

# Usporedba koncentracija interleukina 12 u očnoj vodici i serumu kod dijabetičara

---

**Gverović Antunica, Antonela**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2012**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:750981>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-26**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Antonela Gverović Antunica**

**USPOREDBA KONCENTRACIJA  
INTERLEUKINA 12 U OČNOJ VODICI I  
SERUMU KOD DIJABETIČARA**

**Doktorska disertacija**

**Split 2012.**

Klinički dio doktorske disertacije izrađen je u Općoj bolnici Dubrovnik, a laboratorijski dio u Centralnom laboratoriju KBC Split.

**Voditeljica rada je prof.dr.sc. Ksenija Karaman**

Rad je posvećen mojoj učiteljici oftalmologije i mentorici ovog rada prof.dr.sc. Kseniji Karaman. Hvala za svo preneseno znanje, vještine u oftalmologiji i pomoć u izradi ovog rada.

Zahvalnost dugujem prof.dr.sc. Vesni Buško i dr.sc. Ani Jerončić na stručnim savjetim pri obradi statističkih podataka, kao i Mariji Radin bacc.sestrinstva, Veliboru Puzoviću dr.med. i gđi. Adi Sapunar specijalisticu laboratorijske biokemije za veliku pomoć u prikupljanju, čuvanju i obradi uzoraka za izradu ovog rada.

Doc.dr.sc. Ivani Goić Barišić hvala za svaki savjet od samog početka.

Hvala prijateljima koji su uvijek bili oslonac i poticaj za dalje, naročito doc.dr.sc. Kaju Bućanu za uloženi trud u učenju laseriranja prije izrade ovog rada.

Gospođi Mariti Maričić Mimica hvala za ohrabrenje i osmijeh kad je bilo najteže. Suprugu Vedranu, djeci Mateu i Stijepu i roditeljima hvala za ljubav, strpljenje i potporu bez koje izrada ovog rada ne bi bila moguća.

Bogu hvala na svima i za sve!

# SADRŽAJ

## 1. UVOD

### 1.1. Šećerna bolest

1.1.1. Definicija	7
1.1.2. Epidemiologija	7
1.1.3. Klasifikacija	8

### 1.2. Šećerna bolest tipa 2

1.2.1. Definicija i epidemiologija	9
1.2.2. Etiologija i patogeneza	9
1.2.3. Klinička slika	10
1.2.4. Dijagnoza	11
1.2.5. Liječenje	12
1.2.6. Komplikacije	14

### 1.3. Dijabetična retinopatija

1.3.1. Anatomija i fiziologija krvnih žila mrežnice	15
1.3.1.2. Krvne žile mrežnice u zdravom oku	15
1.3.1.3. Krvne žile mrežnice u dijabetičnoj retinopatiji	17
1.3.2. Etiologija i epidemiologija	27
1.3.3. Patogeneza	31
1.3.4. Klinička slika	39
1.3.5. Dijagnoza	43
1.3.6. Liječenje	44
1.3.6.1. Laserska fotokoagulacija	44
1.3.6.2. Farmakološka sredstva	46
1.3.6.3. Vitrektomija	47

<b>1.4. Citokini</b>	47
1.4.1. Receptori	48
1.4.2. Interleukin 12	51
<b>2. CILJEVI I HIPOTEZE</b>	52
<b>3. METODE</b>	54
<b>4. REZULTATI</b>	59
<b>5. RASPRAVA</b>	84
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	93
<b>7. SAŽETAK</b>	95
<b>8. SUMMARY</b>	96
<b>9. LITERATURA</b>	97
<b>10. ŽIVOTOPIS</b>	115

## POPIS OZNAKA I KRATICA

ADA	-	Američka dijabetična udruga (engl. <i>American Diabetic Association</i> )
BMI	-	tjelesni indeks mase (engl. <i>body mass index</i> )
CRP	-	C reaktivni protein
DAG	-	diaglicerol
DM	-	šećerna bolest (lat. <i>diabetes mellitus</i> )
DR	-	dijabetična retinopatija
GUK	-	glukoza u krvi
HLA	-	glavni kompleks gena tkivne podudarnosti (engl. <i>human leukocyte antigen</i> )
IFN- $\gamma$	-	interferon gama
IL-4	-	interleukin 4
IL-6	-	interleukin 6
IL-10	-	interleukin 10
IL-12	-	interleukin 12
IL-13	-	interleukin 13
IL-23	-	interleukin 23
IRMA	-	intraretinalne mikrovaskularne abnormalnosti (engl. <i>intraretinal microvascular abnormality</i> )
JAK	-	Janus kinaza
kD	-	kilodalton
LF	-	laserska fotokoagulacija
NPDR	-	neproliferativna dijabetična retinopatija
OGTT	-	test oralne tolerancije glukoze
PDR	-	proliferativna dijabetična retinopatija
PKC	-	protein kinaza C

- RPE - retinalni pigmentni epitel
- STAT - prijenosnik signala i aktivator stanične transkripcije (engl. signal transducers and activators of transcription)
- TNF - čimbenik nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*)
- UKPDS - Britanska prospektivna dijabaetična studija (engl *United Kingdom Prospective Diabetes Study*)
- VEGF - vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)
- WHO - Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*)

# **1. UVOD**

## **1.1. ŠEĆERNA BOLEST**

### **1.1.1. Definicija**

Šećerna bolest - diabetes mellitus (DM) je višestruki metabolički poremećaj obilježen apsolutnim ili relativnim nedostatkom inzulina koji kao posljedicu ima povišenje glukoze u krvi (hiperglikemiju).

Pored poremećaja metabolizma ugljikohidrata, istovremeno postoji i poremećaj metabolizma masti i bjelančevina. To je kronična, neizlječiva bolest koja zahvaća sve dobne skupine i u stalnom je i progresivnom porastu.

### **1.1.2 Epidemiologija**

Dijabetes melitus je najraširenija među kroničnim bolestima, tako da danas poprima epidemijske razmjere. Procjenjuje se da u Europi ima 7,8% dijabetičara od 20-79 godina (1), a u Hrvatskoj 6,1 % u dobi od 18-65 godina (2).

Krajem prošlog stoljeća dijagnosticirano je 150 milijuna dijabetičara s prognozom da će ih za 20 godina biti 240 milijuna (1).



### **1.1.3 Klasifikacija**

Tek su 1979.g. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO - World Health Organisation) (3) i Međunarodna grupa za dijabetes (National Diabetes Data Group - NDDG) (4) predložile nove dijagnostičke kriterije za DM. To su bili prvi koraci u sređivanju do tada gotovo kaotične klasifikacije i nomenklature. Prvu šire prihvaćenu klasifikaciju DM objavila je WHO 1980. g. (3) i u izmjenjenom obliku 1985. g. (5).

Američka udruga za dijabetes (American Diabetes Association - ADA) 1997.g. predložila je etiološku klasifikaciju (6), koja se najčešće koristi, a DM dijeli na sljedeći način:

#### **a) DM tipa 1**

- autoimuni oblik
- idiopatski oblik

#### **b) DM tipa 2**

#### **c) ostali specifični tipovi dijabetesa**

- genetski defekt djelovanja inzulina
- genetski defekt beta - stanične funkcije
- DM uzrokovan kroničnim bolestima gušterače
- endokrinopatije
- DM uzrokovan lijekovima ili kemijskim spojevima
- DM uzrokovan upalama

- ostali nasljedni sindromi udruženi s DM
- DM u trudnoći

## **1.2. ŠEĆERNA BOLEST TIP 2**

### **1.2.1 Definicija i epidemiologija**

DM tipa 2 je karakteriziran smanjenim ili nedovoljnim lučenjem inzulina, inzulinskom rezistencijom, te pojačanom sintezom glukoze u jetri.

Javlja se u više od 90% osoba sa šećernom bolešću, uglavnom u odrasloj populaciji. U dobi iznad 40 godina učestalost raste, ali nažalost zbog nezdravog načina života, sve češće se javlja i u mlađih. DM tipa 2 postao je značajan problem, posebno u mladima u dobi između 10. i 19. godine života, i to ne samo u razvijenim zemljama, a zbog povećane pretilosti i u mlađoj populaciji.

U djece je donedavno bila dijagnosticirana isključivo šećerna bolest tipa 1, ali posljednjih desetak godina incidencija DM tipa 2 narasla je deseterostruko (7).

### **1.2.2. Etiologija i patogeneza**

Najčešće postoji dvostruki poremećaj: smanjenje broja inzulinskih receptora u stanicama i nemogućnost djelovanja inzulina u transportu glukoze u stanice (inzulinska rezistencija).

To je dijelom genetski poremećaj, te se spominju i određeni čimbenici koji mogu povećati rizik razvoja bolesti, a to su :

- gojaznost (80% osoba s DM tipa 2 su pretili)
- dob (iznad 40 godina učestalost raste)
- smanjena tolerancija na glukozu
- nedostatak tjelesne aktivnosti
- trudnoća
- stres

Rezultat navedenog je porast glukoze u krvi, a gušterača započinje lučiti veće količine inzulina kako bi pojačala ulazak glukoze u stanice. Vremenom se gušterača iscrpljuje i lučenje inzulina se smanjuje što dovodi do nastanka šećerne bolesti (8).

### **1.2.3. Klinička slika**

DM tipa 2 često ne bude dijagnosticiran dugo godina jer hiperglikemija nije tako teška da bi izazvala tipičnu kliničku sliku.

Simptomi bolesti u početku mogu biti sasvim blagi i javljaju se postupno, pa može proći i nekoliko godina do postavljanja dijagnoze. Oni mogu biti u obliku žeđi, učestalog mokrenja, pospanosti nakon obroka, pojačane gladi, preznojavanja, drhtanja, umjerenog gubitka na težini, češćih infekcija, smetnji vida i koncentracije. Dijagnoza se često postavi sasvim slučajno. U trenutku kliničkog otkrivanja bolest je najčešće prisutna 7 do 10 godina.

U toj fazi pacijent najčešće ima razvijene i druge rizične čimbenike: debljinu, hiperlipidemiju i hipertenziju (9).

U zadnje se vrijeme koristi naziv predijabetes, a opisuje se kao stanje između normalne glikemije i dijabetesa.

### 1.2.4. Dijagnoza

U većini europskih zemalja prihvaćene su referentne vrijednosti donje granice glukoze u krvi (GUK - a) natašte 6,1 mmol/L prema WHO, dok ADA predlaže donju granicu 5,6 mmol/L (10).

Provodi se takozvani "zlatni standard probiranja dijabetesa", tj. određuju se vrijednosti GUK - a natašte, u dva mjerenja, u različitim danima. Ukoliko se vrijednosti podudaraju isključuje se ili postavlja dijagnoza dijabetesa, a ako se ne podudaraju radi se test oralne tolerancije glukoze (OGTT), koji se sastoji u mjerenju razine GUK-a 120 minuta nakon oralnog opterećenja s 75 g glukoze u 250 mL vode (11).

Predložene vrijednosti u "zlatnom standardu" su sljedeće :

1. GUK natašte do 6,1 mmol/L je uredan nalaz
2. GUK natašte 6,1- 6,9 mmol/L je nalaz povećane glukoze natašte i potrebno je uraditi OGTT Ako je GUK nakon 120 minuta:
  - < 7,8 mmol/L nalaz je uredan i potrebna je kontrola za jednu godinu
  - 7,8 - 11,1 mmol/L oštećena je tolerancija glukoze – potreban je dijetni režim, povećanje tjelesne aktivnost i kontrola OGTT-a za jednu godinu
  - >11,1 mmol/L je šećerna bolest
3. GUK natašte > 7,0 mmol/L je šećerna bolest

Kategorije povećana glukoza natašte i oštećena tolerancija glukoze zahtijevaju intenzivan nadzor obiteljskog liječnika, a šećerna bolest liječenje.

### **1.2.5. Liječenje**

U liječenju DM tipa 2 koristi se više terapijskih postupaka koji mogu biti učinkoviti jedino uz samokontrolu oboljelog. Potrebna je promjena stila života. Kod trećine oboljelih od šećerne bolesti tipa 2 bolest se može kontrolirati samo dijetom i tjelovježbom, što se povoljno odražava na koncentraciju glukoze i krvni tlak. Ostali moraju uzimati lijekove kojima se stimulira izlučivanje preostalog inzulina ili povećava osjetljivost na inzulin, ali naposljetku zalihe prirodnog inzulina u gušterači, tj. Langerhansovim otočićima se iscrpe pa ga je potrebno nadomjestiti.

Preporuča se sljedeće:

#### **1. Dijeta**

Kod većine oboljelih dijeta je ključ u liječenju, ali je izuzetno teško provoditi. Nema jedinstvene dijeta koja bi odgovarala potrebama svih bolesnika, ali svi oboljeli od šećerne bolesti morali bi održavati sljedeće (12):

- koncentracije GUK- a natašte ispod 6,0 mmol/L
- normalne koncentracije lipida (kolesterola i triglicerida)
- krvni tlak oko 130/80 mm Hg

## 2. Tjelesna aktivnost

Vježbanjem se smanjuje koncentracija glukoze u krvi i povećava osjetljivost na inzulin. Smanjuje se i krvni tlak, masnoće u krvi, te rizik od oboljenja srca i krvnih žila. Redovito vježbanje, čak i umjerenog intenziteta, povećava osjetljivost na inzulin. Ipak oboljeli od DM moraju biti oprezni zbog opasnosti od "tihe" srčane bolesti - bez prijeteće boli (13), ozljeda stopala, pa prije pristupanja vježbanju treba konzultirati liječnika.

## 3. Lijekovi:

- a) sredstva za povećanje produkcije preostalog inzulina
- b) inzulin

Za razliku od šećerne bolesti tipa 1, bolesnici oboljeli od šećerne bolesti tipa 2 još uvijek produciraju nešto inzulina, iako ne dovoljno da bi se premostila rezistencija na inzulin, pa se bolesnicima koji trebaju lijekove, počinje sa sredstvima za povećanje produkcije preostalog inzulina ili osjetljivosti na inzulin, umjesto da im se inzulin izravno nadomjesti, kao što je to standardno kod šećerne bolesti tipa 1. Za početno liječenje preporučuju se preparati sulfonilureje i metformin (14). Na kraju terapija tabletama obično zataji, pa bolesnicima ipak treba dati inzulin (15).

## 1.2.6. Komplikacije

Kronične komplikacije šećerne bolesti podijeljene su na :

a) vaskularne

- retinopatija
- nefropatija
- koronarna arterijska bolest
- cerebrovaskularna bolest
- bolest perifernih krvnih žila

b) nevaskularne

- neuropatija

Unatoč brojnim studijama i patofiziološkim objašnjenjima točan mehanizam nastanka komplikacija u DM do danas nije jasan. Kao glavni čimbenici rizika spominju se trajanje bolesti i nivo glukoze u krvi.

Dvije velike studije „The Diabetes Control and Complication Trial“ (DCCT) (16,17) i „U.K. Prospective Diabetic Study“ (UKPDS) (18) su pokazale da je terapija šećerne bolesti i smanjenje nivoa glukoze u krvi važan čimbenik u smanjenju komplikacija. U tim studijama uspoređivani su pacijenti s provedenom intenzivnom terapijom DM i dobro reguliranim vrijednostima GUK- a s kontrolnom skupinom u kojoj je provedena terapija dijetom.

U prvoj skupini proteinurija je reducirana za 50%, neuropatija za 60% i usporena je progresija dijabetične retinopatije za 50 % (18).

Spominje se nekoliko biokemijskih teorija u nastanku komplikacija, kao što je povećano stvaranje i akumulacija sorbitola (19), krajnjih produkata glikozilacije i povišene koncentracije diaglicerola (20), ali točan mehanizam nastanka staničnog oštećenja kroničnom hiperglikemijom u potpunosti još nije razjašnjen (21).

## **1.3. DIJABETIČNA RETINOPATIJA**

### **1.3.1. Anatomija i fiziologija krvnih žila mrežnice**

#### **1.3.1.1. Krvne žile mrežnice u zdravom oku**

Unutarnje dvije trećine mrežnice imaju izravnu opskrbu krvlju i neovisne su o krvnim žilama žilnice (22). Četiri ogranka središnje mrežnične arterije, koja je prvi ogranak oftalmičke arterije, ogranka unutarnje karotidne arterije, opskrbljuju po jedan mrežnični kvadrant.

Arterije i vene su u sloju živčanih vlakana, a arteriole i venule prodiru u dublje slojeve tvoreći dvije mikrovaskularne mreže :

- površinsku mrežu u ganglijskim stanicama i sloju živčanih vlakana
- dublju mrežu koje čine gušće kapilare u unutarnjem nuklearnom sloju



Kapilarna mreža jedina je poveznica između arterijskog i venskog sustava retine, ali između kapilarnih bazena pojedinih arterijskih grana nema povezanosti. Protok krvi kroz mrežnicu u zdravom oku ostaje konstantan bez obzira na fluktuacije sistemskog i intraokularnog tlaka.

