



**UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET**



Sonja P. Cekić

**MORFOMETRIJSKA ANALIZA PROMENA NA OČNOM DNU OSOBA
SA DIJABETESNOM RETINOPATIJOM I NJIHOVA KORELACIJA SA
BIOMARKERIMA INFLAMACIJE**

- Doktorska disertacija -

Niš, 2014.



**UNIVERSITY OF NIŠ
MEDICAL SCHOOL**



Sonja P.Cekić

**MORPHOMETRIC ANALYZE OF CHANGES ON FUNDUS IN DIABETIC
RETINOPATHY PATIENTS AND THEIR CORELATION WITH
BIOMARKERS OF SYSTEMIC INFLAMMATION**

- PhD thesis -

Niš, 2014.

Mentor

Prof. dr Predrag Jovanović, redovni profesor Medicinskog Fakulteta
Univerziteta u Nišu

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije

Prof. dr Tatjana Cvetković, predsednik, profesor Medicinskog Fakulteta Univerziteta u
Nišu

Prof. dr Svetislav Milenković, član sa Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Predrag Jovanović, mentor, redovni profesor Medicinskog Fakulteta
Univerziteta u Nišu

Prof. dr Milica Pešić, član, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

Doc dr Gordana Stanković Babić, član, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u
Nišu

Datum odbrane: _____

“Nikada ne žalite što ste upoznali neku osobu u svom životu...

Jer dobre ti daruju sreću...

Loše ti daju iskustvo, a zle ti daju lekciju...

U svakom slučaju dobiješ nešto,

i ne možeš nikako biti gubitnik, jer u životu koliko si naučio, toliko si pobedio...”

(Meša Selimović)

Hvala svima koje sam na ovom putu upoznala

I Autor	
Ime i prezime	Sonja P Cekić
Datum i mesto rođenja	06.08.1973. godine, Niš
Sadašnje zapošljenje	oftalmolog, Klinika za očne bolesti, Klinički centar Niš
II Doktorska disertacija	
Naziv	Morfometrijska analiza promena na očnom dnu osoba sa dijabetesnom retinopatijom i njihova korelacija sa biomarkerima inflamacije
Naučna oblast	Medicina
Uža naučna oblast	Oftalmologija
Ustanova i mesto gde je disertacija rađena	Klinika za očne bolesti, Klinički Centar Niš Centar za medicinsku biohemiju, Klinički Centar Niš Institut za medicinsku biohemiju, Medicinski Fakultet, Univerzitet u Nišu
Mentor	Prof. dr Predrag D. Jovanović
III Ocena i odbrana	
Datum prijave doktorske disertacije	27.09.2011.
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske disertacije	04-809/11 04.12.2013.
Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata	1. Doc dr Gordana Stanković Babić, predsednik 2. Prof. dr Predrag Jovanović, mentor i član 3. Prof. dr Svetislav Milenković, član sa Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije	1. Prof. dr Tatjana Cvetković, predsednik 2. Prof. dr Svetislav Milenković, član sa Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu 3. Prof. dr Predrag Jovanović, mentor 4. Prof. dr Milica Pešić, član 5. Doc dr Gordana Stanković Babić, član
Datum odbrane	

Naučni doprinos disertacije

U disertaciji je potvrđena uloga inflamacija u nastanku i napredovanju promena na očnom dnu ispitanika sa dijabetesnom retinopatijom. Rezultati dokazuju značaj hitinaza 3 proteina 1, novog biomarkera inflamacije, u nastanku i praćenju napredovanja dijabetesne retinopatije. Metodama korelacije je utvrđeno da je hitinaza 3 proteina 1 nezavisan parametar u odnosu na indeks telesne mase i C-reaktivni protein, i potvrđena je njegova pozitivna korelacija sa vrednostima ukupnih sulfhidrilnih grupa i dijametrom krvnih sudova kao i negativna korelacija sa brojem krvnih sudova retine. Hitinaza 3 proteina 1 predstavlja "zlatni standard" praćenja nastanka i progresije dijabetesne retinopatije.

Pregledom očnog dna u midrijazi i fotodokumentacijom, uz merenje spoljašnjeg dijametra krvnih sudova i određivanjem njihovog broja u različitim delovima očnog dna, kao i određivanje biomarkera inflamacije i oksidativnog stresa u krvi i njihovom korelacijom mogu se otkriti rane promene i sprečiti dalja progresija promena na očnom dnu osoba obolelih od dijabetes melitusa tip 2 i očuvati oštrina vida.

Ispitivani biomarker hitinaza 3 protein 1 može se koristiti u kliničkoj praksi pre svega u cilju praćenja dijabetesne retinopatije, kako nastanka tako i progresije, ali i blagovremenog uvođenja terapije.

Rezultati doktorske disertacije su značajni za unapređenja protokola praćenja nastanka i progresije dijabetesne retinopatije.

1. **Cekić S**, Cvetković T, Jovanović I, Jovanović P, Pešić M, Stanković Babić G, Milenković S, Risimić D. C-reactive protein and chitinase 3-like protein 1 as biomarker of spatial redistribution of retinal blood vessels on digital retinal photography in patients with diabetic retinopathy. *Bosn J Basic Med Sci* 2014;114(3):1-8. (M 23)
2. **Cekić S**, Risimić D, Jovanović I, Đorđević Jocić J. Idiopathic polypoidal vasculopathy. *Vojnosanit Pregl* 2012;69(1):85-89. (M 23)
3. Risimić D, Nikolić D, Jakšić V, Simeunović D, Milenković S, Stefanović I, Jaković N, Milić N, **Cekić S**, Babović S. Evolution of body mass index and lipid fractions levels in patients with retinal artery occlusion. *Vojnosanitetski pregled* 2011;68(3):231-233. (M 23)
4. **Cekić S**, Petković T, Stanković-Babić G, Mršić J. Central retinal artery occlusion in a patient with metabolic syndrome X. *J Ophthalmic Vis Res* 2010;5(1):57-60. (M 24)
5. Risimić D, Nikolić D, Simeunović D, Jakšić V, **Cekić S**, Milenković S. Correlation of atherogenic risk factors with retinal artery occlusions in adults. *Med Glas Zenica* 2014; 11(1):110-114. (M 24)
6. **Cekić S**, Višnjić Z, Veselinović D, Jovanović P, Stanković Babić G, Vujanović M. Diabetic papillopathy—two case reports. *Acta Ophthalmologica* 2011;37(1-2):31-35. (M 52)
7. Veselinović A, Cvetanović M, **Cekić S**, Trenkić-Božinović M, Vujanović M, Stojanović K, Trajković I. Obostrana prednje ishemična neuropatija optikusa kao posledica primene amiodarona. *Acta Ophthalmologica* 2014;40(1):39-45. (M 52)
8. **Cekić S**, Jovanović I, Stanković Babić G, Jovanović P, Jakšić V, Mavija M, Krtinić D. Retinal Vascular Occlusive Disorders and Inflammatory Biomarkers of Metabolic Syndrome Clin Trials 2014, 4:2 <http://dx.doi.org/10.4172/2167-0870.1000157> (M 52)
9. **Cekić S**, Višnjić Z., Đorđević Jocić J. Horoidalna neovaskularizacija X Kongres Oftalmologa Srbije 2-3 Oktobar 2009, Novi Sad, Srbija. (M 64)
10. **Cekić S**, Višnjić Z. Okluzivne bolesti venskih krvnih sudova XI Kongres Oftalmologa Srbije sa međunarodnim učešćem, Septembar 2010. (M 64)
11. Novak S, Tomašević B, Mršić J, Džunić B Marković S, **Cekić S**, Knežević A. Smanjenje trajanja ekspoziције kod panretinalne fotokoagulacije u leče pacijenata sa proliferativnom dijabetičnom retinopatijom. XI Kongres Oftalmologa Srbije sa međunarodnim učešćem, Septembar 2010, Subotica. (M 64)
12. **Cekić S**. Hemorrhage in macular region in young women—two cases. SOE/AAO, 4-7 June, 2011 Geneva, Switzerland. (M 34)
13. **Cekić S**, Stanković Babić G, Vujanović M, Mavija M. Diabetic papillopathy—report of three cases. 32nd Balkan Medical Week 21-23 September 2012 Niš, Serbia. (M 34)
14. **Cekić S**, Stanković Babić G, Jovanović P, Jakšić V, Risimić D, Jovanović I, Krtinić D. Retinal Vascular Occlusive Disorders and Metabolic Syndrome. 32nd Balkan Medical Week 21-23 September 2012 Niš, Serbia. (M 34)
15. Risimić D, Simeunović D, Nikolić D, Jakšić V, **Cekić S**, Milenković S, Radosavljević A. Evolution of body mass index and lipid fractions levels in patients with retinal artery occlusions. 12th Euretina Congress 6-9 Milano, September 2012. (M 34)
16. Jakšić V, **Cekić S**, Mirković M, Kosanović N, Đokić O, Stamenković M, Kalezić B. Association of systemic inflammation and severity of diabetic maculopathy. 12th Euretina Congress Milano 6-9 September 2012. (M 34)
17. **Cekić S**, Cvetković T, Jovanović P, Milenković S, Jovanović I, Stanković Babić G, Jakšić V. Biomarkers of Oxidative stress In Diabetic Retinopathy Patients. EURETINA, Rome 2014. (M 34)

MORFOMETRIJSKA ANALIZA PROMENA NA OČNOM DNU OSOBA SA DIJABETESNOM RETINOPATIJOM I NJIHOVA KORELACIJA SA BIOMARKERIMA INFLAMACIJE

Sažetak

Cilj studije: Cilj sprovedene studije bio je utvrđivanje povezanosti standardnih biomarkera inflamacije kao što su sedimentacija, fibrinogen, C-reaktivni protein, holesterol i njegove frakcije trigliceridi kao i novog biomarkera inflamacije hitinaza 3 protein 1 u krvi ispitanika u pacijenata sa različitim stadijumom dijabetesne retinopatije.

Metode: U krvi svih ispitanika određivani su standardni biohemijski parametri (glikemija, holesterol i njegove frakcije, trigliceridi, HbA1c, urea, kreatinin), standardni biomarkeri inflamacije (sedimentacija, fibrinogen, C-reaktivni protein), i hitinaza 3 protein 1, nov biomarker inflamacije. Intenzitet oksidativnog stresa pratili smo određivanjem vrednosti produkata uznapredovale oksidacije proteina, TBA-reagujućih substanci i ukupnih SH grupa. Dobijeni rezultati obrađivani su statističkim programom, Sigma stat verzija 3,5. Korišćeni su Mann-Whitney Rank Sum Test i Studentov t test.

Digitalne slike očnog dna ispitanika, blagom neproliferativnom dijabetesnom retinopatijom i teškom preproliferativnom su podeljene u pet različitih zona, koncentričnih, sa centrom na optičkom disku. Nakon morfološke analize digitalne fotografije su dodatno kvantitativno analizirane uz pomoću sistema za procesiranje i analizu digitalne slike ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Statistički paket SPSS verzija 16 je korišćena za statističku analizu dobijenih rezultata. One Way ANOVA je korišćena za utvrđivanje statističke značajnosti. Dodatne razlike između tri grupe ispitanika analizirane su pomoću Tukey's i Games-Howell post hoc testova.

Rezultati: Redukcija broja krvnih sudova i povećanje njihovog spoljašnjeg dijametra, uočeno je na očnom dnu sa progresijom dijabetesne retinopatije. Parametri sistemske inflamacije bili su statistički značajno viši u ispitanika sa dijabetesom i retinopatijom.

Zaključak: Morfometrijska analiza dijametra i broja krvnih sudova na digitalnim fotografijama očnog dna može biti značajna za skrining dijabetesne retinopatije. Parametri inflamacije kao što su C reaktivni protein, hitinaza 3 protein 1 i parametri oksidativnog stresa su značajni za nastanak i napredovanje dijabetesne retinopatije.

Ključne reči: dijabetesna retinopatija, biomarkeri inflamacije, YKL-40, krvni sudovi retine

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Oftalmologija

UDK broj:

MORPHOMETRIC ANALYZE OF CHANGES ON FUNDUS IN DIABETIC RETINOPATHY PATIENTS AND THEIR CORRELATION WITH BIOMARKERS OF SYSTEMIC INFLAMMATION

Summary

Purpose: The aim of our study was to assess basic inflammatory biomarkers such as erythrocyte sedimentation rate, C reactive protein, plasma fibrinogen, plasma triglyceride, total plasma cholesterol, cholesterol fractions, and as new biomarker of inflammation chitinase-3-like protein-1 in peripheral blood samples of DM2 patients at different stages of diabetic retinopathy, as well as, to try to establish the relationship between their values and the severity of it.

Method: Standard biochemical parameters (fasting glucose, cholesterol and its fractions, triglycerides, HbA1c, urea, creatinine), biomarkers of inflammation (erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein and fibrinogen) as well as new one chitinase-3-like protein-1, and biomarkers of oxidative stress (SH groups, advanced oxidation protein product and TBA-reactive substances) have been measured in blood samples. Sigma Stat package for statistical analyze has been used (Mann-Whitney Rank Sum Test and Student's t-test). Main measures and outcomes: We measure number, diameter of retinal blood vessels on digital photography of retina on optic disc and in five different parts concentric to optic disc, in patients with diabetic retinopathy. Morphometric analysis of digital retinal photography with ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), has been performed in patients with diabetic retinopathy. Differences between morphometric parameters and the blood test analysis results were evaluated with Student's t-test. One Way ANOVA was used to establish the significance of differences. Additional difference between groups were tested with Tukey's and Games-Howell post hoc tests.

Results: Mean number of the blood vessels per retinal zone was significantly higher in the group with DRNP than in the group with DRPP in optic disc and all five retinal zones. The average outer diameter of the evaluated retinal zones and optic disc vessels was significantly higher in the DRPP than in the DRNP group. Inflammatory markers were moderately higher in the DRPP than in the DRNP group, and controls. The values of markers of oxidative stress showed similar trend.

Conclusion: Morphological analyze of digital fundus photography is a valuable for screening of diabetic retinopathy. Inflammatory markers as C-reactive protein, chitinase-3-like protein-1 and markers of oxidative stress may be also important in following of diabetic retinopathy.

Key words: diabetic retinopathy, biomarkers of inflammation, YKL-40, retinal vessels

Scientific field: Medicine

Area of expertise: Ophthalmology

UDK number:

SADRŽAJ

UVOD	
1. PREGLED LITERATURE	1
1.1. DIJABETES MELITUS I DIJABETESNA RETINOPATIJA	1
1.2. TEORIJE PATOGENEZE DIJABETESNE RETINOPATIJE	3
1.2.1. Faktori rasta	3
1.2.2. Sistem renin-angiotenzin	5
1.2.3. Inflamacija	5
1.2.3.1. Biomarkeri inflamacije u dijabetesnoj retinopatiji	7
1.2.3.2. Ukupan broj leukocita	9
1.2.3.3. Sedimentacija	10
1.2.3.4. Fibrinogen	10
1.2.3.5. C-reaktivni protein	11
1.2.3.6. Hitinaza-3 protein 1 (YKL-40)	12
1.2.3.7. Inflamacija i krvni sudovi retine	14
1.2.3.8. Inflamacija i ateroskleroza	15
1.2.4. Oksidativni stres	17
1.2.4.1. Put poliola	18
1.2.4.2. Produkati uznapredovale glikacije (AGE)	18
1.2.4.3. Aktivacija protein kinaze C (PKC)	19
1.2.4.4. Aktivnost heksozaminskog puta	19
1.2.4.5. Oksidativni stres na nivou mitohondrija endotelih ćelija krvnih sudova	20
1.2.4.6. Nemitohondrijalni izvori RVK	21
1.3. STADIJUMI DIJABETESNE RETINOPATIJE	22
2. HIPOTEZA	25
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	26
4. ISPITANICI I METODE	27
4.1. ISPITANICI	27
4.2. OFTALMOLOŠKI PREGLED	27
4.3. ODREĐIVANJE OPŠTIH BIOHEMIJSKIH PARAMETARA KRV I BIOMARKERA INFLAMACIJE	28
4.3.1. Određivanje koncentracije YKL-40	29
4.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA I ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE	29
4.4.1. Određivanje lipidnih peroksida u plazmi ispitanika	29
4.4.2. Određivanje produkata uznapredovale oksidacije proteina u plazmi (AOPP)	29
4.4.3. Određivanje ukupnih sulfhidrilnih grupa (SH)	30
4.4.4. Statistička obrada podataka biohemijskih parametara	30
4.5. MORFOMETRIJSKA ANALIZA PROMENA NA OČNOM DNU KOD ISPITANIKA SA DIJABETESNOM RETINOPATIJOM	30
4.5.1. Statistička obrada morfometrijskih podataka	32
5. REZULTATI	33
5.1. UZRAST, POL ISPITANIKA I DUŽINA TRAJANJA BOLESTI	33
5.2. VREDNOSTI PARAMETARA GLIKOREGULACIJE	34
5.3. VREDNOSTI PARAMETRA AZOTNOG BILANSA I UKUPNIH PROTEINA U KRV I ISPITANIKA	35
5.4. VREDNOSTI BIOMARKERA INFLAMACIJE U KRV I ISPITANIKA	35

5.5. VREDNOSTI LIPOPROTEINA I TRIGLICERIDA U SERUMU ISPITANIKA, VREDNOSTI ATEROGENOG INDEKSA PLAZME I INDEKSA TELESNE MASE ISPITANIKA	37
5.6. PARAMETRI OKSIDATIVNOG STRESA I ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE	39
5.7. KORELACIJA BIOHEMIJSKIH PARAMETARA KRV	43
5.7.1. Korelacije glikoze i glikoziliranog hemoglobina A1c, i glikoziliranog hemoglobina A1c sa lipoproteinima krvi	43
5.7.2. Korelacije biomarkera inflamacije, fibrinogena i C-reaktivnog proteina u krvi ispitanika	44
5.7.3. Korelacije hitinaza-3 proteina 1 u krvi i sedimentacije, fibrinogena i C-reaktivnog proteina	45
5.7.4. Korelacije hitinaza-3 proteina 1 u sa BMI, glikozom i HbA1c	45
5.7.5. Korelacije hitinaza-3 proteina 1 u krvi i parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite	46
5.8. REZULTATI MORFOMETRIJSKE ANALIZE PROMENA NA OČNOM DNU	47
5.8.1. Broj krvnih sudova na optičkom disku	47
5.8.2. Dijametar krvnih sudova na optičkom disku	48
5.8.3. Broj i dijametar krvnih sudova u različitim zonama očnog dna	49
5.8.4. Mikromorfološke promene u različitim zonama očnog dna	54
5.9. KORELACIJA BROJA I VREDNOSTI SPOLJAŠNJEG DIJAMETRA KRVNIH SUDOVA RETINE SA BIOMARKERIMA INFLAMACIJE, C-REAKTIVNIM PROTEINOM, HITINAZA-3-PROTEIN 1 I UKUPNIM SULFHIDRILNIM GRUPAMA	57
6. DISKUSIJA	60
6.1. DEMOGRAFSKI FAKTORI	60
6.2. BIOHEMIJSKI PARAMETRI KRV KOD ISPITANIKA SA DIJABETESNOM RETINOPATIJOM	61
6.2.1. Nivo glikoze u krvi	63
6.2.2. Glikozilirani hemoglobin A1c (HbA1c)	64
6.2.3. Parametri azotnog bilansa	65
6.2.4. Lipoproteini i trigliceridi u serumu ispitanika sa dijabetesnom retinopatijom	65
6.2.5. Aterogeni indeks	69
6.2.6. Indeks telesne mase	71
6.3. BIOMARKERI INFLAMACIJE U KRV ISPITANIKA SA DIJABETESNOM RETINOPATIJOM	71
6.3.1. Sedimentacija	72
6.3.2. Fibrinogen	73
6.3.3. C-reaktivni protein	74
6.3.4. Hitinaza-3 protein 1 (YKL-40)	76
6.4. PARAMETRI OKSIDATIVNOG STRESA I ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE	78
6.4.1. Parametri oksidativnog stresa	79
6.4.2. Antioksidativni status	81
6.5. MORFOMETRIJA PROMENA NA OČNOM DNU ISPITANIKA SA DIJABETESNOM RETINOPATIJOM	83
6.5.1. Broj i spoljašnji dijametar krvnih sudova	83
6.5.2. Morfometrijska analiza promene u različitim zonama očnog dna	86
7. ZAKLJUČCI	88
8. LITERATURA	90

Uvod

Dijabetesna retinopatija je mikrovaskularna komplikacija dijabetes melitusa koja dovodi do oštećenja krvnih sudova retine, smanjenja perfuzije, nastanka ishemije i oštećenja funkcija retine. Prema istraživanju Međunarodne federacije za dijabetes (International Diabetes Federation), procenjuje se da od dijabetesa trenutno u svetu boluje približno 285 miliona ljudi. Predpostavlja se da će, do 2030. godine, broj obolelih od dijabetesa premašiti cifru od 552 miliona. Isti izvor navodi da 4,6 miliona ljudi umire od posledica dijabetesa, a procenjeni troškovi lečenja i prevencije iznose 465 milijardi američkih dolara na godišnjem nivou. Između 60-80% direktnih troškova ne odnosi se na lečenje osnovne bolesti, već se utroši na zbrinjavanje njenih komplikacija.

Dijabetesna retinopatija je vodeći uzrok gubitka oštine vida i slepila radno sposobnog stanovništva. Više od 12000 ljudi obolelih od dijabetesa godišnje oslepi usled razvoja retinopatije. U trenutku postavljanja dijagnoze dijabetes tip 2, često već postoje početne promene na očnom dnu. U prvih 20 godina, kod 60% obolelih od dijabetesa se razvije neka forma dijabetesne retinopatije.

Učestalost dijabetesa u našoj zemlji kreće se oko 8,6%, što znači da od dijabetesa u Srbiji trenutno boluje oko 630 000 ljudi. Procene ukazuju da će se broj osoba sa dijabetesom, u našoj zemlji do 2030. godine povećati na 10,2% populacije, odnosno oko 730 000 ljudi. Više od 90% obolelih od dijabetesa ima dijabetesa tip 2. Najveći broj osoba sa dijabetesom tip 2 je uzrasta između 40-59 godina starosti, mada se u poslednje vreme sve češće otkriva i kod mlađih osoba. Simptomi dijabetesa tipa 2 su blagi, bolest često protiče neopaženo i dijagnostikuje se kada su već prisutne komplikacije.

Prema podacima Registra za dijabetes u Srbiji, godišnje se u proseku, evidentira približno 17 000 novih slučajeva dijabetesa tip 2, a u trenutku postavljanja dijagnoze, trećina novoobolelih već ima jednu ili više kasnih komplikacija-ishemijsku bolest srca, moždani udar, dijabetesno stopalo, retinopatiju, neuropatiju ili nefropatiju. Za 2008-2009. godinu prevalenca hroničnih komplikacija kod prijavljenih bolesnika sa dijabetesom tip 2 u Srbiji iznosi za retinopatiju 4,6%. Za 2010. godinu, ukupan broj prijavljenih slučajeva sa dijabetesom tip 2 je 853, u Nišavskom okrugu. Precizan broj osoba sa prisutnim mikrovaskularnim komplikacijama u Nišavskom okrugu nije poznat, obzirom da ne postoji adekvatno prijavljivanje samog oboljenja kao i njegovih mikrovaskularnih komplikacija.

Uprkos dobroj kontroli glikemije, krvnog pritiska i upotrebi terapije za regulaciju nivoa masnoće u krvi, broj bolesnika sa retinopatijom raste, a terapijski postupci su još uvek ograničeni. Prisutna su i značajna ograničenja, kao i brojni neželjeni i sporedni efekti dosadašnje terapije. Otud, postoji potreba za razvojem nove strategije prevencije i lečenja dijabetesne retinopatije.

1. PREGLED LITERATURE

1.1. DIJABETES MELITUS I DIJABETESNA RETINOPATIJA

Dijabetes melitus (DM) je grupa metaboličkih bolesti koju karakteriše hronična hiperglikemija, nastala zbog deficita u sekreciji insulina, rezistencije tkiva na njegovo dejstvo, ili usled istovremenog prisustva oba poremećaja (American Diabetes Association, 2013). Pored poremećaja u metabolizmu glikoze, u dijabetesu je poremećen metabolizam masti i proteina.

Mehanizmi uključeni u nastanak DM su: autoimuna destrukcija β ćelija pankreasa, koja dovodi do deficita insulina i rezistencija tkiva na dejstvo insulina (American Diabetes Association, 2013). Poremećaj insulinske sekrecije i deficit dejstva insulina najčešće su istovremeno prisutni. Nedovoljno je jasno koji poremećaj je primarni uzrok hiperglikemije.

Prema etiopatogenetskom mehanizmu, DM kategorishemo u 4 osnovne kategorije:

1. dijabetes tip 1
2. dijabetes tip 2
3. drugi specifični oblici dijabetesa
4. gestacijski dijabetes.

U dijabetesu tip 1 (DMT1) prisutan je apsolutni deficit sekrecije insulina. Dijabetes tip 2 (DMT2) je češći, u oko 90-95 % svih pacijenata sa dijagnozom DM. Ovaj tip dijabetesa nastaje prevashodno usled rezistencije na dejstvo insulina sa relativnim deficitom u njegovoj sekreciji.

Dijabetes dovodi do nastanka različitih komplikacija, koje možemo svrstati u akutne i hronične komplikacije DM. Akutne komplikacije su: dijabetesna ketoacidoza, laktatna acidoza, dijabetesno neketogeno hiperosmolarno stanje i hipoglikemija (Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje dijabetes mellitusa, 2012). Hronične komplikacije, su hroničnog progresivnog toka, zahvataju krvne sudove i mogu biti makrovaskularne i mikrovaskularne. Makrovaskularne komplikacije predstavljaju agresivnu formu ateroskleroze. One dovode do povećane učestalosti infarkta miokarda, infarkta mozga i gangrene

stopala u osoba obolelih od dijabetesa. U nastanku ateroskleroze značajnu ulogu igraju abnormalnosti u zidu krvnog suda, trombocitima, eritrocitima i metabolizmu lipida. Pušenje i hipertenzija takođe igraju značajnu ulogu. Mikrovaskularna bolest koja zahvata retinu dovodi do dijabetesne retinopatije, zahvatanje bubrega dovodi do dijabetesne nefropatije, a vasa nervorum do dijabetesne neuropatije. Bolest malih krvnih sudova može zahvatiti i srce, tako da se opisuje kardiomegalija sa srčanom insuficijencijom.

Na očima, kod bolesnika sa DM, mogu se javiti različite promene: na kapcima nastaju xanthelasme, menja se sastav suznog filma, smanjuje osetljivost rožnjače, nastaju erozije i bakterijske infekcije. Na dužici može doći do razvoja novih krvnih sudova i mioze. Dijabetes je udružen sa nastankom primarnog glaukoma otvorenog ugla i sekundarnog neovaskularnog glaukoma. Kod osoba sa dijabetesom dolazi do poremećaja refrakcije oka i 2-4 puta povećava rizik od nastanka zamućenja u sočivu. Uzrok je prednjih uveita, oštećenja optičkog nerva i nastanka dijabetesne retinopatije (RD) (Tharnalley i Kempler, 2008).

Dijabetesna retinopatija je mikrovaskularna komplikacija DM koja predstavlja odgovor na sistemski poremećaj i dovodi do oštećenja krvnih sudova retine, smanjenja perfuzije, nastanka ishemije i oštećenja funkcija retine (Diabetic Retinopathy Guidelines, RCOphth, 2012). Retinalno tkivo čini veliki broj ćelija od čije međućelijske komunikacije zavisi normalno funkcionisanje retine. Hronična hiperglikemija oštećuje većinu ćelija retine: ćelije krvnih sudova retine (endotelne ćelije i pericite), neurone (fotoreceptore, bipolarne, horizontalne, amakrine i ganglionarne), glijalne ćelije (Miller-ove ćelije i astrocite), mikroglialne i ćelije retinalnog pigmentnog epitela (RPE) (Duker, 2004). Neposredno pre oštećenja, ove ćelije se aktiviraju i proizvode različite medijatore: faktore rasta, vazoaktivne supstance, proinflamatorne faktore, faktore koagulacije i adhezije molekule (Abu El-Asrar i sar., 2004; Adamis i Berman, 2008; Abu El-Asrar i sar., 2009). Oslobođeni medijatori dovode do povećanja protoka krvi, povećane kapilarne propustljivosti, proliferacije ekstracelularnog matriksa, zadebljanja bazalne membrane krvnih sudova, ubrzane ćelijske modifikacije (apoptoze, proliferacije, hipertrofije ćelija), prokoagulantnih i proagregacionih materija. Opisane promene, dovode do angiogeneze i remodelacije tkiva (Ceriello, 1993; Brownlee, 2005a; Caballero i sar., 2007; Goldberg, 2009). Oštećenja ćelija retine usled DM zavisi od nivoa glikoze u krvi, lipida, hormona, aminokiselina i biomarkera inflamacije (Schubert, 2004; Kern, 2007).

Histološkim studijama, uočene vaskularne lezije u ranim stadijumima RD karakteriše prisustvo sakularnih kapilarnih mikroaneurizmi nastalih gubitkom pericita, obliteracijom i degeneracijom kapilara (Bresnick, 1977; Blair i sar., 2008). Promene u zidu kapilara menjaju propusnu moć i dovode do redukcije retinalne perfuzije. Mehanizmi koji doprinose degenera-

ciji retinalne kapilarne mreže su: okluzija lumena krvnih sudova trombocitima i leukocitima, apoptoza kapilarnih ćelija sekundarno nastala biohemijskim procesima u samim ćelijama krvnih sudova i sekundarnim produktima okolnih ćelija, pre svega neurona i glijalnog tkiva (Kern, 2007).

Gubitak ganglijskih ćelija dokazan je u humanom tkivu i u retini eksperimentalnih životinja. Neurodegenerativne promene, nastaju rano, zbog čega se neurodegeneracija može smatrati prediktivnim faktorom u razvoju oštećenja ćelija krvnih sudova (Calcutt i sar., 2009). Fenotipsko ispoljavanja fibrilarnog kiselog proteina (GFAP), znaka glijalne aktivacije, utiče na stepen oštećenja glijalnih ćelija (Schubert, 2004).

Osnovni biohemijski procesi povezani sa hroničnom hiperglikemijom i potvrđeni u tkivu retine osoba sa DM su: aktivaciju protein kinaza C (PKC), povećani nastanak produkata uznapredovale glikacije (AGEs), nastanak poliola, intenziviranje puta heksozamina, aktivaciju renin-angiotenzin sistema (RAS) i povišena produkcija reaktivnih vrsta kiseonika (RVK) (Mohamed, 2007; Cefalu, 2009; Stolba, 2008).

Tačan mehanizam nastanka, redosled dešavanja i uloga svakog od navedenih procesa u nastanku promena na očnom dnu bolesnika sa DM nije u potpunosti poznata.

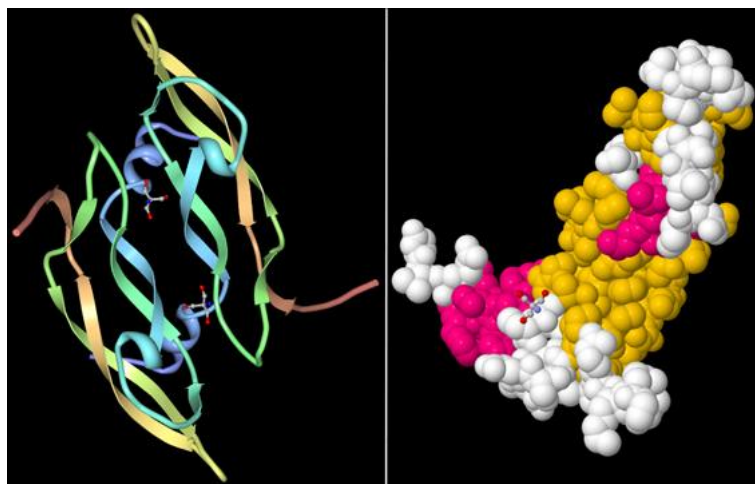
1.2. TEORIJE PATOGENEZE DIJABETESNE RETINOPATIJE

1.2.1. Faktori rasta

Smatra se da faktori rasta imaju značajnu ulogu u nastanku i progresiji RD (Gariano, 2005; Feng i sar., 2009; Gaengel, 2009).

Michaelson je pre 65 godina postavio koncept stimulacije neovaskularnih retinopatija koju uzrokuje nepoznati faktor (Michaelson, 1948). Ovaj „faktor“ je tada označen kao „x faktor“, danas poznat kao vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) (Homayouni, 2009)(slika 1). Vaskularni endotelni faktor rasta smatra se ključnim faktorom angiogeneze i vaskularne propustljivosti (Al-Kateb i sar., 2007; Gaengel, 2009, Sapiuha i sar., 2010).

Porodica VEGF obuhvata placentarni faktor rasta (PLGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i VEGF-E (Homayouni, 2009). Vaskularni endotelni faktor rasta - A se smatra najodgovornijim za nastanak patološke neovaskularizacije u oku (Gariano, 2005; Zhang, 2006; Engin i sar., 2010) (slika 1).



Slika 1. Vaskularni endotelni faktor rasta (www. RCSB-Protein Data Bank).

Na eksperimentalnim modelima je dokazano da VEGF ima ulogu u nastanku i regresiji neovaskularizacije (Gerhardt, 2003; Carmeliet, 2003). U humanim uzorcima staklastog tela kod bolesnika sa proliferativnom formom RD dokazana je povećana koncentracija VEGF (Sapieha, 2010).

Gen koji reguliše sintezu VEGF-A nalazi se na hromozomu 6p12.3 i sastoji se iz 8 egzona i 8 umetnutih introna (Homayouni, 2009). Miller-ove ćelije i ganglijske ćelije retine smatraju se osnovnim izvorom VEGF-A u oku. Postoji devet izoformi ovog molekula VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₄₈, VEGF-A₁₆₂, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A_{165b}, VEGF-A₁₈₃, VEGF-A₁₈₉ i VEGF-A₂₀₆ (Statton i sar., 2000; Stalmans i sar., 2002). Različite izoforme ovog molekula poseduju različite afinitete prema vezivanju za protein-sulfat proteoglikana ćelijskih membrana (Perrin i sar., 2005, Penn i sar., 2008). Svoje efekte ostvaruje vezujući se za receptore, VEGF receptor 1 i receptor 2, i aktivira tirozin kinaza signalni put. Receptor 2 za VEGF se smatra značajnijim u procesu neovaskularizacije (Qaum i sar., 2001; Kitada i sar., 2010).

Vaskularni endotelni faktor-A indukuje angiogenezu migracijom endotelних ćelija, stimulacijom mitoze, uticajem na aktivnost metan monooksigenaze, integrina, vitronectin receptora ($\alpha\beta 3$). On utiče na održanje lumena krvnog suda kao i na nastanak i održavanje fenestri na lumenu krvnih sudova retine (Gargalovic, 2006; Krady i sar., 2005). Vaskularni endotelni faktor A održava integritet RPE, Bruhove membrane i endotelних ćelija krvnih sudova horoideae (Zhang i Wang, 2006; Ruiz, i sar., 2009). Najverovatnije inhibira apoptozu endotelних ćelija, pa se smatra faktorom njihovog opstanka.

Poznato je da VEGF A deluje hemotaktično na makrofage i granulocite i da izaziva vazodilataciju uzrokovanu produkcijom azot monoksida (NO)(Caldwell i sar., 2005; Zhang i Wang, 2006). Povećana propustljivosti krvnih sudova, hemotaktično dejstvo na monocite i

granulocite objašnjava ulogu VEGF A u procesu inflamacije i nastanku makularnog edema kod bolesnika sa RD (Noguyen i Tatlipinar, 2006).

Upotreba inhibitora VEGF, anti-VEGF, uspešno suprimira neovaskularizaciju uzrokovanu hipoksijom (Wong i sar., 2006; Tammela i sar., 2008). Dejstvom VEGF može se objasniti neovaskularizacija, međutim, VEGF ne predstavlja direktnu vezu između hiperglikemije i oštećenje vaskularne mreže retine kod osoba sa DM.

1.2.2. Sistem renin-angiotenzin

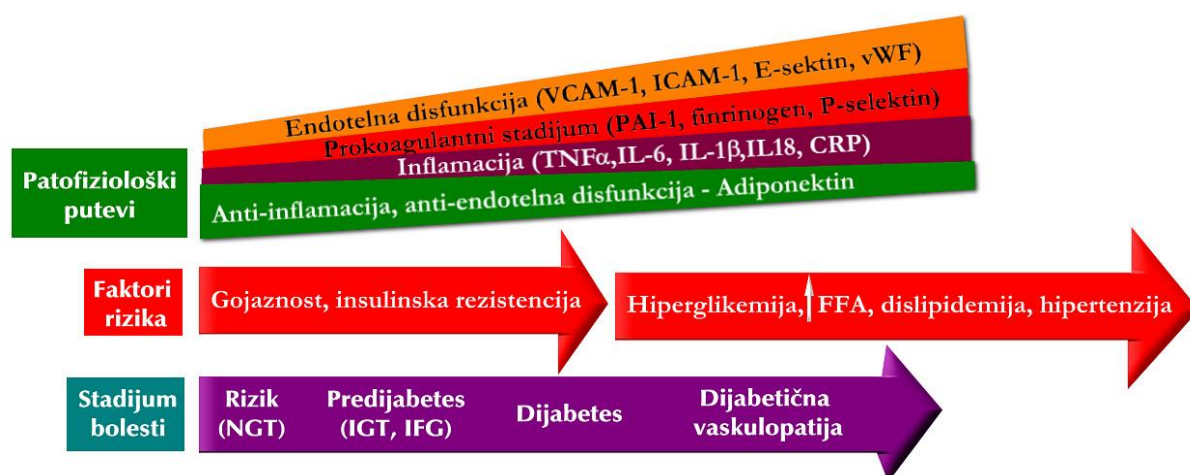
Novije teorije patogeneze RD ukazuju na vezu aktivacije sistema RAS sa nastankom i progresijom RD. Angiotenzin II, krajnji produkt sistema RAS, putem receptora tip 1 (AT1R), dovodi do povećane sinteze intracelularnog adhezionog molekula (ICAM-1) i VEGF na nivou retine (Yao i sar., 2008; Tammela i sar., 2008). Povećana sinteza ICAM povećava adheziju leukocita i leukostazu na nivo retinalnih krvnih sudova dovodi do inflamacije, ishemije i dodatne produkcije VEGF. Vaskularni endotelni faktor rasta povećava vaskularnu permeabilnost, vezuje se za receptore AGE (RAGE) i potencira produkciju RVK na nivou endotelних ćelija krvnih sudova retine (Silva i sar., 2009.) Angiotenzin II direktno indukuje sintezu nuklearnog faktora kapa B (NF- κ B) i utiče na apoptozu endotelних ćelija.

Vezujući se za receptor AT1R, utiče na posttranskripcionom nivou na sintezu sinaptofizina, glavnog proteina na nivou sinapse neuroretinalnog tkiva, smanjujući njegovu sintezu. Aktivacijom sistema proteaza (UPS) dovodi do povećane razgradnje sinaptofizina u neuroretinalnim ćelijama. Dakle, sistem RAS aktiviranjem procesa inflamacije i poremećajem procesa neurotransmisije na nivou neuroretinalnog sloja može dovesti do nastanka i progresije RD.

1.2.3. Inflamacija

Inflamacija je nespecifični odgovor na oštećenje u kome učestvuje veliki broj funkcionalnih molekula i medijatora. Primarni efekat inflamacije je koristan, ali tokom hronične faze ona može imati i neželjene efekte na tkivo (Kayser 2009; Kim i sar., 2010). Povećana ekspresija brojnih inflamatornih markera regulisana je na nivou genetske transkripcije kroz aktivaciju proinflamatornih transkripcionih faktora, uključujući NF- κ B (Romeo i sar., 2002; Zheng i sar., 2004). Ovi proinflamatorni transkripcioni faktori imaju aktivnu i kritičnu ulogu u pojačavanju i ubrzavanju inflamacije i doprinose oštećenju ćelija i apoptozi.

Dijabetesna retinopatija dugo vremena nije bila prepoznata kao inflamatorna bolest jer se retina smatrala imunoprivilegovanim tkivom. Međutim, brojne studije dokazuju da je sistemska inflamacija mogući pokretački mehanizam DM i nastanka vaskularnih komplikacija ove bolesti (Adamis, 2002; Adamis i Berman, 2008; Kern, 2007). Tipični klinički znaci RD, edem i neovaskularizacija karakteristični su za inflamatorne procese i sugerišu potencijalnu ulogu inflamacije u patogenezi RD (Kern, 2007; Blair i sar., 2008; Bek, 2010)(slika 2).



Slika 2. Inflamacija, disfunkcija endotela i prokoagulantno stanje: konceptualni dijagram koji povezuje patogenetske puteve sa faktorima rizika za progresiju dijabetesa i nastanak makro i mikrovaskularnih komplikacija.

Razmatranje da je inflamacija bitan patogenetski faktor za nastanak i progresiju RD pokrenulo je veći broj studija o udruženosti biomarkera sistemske inflamacije sa RD kao što su: fibrinogen, sedimentacija, C-reaktivni protein (CRP), interleukin 1, 6 i 8 (IL-1, IL-6 i IL-8), tumor nekrosis faktor α (TNF α), ICAM, vaskularni celularni adhezioni molekul (VCAM 1) i inducibilna azot oksid sintetaza (iNOS) (Alexandraki i sar., 2006, Fiedler i sar., 2006; Yoshimura i sar., 2009; Andereassen i sar., 2010). Međutim, navedena ispitivanja su dala limitirajuće i ponekad kontradiktorne rezultate o direktnoj ulozi inflamacije u patogenezi promena na krvnim sudovima retine kod bolesnika sa RD (Lee i sar., 2008). Studije koje su sprovele Jousen (2004) i Spijkerman (2007) potvrđuju povezanost RD sa biomarkerima inflamacije, dok studije koje su sprovele Bild (2002), Schram (2005) i Van Hecke (2005) opovrgavaju ovu povezanost. Giebel i sar. (2005) su uočili povišene vrednosti matriks metaloproteinaza (MMP) i to MMP-2/želatinaze A, kao i MMP-9/želatinaze B u epiretinalnim membranama na animalnim modelima. Povišenim vrednostima MMP se može objasniti oštećenje bazalne membrane krvnih sudova, migracija endotelних ćelija i njihova proliferacija, i nastanak acelularnih krvnih sudova kod pacova sa proliferativnom formom RD. U uzorcima očne vodice

ispitanika sa proliferativnom RD uočen je povišen nivo IL-8, MMP-9, VEGF, ICAM i proteinskog derivata izolovanog iz epitela (PEDF) (Petrovic i sar., 2007; Funatsu i sar., 2009).

Razlike u rezultatima studija povezane su najverovatnije sa razlikom u stadijumima same RD, veličinom uzorka, neadekvatnom kontrolom kofaktora, čestim korišćenjem animalnih modela (Tapp i sar., 2003).

Otežavajuće činjenice za proučavanje biomarkera inflamacije u tkivu oka su: relativno mala količina humanog retinalnog tkiva, staklastog tela, epiretinalnih membrana i očne vodice dostupna istraživanju (Stalmans i sar., 2002; de Gooyer, 2006, Tikhonenko i sar., 2010). Metode uzorkovanja su komplikovane i invazivne, što otežava njihovu primenu u svakodnevnoj praksi.

Činjenicu da retinalno tkivo nije izvor inflamacije, već da do retine dospevaju biomarkeri inflamacije sistemskom cirkulacijom, oštećujući vaskularnu mrežu retine, opravdava praćenje sistemskih biomarkera inflamacije u krvi.

1.2.3.1. Biomarkeri inflamacije u dijabetesnoj retinopatiji

Potvrđeno je da se u osnovi nastanka i razvoja mikrovaskularnih promena kod bolesnika sa DMT2 nalazi hronična inflamacija. Pouzdani biomarkeri sistemske inflamacije u cirkulaciji, i njihova međusobna korelacija, su predmet brojnih istraživanja. Najčešće istraživani su: ukupan broj leukocita, sedimentacija, fibrinogen, CRP, serum amiloid A (SAA), TNF- α , tkivni plazminogen aktivator, IL-6, homocistein, D-dimer, ICAM-1 čije su koncentracije povećane tokom nastanka mikroangiopatije (Abiko i sar., 2003; Abu El-Asrar i sar., 2004; Brucklacher i sar., 2008).

Serum amiloid A je reaktant akutne faze inflamacije i pripada grupi porodice apolipoproteina. sintetiše se u jetri, ima važnu ulogu u transportu holesterola do jetre i njegovoj ekskreciji iz žuči, kao i u aktivaciji ćelija imuniteta na mestu inflamacije. Serum amiloid A je značajan biomarker u hroničnim inflamatornim bolestima kao što su amiloidoza, ateroskleroza i reumatoidni artritis. Novije studije pokazuju i njegovu direktnu korelaciju sa sedimentacijom i indeksom telesne mase (*eng.* body mass index-BMI) (Sattar, 2012).

Beaver Dam Eye Study je pokazala korelaciju povećanja dijametra venula i smanjenje dijametra arteriola sa povećanjem koncentracije CRP-a, IL-6 i SAA u serumu ispitanika sa DM (Klein i sar., 2006). Uloga SAA u promeni dijametra krvnih sudova retine može objasniti i aktivaciju pojedinih enzima koji dovode do degradacije ekstracelularnog matriksa. C-reaktivni protein i SAA su biomarkeri inflamacije, ali se razlikuju u odnosu na grupe citokina preko kojih ostvaruju svoje efekte (Sattar i Hingorani., 2009). SAA se smatra senzitivnijim

biomarkerom inflamacije u kardiovaskularnim i ne kardiovaskularnim procesima, nego u pokrenutim inflamatornim mehanizmina odgovornim za nastanak retinalnih mikrovaskularnih promena.

Interleukin 6 pripada grupi inflamatornih citokina. U humanojoj populaciji je kodiran IL-6 genom, koji ima različite uloge u limfoidnom i non limfoidnom tkivu (Mocan i sar., 2006). Značajan je za produkciju i diferencijaciju B ćelija, kao i indukciju proizvodnje imunoglobulina, kao što je IgE. Učestvuje u promociji T ćelija i njihovoj diferencijaciji, a zajedno sa IL-3 učestvuje u procesu hematopoeze, posebno neutrofila. Učestvuje u sintezi biomarkera akutne faze inflamacije: fibrinogena, SAA, haptoglobina, CRP na nivou hepatocita. Interleukin 6 indirektno, putem porasta biomarkera inflamacije povećava sedimentaciju (Mzslawiec i sar., 2008). Lako prolazi krvno-moždanu, ali i barijeru krv-retina i može se uzorkovati iz očne vodice i staklastog tela. Dokazno je da ga sekretuju i adipociti, makrofagi. Interleukin 6 proizvode i adipociti, što objašnjava povišene vrednosti kod gojaznih. Dokazana je i produkcija na nivou glatkomišićnih ćelija i tunike mediae krvnih sudova, gde je potvrđeno da ostvaruje, pre svega, proinflamatorno dejstvo. Smatra se da IL-6 ima značajnu ulogu u nastanku oboljenja, kao što su DM, ateroskleroza, depresija, sistemski lupus, multipli mijelom, Alzheimer-ova bolest, karcinom prostate, reumatoidni artritis (Ishihara i Hirano, 2003).

Tumor nekroza faktor α je citokin uključen u akutnu fazu inflamatornog odgovora. Proizvode ga makrofage, $CD4^+$ limfociti, mastociti, endotelne ćelije, adipociti, fibroblasti, mišićne ćelije srca i neuroni. Tumor nekroza faktor α reguliše aktivnost brojnih ćelija uključenih u imuni odgovor i učestvuje u ćelijskoj apoptozi (Mzslawiec i sar., 2008). Povišen nivo TNF α na nivou jetre stimuliše sintezu biomarkera akutne faze, podiže nivo CRP-a, indukuje insulinsku rezistencu, omogućava migraciju neutrofila i deluje potencijalno hemotaktično, stimuliše fagocitozu i produkciju IL-1, oksidansa i inflamatornog lipida, prostaglandina E2 (PGE2) (Trujillo i Scherer, 2006). Tumor nekroza faktor α se može detektovati u očnoj vodici bolesnika sa DM. Koncentracija ovog citokina u očnoj vodici korelira sa njegovom koncentracijom u plazmi i stepenom uznapređovalosti RD (Mzslawiec i sar., 2008). Tumor nekroza faktor α dovodi do endotelne disfunkcije, indukuje leukocitno endotelnu adheziju, indukuje NADPH oksidaznu aktivnost i produkciju RVK, (Al-Shabrawey i sar., 2006). U *in vivo* studijama TNF α podstiče angiogenezu VEGF-posredovanim putem, dovodi do povećane vaskularne permeabilnosti i narušava barijeru krv-retina.

Biomarkeri, koji mogu imati ulogu u nastanku i evoluciji mikrovaskularnih komplikacija kod bolesnika sa DM2 su: eritropoetin, pentozidin, cistatin C, rezistin, F2t-iso-prostaglandin, paraoksonaza 1, homocistein (Dyer i sar., 1991; Hofman i sar., 1998; Kaviarasan i

sar., 2009). Cistatin C, rezistin, F2t-iso-prostaglandin i homocistein pokazuju značajnu povezanost sa nastankom dijabetesnoj nefropatije (Hultberg i sar., 1991; Salman i sar., 2009; Massaki i sar., 2010; Kerkein i sar., 2012). F2t-iso-prostaglandin i pentozidin, paraoxonaza 1 i ceruloplazmin su značajni biomarkeri oksidativnog stresa kod bolesnika sa DMT2 i mogući su pokazatelji hroničnih mikrovaskularnih komplikacija (Kaysen, 2009).

Posebano značajan izvor biomarkera inflamacije predstavlja masno tkivo. Adipociti produkuju brojne biomarkere inflamacije (IL-6, TNF α), i utiču na metabolizam ugljenih hidrata, lipida i sekreciju insulina. Dokazana je pozitivna korelacija između povećane količine masnog tkiva i biomarkera inflamacije kao što je CRP. Adipociti luče i adipokine, kao što je adiponektin, koji ostvaruje pozitivan efekat na smanjenje inflamacije i poboljšanje funkcije endotelних ćelija (Trujillo i Scherer, 2006).

Prema prisutnim podacima u literaturi, za sada ne postoji definisan biomarker kojim bi se mogao pratiti nastanak i progresija diabetesne retinopatije.

1.2.3.2. Ukupan broj leukocita

McLeod i sar. (1995) su prvi dokazali da se u krvi krvnih sudova retine kod osoba sa RD nalazi povišen broj leukocita. Jousen i sar. (2004) su dokazali da je povećana propustljivost krvnih sudova retine, kapilarna non perfuzija i oštećenje endotelних ćelija, privremenog karaktera i da je u vezi sa stazom leukocita na nivou retinalne vaskulature. Promene u zidu malih krvnih sudova retine, pre svega na animalnim modelima i *in vitro* istraživanjima, obuhvataju: promene u dijametri i broju retinalnih krvnih sudova, migraciju i redukciju pericita i endotelних ćelija retine, nastanak acelularnih kapilarnih krvnih sudova i zadebljanje bazalne membrane krvnih sudova retine. Međutim, tačna uloga povećanja broja leukocita u sistemske cirkulaciji nema za sada adekvatnog objašnjenja. Jousen i sar. (2004) iznose pretpostavku da, pre svega, kod ispitanika sa DM, neutrofili, putem Fas-Fas ligand zavisnog tipa, indukuju apoptozu endotelних ćelija retine i dovode do sloma barijere krv-retina, koja se smatra ključnim mehanizmom nastanka RD.

Roterdamska studija dokazuje povezanost povišenog broja leukocita u krvi kod osoba sa DMT2 i RD sa povećanjem dijametra venula i dilatacijom kapilara (Ikram i sar., 2004). Klinička studija preseka, koja je sprovedena na 30793 korejskih ispitanika, dokazala je povećanje broja neutrofila u krvi i njihovu povezanost sa prisustvom i težinom RD (Woo i sar., 2011).

Mehanizam dejstva leukocitoze, pre svega neutrofilije, u nastanku RD može se za sada objasniti dvema hipotezama: 1) kod ispitanika sa DM neutrofili, putem Fas-Fas ligand zavis-

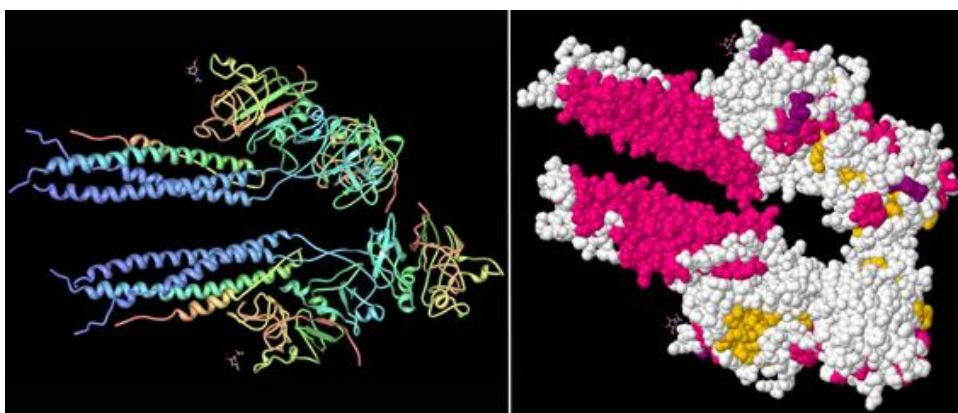
nog tipa, indukuju apoptozu endotelnih ćelija retine i dovode do sloma barijere krv-retina, koja se smatra ključnim nastanka RD; 2) nastanakom kvalitativnih izmena samih neutrofila usled hronične hiperglikemije (Woo i sar., 2011).

1.2.3.3. Sedimentacija

Sedimentacija je najstariji parametar akutne inflamacije. Woo i sar. (2011) u svojoj studiji univarijantnom analizom pokazuju povezanost sedimentacije kod bolesnika sa DMT2, sa ukupnim brojem neutrofila i leukocita, kao i njihov međusobni odnos. U istoj studiji je uočeno da i ako je nivo sedimentacije pokazao statistički značajnu razliku između osoba sa DMT2 i zdravih ispitanika, sprovedenom univarijantnom statističkom analizom uočena je obrnuta povezanost sedimentacije i HbA1c i ili nivoa glikoza u krvi (Woo i sar., 2011).

1.2.3.4. Fibrinogen

Fibrinogen je jedan od u najproučavanijih parametra inflamacije. On se kao i CRP, smatra se prediktorom letalne i neletalne koronarne bolesti, moždanog udara i periferne vaskularne bolesti (Ernst i Resch, 1993; Klein i sar., 2003; Le Duc Son i sar., 2008)(slika 3).



Slika 3. Struktura fragmenta humanog fibrinogena (www.RCSB-Protein Data Bank).

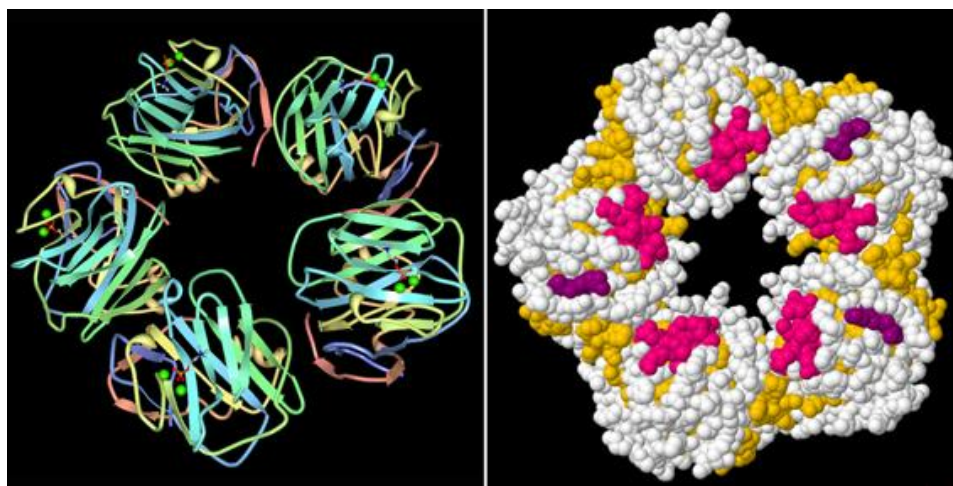
Schram i Folsom u svojim studijama potvrđuju snažnu korelaciju između vrednosti fibrinogena i CRP-a sa nastankom i razvojem mikrovaskularnih komplikacija DM (Folsom i sar., 2000; Schram i sar., 2005). Dokazana je povezanost CRP-a sa okluzijom arterije centralis retine kod bolesnika sa metaboličkim sindromom (Jaković Kosanović i sar., 2005).

Le Duc Son i sar. (2008) iznose podatke da je pojava navedenih mikrovaskularnih komplikacija direktno povezana sa koncentracijom fibrinogena u plazmi i udružena sa rizikom od nastanka kardiovaskularnih bolesti. Koncentracija fibrinogena u plazmi je u direktnoj vezi sa stepenom uznapređovalosti RD i ne zavisi od visine krvnog pritiska i težine nefropa-

tije (Asakawa i sar., 2000; Kedzierska i sar., 2005). Povećana koagulabilnost doprinosi oštećenju endotelnih ćelija i može objasniti nastanak mikrovaskularnih komplikacija.

1.2.3.5. C-reaktivni protein

C-reaktivni protein otkrili su Tillett i Francis 1930. godine. Gen za CRP nalazi se na prvom hromosomu i sadrži samo jedan intron (Qu i sar., 2009). Sintetiše se u hepatocitima, a njegovu sintezu reguliše IL-6 na posttranskripcionom nivou (Devaraj i sar., 2009; Devaraj i sar., 2009a). Interleukin 6 i IL-1 β kontrolišu ekspresiju i drugih biomarkera inflamacije na posttranskripcionom nivou, kao što su fibrinogen i SAA (Eisenhardt i sar., 2009). Ekstrahepatična sinteza CRP-a opisana je u neuronima, aterosklerotičnim plakovima, monocitima i limfocitima (Lippi i sar., 2010). Mehanizam regulacije ekstrahepatične sinteze CRP-a kao i njen uticaj na koncentraciju CRP-a u plazmi, nije poznat. Molekul CRP-a sastoji se od pet identičnih, nekovalentno povezanih 23 kDa protomera, simetrično poređanih oko jedinstvene strukture, centralne pore (slika 4).



Slika 4. C-reaktivni protein (www.RCSB-Protein Data Bank)

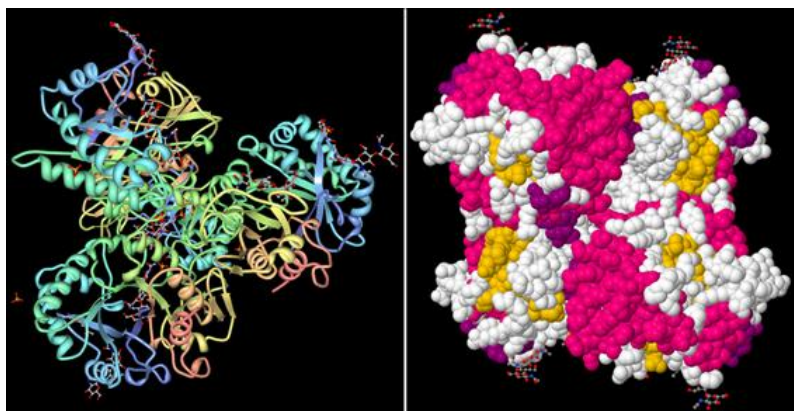
Svaka protomera ima specifično mesto prepoznavanja za fosfoholin vezujuće mesto. Minimalne promene konformacije u strukturi CRP-a utiču na ligande za koje se vezuje.

C reaktivni protein je jedan od proteina akutne faze upale. Nivo CRP-a, tokom akutne faze inflamacije, u krvi raste 50 000 puta za 6-9 sati. Najviše vrednosti dostigne nakon 48 sati (Sattar i Hingorani, 2009). U sklopu imunološkog sistema čoveka CRP ima plejotropne efekte. Antiinflamatornu ulogu ostvaruje preko sistema komplemenata, npr. vezivanjem na fosfoholin koji je izražen na površini mrtvih ili umirućih ćelija (oštećenih infekcijom, inflamacijom ili traumom), vezivanjem na nuklearne antigene i određene patogene organizme. Nakon vezanja za fosfoholin, aktivira sistem komplemenata ili Fc-receptor (sadrže ga odre-

đene ćelije imunog sistema, npr. makrofag) ili služi kao opsonin, utiče na aktivnost trombocita (Boncler i Watała, 2009). Proinflammatory uloga CRP-a objašnjena je ubrzanom fagocitozom. C-reaktivni protein reguliše i ekspresiju adhezionih molekula za endotelne ćelije, inhibira iNOS na novou endotelnih ćelija aorte, stimuliše oslobađanje IL-8, povećava aktivaciju plazminogen aktivator inhibitora -1 (PAI-1), povećava oslobađanje IL-1, IL-6, IL-18 i TNF α (Lippi i sar., 2010). Važnu ulogu CRP-a ima u klirensu ćelijskog debrija nekrotičnih i apoptotičnih ćelija. Vezuje se za oštećene membrane ćelija i njihov nuklearni materijal i podstiče fagocitozu. Smanjenje ili gubitak ovakve funkcije dovodi da nastanka antitela prema oštećenom tkivu i deluje proinflammatory. Denaturisani i agregacioni oblici CRP-a (neo CRP ili modifikovane forme) imaju snažno proinflammatory dejstvo, dokazano brojnim esperimentima (Eisenhardt i sar., 2009). Opisano je da modifikovani oblici povećavaju oslobađanje biomarkera inflamacije: monocit hemotaktičnog proteina 1 (MPC 1) i IL-8 i regulišu ekspresiju ICAM-1 na nivou endotelnih ćelija (Nagaoka i sar., 2008). C-reaktivni protein inhibira proliferaciju ćelija i ćelijsku apoptozu (Sattar i Hingorani, 2009). On je i biomarker inflamacije povezan sa nastankom sistemskih vaskularnih bolesti i ima značajnu ulogu u patogenezi ateroskleroze (Black i sar., 2004; Oda, 2007; Lemieux i sar., 2009; Lim i sar., 2010).

1.2.3.6. Hitinaza-3 protein 1 (YKL-40)

Hitinaza-3 protein 1, humani kartilaglikoprotein-39kDa, heparin i hitin -vezujući glikoprotein, poznat još i kao 38-kDa heparin i keratin vezujući glikoprotein, YKL-40 je nov biomarker inflamacije (slika 5). Skraćenica YKL-40 je zasnovana na korišćenju početnih slova prve tri N-terminalne amino kiseline: tyrosine-tirozin Y, lysine-lizin K i leucine-leucin L i najčešće molekularne mase 40 kDa.



Slika 5. Struktura YKL-40 (www.RCSB-Protein Data Bank).

Gen CHI3L1 za humanu formu YKL-40 je lokalizovan na 1 q31-q32 hromozomu (Ratchke i sar., 2009). Ovaj protein pripada porodici 18 glikozil hidrolaza i nema enzimske sposobnosti. Sastoji se iz dva globularna domena, od kojih je središnji veći. YKL-40 nije hitin, već ima mogućnost vezivanja za njega u različitoj dužini. Osim za hitin, može se vezivati i za keratin i heparin, pa se često naziva heparin vezujući glikoprotein, odnosno keratin vezujući glikoprotein (Shackelton i sar., 1995). Vezivanjem za keratin omogućava da makrofage direktno dospeju do mesta infekcije kao odgovor na inflamaciju.

Makrofage, neutrofili, sinovijalne ćelije slične fibroblastima, hondrociti, glatkomišićne ćelije krvnih sudova, zvezdaste ćelije jetre, tumorske ćelije embrionalne i fetalne ćelije eksprimiraju i luče YKL-40 (Johansen 2005; Kim i sar., 2007). U patološkim stanjima izolovan je iz aterosklerotičnih plakova, u glatkomišićnim ćelijama, i u *in vitro* uslovima tranzicijom iz proliferišuće u neproliferišuću jednoslojnu kulturu (Kozakova i Sarafin, 2009). U oku, tkivu horoidee i retine eksprimira se na nivou normalnih neuroretinalnih struktura retine, a u patološkim stanjima u toku procesa senilne degeneracije makule i na nivou horoidee (Rakic i sar., 2003). YKL-40 mRNA je otkrivena u germinativnim slojevima i prisutna tokom ranog razvoja humanog koštano-zglobnog sistema, gde učestvuje u procesu ćelijske proliferacije, diferencijacije i morfogeneze (Ratchke i sar., 2009a).

Biološka uloga YKL-40, kao ni specifičan receptor nisu poznati. Međutim, poznato je da je ekspresija YKL-40 povezana sa inflamacijom, tkivnom remodelacijom, fibrozom i kancerom (Johansen i sar., 2006; Johansen i sar., 2006a). U serumu zdravih osoba koncentracija YKL-40 raste sa godinama, ali se nalazi u referentnim granicama. Vrednosti YKL-40 u procesima akutne i hronične inflamacije su značajno povišene (Johansen i sar., 2005). Hitinaza-3 protein 1 se proizvodi na mestu inflamacije, stimuliše rast fibroblasta, aktivira fosfatidil inozitol-3 kinazni signalni put, učestvuje u angiogenezi i može imati ulogu u imunom odgovoru (Rathcke i Vestergaard, 2006). Dokazano je da YKL-40 može imati značajnu ulogu u nastanku disfunkcije endotela i procesu ateroskleroze. U *in vitro* uslovima utvrđena je sekrecija YKL-40 koja učestvuje u nastanku multicekularnih nodula i proliferaciji ćelija, u kulturi tkiva torakalne aorte. Na nivou formiranih nodusa, ćelije eksprimiraju marker definisan kao faktor rasta za vaskularne glatkomišićne ćelije prisutne u zidu krvnih sudova (VSMCs). Nodusi u *in vivo* uslovima imitiraju *in vivo* nastale uslove oštećenja glatkomišićnih ćelija tunike medije, dediferencijaciju, migraciju i doprinose procesu restenoze i formiranja nove intime (Rathcke i Vestergaard, 2006). U *in vitro* studijama YKL-40 promovise hemotaksu, međućelijski kontakt, širenje i migraciju vaskularnih endotelih ćelija i doprinosi formiranju aterosklerotičnog plaka. Hitinaza-3 protein 1 menja morfologiju endotelih vaskularnih

ćelija i dovodi do formiranja razgranatih struktura nalik krvnim sudovima, što ukazuje na ulogu YKL-40 u angiogenezi (Rathcke i sar., 2009a).

Hitinaza-3 protein 1 mRNA ekspresija je dokazana u makrofagu aterosklerotičnog plaka. Makrofagi u dubokim slojevima lezije pokazuju više vrednosti YKL-40, u odnosu na makrofage u novoformiranim početnim aterosklerotičnim lezijama. U *in vivo* uslovima YKL-40 je izolovan iz supernatanta makrofaga nakon dodavanja oksidisanog lipoproteina niske gustine (*eng.* low-density-lipoproteina LDL) (Rathcke i Vestergaard, 2006). *In vivo*, YKL-40 mRNA i ekspresija ovog proteina pronađeni su u subpopulaciji makrofaga u različitim tkivima u toku procesa inflamacije i remodelacije ekstracelularnog matriksa (Iwata i sar., 2009).

1.2.3.7. Inflamacija i krvni sudovi retine

Krvni sudovi retine su dostupni neinvazivnoj vizuelizaciji, omogućavajući jedinstvenu mogućnost istraživanja međusobne povezanosti strukture i karakteristika mikrocirkulacije u sistemskim oboljenjima i bolestima oka, glaukom, kardiovaskularne bolesti, moždani udar, gojaznost i dislipidemija (Garcia-Ortiz i sar., 2011, Kisilevsky i sar., 2008; Klein i sar., 2007; Mitchell i sar., 2005). Suženje retinalnih arteriola, na primer, dokazano je kao znak dugotrajne sistemske hipertenzije (Wong i sar., 2004a; Wong i sar., 2005; Wong i sar., 2006). ARIC studija i Beaver Dam Eye Study pokazuju da je smanjenje dijametra malih arteriola povezano sa pojavom DMT2, nezavisno od visine krvnog pritiska kod ispitanika u obe studije (Folsom i sar., 2000; Klein i sar., 2006). Beaver Dam Eye Study pokazala je pozitivnu korelaciju povećanja dijametra venula i koncentracije CRP, IL-6 i SAA ispitanika sa DM (Klein i sar., 2006).

U Rotterdamskoj studiji ispitivan je arterijsko-venski odnos, praćeni su uzroci suženja arteriola retine i uočena je korelacija između biomarkera inflamacije i bolesti krvnih sudova. Niži arterijsko-venski odnos je na mestu povećanog dijametra venula retine bio statistički značajno viši kod bolesnika sa povišenim brojem leukocita u krvi i ubrzanom sedimentacijom (Ikram i sar., 2004). Kod ispitanika sa povišenim dijametrom venula uočen je povišen nivo karotidno-plakoidnog skora, veći broj kalcifikacija na aortnim krvnim sudovima, povišen nivo LDL i niži nivo lipoproteina visoke gustine (*eng.* high-density lipoproteina HDL), povišen odnos struka-kuka, dakle skoro svih faktora koji su prepoznati kao faktori rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti (Ikram i sar., 2004).

Druge studije, međutim, dokazuju povećanje dijametra krvnih sudova kod osoba sa DM, i direktnu vezu između retinalne cirkulacije i veličine dijametra krvnih sudova retine (Wong i sar., 2002; Wong i sar., 2004; Klein i sar., 2007).

Remodelacija vaskularne mreže retine predstavlja osnovni fokus novijih teorija nastanka RD (Klein i sar., 2006). Uočene vaskularne lezije u ranim stadijumima RD karakteriše prisustvo sakularnih kapilarnih mikroaneurizmi nastalih gubitkom pericita, obliteracijom i degeneracijom kapilara. Izmenjeni kapilari menjaju propusnu moć i smanjuju retinalnu perfuziju.

Regresija vaskularne mreže, okluzija i remodelacija krvnih sudova tipične su karakteristike mikrovaskularnih promena kod osoba sa DM i uzrok su dalje progresije RD. Dijabetična retinopatija počinje gubitkom celularnih komponenata retinalnih kapilara, pericita i endotelnih ćelija (Joussen i sar., 2004). Redosled oštećenja ćelija retine je još uvek predmet istraživanja. Kod bolesnika sa DM uočena je promena u sastavu ekstracelularnog matriksa na nivou krvnih sudova i neurodegenerativne promene (Bearse i sar., 2006; de Gooyer i sar., 2006). Histopatološke analize ukazuju da se područje non-perfuzije tokom angiografije lokalizacijom podudara sa područjem acelularnih kapilara (Aprelov, 2011; Kohen i Henkid, 1970).

1.2.3.8. Inflamacija i ateroskleroza

Terminom ateroskleroza definiše se patološki proces, tj. sistemska bolest manjih i većih arterijskih krvnih sudova, uz stvaranje depozita lipida krvi, krvnih ugrušaka i kalcijuma (Libby i sar., 2010). Osnovna karakteristika bolesti je hronična progresivna degeneracija zida krvnog suda. Proliferacija vezivnog tkiva, intra i ekstracelularni depoziti holesterola, masnih kiselina i kalcijuma, kao i akumulacija kolagena, proteoglikana dovodi do smanjenja elastičnosti i zadebljanja krvnih sudova, što je praćeno posledničnim suženjem i smanjenjem njihove elastičnosti (Leal i sar., 2010). Zahvatanje većih krvnih sudova označava se makroangiopatijom, a zahvatanje manjih i srednjeg dijametra krvnih sudova mikroangiopatijom. Intenzivna mikroangiopatija rezultat je dugotrajnog DM. Posebna forma arterioskleroze je skleroza medije, koju karakteriše kalcifikacija mišićnog sloja zida krvnog suda i dokazana je kod teškog oštećenja krvnih sudova bubrega. Proces ateroskleroze je dominantno raspoređen na hemodinamski značajnim mestima vaskularne mreže, pretežno lamelarnog toka krvi i na mestima grananja krvnih sudova (Roh i Weitter, 2004). Na navedenim rizičnim mestima, čak i kod zdrave populacije, endotelna oštećenja uzrokovana protokom krvi dovode do apoptoze endotelnih ćelija (Barth i sar., 2007). Okolne endotelne ćelije kompenzuju tokom vremena ovaj nedostatak proliferacijom do iscrpljivanja. Vremenom, zid krvnog suda slabi i dolazi do pojave mikroaneurizama. Obe promene u dijametru krvnih sudova, suženje lumena, kao i sektorasta vrećasata proširenja ili aneurizme, remete lamelarni tok krvi i dodatno dovode do oštećenja endotelnih ćelija.

Proces po pravilu napreduje sporo, razvija se decenijama i kompleksan je. Otkriveni su brojni uzroci i biohemijski procesi koji doprinose njenom razvoju. Definisane su dve osnovne hipoteze za nastanak ateroskleroze (Bild i sar., 2002). Hipoteza odgovora na oštećenje podrazumeva oštećenje unutrašnjeg sloja, intime sastavljene od jednog sloja endotelnih ćelija i subendotelnog tkiva. Traume, kao što su visoki krvni pritisak, mehaničko oštećenje, bakterijski endotoksini, virusi ili antigen-antitelo reakcija, dovode do oštećenja na molekularnom nivou, uz pojačano lučenje faktora rasta ili citokina i sledstvenu proliferaciju i migraciju glatkomišićnih ćelija iz medije ka intimi krvnog suda uz sekundarno formiranje tzv. penušavih ćelija i na nivou intime i na nivou medije zida krvnog suda (Libby i Theroux, 2005; Rizvi, 2007; Libby i sar., 2010). Na ovaj način nastaju plakovi, koji su karakteristični za proces ateroskleroze.

Hipoteza o aterosklerozi uzrokovanoj lipoproteinima druga je opšte-prihvaćena o patogenezi ateroskleroze, u kojoj osnovnu ulogu ima hemijski modifikovani LDL. Preuzimanjem hemijski modifikovanog LDL-a od strane makrofaga nastaje njihov preobražaj u penušave ćelije (Giacco i Brownlee, 2010). Prema navedenoj hipotezi, prvi korak ka razvoju ateroskleroze je oksidativna modifikacija LDL-a, dok je oštećenje endotelnih ćelija jedna od sekvenci ovog kompleksnog procesa. Novija ispitivanja ukazuju na značaj holesterola, kao negativnog markera inflamacije.

Dalji redosled dešavanja je identičan, bez obzira na prethodno opisane hipoteze o pokretanju ateroskleroze. Nastanak penušavih ćelija pokreće inflamatorni odgovor, koji sledstveno oštećuje dublje slojeve zida arterijskih krvnih sudova i dovodi do prerastanja medije mišićnim slojem. Rezultat tkivne remodelacije je nastanak vezivno-tkivnog plaka sa lipidnim sadržajem. Monociti su najbrojnije ćelije plaka. Adherirani su na disfunkcionalnu površinu endotelnih ćelija i čine i lipidni sadržaj ispunjeni oksidovanom formom LDL-a (Henriksen i sar., 1983). Rupturu aterosklerotičnih plakova prati pokretanje koagulacije, što dovodi do dodatne redukcije lumena krvnog suda. Plakovi skloni rupturi sastoje se od većeg broja makrofaga i manje, fibrozne kape. Smatra se da je u početnim stadijumima formiranje aterosklerotičnih plakova reverzibilno.

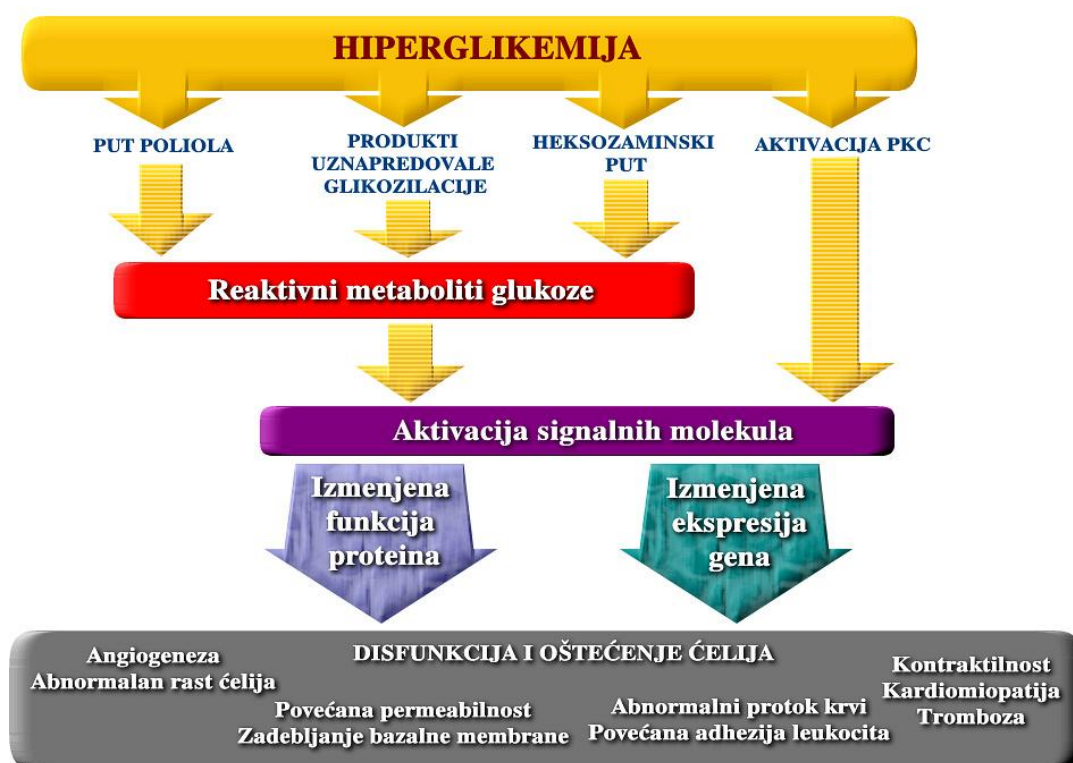
Novija istraživanja ukazuju na značajnu ulogu lipida, holesterola i triglicerida, kao i izmenu njihovog međusobnog odnosa u procesu inflamacije (Gruber i sar., 2009; Fitrolaki i sar., 2013).

1.2.4. Oksidativni stres

Oksidativni stres nastaje u uslovima kada dolazi do poremećaja ravnoteže u produkciji oksidativnih produkata, ili smanjenja kapaciteta antioksidativne zaštite, ili nastankom oba procesa istovremeno. Smatra se da oksidativni stres ima značajnu ulogu u nastanku mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija DM. Metaboličke abnormalnosti uzrokovane hroničnom hiperglikemijom dovode do povećane produkcije RVK aktivacijom alternativnih puteva metabolizma glikoze, na nivou mitohondrija endotelnih ćelija krvnih sudova i nemitohondrijalnom produkcijom RVK (Monnier i sar., 2006; Gürdöl i sar., 2008).

Hronična hiperglikemija dovodi do aktivacije četiri osnovna puta koji učestvuju u patogenezi mikrovaskularnih komplikacija:

- put poliola,
- pojačano formiranje krajnjih produkata uznapredovale glikacije (*eng.* advanced glycation end product -AGE),
- aktivacija protein kinaze C izoformi,
- povišena aktivnost heksozaminskog puta (slika 6).



Slika 6. Mehanizmi dejstva hiperglikemije koji učestvuju u patogenezi mikrovaskularnih komplikacija

1.2.4.1. Put poliola

Povišene vrednosti glikoze u krvi i tkivima dovode do aktivacije poliol puta metabolizma glikoze. Put poliola na više načina uzrokuje oštećenje ćelija: intracelularnom toksičnošću, povišenom produkcijom AGEs prekursora i smanjenjem antioksidativnih mehanizama zaštite. Aldoza reduktaza je ključni enzim u poliol putu, koji redukuje glikozu u sorbitol koristeći NADPH (Obrosova i Pacher, 2005). Smanjuje se količina NADPH, ključnog koenzima glutation reduktaze čime je onemogućena reoksidacija glutationa, usled čega dolazi do smanjenja koncentracije glutationa (Al-Shabrawey i sar., 2006).

Tkivo retine kod bolesnika sa RD, u poređenju sa tkivom retine zdravih osoba, pokazuje povišen nivo ekspresije aldoza reduktaze u ganglijskim ćelijama, nervnim vlaknima i Miller-ovim ćelijama. Povišen nivo sorbitola dokazan je u tkivu retine koje je izložene povišenim koncentracijama glikoze (Pachydaki i sar., 2006; Araki i Nishikawa, 2010). Sorbitol se akumulira i intracelularno, što dovodi do osmotskog stresa.

Produkti poliol puta, fruktozo-3-fosfat i gliceraldehid 3 fosfat, su snažni glikozilirajući agensi koji dovode do nastanka AGEs produkata. Kliničke studije, međutim, nisu dokazale da upotreba inhibitora aldoza-reduktaze sprečava nastanak ili dovodi do regresije promena nastalih na retini (Stefansson, 2006).

1.2.4.2. Produkati uznapredovale glikacije (AGE)

U stanju hronične hiperglikemije jedno od značajnih metaboličkih dešavanja je i povećana neenzimska glikacija proteina i nastanak AGE produkata. Kod osoba sa DM dokazani su povišeni nivoi AGE u serumu, glomerularnom tkivu, humanom sočivu i tkivu retine (Witko-Sarsat i sar., 1996; Pachydaki i sar., 2006; Araki i Nishikawa, 2010). Krajnji produkti uznapredovale glikacije modifikuju intracelularne proteine značajne za regulaciju genske transkripcije, difunduju u ekstracelularni prostor i modifikuju ekstracelularne proteine (laminin i fibronektin), remete signalnu transdukciju između ćelije i ekstracelularnog matriksa, modifikuju proteine krvi, naročito albumine. Ovi produkti vezani za RAGE makrofagima povećavaju produkciju faktora rasta i proinflamatornih citokina (Hammes i sar., 2004, Kern i sar., 2010). Vezivanjem za proteine plazme smanjuju antioksidativni kapacitet plazme. Sintezom proinflamatornih citokina intenziviraju inflamaciju i dovode do direktnog oštećenja endotelih ćelija. Pojačanom sintezom komponenti ekstracelularnog matriksa dovode do fibroze. Lezija endotelih ćelija, prisutnim oksidativnim stresom i inflamacijom, i fibroza dovode do remodelovanja vaskularne mreže retine. Dokazano je i da AGE produkti narušavaju barijeru krv-retina (Barile i sar., 2005).

Krajnji produkti uznapredovale glikacije učestvuju u procesu angiogeneze (Kern i sar., 2010). Uloga je zasnovana pretežno na autokrinom VEGF (Yancopoulos i sar., 2000; Yao i sar., 2007). Zid novonastalih krvnih sudova čine, pre svega, periciti, što ukazuje na postojanje nepotpune vaskulogeneze (Henriksen i sar., 1983; Thurston i sar., 2000; Gariano i Gardner, 2005).