Zona bez kapilara nalazi se oko mrežničnih arterija i arteriola, vjerojatno kao posljedica visoke koncentracije kisika. Povećanjem udaljenosti od glavnog ogranka kapilarna mreža je gušća s ciljem održavanja konstantnog tlaka kisika.

Krvne žile mrežnice i optičkog diska imaju alfa adrenergične, beta adrenergične i kolinergične receptore, ali njihova uloga u vaskularnoj kontroli ostaje nejasna. Regulacija protoka krvi kroz mrežnicu odvija se unutar mikrookoliša (autoregulacija).

Autoregulacija zadržava konstantan protok krvi kroz mrežnicu unutar širokog spektra varijacija sistemskog i intraokularnog tlaka, iako perfuzija kroz središnju mrežničnu arteriju može biti osjetljiva na akutno povećanje intraokularnog tlaka (22). Autoregulacija ovisi o mnogim čimbenicima mikrookoliša, ali njihova kontrola u zdravom oku i u bolesnim stanjima ipak uglavnom je nejasna.

Endotel mrežničnih kapilara pruža strukturnu i fiziološku barijeru između intravaskularnog i ekstravaskularnog odjeljka (23- 25). Nefenestriran je, posjeduje čvrste spojeve i tvori veliki dio krvno-mrežnične barijere (26). Prostor između stanica održavaju prijanjajuće veze – kadherini koji su transmembranski adhezijski proteini ovisni o kalciju (27). Stanične adhezijske molekule, kao što su integrini (površinski glikoproteini povezani s unutarstaničnom citoskeletom), u interakciji su s drugim vrstama stanica uključujući pericite i ekstracelulari matriks (28). Tonus retinalnih krvnih žila ovisi o stupnju vazokonstrikcije na koju utječu glatkomišićne stanice i periciti (29).

Lumen mrežničnih kapilara je u promjeru 5 – 6 mikrona, a stijenka kapilare je građena od jednog sloja endotelnih stanica okruženih intramuralnim pericitima (22, 30).

Periciti reguliraju vaskularni tonus, mehanički podupiru stijenku krvne žile, proizvode ekstracelularni matriks, nositelji su fagocitoze, otpuštaju ekstracelularne komponente kao što su fibronektin, koji pruža čvrsto uporište za prijenos mehaničke sile tijekom konstrikcije kapilara, kontrahiraju se kao odgovor na endotelin-1, angiotenzin-2, hipoksiju i izloženost ugljičnom dioksidu i dušičnom oksidu (31, 32). Igraju strukturnu, kao i vazoregulacijsku ulogu, a što nam pokazuje povećana gustoća pericita u krvnim žilama izloženim hipertenziji, kao i povezanost gubitka pericita sa stvaranjem mikroaneurizama u dijabetičnoj retinopatiji.

Odnos pericita i endotelnih stanica u ljudskim retinalnim stanicama je 1:1.

### **1.3.1.2. Krvne žile mrežnice u dijabetičnoj retinopatiji**

#### **a) zadebljanje kapilarnih bazalnih membrana**

Poznate su četiri funkcije bazalne membrane:

- djelovanje kao "kostur" dajući strukturalnu čvrstoću krvnim žilama
- učinak kao filtracijska barijera za molekule različite veličine
- regulacija proliferacije i diferencijacije stanica
- mogućnost vezivanja različitih čimbenika rasta

Zadebljanje kapilaranih bazalnih membrana primijećeno je kod ljudi i životinja oboljelih od šećerne bolesti (33- 35). Biokemijska događanja koja uzrokuju ova zbivanja nisu poznata, niti je u potpunosti jasna patofiziologija i posljedice ovog zbivanja, ali nekoliko studija upućuje na ciklus sorbitola (36-38).

Nedijabetični štakori hranjeni u dužem periodu hranom bogatom galaktozom razvili su zadebljanje bazalne membrane kapilara mrežnice, dok životinje na kontroliranoj prehrani, ili prehrani s visokim dozama galaktoze zajedno sa sorbinilom, inhibitorom aldoza-reduktaze, nisu razvile abnormalnosti bazalne membrane (37).

Robinson i suradnici (39) su pokazali da se zadebljanje bazalne membrane može prevenirati u galaktozemičnim životinja korištenjem inhibitora aldoza-reduktaze, ali nije jasno kako djelovanje enzima ciklusa sorbitola, aldoza-reduktaza i sorbitol dehidrogenaza mogu utjecati na strukturu bazalnih membrana.

Suprotno tvrdnji da je zadebljanje bazalne membrane kapilara mrežnice kod dijabetičara i u galaktozemičnim životinja izravan rezultat aktivnosti ciklusa sorbitola je opažanje da u renalnim glomerulima dijabetičnih (40) i galaktozemičnih štakora (41) zadebljanje bazalne membrane koje je strukturno i imunokemijski slično onom koje se pojavljuje u mrežnici nije moguće prevenirati inhibitorima aldoza- reduktaze.

I ostali biokemijski mehanizmi bi mogli igrati ulogu u zadebljanju bazalne membrane. Kolagen bazalne membrane je obilno glikoziliran, a ta glikozilacija bi mogla biti kvalitativno ili kvantitativno promijenjena enzimskim ili neenzimskim procesima.

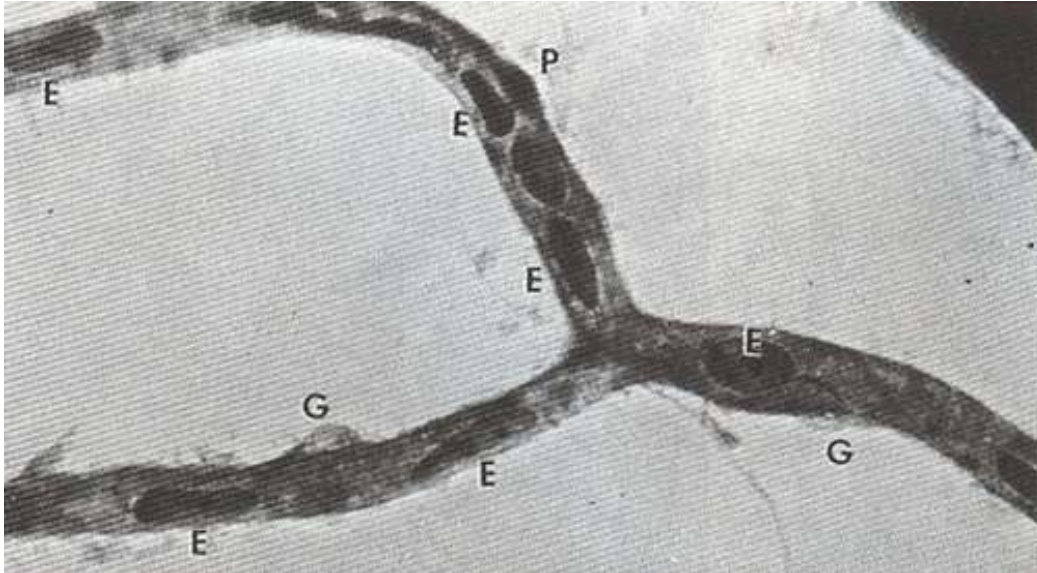
Bazalna membrana regulira proliferaciju i diferencijaciju stanica (42, 43). Nekoliko različitih vrsta stanica uzgajanih in vitro su puno više diferencirane morfologije kada rastu u kolagenim supstratima (44, 45).

Bazalna membrana ima mogućnost vezivanja različitih čimbenika rasta, koji su posebno aktivni u odnosu na endotelne stanice krvnih žila i mogu biti poticaj za neovaskularizaciju (37, 46, 47).

## **b) gubitak intramuralnih pericita**

Coguan, Kawabara i suradnici (48, 49) su prvi opisali gubitak pericita u ranoj fazi dijabetične retinopatije. Njihovi pronalasci potvrđeni su u brojnim znanstvenim radovima korištenjem svjetlosnog i elektronskog mikroskopa gdje je gubitak pericita prepoznat kao prikaz praznih baloniranih prostora koji su probijali sa strane kapilarnog zida (50- 52) (slika 1).

Mehanizam kojim se periciti gube rano u DR je nepoznat. Akagi i suradnici (53) su pretpostavili povezanost s djelovanjem ciklusa sorbitola, jer su pronašli aldoza-reduktazu specifično u pericitima mrežičnih kapilara, ali ne i u endotelnim stanicama ljudi, ali nisu potvrdili drugi istraživači (54, 55).



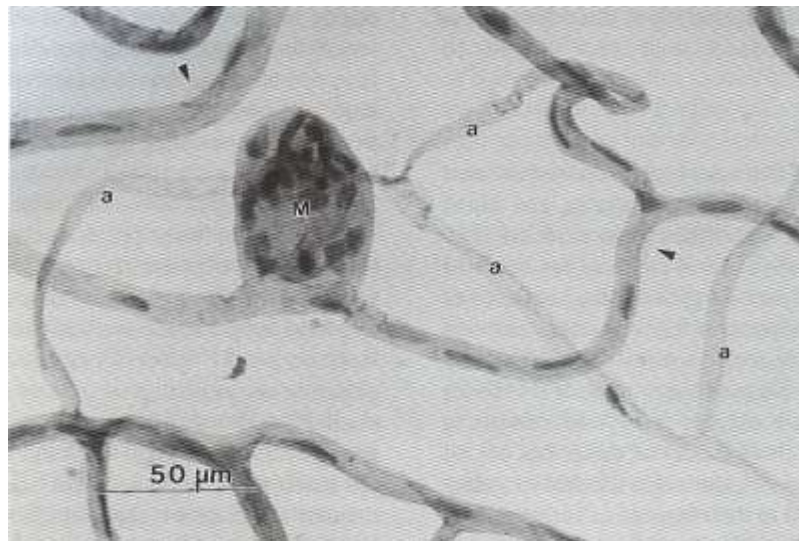
**Slika 1** *Gubitak kapilarnih pericita (preparat mrežnice 42 godišnje dijabetičarke obojen PAS reagensom i hemalalaun-eozinom)*

*G – (ghosts pericyte) balonirani, izgubljeni pericit; P- normalni pericit, E- endotelna stanica*

*Amin RH, Frank RN, Kennedy A, Elliot D, Puklin E, Abrams GW. Invest Ophthalmol Vis Sci.1977; 38:36-47.*

### c) mikroaneurizme

Najranije kliničke promjene DR su mikroaneurizme (56) (slika 2). Oftalmoskopski su vidljive kao crvene točke na mrežnici, a na fluoresceinskoj angiografiji se pokazuju kao hiperfluorescentne točke. Promatrajući ih svjetlosnim mikroskopom vidljive su kao vretenasta proširenja kapilara mrežnice. Mogu biti hipercelularne ili acelularne. Kapilarne mikroaneurizme mrežnice mogu predstavljati fokalna područja endotelne proliferacije stanica gdje je izgubljen antiproliferacijski efekt pericita (57, 58). To bi moglo objasniti razvoj celularanih aneurizmi, ali ne i acelularnih. Smatra se da su sve mikroaneurizme u početku celularne, ali neke postaju acelularne kao rezultat proširene apoptoze koja uključuje endotelne stanice i pericitne jezgre ili stvaranja slabih točaka kapilarnog zida nakon čega slijedi gubitak pericita (59).



**Slika 2** *Kapilarna mikroaneurizma u mrežnici psa*

*M – mikroaneurizma, a – acelularna kapilara*

*Preparat obojen PAS reagensom i hemalaun-eozinom.*

*Engerman RL, Kern TS. Diabetes.1984; 33:97-100.*

#### **d) oštećenje krvno-mrežnične barijere**

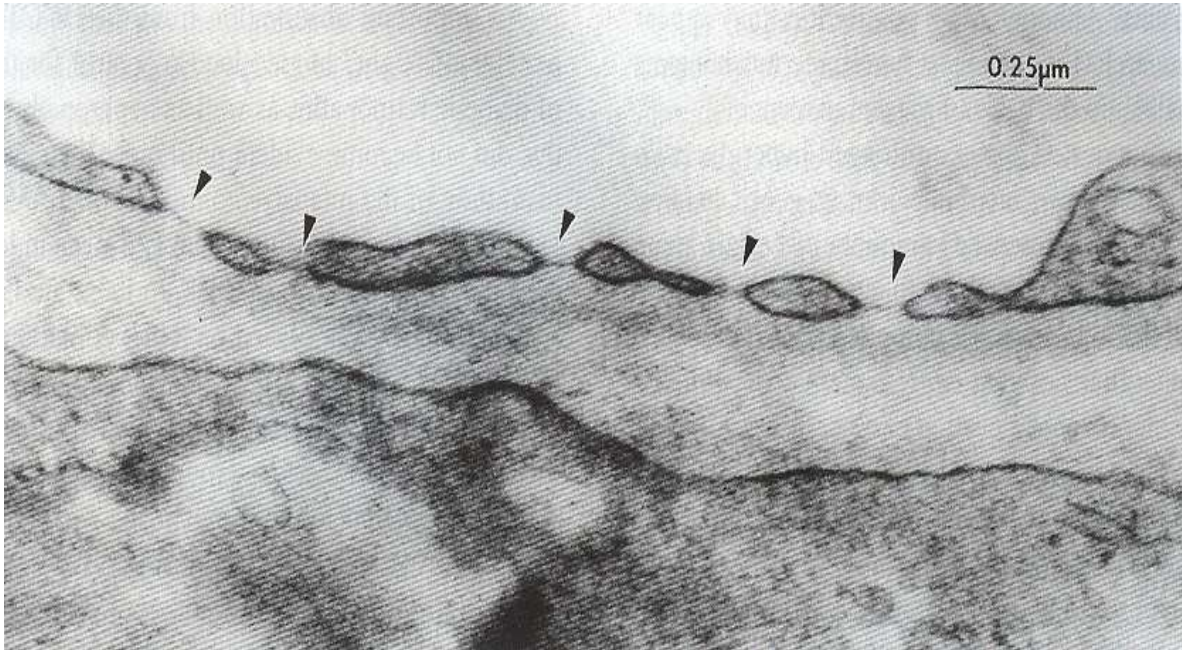
Čini se mogućim da bi se oštećenje te barijere moglo pojaviti u ranom tijeku dijabetesa, prije klinički vidljivih znakova dijabetične retinopatije.

Prvi mogući uzrok je otvaranje uskih spojeva između susjednih nastavaka endotelnih stanica (*lat. zonulae occludens*) (60).

Elektronskim mikroskopom moguće je vidjeti da ti spojevi imaju pentalaminarnu strukturu i kada su zatvoreni ne propuštaju označeni lantan-klorid ili peroksidazu hrena, za razliku kada su te sveze otvorene (61) .

Druga abnormalnost kapilarnih endotelnih stanica je njihova fenestracija (slika 3) . Za fenestre, koje su procijep kontinuiteta citoplazme endotelnih stanica, obično premoštene tankom jednoslojnom membranom, smatra se da utječu na poroznost tankog endotela krvnih žila žilnice.

Normalno fenestre nisu prisutne na zadebljanom endotelu kapilara mrežnice, ali su pronađene u uzorcima ljudi i životinja kod kojih je došlo do oštećenja krvno-mrežnične barijere. Treće moguće objašnjenje je povećan transport endocitnim vezikulama, ali samo u fazi objašnjenja na eksperimentalnim životinjama (62- 64).



**Slika 3. Fenestrirani kapilarni endotel prikazan elektronskim mikroskopom**  
**Preparat mrežnice 59 godišnjeg dijabetičara s PDR**  
**Wallow HL, Geidner PS. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1980;1:1176-83.**



### e) neovaskularizacija

Krvožilni sustav u ljudskom organizmu ima površinu oko 900 m<sup>2</sup>. Krvne žile sastoje se od jednog reda endotelnih stanica, subendotelnog pericitnog sloja, stanica mišićne glatke muskulature, bazalne membrane, fibroblasta i izvanstaničnog matriksa (22).

Ovisno o lokalizaciji krvožilnog sustava u organizmu, bazalna membrana, izvanstanični matriks i stanična konstitucija razlikuju se prema fenotipu, funkciji i kompoziciji.

Iako vaskulogeneza i neovaskularizacija ili angiogeneza u prijevodu znači isto, ne upotrebljavaju se kao sinonimi.

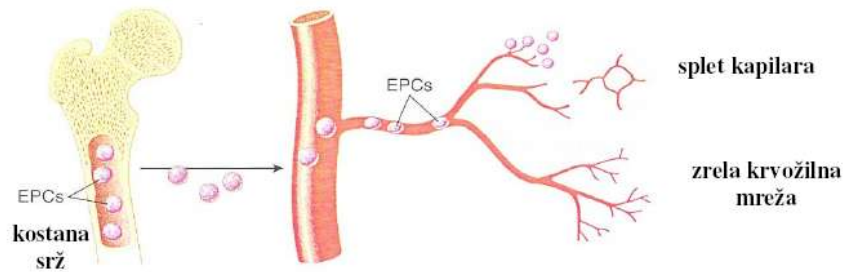
Vaskulogeneza (lat. *vas* – posuda) znači prvo (izvanembrionalno i embrionalno) de novo nastajanje krvnih žila, a angiogeneza (grčki *angeion* posuda) nastajanje novih krvnih žila iz već postojećih embrionalnih ili u odraslom organizmu.