1.2.4.3. Aktivacija protein kinaze C (PKC)

Protein kinaza C pripada porodici serin i treonin protein kinaza, koja učestvuje u fosforilaciji specifičnih, ciljnih, proteina i dovodi do njihove aktivacije ili deaktivacije, značajne u procesu signalne transdukcije (PKC-DRS Study Group, 2005). Izolovano je dvanaest izoformi PKC. One su na osnovu strukture grupisane su u tri kategorije: kalcijum i diacilglicerol (DAG)-zavisna PKC, kalcijum nezavisna i DAG-zavisna PKC i atipična forma PKC, kalcijum nezavisna i DAG-nezavisna PKC. U uslovima hiperglikemije povećana je de novo sinteza DAG, endogenog aktivatora PKC. Povišen nivo DAG, u osoba sa DM, potvrđen je u endotelu, glatkomišićnim ćelijama i mezangijalnim ćelijama (PKC-DRS Study Group, 2005). Dokazano je da PKC, aktivirana u uslovima hiperglikemije, povećava lipidnu peroksidaciju polinezasićenih masnih kiselina na nivou retine i endotelnih ćelija krvnih sudova (Giacco i Brownlee, 2010). Aktivirana PKC povećava ekspresiju gena za strukturne proteine (fibronektin i kolagen tipa IV) i proteine koji utiču na vazodilataciju (NOS i endotelina-1). Takođe povećava sintezu VEGF, aktivira NF- κ B i NADPH oksidazni sistem, dovodi do defosforilacije receptora trombocitnog faktora rasta (PDGF) (McLeod, 1995, Romeo i sar., 2002).

Navedeni procesi na nivou krvnih sudova retine dovode do: fibroze, apoptoze pericita, povećane athezije leukocita i trombocita za zid krvnog suda, okluzije lumena krvnog suda i ishemije. Dolazi do narušavanja barijere krv retina i oštećenja krvnih sudova retine i horio-kapilarisa.

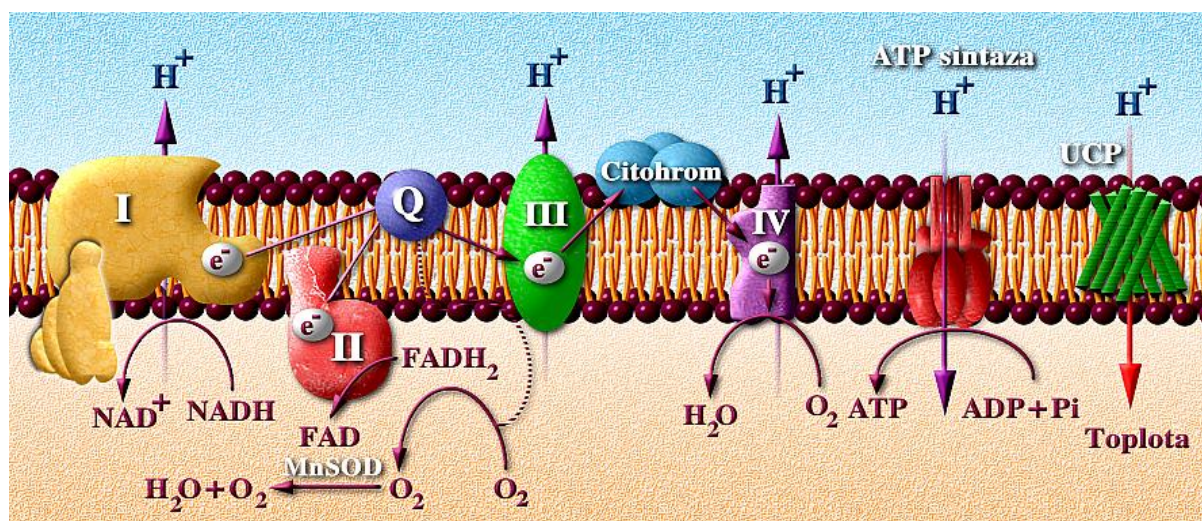
1.2.4.4. Aktivnost heksozaminskog puta

U stanjima normoglikemije samo se mali procenat, oko 1-3% ukupne koncentracije glikoze, metaboliše putem heksozamina. Povećana koncentracija intracelularne glikoze intenzivira heksozaminski put. Fruktozo 6 fosfat, intermedijerni produkt glikolize, menja se u glikozamin 6 fosfata putem limitirajućeg enzima glutamin fruktozo 6 fosfat aminotransferaze (GFAT). Krajnji produkt je uridin difosfat N-acetilglikozamin, koji predstavlja dalji supstrat za lančanu O-vezanu GlcNAc modifikaciju ciljanih proteina na mestu serinskih i treoninskih

ostataka. Glikozamin ili prekomerna ekspresija GFAT je promotor PAI-1 u endotelnim ćelijama krvnih sudova, glatkih mišića i mezangijalnog tkiva (Kugiyama i sar., 1993).

1.2.4.5. Oksidativni stres na nivou mitohondrija endotelnih ćelija krvnih sudova

Mitohondrije se smatraju glavnim pokretačem i izvorom oksidativnih oštećenja kod bolesnika sa RD (Silva i sar., 2009). Osnovne funkcije mitohondrija značajne za nastanak DM i njegovih komplikacija su produkcija adenozin-tri fosfata (ATP), produkcija RVK i regulacija apoptoze. Glikoza se procesom glikolize, u aerobnim uslovima, konvertuje u pirogroždanu kiselinu i ulazi u mitohondrije gde se dalje metaboliše kroz Krebsov ciklus. Masne kiseline se u mitohondrijama nakon β -oksidacije, dalje metabolišu kroz Krebsov ciklus. Krebsov ciklus i β -oksidacija smanjuju koncentracije NADH i redukovani flavin adenin dinukleotid (FADH_2). Elektroni iz NADH i FADH_2 na nivou mitohondrija prolaze kroz transportni sistem elektrona i to kompleks I, kompleks II, putem koenzima Q u kompleks III, putem citohrom c oksidaze u kompleks IV. Transportom elektrona oslobađa se energija u formi ATP-a. Veza na prenosio-cima elektrona, ispred sistema citohrom c oksidaze, pre svega koenzima Q, nije tako čvrsta, pa je moguće prenošenje elektrona na molekularni kiseonik, formiranje superoksida (O_2^-) i dalji nastanak endogenih RVK (slika 7).



Slika 7. Produkcija RVK na nivou mitohondrija.

Hiperglikemija stimuliše proces razgradnje glikoze glikolizom, intenzivira Krebsov ciklus na nivou mitohondrija, i povećava produkciju RVK. Nastali RVK oštećuje proteine, lipide i mitohondrijalnu DNA. Mitohondrijalna DNA, nema introne, slabo je opremljena mehanizmima reparacije, što je čini sklonom oksidativnom oštećenju i mutacijama.

Mitochondrije, takođe, imaju važnu ulogu u regulaciji apoptoze. Metaboličke reakcije, nastale na nivou mitohondrija endotelnih ćelija, odgovorne za pokretanje apoptoze su:

- inhibicija oksidativne fosforilacije,
- promena permeabiliteta zida mitohondrija,
- gubitak transmembranskog potencijala i
- akumulacija kalcijuma u mitohondrijima i oštećenje mitohondrijalne DNK.

Oštećenje zida mitohondrija dovodi do oslobađanja mitohondrijalnih enzima (citohrom oksidaze c, kaspaza, NF-κB) i pokreće proces apoptoze endotelne ćelije.

1.2.4.6. Nemitohondrijalni izvori RVK

Na nivou retinalne vaskularne mreže u osoba sa RD dokazana je staza leukocita, pre svega neutrofila i u manjem broju makrofaga.

Tokom fagocitoze, neutrofili i makrofage doživljavaju “respiratornu eksploziju”, koja se karakteriše povećanom potrošnjom kiseonika, aktivacijom heksozamino-fosfatnog šanta i stvaranjem slobodnih radikala, superoksid anjon radikala i vodonik peroksida. Aktivacija makrofaga i neutrofila ostvaruje se putem NADPH oksidaznog sistema. Dokazano je da se NADPH oksidazni sistem nalazi i u glatkomišićnim ćelijama krvnih sudova, endotelnim ćelijama, mezangijalnim ćelijama i trombocitima. Za aktivaciju ovog sistema u ćelijama koje ne učestvuju u fagocitozi potrebno je više vremena, a nastanak RVK je kontinuiran i u manjem stepenu. Najčešće NADPH oksidazni sistem na nivou krvnih sudova, endotelnih ćelija i glatkomišićnih ćelija stimuliše angiotenzin II, trombin, PDGF i TNF-α.

U neutrofilima postoji i sistem poznat kao mijeloperoksidaza H₂O₂-halogeni sistem koji oksidiše različite halogene i stvara visoko reaktivne toksične produkte, kao što je hipohlorna kiselina. Hipohlorna kiselina nije slobodni radikal, ali zahvaljujući oksidativnim svojstvima proizvodi RVK, hidroksilni radikal i singletni kiseonik (Đorđević i sar., 2000). Povećana produkcija RVK, prisutna kod ispitanika sa RD, dovodi do aktivacije antioksidativnog sistema, čije mogućnosti bivaju prevaziđene i rezultuje nastankom oksidativnog stresa. Nastale RVK i prisutna hiperglikemija, kao i metabolički putevi koje hiperglikemija aktivira dovode do izmene aktivnosti VEGF i predstavljaju “*circulus vitiosus*“, koji dovodi do nastanka RD.

U toku inflamatorne reakcije, endotelne ćelije su izložene toksičnom dejstvu oksidansa produkovanog aktivnošću intracelularne i ekstracelularne ksantin oksidaze (XO). Cirkulišuća XO, proizvodi slobodne radikale, izaziva direktno oštećenje endotela krvnih sudova,

aktivira slobodno-radikal-produkujuće inflamatorne ćelije, šireći oksidativno oštećenje distalno od mesta porekla u toku prolongiranog perioda ishemije. U neutrofilima ili endotelnim ćelijama povećana sinteza adhezivnih molekula ubrzava njihovu interakciju. Oksidansi poništavaju anti-adhezivni efekat NO, povećavaju ekspresiju leukocitnog integrina i ICAM, zbog čega dolazi do akumulacije neutrofila.

Neutrofili oslobađaju elastazu, koja konvertuje intracelularnu ksantin dehidrogenazu u XO, uz produkciju kiseoničkih radikala. Endotelne ćelije proizvode superoksid anjon radikal i NO, koji u reakciji sa H_2O_2 , a u prisustvu metala sa promenljivom valencom (gvožđa i bakra), u Fentonovoj reakciji, generišu hidroksilni radikal i peroksinitrit anjon. Pentoksinitrit-anjon, nastao reakcijom NO i H_2O_2 , ima afinitet za proteinske SH grupe. Jedini efekat reparacije disulfidnih veza, postiže se sistemom glutation-glutation reduktaza.

U slučaju insuficijencije antioksidativnih mehanizama, dolazi do oštećenja endotelnih ćelija. Peroksinitrit-anjon pokazuje toksične efekte i prema aromatičnim jezgrima aminokiselina, inhibira enzime respiratornog lanca, pre svega citohrom oksidazu i ATP sintetazu i time uzrokuje smrt ćelije. Hidroksilni radikal, nastao Fentonovom reakcijom oštećuje DNK, inicira proces lipidne peroksidacije, dovodi do destrukcije bioloških membrana, membranskih proteina, receptora i enzima. (Đorđević i sar., 2000).

1.3. STADIJUMI DIJABETESNE RETINOPATIJE

Klasifikacija **Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group (ETDRS)** je univerzalno prihvaćena klasifikacija promena na očnom dnu kod bolesnika sa dijabetesnom retinopatijom (Diabetic Retinopathy Guidelines, RCOphth, 2012.).

Ona podrazumeva sledeće stadijume :

Klasifikacija dijabetesne retinopatije (ETDRS modifikovana 2003, AAO, Diabetic Retinopathy Guidelines, RCOphth, 2012.)

Neproliferativna dijabetesna retinopatija (RDNP)

A. Blaga RDNP	karakteriše je prisustvo: ▪ makar jedne mikroaneurizme
B. Uznapredovala RDNP	karakteriše je prisustva: ▪ hemoragija i mikroaneurizama (H/Ma) ▪ tvrdih eksudata ▪ proširenja vena i intraretinalne vaskularne anomalije (IRMA)
C. Teška RDNP	karakteriše je prisustvo: ▪ H/Ma u sva četiri kvadranta retine ▪ proširenje vena u više od dva kvadranta retine ▪ IRMA
D. Veoma teška RDNP ili preproliferativna RDPP	karakteriše je prisustvo: ▪ H/Ma u sva četiri kvadranta retine ▪ proširenje vena u više od dva kvadranta retine ▪ IRMA ▪ prisustvo cotton wool promena

Proliferativna dijabetesna retinopatija (PDR)

E. Rana PDR	karakteriše je prisustvo: ▪ novih krvnih sudova na retini, koji mogu biti locirani na optičkom disku (neovascularisatio disci NVD) ili ostalim delovima retine (neovascularisatio elsewear NVE)
F. Visokog rizika PDR	karakteriše je prisustvo: ▪ novih krvnih sudova na optičkom disku (NVD) $\frac{1}{4}$ ili $\frac{1}{3}$ površine optičkog diska ▪ prisustvo novoformiranih krvnih sudova i preretinalna ili/ i hemoragija u staklastom telu.

Dijabetesna makulopatija je uzrok pada vidne oštine kod bolesnika sa DM. Klinički se može podeliti u sledeće subgrupe (Diabetic Retinopathy Guidelines, RCOphth, 2012):

- fokalni dijabetesni makularni edem - ograničeno područje edematozne retine,
- difuzni dijabetesni makularni edem i makula oko fovee zahvaćeni su edemom,
- ishemična dijabetesni makulopatija,
- mešovite forme makulopatije.

Dijagnoza se postavlja fluoresceinskom angiografijom i treba imati u vidu da difuzni makularni edem kod dugog trajanja ima karakteristike cistoidnog edema (Sugimoto i sar., 2005).

Poseban entitet predstavlja termin klinički signifikantnog makularnog edema.

Klinički signifikantan makularni edem (CSME) označava jedno od sledećih stanja:

- zadebljanje retine u prečniku od 500 μm ili manje od centra makule,
- prisustvo tvrdih eksudata u prečniku od 500 μm ili manje od centra makule sa zadebljanjem okolne retine,
- zona, područje zadebljanja retine, veličine prečnika optičkog diska ili veće, na području prečnika jednog optičkog diska ili manje od centra makule.

Dijagnoza se postavlja kliničkim stereoskopskim pregledom makule. Prisustvo makularnog edema i u subkliničkim formama moguće je dokazati i kvantifikovati metodom optičke koherentne tomografije.

2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Na osnovu prikupljenih podataka iz literature, postavljena je osnovna hipoteza:

u osnovi nastanka i progresije dijabetesne retinopatije nalazi se sistemska inflamacija, hroničnog toka, koja uzrokuje remodelaciju i regresiju vaskularne mreže retine, sa promenom broja i dijametra krvnih sudova retine, a biomarkeri sistemske inflamacije u krvi mogu se smatrati biomarkerima nastanka i razvoja dijabetesne retinopatije.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U skladu sa osnovnom hipotezom i pregledom dosadašnje literature, postavljeni su ciljevi istraživanja:

- utvrđivanje povezanosti morfoloških promena na očnom dnu i to: mikroaneurizama i hemoragija (tačkastih, mrljastih, crtastih), tvrdih eksudata i ishemičnih (cotton wool) promena kod ispitanika sa dijabetes melitusa tip 2 i neproliferativnim promenama (RDNP) i sa teškim, preproliferativnim promenama (RDPP)
- utvrđivanje povezanosti promena u spoljašnjem dijametru i broju venskih i arterijskih krvnih sudova u različitim zonama očnog dna u odnosu na optički disk kod ispitanika obolelih od dijabetes melitusa tip 2 sa RDNP i RDPP i njihova korelacija sa:
 - biohemijskim parametrima u krvi ispitanika: vrednostima glikemije, glikoziliranog hemoglobina A1c (HbA1c), ukupnih proteina krvi, uree i kreatinina, holesterola, i njegovih lipoproteinskih frakcija HDL (*eng.* high density) i LDL (*eng.* low density) holesterola, i triglicerida,
 - biomarkerima inflamacije u krvi ispitanika: sedimentacijom u prvom satu, fibrinogenom, C reaktivnim proteinom i hitinaza-3-proteinom 1(YKL-40),
 - parametrima oksidativnog stresa u krvi ispitanika: produktima lipidne peroksidacije u plazmi (TBARS), produktima uznapredovale oksidacije proteina (AOPP),
 - parametrom antioksidativne zaštite: ukupnim sulfhidrilnim grupama (SH grupe).

4. ISPITANICI I METODE

4.1. ISPITANICI

Ispitivanjem je obuhvaćeno 90 ispitanika, podeljenih u tri grupe po 30 ispitanika: prvu, kontrolnu grupu činili su zdravi ispitanici, drugu grupu činili su ispitanici sa dijagnozom DMT2 i početnim neproliferativnim, blagim promenama (RDNP), treću grupu, činili su ispitanici sa dijagnozom DMT2 i promenama na očnom dnu, koje su odgovarale veoma teškim promenama, preproliferativnim (RDPP). Kontrolnu grupu činili su zdravi ispitanici, sa negativnom anamnezom o prisustvu dijabetesa, negativnom familijarnom anamnezom o prisustvu ovog oboljenja, bez sistemskog i drugog akutnog i hroničnog inflamatornog procesa u trenutku sprovođenja ispitivanja, kao i bez akutnog i hroničnog očnog oboljenja. Ispitanici obuhvaćeni ispitivanjem bili su bele rase.

4.2. OFTALMOLOŠKI PREGLED

Svi ispitanici bili su podvrgnuti oftalmološkom pregledu, na Klinici za Očne bolesti u Nišu, koji je obuhvatio: subjektivno određivanje vidne oštine Snellen-ovim znacima, prednju biomikroskopiju, aplanacionu tonometriju, indirektnu oftalmoskopiju, pregled očnog dna i komornog ugla staklom sa 3 ogledala po Goldmanu. Pregled očnog dna obavljen je u midrijazi, postignutoj lokalnim ukapavanjem kapi 2% rastvora homotropina (Sol. Homatropini 2%) i kapi 10% rastvora fenilnefrina (Sol. Phenilnephri 10%), po tri puta u konjunktivalni sakus.

Fotodokumentacija promena na očnom dnu, u koloru i green modu (crno belom modu), kao i fluoresceinska angiografija, urađene su digitalnom fundus kamerom VisuCam Lite Carl Zeiss, sa širinom polja od 45°.

Fluoresceinska angiografija, invazivna metodom snimanja očnog dna, izvođena je ubrizgavanjem 5 ml 10% rastvora natrijum-fluoreseina u bolusu kao intravenska injekcija aplikovana u venske krvne sudove dorzuma šake ili kubitane regije radi verifikacije promena na očnom dnu.

Pregled je obavljen u prethodno postignutoj midrijazi, lokalnim ukapavanjem kapi, 2% rastvora homotropina (Sol.Homatropini 2%) i kapi 10% rastvora fenilnefrina (Sol. Phenilnephrini 10%), po tri puta u konjunktivalni sakus. Prvi snimak načinjen je nakon 10 sekundi od ubrizgavanja fluoresceina, a potom, u pojedinačnim fazama, u arteriskoj, arterijsko-venskoj i venskoj fazi, na 1-2 sekunde, koje su završavane u 5., 10. i 15. minutu, od ubrizgavanja kontrasta.

Pregled je obavljen u kabinetu za fluoresceinsku angiografiju na Klinici za očne bolesti u Nišu, od strane istog oftalmologa i u istim uslovima. Dobijene fotografije očnog dna i fluoresceinske angiografije analizirane su, a klasifikacija promena na očnom dnu izvršena je u skladu sa ETDRS klasifikacijom (Diabetic Retinopathy Guidelines, RCOphth, 2012).

Kod svih ispitanika određivan je indeks telesne mase (*eng.* body mass index -BMI), po formuli telesna masa, izražena u kilogramima, podeljena sa kvadratom telesne visine, izraženom u metrima na kvadrat, kg/m^2 (BMI Classification. World Health Organization). Ispitanici su prema dobijenim vrednostima BMI, a u skladu sa grafikonom BMI Svetske zdravstvene organizacije, svrstani u grupe BMI<18,5 ili nizak BMI, BMI od 18,5 do 25 kao normalan, BMI od 25 i više do 30 kao prekomerni BMI, i BMI preko 30 su gojazni (BMI Classification. World Health Organization).

4.3. ODREĐIVANJE OPŠTIH BIOHEMIJSKIH PARAMETARA KRV I BIOMARKERA INFLAMACIJE

Kod svih ispitanika su urađena laboratorijska ispitivanja u Centru za medicinsku biohemiju Kliničkog centra u Nišu, koja su obuhvatala određivanje glikemije, glikoziliranog hemoglobina (HbA_{1c}), ukupnog holesterola i njegovih lipoproteinskih frakcija lipoproteina HDL (*eng.* high density) i LDL (*eng.* low density), triglicerida, fibrinogen i C-reaktivni protein (CRP), sedimentaciju u prvom satu, na aparatu Olympus AU680.

Krv je uzimana u jutarnjim časovima, pre obroka i davanja terapije.

Za procenu rizika za razvoj ateroskleroze korišćen je aterogeni indeks (API), koji je izračunavan po formuli $(\text{Hol-HDL})/\text{HDL}$. Kao granična uzima se vrednost od 2,3 mmol/L (Dobiašova, 2004).

Produkti lipidne peroksidacije (TBARS), ukupne sulfhidrilne grupe (SH grupe) i produkti uznapredovale oksidacije u plazmi (AOPP) i hitinaza-3 protein 1(YKL-40) određivani su na Institutu za biohemiju Medicinskog fakulteta u Nišu.

4.3.1. Određivanje koncentracije YKL-40

Vrednosti YKL-40 su određivane u serumu obolelih od DMT2 i kontrola. Određivanje je vršeno Elisa metodom pomoću MicroVue YKL-40TM enzyme immunoassay kit, Quidel Corporation, San Diego, USA. Svaku grupu činilo je po 30 ispitanika. Micro Vue YKL-40 enzyme immunoassay kit je uzorak za eksperimentalnu proceduru detekcije YKL-40. Metoda koristi monoklonalna antitela na humani YKL-40, alkalna fosfataza (AP)-konjugovana poliklonalna zečija antitela na YKL-40 i hromogeni supstrat.

U plejt sa monoklonalnim antitelima na YKL-40 dodati su uzorci plazme ispitanika. Potom je sledio period inkubacije na temperaturi od 18-28°C, 60 minuta, i ispiranja nevezanih delova. U drugoj fazi dodavana su AP -konjugovana poliklonalna zečija antitela na YKL-40, koja se vezuju za imobilizovana YKL-40 iz prve faze. Ponovo sledi inkubacija na 18-28°C, 60 minuta, i ispiranje nevezanih delova konjugata. Potom je dodavan p-nitrophenyl phosphate (pNPP), hromogeni rastvor supstrata. Vezani AP reaguje sa supstratom formirajući žutu boju. Nakon perioda inkubacije, od 60 minuta, zaustavlja se hemijska reakcija i intenzitet boje meri spektrofotometrijom, na 405 nm. Intenzitet boje dobijene miksture je proporcionalan koncentraciji YKL-40. Dobijeni rezultati su očitavani iz generisane standardizovane krivulje korišćenjem linearne regresione analize, a vrednosti se izražavaju u ng/L.

4.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA I PARAMETRA ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE

4.4.1. Određivanje lipidnih peroksida u plazmi ispitanika

Praćenje oksidativnog oštećenja vršeno je merenjem TBA-reagujućih supstanci (TBARS) koji u reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) pri visokoj temperaturi i u kiseloj sredini stvaraju hromogen-kondenzacioni produkt. Za njihovo određivanje u plazmi korišćena je modifikovana TBA metoda (Andreeva i sar., 1988). Koncentracija TBARS je izražena u $\mu\text{mol/L}$.

4.4.2. Određivanje produkata uznapredovale oksidacije proteina u plazmi (AOPP)

U plazmi ispitanika za određivanje AOPP korišćena je metoda koju su opisali Witko-Sarsat i sar. (1996). U 200 μL supernatanata, rastvorenog u odnosu 1:5, sa fosfatnim puferom

(PBS), nakon mikrotitracije dodato je 10 μ L 1,16 M kalijum jodida i 20 μ L sirćetne kiseline. Apsorbcija dobijene miksture odmah je očitavana na 340 nm mikroplate čitaču u odnosu na apsorbciju koju je imala mikstura koju su činili 200 μ L PBS, 10 μ L 1,16M kalijum jodidi 20 μ L sirćetne kiseline. Koncentracija AOPP izražena je u μ mol/g proteina.

4.4.3. Određivanje ukupnih sulfhidrilnih grupa (SH)

Ukupne SH grupe u plazmi određivane su pomoću Ellman-ovog reagensa (5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoeva kiselina-DTNB) (Ellman, 1952). U reakciji Ellman-ovog reagensa sa ne-proteinskim SH grupama, nastaje obojeni produkt dianjon 2-nitro-5-tiobenzoeva kiselina. Vrednost koncentracije SH grupa izražena je u μ mol/L.

4.4.4. Statistička obrada biohemijskih podataka

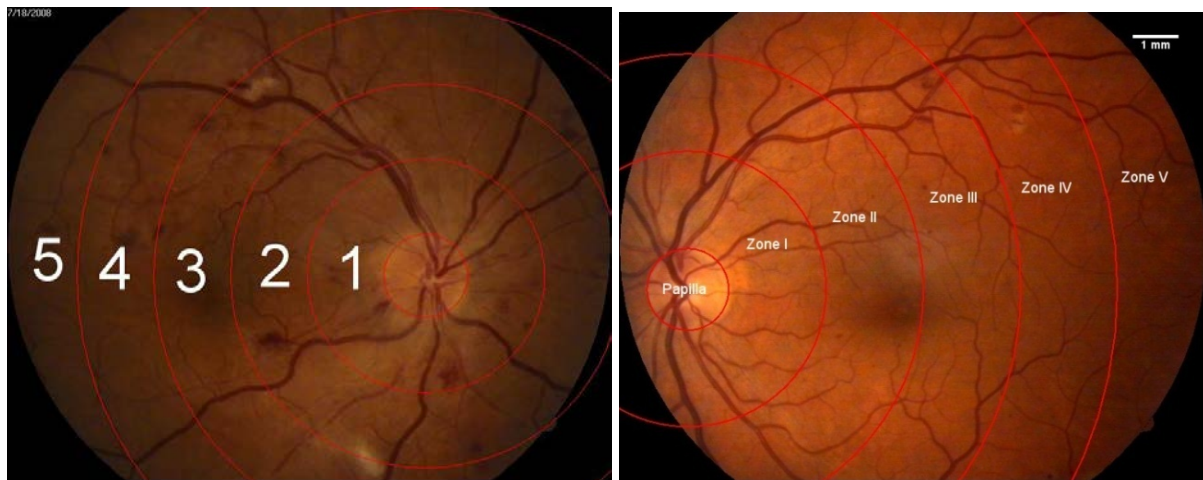
Dobijeni rezultati su obrađeni statističkim programom, Sigma stat verzija 3.5. Korišćeni su Mann-Whitney Rank Sum Test i Studentov t test. Statistička razlika utvrđivana je sa statističkom značajnošću od $p < 0,05$. Dobijeni rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

4.5. MORFOMETRIJSKA ANALIZA PROMENA NA OČNOM DNU KOD ISPITANIKA SA DIJABETESNOM RETINOPATIJOM

Digitalne slike ocnog dna kod 51 ispitanika, 25 kontrolne grupe, 17 ispitanika sa RNDP i 9 sa RDPP, nakon morfološke analize, dodatno su kvantitativno analizirane uz pomoć sistema za procesiranje i analizu digitalne slike ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Fotodokumentaciju i fluoresceinsku angiografiju obavio je jedan oftalmolog prema unapred definisanom protokolu. Analizirane su digitalne fotografije desnog i levog oka kod svakog ispitanika. Sistem je specijalno kalibrisan za dato povećanje kamere (1 pixel = 17,7 μ m). Očno dno je podeljeno u pet koncentričnih zona sa centrom u optičkom disku. Korišćen je softver za crtanje koncentričnih kružnica „concentric circles” (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/concentric-circles.html>) sa centroidom na optičkom disku. U odnosu na centroid na optičkom disku, upotrebom navedenog softvera, formirano je pet koncentričnih zona u odnosu na optički disk (slika 8). Zona koja neposredno okružuje optički disk je označavana kao prva. U prvoj fazi analize bile bi određivane morfometrijske karakteristike optičkog diska (area,

perimeter, Feret-ov dijametar i cirkularnost)(zona I). Sve zone su konstruisane kao jednake i označene uskladu sa porastom distance od optičkog diska (zone II, III, IV, V).

Područje makule lokalizovano je u zoni II ili zoni III, u najvećem broju digitalnih fotografija. Na nekim fotografijama područje makule se delimično nalazi u zoni IV, što je posledica više medijalno lociranog optičkog diska i posledične redukcije širine koncentričnih zona.



Slika 8. Digitalna fotografija očnog dna desnog i levog oka sa konstruisanim i označenim koncentričnim zonama od centra optičkog diska.

Nakon toga je upotrebom softvera, “cell counter tool” (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>) analizirana zastupljenost morfoloških promena prisutnih na očnom dnu. Posebna pažnja posvećena je mikroaneurizmama, hemoragijskim promenama (tačkastim, crtastim i mrljastim hemoragijama), ishemijskim (cotton wool), kao i tvrdim eksudatima. Ispitivana je prvo njihova brojnost u svakoj od navedenih zona, nakon čega su na reprezentativnom uzorku, za svaki slučaj (10 ishemijskih i 10 hemoragijskih promena), su analizirane njihove morfometrijske karakteristike (area, perimeter, Feret-ov dijametar, cirkularnost). Područje cotton wool promena označeno je kao- A_{CWS} , područje tvrdih eksudata - A_{HE} i područje hemoragičnih lezija - A_H) mereno je ImageJ freehand tool, softverom.

U slučajevima kada su se merene promene preklapale u dve susedne zone merenja, područja ovih delova, lokalizovana inače u različitim zonama, merena su odvojeno.

U poslednjoj fazi kvantitativne analize bila je vršena analiza karakteristika krvnih sudova očnog dna (arterija i vena) (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>) merenjem njihovog broja (N) i spoljašnjeg dijametra (D_{BW}) u svakoj zoni retine na digitalnoj fotografiji očnog dna. Brojani su svi krvni sudovi, a u slučaju njihovog grananja, dva novoformirana krvna suda računata su posebno, kao dva odvojena krvna suda.

Spoljašnji dijametar (D_{BW}) meren je na tri različite lokalizacije krvnih sudova unutar optičkog diska, kao i svih pet zona oko nje. Iz izmerenih vrednosti izračunavana je prosečna vrednost za krvne sudove (arterije i vene) unutar diska i za krvne sudove (arterije i vene) u svih pet napred navedenih zona. Prosečne vrednosti parametara, dobijenih merenjem struktura očnoga dna za svaki od ispitivanih slučajeva, prikazane su tabelarno i statistički analizirane.

4.5.1. Statistička obrada morfometrijskih podataka

Statistički paket SPSS verzija 16 korišćen je za statističku analizu dobijenih rezultata. Klasifikaciona analiza je izvršena pomoću k-means metode. Broj krvnih sudova retine u svakoj ispitivanoj zoni i njihov prosečni spoljašnji dijametar korišćeni su kao klasifikacioni parametar. Razlike između morfometrijskih parametara i analiza krvi izvršene su Studentovim t-testom za nezavisne uzorke.

One Way ANOVA je korišćena kao statistička metoda za utvrđivanje statističke značajnosti broja uočenih krvnih sudova i srednje vrednosti spoljašnjeg dijametra ispitivanih zona na digitalnim slikama retine ispitanika.

Dodatne razlike između tri grupe ispitanika analizirane su pomoću Tukey's and Games-Howell post hoc testova. Homogenost varijanse za izmerene parametre analizirana je Levene's testom. Fischer-ov test egzaktno verovatnoće korišćen je za analizu razlika frekvence između ispitivanih grupa. Efekat veličine (d) za dobijene razlike računat je po formuli Lipsey i Willson-a (Lipsey i Willson, 2001).

Rezultati morfometrijske analize, broj krvnih sudova, njihov spoljašnji dijametar u svakoj od ispitivanih zona korišćen je za klaster analizu. Dobijeni rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

Korelacija biohemijskih parametara (biomarkera inflamacije, antioksidativne zaštite i oksidativnog stresa) međusobno, kao i korelacija ispitivanih biomarkera inflamacije, oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, sa dijametrom i brojem krvnih sudova kod ispitivanih grupa bolesnika, prikazana je tabelarno i grafički. One Way ANOVA je korišćena kao statistička metoda.

5. REZULTATI

5.1. UZRAST, POL ISPITANIKA I DUŽINA TRAJANJA BOLESTI

Ispitivanjem je obuhvaćeno 90 ispitanika, podeljenih u tri grupe: prvu, kontrolnu grupu činili su zdravi ispitanici, drugu grupu činili su ispitanici sa dijagnozom DMT2 početnim neproliferativnim, blagim promenama (RDNP), treću grupu činili su ispitanici sa dijagnozom DMT2 i promenama na očnom dnu, koje su odgovarale veoma teškim preproliferativnim, promenama (RDPP). Kontrolnu grupu činili su zdravi ispitanici, sa negativnom anamnezom o prisustvu dijabetesa, negativnom familijarnom anamnezom o prisustvu ovog oboljenja, bez sistemskog i drugog akutnog i hroničnog inflamatornog procesa u trenutku sprovođenja ispitivanja, kao i bez akutnog i hroničnog očnog oboljenja.

U grupi ispitanika sa RDNP prosečna starost izražena u godinama života je 50,6, u grupi ispitanika sa RDPP 52,6 godina (tabela 1).

Tabela 1. Uzrast ispitanika, pol, dužina trajanja bolesti

Parametar	N	Uzrast (godine)	Pol muški	Pol ženski	Dužina trajanja bolesti (godine)
Kontrola	30	50,7±6,9	17 (56,7%)	13 (43,3%)	0
RDNP	30	50,6±7,4	17 (56,7%)	13 (43,3%)	9,40±4,11
RDPP	30	52,6±7,7 ^{a,b}	18 (60%)	12 (40%)	12,43±5,14 ^c

a- $p < 0,01$ vs. Kontrola, b- $p < 0,01$ vs. RDNP; c- $p < 0,05$ vs. RDNP

Prosečna starost, izražena u godinama, ispitanika kontrolne grupe bila je 50,7 godina. Uočena je statistički značajna razlika u uzrastu između grupe ispitanika sa početnim i uznapredovalim oblikom dijabetesne retinopatije, RDNP i RDPP ($p < 0,01$).

Grupu ispitanika sa DM i promenama na očnom dnu činilo je ukupno 60 ispitanika, 37 muškog pola ili 61,7% i 23 ženskog pola ili 38,33%. U grupi ispitanika sa početnim promenama RDNP, ukupno 30 ispitanika, bilo je 17 osoba muškog pola ili 56,7% i 13 osoba ženskog pola ili 43,3%, a u grupi ispitanika sa RDPP 18 osoba muškog pola ili 60% i 12 ženskog pola ili 40%. Kontrolnu grupu činilo je ukupno 30 ispitanika, 17 muškog ili 56,7% i 13 ženskog

pola ili 43,3%. U odnosu na pol ispitanika nije uočena statistički značajna razlika između ispitivanih grupa.

Kod ispitanika sa RDNP prosečna dužina trajanja bolesti iznosila je 9,4 godine, dok u grupi sa promenama na očnom dnu, po tipu uznapredovalih, RDPP, prosečna dužina trajanja oboljenja iznosila je 12,43 godine. Uočena je statistički značajna razlika u dužini trajanja oboljenja kod ispitanika grupe sa RDNP u odnosu na grupu ispitanika sa RDPP ($p < 0,05$).

5.2. VREDNOSTI PARAMETARA GLIKOREGULACIJE

Glikemija i vrednosti HbA1c određivane su kao parametri glikoregulacije u svih ispitanika. Vrednosti glikemije utvrđivane su kod ispitanika različitih grupa uzimanjem uzoraka krvi u ranim jutarnjim satima našte. Prosečne vrednosti glikemije osoba sa RDNP bile su $8,48 \pm 2,26$ mmol/L, u grupi ispitanika sa RDPP $10,27 \pm 4,43$ mmol/L i u kontrolnoj grupi bile su $5,04 \pm 0,44$ mmol/L (tabela 2).

Tabela 2. Vrednosti glikemije i glikoziliranog hemoglobina u krvi ispitanika.

Parametar	N	Glikoza mmol/L	HbA1c (%)
Kontrola	30	$5,04 \pm 0,44$	$5,07 \pm 0,49$
RDNP	30	$8,48 \pm 2,26^a$	$7,45 \pm 0,95^a$
RDPP	30	$10,27 \pm 4,43^{a,b}$	$8,46 \pm 1,68^{a,c}$

a- $p < 0,001$ vs. Kontrola, b- $p < 0,001$ vs. RDNP; c- $p < 0,05$ vs. RDNP;

Najviše vrednosti glikemije u krvi uočene su u grupi ispitanika sa RDPP. Uočena je statistički značajna razlika u vrednostima glikoze u krvi između grupe ispitanika sa dijagnozom DMT2 i sa promenama na očnom dnu i kontrolne grupe, kao i između grupe ispitanika RDNP i RDPP ($p < 0,001$).

Procenat glikoziliranog hemoglobina A1c (HbA1c) određivan je u krvi svih ispitanika i prikazane su njegove vrednosti (tabela 2). Najviše vrednosti HbA1c bile su u grupi ispitanika RDPP (8,46%), niže u grupi ispitanika sa blagim promenama po tipu RDNP (7,45%), dok su najniže vrednosti dobijene u kontrolnoj grupi (5,07%). Uočena je statistički značajna razlika između dobijenih vrednosti HbA1c u grupi ispitanika sa RDPP u odnosu na kontrolnu

grupu ($p < 0,001$). Upoređivanjem dobijenih vrednosti HbA1c, uočena je statistički značajna razlika dobijenih vrednosti istog parametra kod ispitanika sa RDPP u odnosu na ispitanike sa RDNP ($p < 0,05$).

5.3. VREDNOSTI PARAMETARA AZOTNOG BILANSA I UKUPNIH PROTEINA U KRV I ISPITANIKA

U krvi svih ispitanika određivan je nivo uree, kreatinina i ukupnih proteina plazme (tabela 3). Vrednosti uree bile su najviše u grupi ispitanika sa RDPP ($6,19 \pm 2,39$ mmol/L), a najniže u kontrolnoj grupi ($4,67 \pm 1,14$ mmol/L). Između dobijenih vrednosti uree u ispitivanim grupama uočena je statistički značajna razlika, kako između grupa ispitanika sa DMT2 i promenama na očnom dnu i kontrolne grupe ($p < 0,01$). Vrednost kreatinina, takođe, bila je najviša u grupi ispitanika sa RDPP ($93,35 \pm 58,18$ μ mol/L), a statistička značajnost, dobijena upoređivanjem vrednosti ovog parametra, uočena je između grupe ispitanika sa promenama na očnom dnu po tipu RD i kontrolne grupe, ali ne i između dve grupe ispitanika sa RDNP i RDPP.

Tabela 3. Vrednosti uree, kreatinina i ukupnih proteina u krvi ispitanika.

Parametar	N	Urea (mmol/L)	Kreatinin (μ mol/L)	Ukupni proteini plazme (g/L)
Kontrola	30	$4,67 \pm 1,14$	$69,17 \pm 8,10$	$71,48 \pm 4,35$
RDNP	30	$5,68 \pm 1,21^a$	$90,63 \pm 20,12^a$	$69,13 \pm 5,65$
RDPP	30	$6,19 \pm 2,39^a$	$93,35 \pm 58,18^a$	$68,92 \pm 6,01$

a - $p < 0,01$ vs. Kontrola

Ukupni proteini plazme određivani su u krvi svih ispitanika, izraženi u mmol/L, a dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 3. Najniže vrednosti ukupnih proteina bile su u grupi ispitanika sa RDPP ($68,92 \pm 6,01$ g/L). Dobijene prosečne vrednosti za grupe ispitanika, grupe sa RDNP, RDPP i kontrolne grupe, nisu pokazivale statističku značajnost.

5.4. VREDNOSTI BIOMARKERA INFLAMACIJE U KRV I ISPITANIKA

U krvi svih ispitanika određivani su sledeći biomarkeri inflamacije: vrednost sedimentacije u prvom satu, vrednosti fibrinogena, C-reaktivnog proteina (CRP) i hitinaza-3 protein 1 (YKL-40). Dobijene vrednosti navedenih biomarkera inflamacije prikazane su u tabeli 4 i grafikonu 5.

Tabela 4. Biomarkeri inflamacije u krvi ispitanika.