Do nedavno se smatralo da je neovaskularizacija isključivo rezultat grananja i širenja već postojećih krvnih žila.

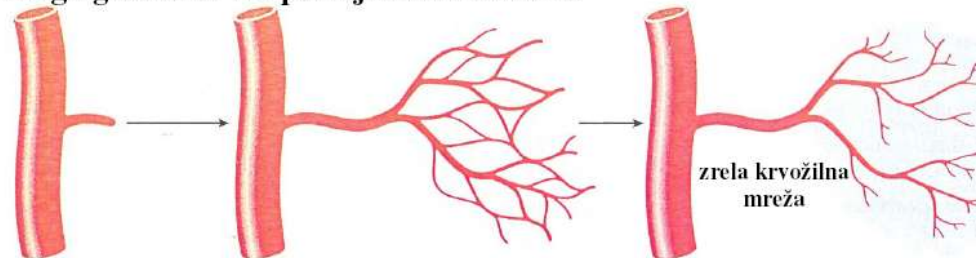
Eksperimentalno su dokazana dva puta stvaranja novih krvnih žila (slika 4):

1. neovaskularizacija iz endotelnih prekursorstaničnih stanica (engl. *endothelial progenitor cells*) EPC iz koštane srži
2. neovaskularizacija iz postojećih krvnih žila

### A. Angiogeneza iz prekursorskih endotelnih stanica (EPCs)



### B. Angiogeneza iz već postojećih krvnih žila



**Slika 4.** Shematski prikaz dvaju tipova angiogeneze  
(V.Kumar, N. Fausto, A. Abbas. Pathologic Basis of Disease 7<sup>th</sup> Edition.  
W.B.Saunders Company.2004.)

Prvi eksperimentalni radovi o neovaskularizaciji zabilježeni su već 1962, kad su F. Becker i Folkman hemoglobinskom otopinom vršili perfuziju solidnih izoliranih organa psa u staklenkama (65). Uspjeli su ih održavati dva tjedna, a interesiralo ih je mogu li izolirani organi podupirati rast. Nakon injekcije stanica mišjeg melanoma razvili su tumor, ali ne veći od 1mm i nikad nisu razvili vaskularizaciju, međutim kada su ti isti tumori presađeni u miša domaćina narasli su u tumor veći od 1 cm i vaskularizirali se.

To je jedan od najranijih eksperimentalnih modela u kojem je pokazano kako tumorski rast može biti zakočen ako se tumor drži u tzv. prevaskularnom stanju. Iz ovog su autori zaključili da tumorski rast solidnih tumora i metastaziranje ovisi o neovaskularizaciji, kao i to da endotelne stanice bubre, ali ne mogu proliferirati u otopinama koje ne sadrže trombocite, kao što su hemoglobinske otopine.

Neovaskularizacija je kritična točka u održavanju normalne homeostaze u tkivu tijekom brojnih fizioloških funkcija (cijeljenje rane, reprodukcija i embrionalni razvoj). Abnormalna neovaskularizacija je ključna u patofiziologiji različitih bolesti npr u kardiovaskularnim bolestima, reumatoidnom artritisu, Chronovoj bolesti, psorijazi i u metastaziranju malignih tumora (66, 67).

Posebno je važna u oku jer vodi ka sljepoći. Intraokularna neovaskularizacija – abnormalna retinalna ili korioidalna je glavni uzrok smanjenog vida u pacijenata koji imaju proliferativnu dijabetičnu retinopatiju (PDR), makularnu degeneraciju ili prematurnu retinopatiju.

Prije nekoliko godina postojala je kontroverza vezana za mjesto nastajanja novih žila u retini. Nije se sa sigurnošću znalo predstavljaju li određene dilatirane i zavijene petlje finih intraretinalnih žila otprije postojeće žile koje su postale dilatirani šantovi kroz područja bez perfuzije, ili su to retinalne neovaskularizacije.

Takve žile nazvane su intraretinalne mikrovaskularne abnormalnosti (IRMA), ali histološkom analizom takvih žila na enukleiranim očima dokazana je rana intraretinalna neovaskularizacija (66, 67).

### 1.3.2. Etiologija i epidemiologija

Proučavanje epidemiologije bolesti važno je za utvrđivanje hipoteza njene patofiziologije dajući odgovore na pitanja o najvećem riziku, kao i o čimbenicima koji na taj rizik utječu.

Za DR glavni rizik je postojanje šećerne bolesti, iako neke studije govore o DR bez postojanja šećerne bolesti (68, 69). Analizom rezultata DCCT-a takve tvrdnje nemaju nikakvu znanstvenu osnovu (16, 17).

O genetskom utjecaju na razvoj DR postoje različiti stavovi. Jedna grupa znanstvenika tvrdi da se genski lokusi koji moduliraju DR, kao i druge komplikacije dijabetesa razlikuju od lokusa koji određuju sam dijabetes, a druga grupa da su komplikacije dijabetesa izravno uzrokovane dugotrajnom hiperglikemijom možda modificirane genetskim ili stečenim osobinama koje variraju od osobe do osobe (15, 16). Ova druga tvrdnja je snažno potvrđena rezultatima DCCT-a (17), kontroliranog randomiziranog kliničkog ispitivanja koje je uključivalo 27 kliničkih centara u SAD-u i Kanadi, a i UK PDS, koji zajednički dokazuju važnost hiperglikemije u razvoju retinopatije i ostalih komplikacija dijabetesa, ali bez mogućnosti eliminacije mogućih dodatnih genetskih čimbenika (18, 70).

### 1.3.2.1. Duljina trajanja dijabetesa i razvoj DR

Nekoliko velikih istraživanja jasno je pokazalo da se DR kod mladih ljudi s DM tipa 1 ne pojavljuje prije 3 do 5 godina trajanja sistemske bolesti (29, 71). Slični rezultati su dobiveni za osobe s DM tipa 2 (72), ali u tim slučajevima vrijeme pojave, kao i trajanja bolesti je bilo teže precizno utvrditi, tako da su se neki bolesnici s novootkrivenim DM tipa 2 prezentirali inicijalno s DR, ili se DR pojavila brzo nakon otkrivanja DM.

Istraživanja koja su pratila vremenski tijek razvoja oštećenja u DR pokazala su prevalenciju minimalne retinopatije kod približno 100% ispitanika nakon 20 godina, a prevalencija PDR nije bila viša od 50 % kod ispitanika s DM tipa 1 kod trajanja bolesti 15 godina ili dulje (71). Prevalencija proliferativnog oblika kod osoba s tipom 2 sličnog trajanja bila je mnogo niža (72). Moguća su dva objašnjenja ovog opažanja. Proliferativna bolest mogla bi biti rezultat vrlo visoke prosječne razine glukoze u krvi, a pojavljuje se češće kod osoba s tipom 1, a drugo je da proliferativna retinopatija može biti rezultat određenog metaboličkog stanja retine koje je vjerojatnije prisutno kod mladih osoba s tipom 1 nego kod starijih s DM tipa 2 (72). Općenito se smatra da je edem makule puno češći kod starijih osoba s tipom 2 DM, a kao takav je povezan sa starošću bolesnika.

Aiello i suradnici (73) su prikazali isti rezultat, ali su zabilježili da kada mladi bolesnici s tipom 1 DM imaju edem makule, često imaju i PDR.

Klein i suradnici (74) su u istraživanju temeljenom na populaciji dijabetičara našli da je prevalencija edema makule kao funkcija trajanja DM identična kod DM tipa 1 i tipa 2.

### **1.3.2.2. Sistemski čimbenici**

Kao dodatak ulozi trajanja i tipa dijabetesa opisivani su mnogi čimbenici koji mogu utjecati na razvoj i progresiju DR.

Jedan od njih je pubertet (75, 76). Mehanizam kojim bi pubertet mogao pojačati učinak razvoja rane DR je nepoznat, ali istraživanja ukazuju na ulogu hormonalnih čimbenika povezanih s rastom u patogenezi PDR kod mladih ljudi (29, 71).

Od sistemskih poremećaja koji bi mogli utjecati na razvoj DR najčešći predmet istraživanja je hipertenzija. Mnoga izvješća su pokazala da je PDR izravno povezana sa vrijednostima sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka (77-79).

Učinak trudnoće na DR je kontroverzan (72). Neki autori smatraju da ubrzava razvoj bolesti, dok drugi smatraju da nema nikakvog učinka. Klein i sur. su prikazali najbolje dokaze da trudnoća potiče progresiju DR (80). Usporedili su trudnice s dijabetesom sličnih godina i trajanja dijabetesa sa ženama koja nisu trudne. Kada su podaci prilagođeni različitim rizičnim čimbenicima, ovi autori su otkrili da je trajanje trudnoće značajno povezano s progresijom retinopatije.

### **1.3.2.3. Genetski čimbenici**

Iako su brojna istraživanja ukazala da genetski čimbenici mogu mijenjati prevalenciju DM među ljudima različitih rasnih skupina ili naroda, niti jedna rasna ili nacionalna razlika nije objavljena za DR.

Niz istraživanja proučavalo je odnos između HLA antigena izraženih na površini stanica i postojanja DR ili težine kliničke slike.

Rand i suradnici (81) iznose u svojoj studiji povećan rizik za PDR kod osoba s HLA DR4+DR3 fenotipom. Niti jedan drugi HLA fenotip, kao niti jedna druga varijacija ostalih proučavanih genskih pokazatelja nije potvrdila takav povećan rizik.

Povećanom sofisticiranošću molekularne biologije brojni su znanstvenici proučavali niz genskih čimbenika koje bi mogli biti povezani s nasljednom sklonošću komplikacijama dijabetesa (82-84). Iako ova istraživanja ni u jednom smislu nisu konačna, postoje dva izvješća koja povezuju mutacije gena za aldoza-reduktazu i DR (53, 54).

Za jednu takvu mutaciju se smatra da potvrđuje povećanu sklonost DR kod pacijenata s DM tipa 1, a druga za raniju pojavu DR kod pacijenata s DM tipa 2.

#### **1.3.2.4. Očni čimbenici**

Becker (85) je 1967.g. objavio da glaukom smanjuje prevalenciju težeg oblika DR u zahvaćenom oku. Do danas objašnjenje te činjenice, koju su uočili i drugi autori, nije jasno. Pretpostavlja se povezanost s gubitkom metaboličke aktivnosti mrežnice koja se očituje gubitkom ganglijskih stanica, ili s gubitkom mrežnične vaskularne perfuzije.

Zabilježeno je i da kratkovidnost umanjuje prevalenciju i težinu DR (86). Ovaj učinak kratkovidnosti na učestalost PDR potvrdili su Rand i sur. koji su pronašli zanimljivu interakciju između miopije veće od 2 dioptrije i HLA antigena (81). Beetham i kolege su primijetili da su pacijenti s nekim stanjima kao retinitis pigmentosa i visoka kratkovidnost relativno zaštićeni od teških oblika PDR (73).

Aiello, Beetham i sur. (76) su primijetili da oči s ožiljcima žilnice i mrežnice kao npr. u ozljedama i upalama imaju značajno manju prevalenciju i ozbiljnost DR. To zapažanje rezultiralo je fotokoagulacijom mrežnice, koja ožiljke inducira jatrogeno. Ta tehnika panretinalne fotokoagulacije, koja se i danas koristi u liječenju DR, jasno je dokazala korist u smanjenju pogoršanja vida u DR.

### **1.3.3. Patogeneza**

#### **1.3.3.1. Hiperglikemija**

Glavna kontroverza u svim raspravama o patogenezi DR je uloga hiperglikemije. Osnovni razlog tome bio je poteškoća u dokumentiranju razine glukoze u krvi kod dijabetičara više puta dnevno tijekom nekoliko godina (87). Razvojem kućnog monitoriranja i određivanjem ukupnog glikoziliranog hemoglobina, koji mjeri srednju vrijednost glukoze u krvi unazad 6 do 12 tjedana, omogućena je točnija procjena kontrole glukoze u krvi (88).

Retrospektivne studije koje koriste izmjerene vrijednosti glikoziliranog hemoglobina u procjeni relativno dugoročne kontrole glikemije, kao što je ona Kleina i suradnika jasno su ukazale da je kronična hiperglikemija usko povezana s razvojem DR (89).

UKPDS su u velikom kliničkom istraživanju u pacijenata s novodijagnosticiranim dijabetesom tipa 2 pratili i usporedili tri skupine: prvu skupinu liječenu kontrolom prehrane, drugu tabletama i treću skupinu liječenu inzulinom. Pacijenti su praćeni najmanje deset godina.



Zaključak te studije je da je bolja kontrola glikemije ostvarila smanjenje rizika od 25% za sve mikrovaskularne komplikacije, a najizraženije smanjenje u ovim mikrovaskularnim posljedicama je u smanjenju potrebe liječenja fotokoagulacijom (90).

Točan mehanizam kojim hiperglikemija djeluje nije jasan, a najčešći spominjani biokemijski mehanizmi su sljedeći:

1. dugotrajna hiperglikemija mogla bi promijeniti ekspresiju jednog ili više gena dovodeći do povećane količine određenih genskih produkata koji mogu mijenjati funkcije stanice.
2. mnoge vrste šećera mogu se neenzimski vezati za proteine dovodeći do glikoziliranih produkata s velikim poluvremenom života u stanicama (91). Taj je fenomen prvo primjećen u hemoglobinu (92) i do danas je određivanje ukupne razine glikoziliranog hemoglobina kod dijabetičara značajno za procjenu dugoročne kontrole glikemije. Takvi proteini mogu proći kroz niz dodatnih reakcija, dovodeći do međusobnog vezanja unutar i između lanaca sa značajnom promjenom funkcije proteina, koji bi zbog izrazito dugog životnog vijeka mogli imati ulogu u nastanku dijabetičnih komplikacija (93).
3. kronična dijabetična hiperglikemija može proizvesti oksidativni stres u stanicama dovodeći do obilnog stvaranja "krajnjih toksičnih produkata oksigenacije" uključujući perokside, superokside i slobodne radikale kisika (90). Iako su ove posljednje molekule kratkog vijeka, njihova produkcija može biti trajno povišena kao rezultat kroničnih promjena prikladnih metaboličkih puteva.

### 1.3.3.2. Metaboličke nepravilnosti i ostali čimbenici

#### a) Put sorbitola

Od enzimskih mehanizama koji su predloženi kao uzrok retinopatije i drugih komplikacija dijabetesa put sorbitola je najčešći. To ime je dano slijedu reakcija koje sadržavaju enzim aldoza-reduktazu i sorbitol dehidrogenazu, koje se pojavljuju u mnogim stanicama (88). Korištenjem reduciranog oblika trifosfopiridin nukleotida (NADPH) aldoza-reduktaza reducira veliki broj aldoznih šećera u svoje šećerne alkohole. Mnogi od njih mogu biti oksidirani u keto šećere pomoću sorbitol dehidrogenaze. Glukoza se reducira u sorbitol, koji se naposljetku oksidira u fruktozu, ali među aldoznim šećerima, glukoza je relativno loš supstrat za aldoza-reduktazu, tako da aldoza-reduktaza ne djeluje u ovom putu osim ako razina glukoze nije visoka kao u nekontroliranoj hiperglikemiji. Kako galaktiol nije supstrat za sorbitol dehidrogenazu, njegova intracelularna razina se povećava i brže od sorbitola u osjetljivim stanicama, te je zato galaktoza često korištena u objašnjenju učinaka sorbitola u dijabetičnim komplikacijama.

U svom eksperimentalnom radu Engerman i Kern (94) su zabilježili gubitak pericita, mikroaneurizme i kapilarnu acelularnost kod nedijabetičnih pasa kojim su davali hranu obogaćenu galaktozom tijekom perioda dužeg od tri godine. To istraživanje prošireno je dodatkom i inhibitora aldoza - reduktaze, ali rezultati su oprečni. Kador i sur. (25, 95), te Robson i suradnici (38, 39, 96) su objavili da je razvoj dijabetične retinopatije u ovakvim uvjetima izrazito usporen, za razliku od rezultata Engermana (97) koji nije mogao pronaći nikakvo smanjenje u težini komplikacija.

Postoje dva klinička ispitivanja inhibitora aldoza-reduktaze kod ljudi s dijabetičnom retinopatijom. U oba klinička ispitivanja primjena inhibitora aldoza-reduktaze nije se pokazala uspješna u redukciji retinopatije i neuropatije. (19)

## **b) Oksidacijski stres**

Metabolička oksidacija glukoze završava oksidacijskom fosforilacijom i respiracijskim lancem u mitohondrijima u kojim se stvaraju najveće količine ATP –a. U tim procesima sudjeluje molekularni kisik, a kao krajnji oksidans nastaje  $H_2O_2$ , ali se i mala količina  $O_2$  pretvara u slobodni superoksidni radikal  $O_2^-$  (98) koji se dalje može pretvarati u druge reaktivne spojeve kisika (ROS) ili reaktivne dušikove spojeve (RNS) . Stanična oštećenja koja mogu izazvati slobodni kisikovi radikali i ostali ROS sprječavaju se djelovanjem glavnog staničnog antioksidansa reduciranog glutaciona (99, 100), čije održavanje je pod kontrolom enzima glutation-reduktaze. Kad stanično antioksidacijsko djelovanje nije dostatno u održavanju ravnoteže jakim oksidacijskim djelovanjem zbog velikih količina ROS-a. nastaje stanje koje nazivamo oksidacijski stres. Rezultat toga su velike količine slobodnih kisikovih radikala i trajno oštećenje stanične strukture.

### c) Upalni citokini

Postoje mnogi dokazi da upala ima važnu ulogu u patogenezi dijabetesa, kao i u aterosklerozi (101).

Povećane vrijednosti sistemskih upalnih pokazatelja nađene su u osoba oboljelih od dijabetesa, ali nisu česti radovi koji ih uspoređuju s dijabetičnom retinopatijom (102).

Citokini su proteini niske molekularne težine od 8-80 kD (kilodaltona) koji reguliraju jačinu i trajanje imunološkog upalnog odgovora. Stanice koje ih luče djeluju autokrino na svoje stanice, parakrino na susjedne i endokrino na udaljene stanice (103).

Ima više podjela citokina, a Roitt ih dijeli na: interleukine, interferone, čimbenike nekroze tumora, čimbenike rasta, čimbenike koji stimuliraju kolonije i kemokine (103). Citokini se često klasificiraju prema njihovoj pro-upalnoj (TNF, IL-1, IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ ) ili protu-upalnoj (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ ) aktivnosti, a u odnosu na patofiziološka zbivanja ateroskleroze na pro - ili protu - aterogene.

Selektivni deficit sinteze IL-12 uzrokovan deficijencijom 12/15 – lipooxygenaze reducira aterosklerotični plak (104), a injekcija IL-12 u eksperimentalnih miševa stimulira razvoj lezije (105).

Dijabetes je važan čimbenik rizika za aterotrombozu, a njegova se povezanost ne može objasniti samo konvencionalnim čimbenicima rizika. U osoba sa šećernom bolešću tipa 2 upalna aktivnost je povećana i snažno povezana s aterotrombozom.

Upalna aktivnost je povećana i u dijabetesu tipa 1, što je dokazano visokim koncentracijama CRP-a (106) i TNF- $\alpha$  (107).

Smatra se da je povećanje koncentracije ovih čimbenika djelomično povezano s hiperglikemijom i stvaranjem produkata glikemije, ali nije poznato koji drugi čimbenici utječu na pojačanu aktivnost u dijabetesu tipa 1. Osobito nije razjašnjena točna povezanost produkata glikozilacije i endotelne disfunkcije.

Nije poznato utječe li prisutnost mikrovaskularnih komplikacija zajedno s konvencionalnim čimbenicima rizika i endotelnom disfunkcijom na upalnu aktivnost.

Schmidt i kolege (108) su koristeći se podacima "Atherosclerosis Risk in Communities Study" prvi pokazali da različiti pokazatelji upale uključujući leukocite, fibrinogen i sijalinsku kiselinu, predskazuju razvoj dijabetesa tipa 2 u populaciji srednje dobi.

U Eurodiab prospektivnoj studiji 2003.g. M.Schram i sur. (109) su pokazali da su razmjeri upale u dijabetičara povezani sa spolom, trajanjem dijabetesa, kontrolom glikemije, indeksom tjelesne mase (BMI), HDL kolesterolom, trigliceridima i sistoličkim krvnim tlakom. Tom studijom su pokazali da je u dijabetesu upalna aktivnost snažno povezana i s adhezijskim molekulama i pokazateljima endotelne disfunkcije, VCAM – 1 i E- selektinom. To je pokazalo da endotelna disfunkcija igra važnu ulogu u upalnoj aktivnosti povezanoj s bolesti, kao i da su konvencionalni čimbenici rizika i endotelna disfunkcija važne determinante bez obzira na prisutnost ili odsutnost komplikacija (109).

Povezanost proupalnog citokina IL-12 i dijabetične retinopatije prvi put se u literaturi spominje 1998. godine (110), a od tada su objavljena još samo četiri rada (111-114).

Hiperglikemija, slobodni radikali kisika i upalni citokini dovode do aktivacije stresnih mitogenima aktiviranih protein – kinaza (MAP kinaza), čija aktivacija može dovesti do promjena transkripcije različitih proteina. Posljedica toga može biti aktivacija drugih signalnih puteva, a konačno i razvoj dijabetičnih komplikacija (115).

Aktivacijom MAP - kinaza fosforilira se aktivacijsko-transkripcijski faktor 2 (ATF-2), a krajnji rezultat je apoptoza, tj. stanična smrt (116).

#### **d) Diaglycerol i protein kinaza C**

Mehanizam kojim hiperglikemija i galaktozemija mogu stimulirati biološke puteve vodeći u dijabetične komplikacije, ali bez aktivacije aldoza-reduktaze predložili su Xia i suradnici (117).

Oboje, dijabetes i galaktozemija mogu stvoriti u nekoliko mjeseci povišene vrijednosti diaglicerola (DAG) u stanicama mrežnice i aorte kod pasa, koja se ne može prevenirati sorbitolom. Povišeni DAG vodi u povećanu aktivnost enzima protein kinaze C (PKC) (118). Povišene vrijednosti DAG-a i aktivnost PKC-a u mrežnicama dijabetičnih štakora koreliraju sa smanjenim krvnim protokom i mogu se korigirati specifičnim inhibitorom  $\beta$ -izoforme PKC, koja je također specifično aktivirana vaskularnim endotelnim čimbenikom rasta VEGF-om (119).

### e) Čimbenik rasta vaskularnog endotela i ostali čimbenici rasta

Michaelsonova originalna pretpostavka da "čimbenik X" kojeg stvara mrežnica stimulira neovaskularizaciju, čini se istinitom, iako je priča mnogo kompliciranija nego je autor mogao pretpostaviti 1948. godine (120). Peptidni čimbenici rasta za koje se u početku smatralo da su najvjerojatniji stimulatori neovaskularizacije bili su čimbenici rasta fibroblasta (PGF), obitelj acidoznih i baznih proteina izvorno izoliranih iz mozga, kao i iz drugih tkiva koji potiču proliferaciju raznih tipova stanica, posebno vaskularnog endotela.

Najopsežnije istražen angiogeni čimbenik, koji se odnosi na neovaskularne bolesti mrežnice je VEGF. Najprije je otkriven kao molekula koja povećava propusnost žila, pa je njegov drugi naziv "čimbenik vaskularne propustljivosti".

Ekspresija VEGF-a je u tkivima regulirana raznim čimbenicima, ali kod PDR od osobitog je značenja hipoksija.

Razine VEGF- a u staklovini pacijenata koji su podvrgnuti vitrektomiji zbog PDR su značajno povišene u usporedbi s osobama kojima je vitrektomija urađena zbog neproliferativnih uzroka (121),

VEGF u mrežnici luče RPE, Mullerove i ganglijske stanice (122), a izravno djeluje na endotelne stanice smanjujući sadržaj proteina, povećavajući fosforilaciju i uzrokujući povećanu propustljivost.

Terapijski postupci koji sprječavaju stvaranje i djelovanje VEGF-a davanjem intravitrealnih injekcija VEGF protutijela značajan su napredak u liječenju DR (123, 124).

#### 1.3.4. Klinička slika

Dijabetična retinopatija kao vaskularna komplikacija šećerne bolesti jedna je od vodećih uzroka sljepoće u svijetu.

U Wisconcin epidemiološkoj studiji od dijabetične retinopatije slijepo je 3,6 % mladih pacijenata s dijabetesom tipa 1 i 1,6% pacijenata tipa 2 (125).

Iako postoje mnoge studije, patogeneza dijabetične retinopatije nije još u potpunosti razjašnjena.

Smatra se da je u zemljama zapadnog svijeta 12% svih sljepoća uzrokovano dijabetesom, koji je vodeći uzrok novonastale sljepoće među populacijom od 20 do 74 godine (126).

Incidencija i prevalencija gubitka vida i sljepoće zbog DR se ne smanjuje unatoč svim metodama prevencije (127). Do otkrića inzulina pacijenti s razvijenom dijabetičnom retinopatijom bili su izuzetno rijetki jer su umirali prije nego su se komplikacije mogle razviti.

DR se odlikuje okluzijom kapilara, mikrovaskularnim lezijama uz krvarenje, edem i eksudate, te neovaskularizacijom i glijalnom proliferacijom uz područje mrežnične ishemije (128).

Okluzija kapilara javlja se u ranoj fazi dijabetične retinopatije i smatra se uzrokom neovaskularizacije (129).

Točan mehanizam nastanka promjena cirkulacije mrežnice u bolesnika sa šećernom bolešću i dalje je nepotpuno razjašnjen, a istraživanja u posljednjih desetak godina ukazuju na moguću upalnu ulogu u njenom nastanku (101,130).

Poznato je da tkivna hipoksija može rezultirati staničnom upalom, uključujući i infiltraciju makrofagima na mjestu hipoksije (131).



U dijabetičnoj retinopatiji spominje se da je upravo hipoksija pokretač svih patofizioloških zbivanja (101).

Makrofagi mogu pokazati i anti-angiogene i pro-angiogene funkcije, ovisna o njihovoj polarizaciji, a kao rezultat djelovanja citokina u tkivima (132). Nakon stimulacije interferonom gama (IFN- $\gamma$ ) i stimulirajućim čimbenikom kolonije granulocita (GM-CSF- engl.*granulocyte macrophage colony stimulating factor*) makrofagi proizvode velike količine IL-12, IL-23, IL-6, TNF  $\alpha$  (engl.*tumor necrosis factor alpha*) i male količine IL-10 (132). Ovakav klasični makrofag ili M1 makrofag pokazuje antiangiogeni fenotip i ima proupalno djelovanje. M2 makrofagi su stimulirani u prisutnosti IL-10, IL-4 ili IL-13 i proizvode puno protuupalnog citokina IL-10, a malo proupalnih citokina.

Zajedno s endotelom krvnih žila retine, pigmentni epitel retine čini krvno-mrežničnu barijeru izolirajući stražnji segment oka od ostalog dijela tijela, naročito od upalnih stanica (22).

U literaturi se spominje da su neka patološka stanja kao npr. uveitis ili DR povezana s oštećenjem krvno-mrežnične barijere i infiltracijom retine T-limfocitima, neutrofilima s lokalnom sekrecijom raznih citokina (101).

Sve navedeno može okarakterizirati mrežnicu kao tkivo jakih imunoloških zbivanja.

DR se dijeli i klasificira kao neproliferativna (NPDR) i proliferativna dijabetična retinopatija (PDR).

**Neproliferativnu dijabetičnu retinopatiju** karakteriziraju mikroaneurizme, krvarenja u mrežnici, eksudati, intraretinalne vaskularne abnormalnosti i venske abnormalnosti (kruničaste vene), a po težini promjena se klasificiraju u tri stupnja:

a) blaga

- najmanje jedna mikroaneurizma
- mrežnično krvarenje u jednom kvadrantu

b) umjereno teška

- mrežnično krvarenje najmanje u jednom, a manje od četiri kvadranta
- meki eksudati (engl. *cotton-wool spot*)
- kruničaste vene

c) teška

- krvarenje i mikroaneurizme u sva četiri kvadranta
- abnormalnosti kalibra vena u najmanje dva kvadranta
- intraretinalna mikrovaskularna abnormalnost u jednom kvadrantu

Intraretinalne hemoragije oftalmoskopski su vrlo slične mikroaneurizmama, vidljive su kao crvene točke, ali za razliku od mikroaneurizama ima nejasne granice i veće su.

**Proliferativna dijabetična retinopatija** je rjeđi, ali teži oblik DR i obuhvaća 15 % svih oblika DR.

Karakteriziraju je:

- neovaskularizacije
- hemoragije
- rubeoza šarenice
- trakcijska ablacija mrežnice

Postoje dva stupnja:

- rani
- visoko rizični

### 1.3.5. Dijagnoza

U postavljanju dijagnoze DR koriste se sljedeće pretrage:

1. detaljan pregled očnog dna
  - direktna i indirektna oftalmoskopija
  - biomikroskopski pregled s kontaktnim i nekontaktnim lupama
2. gonioskopija
3. stereofotografija fundusa za dokumentaciju (133)
4. ultrazvučni pregled kod zamućenih očnih medija
5. vidno polje (134)
6. fluoresceinska angiografija (135)
7. ispitivanje vida za boje (136)
8. OCT (engl. *optical coherence tomography*) koristi lasersku zraku infracrvenog spektra u prikazu očne pozadine (137)
9. HRT- Heidelberg retina tomograph je trodimenzionalni prikaz retine (138)
10. elektrodijagnostika (elektroretinografija, vidno evocirani potencijali) (139, 140)
11. kvantitativna vitrealna fluorometrija (141)

### 1.3.6. Liječenje

Liječenje dijabetične retinopatije značajno se je razvilo u prošlom stoljeću. Prije otkrića fotokoagulacije bile su ograničene mogućnosti liječenja komplikacija dijabetesa. Pokušaji odstranjenja hipofize i gušterače imali su minimalan pozitivni učinak, ali i teške komplikacije kao hipotenziju, sterilitet, čak i smrtni ishod (142).

Noviji načini terapije su uz fotokoagulaciju, intravitrealna aplikacija anti-VEGF-a (eng. *vascular endothelial growth factor*) (123, 124, 130) i triamcinolona (143, 144).

Sprječavanje i usporavanje razvoja DR kontrolom i regulacijom čimbenika rizika osnovni je cilj u liječenju DR.

#### 1.3.6.1. Laserska fotokoagulacija

Laserska fotokoagulacija (LF) mrežnice je metoda izbora u liječenju DR (145, 146).

Pojam LASER je skraćenica od engl. *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* što bi u prijevodu značilo: Pojačano svjetlo stimulirano emisijom zračenja. Glavne karakteristike lasera su: korištenje zrake svjetlosti jedne valne duljine (monokromatičnost), zrake su usmjerene u istom pravcu (prostorna koherencija) i praktički izbijaju istodobno (vremenska koherencija).

Laserski učinak na oku je apsorpcija laserske zrake i pretvorba svjetlosne u toplinsku energiju.

Veliku moć apsorpcije imaju pigmenti mrežnice: melanin, ksantofil i hemoglobin (147). Melanin najbolje apsorbira svjetlo, a njegova apsorpcija se smanjuje porastom valne duljine. Rožnica, leća i staklovina imaju malu moć apsorpcije.

U kliničkoj praksi najrasprostranjeniji su argon laseri koji su u početku imali plavo - zeleni spektar (148).

Kako plavi laser širi previše energije u okolna tkiva, štetan je za makularno područje jer ga apsorbira makularni ksantofil, pa je zamijenjen uređajima koji koriste samo zeleno svjetlo valne duljine 514,5 nm (148).

Diodni infracrveni mikropulsni laser valne duljine 810 nm u današnje je vrijeme sve je više u uporabi (149).

Prednosti su mu sljedeće:

- selektivna koagulacija RPE
- izostanak provođenja topline u okolinu
- vrlo malo ili nikakvo oštećenje fotoreceptora

Nedostaci su mu :

- lošija apsorpcija u hemoglobinu
- teža okluzija mikroaneurizmi

Indikacije za LF mrežnice su:

- teški oblik DR
- PDR
- klinički značajan edem makule

Osnovni načini fotokoagulacije mrežnice su:

- fokalna kod klinički signifikantnog makularnog edema
- izravna na neovaskularizaciju
- panretinalna ili "scatter"- rastresita fotokoagulacija kod PDR ili vrlo teške NPDR

### **1.3.6.2. Farmakološka sredstva**

Mnogo je bezuspješnih pokušaja liječenja dijabetične retinopatije lijekovima kao npr. vazodilatatorima, antikoagulansima, vitaminima.

U novije vrijeme ohrabruju rezultati intravitrealne aplikacije:

- a) kortikosteroida – Triamcinolon (143, 144)
- b) antagonista vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (123, 124)
  - Pegaptanib (Macugen)
  - Bevacuzimab (Avastin)
  - Ranibicuzimab (Lucentis)

Studije koje ispituju djelovanje lizinopрила, inhibitora aldoza- reduktaze, protein kinaze C su u daljnjem razmatranju (150).