Parametar	N	Sedimentacija (mm/h)	Fibrinogen (g/L)	CRP (mg/L)
Kontrola	30	7,03±3,24	3,99±0,40	3,94±0,43
RDNP	30	15,60±8,33 ^a	7,83±3,10 ^a	5,62±1,08 ^a
RDPP	30	20,43±12,73 ^a	7,37±2,38 ^a	7,20±2,49 ^{a,b}

a - p < 0,001 vs. Kontrola; b - p < 0,001 vs. RDNP

Najviše prosečne vrednosti sedimentacije bile su u grupi ispitanika sa RDPP (20,43±12,73 mm/h). Prisutna je statistički značajna razlika između grupe ispitanika sa DMT2 i sa promenama na očnom dnu u odnosu na kontrolnu grupu (p<0,001). Međutim, nije uočena statistička značajnost u vrednostima ovog biomarkera inflamacije između grupa ispitanika sa RDNP i RDPP.

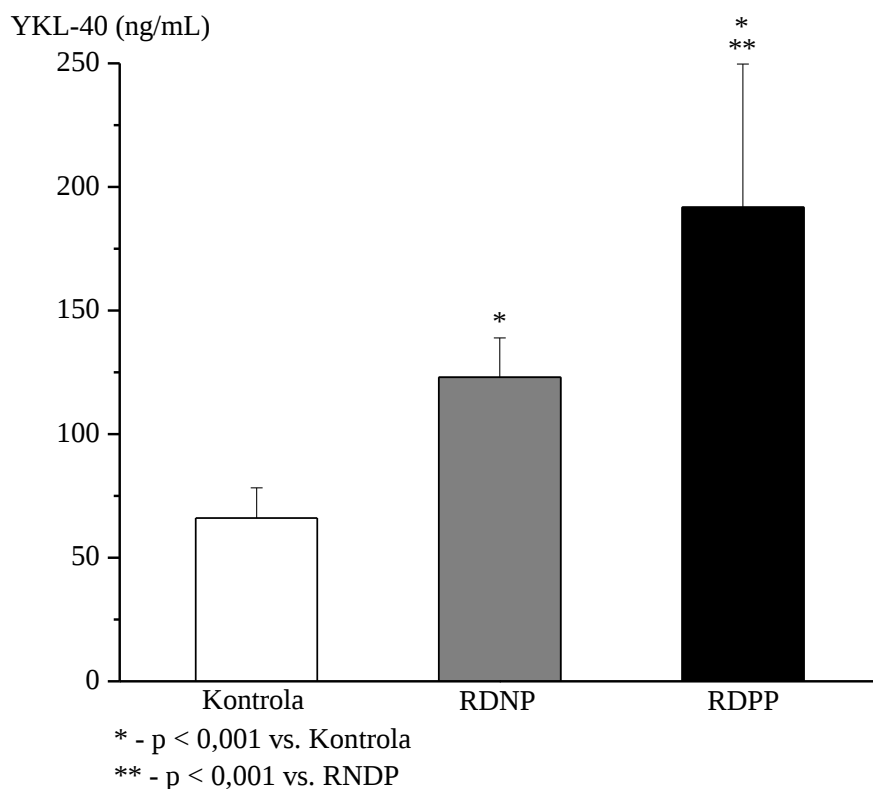
U krvi ispitanika su određivane vrednosti fibrinogena, kao biomarkera inflamacije, koje su prikazane u tabeli 4. Najviše vrednosti fibrinogena uočene su u grupi ispitanika sa RDPP (7,37±2,38 g/L), a najniže u kontrolnoj grupi (3,99±0,40 g/L).

Prisutna je statistički značajna razlika u vrednostima fibrinogena obe grupe ispitanika obolelih od DMT2 sa promenama na očnom dnu, u odnosu na kontrolnu grupu (p<0,001). Nije uočena statistički značajna razlika između vrednosti fibrinogena grupe ispitanika sa RDNP i RDPP.

Prosečne vrednosti CRP-a bile su najviše u grupi ispitanika sa RDPP (7,20±2,49 mg/L), a najniže u kontrolnoj grupi (3,94±0,43 mg/L). Vrednosti CRP-a u grupi ispitanika sa RDNP bile su 5,62±1,08 mg/L. Uočena je statistički značajna razlika u vrednosti koncentracija CRP-a između grupa ispitanika sa DMT2 i kontrolne grupe (p<0,001).

Takođe, uočena je statistički značajna razlika u vrednosti ovog parametra između dve grupe ispitanika sa različitim oblikom RD, u grupi ispitanika sa RDPP, u odnosu na grupu ispitanika sa RDNP (p<0,001).

Prosečne vrednosti YKL-40 izražene su u ng/ml i prikazane u grafikonu 1. U grupi ispitanika sa početnim, blagim promenama, RDNP su bile prisutne više vrednosti, ovog parametra (123,05±15,81 ng/ml), u odnosu na kontrolnu grupu, a najviše su bile u grupi ispitanika sa promenama označenim kao RDPP (191,79±57,94 ng/mL) (grafikon 1).



Grafikon 1. YKL-40 u plazmi ispitanika sve tri grupe.

U kontrolnoj grupi vrednosti ovog parametra su bile najniže 66,02±12,21 ng/ml. Uočena je statistički značajna razlika u vrednosti ovog biomarkera inflamacije između grupa ispitanika sa DMT2 i promenama na očnom dnu i grupe kontrola ($p < 0,001$) (grafikon 1).

Između grupe ispitanika sa RDNP i grupe ispitanika sa RDPP uočena je visoka statistička značajnost u vrednosti koncentracije ovog biomarkera inflamacije ($p < 0,001$) (grafikon 1).

5.5. VREDNOSTI LIPOPROTEINA, TRIGLICERIDA U SERUMU ISPITANIKA, ATEROGENI INDEKS I INDEKS TELESNE MASE ISPITANIKA

Kod 90 ispitanika su u serumu određivane koncentracije ukupnog holesterola, njegove lipoproteinske frakcije, HDL (*eng.*-high density lipoproteins), LDL (*eng.*-low density lipoproteins) i vrednosti triglicerida. Vrednosti koncentracija lipida izražene su u mmol/L, a dobijeni rezultati prikazani u tabeli 4.

Tabela 5. Vrednosti ukupnog holesterola, HDL, LDL i triglicerida u krvi ispitanika, aterogeni indeks i BMI

Parametar	N	Kontrola	RDNP	RDPP
Holesterol (mmol/L)	30	4,41±0,69	5,92±1,39 ^a	5,51±0,96 ^a
HDL (mmol/L)	30	1,61±0,69	2,00±1,39	1,26±0,26 ^{b,c}
LDL (mmol/L)	30	2,80±0,97	4,03±0,99 ^a	3,88±0,96 ^a
Trigliceridi (mmol/L)	30	1,21±0,31	1,91±0,72 ^a	1,90±0,67 ^a
Aterogeni indeks	30	2,05±0,93	2,57±1,29	3,54±1,09 ^{a,d}
BMI (kg/m²)	30	24,37±3,87	28,57±4,82 ^a	27,37±5,65

a - $p < 0,001$ vs. Kontrola; b - $p < 0,001$ vs. RDNP; c- $p < 0,05$ vs. Kontrola; d- $p < 0,01$ vs. RDNP

Najveće vrednosti koncentracije ukupnog holesterola bile su prisutne u grupi ispitanika sa RDNP (5,92±1,39 mmol/L). U kontrolnoj grupi su koncentracije navedenog parametra bile najniže (4,41±0,69 mmol/L).

Prisutna je statistički značajna razlika u vrednostima ovog parametra između obe grupe ispitanika sa DMT2 i promenama na očnom dnu i kontrolne grupe ($p < 0,001$). Vrednosti HDL frakcije holesterola bile su najviše u grupi ispitanika sa blagim početnim promenama, RDNP (2,00±1,39 mmol/L), a najniže vrednosti HDL uočene su u grupi ispitanika sa vrlo teškim proliferativnim promenama, RDPP (1,26±0,26 mmol/L).

Uočena je statistički značajna razlika u vrednosti ispitivanog parametra između ispitanika sa RDNP i RDPP ($p < 0,001$). Statistička razlika u vrednostima ovog parametra prisutna je i između grupe ispitanika sa RDPP u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$).

Vrednosti koncentracija LDL bile su najviše u grupi ispitanika sa DMT2 i promenama na očnom dnu, označenim kao RDNP (4,03±0,99 mmol/L), a najniže u grupi zdravih ispitanika (2,80±0,97 mmol/L). U obe grupe ispitanika sa DMT2 i promenama na očnom dnu vrednosti LDL bile su statistički značajno više nego u kontrolnoj grupi ($p < 0,001$).

Vrednosti triglicerida za sve tri grupe ispitanika prikazane su u tabeli 5. Najviše vrednosti triglicerida uočene su u grupi ispitanika sa blagim, početnim promenama RDNP (1,91±0,72 mmol/L), a najniže u kontrolnoj grupi ispitanika (1,21±0,31 mmol/L).

U odnosu na kontrolnu grupu, vrednosti triglicerida bile su povišene u obe grupe ispitanika sa RD ($p < 0,001$). Nije prisutna statistički značajna razlika u vrednostima ovog parametra između grupa ispitanika sa različitim stepenom promena na očnom dnu, odnosno grupi sa RDNP i RDPP.

Kod ispitanika svih grupa izračunavan je aterogeni indeks plazme (AIP)(tabela 5). Povišene vrednosti AIP u odnosu na referentne vrednosti dobijene su u obe grupe ispitanika sa dijagnozom DMT2 i promenama na očnom dnu. Najveća vrednost AIP bila je u grupi ispitanika sa RDPP ($3,54 \pm 1,09$). Uočena je statistički značajna razlika u vrednostima AIP između grupe ispitanika sa RDPP, u odnosu na ispitanike kontrolne grupe ($p < 0,001$). Prisutna je uočena statistička značajnost u vrednostima AIP između grupe ispitanika sa RDPP, u odnosu na grupu ispitanika RDNP ($p < 0,01$).

Kod svih ispitanika izračunavan je BMI (tabela 5). Najviši BMI bio je prisutan u grupi ispitanika sa RDNP ($28,57 \pm 4,82 \text{ kg/m}^2$). U odnosu na referentne vrednosti Svetske zdravstvene organizacije, ispitanici kontrolne grupe pripadali su grupi sa idealnom telesnom težinom ($24,37 \pm 3,87 \text{ kg/m}^2$).

Upoređivanjem prosečnih vrednosti BMI ispitanika sve tri grupe uočena je statistički značajna razlika između BMI ispitanika sa RDNP, u odnosu na kontrolnu grupu, pri čemu je BMI u grupi ispitanika sa RDNP bio statistički značajno veći ($p < 0,001$).

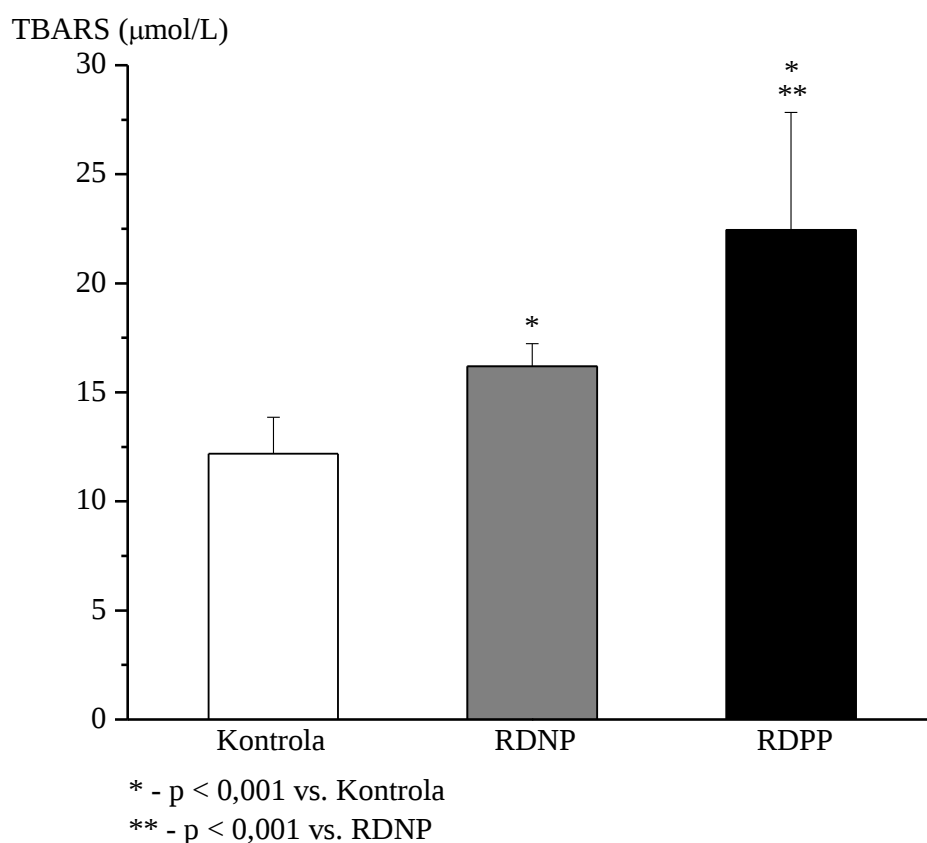
Između grupa ispitanika sa RDNP i RDPP nije uočena statistički značajna razlika u vrednostima ovog parametra.

5.6. PARAMETRI OKSIDATIVNOG STRESA I PARAMETAR ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE

Kod svih ispitanika određivane su koncentracije parametara oksidativnog stresa, i to produkti lipidne peroksidacije (TBARS) u plazmi i produkti uznapredovale oksidacije proteina u plazmi (AOPP) i vrednosti parametra antioksidativne neenzimske zaštite, ukupnih sulfhidrilnih grupa (SH grupe).

Najviše prosečne vrednosti TBARS dobijene su u grupi ispitanika sa RDPP ($22,45 \pm 5,39 \text{ } \mu\text{mol/L}$), a najniže u kontrolnoj grupi ($12,19 \pm 1,67 \text{ } \mu\text{mol/L}$) (grafikon 2). Vrednosti TBARS u grupi ispitanika sa RDNP bile su $16,19 \pm 1,05 \text{ } \mu\text{mol/L}$.

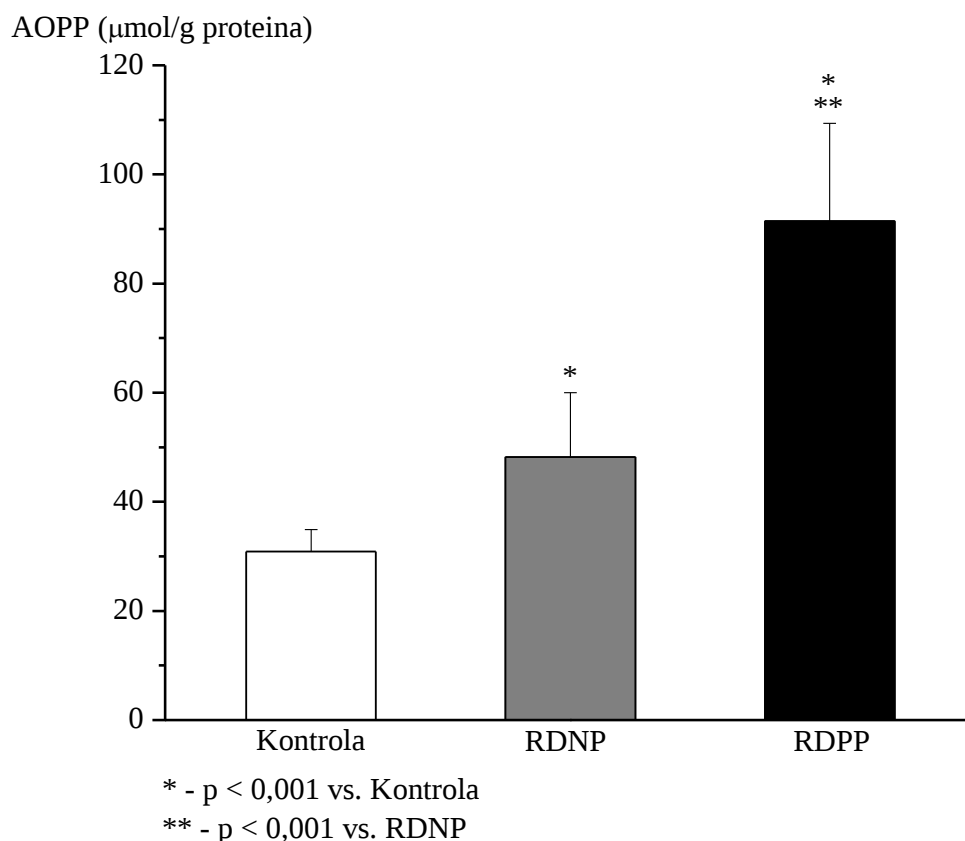
Upoređivanjem dobijenih vrednosti za ispitanike sve tri grupe uočena je statistički značajna razlika između grupa ispitanika sa DMT2 u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$) (grafikon 2).



Grafikon 2. Prosečne vrednosti TBARS kod ispitanika različitih grupa.

Kada je reč o odnosu dobijenih prosečnih vrednosti ovog parametra između grupe ispitanika sa RDNP i RDPP, uočeno je da je vrednost ovog parametra statistički značajno viša kod ispitanika sa RDPP ($p < 0,001$) (grafikon 2).

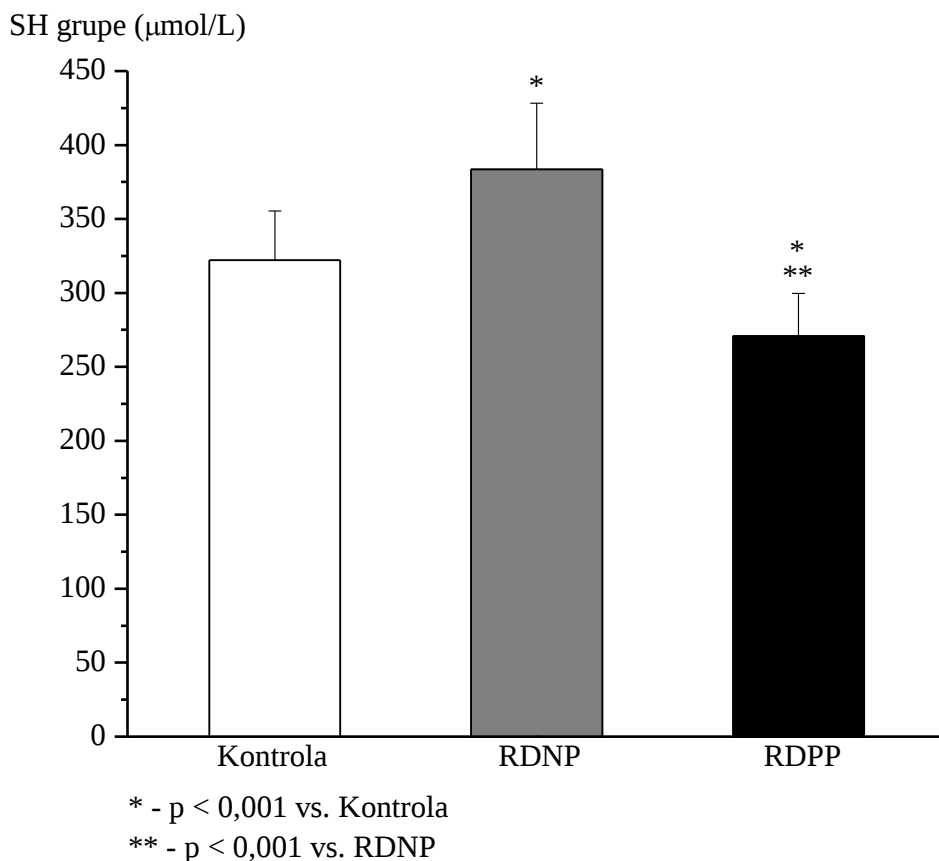
Najviše vrednosti AOPP bile su u grupi ispitanika sa RDPP ($91,45 \pm 17,94$ μmol/g proteina), a najniže prosečne vrednosti u kontrolnoj grupi i dobijene prosečne vrednosti u ovoj grupi iznosile su $30,86 \pm 4,06$ μmol/g proteina.



Grafikon 3. Prosečne vrednosti AOPP kod ispitanika različitih grupa.

Upoređivanjem dobijenih vrednosti za ispitanike sve tri grupe uočena je statistički značajna razlika između grupa ispitanika sa DMT2 u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$) (grafikon 3). Kada je reč o odnosu dobijenih prosečnih vrednosti ovog parametra između grupe ispitanika sa RDPP u odnosu na RDNP, uočeno je da je vrednost ovog parametra statistički značajno viša kod ispitanika sa RDPP ($p < 0,001$) (grafikon 3).

Dobijene prosečne vrednosti za ukupne SH grupe plazme iskazane su u $\mu\text{mol/L}$, i bile su sa najvišim vrednostima u grupi ispitanika sa početnim promenama na očnom dnu, RDNP ($383,56 \pm 44,67 \mu\text{mol/L}$), a njihove najniže vrednosti uočene su kod ispitanika sa RDPP ($270,89 \pm 28,81 \mu\text{mol/L}$) (grafikon 4).



Grafikon 4. Prosečne vrednosti ukupnih sulfhidrilnih grupa kod ispitanika.

Upoređivanjem dobijenih rezultata vrednosti ovog parametra uočena je statistički značajna razlika između vrednosti ukupnih SH grupa, grupe ispitanika sa RDNP u odnosu na kontrolnu grupu, gde je vrednost ukupnih SH grupa bila viša ($p < 0,001$).

Takođe, bila je prisutna statistički značajna razlika vrednosti SH grupa između ispitanika grupe sa RDPP i kontrolne grupe ispitanika, pri čemu su vrednosti SH grupa bile niže u grupi ispitanika sa RDPP ($270,89 \pm 28,81 \mu\text{mol/L}$), u odnosu na kontrolnu grupu ($322,09 \pm 33,36 \mu\text{mol/L}$; $p < 0,001$).

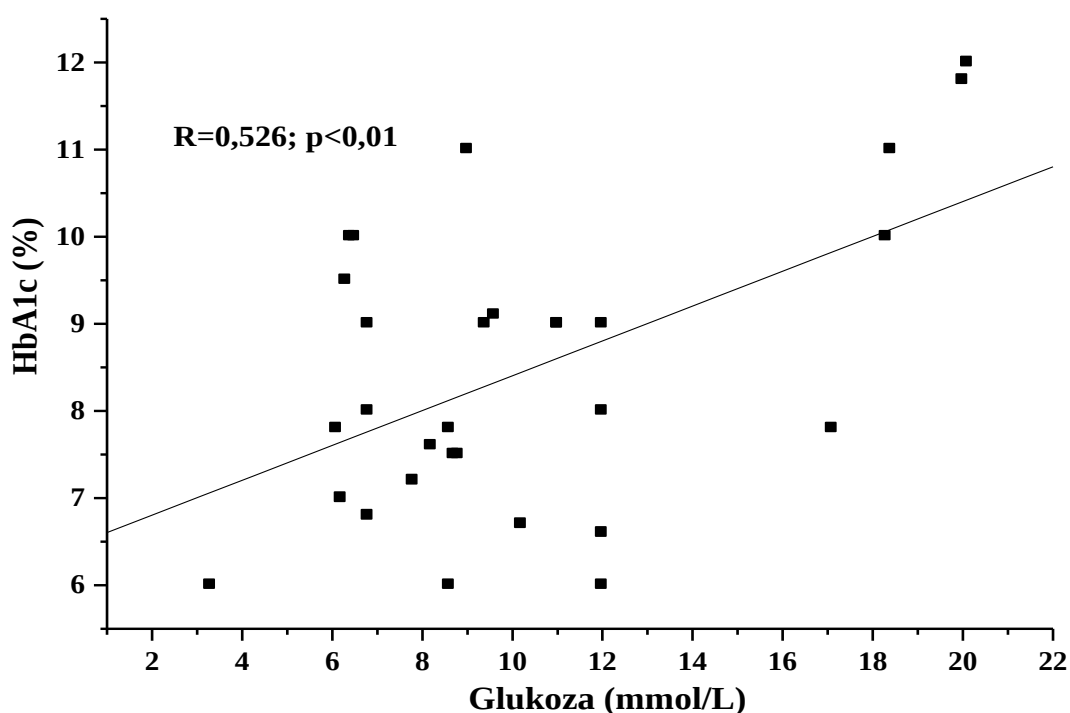
Upoređivanjem vrednosti SH grupa između grupe ispitanika sa RDNP i grupe ispitanika sa RDPP ($270,89 \pm 28,81 \mu\text{mol/L}$), uočeno je da su vrednosti SH grupa bile statistički značajno više u grupi ispitanika sa RDNP ($383,56 \pm 44,67 \mu\text{mol/L}$; $p < 0,001$) (grafikon 4).

5.7. KORELACIJA BIOHEMIJSKIH PARAMETARA KRVI

Na osnovu dobijenih rezultata urađene su korelacije sledećih biohemijskih parametara:

5.7.1. Korelacije glikoze sa glikoziliranim hemoglobinom A1c i glikoziliranog hemoglobina A1c sa lipoproteinima krvi

Glikoza u krvi i glikozilirani hemoglobin A1c - Na osnovu dobijenih prosečnih vrednosti koncentracija glikoze u krvi, izražene u mmol/L, i glikoziliranog hemoglobina (HbA1c), izraženog u procentima, određena je korelacija navedenih parametara. Uočena je pozitivna korelacija između nivoa glikoze, HbA1c sa stepenom izraženosti promena na očnom dnu, tj. veći nivo glikoze u krvi ispitanika i veći procenat nivoa glikoziliranog hemoglobina potvrđen je u grupi ispitanika sa RDPP ($p < 0,01$) ($p < 0,01$; $R = 0,526$). Dakle, nivo glikoze u krvi i procenat HbA1c direktno koreliraju sa preproliferativnim promenama na očnom dnu ispitanika sa RD.



Grafikon 5. Korelacija dobijenih vrednosti glikoze i HbA1c u tri grupe ispitanika.

Glikozilirani hemoglobin A1c i lipoproteini krvi - Korelacija dobijenih vrednosti glikoziliranog hemoglobina (HbA1c), izraženog u procentima, i ukupnog holesterola, kao i

njegovih frakcija, HDL i LDL, izraženih u mmol/L, u krvi ispitanika kontrolne grupe i obolelih od DMT2 sa promenama na očnom dnu, prikazana je tabelarno (tabela 5). Uočena je direktna korelacija navedenih parametara krvi u grupi ispitanika sa RDNP i to vrednosti HbA1c i ukupnog holesterola ($p<0,1$)($p<0,05$; $R=0,402$) i vrednosti HbA1c i LDL frakcije holesterola ($p<0,01$)($p<0,01$, $R=0,569$), tj. u grupi ispitanika sa RDNP porast vrednosti holesterola prati direktno porast vrednosti HbA1c (tabela 8). Korelacijom vrednosti HbA1c i LDL frakcije holesterola takođe je uočena direktna povezanost, tj. rast HbA1c u krvi ispitanika grupe sa RDNP prati rast vrednosti LDL frakcije holesterola. Za ostale parametre, HDL i trigliceride, kao i ostale grupe ispitanika, nije potvrđena korelacija (tabela 8).

Tabela 6. Korelacija vrednosti HbA1c i lipida u krvi.

HbA1c			
	Kontrola	RDNP	RDPP
Holesterol (mmol/L)	0,104	0,402	0,146
	0,583	0,028	0,441
LDL (mmol/L)	0,121	0,569	0,024
	0,522	0,001	0,900
HDL (mmol/L)	-0,080	0,005	-0,150
	0,673	0,980	0,430
Trigliceridi (mmol/L)	0,328	-0,076	0,258
	0,077	0,689	0,168

5.7.2. Korelacije biomarkera inflamacije, fibrinogena i C-reaktivnog proteina u krvi ispitanika

Na osnovu dobijenih rezultata, izvršena je korelacija vrednosti fibrinogena u plazmi i C-reaktivnog proteina (CRP), kao biomarkera inflamacije, u krvi svih ispitanika, grupe obolelih od DMT2 i kontrolne grupe (tabela 7). Koncentracije fibrinogena u plazmi izražena je u g/L a CRP-a u mg/L.

Na osnovu korelacije dobijenih vrednosti ovih parametara za ispitivane grupe, uočena je pozitivna korelacija između vrednosti fibrinogena i CRP u grupi ispitanika sa RDPP ($p<0,1$)($p<0,05$; $R=0,434$).

U grupi ispitanika sa RDPP porast vrednosti fibrinogena u plazmi prati porast CRP-a. Korelacija ovih biomarkera inflamacije nije uočena kod ispitanika ostalih grupa.

Tabela 7. Korelacija vrednosti fibrinogena i CRP-a

Fibrinogen (g/L)	Kontrola	RDNP	RDPP
	0,125	-0,045	0,434
CRP (mg/L)	0,510	0,814	0,017

5.7.3. Korelacije hitinaza-3 proteina 1 u krvi i sedimentacije, fibrinogena i C reaktivnog proteina

Na osnovu dobijenih rezultata, za biomarker inflamacije krvi u sve tri grupe ispitanika, grupu ispitanika sa RDNP, grupu ispitanika sa RDPP i kontrolnu grupu, urađena je korelacija biomarkera inflamacije i to za sledeće biomarkere: hitinaza-3 protein 1 (YKL-40) sa sedimentacijom, koncentracijom fibrinogena i CRP-a. Dobijene vrednosti za YKL-40 izražene su u ng/ml, vrednosti fibrinogena u g/L i CRP-a u mg/L, a vrednosti sedimentacije u mm/h. Rezultati su prikazani u tabeli 8.

Tabela 8. Korelacija vrednosti biomarkera inflamacije YKL-40 sa sedimentacijom, fibrinogenom, CRP-om, BMI, glikozom i HbA1c

YKL-40 (ng/ml)	Kontrola	RDNP	RDPP
	0,0009	-0,494	0,031
Se (mm/h)	0,996	0,005	0,871
	0,193	-0,183	0,137
CRP (mg/L)	0,306	0,334	0,470
	0,137	0,239	0,031
Fibrinogen (g/L)	0,471	0,203	0,731

Na osnovu korelacije ispitivanih biomarkera inflamacije za tri grupe ispitanika uočena je korelacija između YKL-40, biomarkera inflamacije i sedimentacije u grupi ispitanika sa RDNP ($p < 0,01$) ($p = 0,005$; $R = -0,494$) (tabela 8).

5.7.4. Korelacije hitinaza-3 proteina 1 u krvi sa BMI, glikozom i HbA1c

Na osnovu dobijenih rezultata, za biomarker inflamacije krvi u sve tri grupe ispitanika, grupu ispitanika sa RDNP, grupu ispitanika sa RDPP i kontrolnu grupu, urađena je korelacija biomarkera inflamacije YKL-40 sa BMI i parametrima glikoregulacije, vrednostima glikoze i HbA1c (tabela 11).

Tabela 9. Korelacija vrednosti biomarkera inflamacije YKL-40 sa BMI, glikozom i HbA1c

YKL-40 (ng/ml)	Kontrola	RDNP	RDPP
BMI (kg/m²)	-0,091 0,632	-0,076 0,690	0,272 0,146
Glikoza (mmol/L)	0,265 0,157	0,150 0,429	0,316 0,088
HbA1c (%)	0,044 0,817	0,214 0,256	0,074 0,699

Korelacija ispitivanih biomarkera za ostale grupe ispitanika nije uočena (tabela 9).

5.7.5. Korelacije hitinaza-3 proteina 1 u krvi i parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Na osnovu dobijenih rezultata, hitinaza-3 protein 1 (YKL-40), biomarkera inflamacije i vrednosti parametara antioksidativne zaštite, ukupnih sulfhidrilnih grupa (SH grupa), i parametara oksidativnog stresa, TBARS kao parametra lipidne peroksidacije i AOPP kao produkata uznapredovale oksidacije proteina, određena je korelacija dobijenih vrednosti (tabeli 10).

Tabela 10. Korelacija vrednosti YKL-40 i parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.

YKL-40 (ng/ml)	Kontrola	RDNP	RDPP
TBARS (μmol/L)	-0,182 0,335	-0,136 0,473	-0,283 0,130
SH grupe (μmol/L)	0,115 0,545	0,429 0,018	0,213 0,258
AOPP (μmol/g proteina)	0,067 0,724	-0,003 0,985	0,147 0,440

Vrednosti YKL-40 izražene su u ng/ml, ukupnih SH grupa i TBARS u μmol/L, a AOPP μmol/g proteina. Uočena je korelacija između vrednosti YKL-40 i vrednosti ukupnih SH grupa, ($p=0,018$, $R=0,429$) u grupi ispitanika sa RDNP (tabela 10). Porast vrednosti YKL-40 prati porast vrednosti ukupnih SH grupa u grupi ispitanika sa RDNP (tabela 10).

5.8. REZULTATI MORFOMETRIJSKE ANALIZE PROMENA NA OČNOM DNU

5.8.1. Broj krvnih sudova na optičkom disku

Analiziran je broj krvnih sudova na optičkom disku desnog oka (OD-BKS). Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 11.

Tabela 11. Broj krvnih sudova na optičkom disku desnog oka.

Grupa ispitanika	N	OD-BKS
Kontrola	25	18,64 ±3,22
RDNP	17	17,76±3,80
RDPP	9	14,00±3,39 ^{a,b}

a-p<0,05vs. Kontrola; b-p<0,05vs. RDNP.

Statistička značajnost ustanovljenih razlika između dobijenih vrednosti morfometrijskih parametara ispitivana je One Way ANOVA testom. Dodatno, značajnost razlika ispitivanih parametara između grupa ispitanika određivana je Tukey-evim post hoc testom, a u slučaju prisustva statistički značajne razlike varijansi ispitivanih grupa sa Games-Howell-ovim post hoc testom. Broj krvnih sudova optičkog diska desnog oka statistički se značajno razlikovao između ispitivanih grupa ($F(2,48)=6,029$; $p=0,005$). Tukey post hoc test je dodatno ukazao da je prosečan broj krvnih sudova optičkog diska desnog oka kod ispitanika sa RDPP manji u odnosu na ispitanike kontrolne grupe i ispitanike sa RDNP ($p<0,05$). Vrednosti ovog parametra kod ispitanika sa RDNP bile su manje u odnosu na kontrolnu grupu, sa statistički značajnom razlikom ($p<0,05$)(tabela 11).

Tabela 12. Broj krvnih sudova na optičkom disku levog oka.

Grupa ispitanika	N	OL-BKS
Kontrola	25	18,48±3,15
RDNP	17	16,53±3,86 ^a
RDPP	9	14,56±3,13 ^a

a-p<0,05vs. Kontrola.

Prosečan broj krvnih sudova levog optičkog diska levog oka (OL-BKS) ispitanih grupa prikazan je u tabeli 14. Kao i u slučaju desnog oka, prosečan broj krvnih sudova optičkog diska se je statistički značajno razlikovao između analiziranih grupa ($F(2,48)$; $p=4,817$, $p=0,012$). Tukey post hoc test je dodatno ukazao da su vrednosti ovog parametra bile statistički značajno manje obe grupe ispitanika sa RD u odnosu na kontrolnu grupu ($p<0,05$), dok su vrednosti RDPP grupe manje u odnosu na RDNP grupu, ali bez statistički značajne razlike ($p>0,05$)(tabela 12).

5.8.2. Dijametar krvnih sudova na optičkom disku

Prosečan dijametar krvnih sudova optičkog diska desnog oka (OD-DKS) pokazivao je suprotan trend, u odnosu na trend broja krvnih sudova na optičkom disku (tabela 13).

Tabela 13. Dijametar krvnih sudova na optičkom disku desnog oka.

Grupa ispitanika	N	OD-DKS (μm)
Kontrola	25	$74,89 \pm 10,35$
RDNP	17	$83,56 \pm 6,66^a$
RDPP	9	$94,75 \pm 12,28^{a,b}$

a- $p<0,05$ vs. Kontrola; b- $p<0,05$ vs. RDNP

Prosečne vrednosti ovog parametra su se razlikovale između napred navedenih grupa ($F(2,48)=14,532$; $p<0,0001$). Tukey post hoc test je dodatno ukazao da je prosečan dijametar obe grupe ispitanika sa RD statistički značajno veći u odnosu na ispitanike kontrolne grupe, ($p<0,05$)(tabela 14).

Tabela 14. Dijametar krvnih sudova na optičkom disku levog oka.

Grupa ispitanika	N	OL-DKS (μm)
Kontrola	25	$76,37 \pm 8,14$
RDNP	17	$86,37 \pm 9,19^a$
RDPP	9	$91,05 \pm 14,46^{a,b}$

a- $p<0,05$ vs. Kontrola; b- $p<0,05$ vs. RDNP

Vrednost ovog parametra u RDNP grupi bila je statistički značajno viša u odnosu na kontrolnu, ali statistički značajno niža u odnosu na RDPP grupu ($p < 0,05$), čiji su se slučajevi karakterisali najvišim vrednostima ovog parametra (tabela 14).

Prosečan dijametar krvnih sudova optičkog diska levog oka (OL-DKS) pratio je trend odnosa dijametara krvnih sudova i njihovog broja na optičkom disku istog oka (tabela 16). Prosečne vrednosti ovog parametra su se razlikovale između napred navedenih grupa ($F(2,48)=9,621$; $p < 0,0001$). Tukey post hoc test je dodatno ukazao da je prosečan dijametar obe grupe ispitanika sa RD statistički značajno veći u odnosu na ispitanike kontrolne grupe, respektivno ($p < 0,05$). Vrednost ovog parametra u RDNP grupi bila je statistički značajno viša u odnosu na kontrolnu, ali statistički značajno niža u odnosu na RDPP grupu ($p < 0,05$), čiji slučajevi su se karakterisali najvišim vrednostima ovog parametra (tabela 14).

5.8.3. Broj i dijametar krvnih sudova u različitim zonama očnog dna

Na digitalnim fotografijama desnog i levog oka kod svakog ispitanika određivan je broj (D-BKS i L-BKS) i spoljašnji dijametar krvnih sudova (D-DKS i L-DKS). Prilikom analize, očno dno je podeljeno u pet koncentričnih zona sa centrom u optičkom disku (slika 8). Zona koja neposredno okružuje optički disk označavana je kao prva. Sve zone su konstruisane kao jednake i označene u skladu sa porastom distance od optičkog diska (zone II, III, IV, V). Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 15 i 16 i u grafikonu 6. Rezultati ovih analiza pokazali su statističku značajnost između tri posmatrane grupe ispitanika.

Prosečan broj krvnih sudova retine (D-BKS) bio je značajno manji u grupi ispitanika sa RDPP u odnosu na kontrolnu grupu i grupu ispitanika sa RDNP u svih pet ispitivanih zona retine na digitalnim fotografijama očnog dna desnog oka (tabela 15). Međutim, prosečne vrednosti D-DKS retine bile su značajno više u grupi ispitanika sa RDPP u svih pet posmatranih zona u odnosu na kontrolnu grupu i grupu ispitanika sa RDNP (tabela 15).

Ranije navedeni morfometrijski parametri, prosečan broj krvnih sudova retine (L-BKS) i vrednosti njihovog prosečnog spoljašnjeg dijametara (L-DKS) pokazuju isti trend kao na desnom oku. Prosečan L-BKS bio je značajno veći u kontrolnoj grupi i grupi ispitanika sa RDNP u odnosu na grupu ispitanika sa RDPP u svih pet ispitivanih zona retine na digitalnim fotografijama očnog dna levog oka (tabela 16).

One way ANOVA pokazuje da postoji statistički značajna razlika u broju krvnih sudova u svih pet zona retine desnog i levog oka, i to u zoni I desnog oka ($F(2,48)=220,863$; $p < 0,005$), u zoni I levog oka ($F(2,48)=99,649$; $p < 0,5$), u zoni II desnog oka ($F(2,48)=$

1510,067; $p < 0,0001$), zoni II levog oka ($F(2,48)=757,031$, $p < 0,005$), zoni III ($F(2,48)=2217,981$; $p < 0,0001$) desnog oka i zoni III levog oka ($F(2,48)=1889,328$; $p < 0,0001$). Uopšteno, vrednosti ovog parametra rastu od optičkog diska do zone III, gde su prisutne najviše vrednosti, tj. najveća prosečna vrednost broja krvnih sudova retine, koja postepeno opada na oba oka u sve tri grupe ispitanika.

Games Howell post hoc test pokazuje da je na desnom oku u grupi ispitanika sa RDNP prosečan broj krvnih sudova statistički značajno veći ($p < 0,05$) u zoni II, zoni III i zoni IV nego na optičkom disku, kao i u odnosu na zonu I i zonu V (tabele 15 i 16). Ovaj parametar bio je veći i u zoni IV u odnosu na zonu I, ali ova razlika nije bila statistički značajna. Prosečan broj krvnih sudova u zoni II, zoni III i zoni IV nije pokazivao statistički značajnu razliku primenom ovog testa.

Tukey's post hoc test pokazuje da je u grupi ispitanika sa RDPP prosečan broj krvnih sudova značajno viši ($p < 0,05$) u zoni II i zoni III nego na optičkom disku i u zoni V, kao i u zoni I u odnosu na zonu V (tabela 15 i 16). Vrednosti ovog parametra se nisu značajno razlikovale između ostalih zona na desnom oku u okviru grupe ispitanika sa RDPP. Prosečan broj krvnih sudova u svakoj zoni pokazuje sličan trend na levom oku u grupi ispitanika sa RDNP, dok je u grupi ispitanika sa RDPP na levom oku u zonama I, II i III prisutan statistički značajno veći prosečan broj krvnih sudova u odnosu na prosečan broj krvnih sudova na optičkom disku levog oka, kao i u zonama IV i V (tabela 15 i 16).