### 1.3.6.3. Vitrektomija

je operacijski zahvat odstranjenja staklovine i proliferativnih membrana kroz bjeloočnicu na području pars plana cilijarnog tijela (4-5 mm od limbusa), jer je taj dio oka oskudno vaskulariziran i ne krvari.

Indikacije za ovaj način liječenja kod dijabetičara su:

- a) krvarenja u staklovini
- b) proliferativni oblik dijabetične retinopatije
- c) trakcijska ablacija mrežnice

## 1.4 CITOKINI

Citokini su regulatorne proteinske molekule veličine od 8-80 kD (kilodaltona). Riječ citokini izvedena je iz riječi grčkog podrijetla "*cytos*" u značenju stanica i "*kine*" u značenju micati se (103). Danas poznajemo preko 30 različitih citokina.

Sudjeluju u svim fazama imunoloških reakcija, a najčešće su zastupljeni u efektornim fazama urođenog i stečenog imuniteta.

Luče ih brojne stanice: makrofagi/ monociti, dendritične stanice, svi limfociti T, limfociti B, stanice epitela, stromalne stanice timusa i koštane srži, mastociti, eozinofili, granulociti, fibroblasti, osteoklasti, endotelne stanice, keratinociti, hepatociti, trombociti, megakariociti i drugi.

Igraju centralnu ulogu u pozitivnom i negativnom reguliranju imunoloških reakcija koje povezuju imuni s hematopoetskim, endokrinim i živčanim sustavom. Nema imunološkog odgovora bez produkcije citokina.

Osnovna zajednička svojstva citokina:

- jedna stanica može lučiti više citokina
- različiti tipovi stanica mogu producirati isti citokin
- jedan citokin može djelovati na više različitih tipova stanica
- više različitih citokina može ispoljiti istu aktivnost
- jedan citokin može stimulirati ili inhibirati produkciju drugih citokina
- jedan citokin može potencirati (sinergizam) ili inhibirati djelovanje (antagonizam) drugog citokina
- uglavnom djeluju lokalno - autokrino i parakrino, rjeđe endokrino
- svoju aktivnost ispoljavaju vezujući se za receptore

Citokini su glasničke molekule koje prenose signale iz jedne stanice u drugu, mogu stanici prenijeti signal za proliferaciju, diferencijaciju, sekreciju dodatnih citokina, migraciju i smrt. Jedna od najvažnijih citokinskih grupa su interleukini, jer sadrže citokine koji se ponašaju kao komunikatori između leukocita.

Približno 30 interleukina je opisano do danas (IL- 1 do IL-33), a neki bez sumnje još čekaju kad će biti otkriveni.

Ostale citokinske obitelji ustanovljene su prema svojim sposobnostima podupiranja proliferacije hematopoetskih prekursora (čimbenici stimulacije kolonija) ili citotoksične aktivnosti prema transformiranim staničnim tipovima (tumor nekrotizirajući čimbenici) ili prema sposobnosti interferencije s virusnom replikacijom (interferoni). Za razliku od endokrinih hormona, većina citokina djeluje lokalno na parakrini ili pak autokrini način.



Zato citokini koji potječu iz limfocita rijetko postoje u cirkulaciji, ali nelimfoidne stanice, potaknute bakterijskim produktima otpuštaju citokine koji se mogu detektirati i u krvnom optoku, često na štetu domaćina. Septički šok, primjer je stanja opasnog po život, a rezultat je masovne produkcije citokina kao što su TNF i IL-1, kao odgovor na bakterijsku infekciju.

### 1.4.1. Receptori citokina

Citokini sudjeluju u signalizaciji preko ligandom inducirane homo ili heterodimerizacije podjedinica citokinskih receptora.

Postoje dva puta aktivacije, jedan preko janus kinaze (JAK-STAT) i drugi preko Ras-MAP kinaze (103).

Članovi citokinske receptorske superobitelji (hematopoetinski receptori) nemaju katalitičku domenu, ali su konstitutivno povezani s jednom ili više janus kinaza.

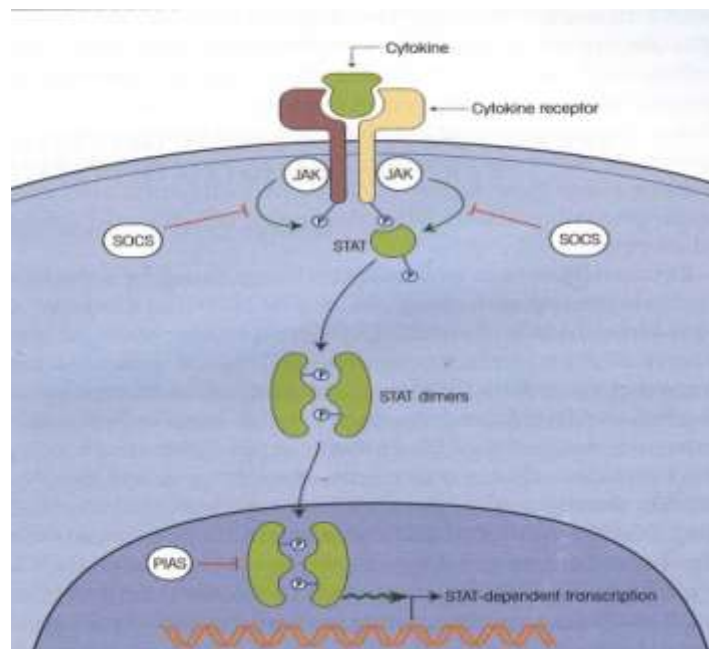
Janus kinaze (JAK ili engl. *Just another kinase*) je obitelj tirozin kinaza koje prenose citokinski signal preko JAK-STAT puta. Prvo su nazvani "*just another kinase*", ali je konačno prihvaćeno ime "Janus kinase".

Ime Janus (latinski *ianua*-vrata) u prijevodu je rimski bog vremena, početka i ulaska u radove. Ima glavu s dva lica od kojih jedno mladenačko, a drugo staračko.

Postoje četiri člana obitelji Janus kinaza u sisavaca JAK1, JAK2, JAK3 i Tyk2 (tirozin kinaza 2) i svi fosforiliraju svoje supstrate na tirozinskim ostacima.

Nakon citokinski inducirane dimerizacije receptora, Janus kinaze se recipročno fosforiliraju i aktiviraju se uzajamno. Aktivna JAK fosforilira specifične tirozinske ostatke na citoplazmatskom repu receptora i tako tvori "sidrište" za članove STAT (prenositelj signala i aktivator transkripcije ili engl. *Signal transducers and activators of transcription*) obitelji koja sadrži SH2 domenu, te je transkripcijski čimbenik.

STAT-ovi se nalaze u citoplazmi u inaktivnom stanju, ali nakon aktivacije receptora za citokine (preko svoje SH2 domene) postaju fosforilirani Janus kinazom, dimeriziraju se i odvajaju se od receptora. Dimerizirani STAT-ovi prelaze u jezgru aktivirajući transkripciju gena (slika 5).



Slika 5. Aktivacija citokinskog receptora i prijenos signala

(Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Roitt's Essential Immunology 11<sup>th</sup> edition London. Blackwell Publishing 2009;189.)

Sedam verzija STAT-ova je opisano kod sisavaca i svaki igra važnu ulogu u prenošenju signala citokinima. Jedan citokin obično aktivira nekoliko STAT-ova kako bi pojačao svoj biološki učinak. Vezivanje citokina za specifični membranski receptor potrebno je za biološku aktivnost citokina.

Receptori su građeni od dva polipeptidna lanca, od kojih je jedan specifičan i za njega se veže citokin, a drugi je nespecifičan i funkcija mu je prenijeti signal u stanicu. Ekspresiju receptora može potaknuti hormon, antigen ili neki drugi citokin (111). Citokinski receptor se može ispoljiti nakon podražaja ili se pojaviti spontano tijekom ciklusa (111).

## 1.4.2. Interleukin 12

Interleukin 12 je glikoproteinski heterodimer od 75 kD. Sinonimi su mu NKSF (engl. *natural killer cell stimulatory factor*) i CLMF (engl. *cytotoxic lymphocyte maturation factor*).

Sastoji se od dvije nejednake, genetski nesrodne podjedinice: p35, koja je srodna IL-6 i G-CSF, i veće podjedinice, p40, koja je slična topljivom receptoru za IL-6, što ukazuje da je nastao od citokin topljivog receptorskog kompleksa. Podjedinica p40 je odgovorna za vezivanje s receptorom i aktivnost IL-12.

Luče ga monociti/makrofagi, limfociti B i mastociti vezivnog tkiva. Pri tome, p40 uglavnom luče limfociti B u prisustvu aktivnog IL-12. Biološki djeluje preko receptora koji se nalaze na pomagačkim limfocitima T, NK i limfocitima B.

Receptor za IL-12 se sastoji od dvije podjedinice. Neophodna je koekspresija obje podjedinice da bi se ostvarilo mjesto vezivanja s visokim afinitetom.

IL-12 je multifunkcionalni citokin i biološke funkcije su mu:

- a) diferencijacija Th1 i Th0
- b) stimulacija Th1, Tc1 i NK na povećano lučenje IF $\gamma$  i TNF
- c) stimulacija makrofaga na pojačanu fagocitozu preko IF $\gamma$  kojeg luče Th1, Tc1 i NK
- d) zajedno s IL-18 stimulira diferenciranje u Th1, Tc1 i NK stanica i makrofaga da preko limfocita B formiraju AFC (antibody forming cells) na T nezavisni antigen (urođeni imunitet)
- e) povezuje urođeni i stečeni imunitet
- f) djeluje kao endogeni adjuvant, pa se rekombinirani IL-12 koristi u cjepivima da bi potaknuo celularne reakcije imunog aparata

## 2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

### Glavni cilj istraživanja ove doktorske disertacije je :

Odrediti koncentracije citokina IL-12 u serumu i očnoj vodici dijabetičara tipa 2 :

- bez dijabetične retinopatije
- s netretiranom dijabetičnom retinopatijom
- laserski tretiranom dijabetičnom retinopatijom

Dobivene vrijednosti usporediti između grupa, kao i s koncentracijama kod pacijenata koji ne boluju od dijabetesa.

### Sporedni cilj je:

Utvrditi povezanost vrijednosti IL-12 u očnoj vodici i/ili serumu s

a) konvencionalnim čimbenicima rizika za DR :

- spol
- dob
- trajanje dijabetesa
- tjelesni indeks mase (engl *BMI*)
- pušenje
- krvni tlak
- GUK
- glikozilirani hemoglobin- HbA<sub>1c</sub>
- trigliceridi
- kolesterol

b) pokazateljima upale

- sedimentacija eritrocita
- CRP
- fibrinogen

U ovoj studiji postavljene su sljedeće hipoteze:

- Poremećaj lokalne homeostaze tj. povećanje koncentracije proupalnih citokina u oku povezano je s prisutnošću dijabetične retinopatije.
- Koncentracija IL-12 u očnoj vodici je veća u dijabetičnih pacijenata s dijabetičnom retinopatijom bez laserskog liječenja mrežnice u usporedbi s
  - a) pacijentima bez dijabetesa
  - b) dijabetičarima bez dijabetične retinopatije
  - c) dijabetičarima s dijabetičnom retinopatijom nakon laserskog liječenja mrežnice.
- Koncentracije IL-12 u serumu dijabetičara, s ili bez dijabetične retinopatije i osoba bez dijabetesa se razlikuju.
- Postoji pozitivna korelacija koncentracije IL-12 u serumu s duljinom trajanja dijabetesa, BMI-om, HDL kolesterolom, trigliceridima, sistoličkim tlakom i pušenjem.
- Ne postoji pozitivna korelacija IL-12 u očnoj vodici s duljinom trajanja dijabetesa, BMI-om, HDL kolesterolom, trigliceridima, sistoličkim tlakom i pušenjem.

### **3. METODE ISPITIVANJA**

#### **a) Ispitanici**

Ispitanici su bolesnici Očnog odjela OB Dubrovnik kojima je postavljena indikacija za operaciju mreže.

U istraživanje su uključene 4 skupine ispitanika:

1. ispitanici bez šećerne bolesti koji imaju negativnu obiteljsku anamnezu za šećernu bolest
2. ispitanici oboljeli od šećerne bolesti bez znakova dijabetične retinopatije
3. ispitanici oboljeli od šećerne bolesti s neproliferativnim tipom dijabetične retinopatije, a bez ikakvog tretmana na oku
4. ispitanici oboljeli od šećerne bolesti s neproliferativnim tipom dijabetične retinopatije, koji su liječeni laserskom fotokoagulacijom mrežnice

Kriteriji uvrštenja:

Svi ispitanici su stariji od 60 godina i imaju očnu mrežu.

Duljina trajanja dijabetesa kod uključenih dijabetičara je 10 godina i više, a vrijeme od posljednjeg laserskog liječenja retine bilo je dulje od 6 mjeseci.

Iz studije su isključeni ispitanici koji imaju druge očne bolesti

- a) upalne bolesti oka
- b) glaukom
- c) pseudoeksfolijacijski sindrom
- d) okluzivne i degenerativne bolesti mrežnice

## **b) Postupci**

Postupci ove studije uključuju:

### 1. Opću i oftalmološku anamnezu kao i sljedeće varijable:

- dob
- spol
- trajanje dijabetesa
- terapiju
- obiteljsku anamnezu
- pušenje
- krvni tlak
- BMI

### 2. Laboratorijske parametre:

- IL-12 u očnoj vodici
- IL-12 u serumu
- GUK
- HbA<sub>1c</sub>
- kolesterol, HDL i LDL kolesterol,
- trigliceridi
- SE
- CRP
- fibrinogen



### 3. Kompletni oftalmološki pregled

- vidnu oštrinu bez i s korekcijom na Snellenovim tablicama
- biomikroskopski pregled prednjeg segmenta oka u uskoj i proširenoj zjenici
- mjerenje očnog tlaka Goldmanovim aplanacijskim tonometrom
- indirektnu oftalmoskopiju asferičnom lupom od +20 dioptrija
- pregled kontaktnom lupom Volk trans equator na biomikroskopu Haag Streit BQ 900
- fotodokumentaciju na digitalnoj fundus kameri Zeiss Visucam lite (god. 2007.)
- fluoresceinsku angiografiju za dijabetičare na digitalnoj fundus kameri Zeiss Visucam lite (god. 2007.)

Promjene na fundusu analizirane su i standardizirane na temelju fluoresceinske angiografije, a podjela retinopatije izvršena je prema Arlie House klasifikaciji koja je primjenjena u multicentričnoj studiji " The Early Treatment Diabetic Retinopathy Study „ (ETDRS) (132).

Kvantitativna analiza IL-12 izvršena je u Odjelu za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku KBC Split.

Sve operacijske zahvate uradio je isti oftalmolog Očnog odjela Opće bolnice Dubrovnik. Očna vodica za analizu uzimala se tijekom operacije mrežnice. Kanilom se ručno aspiriralo 0,1-0,2 ml očne vodice u inzulinsku špricu te se uzorak prebacivao u kivete (Eppendorf, Hamburg, Germany) i nerazrijeđen zamrzavao u hladnjaku na - 80 °C. Neposredno pred početak operacije uzimao se uzorak krvi nakon kubitalne venepunkcije te se centrifugirao i zamrzavao na - 80 °C . Uzorci očne vodice i seruma su se transportirali u KBC Split na suhom ledu.

Mjerenje koncentracije IL-12 je rađeno uz pomoć uređaja za ELISA tehniku (Elisys Uno Human, Gesellschaft fur Biochemica und Diagnostica mbh, Wiesbaden, Germany).

Korištena su monoklonska protutijela protiv epitopa IL-12. Koncentracija IL-12 se određivala kolorimetrijski. Kvantitativna analiza IL-12 izvršena je u Odjelu za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku KBC Split.

### **c) Materijali**

Za mjerenje koncentracije IL-12 koristio se kit **IL-12+p40-EASIA** (Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay) **KAP1561**, BioSource Europe, Nivelles, Belgium.

### **d) Statistički postupci**

U analizi podataka korištene su metode opisne i inferencijske statistike.

Od parametara opisne statistike korišteni su: medijan i raspon (kod opisa kvantitativnih varijabli) te proporcija (kvalitativne varijable). Medijan je konzistentno korišten kao mjera centralne tendencije budući da su u nekim slučajevima razdiobe ispitivanih varijabli značajno odstupale od normalne razdiobe.

Glede postupaka inferencijske statistike, korišten je niz parametrijskih i neparametrijskih statističkih testova. Neparametrijski testovi korišteni su u slučaju kada preduvjeti normalnosti razdiobe ispitivane kvantitativne varijable nisu bili zadovoljeni. Normalnost razdiobe testirana je Kolmogorov-Smirnov testom.

Specifično, kod usporedbe koncentracija IL-12 u očnoj vodici korišten je neparametrijski Kruskal-Wallis test, a parovi skupina su naknadno analizirani Mann-Whitney U-testom uz korištenje Bonferoni korekcije.