Prosečna vrednost spoljašnjeg dijametra povećava se od optičkog diska do zone V i to statistički značajnije na desnom oku u grupi ispitanika sa RDNP ($F(5, 96)=48,22$; $p < 0,0001$, $d=2,78$) i u grupi ispitanika sa RDPP ($F(5, 48)=6,04$; $p < 0,0001$, $d=1,26$) (tabela 15 i grafikon 6). Tukey's post hoc test dodatno pokazuje da se u grupi ispitanika sa RDNP ovaj parametar statistički značajno razlikuje ($p < 0,05$) u zoni I i zoni II u odnosu na optički disk. Spoljašnji dijametar krvnih sudova u zonama III, IV i V bio je značajno ($p < 0,05$) veći nego na optičkom disku, kao i zonama I i II. Dobijene vrednosti spoljašnjeg dijametra krvnih sudova u zonama III, IV i V nisu pokazivale statistički značajnu razliku. U grupi ispitanika sa RDPP ovaj parametar je pokazivao sličan trend, sa izuzetkom da je ovo povećanje bilo statistički značajno ($p < 0,05$) u zonama III, IV i V, u odnosu na izmerene vrednosti spoljašnjeg dijametra krvnih sudova na optičkom disku i zoni I. Razlika u izmerenoj vrednosti ovog parametra između ostalih zona nije pokazivala statističku značajnost.

Na digitalnim fotografijama očnog dna levog oka, spoljašnji dijametar krvnih sudova povećavao se od optičkog diska do zone V, slično kao na očnom dnu desnog oka (tabela 15, grafikon 6). Tukey's post hoc test pokazao je da vrednosti spoljašnjeg dijametra krvnih sudo-

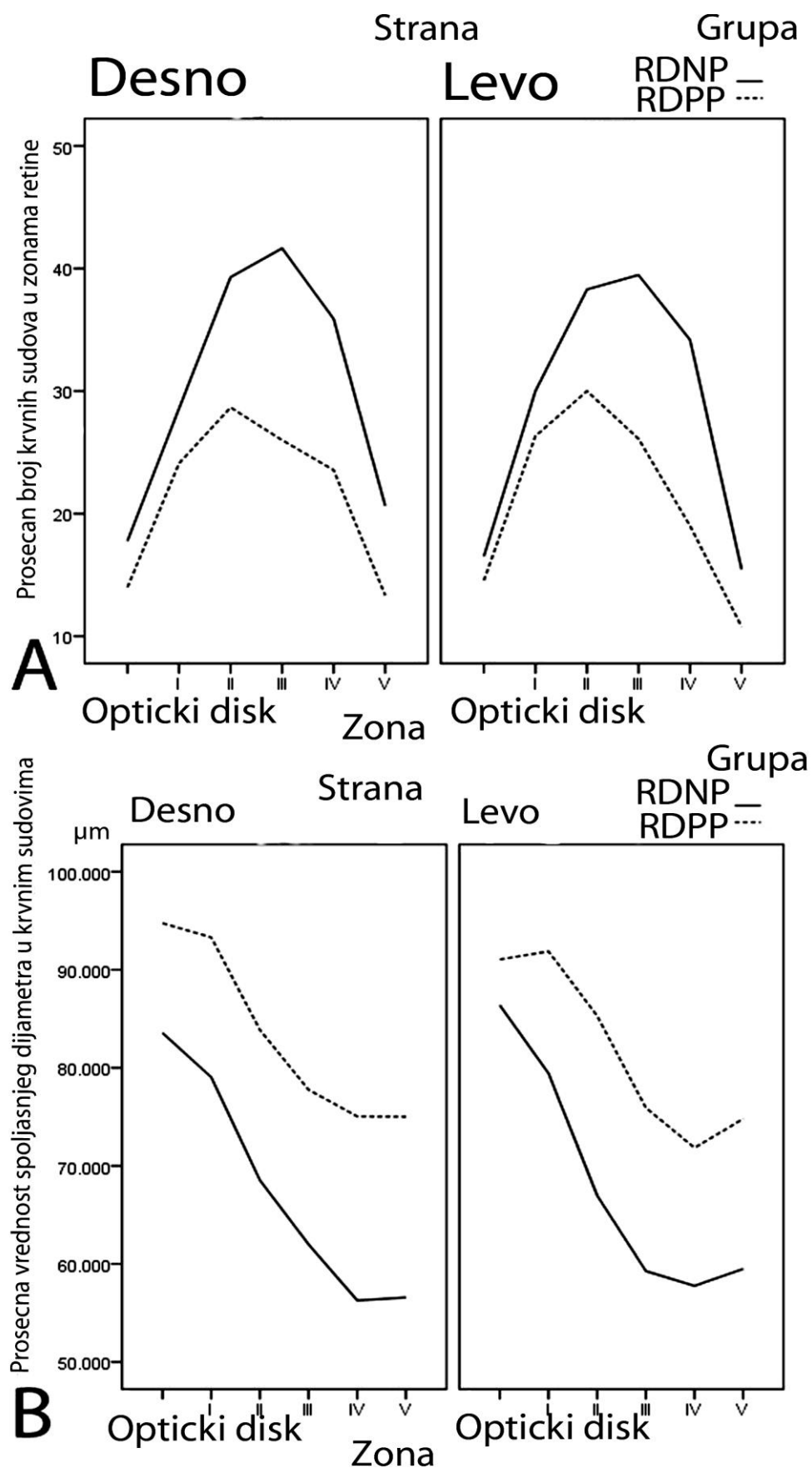
va značajno rastu ($p < 0,05$) u zonama II, III, IV i V, u odnosu na isti parametar na optičkom disku i u zoni I. Statistička značajnost bila je prisutna i u grupi ispitanika sa RDPP. Games Howell post hoc test pokazao je da je spoljašnji dijametar krvnih sudova statistički značajno veći ($p < 0,05$) u zoni I u odnosu na zonu IV.

Tabela 15. Broj i dijametar krvnih sudova retine u ispitivanim zonama očnog dna desnog oka.

Zona	Parametar	Grupa	N	$\bar{X} \pm SD$
Zona I	BKS	Kontrola	25	29,88±6,610
		RDNP	17	28,59±5,112 ^a
		RDPP	9	24,11±4,106 ^b
	DKS (μm)	Kontrola	25	74,287±8,317
		RDNP	17	79,043±6,660
		RDPP	9	93,300±10,643
Zona II	BKS	Kontrola	25	43,760±8,828
		RDNP	17	39,294±2,289
		RDPP	9	28,667±7,382
	DKS (μm)	Kontrola	25	64,194±8,052
		RDNP	17	68,537±7,768
		RDPP	9	83,859±11,612
Zona III	BKS	Kontrola	25	44,04±7,080
		RDNP	17	41,65±11,096
		RDPP	9	26,00±11,325
	DKS (μm)	Kontrola	25	59,389±8,591
		RDNP	17	61,994±8,231
		RDPP	9	77,758±10,064
Zona IV	BKS	Kontrola	25	36,44±7,932
		RDNP	17	35,88±8,371
		RDPP	9	23,56±11,26
	DKS (μm)	Kontrola	25	55,62±6,683
		RDNP	17	56,276±4,519
		RDPP	9	75,043±8,860
Zona V	BKS	Kontrola	25	21,40±5,099
		RDNP	17	21,65±5,766
		RDPP	9	13,33±4,243
	DKS (μm)	Kontrola	25	56,114±6,466
		RDNP	17	56,575±6,722
		RDPP	9	75,014±11,394

Tabela 16. Broj i dijametar krvnih sudova retine u ispitivanim zonama očnog dna levog oka

Zona	Parametar	Grupa	N	$\bar{X} \pm SD$
Zona I	BKS	Kontrola	25	30,000±4,983
		RDNP	17	30,000±6,982
		RDPP	9	26,333±4,472
	DKS (μm)	Kontrola	25	76,579±7,563
		RDNP	17	79,435±8,581
		RDPP	9	91,894±12,422
Zona II	BKS	Kontrola	25	40,68±8,097
		RDNP	17	38,29±8,380
		RDPP	9	30,00±7,106
	DKS (μm)	Kontrola	25	64,316±7,266
		RDNP	17	66,974±8,266
		RDPP	9	85,282±14,973
Zona III	BKS	Kontrola	25	42,96±10,826
		RDNP	17	39,47±9,362
		RDPP	9	26,11±9,033
	DKS (μm)	Kontrola	25	60,269±10,146
		RDNP	17	59,273±7,568
		RDPP	9	75,198±15,229
Zona IV	BKS	Kontrola	25	31,36±7,999
		RDNP	17	34,18±10,979
		RDPP	9	19,00±7,382
	DKS (μm)	Kontrola	25	57,677±11,357
		RDNP	17	57,765±10,154
		RDPP	9	71,844±14,084
Zona V	BKS	Kontrola	25	16,76±6,023
		RDNP	17	15,47±6,135
		RDPP	9	10,78±4,764
	DKS (μm)	Kontrola	25	61,805±15,052
		RDNP	17	59,487±10,324
		RDPP	9	74,795±17,345



Grafikon 6. Prosecan broj krvnih sudova u zonama retine i njihov spoljašnji dijametar u grupi ispitanika sa RDNP i RDPP.

5.8.4. Mikromorfološke promene u različitim zonama očnog dna

Hemoragije (tačkasta, mrljasta i crtasta krvarenja) uočene su u 47,06% zone I retine, 76,47% u zoni II, 82,35% u zoni III, 64,71% u zoni IV i 23,53% u zoni V, u grupi ispitanika sa RDNP na očnom dnu desnog oka (tabela 17). Frekvencija ovih lezija u grupi ispitanika sa RDPP, na desnom oku, bila je slična 44,44% u zoni I, 77,78% u zoni II, 88,89% u zoni III, 66,67% u zoni IV i 66,67% u zoni V (tabela 17). Na očnom dnu levog oka, hemoragične promene su uočene u 41,17% svih slučajeva u zoni I, 76,70% u zoni II, 76,70% u zoni III, 64,71% u zoni IV i 11,77% u zoni V, u grupi ispitanika sa RDNP (tabela 18). U grupi ispitanika sa RDPP uočeno je 66,67% hemoragija u zoni I, 88,89% u zoni II, 88,89% u zoni III i zoni IV i 22,22% u zoni V. Hemoragije su bile češće u grupi ispitanika sa RDPP i to na očnom dnu levog oka (tabela 17). Međutim, njihova ukupna površina po zonama nije pokazivala statistički značajnu razliku, kako između RDNP i RDPP na levom oku tako i u poređenju sa vrednostima zahvaćene površine obe grupe ispitanika na desnom oku (tabela 17 i 18). Samo u zoni III na desnom oku, ova površina bila je veća ($d=0,59$) u grupi ispitanika sa RDPP nego u grupi ispitanika sa RDNP.

Učestalost pojave tvrdih eksudata, prisutnih u zonama I-V na očnom dnu desnog oka, u grupi ispitanika sa RDNP bila je 17,65%, 29,42%, 41,18%, 23,53% i 17,65%, po zonama. U grupi ispitanika sa RDPP na očnom dnu desnog oka, učestalost pojave tvrdih eksudata bila je 22,22%, 55,56%, 55,56%, 44,44%, i 44,44% po zonama od I-V (tabela 17). Najveća učestalost u grupi ispitanika sa RDPP bila je u zonama II i III. Uočena je značajna razlika u odnosu na grupu ispitanika sa RDNP. Na očnom dnu levog oka, u grupu RDNP, učestalost tvrdih eksudata od zone I-V bila je 11,76%, 35,29%, 52,94%, 23,53%, 5,88%. U grupi ispitanika sa RDPP, učestalost tvrdih eksudata po zonama od I-V bila je 22,22%, 66,67%, 55,56%, 33,33% i 22,22% (tabela 17 i 18).

Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da je učestalost tvrdih eksudata značajno veća u grupi ispitanika sa RDPP na očnom dnu oba oka. Međutim, nasuprot opisanoj razlici, u učestalosti eksudativnih promena na desnom i levom očnom dnu između dve grupe ispitanika sa RD nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na površinu zahvaćenu ovim promenama (tabela 17 i 18).

Tabela 17. Mikromorfološke promene u različitim zonama očnog dna desnog oka.

Zona	Parametar	Grupa	N	$\bar{X} \pm SD$	t	df	p	d
Optički disk	Circularity	RDNP	17	0,935±0,025	24,000	0,482	0,0087	9,89
		RDPP	9	0,926±0,036				
	D _F (mm)	RDNP	17	2,060±0,140	-1,267	24	0,2170	-0,52
		RDPP	9	2,138±0,167				
	N	RDNP	17	17,8±3,800	2,489	24	0,0200	1,03
		RDPP	9	14,0±3,391				
Zona I	D _{BW} (μm)	RDNP	17	83,558±6,660	-2,508	10,476	0,0300	-1,03
		RDPP	9	94,751±12,478				
	N	RDNP	17	28,6±5,112	2,263	24	0,0330	0,93
		RDPP	9	24,1±4,106				
	D _{BW} (μm)	RDNP	17	79,043±6,660	-4,215	24	0,0000	-1,74
		RDPP	9	93,301±10,644				
	A _H (mm ²)	RDNP	8	0,138±0,150	-0,367	10	0,7210	-0,15
		RDPP	4	0,181±0,269				
	A _{HE} (mm ²)	RDNP	3	0,154±0,092	-0,198	3	0,8560	-0,08
		RDPP	2	0,181±0,227				
Zona II	N	RDNP	17	39,3±8,290	3,223	24	0,0040	1,33
		RDPP	9	28,7±7,382				
	D _{BW} (μm)	RDNP	17	68,537±7,768	-4,027	24	0,0000	-1,66
		RDPP	9	83,857±11,613				
	A _H (mm ²)	RDNP	13	0,157±0,186	-0,440	18	0,6650	-0,18
		RDPP	7	0,214±0,396				
	A _{HE} (mm ²)	RDNP	5	0,608±0,942	0,071	8	0,9450	0,03
		RDPP	5	0,569±0,788				
Zona III	N	RDNP	17	41,7±11,096	3,397	24	0,0020	1,40
		RDPP	9	26,0±11,325				
	D _{BW} (μm)	RDNP	17	61,995±8,231	-4,304	24	0,0000	-1,77
		RDPP	9	77,759±10,064				
	A _H (mm ²)	RDNP	14	0,191±0,242	-1,420	20	0,1710	-0,59
		RDPP	8	0,445±0,598				
	A _{HE} (mm ²)	RDNP	7	0,577±1,208	-0,589	10	0,5690	-0,24
		RDPP	5	1,046±1,560				
Zona IV	N	RDNP	17	35,9±8,731	3,099	24	0,0050	1,28
		RDPP	9	23,6±11,260				
	D _{BW} (μm)	RDNP	17	56,275±4,519	-5,958	10,258	0,0000	-2,46
		RDPP	9	75,043±8,860				
	A _H (mm ²)	RDNP	11	0,198±0,222	-0,180	15	0,8600	-0,07
		RDPP	6	0,222±0,318				
	A _{HE} (mm ²)	RDNP	4	1,045±1,819	0,542	6	0,6070	0,22
		RDPP	4	0,528±0,574				
Zona V	N	RDNP	17	20,7±5,766	3,343	24	0,0030	1,38
		RDPP	9	13,3±4,243				
	D _{BW} (μm)	RDNP	17	56,576±6,723	-4,461	11,033	0,0010	-1,84
		RDPP	9	75,014±11,394				
	A _H (mm ²)	RDNP	4	0,063±0,084	-1,094	8	0,3060	-0,45
		RDPP	6	0,195±0,226				
	A _{HE} (mm ²)	RDNP	3	0,152±0,245	-0,536	5	0,6150	-0,22
		RDPP						

Tabela 18. Mikromorfološke promene u različitim zonama očnog dna levog oka.

Zona	Parametar	Grupa	N	$\bar{X} \pm SD$	t	df	p	d
Optički disk	Circularity	RDNP	17	0,932±0,023	-0,940	24	0,3570	-0,39
		RDPP	9	0,940±0,019				
	D _F (mm)	RDNP	17	2,052±0,151	-0,129	24	0,8980	-0,05
		RDPP	9	2,060±0,180				
	N	RDNP	17	16,5±3,859	1,319	24	0,2000	0,54
		RDPP	9	14,6±3,127				
Zona I	D _{BW} (μm)	RDNP	17	86,374±3,127	-1,011	24	0,3220	-0,42
		RDPP	9	91,053±14,465				
	N	RDNP	17	30,0±6,982	1,421	24	0,1680	0,59
		RDPP	9	26,3±4,472				
	D _{BW} (μm)	RDNP	17	79,436±8,582	-3,009	24	0,0060	-1,24
		RDPP	9	91,875±12,422				
	A _H (mm ²)	RDNP	8	0,292±0,433	0,937	12	0,3670	0,39
		RDPP	6	0,120±0,132				
	A _{HE} (mm ²)	RDNP	2	0,466±0,561	0,779	2	0,5170	0,32
		RDPP	2	0,146±0,145				
Zona II	N	RDNP	17	38,3±8,830	2,425	24	0,0230	1,00
		RDPP	9	30,0±7,106				
	D _{BW} (μm)	RDNP	17	66,974±8,267	-4,049	24	0,0000	-1,67
		RDPP	9	85,283±14,973				
	A _H (mm ²)	RDNP	13	0,189±0,266	-0,325	19	0,7490	-0,13
		RDPP	8	0,226±0,234				
Zona III	A _{HE} (mm ²)	RDNP	6	0,511±1,011	0,857	10	0,4110	0,35
		RDPP	6	0,155±0,107				
	N	RDNP	17	39,5±9,362	3,469	24	0,0020	1,43
		RDPP	9	26,1±9,307				
	D _{BW} (μm)	RDNP	17	59,273±7,569	-3,757	24	0,0010	-1,55
		RDPP	9	75,918±15,230				
Zona IV	A _H (mm ²)	RDNP	13	0,307±0,431	-0,290	20	0,7750	-0,12
		RDPP	9	0,357±0,357				
	A _{HE} (mm ²)	RDNP	9	0,443±1,114	0,446	12	0,6630	0,18
		RDPP	5	0,213±0,259				
	N	RDNP	17	34,2±10,979	3,709	24	0,0010	1,53
		RDPP	9	19,0±7,382				
	D _{BW} (μm)	RDNP	17	57,766±10,154	-2,941	24	0,0070	-1,21
		RDPP	9	71,845±14,085				
	A _H (mm ²)	RDNP	11	0,216±0,279	0,617	17	0,5460	0,25
		RDPP	8	0,149±0,134				
Zona V	A _{HE} (mm ²)	RDNP	4	0,652±1,148	0,450	5	0,6710	0,19
		RDPP	3	0,331				
	A _{HE} (mm ²)	RDPP	4	0,066±0,096	82,860	1	0,0080	34,16
		RDNP	1	1,416				
	N	RDNP	17	15,5±6,135	1,992	24	0,0580	0,82
		RDPP	9	10,8±4,764				
	D _{BW} (μm)	RDNP	17	59,487±10,324	-2,837	24	0,0090	-1,17
		RDPP	9	74,796±17,346				
	A _H (mm ²)	RDNP	2	0,033±0,029	-0,458	4	0,6710	-0,19
		RDPP	4	0,066±0,096				
	A _{HE} (mm ²)	RDNP	1	1,416	82,860	1	0,0080	34,16
		RDPP	2	0,202±0,012				

5.9. KORELACIJA BROJA I VREDNOSTI SPOLJAŠNJEG DIJAMETRA KRVNIH SUDOVA RETINE SA BIOMARKERIMA INFLAMACIJE, C-REAKTIVNIM PROTEINOM, HITINAZA-3 PROTEIN 1 I UKUPNIM SULFHIDRILNOM GRUPAMA

Kod ukupno 51 ispitanika, podeljenih u tri grupe: kontrolnu grupu, koju je činilo 25 ispitanika, grupu ispitanika sa DMT2 i RDNP, koju je činilo 17 ispitanika, grupu ispitanika sa DMT2 i RDPP, koju je činilo 9 ispitanika, izvršena je morfometrijska analiza promena na očnom dnu, određen dijametar i broj krvnih sudova retine, po ranije objašnjenom protokolu i u istoj grupi ispitanika određeni su biomarkeri inflamacije: C-reaktivni protein (CRP), hitinaza-3 protein1 (YKL-40) i ukupne sulfhidrilne grupe (SH grupe), kao markeri antioksidativne zaštite. Primenjena je One Way ANOVE, statistička metoda za utvrđivanje statističke značajnosti. Dodatne razlike između grupa ispitanika analizirane su Games-Howell posthoc testom. Rezultati su prikazani u tabeli 19.

Tabela 19. Vrednosti CRP-a, YKL-40 i SH-grupa kod sve tri grupe ispitanika.

Parametar	Grupa	N	$\bar{X} \pm SD$	SE	95% CI DG	95% CI GG
CRP (mg/L)	Kontrola	25	2,34±0,60	0,12	2,09	2,58
	RDNP	17	3,66±1,82 ^a	0,44	2,73	4,60
	RDPP	9	6,02±4,71	1,57	2,40	9,64
YKL-40 (ng/ml)	Kontrola	25	64,27±12,11	2,42	59,27	69,27
	RDNP	17	115,91±12,93 ^a	3,14	109,26	122,56
	RDPP	9	231,98±73,35 ^{a,b}	24,45	175,60	288,36
SH grupe (μmol/L)	Kontrola	25	300,96±63,52	12,70	274,75	327,18
	RDNP	17	401,83±50,18 ^{a,b}	12,17	376,03	427,63
	RDPP	9	267,89±27,04	9,01	247,11	288,68

a-p<0,05 vs. Kontrola; b-p<0,05vs. RDNP

Za dobijene prosečne vrednosti CRP-a, izražene u mg/L, uočena je statistički značajna razlika između grupe bolesnika sa RDNP (3,66±1,82 mg/L) u odnosu na kontrolnu grupu (2,34±0,60 mg/L; p<0,05). Najviše vrednosti YKL-40, parametra inflamacije, uočene su u grupi ispitanika sa RDPP (231,98±73,35 ng/ml), a najniže u kontrolnoj grupi (64,27±12,11 ng/ml). Kod ispitanika sa RDNP, vrednosti ovog parametra bile su 115,91±12,93 ng/ml. Uočena je statistički značajna razlika između grupa ispitanika sa promenama na očnom dnu i dijagnozom DMT2 u odnosu na kontrolnu grupu (p<0,05), kao i između grupa ispitanika sa različitim stepenom promena na očnom dnu, RDNP i RDPP (p<0,05), utvrđenom Games-Howell posthoc testom (tabela 19). Najveća prosečna vrednost ukupnih SH-grupa u plazmi ispitanika bila je u grupi ispitanika sa RDNP (401,83±50,18 μmol/L), a najniža u grupi sa

RDPP ($267,89 \pm 27,04 \mu\text{mol/L}$). Uočena je statistički značajna razlika $p < 0,05$ (tabela 19), kako u odnosu na kontrolnu grupu tako i u odnosu na grupu ispitanika sa RDNP.

Za sva tri određivana parametra odrađen je Games-Howell posthoc test za analizu statističke razlike između ispitivanih grupa i utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji CRP-a između ispitivanih grupa $p < 0,01$), zatim YKL-40 ($p < 0,001$) i ukupnih SH grupa ($p < 0,001$).

Korelacija vrednosti spoljašnjeg dijametra krvnih sudova retine i broja krvnih sudova na samom optičkom disku i u pet koncentričnih zona sa centrom na optičkom disku, na digitalnim fotografijama očnog dna desnog i levog oka, 51 ispitanika sa vrednostima CRP-a i YKL-40 i ukupnih SH grupa sa prikazana je u tabelama 20 i 21.

Dobijeni rezultati korelacija navedenih parametara statistički su obrađeni One Way ANOVA statističkim programom, a međusobna razlika između grupa testirana je Games-Howell posthoc testom (tabela 20 i 21).

Tabela 20. Korelacija dijametra i broja krvnih sudova retine desnog oka sa biomarkerima inflamacije YKL-40, CRP i ukupnim SH grupama .

Parametar		OD _{BKS}	OD _{DKS}	I _{BKS}	I _{DKS}	II _{BKS}	II _{DKS}	III _{BKS}	III _{DKS}	IV _{BKS}	IV _{DKS}	V _{BKS}	V _{DKS}
YKL- 40 (ng/ml)	R	-0,34	0,49	-0,29	0,57	-0,45	0,56	-0,45	0,50	-0,34	0,63	-0,47	0,58
	p	0,013	0,000	0,040	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000	0,014	0,000	0,001	0,000
CRP (mg/L)	R	-0,27	0,48	-0,23	0,30	-0,31	0,39	-0,34	0,36	-0,23	0,26	-0,27	0,34
	p	0,028	0,000	0,108	0,031	0,030	0,005	0,013	0,009	0,008	0,050	0,056	0,014
SH ($\mu\text{mol/L}$)	R	-0,05	0,09	0,15	-0,09	0,06	-0,19	0,16	-0,30	0,22	-0,33	0,16	-0,18
	p	0,746	0,541	0,291	0,546	0,698	0,179	0,254	0,031	0,124	0,017	0,263	0,196

Tabela 21. Korelacija dijametra i broja krvnih sudova retine levog oka sa biomarkerima inflamacije YKL-40, CRP i ukupnim SH grupama .

Parametar		OD _{BKS}	OD _{DKS}	I _{BKS}	I _{DKS}	II _{BKS}	II _{DKS}	III _{BKS}	III _{DKS}	IV _{BKS}	IV _{DKS}	V _{BKS}	V _{DKS}
YKL- 40 (ng/ml)	R	-0,29	0,43	-0,23	0,42	-0,40	0,53	-0,47	0,37	-0,37	0,33	-0,30	0,26
	p	0,036	0,001	0,105	0,002	0,004	0,000	0,001	0,008	0,009	0,018	0,033	0,066
CRP (mg/L)	R	-0,06	0,12	-0,01	0,17	-0,17	0,17	-0,13	0,11	-0,19	0,13	-0,16	0,22
	p	0,676	0,004	0,971	0,040	0,042	0,020	0,061	0,030	0,187	0,078	0,277	0,027
SH ($\mu\text{mol/L}$)	R	-0,06	0,13	-0,01	-0,04	-0,02	-0,19	-0,03	-0,13	0,21	-0,08	0,03	-0,22
	p	0,684	0,354	0,922	0,783	0,902	0,184	0,860	0,365	0,148	0,582	0,825	0,113

Korelacijom vrednosti CRP-a i spoljašnjeg dijametra krvnih statistički značajna, pozitivna korelacija u vrednosti tj. veličini dijametra krvnih sudova i to na nivou optičkog diska na desnom oku ($p < 0,001$), u I zoni ($p < 0,05$; $R = 0,30$) u II zoni ($p < 0,01$; $R = 0,39$), III zoni ($p < 0,01$; $R = 0,36$) (tabela 21). Slični rezultati korelacije ovog parametra dobijeni su i za levo oko, sa statističkom značajnošću dobijenim za vrednosti dijametra krvnih sudova na optičkom disku ($p < 0,01$; $R = 0,12$), u I zoni ($p < 0,05$; $R = 0,17$) i II zoni ($p < 0,05$; $R = 0,17$), III zoni ($p < 0,05$; $R = 0,11$) (tabela 22). Može se uočiti da je prisutna pozitivna korelacija spoljašnjeg

dijametra krvnih sudova na oba oka sa koreliranim parametrom, tj. dijametar krvnih sudova se povećava u svim zonama. Vrednosti korelacije broja krvnih sudova sa vrednostima CRP-a pokazuju statistički značajnu, negativnu korelaciju. Broj krvnih sudova, po ispitivanim zonama oba oka i na optičkom disku, se redukuje sa povećanjem vrednosti CRP-a (tabela 20 i 21), sa statističkom značajnošću od $p < 0,005$ do $p < 0,05$. Na levom oku u predelu optičkog diska i zone I, kada je reč o broju krvnih sudova, nije prisutna statistička značajnost.

Najznačajnija korelacija uočena je za vrednosti biomarkera inflamacije YKL-40 sa spoljašnjim dijametrom krvnih sudova po zonama i na optičkom disku, i sa brojem krvnih sudova (tabela 20 i 21). Uočeno je da je prisutna pozitivna korelacija, tj. porast koncentracije YKL-40 praćen je porastom spoljašnjeg dijametra krvnih sudova u svim ispitivanim zonama i na nivou optičkog diska oba oka, sa statističkom značajnošću za desno oko $p < 0,001$.

Prisutna je negativana statistički značajna korelacija u odnosu na broj krvnih sudova na optičkom disku oba oka i ispitivanim zonama, tj. dolazi do redukcije broja krvnih sudova retine ($p < 0,05$ i $p < 0,001$), za korelaciju navedenih parametara, osim u nivou V zone levog oka, gde nije prisutna statistička značajnost (tabela 20 i 21).

Statistički značajna korelacija između spoljašnjeg dijametra krvnih sudova i broja krvnih sudova na optičkom disku u pet različitih zona retine nije prisutna sa ukupnim sulfhidrilnim grupama (SH-grupama) (tabela 20 i 21).

6. DISKUSIJA

6.1. DEMOGRAFSKI FAKTORI

Dijabetesna retinopatija je mikrovaskularna komplikacija DM koja predstavlja odgovor na sistemski poremećaj, i karakteriše je oštećenja krvnih sudova retine, smanjenja perfuzije, nastanak ishemije i oštećenje funkcije retine (Diabetic Retinopathy Guidelines, RCOphth, 2012). U trenutku postavljanja dijagnoze dijabetes tip 2, često već postoje početne promene na očnom dnu. U prvih 20 godina, kod 60% obolelih od dijabetesa se razvije neka forma dijabetesne retinopatije (International Diabetes Federation, 2012).

U 2010. godini je procenjeno da se na teritoriji Srbije, prema uzrastu, broj obolelih kreće u grupi osoba od 20 do 39 godina 11%, od 40 do 59 godina 36% i od 60 do 79 godina 52,8% (Registar za dijabetes u Srbiji, Izveštaj br. 5, 2007; Registar za dijabetes u Srbiji, Izveštaj br. 5, 2010).

U grupi ispitanika sa RDNP prosečna starost izražena u godinama je 50,6 godina, u grupi ispitanika sa veoma teškim promenama, preproliferativnim RDPP 52,6 godina. Uočena je statistički značajna razlika u uzrastu grupe ispitanika sa RDNP u odnosu na ispitanike grupe sa RDPP ($p < 0,01$). Navedenu statističku razliku možemo objasniti dužinom trajanja bolesti, koja je neophodna za razvoj mikrovaskularnih komplikacija. Kod ispitanika sa RDNP, prosečna dužina trajanja bolesti bila je 9,4 godine, a u grupi ispitanika sa promenama na očnom dnu po tipu RDPP 12,43 godine, sa statistički značajnom razlikom ($p < 0,05$).

U odnosu na pol ispitanika, nije uočena statistički značajna razlika između ispitivanih grupa.

Podaci koji su prisutni u literaturi ukazuju da je za razvoj mikrovaskularnih komplikacija, kojima pripada i RD, prosečno potrebno da trajanje bolesti bude 10 godina (Klein i sar., 1984; Klein i sar., 1994).

Dijabetesna retinopatija sa preproliferativnim promenama je uznapredovali oblik bolesti, kome po pravilu prethodi RDNP kao blaži oblik oboljenja.

6.2. BIOHEMIJSKI PARAMETRI KRV I KOD ISPITANIK A SA DIJABETESNOM RETINOPATIJOM

Biohemijski parametri dobro definisanog patofiziološkog procesa mogu biti značajni za predikciju razvoja kako osnovne bolesti tako i mikrovaskularnih promena na retini. Osnovni biohemijski parametri krvi određivani kod naših ispitanika bili su vrednost glikemije, HbA1c, ukupni proteini krvi, urea i kreatinin, holesterol i njegove lipoproteinske frakcije, HDL, LDL i trigliceridi.

6.2.1. Nivo glikoze u krvi

Dve veće studije The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) i The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) su potvrdile da je hiperglikemija osnovni faktorom rizika za nastanak komplikacija u pacijenata sa DM (Lyons i sar., 2004; Stratton i sar., 2000). Na prolongiranu hiperglikemiju ćelije organizma različito reaguju. Step en zahvaćenosti tkiva zavisi i od genetskih determinanti osobe, prisustva ateroskleroze, hipertenzije i dislipidemija (Stratton i sar., 2000; Al-Kateb i sar., 2007).

Najviše vrednosti glikemije u krvi naših ispitanika uočene su u grupi ispitanika sa RDPP. Uočena je statistički značajna razlika u vrednostima glikoze u krvi između grupe ispitanika sa dijagnozom DMT2 i promenama na očnom dnu, u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$).

Uočena razlika između grupa ispitanika može se objasniti mehanizmima dejstava hronične hiperglikemije na ćelije krvnih sudova retine i ekstracelularnog matriksa. Endotelne ćelije krvnih sudova su ciljne ćelije hiperglikemičnog oštećenja jer nemaju mogućnost reverzibilnog transporta glikoze i u uslovima hronične hiperglikemije dolazi do intracelularne hiperglikemije. Nastala intracelularna hiperglikemija dovodi do:

- aktivacije puta poliola,
- pojačanog formiranja krajnjih produkata uznapredovale glikacije AGE,
- aktivacije protein kinaze C,
- povišene aktivnosti heksozaminskog puta.

Put poliola dovodi do oštećenja ćelija intracelularnom toksičnošću, povišenom produkcijom AGEs prekursora i smanjenjem mehanizama antioksidativne zaštite. Aldoza reduktaza je ključni enzim na polirol putu, koji redukuje glukozu u sorbitol koristeći NADPH kao

kofaktor. Smanjena količina NADPH dovodi do smanjenja glutaciona i smanjenja antioksidativne zaštite. Nagomilavanje sorbitola u endotelnim ćelijama dovodi do osmotskog stresa i trajnog oštećenja.

U stanju hronične hiperglikemije jedan od značajnih metaboličkih dešavanja je povećana neenzimska glikacija proteina ili karbonilni stres, kao i nastanak AGE produkata. Kod osoba sa DM2 je povišen nivo AGE dokazan u serumu, glomerularnom tkivu, sočivu i tkivu retine (Witko-Sarsat i sar., 1996; Pachydaki i sar., 2006; Araki i Nishikawa, 2010). Krajnji produkti uznapredovale glikacije na nivou vaskularne mreže retine dovode do: apoptoze pericita i smanjenja replikacije endotelnih ćelija i povećane permeabilnost krvnih sudova; uzrokuju fibrozu i podstiču kompenzatornu inkompletnu neovaskularizaciju.

Aktivacija PKC povećava atheziju leukocita, stimuliše proces fagocitoze, intenzivira apoptozu pericita, stimuliše sintezu komponenata ekstracelularnog matrikasa i AGE produkata, podstiče kompenzatornu, inkompletnu, neovaskularizaciju.

Intenziviran heksozaminski put povećava koagulabilnost krvi, dovodi do okluzije krvnih sudova retine. Okluzija krvnih sudova dovodi do redukcije vaskularne mreže retine ishemije i kompenzatorne neovaskularizacije.

Izmene u sastavu zida krvnih sudova retine, smanjenje broja endotelnih ćelija i pericita, dovodi do povećanja dijametra krvnog suda. Lokalizovano povećanje dijametra krvnog suda na malom segmentu označava se mikroaneurizmom i karakteriše blagu, početnu formu, RDNP. Povećana permeabilnost krvnih sudova retine dovodi do nastanka tačkastih hemoragija i tvrdih eksudata, koji odgovaraju izlivanju lipoproteina iz krvnih sudova. Dalje oštećenje vaskularne mreže karakteriše okluzija krvnih sudova retine i nastanak ishemijskih promena: crtastih hemoragija i „cotton wool“ promena. Nastanak intravaskularnih anomalija IRMA i promena po tipu omčasto izmenjenih krvnih sudova (*eng.* looping) karakteristika su teških, uznapredovalih oblika RD. Opisane promene krvnih sudova nastaju usled oštećenja većih segmenata krvnih sudova sa gubitkom struktura zida krvnog suda, pericita i endotelnih ćelija. U daljem toku, usled ishemije i stimulacije neovaskularizacije nastaju novoformirani krvni sudovi koji su karakteristika RDP. Novonastali krvni sudovi su povećane permeabilnosti, nastali usled inkompletne vaskulogeneze i praćeni su čestim hemoragijama u staklasto telo. Neovaskularizaciju prati i intenzivna fibroza sa nastankom fibrovaskularnih traka u staklastom telu-mreže krvnih sudova (*lat.* „rete mirabile“).

Odsustvo statističke značajnosti između vrednosti glikemije ispitanika sa RDPP u odnosu na RDNP, ukazuje da vrednosti glikemije nisu adekvatan parametar progresije oboljenja. Dnevnim oscilacijama vrednosti glikemije, izraženim kod osoba sa RD, i to uznapredo-

valim formama kao što je RDPP, možemo objasniti nepostojanje statistički značajne razlike u vrednosti glikemije utvrđene jednim merenjem.

6.2.2. Glikozilirani hemoglobin A1c (HbA1c)

Određena količina hemoglobina se u normalnim okolnostima vezuje za glikozu ketoaminskom reakcijom između glikoze i amino-terminalne aminokiseline oba lanca molekula hemoglobina. Reakcija je ireverzibilna (Brownlee i Hirsch, 2006; Conway i sar., 2009). Glavna forma glikohemoglobina je hemoglobin A1c (HbA1c), koja kod zdravih iznosi do 6,5% ukupnog hemoglobina. Kod ispitanika sa RD, vrednosti HbA1c su bile statistički značajno više u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi ($p < 0,001$). Povišene vrednosti ovog parametra u grupi ispitanika sa RD idu u prilog lošoj glikoregulaciji, što objašnjava i pojavu mikrovaskularnih komplikacija. Kod naših ispitanika prisutna je i statistički značajna razlika između vrednost HbA1c grupe ispitanika sa RDPP u odnosu na RDNP ($p < 0,05$), što se može objasniti napredovanjem mikrovaskularnih komplikacija kod osoba sa višim vrednostima HbA1c. Odnosno, vrednost HbA1c direktno korelira sa nastankom RD i njenom progresijom.

Glikozilacija hemoglobina zavisi od koncentracije glikoze i u uslovima povišenih vrednosti glikoze u krvi viša je i vrednost HbA1c (McCarter i sar., 2006; Klipatric i sar., 2007; Conway i sar., 2009). Nivo glikoziliranog hemoglobina predstavlja najbolji parametar za praćenje glikoregulacije u prethodnih 8-12 nedelja i može biti sprovedeno bilo kada u toku dana i ne zahteva posebne pripreme uključujući i stanje gladovanja (Kitada i sar., 2010). Smatra se da smanjenje nivoa HbA1c smanjuje i rizik od nastanka komplikacija. Svako smanjenje vrednosti HbA1c za 1% smanjuje rizik za razvoj mikrovaskularnih komplikacija za 21-37% (Stratton i sar., 2000).

Međunarodni ekspertski komitet, Američke asocijacije za dijabetes (ADA), Evropske asocijacije za studije u dijabetesu (EASD) i Međunarodne federacije za dijabetes (IDF) izdao je konsenzus preporuka i uvrstio HbA1c kao kriterijum za postavljanje dijagnoze DM (American Diabetes Association, 2010; International Diabetes Federation, 2012; European Association for the Study of Diabetes 2012). Prema ovim preporukama, predložena vrednost HbA1c od 6,5% kao dovoljno senzitivna i specifična da identifikuje osobe sa značajno povišenim rizikom za pojavu retinopatije, može predstaviti graničnu vrednost za postavljanje dijagnoze dijabetesa. Dijagnozu dijabetesa treba postaviti kada je $HbA1c \geq 6,5\%$ i potvrditi je ponavljanjem nalaza HbA1c. Američka asocijacija za dijabetes je usvojila ovu preporuku i od

2010.godine uvrstila je u standardne dijagnostičke kriterijume (American Diabetes Association, 2010).

Kod naših ispitanika je utvrđena pozitivna korelacija nivoa glikoze u krvi i vrednosti glikoziliranog HbA1c. Pozitivna korelacija uočena je i korelacijom vrednosti HbA1c i ukupnih vrednosti holesterola ($p < 0,05$) i LDL frakcijom holesterola ($p < 0,01$). Dobijene korelacije moguće je objasniti procesom glikooksidacije hemoglobina odnosno lipoproteina plazme. Glikozilacijom modifikovani LDL deluje proinflamatorno, utiče na permeabilnost krvnih sudova retine, direktno oštećuje endotelne i glatkomišićne ćelije krvnih sudova.

6.2.3. Parametri azotnog bilansa

Urea je netoksično, dobro rastvorljivo jedinjenje, čije je osnovno mesto sinteze jetra. Lako difunduje i brzo prelazi u krvotok sa mesta sinteze i glavni je put detoksikacije azota i katabolizma proteina. Koncentracija uree u plazmi se koristi kao indikator renalne glomerulske filtracije. Kreatinin je anhidrid kreatina, preko kojeg se kreatin izlučuje iz organizma odraslih putem bubrega. Koncentracija kreatinina u plazmi određuje se našte, i može u fiziološkim uslovima biti povećana kod intenzivnog fizičkog rada i kod osoba sa velikom mišićnom masom (Koraćević i sar., 1996).

Kod svih ispitanika kontrolne grupe, kao i kod ispitanika sa RDNP i RDPP, određivane su vrednosti uree i kreatinina u krvi. Uočena je statistički značajna razlika između dobijenih prosečnih vrednosti uree u obe grupe ispitanika sa RD u odnosu na kontrolnu grupu, ($p < 0,01$). U obe grupe ispitanika sa DMT2 i RD vrednosti ovog parametra bile su veće u odnosu na kontrolnu grupu. Najviše vrednosti ovog parametra bile su u grupi ispitanika sa RDPP. Međutim, upoređivanjem prosečnih vrednosti uree između grupe ispitanika sa RDNP i RDPP nije uočena statistička značajnost.