Analiza koncentracije IL-12 u serumu, provedena je pak jednosmjernom analizom varijance (engl. *one-way ANOVA*).

Budući je Kolmogorov-Smirnov testom utvrđeno da razdioba koncentracije IL-12 u serumu kod različitih skupina ne odstupa značajno od normalne ( $p > 0,05$ ), u ovom je slučaju bilo moguće primijeniti osjetljiviji parametrijski test.

U korelacijskoj analizi korišteni su Pearsonov koeficijent korelacije (serumske koncentracije), te zbog odstupanja od normalnosti, Spearmanov koeficijent korelacije za analizu koncentracija IL-12 iz očne vodice.

Korištena je razina značajnosti od  $\alpha = 0,05$ . Sve statističke analize izrađene su u računalnom programu SPSS, verzija 13 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

## 4. REZULTATI

U studiju je bilo uključeno ukupno 76 ispitanika raspodijeljenih u 4 skupine. Ispitanika bez dijabetesa bilo je 24 (31,6%) (skupina 0); dijabetičara bez dijabetične retinopatije 12 (15,8%) (skupina 1); dijabetičara s neliječenom neproliferativnom dijabetičnom retinopatijom 23 (30,3%) (skupina 2) i dijabetičara s laserski liječenom neproliferativnom dijabetičnom retinopatijom 17 (22,3%) (skupina 3) (Tablica 1).

**Tablica 1. Prikaz broja ispitanika prema skupinama**

Ispitanici	Broj	Postotak
0	24	31,6
1	12	15,8
2	23	30,3
3	17	22,3
Ukupno	76	100,0

- 0 ispitanici bez dijabetesa
- 1 dijabetičari bez dijabetične retinopatije
- 2 dijabetičari s neliječenom dijabetičnom retinopatijom
- 3 dijabetičari s laserski liječenom dijabetičnom retinopatijom

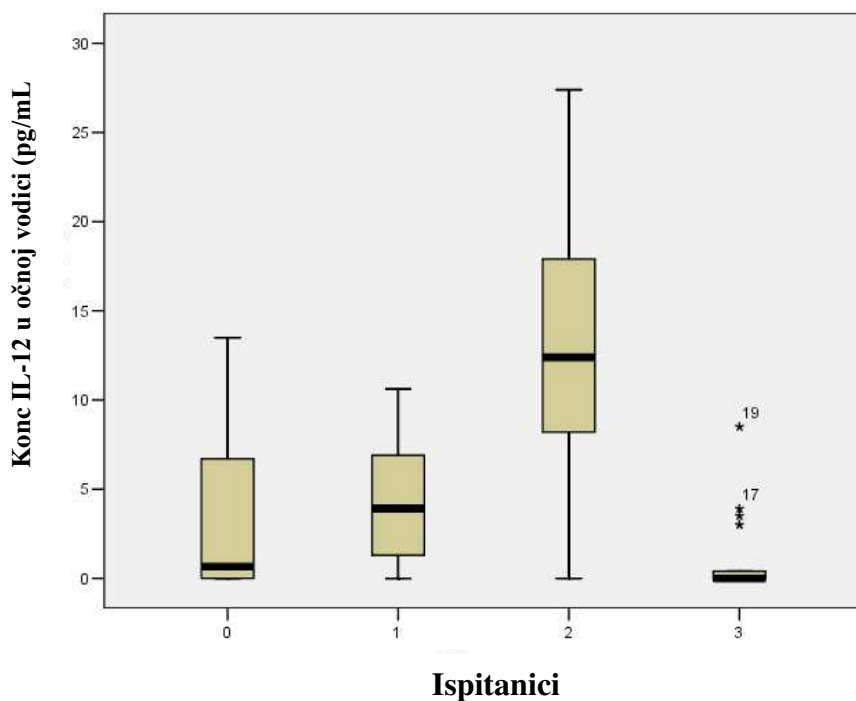
Usporedba koncentracije IL-12 u očnoj vodici između svih promatranih skupina izvedena je neparametrijskim Kruskal-Wallis testom.

Test je ukazao na postojanje značajne razlika između skupina ( $\chi^2(3,N=76)=27,137$ ;  $p=5,5*10^{-6}$ ), pri čemu je skupina s neliječenom dijabetičkom retinopatijom imala daleko najveće koncentracije IL-12 (Slika 1) (tablica 2).

Naknadnom usporedbom pojedinačnih parova, provedenom neparametrijskim Mann-Whitney U testom uz korištenje Bonferoni korekcije, potvrdilo se postojanje statistički značajne razlike između skupine s neliječenom dijabetičnom retinopatijom s jedne strane, te ispitanika bez dijabetesa ( $p=4,82E-06$ ), dijabetičara bez retinopatije ( $p=2,26E-04$ ), i skupine s laserski liječenom retinopatijom ( $p=1,20E-06$ ).

Smjer te razlike kao i njena klinička značajnost može se iščitati sa Slike 6.

Između ostalih skupina statistički značajne razlike nisu nađene ( $p$  od 0,12 do 0,265).

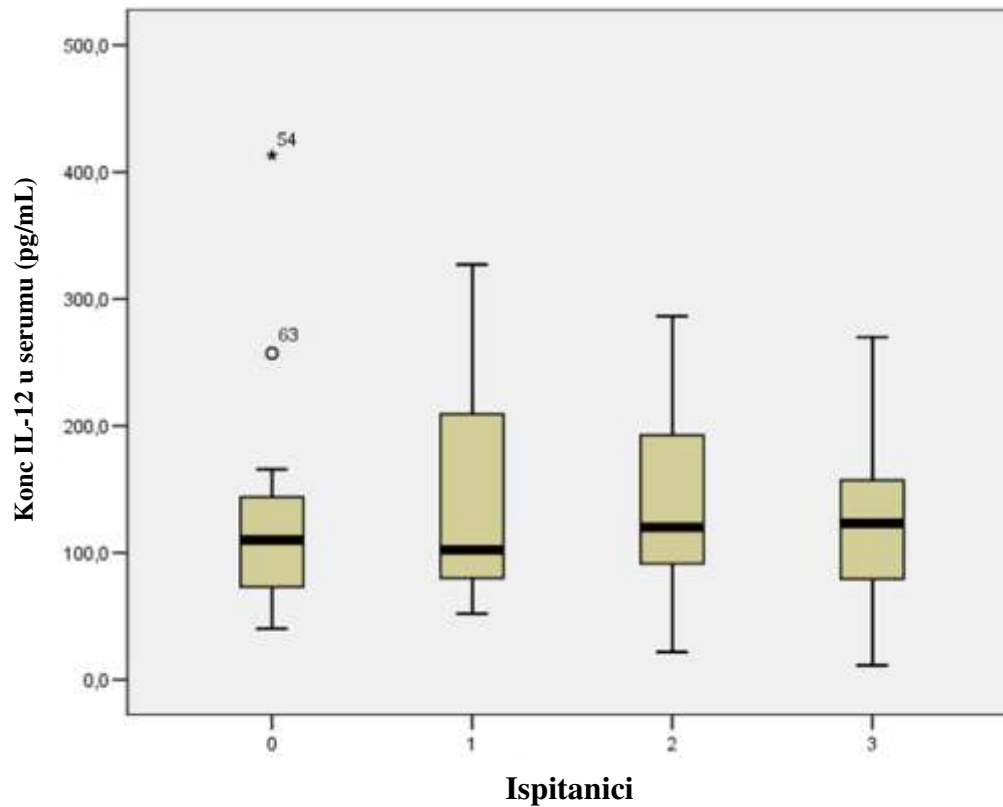


**Slika 6.** Koncentracija IL-12 u očnoj vodici kod 4 skupine ispitanika: 0-zdravi, 1- dijabetičari bez retinopatije, 2- dijabetičari s neliječenom retinopatijom, 3- dijabetičari s laserski liječenom retinopatijom

**Tablica 2. Vrijednosti IL-12 u očnoj vodici po skupinama**

<b>Ispitanici</b>	<b>Interleukin 12 u očnoj vodici</b>	<b>Izmjerene vrijednosti</b>	<b>Standardna pogreška</b>
<b>ispitanici bez dijabetesa</b>	Srednja vrijednost pg/mL	<b>3,08</b>	0,85
	Medijan pg/mL	0,65	
	Standardna devijacija	4,15	
	Minimum pg/mL	0,00	
	Maximum pg/mL	13,50	
	Raspon pg/mL	13,50	
	Interkvartilni raspon	6,80	
<b>dijabetičari bez retinopatije</b>	Srednja vrijednost pg/mL	<b>4,29</b>	0,98
	Medijan pg/mL	3,90	
	Standardna devijacija	3,39	
	Minimum pg/mL	0,00	
	Maximum pg/mL	10,60	
	Raspon pg/mL	10,60	
	Interkvartilni raspon	6,25	
<b>dijabetičari s neliječenom dijabetičnom retinopatijom</b>	Srednja vrijednost pg/mL	<b>12,85</b>	1,48
	Medijan pg/mL	12,40	
	Standardna devijacija	7,12	
	Minimum pg/mL	0,00	
	Maximum pg/mL	27,40	
	Raspon pg/mL	27,40	
	Interkvartilni raspon	10,10	
<b>dijabetičari s laserski liječenom retinopatijom</b>	Srednja vrijednost pg/mL	<b>1,15</b>	0,56
	Medijan pg/mL	0,00	
	Standardna devijacija	2,32	
	Minimum pg/mL	0,00	
	Maximum pg/mL	8,50	
	Raspon pg/mL	8,50	
	Interkvartilni raspon	1,70	

Rezultati jednosmjerne ANOVE s 4 različite skupine ispitanika i serumskom koncentracijom IL-12 kao zavisnom varijablom, pokazali su da u slučaju serumskih koncentracija ne postoje značajne razlike između skupina,  $F(3, 75)=0,405$ ,  $p=0,750$ . Takav nalaz potkrijepljen je i slikom 7 na kojoj su grafički prikazani parametri razdiobe IL-12 u serumu za 4 različite skupine, a izmjerene vrijednosti koncentracije IL-12 u serumu u tablici 3.



**Slika 7.** Koncentracija IL-12 u serumu kod 4 skupine ispitanika: 0 - zdravi, 1- dijabetičari bez renopatije, 2-dijabetičari s neliječenom retinopatijom, 3-dijabetičari s laserski liječenom retinopatijom .



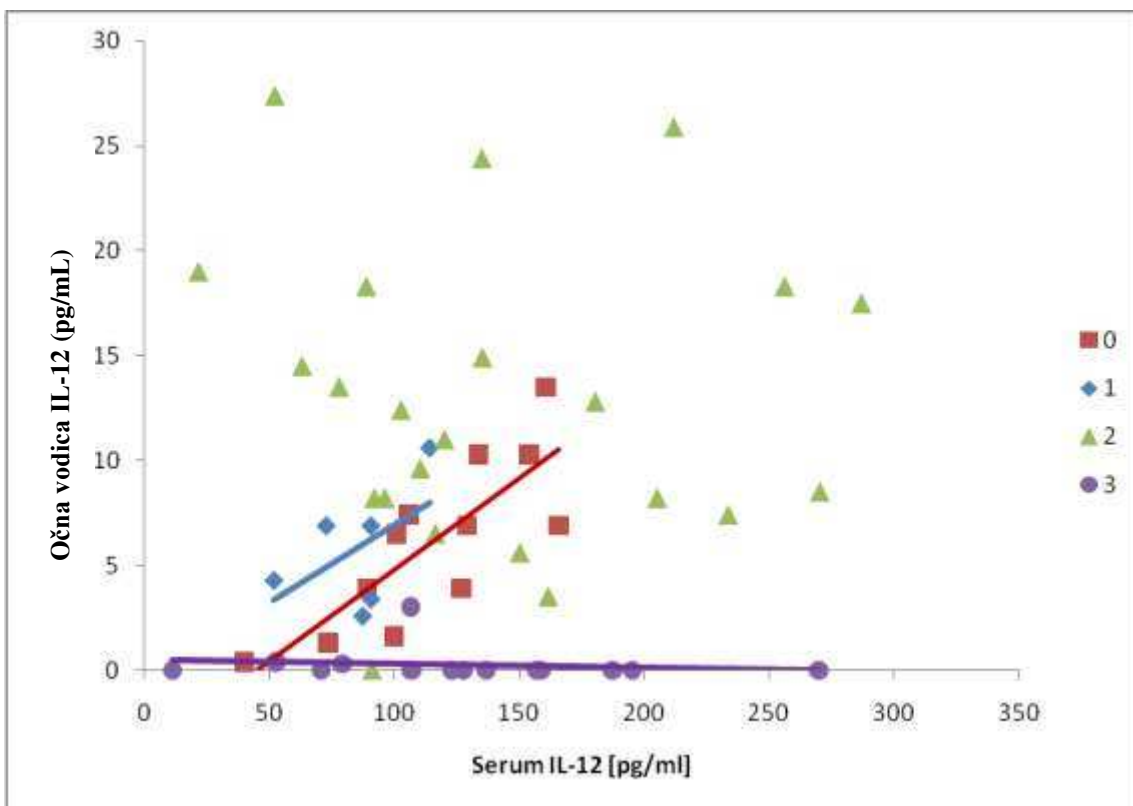
**Tablica 3. Vrijednosti IL-12 u serumu po skupinama**

<b>Ispitanici</b>	<b>Interlekin 12 u serumu</b>	<b>Izmjerene vrijednosti</b>	<b>Standardna pogreška</b>
<b>ispitanici bez dijabetesa</b>	Srednja vrijednost pg/mL	<b>124,94</b>	15,90
	Medijan pg/mL	110,20	
	Standardna devijacija	77,89	
	Minimum pg/mL	39,90	
	Maximum pg/mL	413,20	
	Raspon pg/mL	373,30	
	Interkvartilni raspon	76,08	
<b>dijabetičari bez retinopatije</b>	Srednja vrijednost pg/mL	<b>141,63</b>	26,34
	Medijan pg/mL	102,55	
	Standardna devijacija	91,24	
	Minimum pg/mL	51,70	
	Maximum pg/mL	326,90	
	Raspon pg/mL	275,20	
	Interkvartilni raspon	155,60	
<b>dijabetičari s neliječenom dijabetičnom retinopatijom</b>	Srednja vrijednost pg/mL	<b>141,60</b>	15,16
	Medijan pg/mL	120,00	
	Standardna devijacija	72,69	
	Minimum pg/mL	21,60	
	Maximum pg/mL	286,70	
	Raspon pg/mL	265,10	
	Interkvartilni raspon	114,10	
<b>dijabetičari s laserski liječenom retinopatijom</b>	Srednja vrijednost pg/mL	<b>119,80</b>	15,32
	Medijan pg/mL	123,00	
	Standardna devijacija	63,17	
	Minimum pg/mL	11,30	
	Maximum pg/mL	269,90	
	Raspon pg/mL	258,60	
	Interkvartilni raspon	82,80	

Analiza povezanosti koncentracija IL-12 u serumu i u očnoj vodici pokazala je da kod pacijenata bez dijabetesa postoji linearna povezanost između dvije varijable,  $p=0,003$  (slika 8) . To je dokaz da jedino zdrave osobe imaju intaktnu krvno-mrežničnu barijeru, a nemaju poremećenu lokalnu produkciju IL-12.

Za napomenuti je da je ovakva povezanost nađena nakon uklanjanja vrijednosti koje odskaču.

Kod neliječenih i liječenih pacijenata takva ovisnost pak nije utvrđena. Štoviše, iz slike 3 vidljivo je da su te vrijednosti IL-12 u oku skoro u potpunosti neovisne, pri čemu kod liječenih pacijenata vrijednost IL-12 u oku gotovo konstantno ima vrijednost 0, što ukazuje na izostanak „transporta IL-12“ između seruma i vodice.



Slika 8. Povezanost koncentracije IL-12 u serumu i očnoj vodici kod različitih skupina ispitanika 0-zdravi, 1-dijabetičari bez retinopatije, 2-dijabetičari s neliječenom retinopatijom, 3- dijabetičari s laserski liječenom retinopatijom

Svi ispitanici bili su stariji od 60 godina (od 61 do 89 godina). Srednja dob svih ispitanika bila je najniža u skupini s neliječenom retinopatijom i iznosila je 70,5 godina, a najviša u skupini bez dijabetesa. (Tablica 4).

U ispitavanju je više bilo žena i to 48 (62%), dok je muškaraca bilo 28 (38%) (Tablica 4).