Uočena je statistički značajna razlika između dobijenih prosečnih vrednosti kreatinina grupe ispitanika sa RDNP i RDPP, u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$). Nije uočena statistički značajna razlika između prosečnih vrednosti kreatinina između grupe ispitanika sa RDNP i RDPP. Najviše vrednosti ovog parametra bile su u grupi ispitanika sa RDPP, ali upoređivanjem ovih vrednosti sa prosečnim vrednostima u grupi ispitanika sa RDNP nije uočena statistička značajnost.

Dijabetesna nefropatija i retinopatija predstavljaju hronične mikrovaskularne komplikacije osnovne bolesti. Oštećenje bubrega kod bolesnika sa DMT2 nastaje kao posledica kapilarne mikroangiopatije na nivou glomerula bubrega. Oboljenje se manifestuje povišenjem

vrednosti uree i kreatinina. Međutim, porast koncentracije navedenih parametra u plazmi je posledica, a ne uzrok samog oboljenja. Povišene vrednosti ovih parametara kod naših ispitanika sa RD u odnosu na kontrolnu grupu najverovatnije ukazuju na prisustvo mikroangiopatije, koja je osnovni i zajednički patološki supstrat kod bolesnika sa RD i nefropatijom (Hultberg i sar., 1991). Vrednosti uree i kreatinina nisu validan marker praćenja promena na očnom dnu ispitanika sa RD. Novije studije upućuju na adekvatnije parametre praćenja oba oboljenja, kao što je pentozidin i homocistein (Chiarelli i sar., 2000; Hofmann i sar., 1998, Kerkeni i sar., 2012).

6.2.4. Lipoproteini i trigliceridi u serumu ispitanika sa dijabetesnom retinopatijom

Novije studije ukazuju da stanje akutne i sistemske inflamacije u organizmu prati dislipidemija, porast ukupnog holesterola, smanjenje HDL frakcije i porast triglicerida (Gruber i sar., 2009; Fitrolaki i sar., 2013.) Dislipidemija, prisutna u osoba sa DM, je povezana sa nastankom i progresijom makro i mikrovaskularnih oštećenja (Leung i sar., 2005).

Kod naših ispitanika određivana je koncentracija ukupnog holesterola, njegovih frakcija HDL i LDL, kao i triglicerida.

Vrednosti ukupnog holesterola bile su statistički značajno više u grupi ispitanika sa RD u odnosu na kontrolnu grupu. Uloga holesterola u nastanku RD može se objasniti toksičnim delovanjem produkata njegove oksidativne modifikacije. Produkti oksidativne modifikacije holesterola (25-hidroksiholesterol, holestan 3 β , 6 β -triol, 7 ketoholesterol) interferiraju u procesu esterifikacije holesterola povećavajući količinu esterifikovanog holesterola. Ovi produkti aktiviraju gene za 3-hidroksi-3metilglutaril-koenzim A reduktazu (HMG-KoA reduktazu), suprimiraju gene za receptore LDL i povećavaju količinu cirkulišućeg LDL. Povećana količina esterifikovanog holesterola i cirkulišućeg LDL intenzivira njihovu fagocitozu od strane makrofaga i endotelinih ćelija pretvarajući ih u penušave ćelije, i time doprinosi procesu ateroskleroze. Peroksidi holesterola imaju protrombogena dejstva.

Uočena je statistički značajna razlika u prosečnim vrednostima HDL grupe ispitanika sa RDPP u odnosu na kontrolnu grupu, kao i grupe ispitanika sa RDNP u odnosu na RDPP. Vrednosti HDL frakcije holesterola bile su najviše u grupi ispitanika sa RDNP, a najniže vrednosti uočene su u grupi ispitanika sa RDPP.

Vrednosti koncentracija LDL bile su najviše u grupi ispitanika sa RDNP. U obe grupe ispitanika sa RD vrednosti LDL bile su statistički značajno više u odnosu na kontrolnu grupu.

Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da su vrednosti ukupnog holesterola, kao i vrednosti LDL frakcije, povišene kod ispitanika sa RD, a vrednosti HDL frakcije napredovanjem procesa pokazuju tendenciju smanjenja.

Ulogu lipoproteinskih frakcija holesterola HDL i LDL u nastanku i razvoju RD možemo objasniti učešćem ovih lipoproteina u procesima: inflamacije, oksidativnom stresu i procesu ateroskleroze (Jain, 2006; Liew i sar., 2008, Yin i sar., 2010).

Lipoproteinska frakcija HDL se normalno nalazi u plazmi i malim delom, jedna petina ukupnih vrednosti, u subendotelnom prostoru arterija, dok su apolipoproteini LDL pretežno deponovani u ekstracelularnom matriksu mnogih tkiva, posebno arterijskih krvnih sudova. Uloge HDL lipoproteinske frakcije su: uklanjanje višak holesterola iz ekstrahepatičnih tkiva, reverzibilni transport holesterola, sistemsko antioksidativno i antiinflamatorno dejstvo (Yin i sar., 2010; Biasucci i sar., 2010). U uslovima akutnih i hroničnih inflamatornih procesa dolazi do promene uloge HDL (Marsche i sar., 2006). Dokazano je smanjenje HDL frakcije holesterola, praćeno porastom vrednosti triglicerida i CRP-a (Fitrolaki i sar., 2013).

Na nivou krvnih sudova retine u osoba sa DM i prisutnom RD dokazana je leukostaza, a u sistemske cirkulaciji povišen broj elemenata bele loze krvi, pre svega neutrofila. Fitrolaki i sar. (2013) ukazuju na pozitivnu korelaciju sa vrednostima triglicerida i glikemije i negativnu korelaciju sa vrednostima HDL na intenzitet inflamatornog procesa. CD64 je glikoprotein membrane i učestvuje u procesu endocitoze, fagocitoze, antitelo-nezavisne citotoksičnosti, oslobađanju citokina i produkciji RVK. Njegova ekspresija na nivou leukocita je potvrđena i značajniji je marker inflamatornog procesa.

Vrednosti HDL se smatraju negativnim markerom inflamatornog procesa, tj. u procesu inflamacije dolazi do smanjenja vrednosti HDL. Najniže prosečne vrednosti HDL bile su u grupi ispitanika sa RDPP, što se može objasniti najverovatnije većim intenzitetom inflamacije prisutnim u ovoj grupi ispitanika.

U grupi ispitanika sa RDNP vrednosti HDL frakcije holesterola bile su najviše, što se može objasniti uočenom pojavom porasta iste frakcije holesterola u početnim stadijumima formiranja aterosklerotičnih plakova i njegovim protektivnim, antiinflamatornim dejstvom (Navab i sar., 2009). Smanjenje ove frakcije holesterola dovodi do progresije promena na očnom dnu i nastanka RDPP. Uočeno smanjenje vrednosti nove HDL frakcije holesterola dovodi do smanjenja njegovog protektivnog, antiinflamatornog dejstva.

Nagomilavanje LDL u ekstracelularnom matriksu subendotelnog prostora predisponira njegovu oksidaciju (Song i sar., 2005). Najodgovorniji za aterogenost LDL-a su: povećana sinteza i sekrecija MCP-1, inhibicija migracije makrofaga iz krvnog suda, delovanje na speci-

fične receptore i citotoksična svojstva, kao i ekspresija adhezivnih molekula. Zarobljeni monociti trpe niz promena i od njih nastaju makrofagi, a zatim penušave ćelije. Oksidativno modifikovane LDL čestice dovode do akumulacije holesterola u glatkomišićnim ćelijama transformišući ih u penušave ćelije. Glikooksidacijom LDL, prisutnom kod osoba sa DM, nastaju AGE-LDL forme, koje se vezuju za RAGE na nivou endotelnih ćelija i generišu superoksid radikale i endotelno oštećenje. AGE-LDL oštećuje i zidove mitohondrija, inhibira proces fibrinolize, remeti signalne puteve, aktivira sintezu PKC i desetostruko povećava nivo kalcijuma na nivou endotelnih ćelija. Porast nivoa kalcijuma dovodi do oštećenja mikrofilamenata i citoskeleta ćelije, uzrokujući ireverzibilno oštećenje endotelnih ćelija.

U normalnim uslovima HDL sprečava oksidaciju LDL i inflamatornu reakciju indukovanu LDL (Navab i sar., 2009). U akutnoj fazi inflamacije, HDL gubi mogućnost inhibicije LDL oksidacije usled smanjenja aktivnosti dva HDL-povezana (zavisna) enzima paraoxonaze-1 (PON1) i trombocit aktivirajućeg faktora acetilhidrolaze (PAF-AH) (Navab i sar., 2009). Po prestanku akutnog inflamatornog procesa, antiinflamatorna funkcija HDL, PON1 i PAF-AH se vraća (Navaratna i sar., 2007; Navaratna i sar., 2007a). U uslovima dugotrajne hiperglikemije, kao kod bolesnika sa DMT2, dolazi do glikozilacije HDL, čime on gubi sposobnost inhibicije adhezije monocita na zid krvnih sudova izloženih oksidovanoj formi LDL (Navab i sar., 2009). Nastaje glikozilacija i dva HDL-povezana (zavisna) enzima, PON1 i PAF-AH, gube antiinflamatornu ulogu (Lyons i sar., 2004). Glikozilacijom modifikovani LDL, takođe, deluje proinflamatorno, utiče na permeabilnost endotelnih ćelija, deluje prokoagulantno, stimuliše fibroblastnu proliferaciju i T ćelijsku aktivaciju, aktivira T ćelije na nivou ateromatoznih plakova (Kinscher i sar., 2008, Kumaru i sar., 2008). Proinflamatorno svojstvo modifikovanog LDL velikim delom određeno je njegovim imunogenim svojstvom (Li i sar., 2009). Modifikovane LDL indukuje nastanak antitela. Nastali imuni kompleksi (Oxi-LDL-IgG, ređe Oxi-LDL-IgM ili Oxi-LDL-IgA), pokazuju veliku prijemčivost za endotelne ćelije, a nešto manju za glatkomišićne ćelije krvnih sudova. Imuni kompleksi se talože subendotelno. Vezivanjem za endotelne ćelije dovode do aktivacije signalnih puteva (tirozin kinaze) i povećanja intracelularnog kalcijuma. Aktivacija signalnih puteva stimuliše ekspresiju LDL receptora u priliv holesterola u ćelije, nastanak penušavih ćelija i inicijaciju procesa ateroskleroze. Nagomilavanje kalcijuma u ćelijama endotela oštećuje ćelije procesom apoptoze. Na mestu apoptotičnih ćelija dolazi do nakupljanja makrofaga i monocita i pokretanja procesa inflamacije.

Kod naših ispitanika, vrednosti triglicerida bile su povišene u obe grupe ispitanika sa RD u odnosu na kontrolnu grupu. Nije prisutna statistički značajna razlika u vrednostima ovog parametra između grupa ispitanika sa RDNP i RDPP.

Povišen nivo triglicerida pokazuje direktnu povezanost vrednosti triglicerida sa nastankom mikrovaskularnih komplikacija DM i u skladu su sa podacima studije sprovedene u severnoj Indiji (Enas i sar., 1994). U studiji sprovedenoj u Koreji ispitanici sa RDP su imali više vrednosti lipida u plazmi u odnosu na grupu ispitanika sa RDNP (Kim i sar., 1998). Singh i autori (2009), međutim, ističu da je nivo ukupnih lipida povišen, pre svega, kod ispitanika sa RDNP. Međutim, obe studije prate ukupni nivo holesterola, ne i njegovih frakcija, kao i nivo triglicerida (Kim i sar., 1998, Singh i sar., 2009). Fitrolaki i sar. (2013) takođe dokazuju povišen nivo triglicerida u stanjima inflamacije kako u odraslih tako i dece.

Povišen nivo triglicerida dovodi do:

- alteracije strukture plazme membrane i aktivacije adenil ciklazne reakcije, praćene respiratornom eksplozijom (*eng.* respiratory burst) u mononuklearnim ćelijama (Đorđević i sar., 2000). Posledično nastaje agregacija i adhezija trombocita i povećana proliferacija glatkomišićnih ćelija krvnih sudova, čime se počinje ili nastavlja započet proces ateroskleroze, značajan za nastanak RD.
- Hipertrigliceridemija kod osoba sa DM povezana je sa disfunkcijom lipoprotein lipaze. Lipoprotein lipaze je ključni enzima hidrolize triglicerida, koji deluje na male krvne sudove retine i bubrega. Disfunkcija ovog enzima generiše ligande za endogene peroksozomalne proliferator-aktivisane receptore (PPAR) (Orasanu i Plutzky, 2009). Peroksozomalni proliferator aktivator receptori su grupa nuklearnih proteina, koji regulišu ekspresiju gena i utiču na diferencijaciju ćelija, razvoj, metabolizam ugljenih hidrata, proteina i lipida. Agonisti PPAR mogu biti endogeni ili farmakološki, kao što su fibrati. Dokazano je da PPAR agonisti inhibišu neovaskularizaciju indukovanu VEGF-om i ograničavaju proces apoptoze. Prisutna disfunkcija lipoproteinske lipaze preko gubitka endogenog PPAR agonista omogućava neovaskularizaciju i aktivira proces apoptoze.

Na osnovu dobijenih rezultata, vrednosti triglicerida možemo smatrati značajnim za nastanak, ali ne i za progresiju oboljenja.

Uočena je pozitivna korelacija između HbA1c i ukupnog holesterola, kao i HbA1c i LDL. Navedena pozitivna korelacija ukazuje da se posmatrani parametri mogu sagledati kao

faktori rizika za nastanak i progresiju RD i da je u osnovi nastanka kako glikoziliranog hemoglobina tako i izmenjene uloge holesterola i LDL, njihova modifikacija, odnosno prisutnu inflamaciju i intenzivan proces oksidativnog stresa.

6.2.5. Aterogeni indeks

Aterogeni indeks plazme (AIP) je parametar praćenja makrovaskularnih komplikacija, dislipidemije i nastanka metaboličkog sindroma. On je direktno povezan sa fenotipom B LDL holesterola, povišenim vrednostima apoproteina B i povišenim vrednostima LDL.

Kod naših ispitanika su povišene vrednosti AIP dobijene u obe grupe ispitanika sa dijagnozom RD u odnosu na kontrolnu grupu. Najveća vrednost ovog indeksa bila je u grupi ispitanika sa RDPP. Takođe je prisutna statistička značajnost u vrednosti AIP između grupe ispitanika sa RDNP u odnosu na grupu ispitanika RDPP. Dakle, aterogeni indeks može biti parametar praćenja nastanka i progresije RD.

Jedna od dve centralne hipoteze o nastanku ateroskleroze je hipoteza o aterosklerozi indukovanoj lipoproteinima, koja ističe lipoproteine i dislipidemiju kao glavne pokretače ateroskleroze (Giacco i Brownlee, 2010). Prema navedenoj hipotezi, prvi korak ka razvoju ateroskleroze je oksidativna modifikacija LDL, dok je oštećenje endotelnih ćelija jedna od sekveneci ovog kompleksnog procesa. Nastanak penušavih ćelija pokreće inflamatorni odgovor, koji sledstveno oštećuje dublje slojeve zida arterijskih krvnih sudova i dovodi do prerastanja medije slojem glatkomišićnih ćelija. Rezultat tkivne remodelacije je nastanak vezivno-tkivnog plaka sa lipidnim sadržajem. Monociti su najbrojnije ćelije plaka, adherirane na disfunkcionalnu površinu endotelnih ćelija, čine lipidni sadržaj ispunjen oksidovanom formom LDL.

U početnim stadijumima, formiranje aterosklerotičnih plakova je reverzibilno, dok nivo HDL raste, što znači da HDL ima u početnim stadijumima, pre svega, protektivno dejstvo (Navab i sar., 2009). Nakon ovog stadijuma, promene ostaju trajne.

Kod naših ispitanika, nastanak početnih promena na očnom dnu po tipu RDNP praćen je porastom nivoa HDL frakcije holesterola, što se može objasniti uočenom pojavom porasta iste frakcije holesterola u početnim stadijumima formiranja aterosklerotičnih plakova i njegovim protektivnim, antiinflamatornim dejstvom, koje objašnjava i Navab (2009). Uočeno smanjenje vrednosti novoa HDL frakcije holesterola dovodi do smanjenja njegovog protektivnog, antiinflamatornog dejstva. Smanjenje ove frakcije holesterola dovodi do progresije promena na očnom dnu i nastanka RDPP. Povišene vrednosti AIP u ispitanika sa RD u odnosu na kontrolnu grupu ukazuju na intenzivan proces inflamacije i ateroskleroze, koji je

karakterističan za ispitanike sa DMT2. Dokazano je da je kod osoba sa DMT2 proces angiogeneze udružen sa rupturom aterosklerotičnih plakova. Rupturu aterosklerotičnih plakova prati pokretanje procesa koagulacije i dodatne redukcije lumena krvnog suda. Aterosklerotične promene kod dijabetičnih osoba pretežno su difuzne, imaju tendenciju brže akumulacije i vulnerabilnije su (Virella i Lopes-Virella, 2012). Mesto rupturiranog plaka ispunjavaju apoptotični makrofagi i nekrotični sadržaj plaka, koje ingestijom otklanjaju funkcionalni makrofagi, delimično suprimirajući inflamaciju. Istovremeno, kod uznapredovalih lezija dolazi do nakupljanja nekrotičnog materijala, što dalje aktivira proces inflamacije. Okluzija lumena krvnog suda dovodi do nastanka hipoksije, koja posledično dovodi do povećanja aktivnosti VEGF. Vaskularni endotelni faktor rasta povećava vaskularnu permeabilnost i deluje hemotaksično na monocite i makrofage, pa dodatno aktivira proces inflamacije.

Moura i saradnici (2013) dokazuju povezanost vrednosti API sa mikroalbuminurijom. Naime, isti autori opisuju pozitivnu korelaciju biomarkera inflamacije CRP, cistatina C i AIP u osoba sa mikroalbuminurijom. Mikroalbuminurija predstavlja marker endotelnog oštećenja, a vrednosti API direktno koreliraju sa stepenom oštećenja endotelних ćelija.

Vrednosti AIP kod naših ispitanika rastu sa progresijom promena na očnom dnu ispitanika sa RD. Najveće vrednosti prisutne su u grupi ispitanika sa najizraženijim promenama, preproliferativnim. Preproliferativnu formu RD karakteriše prisustvo crtastih hemoragija, pojava omčastih formacija krvnih sudova (*eng.* looping), IRMA, i “cotton wool” promena. Navedene promene su posledica ishemije i prisutne su na nivou retine. Mogu se objasniti promenama u sastavu zida, tj. redukcijom endotelних ćelija, usled direktnog oštećenja endotelних ćelija. Promene u sastavu zida vaskularne mreže retine remete permeabilnost krvnih sudova i pokreću proces inflamacije. Opisane promene dovode do okluzije i redukcijom lumena krvnih sudova, kao i nastanka ishemije.

HDL-Atherosclerosis Treatment Study (HATS) i istraživanje Dobiašove i Frohlich -a potvrđuju da se AIP može koristiti kao biomarker procesa ateroskleroze (Dobiašova i sar., 2011; Williams i sar., 2013). Moura i sar. (2013) navode da se AIP može smatrati markerom ranog mikrovaskularnog oštećenja, i parametrom direktnog oštećenja endotelних ćelija. Naime, upotreba terapije za smanjenje nivoa lipida u krvi snižava i vrednosti AIP (Lyons i sar., 2004). Prema istraživanju Dobiašove, kombinacija terapije somatostatina i nijacina smanjuje koncentraciju ukupnog holesterola, frakcija i triglicerida, a povećava koncentraciju HDL, čime smanjuje AIP (Dobiašova, 2004). Navedeni rezultati otvaraju mogućnost uvođenja terapije somatostatina ili kombinacije somatostatina i antioksidanasa, kao što je nijacin u

prevenciji nastanka i daljeg napredovanja mikrovaskularnih komplikacija (Brown i sar., 1990; Dandona, 2008).

6.2.6. Indeks telesne mase

Indeks telesne mase (BMI) je visinsko-težinski pokazatelj uhranjenosti pojedinca i validan je za sve osobe starije od 20 godina. Ovaj parametar se često koristi za procenu gojaznosti osobe, tj. prisustva masnog tkiva u organizmu, u najvećem broju studija (Riberio i sar., 2011; Rizvi, 2007). U odnosu na predložene referentne vrednosti Svetske zdravstvene organizacije, ispitanici kontrolne grupe pripadali su grupi osoba sa idealnom telesnom težinom, dok su ispitanici obe grupe sa RD pripadali grupi osoba sa prekomernom težinom (BMI Classification. World Health Organization).

Upoređivanjem prosečnih vrednosti BMI ispitanika uočena je statistički značajna razlika između BMI ispitanika sa RDNP, u odnosu na kontrolnu grupu. Dobijene rezultate povišenih vrednosti BMI i njihov značaj za nastanak RD možemo objasniti ulogom masnog tkiva u nastanku mikrovaskularnih komplikacija. Povećana količina masnog tkiva i rezistencija na insulin dovodi do povećanja slobodnih masnih kiselina, koje direktno oštećuju male krvne sudove i dovode do nastanka RD. Masno tkivo je izvor medijatora inflamacije, kao što su TNF α , interleukin, i to IL-6 i IL-8 i PAI-1, koji direktno pokreću proces inflamacije, dovode do oštećenja endotelinih ćelija krvnih sudova, uzrokuju leukocitnu adheziju i opstrukciju malih krvnih sudova retine. Plazminogen aktivator inhibitor -1 utiče na proces koagulacije i dodatne opstrukcije lumena krvnih sudova retine.

Uočena povišena vrednost ovog parametra kod obe grupe ispitanika sa RD i odsustvo statističke značajnosti između prosečnih vrednosti BMI kod ispitanika sa RDNP i RDPP, može se objasniti time da je BMI faktor rizika za razvoj mikrovaskularnih komplikacija DMT2, ali ne i parametar za praćenje njihove progresije, što je u skladu i sa rezultatima istraživanja drugih studija (Schneider i sar., 2010, Zeyda i sar., 2010).

6.3. BIOMARKERI INFLAMACIJE U KRV I ISPITANIK SA DIJABETESNOM RETINOPATIJOM

Inflamacija je nespecifični odgovor na oštećenje u kome učestvuje veliki broj funkcionalnih molekula i medijatora, uz učešće i aktivaciju leukocita. Dugo vremena RD nije bila prepoznata kao inflamatorna bolest, jer se retina smatrala imunoprivilegovanim tkivom. Nove

studije, međutim, dokazuju da je sistemska inflamacija mogući pokretački mehanizam DM i nastanka mikro i makrovaskularnih komplikacija. Biološki parametri inflamacije, tzv. biomarkeri inflamacije su lako dostupni iz krvi, pouzdan relativno lako detektabilni te bi se njima mogao pratiti intenzitet procesa, proceniti rizik za nastanak dijabetesne retinopatije i njenu progresiju. Praćenje sistemskih parametara inflamacije u krvi opravdava i činjenica da retinalno tkivo nije izvor inflamacije, već parametri inflamacije dospevaju do retine sistemskom cirkulacijom, oštećujući vaskularnu mrežu retine (Joussen i sar., 2004, Streja i sar., 2003).

6.3.1. Sedimentacija

Sedimentacija (Se) je parametar prisutne akutne inflamacije (Kaysen, 2009). Ona je jednostavan laboratorijski test koji se odnosi na brzinu taloženja eritrocita *in vivo*, uzetih iz pune venske ili kapilarne krvi.

Kod naših ispitanika uočena je povišena vrednost ovog biomarkera inflamacije u obe grupe ispitanika sa RD u odnosu na kontrolnu grupu. Nije uočena statistički značajna razlika u sedimentaciji između grupe ispitanika sa RDPP u odnosu na RDNP.

Brzina Se zavisi od plazmatskih faktora proteina, fibrinogena, glikoproteina, i to naročito od njihovog međusobnog odnosa, od površinskog napona krvi, koncentracije jona, volumen-procenta krvnih ćelija, od veličine i oblika samih eritrocita, od količine lipida, od pH vrednosti itd.

Sa porastom koncentracije proteina plazme, fibrinogena, imunoproteina i drugih proteina, u akutnoj fazi, smanjuje se elektronegativni naboj na membrani eritrocita i kao posledica toga nastaje njihovo ubrzano taloženje. Woo i sar. (2011) u svojoj kliničkoj studiji preseka pokazuju direktnu povezanost sedimentacije kod bolesnika sa DMT2 sa ukupnim brojem neutrofila i leukocita, kao i njihov međusobni odnos.

Kod ispitanika sa RD prisutno je, pre svega, stanje hronične hiperglikemije, dokazan je porast proteina, biomarkera inflamacije, zatim porast lipoproteina i triglicerida, povišene vrednosti glikoziliranog hemoglobina, kojima se može objasniti porast sedimentacije.

Sedimentacija nije specifični marker inflamatornog procesa i biomarker je akutne, a ne hronične inflamacije, koja je prisutna kod ispitanika sa DM. Ne može se smatrati specifičnim markerom inflamacije značajnim za nastanak i progresiju RD, na šta ukazuje i činjenica da ne postoji statistički značajna razlika u vrednosti sedimentacije između dve grupe ispitanika sa različitim stadijumom RD.

Izrazito povišene vrednosti Se, 100 mm/h, dijagnostički mogu biti značajne u slučajevima pokretanja autoimunih procesa, kao što su lupus, *arteritis temporalis*, dakle sistemskih vaskulita (Woo i sar., 2011). Veza autoimunog procesa i dijabetesa potvrđena je savremenim studijama patogeneze DMT2. Inflamatorni proces, praćen lezijom krvnih sudova, eventualno može biti osnova za dalja proučavanja veze Se i mikrovaskularnih komplikacija kao što je RD.

Sprovedenom univarijantnom statističkom analizom uočena je obrnuta povezanost Se, HbA1c i glikemije. Rezultati dobijeni našom studijom, pri korelaciji Se sa novim biomarkerom inflamacije YKL-40, uočena je negativna korelacija, tj. porast vrednosti YKL-40 prati smanjenje Se u grupi ispitanika sa RDNP.

6.3.2. Fibrinogen

Fibrinogen spada u najproučavanije biološke parametre, pre svega, koagulacije. Poznat i kao faktor I procesa koagulacije, a potom proučavan i kao faktor inflamacije. Pripada proteinima akutne faze inflamacije, sintetiše se na nivou hepatocita, a u krvi se nalazi u formi proenzima. Ovaj biomarker, kao i CRP, smatra se prediktorom letalne i neletalne koronarne bolesti, moždanog udara i periferne vaskularne bolesti (Ernst i Resch, 1993; Klein i sar., 2003; Le Duc Son i sar., 2008).

Najviše vrednosti fibrinogena u krvi ispitanika u našoj studiji uočene su u grupi ispitanika sa RDPP, a najniže u kontrolnoj grupi. Na osnovu dobijenih rezultata, uočena je statistički značajna razlika u vrednostima ovog parametra kod obe grupe sa RD u odnosu na kontrolnu grupu. U toku razvoja RD uočeno je i dokazano stanje hiperkoagulabilnosti, koje se smatra odgovornim za okluzivne promene na krvnim sudovima retine, koje dalje dovode do ishemije, pokretanja procesa neovaskularizacije i oksidativnog stresa, uslovljenog kapilarnom hipoperfuzijom. Hipoperfuzija dovodi do ishemije, koja aktivira inflamaciju i proces oksidativnog stresa, koji naknadno dovode do oštećenja tkiva. U postkapilarnim venulama tkiva koje je izloženo hipoksiji dolazi do akumulacije leukocita usled pojačane sinteze ćelijskih i ekstraćelijskih adhezivnih molekula i to:

- ICAM - koji ostvaruje interakciju sa E i P selektinom endotelnih ćelija
- na nivou ekstracelularnog prostora nastaje interakcija fibronektina sa lamininom
- integrini reaguju sa leukocitima.

Najverovatnije da superoksid posreduje u leukocitno-endotelnoj interakciji. Udruženim delovanjem ksantin oksidaze (OX) i NADPH oksidaze leukocita dolazi do oštećenja endotelnih ćelija. Leukostaza uzrokuje dodatnu okluziju krvnih sudova, aktivacijom NADPH oksidaze dovodi do produkcije RVK, produkuje hipohlornu kiselinu i aktivira proteaze uzrokujući dalja oštećenja retinalnog tkiva.

Nije uočena statistički značajna razlika u vrednostima ovog parametra kod ispitanika sa RDPP u odnosu na RDNP. Najverovatnije da se fibrinogen može smatrati povezanim sa nastankom RD, ali ne i biomarkerom progresije promena.

Folsom (2002) i Schram (2005) u svojim studijama potvrđuju snažnu korelaciju između vrednosti fibrinogena i CRP-a sa nastankom i razvojem mikrovaskularnih komplikacija DM. Međutim, kao i ovi autori, tako i druge studije fibrinogen smatraju povezanim sa CRP-om u procesu inflamacije.

6.3.3. C-reaktivni protein

C-reaktivni protein je jedan od proteina akutne faze upale i sintetiše se u hepatocitima. Ekstra hepatična sinteza CRP-a opisana je u neuronima, aterosklerotičnim plakovima, monocitima i limfocitima (Lippi i sar., 2010). Na koncentraciju CRP-a utiču: BMI, DM, hipertenzija, pušenje, supstituciona terapija estrogenom, kao i postojanje reumatoidnog artritisa, hroničnih bolesti pluća, akutnih virusnih infekcija, terapija statinima i aspirinom (Lim i sar., 2010; Lippi i sar., 2010, Dandona, 2008).

Kod naših ispitanika je uočena statistički značajna razlika u vrednostima ovog parametra za obe grupe sa RD u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, prisutna je statistički značajna razlika u vrednostima CRP-a kod ispitanika sa RDNP u odnosu na RDPP. Više prosečne vrednosti bile su zastupljene u grupi ispitanika sa RDPP, tj. u grupi ispitanika sa izraženijim promenama. Dobijeni rezultati mogu ukazivati na to da je CRP biomarker inflamacije povezan sa nastankom RD i progresijom promena od blage RDNP ka nastanku RDPP. Mehanizam dejstva CRP-a u nastanku i progresiji RD možemo objasniti njegovom ulogom u imunološkom sistemu, pre svega u procesu inflamacije.

U imunološkom sistemu CRP ima veći broj uloga: vezivanjem za fosfolipin na površini mrtvih ili umirućih ćelija i vezivanjem za nuklearne antigene i određene patogene organizme, aktivira sistem komplementa ili aktivira Fc-receptora (kojeg sadrže određene ćelije imunog sistema, npr. makrofag), ili tako služi kao opsonin, utiče na aktivnost trombocita, reguliše i ekspresiju adhezionih molekula za endotelne ćelije, inhibira NOS na novou endo-

telnih ćelija u aorti, stimuliše oslobađanje IL-8, povećava aktivaciju PAI-1, povećava oslobađanje IL-1, IL-6, IL-18 i TNF- α . Proinflammatorna uloga CRP-a objašnjena je ubrzanom fagocitozom i gubitkom uloge u klirensu ćelijskog debris nekrotičnih i apoptotičnih ćelija, koja dovodi do nastanka antitela prema oštećenom tkivu i deluje proinflammatorno. U procesu fagocitoze dokazana je produkcija RVK koja dovodi do izmene strukture CRP-a. Denaturisani i agregacioni oblici CRP-a (neo CRP ili modifikovane forme) imaju snažno proinflammatorno dejstvo (Eisenhardt i sar., 2009).

Nedavno je opisano da modifikovani oblici povećavaju oslobađanje inflamatornih markera, MPC- 1 i IL-8 i regulišu ekspresiju ICAM-1 na nivou endotelih ćelija krvnih sudova retine (Nagaoka i sar., 2008). C-reaktivni protein je direktni proinflammatorni medijator proaterogenog dejstva na ćelije krvnih sudova (Black i sar., 2004, Lemieux i sar., 2009). Smatra se da se CRP vezuje za fosfoholin oksidovanih oblika LDL-a, povećava unos LDL-a u makrofage i time dovodi do formiranja takozvanih penušavih ćelija, inhibira iNOS na novou endotelih ćelija, povećava ekspresiju i aktivaciju PAI-1 i time učestvuje u procesu formiranja aterosklerotične ploče, ali reguliše i njenu stabilnost. Povećan sadržaj penušavih ćelija u plaku čini aterosklerotični plak vulnerabilnijim. Rupturom aterosklerotičnog plaka i oslobađanjem materijala iz samih plakova, dolazi do aktivacije procesa inflamacije i oksidativnog stresa, kao i okluzije krvnih sudova.

Streja (2003) je utvrdio snažnu povezanost fibrinogena sa mikrovaskularnim komplikacijama DM, ali ne i CRP-a, što objašnjava činjenicama da se CRP smatra prediktorom budućih događaja, tj. nestabilnih plakova, a ne markerom stepena ateroskleroze, da je udružen sa komponentama sindroma insulinske rezistencije, dok je fibrinogen udružen sa faktorima praćenja procesa ateroskleroze.

U našem ispitivanju, korelacijom dobijenih rezultata prosečnih vrednosti fibrinogena i CRP-a kod ispitanika svih grupa, uočena je pozitivna korelacija između vrednosti fibrinogena i CRP-a kod ispitanika sa RDPP. Dakle, evoluciju mikrovaskularne komplikacije prati povezanost, tj. korelacija ova dva biomarkera inflamacije. Folsom (2000) i Schram (2005) potvrđuju snažnu korelaciju između vrednosti fibrinogena i CRP-a sa nastankom i razvojem mikrovaskularnih komplikacija DM.

Korelacijom vrednosti CRP-a i spoljašnjeg dijametra krvnih sudova retine kod naših ispitanika uočena je statistički značajna, pozitivna korelacija. Vrednosti korelacije za broj krvnih sudova, međutim, pokazuju statistički značajnu, ali negativnu korelaciju, odnosno broj krvnih sudova se redukuje sa povećanjem vrednosti CRP-a. Kod ispitanika sa RDPP uočene su i najviše vrednosti CRP-a, što može objasniti i najizraženije promene na očnom dnu, pojavu

IRMA i looping-a na krvnim sudovima, kao i znakova ishemije usled redukcije vaskularne mreže. Beaver Dam Eye Study, studija preseka, pokazala je pozitivnu korelaciju povećanja dijametra venula i koncentracije CRP-a kod ispitanika sa DM, što je u skladu sa rezultatima našeg ispitivanja (Klein i sar., 2006).

Na osnovu podataka iz literature i dobijenih rezultata možemo zaključiti da su i fibrinogen i CRP svakako parametri inflamatornog procesa, da je fibrinogen parametar same bolesti, dok je CRP parametar evolucije komplikacija bolesti i mogućeg razvoja metaboličkog sindroma i marker bolesti manjih krvnih sudova.

6.3.4. Hitinaza-3 protein 1 (YKL-40)

Hitinaza-3-protein1, YKL-40 je nov biomarker inflamacije (Johansen i sar. 2006; Kozakova i Sarafin, 2009). Nema enzimске sposobnosti. Biološka uloga YKL-40 i postojanje specifičnog receptora nisu poznati. Hitinaza-3-protein1 ima sklonost vezivanja za heparin i histidin.

U našem ispitivanju kod obe grupe ispitanika sa RD vrednosti YKL-40 bile su statistički značajno više u odnosu na kontrolnu grupu. Poznato je da koncentracija YKL-40 raste u procesima akutne i hronične inflamacije (Johansen i sar. 2008; Kozakova i Sarafin, 2009). Kod ispitanika sa RDPP bile su prisutne najviše vrednosti ovog parametra. Uočena je statistički značajna razlika u odnosu na grupu ispitanika sa RDNP.

Dobijene rezultate možemo objasniti ulogom YKL-40 u inflamaciji, remodelaciji ekstracelularnog matriksa i vaskularne mreže retine i aterosklerozi.

Poznato je da YKL-40 eksprimiraju i luče makrofage, neutrofili, glatkomišićne ćelije krvnih sudova (Johansen 2006; Johansen i sar.; 2006; Kim i sar., 2007). Ekspresija YKL-40 detektovana je u području makule, ostalih delova retine i kompleksa RPE-horioidea.

Smatra se da učestvuje u imunom odgovoru omogućavajući maturaciju i diferencijaciju monocita u makrofage i njihovo direktno pristizanje do mesta infekcije kao odgovor na inflamaciju. Na neutrofile YKL-40 ne deluje hemotaktično, ali je kod osoba sa DMT2 dokazan porast broja neutrofila u krvi, infiltracija retine neutrofilima u ranim stadijumima razvoja RD, kao i da se u granulama neutrofila nalazi YKL-40, koji se oslobađa tokom inflamacije (Joussen i sar., 2004; Woo i sar. 2011). Dakle, makrofage i neutrofili proizvode YKL-40 na mestu inflamacije.

Proces remodelacije retinalnog tkiva, pre svega vaskularne mreže, prisutan je u toku nastanka i progresije RD. Hitinaza-3-protein 1 remodelaciju ostvaruje dejstvom na endotelne

ćelije krvnih sudova retine, glatkomišićne ćelije, ali i fibroblaste i aktivnost matriks metalo-proteinaza.

Hitinaza-3 protein 1 je marker disfunkcije endotelnih ćelija. Naime, on deluje direktno hemotaktično na endotelne ćelije, omogućava njihovu migraciju i proliferaciju, međućelijski kontakt endotelnih ćelija. Proliferacijom endotelnih ćelija dolazi do zadebljanja endotelnog sloja zida krvnog suda, što posledično remeti tok krvi, uzrokuje stenozu krvnog suda, na nivou zahvaćenog tkiva dovodi do ishemije i započinjanja procesa ateroskleroze. Ishemija na nivou tkiva aktivira inflamatorne faktore i hemotaksične faktore, oštećuje endotel, potencira proces ateroskleroze i oksidativne modifikacije. Hitinaza-3-protein 1 dovodi do formiranja razgranatih struktura nalik krvnim sudovima, usled proliferacije endotelnih ćelija i stimulacijom migracije glatkomišićnih ćelija krvnih sudova, što ukazuje na ulogu YKL-40 u angiogenezi (Rathcke i sar., 2009a). On se najverovatnije vezuje za vimentin remeteći unutrašnji citoskelet i učestvuje u aktivaciji signalnih puteva. Aktivacijom mitogen protein kinaze/ekstracelularnog signalnog puta (MAPK) YKL-40 ostaruje svoj proliferativni efekat na nivou endotelnih ćelija. Hitinaza-3-protein 1 deluje putem fosfatidil inozitol 1,3 signalnih puteva i povećava nivo kalcijuma na nivou endotelnih ćelija. Porast nivoa kalcijuma dovodi do aktivacije kalcijim zavisne fosfolipaze A2, generisanja toksičnih lizofosfolipida i oštećenja mikrofilamenata i citoskeleta ćelije, uzrokujući ireverzibilno oštećenje endotelnih ćelija. Povišena aktivnost PKC i p38 α mitogen aktivirajuće protein kinaze (MAPK) povećava ekspresiju signalnog puta i putem protein tirozin fosfataze, koji dovodi do defosforilacije β receptora trombocitnog faktora rasta (PDGF), uzrokuje apoptozu pericita. Isti signalni put povećava oksidaciju masnih kiselina na nivou endotelnih ćelija i ima značajnu ulogu u aterosklerozi (Giacco i Brownlee, 2010). Na nivou glijalnih ćelija YKL-40 se najverovatnije vezuje za GFAP, intermedijerni mikrofilament odgovoran za održavanje strukture, mitoze i funkcije glijalnih ćelija, dovodeći do aktivacije navedenih signalnih puteva, nakupljanja GFAP i oštećenja glijalnih ćelija retine.

Remodelaciju tkiva YKL-40 ostvaruje i intenziviranjem proliferacije fibroblasta, posredstvom mitogen protein kinaze/ekstracelularnog signalnog puta (MAPK) i fosfatidil inozitol 1,3 signalnog puta. Proliferacija vezivnog tkiva je takođe jedna od karakteristika nastanka i razvoja RD. Na nivou fibroblasta YKL-40 smanjuje aktivaciju signalnog puta p38 i tkz. stresom aktiviranih signalnih puteva (SAPK/JNK), koji su podgrupa MAPK, koja smanjuje koncentraciju matriks metaloproteinaza, utiču na proces apoptoze, mitoze endotel-nih ćelija i fibroblasta, i reparacije DNA.

Korelacijom vrednosti biomarkera inflamacije YKL-40 i vrednosti spoljašnjeg dijametra krvnih sudova i broja krvnih sudova na oba oka, uočena je statistička značajnost. Prisutna je pozitivna korelacija, tj. porast koncentracije YKL-40 praćen je porastom spoljašnjeg dijametra krvnih sudova u svim ispitivanim zonama i na nivou optičkog diska. Dokazana je statistički značajna negativna korelacija u odnosu na broj krvnih sudova na optičkom disku oba oka i ispitivanim zonama, tj. dolazi do redukcije broja krvnih sudova retine. Hitinaza-3-protein 1 stimuliše proliferaciju endotelnih ćelija, stimuliše proliferaciju VSMCs i dovodi do povećanja spoljašnjeg dijametra krvnog suda. Izmenjeni krvni sudovi uzrokuju ishemiju i redukciju vaskularne mreže.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je YKL-40 biomarker koji može služiti u praćenju nastanka i progresije RD. Korelacijom sa biomarkerima inflamacije utvrđeno je da je YKL-40 nezavisan parametar od CRP-a, BMI, glikemije i fibrinogena. Navedene činjenice govore u prilog većoj specifičnosti YKL kao parametra inflamacije i njegovoj manjoj zavisnosti od sinteze drugih markera inflamacije, kao i lokalne sinteze YKL-40 na nivou samih tkiva u kojima se proces odigrava. Nielsen i autori označavaju YKL-40 nezavisnim markerom DMT2 (Nielsen i sar., 2008).

Korelacijom dobijenih vrednosti uočena je negativna korelacija YKL-40 sa sedimentacijom, i pozitivna korelacija sa ukupnim SH grupama. Porastom vrednosti YKL-40 raste i vrednost SH grupa kod bolesnika sa DMT2 i početnim promenama na očnom dnu. Hitinaza-3-protein-1 učestvuje u procesu inflamacije koja dovodi do produkcije RVK. Povećana produkcija RVK aktivira mehanizme antioksidativne zaštite, kao što su ukupne SH grupe. Usled međuorganske preraspodele glutaciona, u ranim stadijumima RD može se objasniti porast vrednosti ukupnih SH grupa u perifernoj krvi ispitanika sa RDNP.

6.4. PARAMETRI OKSIDATIVNOG STRESA I ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE

Rezultati brojnih studija pokazuju da oksidativni stres ima značajnu ulogu u nastanku kako mikrovaskularnih tako i makrovaskularnih komplikacija DMT2.

Retinalno tkivo ima visok procenat polinezasićenih masnih kiselina, veću potrošnju kiseonika i intenzivniji proces oksidacije glikoze u poređenju sa bilo kojim drugim tkivom u organizmu, što ga čini podložnijim oksidativnom stresu (Song i sar., 2005).

Hronična hiperglikemija dovodi do aktivacije alternativnih puteva metabolizma glikoze, puta poliola, formiranja produkata ubrzane glikozilacije AGE i ekspresije RAGE i

njegovih aktivnih ligandi, aktivacije PKC izoformi i povišene aktivnosti heksozaminskog puta i nastanka RVK. U uslovima hronične hiperglikemije prisutna je povišena produkcija RVK na nivou mitohondrija. Hronična inflamacija dokazana kod osoba sa DMT2 praćena je, takođe, pojačanom produkcijom RVK.

Kao parametre oksidativnog stresa pratili smo koncentracije TBA-reagujućih supstanci (TBARS) i produkte uznapredovale oksidacije proteina (AOPP) u serumu svih ispitanika.

6.4.1. Parametri oksidativnog stresa

Praćenje oksidativnog oštećenja lipida kod naših ispitanika vršeno je merenjem TBA-reagujućih supstanci (Andreeva i sar., 1988). Najviše prosečne vrednosti TBARS dobijene su u grupi ispitanika sa RDPP, a najniže u kontrolnoj grupi. Upoređivanjem vrednosti TBARS bile su značajno više kod obe grupe ispitanika sa RD u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika. Upoređivanjem dobijenih prosečnih vrednosti ovog parametra između grupe ispitanika sa RDNP i RDPP, uočeno je da je vrednost ovog parametra statistički značajno viša kod ispitanika sa RDPP. Dobijeni rezultati ukazuju na intenzivni proces lipidne peroksidacije u grupi ispitanika sa uznapredovalom RD preproliferativnog tipa.

Lipidna peroksidacija je oksidativno oštećenje koje zahvata ćelijske membrane, lipoproteine i druge molekule koji sadrže lipide u uslovima postojanja oksidativnog stresa. Čelije tkiva retine imaju visok procenat polinezasićenih masnih kiselina, što ih čini posebno osetljivim na proces lipidne peroksidacije. Kod ispitanika sa RD uočena je veća koncentracija ukupnog holesterol, kao i LDL lipoproteinske frakcije u plazmi ispitanika. Prisutna hronična hiperglikemija i inflamacija predstavljaju izvor RVK i dovode do intenziviranja procesa lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija smanjuje fluidnost ćelijskih membrana i dovodi do inaktivacije membranskih enzima. Fragmentacija lanaca membranskih enzima dovodi do gubitka integriteta membrana i inaktivacije membranskih enzima, a ruptura lizozomskih membrana dovodi do oslobađanja hidrolitičkih enzima koji dalje oštećuju ćeliju. Oštećene ćelije pokreću proces apoptoze i fagocitoze, uz nastanak novog izvora RVK.

Lipidna peroksidacija lipoproteina plazme menja njihove fiziološke uloge i smatra se da je direktno povezana sa nastankom ateroskleroze. Direktno oštećenje ćelija retine, kao i stimulacija procesa ateroskleroze mogu objasniti oštećenje vaskularne mreže retine i tkiva retine kod osoba sa DM. Jednom pokrenuta reakcija peroksidacije nastavlja se autokatalitički, ima progresivan tok i dovodi do strukturno-funkcionalne promene supstrata. Ovom činjeni-

com je moguće objasniti i prisutnu statistički značajnu razliku između grupa ispitanika sa RDNP i RDPP.

Proteini pokazuju visoku osetljivost na delovanje slobodnih radikala. Oksidacija proteina je brza, linearna i senzitivniji je parametar oksidativnog oštećenja ćelije. Ona menja strukturu i dovodi do izmene funkcionalne aktivnosti proteina. Jedan od značajnih tipova oksidativne modifikacije proteina je karbonilni stres. U pitanju je reakcija glukoze sa proteinima, uz istovremeno učešće slobodnih radikala. Karbonilni stres je oblik modifikacije proteina prisutan kod osoba sa DM.

Kod naših ispitanika pratili smo oksidativnu modifikaciju proteina određivanjem koncentracije AOPP. Produkti uznapredovale oksidacije proteina smatraju se sličnim AGEs produktima i pripisuju im se slične biološke aktivnosti. Najviše vrednosti AOPP bile su u grupi ispitanika sa RDPP. Upoređivanjem dobijenih vrednosti AOPP bile su značajno više u obe grupe ispitanika sa RD u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika i to sa statističkom značajnošću. Uočeno je da je vrednost ovog parametra statistički značajno viša kod ispitanika sa RDPP u odnosu na grupu ispitanika sa RDNP.

Produkti uznapredovale oksidacije proteina nastaju intenzivnom glikooksidacijom, odnosno procesom karbonilnog stresa, u uslovima poremećene ravnoteže oksidanasa i antioksidanasa i istovremeno prisutne inflamacije. Kod osoba sa DM dolazi do njihovog nakupljanja i agregacije.

Proces glikacije je u prvoj fazi reverzibilan, kada nastaje kovalentna veza između amino grupe proteina i karbonilne grupe glukoze i nastaje Šifova baza. Zatim, nastaje fruktozilizin, prvi stabilni produkt. Njegova koncentracija zavisi od koncentracije glukoze i glikoziliranog hemoglobina. Kod naših ispitanika najviše vrednosti AOPP uočene su kod onih sa uznapredovalom formom RD, RDPP, kod kojih je uočena i najviša vrednost glukoze i glikoziliranog hemoglobina. Uslov za kasniju fazu je postojanje stabilnih ketoamin derivata ili produkata njegove razgradnje, usled delovanja slobodnih radikala, tzv. Milardovih produkata, odnosno N-karboksimetilina, pentozidina i piralina. Kritična patogenetska konsekvencija je deficit detoksikacije reaktivnih karbonilnih komponenti. U detoksikaciji reaktivnih karbonilnih komponenti učestvuju glutation (GSH), NADPH-zavisna redukcija putem aldozo reduktaze i NAD-zavisne oksidacije.

Tokom serije lančanih interakcija Milardovih produkata sa proteinima i uz prisustvo slobodnih radikala nastaju AGE produkti. Produkti uznapredovale glikooksidacije su visoko-oksidisane forme i moćan generator superoksid anjona. Utiču na permeabilnost krvnih sudova povećavajući je, sprečavaju dejstvo NO, direktno oštećuju endotelne ćelije krvnih sudova,

dovode do neadekvatne vaskulogeneze, utiču na produkciju proinflammatoryh citokina, aktiviraju neutrofile, monocite i adhezivne molekule.

Marsh i sar. (2009) dokazuju da nivo AOPP direktno korelira sa koncentracijom MPO u plazmi i AOPP nastaje MPO aktivnošću, odnosno u procesu inflamacije. Analizom molekularnih vrsta i spektralnih karakteristika AOPP uočeno je da sadrže karbonilne i ditirozinske grupe vezane za albumina. Isti autori navode da AOPP –albumin stimuliše proces oksidativnog sagorevanja, i sintezu proinflammatoryh citokina u neutrofilima i monocitima. U in vivo uslovima oksidovane forme albumina mogu biti značajni medijatori inflamacije.

Kod naših ispitanika vrednosti AOPP prate progresiju promena, tj. njihova koncentracija raste sa napredovanjem pomena na očnom dnu ispitanika. Naime, staza leukocita na nivou vaskularne mreže retine, dokazana u pacijenta sa DM i RD, omogućava nastanak AOPP MPO aktivnošću neutrofila (Marsh i sar., 2009, Woo i sar., 2011). Nastali AOPP su biomarkeri inflamacije i koreliraju sa progresijom promena na očnom dnu. Ng i sar. (2013) u svojoj studiji takođe potvrđuju povezanost nastanka AOPP i napredovanja RD. Isti autori ulogu AOPP presvega razmatraju kroz proces inflamacije.

Akumulacija AOPP uočena je kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom (Moore i sar., 2003). Jakuš i saradnici, u svojoj studiji sprovedenoj na ispitanicima sa tip 1 DM, uočili su povišene vrednosti AOPP i njegovu korelaciju sa produktima rane glikacije - fruktozamin (FAM), HbA1c i AGEs, što je uskladu sa našim rezultatima (Jakuš i sar., 2012). Najverovatnije je da AOPP nastaje relativno rano, povezuje proces oksidativnog stresa i inflamacije i njegove vrednosti koreliraju sa težinom samog oboljenja, tj. najviše su kod ispitanika sa RDPP.

6.4.2. Antioksidativni status

Organizam je dobro zaštićen antioksidativnim sistemom. Ovaj sistem čine endogeni antioksidansi (albumini, bilirubin, glutathion), egzogeni antioksidansi (tokoferol, vitamin C, karotenoidi) i sistem antioksidativnih enzima (katalaza, superoksid dismutaza (SOD), glutathion peroksidaza (GPx)). Dokazano je da je kod osoba sa DM smanjen kapacitet antioksidativne zaštite.

Proteini, pre svega albumini, i tio aminokiseline (cistein, tirozin, homocistein) su osnovni antioksidativni zaštitni parametri plazme. Kod osoba sa DM, dolazi da vezivanja AGE produkata i AOPP produkata za albumine i time dolazi do značajnog smanjenja njihovih toksičnih efekata.

Bilirubin sprečava oksidaciju LDL molekula. On ima i antiinflamatornu ulogu jer inhibira TNF- α , ICAM-1, and VCAM-1. Kod osoba sa DM i ovaj sistem pokazuje smanjenje svog kapaciteta.

Glutation (L- γ -glutamil-L-cistenil-glicin) je niskomolekulsko tiolno jedinjenje koje čini 90% ukupnih neproteinskih sulfhidrilnih jedinjenja. U ćeliji se najvećim delom nalazi kao tiol, u redukovanom obliku (GSH), a manje kao disulfid (GSSG) u oksidovanom obliku. Glutation S transferaza, glutathion transhidrogenaza glutathion peroksidaza, transferaza, glutathion reduktaza i NADPH obrazuju antioksidativni sistem glutathiona u kome su glutathion reduktaza i NADPH neophodni za redukciju oksidisanog glutathiona i reoksidaciju glutathiona koja se ostvaruje u glutathion redoks ciklusu.

U normalnim uslovima nastale veće količine RVK, pre svega superoksida, podležu procesu detoksikacije putem SOD do nastanka H₂O₂, a potom dejstvom katalaze i glutathion peroksidaze u molekul vode. Za ove reakcije neophodno je prisustvo glutathiona.

Antioksidativni status ispitanika sa RD pratili smo određivanjem ukupnih SH grupa i proteina u plazmi ispitanika. Dobijene prosečne vrednosti za ukupne SH grupe plazme bile su najviše u grupi ispitanika sa početnim promenama na očnom dnu, RDNP, a njihove najniže vrednosti uočene su kod ispitanika sa uznapredovalim oštećenjima očnog dna, RDPP. Upoređivanjem dobijenih rezultata vrednosti ovog parametra uočena je statistički značajna razlika grupe ispitanika sa RDNP u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika. Uočena je statistički značajna razlika u vrednostima istog parametra u grupi ispitanika sa RDPP u odnosu na RDNP.

Na osnovu dobijenih rezultata možemo uočiti da u početnim stadijumima RD dolazi do povećanja koncentracije SH grupa u perifernoj krvi, kao pokušaj organizma da odgovori na povećanu produkciju RVK. Međutim, u uznapredovalim formama RD, ko što RDPP dolazi do smanjenja ovog vida antioksidativne zaštite.

Na nivou krvnih sudova retine dokazana je leukostaza, presvega akumulacija neutrofila. Nagomilani neutrofili i endotelne ćelije proizvode superoksid anjon i NO. Superoksid anjon i NO u Fentonovoj reakciji generišu hidroksilni radikal i peroksinitrit anjon. Peroksinitrit anjon ima afinitet za SH grupe i aromatična jezgra amino kiselina, čime se smanjuje ukupna količina SH grupa u intenzivnom procesu inflamacije, prisutnom u ispitanika sa RDPP.

6.5. MORFOMETRIJA PROMENA NA OČNOM DNU KOD ISPITANIKA SA DIJABETESNOM RETINOPATIJOM

Krvni sudovi retine su dostupni neinvazivnoj vizuelizaciji, čime je pružena jedinstvena mogućnost istraživanja povezanosti strukture i karakteristika mikrocirkulacije u sistemskim oboljenjima i bolestima oka, kao što su glaukom, kardiovaskularne bolesti, moždani udar, gojaznost i dislipidemija (Kisilevsky i sar., 2008; Klein i sar., 2007; Mitchell i sar., 2005). Dokazano je da je suženje retinalnih arteriola znak dugotrajne sistemske hipertenzije (Wong i sar., 2004a; Wong i sar., 2005; Wong i sar., 2006).

Proučavanje broja i spoljašnjeg dijametra krvnih sudova retine kao i mikromorfoloških promena, koje nastaju kod osoba sa RD, moglo bi omogućiti adekvatnije praćenje napredovanja RD i blagovremeno uvođenje adekvatne terapije.

6.5.1. Broj i dijametar kvnih sudova retine

ARIC studija i Beaver Dam Eye Study proučavajući retinalnu cirkulaciju, dokazuju da je smanjenje dijametra malih arteriola u povezano sa DMT2 i ne zavisi od visine krvnog pritiska (Wong i sar., 2004a; Klein i sar., 2006).

Druge studije, međutim, dokazuju povećanje dijametra krvnih sudova retine kod osoba sa DMT2 (Wong i sar., 2002; Wong i sar., 2004; Klein i sar., 2007). Rezultati navedenih istraživanja objašnjeni su prisutnom hiperglikemijom i hipoksijom kod osoba sa DM i RD. Hiperglikemija, inflamacija i oksidativni stres dovode do oštećenja vaskularne mreže retine i smanjenja broja krvnih sudova. Usled hipoperfuzije tkiva retine redukcije vaskularne mreže retine, vazoregresije, dolazi do hipoksije tkiva retine (Hammes i sar., 2011; Wong i sar., 2002; Klein i sar., 2007). Hipoperfuzija u skladu sa autoregulacionim mehanizmom dovodi do dalje vazodilatacije (Hammes i sar., 2011; Wong i sar., 2002).

Inflamacija prisutna na nivou retinalnih krvnih sudova i remodelacija, praćena smanjenjem ukupnog broja krvnih sudova retine i izmenama u sastavu zidova krvnih sudova retine, predstavljaju osnovnu okosnicu novijih teorija nastanka RD (Wong i sar., 2006; Jousen i sar., 2004). Regresija vaskularne mreže, okluzija i remodelacija krvnih sudova tipične su karakteristike mikrovaskularnih promena kod bolesnika sa DMT2 i uzrok su daljeg napredovanja RD. Dijabetesna retinopatija počinje gubitkom celularnih komponenata retinalnih kapilara, pericita i endotelnih ćelija (Jousen i sar. 2004). Tačan redosled gubitka ćelija

nije poznat. Nakon gubitka celularnih komponenata zida slede promene u sastavu ekstracelularnog matriksa na nivou krvnih sudova retine.

Kod naših ispitanika sa RD analiziran je broj krvnih sudova na optičkom disku oba oka (OD-BKS i OL-BKS). Najviše krvnih sudova na optičkom disku oba oka bilo je u kontrolnoj grupi. Tukey post hoc test je dodatno ukazao da je prosečan broj krvnih sudova u kontrolnoj grupi i grupi ispitanika sa RDNP statistički značajno viši u odnosu na RDPP grupu, na optičkom disku desnog oka. Kod ispitivanih grupa, na nivou optičkog diska levog oka, prisutna je statistički značajna razlika u broju krvnih sudova grupe sa RDPP u odnosu na kontrolnu grupu i kod ispitanika sa RDNP. Na optičkom disku oba oka dolazi do smanjenja broja krvnih sudova sa napredovanjem RD.

Kod svih ispitanika određivan je i prosečan spoljašnji dijametar krvnih sudova oba oka na optičkom disku (OD-DKS i OL-DKS). Prosečan OD-DKS je pokazivao suprotan trend, u odnosu na trend broja krvnih sudova na optičkom disku oba oka. Dijametar krvnih sudova bio je veći kod ispitanika sa RD u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika. Najveći dijametar krvnih sudova na optičkom disku uočen je u grupi ispitanika sa RDPP. Prisutna je statistički značajna razlika u vrednosti ovog parametra između grupe ispitanika sa RDPP u odnosu na grupu ispitanika sa RDNP. Na optičkom disku oba oka dolazi do povećanja spoljašnjeg dijalmetra krvnih sudova sa napredovanjem RD.

Kod svih ispitanika pratili smo spoljašnji dijametar i broj krvnih sudova na digitalnim fotografijama očnog dna u pet koncentričnih zona sa centrom u optičkom disku (slika 8). Rezultati ovih analiza pokazali su statističku značajnost između tri posmatrane grupe ispitanika. Prosečan broj krvnih sudova retine bio je najmanji u grupi ispitanika sa RDPP u svih pet ispitivanih zona retine na digitalnim fotografijama očnog dna oba oka.

One way ANOVA pokazuje da postoji statistički značajna razlika u broju krvnih sudova i svih pet zona retine desnog i levog oka. Vrednosti ovog parametra rastu od optičkog diska do zone III, gde su prisutne najviše vrednosti, tj. najveća prosečna vrednost broja krvnih sudova retine, koja postepeno opada na oba oka u sve tri grupe ispitanika. Games Howell post hoc test pokazuje da je na desnom oku u grupi ispitanika sa RDNP prosečan broj krvnih sudova statistički značajno veći ($p < 0,05$) u zoni II, zoni III i zoni IV nego na optičkom disku, kao i u odnosu na zonu I i zonu V. Tukey's post hoc test pokazuje da je u grupi ispitanika sa RDPP prosečan broj krvnih sudova značajno viši ($p < 0,05$) u zoni II i zoni III, nego na optičkom disku i u zoni V, kao i u zoni I u odnosu na zonu V. Vrednosti ovog parametra se nisu značajno razlikovale između ostalih zona na desnom oku u okviru grupe ispitanika sa RDPP. Prosečan broj krvnih sudova u svakoj zoni pokazuje sličan trend na levom oku.

Ovi podaci mogu sugerisati da je redukcija prokrvljenosti u slučaju grupe ispitanika sa RDPP izraženija u području makule kao i u zoni V, u odnosu na ostale zone, i to na oba oka. Područje makule lokalizovano je u zoni II ili zoni III, u najvećem broju digitalnih fotografija. Na nekim fotografijama područje makule se delimično nalazi u zoni IV, što je posledica više medijalno lociranog optičkog diska i posledične redukcije širine koncentričnih zona. Zona V odgovara periferiji same retine.

Prosečna vrednost spoljašnjeg dijametra povećava se od optičkog diska do zone V i to statistički značajnije na desnom oku u grupi ispitanika sa RDNP ($p < 0,001$) i u grupi ispitanika sa RDPP ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika.

Uočeno je da prosečan broj krvnih sudova raste od optičkog diska do zone II i III, a potom se smanjuje, a najveći je u kontrolnoj grupi. Dijametar krvnih sudova raste od optičkog diska ka zoni V i najveći je u grupi bolesnika sa RDPP.

Korelacijom vrednosti CRP-a i YKL-40, kao biomarkera inflamacije, sa dobijenim vrednostima spoljašnjeg dijametra krvnih sudova retine, uočena je pozitivna korelacija, odnosno veličina krvnih sudova na optičkom disku, kao i u svih 5 zona u kojima je vršeno merenje dijametra krvnih sudova na oba oka, raste sa porastom vrednosti navedenih parametara. Međutim, korelacija CRP-a i YKL-40 sa brojem krvnih sudova je takođe prisutna, ali kao negativna, odnosno broj krvnih sudova se smanjuje sa porastom vrednosti ova dva biomarkera inflamacije u krvi ispitanika, što ide u prilog činjenicama iznetim u teoriji vazoregresije uzrokovane inflamacijom u RD (Joussen i sar., 2004)

Statistički značajna korelacija između spoljašnjeg dijametra krvnih sudova i broja krvnih sudova na optičkom disku i u pet različitih zona retine nije prisutna sa ukupnim sulfhidrilnim grupama.

Mehanizam koji dovodi do povećanja spoljašnjeg dijametra malih krvnih sudova retine najverovatnije uključuje inflamaciju koji dovodi do apoptoze endotelних ćelija i pericita, i izmena ekstracelularnog matriksa. Povećanje spoljašnjeg dijametra krvnih sudova može se objasniti gubitkom ćelijskih elemenata zida krvnih sudova i povećanjem ekstracelularnog matriksa. Povećanje dijametra krvnih sudova u morfolškom pogledu podrazumeva prisustvo mikroaneurizmi, pre svega kod ispitanika sa RDNP i RDPP, i IRMA i "looping" promena kod ispitanika sa RDPP. Intravaskularne anomalije i omčasto izmenjeni krvni sudovi karakterišu uznapređovalu formu RDPP. Dobijeni rezultati su u skladu sa prisutnim podacima u literaturi o ulozi inflamacije u nastanku RD (Joussen i sar., 2004; Klein i sar., 2006).

Kod ispitanika sa RD u odnosu na kontrolnu grupu parametri inflamacije, fibrinogen, sedimentacija, CRP i YKL-40, kao i parametri oksidativnog stresa, AOPP i TBARS i anti-

oksidativne zaštite (SH grupe) bili su viši u odnosu na kontrolnu grupu, i to sa statističkom značajnošću. Najveće vrednosti ovih parametara bile su u grupi ispitanika sa RDPP. Uočena statistički značajna razlika u ovim parametrima između grupe ispitanika sa RDNP i RDPP.

Broj krvnih sudova na nivou optičkog diska kao i na nivou svih pet ispitivanih zona pokazuje tendenciju smanjenja. Smanjenje vrednosti ovog parametara uočeno je po zonama kao i sa napredovanjem samog oboljenja, odnosno u grupi ispitanika sa RDPP. Dobijeni rezultati su u skladu sa teorijom vazoregresije vaskularne mreže u osoba sa RD. Tokom razvoja RD, usled gubitka ćelijskih elemenata zida, zadebljanja ekstracelularnog matriksa i prisutne okluzije krvnih sudova nastaju acelularne fibroze trake koje odgovaraju okludiranim krvnim sudovima. Ovako nastali krvni sudovi upotpunosti gube svoju funkciju, a istovremeno nastaje i gubitak dela vaskularne mreže. Nastale promene se mogu objasniti prisutnom inflamacijom i oksidativnim stresom prisutnim na nivou vaskularne mreže retine.

Merenje dijametra retinalnih krvnih sudova nam može pružiti informaciju o progresiji RD (Wong i sar., 2002; Klein i sar., 2006; Abramoff i sar., 2008; Apelov, 2011). Praćenje RD bi mogao biti zasnovan na praćenju broja i dijametara krvnih sudova retine ispitanika sa RD u midrijazi uz fotodokumentaciju i adekvatnu morfometrijsku analizu i korelaciju sa biomarkerima inflamacije CRP i YKL-40.

6.5.2. Morfometrijska analiza promena na očnom dnu

Urađena je i morfometrijska analiza promena na očnom dnu kod osoba sa RD i to: hemoragija (tačkasta, mrljasta i crtasta krvarenja) i tvrdih eksudata. Hemoragije su bile češće u grupi ispitanika sa RDPP i to na očnom dnu levog oka. Međutim, njihova ukupna površina po zonama nije pokazivala statistički značajnu razliku između RDPP u odnosu na RDNP, ni po ispitivnim zonama oba oka.

Hemoragije retine, tačkaste, mrljaste i crtaste, su morfoloiške promene sa tendencijom povlačenja i totalne resopcije. Ove karakteristike retinalih hemoragija mogu objasniti ne postojanje statistički značajne razlike između ispitivanih grupa kao i ukazati da prisustvo hemoragija nije od značaja za praćenje napredovanja RD.

Zastupljenost tvrdih eksudata u osoba sa RDPP bila je veća u odnosu na grupu ispitanika sa RDNP. Međutim upoređivanjem površina zahvaćenih ovim promenama nije uočena statistički značajna razlika između grupa sa RDPP i RDNP. Najveći procenat tvrdih eksudata bio je zastupljen u zoni II i III koja odgovara području makule u obe grupe ispitanika kao i na oba oka.

Tvrđi eksudati nastaju kao posledica oštećenja krvnih sudova retine i povećanja njihove permeabilosti. Oni su zapravo depoziti lipida plazme i najčešća i najznačajnija po oštrinu vida je njihova lokalizacija u području makule. Ove promene se ne smatraju značajnim za napredovanje RD.

Duker i sar. (2004) takođe potvrđuju da hemoragije kao i prisustvo tvrdih eksudata nisu parametri praćenja napredovanja RD.

Navedene činjenice podržavaju težnje da se mikrocirkulatorne komplikacije spreče ili umanje primenom sistemske terapije. Izvesni autori sugerišu da bi farmakološki agensi, kao što su antikoagulaciona terapija, glikokortikoidi, inhibitori aldoso reduktaze, inhibitori protein kinaze C, AOPP inhibitori, statini, kanabinoidi, antioksidansi, mogli imati pozitivan terapijski efekat na smanjenje dijametra krvnih sudova i vazoregresiju (The ACCORD Study Group and ACCORD Eye Study Group, 2010).

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata sprovedenog ispitivanja, možemo zaključiti:

- Dužina trajanja bolesti je značajna za nastanak i progresiju dijabetesne retinopatije.
- Vrednost glikemije značajan je parametar za nastanak dijabetesne retinopatije, ali ne i za progresiju oboljenja.
- Glikozilirani hemoglobin A1c, parametar glikoregulacije u prethodnih 8 do 12 nedelja, je značajnim parametar za nastanak dijabetesne retinopatije i može se smatrati značajnim za progresiju oboljenja.
- Smanjenje vrednosti HDL frakcije holesterola i povećanje vrednosti triglicerida značajni su parametri za nastanak i progresiju dijabetesne retinopatije. Vrednosti lipida, posebno HDL frakcije kao negativnog biomarkera inflamacije, koreliraju sa intenzitetom inflamacije i oksidativnog oštećenja vaskularne mreže retine.
- Aterogeni indeks plazme je značajan parametar nastanka ali i progresije oštećenja endotelne ćelije krvnih sudova, i može se smatrati markerom nastanka i praćenja progresije dijabetesne retinopatije.
- Indeks telesne mase nije direktno povezan sa nastankom i progresijom oboljenja.
- Sedimentacija i fibrinogen su biomarkeri inflamacije značajni za nastanak dijabetesne retinopatije, ali ne i parametari praćenja progresije promena.
- C-reaktivni protein je značajan biomarker inflamacije čije vrednosti direktno koreliraju sa nastankom i progresijom mikrovaskularnih promena kod osoba sa DMT2 i mogućim nastankom metaboličkog sindroma.
- Vrednosti hitinaza-3 protein 1, novog biomarkera inflamacije, direktno koreliraju sa stepenom napredovanja promena na očnom dnu ispitanika sa dijabetesnom retinopatijom. Metodama korelacije je utvrđeno da je nezavisan parametar u odnosu na indeks telesne mase i C-reaktivni protein, i potvrđena je njegoa pozitivna korelacija sa vrednostima ukupnih sulfhidrilnih grupa.
- Parametri oksidativnog stresa TBA-reaktivne supstance i produkti ubrzane oksidacije proteina prate nastanak i progresiju dijabetesne retinopatije.

- Ukupne sulfhidrilne grupe, kao parametri antioksidativne zaštite, značajne su za praćenje nastanka i progresije dijabetesne retinopatije.
- U osnovi nastanka i progresije dijabetesne retinopatije nalaze se dva procesa: inflamacija i oksidativni stres, koji se međusobno prepliću i teško je reći koji od njih je inicijalni proces u pokretanju ove mikrovaskularne komplikacije.
- Dijametar i broj krvnih sudova retine i optičkog diska mogu se smatrati značajnim parametrom za praćenje nastanka i progresije dijabetesne retinopatije.
- Broj krvnih sudova retine i optičkog diska pokazuje tendenciju smanjenja napredovanjem procesa, što je ide u prilog teoriji vazoregresije.
- Dijametar krvnih sudova retine i optičkog diska pokazuje tendenciju povećanja i prati progresiju dijabetesne retinopatije, odnosno napredovanje samog procesa.
- Korelacija vrednosti biomarkera inflamacije, C-reaktivni protein i hitinaza-3 protein 1 sa brojem i dijametrom krvnih sudova retine, ukazuje na direktnu povezanost intenziteta inflamacije i promena na očnom dnu, odnosno povećanje vrednosti navedenih biomarkera inflamacije prati povećanje dijametra i redukciju broja krvnih sudova retine.

8. LITERATURA

1. Abiko T, Abiko A, Clermont AC, Shoelson B, Horio N, Takahashi J, Adamis AP, King GL, Bursell SE. Characterization of retinal leukostasis and hemodynamics in insulin resistance and diabetes: role of oxidants and protein kinase-C activation. **Diabetes** 2003;52:829-837.
2. Abramoff MD, Niemeijer M, Suttorp-Schulten MSA, Viergever MA, Russell SR, van Ginneken B. Evaluation of a system for automatic detection of diabetic retinopathy from color fundus photographs in a large population of patients with diabetes. **Diabetes Care** 2008;31(2): 193-8.
3. Abu-El-Asrar AM, Dralands L, Missotten L, Al-Jadaan IA, Geboes K. Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2004;45: 2760-6.
4. Abu El-Asrar MA, Al-Mezanine, Ola SM. Pathophysiology and management of diabetic retinopathy. **Exp Rev of Ophthalmol** 2009;15:1-28.
5. Adamis AP. Is diabetic retinopathy an inflammatory disease? **Br J Ophthalmol** 2002;86:363-365.
6. Adamis AP, Berman AJ. Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. **Semin Immunopathol** 2008;30:65-84.
7. Al-Kateb H, Mirea L, Xie X, Sun L, Liu M, Chen H, Bull SB, Boright AP, Paterson AD; DCCT/EDIC Research Group. Multiple variants in vascular endothelial growth factor (VEGFA) are risk factors for time to severe retinopathy in type 1 diabetes: the DCCT/EDIC genetics study. **Diabetes** 2007;56(8):2161-8.
8. Alexandraki K, Piperi C, Kalofoutis C, Singh J, Alaveras A, Kalofoutis A. Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines. **Ann NY Acad Sci** 2006;1084:89-117.
9. Al-Shabraway M, Rojas M, Bartoli M, El-Remessy A, Behzadian A, Miller T, Lemtalsi T, Liou GI, Caldwell RB. Preservation of the blood retinal barrier (brb) in diabetes by deletion of gp91phox or inhibition of NAD(P)H oxidase. Abstract - ARVO, 2006.
10. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care** 2010;33:62-69.
11. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care** 2013;(1):67-74.
12. Andreassen M, Raymond I, Hildebrandt P, Kistorp C, Rathcke C, Vestergaard H, Faber J, Kristensen LO. Associations between plasma insulin-like growth factor-I and the markers of inflammation interleukin 6, C-reactive protein and YKL-40 in an elderly background population. **Inflamm Res** 2010;59(7):503-10.
13. Andreeva IL, Koemjakin AL, Kiškun AA. Modifikacija metoda opredelenia perkisej lipiddov v teste s tiobarbiturovoj kislotoj. **Lab Delo** 1988;11:41-3.
14. Aprelov AE. Combination of measurement of retinal vascular caliber, adaptive optics and fluorescent angiography in early diagnosis and monitoring of diabetic and hypertensive retinopathy. **Vestn Oftalmol** 2011;127(2):29-31.
15. Araki E, Nishikawa T. Oxidative stress: A cause and therapeutic target of diabetic complications. **J Diabetes Invest** 2010;1:90-6.
16. Asakawa H, Tkunaga K, Kawakami F. Evolution of fibrinogen and thrombin-antithrombin III complex levels of type 2 diabetes mellitus patients with retinopathy and nephropathy. **J Diab Complications** 2000;14:121-26.
17. Badawi A, Klip A, Hadda P. Type 2 Diabetes mellitus and inflammation: Prospects for biomarkers of risk and nutritional intervention. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Target and Therapy** 2010;3:173-86.
18. Barile GR, Pachydaki S, Tari SR. The RAGE axis in early diabetic retinopathy. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2005;46:2916-24.

19. Barth JL, Yu Y, Song W, Lu K, Dashti A, Huang Y, Argraves WS, Lyons TJ. Oxidised, glyca-
ted LDL selectively influences tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene expression and
protein production in human retinal capillary pericytes. **Diabetologia** 2007;50:2200-08.
20. Bek H, Hammes HP, Porta M (eds). Clinical presentations and pathological correlates of retino-
pathy: experimental approaches to diabetic retinopathy. Front Diabetes. Basel, Karger, 2010;
20:1-19.
21. Bearse MA, Adams AJ, Han Y, Scheinecn ME, Ng J, Castain KB, Barez S. A multifocal elec-
troretinogram model predicting the development of diabetic retinopathy. **Prog Retin Eye Reas
Elsevier** 2006;25:425-48.
22. Biasucci LM, Biasillio G, Stefanelli A. Inflammatory markers, cholesterol and statins: Patho-
physiological role and clinical importance. **Clin Chem Lab Med** 2010;48(12):1685-91.
23. Bild DE, Bluemke DA, Burke GL. Multi-ethnic study of atherosclerosis: objective and design.
Am J Epidemiol 2002;156:871-81.
24. "BMI Classification". World Health Organization. http://www.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html.
25. Black S, Kushner I, Samilis D. C-reactive protein. **J Biol Chem** 2004;279(47):48487-90.
26. Blair NP, Shahidi M, Lai WW, Zelkha R. Correlation between microaneurysms and retinal
thickness in diabetic macular edema. **Retina** 2008;28:1097-103.
27. Bresnick GH, Davis MD, Myers FL, de Venecia G. Clinicopathologic correlations in diabetic
retinopathy. II. Clinical and histologic appearances of retinal capillary microaneurysms. **Arch
Ophthalmol** 1977;95:1215-20.
28. Boncler M, Watała C. Regulation of cell function by isoforms of C-reactive protein: A compa-
rative analysis. **Acta Biochimica Polonica** 2009;56 (1):17-31.
29. Brown BG, Albers JJ, Fisher LD, Schaefer SM, Lin JT, Kaplan C, Zhao XQ, Bisson BD, Fitz-
patrick VF, Dodge HT. Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lo-
wering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. **N Engl J Med** 1990;323:1289-98.
30. Brownlee M, Hirsch IB. Glycemia Variability: A hemoglobin A1C-independent risk factor for
diabetic complications. **JAMA** 2006;295(14):1707-8.
31. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diab** 2005;
54:1615-25.
32. Brucklacher RM, Patel KM, VanGuilder HD, Bixler GV, Barber AJ, Antonetti DA, Lin CM,
LaNoue KF, Gardner TW, Bronson SK, Freeman WM. Whole genome assessment of the reti-
nal response to diabetes reveals a progressive neurovascular inflammatory response. **BMC Med
Genomics** 2008;1:26.
33. Caballero S, Sengupta N, Afzal A, Chang KH, Li Calzi S, Guberski DL, Kern TS, Grant MB.
Ischemic vascular damage can be repaired by healthy, but not diabetic, endothelial progenitor
cells. **Diabetes** 2007;56(4):960-7.
34. Caldwell RB, Bartoli M, Behzadian MA, El-Remessy AE, Al-Shabrawey M, Platt DH, Liou
GI, Caldwell RW. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: role of oxida-
tive stress. **Curr Drug Targets** 2005;6:511-24.
35. Calcutt NA, Cooper ME, Kern TS, Schmidt AM. Therapies for hyperglycaemia-induced
diabetic complications: from animal models to clinical trials. **Nat Rev Drug Discov** 2009;8:
417-29.
36. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. **Nat Med** 2003;9:653-660.
37. Cefalu WT. Inflammation, insulin resistance, and type2 diabetes: back to the future? **Diabetes**
2009;58:307-8.
38. Ceriello A. Coagulation activation in diabetes mellitus: the role of hyperglycaemia and thera-
peutical prospect. **Diabetologia** 1993;36:1119-1125.
39. Chiarelli F, Pomilio M, Mohn A, Tumini S, Vanelli M, Morgese G, Spagnoli A, Verrotti A.
Homocysteine levels during fasting and after methionine loading in adolescents with diabetic
retinopathy and nephropathy. **J Pediat** 2000;137(3) :386-92.
40. Conway BN, Miller RG, Klein R, Orchard TJ. Prediction of proliferative diabetic retinopathy
with hemoglobin level. arch. **Ophthalmol** 2009;127(11):1494-9.
41. Dandona P. Effects of antidiabetic and antihyperlipidemic agents on C-reactive protein. **Mayo
Clin Proc** 2008;83(3):333-42.

42. de Gooyer TE, Stevenson KA, Humphries P, Simpson DA, Gardiner TA, Stitt AW. Retinopathy is reduced during experimental diabetes in a mouse model of outer retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:5561-8.
43. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. World Health Organisation. 1999. http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO_NCD_NCS_99.2.pdf.
44. Devaraj S, Singh U, Jialal I. The Evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis. *Clin Chem* 2009;55(2):229-38.
45. Devaraj S, Singh U, Jialal I. Human C-reactive protein and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2009;20(3):182-9.
46. Diabetic Retinopathy Guidelines. 2012, *The Royal College of Ophthalmologists*
47. Đorđević V, Pavlović D, Kocić G. Biohemija slobodnih radikala. Sirius Print, Niš, 2000.
48. Dobiašova M. Atherogenic index of plasma [Log(Triglycerides/HDL-Cholesterol)]: Theoretical and practical implications. *Clin Chem* 2004;50(7):1113-15.
49. Dobiašova M, Frohlich J, Šedova M, Cheung MC, Brown BG. Cholesterol esterification and atherogenic index of plasma correlate with lipoprotein size and findings on coronary angiography. *J Lipid Res* 2011;52(3):566-71.
50. Duker JS. Retina et vitreous. In Yanoff M, Duker JS. ed. Ophthalmology. 2nd ed. Mosby, 2004:770-1038.
51. Dyer DG, Blackledge JA, Thope SR, Baynes JW. Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of preteins by glucose. *J Biol Chem* 1991;266(18):11654-60.
52. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Grading diabetic retinopathy from Stereoscopic Color Fundus Photographs: an extension of the Modified Arlie House classification. *Ophthalmol* 1991; 98:789-806.
53. Eisenhardt SU, Thiele JR, Bannasch H, Stark GB, Peter K. C-reactive protein How conformational changes influence inflammatory properties. *Cell Cycle* 2009; 8;23:3885-92.
54. Ellman LG. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1952;82:70-7.
55. Enas EA, Yusuf S, Garg A. Lipoprotein (a) level in indiana physician; comparison with white and black physicians in the USA. *Indian Heart J* 1994;46:1.
56. Engin KN, Yemişçi B, Yiğit U, Ağaçhan A, Coşkun C. Variability of serum oxidative stress biomarkers relative to biochemical data and clinical parameters of glaucoma patients. *Mol Vis* 2010;16:1260-71.
57. Ernst E, Resch KL. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med* 1993;118:956-63.
58. European Association for the Study of Diabetes (EASD). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the ADA and EASD. *Diabetes Care* 2012;35(6):1364-79.
59. Feng Y, Vom Hagen F, Wang Y, Beck S, Schreiter K, Pfister F, Hoffmann S, Wagner P, Seeliger M, Molema G, Deutsch U, Hammes HP. The absence of angiotensin-2 leads to abnormal vascular maturation and persistent proliferative retinopathy. *Thromb Haemost* 2009;102(1):120-30.
60. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, Gale NW, Witzenzath M, Rosseau S, Suttorp N, Sobke A, Herrmann M, Preissner KT, Vajkoczy P, Augustin HG. Angiotensin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 2006;12(2):235-9.
61. Folsom AR, Wu KK, Rasmussen M, Chambless LE, Aleksić N, Nieto FJ. Determinants in fibrinogen and factor VII over six years: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:601-606.
62. Funatsu H, Noma H, Mimura T, Eguchi S, Hori S. Association of vitreous inflammatory factors with diabetic macular edema. *Ophthalmol* 2009;116(1):73-9.
63. Fitrolaki DM, Dimitriou H, Kalmanti M, Briassoulis G. CD64-Neutrophil expression and stress metabolic patterns in early sepsis and severe traumatic brain injury in children. *BMC Pediatrics* 2013;1:13-31.
64. Garcia-Ortiz L, Ramos-Delgado E, Recio-Rodriguez JJ, Agudo-Conde C, Martínez-Salgado C, Patino-Alonso MC, Rodriguez-Sanchez E, Gomez-Marcos MA; Vaso risk group. Peripheral and central arterial pressure and its relationship to vascular target organ damage in carotid

- artery, retina and arterial stiffness. Development and valid of a toll. The vasorisk study. *BMC Public Health* 2011;11:266.
65. Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:630-8.
 66. Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature* 2005;438:960-6.
 67. Gargalovic PS. The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2490-6.
 68. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003;161:1163-77.
 69. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Cir Res* 2010;107:1058-70.
 70. Giebel SJ, Menicucci G, McGuire PG, Das A. Matrix metallo proteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood retinal barrier. *Lab Invest* 2005;85:597-607.
 71. Gruber M, Christ-Crain M, Stolz D, Keller U, Müller C, Bingisser R, Tamm M, Mueller B, Schuetz P. Prognostic impact of plasma lipids in patients with lower respiratory tract infections an observational study. *Swiss Med WKLY* 2009;139(11-12):166-72.
 72. Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced-coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(9):3171-82.
 73. Gürdöl F, Cimsit M, Öner-Iyidoğan Y, Körpınar Ş, Yalçinkaya S. Early and late effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress parameters in diabetic patients. *Physiol Res* 2008;57:41-7.
 74. Hammes HP, Feng Y, Pfister F, Brownlee M. Diabetic retinopathy. *Diabetes* 2011;60(1):9-16.
 75. Hammes HP, Lin J, Wagner P, Feng Y, Vom Hagen F, Krzizok T, Renner O, Breier G, Brownlee M, Deutsch U. Angiopoietin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy. *Diabetes* 2004;53:1104-10.
 76. Hellström M, Phng LK, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, Lindblom P, Alva J, Nilsson AK, Karlsson L, Gaiano N, Yoon K, Rossant J, Iruela-Arispe ML, Kalén M, Gerhardt H, Betsholtz C. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 2007;445:776-80.
 77. Henriksen T, Mahoney ME, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis* 1983;3:149-8.
 78. Homayouni M. Vascular endothelial growth factors and their inhibitors in ocular neovascular disorders. *J Ophthalmic Res* 2009;4(2):105-14.
 79. Hofmann MA, Kohl B, Zumbach MS, Borcea V, Bierhaus A, Henkels M, Amiral J, Schmidt AM, Fiehn W, Ziegler R, Wahl P, Nawroth PP. Hyperhomocyst(e)inemia and endothelial dysfunction in IDDM. *Diabetes Care* 1998;21:841-8.
 80. Hultberg B, Agardh E, Andersson A, Brattström L, Isaksson A, Israelsson B, Agardh CD. Increased levels of plasma homocysteine are associated with nephropathy, but not severe retinopathy in type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1991;51:277-82.
 81. Ikram MK, de Jong FJ, Vingerling JR, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM, de Jong PT. Are retinal arteriolar or venular diameters associated with markers for cardiovascular disorders? The Rotterdam Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2129-34.
 82. International Diabetes Federation, 2012 (International Diabetes Federation Atlas, 4th Edition, 2012 www.diabetesatlas.org/content/foreword).
 83. Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;13(4-5):357-68.
 84. Iwata T, Kuwajima M, Sukeno A, Ishimaru N, Hayashi Y, Wabitsch M, Mizusawa N, Itakura M, Yoshimoto K. YKL-40 secreted from adipose tissue inhibits degradation of type I collagen. *Biochem Biophys Res Comm* 2009;388:511-19.
 85. Jain SK. Superoxide dismutase overexpression and cellular oxidative damage in diabetes. A commentary on "Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress". *Free Radic Biol Med* 2006;41:1187-90.