**Tablica 4. Prikaz ispitanika prema dobi i spolu**

Varijabla	Skupine				Statistika
	Ispitanici bez dijabetesa (N=24)	Dijabetičari bez retinopatije (N=12)	Dijabetičari s neliječenom retinopatijom (N=23)	Dijabetičari s laseski liječenom retinopatijom (N=17)	
<b>Dob</b>	75.9 (63-89)	76.0 (61-87)	70.5 (61-83)	71.0 (61-80)	<i>p=0,043*</i>
<b>Spol</b>					
<b>Žene</b>	16 (67%)	10 (83%)	13 (57%)	9 (53%)	<i>X<sup>2</sup>=3,42 df=3 p=0,331 †</i>
<b>Muškarci</b>	8 (33%)	2 (17%)	10 (43%)	8 (47%)	

\*Kruskall-Wallis test

†Pearson  $\chi^2$  test

U svih ispitanika duljina trajanja dijabetesa, tj. vrijeme od postavljanje dijagnoze je dulje od deset godina. Najdulje trajanje je u skupini s neliječenom dijabetičnom retinopatijom – prosječno trajanje 22 godine i ta skupina ispitanika se statistički značajno razlikovala, po duljini trajanja dijabetesa, u usporedbi s ostale dvije skupine ( $p=0,001$ ) (tablica 5).

U skupini ispitanika bez dijabetične retinopatije 65% bilo je na peroralnoj terapiji antiglikemicima, a 35% na inzulinu. U skupini s razvijenom DR 82% ispitanika liječi se inzulinom, a u skupini s DR tretiranom laserom najviše ispitanika (66%) je na oralnim hipoglikemicima (tablica 5).

**Tablica 5. Prikaz trajanja dijabetesa u godinama i vrste terapije po skupinama ispitanika**

<i>Skupine ispitanika</i>					
	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	Statistika
<b>Duljina trajanja dijabetesa (god)</b>	0	16 (11-30)	22 (11-36)	13 (10-21)	<b><i>P=0,001</i></b>
<b>Terapija</b>					
<b>bez th</b>	24(100%)	-	-	-	
<b>dijeta</b>	-	-	-	2 (17%)	
<b>peroralna terapija</b>	-	15 (65%)	3 (18%)	8 (66%)	
<b>inzulin</b>	-	8 (35%)	14 (82%)	2 (17%)	
<b>Duljina trajanja terapije (god)</b>	-	14 (0-30)	13 (3-29)	13 (6-21)	

Kruskall-Wallis test

- 0 ispitanici bez dijabetesa
- 1 dijabetičari bez dijabetične retinopatije
- 2 dijabetičari s neliječenom dijabetičnom retinopatijom
- 3 dijabetičari s laserski liječenom dijabetičnom retinopatijom

Svi ispitanici bez dijabetesa imali su negativnu obiteljsku anamnezu za šećernu bolest. Pozitivnu obiteljsku anamnezu imali su dijabetičari bez dijabetične retinopatije u 35 %, dijabetičari s neliječenom dijabetičnom retinopatijom 41 %, dok oni s liječenom retinopatijom 47 % ( Tablica 6).

Pozitivna obiteljska anamneza statistički se značajno razlikovala u dijabetičara bez dijabetične retinopatije u usporedbi s dijabetičarima koji su imali razvijenu dijabetičnu retinopatiju liječenu ili neliječenu  $X^2=31,33$   $df=6$   $p<0,001$ .

**Tablica 6. Prikaz obiteljske anamneze po skupinama**

Varijabla	Skupine				Statistika
	Ispitanici bez dijabetesa (N=24)	Dijabetičari bez retinopatije (N=12)	Dijabetičari s neliječenom retinopatijom (N=23)	Dijabetičari s laserski liječenom retinopatijom (N=17)	
<b>Obiteljska anamneza</b>					
<b>Negativna</b>	24 (100%)	15 (65%)	7 (59%)	3 (18%)	<b>X<sup>2</sup>=31,33 df=6 p&lt;0,001</b>
<b>Roditelji</b>	-	4 (18%)	4 (33%)	8 (47%)	
<b>Rodaci</b>	-	4 (17%)	1 (8%)	6 (35%)	

Pearson  $\chi^2$  test

Većina ispitanika uključenih u studiju bili su nepušači, a u skupini bez retinopatije svi su bili nepušači. Nije bilo statistički značajne razlike prema pušenju između skupina (Tablica 7).

Analizirajući tjelesni indeks mase (BMI) svi ispitanici imali su indeks veći od 25,0 . Tjelesni indeks mase koristi se kao pokazatelj stupnja uhranjenosti, a predstavlja omjer tjelesne mase u kilogramima i kvadrata visine u metrima.

$$\text{BMI} = m/h^2$$

Ovaj parametar koristi se vrlo često, ali ima svoje manjkavosti jer ne mjeri postotak tjelesne masti.

Prava mjera uhranjenosti je omjer masnog i mišićnog tkiva. Prema vrijednostima BMI osoba može biti gojazna, a imati uredan BMI, a isto tako imati prekomjernu tjelesnu masu i ne biti gojazna. Primjer za to su neaktivne osobe koje imaju višak masnog tkiva i uredan BMI ili sportaši s visokim BMI i visokim udjelom mišićnog tkiva.

Najmanji BMI imali su ispitanici bez dijabetesa 25.9, a najveći ispitanici bez DR. Ispitanici oboljeli od dijabetesa imali su statistički značajno veći BMI u usporedbi s ispitanicima bez dijabetesa  $P=0,006$  (Tablica 7). Usporedbom ispitanika s dijabetičnom retinopatijom s ispitanicima bez DR i laseriranim ispitanicima nisu nađene statistički značajne razlike između skupina.



**Tablica 7. Prikaz navike pušenja i tjelesnog indeksa mase po skupinama**

Varijabla	Skupine				Statistika
	Ispitanici bez Dijabetesa (N=24)	Dijabetičari bez retinopatije (N=12)	Dijabetičari s neliječenom retinopatijom (N=23)	Dijabetičari s liječenom retinopatijom (N=17)	
<b>Pušenje</b>					
<b>Nepušač</b>	20 (83%)	12 (100%)	18 (78%)	10 (59%)	<i><math>\chi^2=8,86</math> <math>df=6</math> <math>p=0,182</math> † 1 (6%)</i>
<b>Pušač</b>	3 (13%)	-	5 (22%)	6 (35%)	
<b>Bivši pušač</b>	1 (4%)		-		
<b>BMI(kg/m<sup>2</sup>)</b>					
	25,7(19,5-34,1)	29,44(22,3-33,5)	28,13 (23,8-32,4)	28,95 (22,58-37,2)	<i><math>p=0,006</math>*</i>

†Pearson  $\chi^2$  test

\*Kruskall- Wallis test

Vrijednosti glukoze u krvi statistički su se značajno razlikovale između skupina  $p < 0,001$ . Najveći nivo GUK-a u skupinama dijabetičara imali su ispitanici s liječenom DR, a najmanji ispitanici bez DR.

Vrijednosti glikoziliranog hemoglobina podudara se s dobivenim vrijednostima glukoze u krvi i statistički se značajno razlikuje između skupina ispitanika  $p < 0,001$ . (Tablica 8).

**Tablica 8. Vrijednosti GUK.a i glikoziliranog hemoglobina po skupinama**

Varijabla	Skupine				Statistika
	Ispitanici bez dijabetesa (N=24)	Dijabetičari bez retinopatije (N=12)	Dijabetičari s neliječenom retinopatijom (N=23)	Dijabetičari s liječenom retinopatijom (N=17)	
<b>GUK</b> (mmol/L)	5,2 (4,0-6,3)	7,5 (5,2-17,1)	9,5 (5,3-17,7)	10,3 (7,2-20,8)	$p < 0,001$
<b>HbA<sub>1c</sub></b> (%)	5,5 (4,2-5,9)	7,0 (5,1-12,7)	7,4 (5,3-12,4)	8,5 (7,2-11,4)	$p < 0,001$

Kruskall-Wallis test

Analizirane su i vrijednosti masnoća u krvi po skupinama ( Tablica 9). Srednje vrijednosti triglicerida bile su od 1,5 do 2,3 mmol/L.

Najmanje izmjerene su u ispitanika bez dijabetesa, a najveće u dijabetičara bez retinopatije. Nije bilo statistički značajne razlike između četiri skupine ispitanika  $p=0,055$ .

Srednje vrijednosti kolesterola bile su od 4,9 do 6,4 mmol/L, a nije bilo statistički značajne razlike između promatranih skupina  $p=0,342$ .

Srednje vrijednosti HDL kolesterola bile su vrlo ujednačene između skupina, s najnižom vrijednosti u skupini s laserski liječenom retinopatijom, a najvišom u ispitanika bez dijabetesa.

Nije bilo statistički značajne razlike između promatranih skupina  $p=0,903$ .

Srednje vrijednosti LDL kolesterola također se nisu statistički značajno razlikovale između skupina  $p=0,365$ , a iznosile su od 3,2 mmol/L do 3,9 mmol /L.

**Tablica 9. Prikaz nivoa masnoća u krvi prema skupinama**

Varijabla	Skupine				Statistika
	Ispitanici bez dijabetesa (N=24)	Dijabetičari bez retinopatije (N=12)	Dijabetičari s neliječenom retinopatijom (N=23)	Dijabetičari s liječenom retinopatijom (N=17)	
<b>Trigliceridi (mmol/L)</b>	1,5 (0,8-2,8)	2,3 (1,3-3,5)	2,0 (0,4-4,7)	1,6 (0,7-4,4)	<i>p=0,055</i>
<b>Kolesterol (mmol/L)</b>	5,9 (4,4-8,2)	6,4 (4,2-7,7)	4,9 (1,4-8,6)	5,4 (3,5-8,9)	<i>p=0,342</i>
<b>HDL kolesterol (mmol/L)</b>	1,5 (1,0-2,3)	1,4 (1,1-1,8)	1,4 (0,9-2,3)	1,3 (0,9-2,6)	<i>p=0,903</i>
<b>LDL kolesterol (mmol/L)</b>	3,8 (1,8-5,7)	3,9 (2,2-5,3)	3,3 (0,9-5,9)	3,2 (1,3-25)	<i>p=0,365</i>

Kruskall -Wallis test

Kako novija istraživanja šećernu bolest povezuju s upalom analizirani su i pokazatelji upale u serumu ispitanika i to: sedimentacija eritrocita, CRP i fibrinogen (Tablica 10).

Vrijednosti sedimentacije eritrocita bile su od 15 do 20 i nisu se statistički značajno razlikovale između skupina  $p = 0,097$ .

Izmjerene vrijednosti CRP najmanje su bile u skupini dijabetičara s liječenom dijabetičnom retinopatijom, a najveće u skupini dijabetičara s neliječenom dijabetičnom retinopatijom, ali se statistički nisu značajno razlikovale  $p = 0,817$ .

Dobivene vrijednosti fibrinogena u serumu nisu se statistički značajno razlikovale između skupina  $p = 0,262$ .

**Tablica 10. Prikaz upalnih parametara u serumu po skupinama**

Varijabla	Skupine				Statistika
	Ispitanici bez dijabetesa (N=24)	Dijabetičari bez retinopatije (N=12)	Dijabetičari s neliječenom retinopatijom (N=23)	Dijabetičari s liječenom retinopatijom (N=17)	
<b>Sedimentacija (mm/h)</b>	15 (5-34)	20 (4-45)	16 (6-37)	20 (8-40)	$p=0.097$
<b>CRP (mg/L)</b>	3,0 (0,0-9,1)	2,6 (0,5-16,9)	3,1 (0,1-17,3)	1,8 (0,1-13)	$p=0.819$
<b>Fibrinogen (g/L)</b>	3,7 (2,2-5,4)	3,9 (3,3-4,7)	3,8 (2,4-5,8)	4,1 (3,0-4,9)	$p=0.262$

Kruskall-Wallis test

U tablici 11 prikazani su svi ispitanici podijeljeni u dvije skupine i to obzirom na postojanje dijabetesa.

U jednoj skupini su ispitanici bez dijabetesa, a druga skupina obuhvaća tri skupine ispitanika zajedno: skupinu 1 ispitanike s dijabetesom bez dijabetične retinopatije, skupinu 2 s razvijenom ali neliječenom dijabetičnom retinopatijom i skupinu 3 s razvijenom i laserski liječenom DR.

Sve varijabele uspoređene su između te dvije skupine ispitanika i vidljivo je da se dijabetičari prema nedijabetičarima statistički značajno razlikuju prema nivou glukoze, glikoziliranom hemoglobinu i tjelesnom indeksu mase. Vrijednos sedimentacije je 0,05, a u svim ostalim promatranim varijablama nema statistički značajne razlike.

**Tablica 11. Usporedba dijabetičara i nedijabetičara prema svim promatranim varijablama**

Varijabla	Skupine		Statistika
	Dijabetičari Skupine 1+2+3 (N=52)	Ispitanici bez dijabetesa (N=24)	
Dob (god)	72(61-87)	75.9 (63-89)	$p=0,112^*$
<b>Spol</b>			
Žene	32(62%)	16 (67%)	$X^2=0,092$ $df=1 p=0,802^†$
Muškarci	20(28%)	8 (33%)	
<b>Pušenje</b>			
Nepušač	40(77%)	20 (83%)	$X^2=0,979$ $df=2 P=0,613^†$
Pušač	11(21%)	3 (13%)	
Bivši pušač	1(2%)	1 (4%)	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.6(22.3-37.2)	25.7 (19.5-34.1)	$p=0,001^*$
Sedimentacija(mm/h)	19(4-45)	15 (5-34)	$p=0,050^*$
GUK (mmol/L)	9.9(5.2-20.8)	5.2 (4.0-6.3)	$p=1,46*10^{-10^*}$
Hba1c (%)	7.9(5.1-12.7)	5.5 (4.2-5.9)	$p=2,83*10^{-10^*}$
Trigliceridi (mmol/L)	2.0(0.4-4.7)	1,5 (0.8-2.8)	$p=0,068^*$
Kolesterol (mmol/L)	5.8(1.4-8.9)	5,9 (4.4-8.2)	$p=0,480^*$
HDL kolesterol(mmol/L)	1.4(0.9-2.6)	1.5 (1.0-2.3)	$p=0,370^*$
LDL kolesterol(mmol/L)	3.4(0.9-25)	3.8 (1,8-5.7)	$p=0,304^*$
CRP (mg/L)	2.7(0.1-17.3)	3.0 (0.0-9.1)	$p=0,597^*$
Fibrinogen (g/L)	3.9(2.4-5.8)	3.7 (2.2-5.4)	$p=0,191^*$

†Pearson  $\chi^2$  test

\*Kruskall-Wallis test

U tablici br 12. prikazana je usporedba dijabetičara s razvijenom retinopatijom i skupina bez razvijene retinopatije.

Skupina dijabetičara s razvijenom retinopatijom obuhvaća dvije skupine ispitanika : dijabetičare s neliječenom retinopatijom ( skupina 2) i dijabetičare s laserski liječenom retinopatijom ( skupina 3).

Vidljivo je da se skupina ispitanika s razvijenom DR statistički značajno razlikuje prema skupini u koje dijabetična retinopatija nije razvijena prema dobi i duljini trajanja dijabetesa i glikoziliranom hemoglobinu, a nema statistički značajne razlike prema svim ostalim promatranim varijablama.



Tablica br 12. Usporedba dijabetičara s retinopatijom i bez retinopatije

Varijabla	Skupine		Statistika
	Dijabetičari s retinopatijom Skupina 2+3 (N=40)	Dijabetičari bez retinopatije Skupina 1 (N=12)	
Dob	71(61-83)	76.0 (61-87)	<i>P=0,024*</i>
Žene	22(55%)	10 (83%)	$\chi^2=3.131$ df=1 <i>p=0,077†</i>
Muškarci	18(45%)	2 (17%)	
Duljina trajanja dijabetesa	20(11-36)	13 (10-21)	<i>p=0,002*</i>
Duljina trajanja terapije	14(0-30)	13 (6-21)	<i>p=0,579*</i>
<b>Obiteljska anamneza</b>			
Negativna	18(45%)	7 (59%)	$\chi^2=1.314$ df=2 <i>p=0,518†</i>
Roditelji	2(30%)	4 (33%)	
Rođaci	9(23%)	1 (8%)	
<b>Pušenje</b>			
Nepušač	28(70%)	12 (100%)	$\chi^2=4.680$ df=2 <i>p=0.096†</i>
Pušač	11(28%)	-	
Bivši pušač	1(2%)	-	
BMI	28.4(22.6-37.2)	29,44 (22,3-35,3)	<i>p=0,578*</i>
Sedimentacija	17.0(6.0-40.0)	20 (4-45)	<i>p=0,258*</i>
GUK	10.2(5.3-20.8)	7,5 (5,2-17,1)	<i>p=0,182*</i>
Hba1c	8.3(5.3-12.4)	7,0 (5,1-12,7)	<i>p=0,022*</i>
Trigliceridi	1.8(0.4-4.7)	2,3 (1,3-3,5)	<i>p=0,182*</i>
Kolesterol	5.3(1.4-8.9)	6,4 (4,2-7,7)	<i>p=0,146*</i>
HDL kolesterol	1.4(0.9-2.6)	1,4 (1,1-1,8)	<i>p=0,712*</i>
LDL kolesterol	3.2(0.9-25.0)	3,9 (2,2-5,3)	<i>p=0,158*</i>
CRP	2.7(0.1-17.3)	2,6 (0,5-16,9)	<i>p=0,720*</i>
Fibrinogen	3.9(2.4-5.8)	3,9 (3,3-4,7)	<i>p=0,712*</i>

†Pearson  $\chi^2$  test

\*Kruskall-Wallis test

Analizirajući korelaciju koncentracije IL-12 u serumu i očnoj vodici s uobičajenim čimbenicima rizika nije pronađena statistički značajna korelacija za dob, trajanje dijabetesa, BMI, sistolički tlak, HDL kolesterol, trigliceride i pušenje (tablice 13 i 14).