86. Jaković Kosanović N, Petrović L, Risimić D, Milenković S, Matić D. Metabolic syndrome and central retinal artery occlusion. *Vojnosanit Pregl* 2005;62(12):935-8.
87. Jakuš V, Sapak M, Kostolanska J. Circulating TGFβ1, glycation, and oxidation in children with diabetes mellitus type 1. *Exp Diab Res* 2012;2012:510902.doi:10.1155/2012/510902.
88. Jiang A, Hu W, Meng H, Gao H, Qiao X. Loss of VLDL Receptor Activates Retinal Vascular Endothelial Cells and Promotes Angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(2):844-50.
89. Johansen J. Study on serum YKL-40 as biomarker in disease with inflammation, tissue remodeling, fibrosis and cancer. *Dan Med Bull* 2006;53:72-209.
90. Johansen JS, Jensen BV, Roslind A, Nielsen D, Price PA. Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(2):194-202.
91. Johansen JH, Krabbe KS, Møller K, Pedersen BK. Circulating YKL-40 levels during human endotoxaemia. *Clin Experiment Immunol* 2005;140:343-8.
92. Johansen JS, Løttenburger T, Nielsen HJ, Jensen JE, Svendsen MN, Kollerup G, Christensen IJ. Diurnal, weekly and long-time variation in serum concentration of ykl-40 in healthy subject. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(10):2603-8.
93. Joussen AM, Poulaki V, Mitsiades N, Kirchhof B, Koizumi K, Döhmen S, Adamis AP. Non steroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-α suppression. *FASEB J* 2002;16:438-40.
94. Joussen AM, Poulaki V, Le ML, Koizumi K, Esser C, Janicki H, Schraermeyer U, Kociok N, Fauser S, Kirchhof B, Kern TS, Adamis AP. A central role of inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB J* 2004;18(12):1450-2.
95. Kaji Y, Usui T, Ishida S, Yamashiro K, Moore TC, Moore J, Yamamoto Y, Yamamoto H, Adamis AP. Inhibition of diabetic leukostasis and blood retinal barrier breakdown with a soluble form of a receptor for advanced glycation end products. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:858-65.
96. Kaviarasan S, Muniandy S, Qvist R, Ismail IS. F₂-Isoprostanes as Novel Biomarkers for Type 2 Diabetes: a Review. *J Clin Biochem Nutr* 2009;45:1-8.
97. Kaysen GA. Biochemistry and biomarkers of inflamed patients: why look, what to assess. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4 Suppl 1:S56-63.
98. Kedzierska K, Ciechanowski K, Gołembiewska E, Safranow K, Ciechanowicz A, Domański L, Myślak M, Różański J. Plasma pre kalikrein as risk factor for diabetic retinopathy. *Arch Med Res* 2005;36:539-43.
99. Kerkeni M, Saïdi A, Bouzidi H, Letaïef A, Ben Yahia S, Hammami M. Pentosidine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diab Vasc Dis Res* 2013;10(3):239-45.
100. Kern TS. Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res* 2007;9(5):103.
101. Kern TS, Li G, Tang J, Yunpeng D, Du Y, Lee CA. Beneficial effects of RAGE-Ig fusion protein on early diabetic retinopathy and tactile allodynia. *Diabetes* 2010;59(1):1004A.
102. Kim CH, Park HJ, Park JY, Hong SK, Yoon YH, Lee KU. High serum lipoprotein(a) levels in Korean type 2 diabetic patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 1998;21(12):2149-51.
103. Kim K, Kim SJ, Yu HG, Yu J, Park KS, Jang IJ, Kim Y. Verification of biomarkers for diabetic retinopathy by multiple reaction monitoring. *J Proteome Res* 2010;9(2):689-99.
104. Kim SH, Das K, Noreen S, Coffman F, Hameed M. Prognostic implications of immunohistochemically detected YKL-40 expression in breast cancer. *World J Surg Oncol* 2007;5:17.
105. Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Barth TF, Drägen D, Skurk T, Hauner H, Blüher M, Unger T, Wolf AM, Knippschild U, Hombach V, Marx N. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: A primary event in adipose tissue inflammation and development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1304-10.
106. Kisilevsky M, Madrimae A, Slessarev M, Han J, Fisher J, Hudson C. Retinal arteriolar and middle cerebral artery responses to combined hyperbaric/hyperoxic stimuli. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(12):5503-5.

107. Kitada M, Zhang Z, Mima K, King L G. Molecular mechanisms of diabetic vascular complications. *J Diab Invest* 2010;3(1):77-87.
108. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years, The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy III. *Arch Ophthalmol* 1984;102:527-32.
109. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. XIV Ten-year incidence and progression of diabetic retinopathy, the Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1994;112:1217-28.
110. Klein R, Klein BE, Moss SE, Wong TY. Retinal vessel caliber and microvascular and macrovascular disease in type 2 diabetes: XXI: The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Ophthalmol* 2007;114;10:1884-92.
111. Klein RL, Hunter SJ, Jenkins AJ, Zheng D, Semler AJ, Clore J, Garvey WT; DCCT/ECIC STUDY GROUP. Fibrinogen is a marker for nephropathy and peripheral vascular disease in type 1 diabetes: studies of plasma fibrinogen and fibrinogen gene polymorphism in the DCCT/EDIC cohort. *Diabetes Care* 2003;26:1439-48.
112. Klein R, Klein BE, Knudtson MD, Wong TY, Tsai MY. Are inflammatory factors related to retinal vessel caliber? The Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 2006;124:87-94.
113. Klein BE, Klein R, McBride PE, Cruickshanks KJ, Palta M, Knudtson MD, Moss SE, Reinke JO. Cardiovascular disease, mortality, and retinal microvascular characteristics in type 1 diabetes Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Arch Intern Med* 2004;164:1917-24.
114. Klipatrak EC, Rigby AS, Atkin S.L. Variability in the relationship between mean plasma glucose and HbA1c: implications for the assessment of glycemic control. *Clin Chem* 2007;53(5):897-901.
115. Kohen EM, Henkid P. Corelation of fluorescein angiogram and retinal digest in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1970;69;403-14.
116. Koraćević D, Bjelaković V, Đorđević V, Nikolić J, Pavlović D, Kocić G. Biohemija. Savremena administracija, Beograd, 1996.
117. Kozakova M, Sarafian VS. YKL-40- a novel biomarker in clinical practice? *Folia Med* 2009; 1:5-13.
118. Krady JK, Basu A, Allen CM, Xu Y, LaNoue KF, Gardner TW, Levison SW. Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy. *Diabetes* 2005;54:1559-65.
119. Kugiyama K, Sakamoto T, Musumi I, Sugiyama S, Ohgushi M, Ogawa H, Horiguchi M, Yasue H. Transferrable lipids in oxidized LDL stimulate PAI-1 and inhibit PA release from endothelial cells. *Circ Res* 1993;73:335-43.
120. Kumar S, Panda S, Mangaraj M, Mandal MK, Mahapatra PC. Plasma MDA and antioxidant vitamins in diabetic retinopathy. *Indian J Clin Biochem* 2008;32(2):158-62.
121. Larsen M, Colmorn LB, Bønnelycke M, Kaaja R, Immonen I, Sander B, Loukovaara S. Retinal artery and vein diameters during pregnancy in diabetic women. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:709-13.
122. Leal EC, Martins J, Voabil P, Liberal J, Chiavaroli C, Bauer J, Cunha-Vaz J, Ambrósio AF. Calcium deisilate inhibits the alteration in tight junction proteins and leukocyte adhesion to retinal endothelial cells induced by diabetes. *Diabetes* 2010;59:2637-45.
123. Le Duc Son, Miles R, Savage PJ, Cornell E, Tracy R, Klawner W C, Krakoff J. The association of plasma fibrinogen concentration with diabetic microvascular complication in young adults with early-onset of type 2 diabetes. *Diabet Res And Clin Pract* 2008;82:317-23.
124. Lee JH, Lee W, Kwon OH, Kim JH, Kwon OW, Kim KH, Lim JB. Cytokine profile of peripheral blood in type 2 diabetes mellitus patients with diabetic retinopathy. *Ann Clin Lab Sci* 2008; 38(4):361-7.
125. Lemieux I, Pascot A, Prud'homme D, Alméras N, Bogaty P, Nadeau A, Bergeron J, Després JP. Elevated C-reactive protein: Another component of the atherothrombotic profile of abdominal obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:961-7.
126. Leung H, Wang JJ, Rochtchina E, Wong TY, Klein R, Mitchel P. Dyslipidaemia and microvascular disease in the retina. *Eye* 2005;19:861-8.

127. Li J, Wang JJ, Yu Q, Wang M, Zhang SX. Endoplasmatic reticulum stress is implicated in retinal inflammation and diabetic retinopathy. *FEBS J* 2009;583(9):1521-7.
128. Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J* 2010;74:213-20.
129. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005;111:3481-8.
130. Lim LS, Tai ES, Mitchell P, Wang JJ, Tay WT, Lamoureux E, Wong TY. C-reactive protein, body mass index, and diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(9):4458-63.
131. Liew G, Gillies M, Wang JJ. Fenofibrate and diabetic retinopathy. *Lancet* 2008; 371:721.
132. Lippi G, Favaloro EJ, Montagnana M, Franchini M. C-reactive protein and venous thromboembolism: causal or casual association? *Clin Chem Lab Med* 2010;48(12):1693-701.
133. Lipsey MW, Wilson DB. (eds.). Practical meta-analysis. SAGE Publications, London, 2001.
134. Lyons TJ, Jenkins AJ, Zheng D, Lackland DT, McGee D, Garvey WT, Klein RL. Diabetic retinopathy and serum lipoprotein subclasses in the DCCT/EDIC cohort. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:910-18.
135. Massaki M, Manforo RC, Martinis C. Association between body fat, inflammation and oxidative stress in hemodialysis. *J Bras Nefrol* 2010;32(1):9-15.
136. Marsche G, Frank S, Hrzenjak A, Holzer M, Dirnberger S, Wadsack C, Scharnagl H, Stojakovic T, Heinemann A, Oettl K. Plasma-advanced oxidation protein products are potent high-density lipoprotein receptor antagonists in vivo. *Circ Res* 2009;104:750-7.
137. Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Tuñón J, Muñoz-García B, Madrigal-Matute J, Moreno JA, Vega de Céniga M, Egido J. Biomarkers in cardiovascular medicine. *Rev Esp Cardiol* 2009;62(6):677-88.
138. Matsuoka M, Ogata N, Minamino K, Matsumura M. Leukostasis and pigment epithelium-derived factor in rat models of diabetic retinopathy. *Molecular Vision* 2007;13:1058-68.
139. McCarter RJ, Hempe JM, Chalew SA. Mean blood glucose and biological variation have greater influence on HbA1c levels than glucose instability. *Diabetes Care* 2006;29(2):352-5.
140. McLeod DS, Lefer DJ, Merges C, Luty GA. Enhanced Expression of intracellular adhesion molecule-1 and P-selectin in diabetic human retina and choroid. *Am J Pathol* 1995;147(3):642-53.
141. Michaelson IC. The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal disorders. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1948; 68:137-80.
142. Mitchell P, Leung H, Wang JJ, Rochtchina E, Lee A, Wong TY, Klein R. Retinal vessel diameter and open-angle glaucoma: The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 2005;112(2):245-50.
143. Mocan MC, Kadayifcilar S, Elem B. Elevated intravitreal interleukin -6 in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Can Ophthalmol* 2006;41:747-52.
144. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol JP, Colette C. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA* 2006;295:1681-7.
145. Mohamed Q, Gillies MC, Wong T. Management of diabetic retinopathy: a systemic review. *JAMA* 2007;298:902-16.
146. Moore TC, Moore JE, Kaji Y, Frizzell N, Usui T, Poulaki V, Campbell IL, Stitt AW, Gardiner TA, Archer DB, Adamis AP. The role of advanced glycation end products in retinal microvascular leukostasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4457-64.
147. Moura RD, Vasconcelos DF, Freitas E, Moura FJ, Rosa TT, Veiga JP. Cystatin C, CRP, log TG/HDLc and metabolic syndrome are associated with microalbuminuria in hypertension. *Arq Bras Cardiol* 2013;pii:S0066-782X2013005000096.
148. Mzsliewicz M, Bascerska A, Zorena K, Mzsliewicz J, Lipowska P, Raczynska K. The role of vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor α I interleukin-6 in pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diab Res and Clin Pract* 2008;79:141-6.
149. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje dijabetes mellitusa. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije, 2012; drugo dopunjeno izdanje.

150. Nagaoka T, Kuo L, Ren Y, Yoshida A, Hein T. C-reactive protein inhibits endothelium dependent nitric oxide-mediated dilatation of retinal arterioles via enhanced superoxide production. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(5):2052-60.
151. Navab M, Anathaaramaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Folgeman AM. HDL as biomarker, potential therapeutic target and therapy. *Diabetes* 2009;58:2711-17.
152. Navaratna D, McGuire PG. Proteolytic degradation of VE-cadherin alters the blood-retinal barrier in diabetes. *Diabetes* 2007;56:2380-7.
153. Navaratna D, Menicucci G. A peptide inhibitor of the uPA/uPAR system inhibits alteration of the blood-retinal barrier in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:E abstract 4025.
154. Ng ZX, Chua KH, Iqbal T, Kuppusamy UR. Soluble Receptor for Advanced Glycation End-Product (sRAGE)/Pentosidine Ratio: A Potential Risk Factor Determinant for Type 2 Diabetic Retinopathy. *Int J Mol Sci* 2013, 14, 7480-7491; doi:10.3390/ijms14047480
155. Nielsen AR, Erikstrup C, Johansen JS, Fischer CP, Plomgaard P, Krogh-Madsen R, Taudorf S, Lindegaard B, Pedersen BK. Plasma YKL-40 a BMI-independent marker of type 2 diabetes. *Diabetes* 2008;57:3078-82.
156. Nguyen QD, Tatlipinar S. Vascular endothelial growth factor is a critical stimulus for diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol* 2006;142:961-9.
157. Obrosova IG, Pacher P. Aldose reductase inhibition counteracts oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in tissue sites for diabetes complications. *Diabetes* 2005;54:234-42.
158. Oda E. CRP may be superior to anthropometric markers of obesity. *Circ J* 2007;71:1332.
159. Orsan G, Plutzky J. The pathological continuum of diabetic vascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:35-42.
160. Pachydaki SI, Tari SR, Lee SE. Upregulation of RAGE and its ligands in proliferative retinal disease. *Exp Eye Res* 2006;82:807-15.
161. Paresch D. Effects of antidiabetic and antihyperlipidemic agents on C-reactive protein. *Mayo Clin Proc* 2008;83(3):333-42.
162. PKC-DRS Study Group. The effect of ruboxistaurin on visual loss in patients with moderately severe to very severe nonproliferative diabetic retinopathy: initial results of the Protein Kinase C beta Inhibitor Diabetic Retinopathy Study (PKC-DRS) multicenter randomized clinical trial. *Diabetes* 2005;54(7):2188-97.
163. Penn JS, Madan A, Caldwell RB, Bartoli M, Caldwell RW, Hartnelt ME. Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Progr Ret Eye Res* 2008;27:331-72.
164. Perrin RM, Konopatskaya O. Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetol* 2005;48:2422-7.
165. Petrovic MG, Korosec P, Kosnik M, Hawlina M. Vitreous levels of interleukin-8 in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2007;143(1):175-6.
166. Pfister F, Feng Y, vom Hagen F, Hoffmann S, Molema G, Hillebrands JL, Shani M, Deutsch U, Hammes HP. Pericyte migration: a novel mechanism of pericyte loss in experimental diabetic retinopathy. *Diabetes* 2008;57:2495-502.
167. Rakic JM, Lambert V, Deprez M, Foidart JM, Noe A, Munaut C. Estrogens reduce the expression of YKL-40 in the retina: Implications for eye and joint disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(4):1740-6.
168. Rathcke CN, Vistergaard H. YKL-40, a new inflammatory marker with relation to insulin resistance and with a role in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Inflamm Res* 2006; 55:221-7.
169. Rathcke CN, Holmkvist J, Jørgensen T, Borch-Johnsen K, Hansen T, Pedersen OB, Vistergaard H. Variation in CHI3LI in relation to type 2 diabetes and related quantitative traits. *PLoS One* 2009;4(5):e5469.
170. Rathcke CN, Ilan R, Kristop C, Hildenbrandt P, Faber J, Vistergaard H. Low grade inflammation as measured with YKL-40: Association with increased overall and cardiovascular mortality rate in an older population. *Inter J Cardiology* 2009;7:1-8.

171. Rathcke CN, Presson F, Tarnow L, Rossing P, Vestergaard H. YKL-40, a marker of inflammation and endothelial dysfunction, is elevated in patients with type 1 diabetes and increases with levels of albuminuria. **Diabetes Care** 2009;32:323-8.
172. Registar za dijabetes u Srbiji Izveštaj br. 5 Incidencija i mortalitet od dijabetesa u Srbiji. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”, 2007.
173. Registar za dijabetes u Srbiji Izveštaj br. 5 Incidencija i mortalitet od dijabetesa u Srbiji. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”, 2010.
174. Riberio ML, Figuera J, Cunha-Vaz J. Management of diabetic retinopathy. **Ophthalmol Inter** 2011;6(2):38-43.
175. Ringshot M, Hogdal EVS, Johansen SJ, Price PA, Christensen LH. YKL-40 protein expression in normal adult humane tissue-an immunohistochemical study. **J Mol Hist** 2007;38:33-4.
176. Rizvi AA. Inflammation markers as mediators of vasculo-endothelial dysfunction and atherosclerosis in the metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Chin Med J** 2007;120:1918-24.
177. Roberts CK, Ng K, Hama S, Eliseo AJ, Barnard RJ. Effect of short-term diet and exercise intervention on inflammatory/anti-inflammatory properties of HDL in overweight/obese men with cardiovascular risk factors. **J App Physiol** 2006;101:1727-32.
178. Roh SW, Weitter JJ. Retinal and choroidal circulation. U Yanoff M, Duker JS. ed. Ophthalmology. 2nd edition Mosby, 2004:771-7.
179. Romeo G, Liu WH, Asnaghi V, Kern TS, Lorenzi M. Activation of nuclear factor- κ B induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes. **Diabetes** 2002;51:2241-8.
180. Rosalind A, Johansen JS. YKL-40 a novel marker shared by chronic inflammation and oncogenic transformation. **Inflamm Canc** 2009;511:156-9.
181. Roslind A, Johansen JS, Junker N, Nielsen DL, Dzaferi H, Price PA, Balslev E. YKL-40 expression in benign and malignant lesions of the breast: A methodological study. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2007;15:371-379.
182. Ruiz de Almodovar C, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P. Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. **Physiol Rev** 2009; 89:607-48.
183. Salman GA, Mansour DEAA, Swelem AHA, Al-Zawehary WMAR, Radwan AA. Pentosidine a new biochemical marker in diabetic retinopathy. **Ophthalmic Res** 2009;42:96-8.
184. Sapieha P, Hamel D, Shao Z, Rivera JC, Zaniolo K, Joyal JS, Chemtob S. Proliferative retinopathies: Angiogenesis that blinds. **Int J Biochem Cell Biol** 2010;42:5-12.
185. Sattar N, Hingorani AD. C-Reactive protein and prognosis in diabetes: getting to the heart of the matter. **Diabetes** 2009;58:798-9.
186. Sattar N. Biomarkers for diabetes prediction, pathogenesis or pharmacotherapy guidance? Past, present and future possibilities. **Diabet Med** 2012;29:5-13.
187. Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk CG, Fuller JH, Stehouwer CD. Markers of inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes: EURODIAB Prospective Complications Study. **Diabetologia** 2005; 48:370-8.
188. Schubert HD. Structure and function of the neural retina. In Yanoff M, Duker JS. ed. Ophthalmology. 2nd ed. Mosby, 2004:771-8.
189. Schneider HJ, Friedrich N, Klotsche J, Pieper L, Nauck M, John U, Dörr M, Felix S, Lehnert H, Pittrow D, Silber S, Völzke H, Stalla GK, Wallaschofski H, Wittchen HU. The predictive value of different measures of obesity for incident cardiovascular events and mortality. **J Clin Endocrinol Metabol** 2010; 95(4):1177-85.
190. Silva KC, Rosales MAB, Biswas SK, Lopes de Faria JB, Lopes de Faria JM. Diabetic retinal neurodegeneration is associated with mitochondrial oxidative stress and is improved by an angiotensin receptor blocker in a model combining hypertension and diabetes. **Diabetes** 2009;58 (6):1382-90.
191. Singh SK, Singh MK, Singh S, Singh TB, Singh S. Lipoprotein(a) and diabetic retinopathy. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews** 2009;3:149-51.
192. Shackelton LM, Mann DM, Mills AJT. Identification of a 38-k Da heparin-binding glycoprotein (gp38k) in differentiating vascular smooth muscle cells as a member of a group of proteins associated with tissue remodeling. **J Biol Chem** 1995;270:13076-83.

193. Soedamah-Muthu SS, Chaturvedi N, Teerlink T, Idzior-Walus B, Fuller JH, Stehouwer CD; Eurodiab Prospective Complications Study Group. Plasma homocysteine and microvascular and macrovascular complications in type 1 diabetes: a cross-sectional nested case-control study, Eurodiab Prospective Complications Study Group. *J Intern Med* 2005;258:450-9.
194. Song W, Barth JL, Yu Y, Lu K, Dashti A, Huang Y, Gittinger CK, Argraves WS, Lyons TJ. Effects of oxidized and glycated LDL on gene expression in human retinal capillary pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(8):2974-82.
195. Spijkerman AM, Gall MA, Tarnow L, Twisk JW, Lauritzen E, Lund-Andersen H, Emeis J, Parving HH, Stehouwer CD. Endothelial dysfunction and Low-grade inflammation and the progression of retinopathy in type 2 diabetes. *Diabet Med* 2007;24(9):969-76.
196. Stalmans I, Ng YS, Rohan R, Fruttiger M, Bouché A, Yuce A, Fujisawa H, Hermans B, Shani M, Jansen S, Hicklin D, Anderson DJ, Gardiner T, Hammes HP, Moons L, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P, D'Amore PA. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest* 2002;109:327-36.
197. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR. Association of glycaemia with microvascular and macrovascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): Prospective Observational Study. *BMJ* 2000;321(7258):405-12.
198. Stefansson E. Ocular oxygenation and the treatment of diabetic retinopathy. *Surv Ophthalmol* 2006;51:364-80.
199. Stettler C, Witt N, Tapp RJ, Thom S, Allemann S, Tillin T, Stanton A, O'Brien E, Poulter N, Gallimore JR, Hughes AD, Chaturvedi N. Serum Amyloid A, C-reactive protein, and retinal microvascular changes in hypertensive diabetic and nondiabetic individuals. An Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT) substudy. *Diabetes Care* 2009;32(6):1098-100.
200. Stolba U. Diabetic retinopathy - pathogenesis and treatment lectures open medical institut of the AAF and Weill Cornell Medical College April 20-26,2008 Schloss Arenberg, Salzburg, Austria.
201. Streja D, Cressey P, Rabkin SW. Association between inflammatory markers, traditional risk factors, and complications in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diab Compl* 2003;17:120-7.
202. Sugimoto M, Sasoh M, Ido M, Wakitani Y, Takahashi C, Uji Y. Detection of early diabetic change with optical coherence tomography in type 2 diabetes mellitus patients without retinopathy. *Ophthalmologica* 2005; 219:379-385.
203. Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, Murtoimäki A, Suchting S, Wirzenius M, Waltari M, Hellström M, Schomber T, Peltonen R, Freitas C, Duarte A, Isoniemi H, Laakkonen P, Christofori G, Ylä-Herttuala S, Shibuya M, Pytowski B, Eichmann A, Betsholtz C, Alitalo K. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* 2008;454(7204):656-60.
204. Tapp RJ, Shaw JE, Harper CA, de Courten MP, Balkau B, McCarty DJ, Taylor HR, Welborn TA, Zimmet PZ; AusDiab Study Group. The prevalence of and factors associated with diabetic retinopathy in the Australian population. *Diabetes Care* 2003;26(6):1731-7.
205. The ACCORD Study Group and ACCORD Eye Study Group. effect of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *N Engl Med* 2010;363(3):233-44.
206. Tikhonenko M, Lydic TA, Wang Y, Chen W, Opreanu M, Sochacki A, McSorley KM, Renis RL, Kern T, Jump DB, Reid GE, Busik JV. Remodeling of retinal fatty acids in an animal model of diabetes: a decrease in long-chain polyunsaturated fatty acids is associated with a decrease in fatty acid elongases Elovl2 and Elovl4. *Diabetes* 2010;59(1):219-27.
207. Tharnalley PJ, Kempler P. Complications of Diabetes Mellitus: pathophysiology and pathogenetically-based treatment options. International expert workshop. Thieme, Rome, 2008, Italy.
208. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM, Yancopoulos GD. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 2000;6:460-3.
209. Trujillo ME, Scherer PE. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev* 2006;27:762-78.

210. van Hecke MV, Dekker JM, Nijpels G, Moll AC, Heine RJ, Bouter LM, Polak BC, Stehouwer CD. Inflammation and endothelial dysfunction are associated with retinopathy: the Hoorn Study. *Diabetologia* 2005;48:1300-6.
211. van Schalkwijk D, van Ommen B, Freidig AP, der Greef J, der Greef AA. Diagnostic markers based on a computational model of lipoprotein metabolism *J Clin Bioinform* 2011;1:29.
212. Virella L, Lopes-Virella M. The pathogenic role of the adaptive immune response to modified LDL in diabetes. *Front Endocr* 2012;3(76):1-6.
213. Williams PT, Zhao XQ, Marcovina SM, Brown BG, Krauss RM. Levels of cholesterol in small LDL particles predict atherosclerosis progression and incidental CHD in the HDL-atherosclerosis treatment study (HATS). *PLoS One* 2013;8(2):e56782.
214. Winsconsin epidemiologic study of diabetes the relation of markers of inflammation and endothelial dysfunction to the prevalence and progression of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 2009;127(9):1175-82.
215. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996;49:1304-5.
216. Wong TY, Kamineni A, Klein R, Sharrett AR, Klein BE, Siscovick DS, Cushman M, Duncan BB. Quantitative retinal venular caliber and risk of cardiovascular disease in older persons. The cardiovascular health study. *Arch Intern Med* 2006;166: 2388-94.
217. Wong TY, Klein R, Islam FM, Cotch MF, Folsom AR, Klein BE, Sharrett AR, Shea S. Diabetic retinopathy in a multi-ethnic cohort in the United States. *Am J Ophthalmol* 2006;141(3): 446-55.
218. Wong TY, Islam FM, Klein R, Klein BE, Cotch MF, Castro C, Sharrett AR, Shahar E. Retinal vascular caliber, cardiovascular risk factors, and inflammation: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:2341-50.
219. Wong TY, Duncan BB, Golden SH, Klein R. Association between the metabolic syndrome and retinal microvascular signs: the atherosclerosis risk in communities study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2949-54.
220. Wong TY, Klein R, Sharrett AR, Schmidt MI, Pankow JS, Couper DJ, Klein BE, Hubbard LD, Duncan BB; ARIC Investigators. Retinal arteriolar narrowing and risk of diabetes mellitus in middle-aged persons. *JAMA* 2002;287:2528-33.
221. Wong TY, Shankar A, Klein R, Klein BE. Retinal vessel diameters and the incidence of gross proteinuria and renal insufficiency in people with type 1 diabetes. *Diabetes* 2004;53:179-84.
222. Wong TY, Shankar A, Klein R, Klein BE, Hubbard LD. Retinal arteriolar narrowing, hypertension, and subsequent risk of diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 2005;165:1060-5.
223. Wong TY, Klein R, Sharrett AR, Duncan BB, Couper DJ, Klein BE, Hubbard LD, Nieto FJ; Atherosclerosis Risk in Communities Study. Retinal arteriolar diameter and risk for hypertension. *Ann Intern Med* 2004;140(4):248-55.
224. Woo SJ, Ahn JS, Ahn J, Park HK, LK. Elevated systemic neutrophil count in diabetic retinopathy and diabetes: a hospital-based cross-sectional study of 30,793 Korean subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:7697-703.
225. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407:242-8.
226. Yao D, Taguchi T, Matsumura T, Pestell R, Edelstein D, Giardino I, Suske G, Rabbani N, Thornalley PJ, Sarthy VP, Hammes HP, Brownlee M. High glucose increases angiopoietin-2 transcription in microvascular endothelial cells through methylglyoxal modification of mSin3A. *J Biol Chem* 2007;282:31038-45.
227. Yeung DC, Xu A, Tso AW, Chow WS, Wat NM, Fong CH, Tam S, Sham PC, Lam KS. Circulating levels of adipocyte and epidermal fatty acid-binding proteins in relation to nephropathy staging and macrovascular complications in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2009;32(1): 132-4.
228. Yin K, Liao D, Tang C. ATP-Binding Membrane Cassette Transporter A1(ABCA1): A possible link between inflammation and reverse cholesterol transport. *Mol Med* 2010;9-10:438-49.

229. Yoshimura T, Sonoda KH, Sugahara M, Mochizuki Y, Enaida H, Oshima Y, Ueno A, Hata Y, Yoshida H, Ishibashi T. Comprehensive analysis of inflammatory immune mediators in vitreo-retinal diseases. *PLoS One* 2009;4(12):e8158.
230. Zeyda M, Stulnig MT. Obesity, Inflammation, and insulin resistance-a mini-review. *Gerontology* 2009;55:379-86.
231. Zhang W, Lui H, Rojas M, Cadwell RW, Cadwell RB. Anti-inflammatory therapy for diabetic retinopathy. *Immunotherapy* 2011;3(5):609-28.
232. Zhang SX, Wang JJ, Gao G, Shao C, Mott R, Ma JX. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous antiinflammatory factor. *FASEB J* 2006;20(2):323-5.
233. Zhang SX, Wang JJ, Gao G, Parke K, Ma JX. Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. *J Mol Endocrinol* 2006;37(1):1-12.
234. Zheng L, Szabó C, Kern TS. Poly(ADP-ribose) polymerase is involved in the development of diabetic retinopathy via regulation of nuclear factor- κ B. *Diabetes* 2004;53:2960-7.
235. Qaum T, Xu Q, Joussen AM, Clemens MW, Qin W, Miyamoto K, Hassessian H, Wiegand SJ, Rudge J, Yancopoulos GD, Adamis AP. VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(10):2408-13.
236. Qu L, Rifai N, Hu FB. Interleukin -6 receptor gene, plasma c-reactive protein and diabetes risk in women. *Diabetes* 2009;58:275-8.

BIOGRAFIJA

Cekić dr Sonja rođena je 06.08.1973.godine u Nišu. Osnovnu i srednju medicinsku školu u Nišu završila je sa odličnim uspehom i dobitnik je diplome “Vuk Karadžić”.

Medicinski fakultet u Nišu upisala je školske 1992/93.godine, a diplomirala 1998. godine sa prosečnom ocenom 10,00 i odbranjenim diplomskim radom ”Konatalne infekcije” na predmetu Infektologija sa ocenom 10,00. U toku studija radila je kao demonstrator na predmetu Anatomija i Patološka Anatomija. Na prvoj i drugoj godini studija dobitnik je Povelje za najbolji postignut uspeh Univerziteta u Nišu. Tokom studija učestvovala je na većem broju kongresa studenata medicine u zemlji i inostranstvu i dobitnik je stipendije grada Niša i Ministarstva za nauku i tehnologiju. Učestvovala na projektu - Morfologija i patogeneza hipotalamusne gojaznosti - eksperimentalna studija - EV.BR.13M17(pp13), rukovodilac projekta Prof.dr V.Katić.

Nakon obavljenog lekarskog staža položila je stručni ispit januara 2000 godine u Beogradu. Od 05.04.2001. godine nalazi se na Očnoj klinici u Nišu primljena preko akcije tržišta rada u Nišu za zapošljavanje diplomiranih studenata sa visokim prosekom u radni odnos na određeno vreme kao lekar na volonterskoj specijalizaciji, a potom akcijom Ministarstva za zdravlje Republike Srbije prevedena u stalni radni odnos.

Magistarske studije iz oftalmologije upisala je školske 1999/2000 godine. Magistarsku tezu pod nazivom “Faktori rizika za nastanak staračke katarakte”, odbranila je 09.05.2006. god. na Medicinskom fakultetu u Nišu.

Specijalizaciju iz oftalmologije položila je 02.11.2006. godine sa odličnom ocenom.

Usavršavanje iz oblasti Vaskularne bolesti retine i dijabetes melitus u trajanju od jednog meseca završila je na “Institutu za očne bolesti” prof dr Djordje Nešić, na odeljenju *Medical retina* pod mentorstvom Prof dr Svetislav Milenković.

Školu ultrazvuka u oftalmologiji, održanu u Beogradu završila je 2007.godine.

Cekić dr Sonja dobitnik je stipendije Evropskog Udruženja Oftalmologa za 2007. godinu koju realizuje na Klinik und Poliklinik fuer Augenheilkunde, Inselspital, Bern, Švajcarska, iz oblasti *Medical retina and retinal imaging*, pod mentorstvom prof dr dr Sebastian Wolf.

Poseduje sertifikat o položenoj LOCS III classification sistemu, sa Harvard Medical School Center for Ophthalmic Research Brigham and Women s Hospital.

Učesnik je XIV Kongresa oftalmologa Jugoslavije u Beogradu 2001 godine, VIII Kongresa oftalmologa Srbije održanom u Beogradu od 28.09.-01.10.2004.godine, WET LAB,

Belgrade od 14.-17. Decembra 2004. godine, učestvovala je u radu sekcije SLD-a održanog u Sokobanji dana 20.05.2005. godine, 2004 godine XIII Congress European Society of Ophthalmology June 3-7, 2001, Istanbul, Kongres oftalmologa Srbije sa međunarodnim učešćem 2007. godine održanom u Beogradu i Congress of European Ophthalmology Vienna 2007. Učesnik je kongresa Oftalmologa Srbije sa međunarodnim učešćem 2008, 2009, 2010, 2011 i 2012 godine. Učesnik je Kongresa oftalmologa BiH, održanog u Banja Luci 2012 godine sa usmenom prezentacijom rada Kongenitalne anomalije optičkog diska. Cekić dr Sonja je učesnik Beogradskog oftalmološkog simpozijuma 2012 godine, Kongresa EURETINA 2012, Milano, Italija. Učestvovala je na 32 Balkanskoj medicinskoj nedelji, u organizaciji Balkanske medicinske unije i Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Nišu održane 21-23.9.2012. na Univerzitetu u Nišu i usmeno prezentovala radove Diabetic papillopathy- report of three cases i Retinal vascular occlusive disorders and Metabolic Syndrome.

Predavač je na kliničkim seminarima Klinike za očne bolesti u Nišu sa temama: Bakterijski konjunktivitisi, Orbitalni tumori u dece, Endokrina orbitopatija, Okluzivne bolesti venskih krvnih sudova retine.

Učesnik je Weill Cornell Medical College Seminar of Ophthalmology 20-26. Aprila 2008. koji je uspešno završila.

Učesnik je memorijalnog simpozijuma Prof dr Sima Pavlović Novine u Vitreoretinalnoj Hirurgiji Maj, 2009 godine, i simpozijuma Multidisciplinarni pristup oftalmologiji 2012 godine.

Sonja Cekić ima završen kurs Indikacije i postoperativni tok vitreoretinalnih operacija.

Predavač je na skupu Savremeni principi lečenja, praćenja i kontrole pacijenata sa komplikacijama dijabetesa na zadnjem segmentu oka, predavanje Fluoresceinska angiografija u dijagnostici dijabetesne retinopatije, održane dana 02.03.2012. godine u sklopu KME pri Medicinskom fakultetu u Nišu u organizaciji SLD i Očne klinike KC Niš. Moderator stručnog sastanka na Klinici za očne bolesti u Nišu, u organizaciji Kliničkog Centra u Nišu i Klinike za očne bolesti, akreditovanog od strane zdravstvenog saveta u sklopu KME, sa temom Primena anti-VEGF terapije u oftalmologiji i predavač Primena anti-VEGF terapije u pacijenata sa dijabetesnom retinopatijom 2013. godine.

Cekić dr Sonja je zvanični reviewer časopisa American Journal of Ophthalmology, Retina i Ophthalmology i član uređivačkog odbora časopisa Acta Ophthalmologica, zvaničnog časopisa Udruženja oftalmologa Srbije. Član je Srpskog lekarskog društva, Udruženja oftalmologa Srbije, udruženja EVER i EURETINA.

Klinički asistent na predmetu Oftalmologija Medicinskog Fakulteta u Nišu je od 01.10.2012. godine do 27.08.2014 godine.

Učesnik je Winter meeting Euretina 2014. godine u Rimu.

Ukupan broj radova Cekić dr Sonje je 116, u celosti objavljenih 39, 13 na SCi list, i 77 štampanih u izvodu.



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, по насловом

**Морфометријска анализа промена на очном дну особа са дијабетесном ретинопатијом
и њихова корелација са биомаркерима инфламације**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни у целини, ни у деловима, није била предложена за добијање било које дипломе, према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, _____

Аутор дисертације: **Соња Цекић**

Потпис докторанда:

С. Цекић



Прилог 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: Соња Цекић

Студијски програм: Медицина

Наслов рада: Морфометријска анализа промена на очном дну особа са дијабетесном ретинопатијом и њихова корелација са биомаркерима инфламације

Ментор: Проф др Предраг Јовановић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____

Аутор дисертације: Соња Цекић

Потпис докторанда:

С. Цекић



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом :

Морфометријска анализа промена на очном дну особа са дијабетесном ретинопатијом и њихова корелација са биомаркерима инфламације

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство- некомерцијално
3. Ауторство- некомерцијално- без прераде
4. Ауторство- некомерцијално- делити под истим условима
5. Ауторство- без прераде
6. Ауторство- делити под истим условима

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, _____

Аутор дисертације: Соња Цекић

Потпис докторанда:

С. Цекић