**Tablica 13. Korelacija koncentracija IL-12 u serumu i uobičajenih čimbenika rizika**

<i>Varijabla</i>	<i>IL-12 u serumu</i> <i>p</i>
dob (god)	<i>0,255</i>
spol	<i>0,158</i>
trajanje dijabetesa (god)	<i>0,952</i>
duljina pušenja (god)	<i>0,176</i>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	<i>0,190</i>
sistolički tlak (mm Hg)	<i>0,620</i>
ukupni kolesterol (mmol/L)	<i>0,855</i>
HDL kolesterol (mmol/L)	<i>0,204</i>
trigliceridi (mmol/L)	<i>0,536</i>

Kruskall - Wallis test

**Tablica 14. Korelacija koncentracija IL-12 u očnoj vodici i uobičajenih čimbenika rizika**

<i>Varijabla</i>	<i>IL-12 u očnoj vodici</i> <i>P</i>
dob (god)	<i>0,156</i>
spol	<i>0,158</i>
trajanje dijabetesa (god)	<i>0,296</i>
duljina pušenja (god)	<i>0,821</i>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	<i>0,290</i>
sistolički tlak (mm Hg)	<i>0,991</i>
ukupni kolesterol (mmol/L)	<i>0,675</i>
HDL - kolesterol (mmol/L)	<i>0,725</i>
trigliceridi (mmol/L)	<i>0,093</i>

Kruskall-Wallis test

Usporedba koncentracije pokazatelja upale (SE, CRP i fibrinogen) i koncentracije IL-12 u serumu i očnoj vodici prikazane su u tablici br 15 i 16 i ne pokazuju statistički značajne razlike ni po jednom parametru za očnu vodicu, a za serum samo za sedimentaciju eritrocita.

**Tablica 15. Korelacija koncentracija IL-12 u serumu i pokazatelja upale**

<i>Varijabla</i>	<i>IL-12 u serumu</i> <i>p</i>
SE (mm/h)	<i>p=0,005</i>
CRP (mg/L)	<i>p=0,067</i>
fibrinogen ( g/L)	<i>p=0,266</i>

Kruskall-Wallis test

**Tablica 16. Korelacija koncentracija IL-12 u očnoj vodici i pokazatelja upale**

<i>Varijabla</i>	<i>IL-12 u očnoj vodici</i> <i>p</i>
SE (mm/h)	<i>p=0,416</i>
CRP (mg/L)	<i>p=0,370</i>
fibrinogen ( g/L)	<i>p=0,153</i>

Kruskall-Wallis test

## 5. RASPRAVA

Poznato je da je dugotrajna i neregulirana hiperglikemija najjači rizični čimbenik u nastanku DR (16, 17). U praksi se ipak mogu vidjeti pacijenti s dugotrajnim i nereguliranim vrijednostima GUK-a, a bez znakova DR. Tako se kod osoba s visokom kratkovidnošću rijetko mogu vidjeti teži oblici DR, a najviše zbunjuju razlike u stupnju DR između oba oka iste osobe bez anatomskih i funkcionalnih razlika karotidnih i vertebralnih krvnih žila.

Sve navedeno kliničara navodi na razmišljanje o poremećaju homeostaze u oku, koje je kao organ, uz postojanje krvno-mrežnične barijere „zaštićeno“ od okolnih utjecaja. Navedeni nesrazmjer rizičnih čimbenika i kliničke slike bio je poticaj za izradu ovog istraživanja koje je trajalo od 2006. do 2010. g

U našem istraživanju uključeno je 76 ispitanika podijeljenih u četiri skupine: 24 ispitanika bez dijabetesa, 12 dijabetičara bez dijabetične retinopatije, 23 dijabetičara s neliječenom neproliferativnom dijabetičnom retinopatijom i 17 dijabetičara s laserski liječenom dijabetičnom retinopatijom. Ukupna prosječna dob svih ispitanika bila je 73,5 godine, najmlađi je imao 61 godinu, a najstariji 89 godina, s nešto većim udjelom žena (62%).

U svih ispitanika analizirana je koncentracija IL - 12 u serumu i u očnoj vodici. Iako je predmet analize bio povezanost IL-12 s dijabetičnim komplikacijama izraženim na mrežnici, u ovom radu analizirana je koncentracija IL-12 u očnoj vodici, a ne u staklovini.

Postoje radovi koji dokazuju da koncentracija IL-12 u očnoj vodici kod oboljelih od uveitisa korelira onoj u staklovini i time odražava upalno stanje na mrežnici (151), a i analize koncentracija u staklovini i očnoj vodici drugih citokina potvrđuje tu korelaciju (152, 153). Uzimanje uzorka očne vodice je jednostavnije, a pri operacijskom zahvatu mrežnice pacijenta ne izlažemo nikakvom dodatnom agresivnom postupku.

Naša je studija, prema dostupnoj literaturi, prva dokazala statistički značajno veću koncentraciju proupalnog citokina IL-12 u očnoj vodici kod bolesnika s neliječenom DR (medijan 12,40 pg/mL) u odnosu na dijabetičare bez DR (medijan 3,90 pg/mL), dijabetičare s laserski liječenom DR (medijan 0,00 pg/mL) i ispitanike bez dijabetesa (medijan 0,65 pg/mL).

Naše istraživanje je prvo koje je ukazalo da je neliječena dijabetična retinopatija praćena značajno povećanom sintezom i sekrecijom IL-12 u očnoj vodici.

Najmanje vrijednosti IL-12 u očnoj vodici izmjerene su u ispitanika s laserskom fotokoagulacijom mrežnice, a kako fotokoagulacija smanjuje površinu vitalne mrežnice može se zaključiti da je upravo poremećen mrežnični metabolizam uzrok povećane koncentracije IL-12 u očnoj vodici. Drugi mogući zaključak je da je laserski fotokoagulacijski učinak takav da se jatrogenim uništavanjem djelova mrežnice uništavaju i stanice koje luče upalne citokine. Fotokoagulacija mrežnice diodnim mikropulsnim laserom, koji je korišten kod ispitanika iz ove studije, uglavnom uništava RPE s minimalnim učinkom na okolne strukture, pa je moguće da su upravo stanice RPE one koje luče ovaj proupalni citokin.

Navode se mnoge funkcije humanog mrežničnog pigmentnog epitela (hRPE). Willerman i sur. su u svom radu ispitivali ekspresiju kostimulatorne molekule CD 40 u mirujućem i aktiviranom hRPE i dokazali da aktivirane stanice hRPE luče IL-12 (154).

Serumske koncentracije IL-12 se nisu statistički značajno razlikovale među ispitanim skupinama, pa možemo s priličnom sigurnošću govoriti o lokalnoj sintezi i sekreciji. Medijan izmjerenih vrijednosti IL-12 u serumu zdravih ispitanika je 110,20 pg/mL, ispitanika bez DR 102,55 pg/mL, ispitanika s neliječenom DR 120,00 pg/mL i ispitanika s laserski liječenom DR 123,00 pg/ mL.

Linearna korelaciju između izmjerenih vrijednosti seruma i očne vodice nađena je samo kod osoba koje ne boluju od dijabetesa. To je dokaz da jedino zdrave osobe imaju intaktnu krvno-mrežničnu barijeru, a nemaju poremećenu sintezu i povećanu lokalnu produkciju IL-12.

Povezanost proupalnog citokina IL-12 u serumu dijabetičara i dijabetične retinopatije prvi put se u literaturi spominje 1998. godine u studiji u kojoj su Winkler i suradnici pokazali statistički značajnu razliku koncentracija IL-12 u serumu dijabetičara oba tipa u usporedbi s nedijabetičarima, kao i veće koncentracije IL-12 u dijabetičara s razvijenom retinopatijom u usporebi onih bez retinopatije. Ti rezultati se ne podudaraju s rezultatima naše studije, ali Winkler i sur. u svojoj studiji nisu ispitanike razdvajali po stupnju oštećenja na mrežnici, pa nepodudarnost među rezultatima navedenih studija može biti zbog nejednake rasprostranjenosti mikroangiopatije kod uključenih ispitanika. Koncentracije serumskog IL-12 između dijabetičara tipa 1 i 2 u Winklerovoj studiji pokazale su veću koncentraciju IL-12 u serumu ispitanika tipa 1 ali se statistički nisu značajno razlikovale. Taj rezultat ne možemo usporediti jer svi ispitanici u našoj studiji bili su tipa 2.

Nakon Winklerove studije objavljena su samo četiri rada i to tri za dijabetes tipa 1 (111- 113) i jedan za tip 2 (114), ali u svim radovima analizirana je koncentracija IL-12 samo u serumu.

Khalifa i sur. (114) u svom radu iznose statistički značajnu razliku serumskog IL-12, interferon-induciranog proteina 10 (IP-10) i IL-18 u ispitanika s PDR u usporedbi s ispitanicima s NDR, kao i sa zdravim osobama što može biti još jedan dokaz da je serumska koncentracija proupalnih citokina povezana sa sistemskom proširenošću dijabetične mikroangiopatije za koju se može očekivati da bude najjača kod bolesnika s najtežim proliferativnim oblikom dijabetične retinopatije. Analizirali su i potvrdili pozitivnu povezanost serumske koncentracije IL-12 s vrijednostima glikoziliranog hemoglobina, a ostale rizične čimbenike nisu ni razmatrali.

Zorena i sur. u svojim radovima su dokazali najveće serumske koncentracije IL-12 u dijabetičara tipa 1 s razvijenom dijabetičnom retinopatijom. Statistički su se značajno razlikovale u usporedbi sa zdravim ispitanicima, ali nije bilo statistički značane razlike prema dijabetičarima tipa 1 bez retinopatije (111- 113). Uspoređivali su i koncentracije citokina IL-6 i TNF- $\alpha$  koje su veće u ispitanika s razvijenom DR, a u jednom radu (113) su se osvrnuli na omjer citokina TNF- $\alpha$  i IL- 12 u serumu kod dijabetičara tipa 1. U tom radu autori zaključuju kada postoji ravnoteža između koncentracija TNF- $\alpha$  i IL- 12 u serumu ispitanici ne razvijaju DR.

U svim radovima koji proučavaju dijabetičnu retinopatiju želi se pronaći uzrok oštećenja vaskularne retinalne barijere i okluzije retinalnih krvnih žila, ali unatoč brojnim studijama i patofiziološkim objašnjenjima točan mehanizam nastanka komplikacija u šećernoj bolesti do danas nije jasan (21).

Spominje se nekoliko biokemijskih teorija, kao što je povećano stvaranje i nakupljanje sorbitola (19), krajnjih produkata glikozilacije i povećane koncentracije diaglicerola (20), ali i utjecaj citokina (103). Povećane vrijednosti sistemskih pokazatelja upale nađene su u osoba oboljelih od dijabetesa, ali nisu česti radovi koji ih uspoređuju s dijabetičnom retinopatijom (102).

Schmidt i kolege (108) su koristeći se podacima "Atherosclerosis Risk in Communities Study " prvi pokazali da različiti pokazatelji upale uključujući leukocite, fibrinogen i sijalinsku kiselinu, predskazuju razvoj dijabetesa tipa 2 u populaciji srednje dobi.

Korelacijska analiza u ovoj studiji nije pokazala statistički značajnu povezanost koncentracije IL-12 u serumu s konvencionalnim čimbenicima rizika (spol, dob, trajanje dijabetesa, pušenje, BMI, sistolički krvni tlak, kolesterol, trigliceridi) što je sukladno rezultatima koje su objavili Winkler i sur., koji također nisu našli korelaciju IL-12 s duljinom trajanja bolesti (110).



S druge strane Schram i sur. su u svojoj case control studiji našli da su proupalni pokazatelji (CRP, IL-6 i TNF- $\alpha$ ) u dijabetičara povezani sa spolom, trajanjem dijabetesa, kontrolom glikemije, BMI - om , HDL kolesterolom, trigliceridima i sistoličkim krvnim tlakom (109). Autori navode činjenicu da adipociti mogu proizvoditi IL-6 i TNF- $\alpha$  i da su studije na normoglikemičarima (155-161) i dijabetičarima tipa 2 (162, 163) pokazale pozitivnu vezu između tjelesne mase i upalne aktivnosti, što se nije potvrdilo u ovoj studiji.

BMI prikazuje odnos mase i visine tijela, međutim ne uzima u obzir tjelesnu građu, postotak masnog tkiva, mišićnu i koštanu masu, kao ni dob, pa nije potpuno točan kriterij u procjeni debljine, već je točniji kao statistička mjera uhranjenosti. Svi pacijenti u ovoj studiji imali su BMI >25.0, pa bi prema klasifikaciji WHO bili u kategoriji prekomjerne tjelesne mase, bilo umjerene, bilo u kategoriji pretilosti. Preporuke i kategorizacija BMI razlikuju se od države do države ovisno o tipu građe tijela, tako da su Azijati, zbog niskog rasta s BMI većim od 23,5 već vidljivo preuhranjeni, a s BMI 27,5 očigledno pretili obzirom na svoju tjelesnu građu i proporcije. Nije poznato da su izrađene posebne preporuke u klasifikaciji pretilosti prema BMI u Hrvata.

U našoj studiji nije dokazana povezanost BMI s IL-12, što navodi i Zorena u svom radu (113), ali u Schramovoj studiji (109) povezanost postoji sa svim promatranim pokazateljima upale (IL-6, TNF i CRP). BMI je kao indeks neprecizan za osobnu procjenu pretilosti, posebno za udio masti koja se navodi u povezanosti s koncentracijom interleukina, pa je to mogući razlog izostanka korelacije u ovoj studiji. Iako se u većini studija koristi BMI točnije rezultate dali bi indeksi koji određuju odnos masti prema mišićnom tkivu.

Jaku povezanost razine triglicerida i HDL kolesterola (negativna sprega), s upalnom aktivnosti navodi Schram u svojoj studiji za dijabetičare (109), ali postoje radovi koji navode povezanost i za nedijabetičare (160, 161). Nepovoljne promjene u profilu lipida autori smatraju triggerima u stvaranju pjenušavih stanica u zidu arterija, pa mogu pojačati stanje upale u osoba oboljelih od dijabetesa . Takva povezanost u ovoj studiji nije dokazana.

Povezanost sistoličkog krvnog tlaka sa serumskom koncentracijom IL-12 u našoj studiji nije dokazana, za razliku od Shrama i suradnika (109) koji su tu povezanost našli sa svim pokazateljima upale. Visoki sistolički tlak oštećuje endotelne stanice i vaskularno tkivo, te na taj način inducira upalni odgovor, a slične veze između upale i sistoličkog tlaka su nađene i u populacijskim studijama (164). Moguće da je dobra izreguliranost krvnog tlaka pred operacijski zahvat kod pacijenata ove studije razlog nekorelacije sa serumskim IL-12.

U našoj studiji ne postoji statistički značajna korelacija pušenja s vrijednostima IL-12, a Zorena (111-113) i Khalifa (114) tu korelaciju nisu ni istraživali.

Korelacijska analiza nije pokazala statistički značajnu povezanost koncentracije IL-12 u očnoj vodici s konvencionalnim čimbenicima rizika (spol, dob, trajanje dijabetesa, BMI, pušenje, krvni tlak, kolesterol, trigliceridi), kao ni s pokazateljima upale (SE, CRP, fibrinogen), jednako kao i u korelaciji navedenih čimbenika sa serumskim vrijednostima IL-12 u ovoj studiji, a kako nije bilo sličnih studija usporedba s drugim studijama nije moguća.

Razlozi nepovezanosti koncentracije IL-12 u očnoj vodici s konvencionalnim čimbenicima rizika i pokazateljima upale mogli bi biti zbog postojanja krvno-mrežnične barijere, kao i činjenice da je za mrežničnu cirkulaciju poznato postojanje autoregulacije protoka koje je neovisno o fluktuacijama krvnog tlaka.

Korelacija konvencionalnih čimbenika rizika s DR u ovoj studiji je bio sporedni cilj istraživanja i pokazao je statistički značajnu povezanost DR s vrijednostima GUK a , HbA<sub>1c</sub> i trajanja DM, dok sa svim ostalim promatranim čimbenicima ta povezanost nije nađena.

Neregulirana hiperglikemija spominje se kao najjači rizični čimbenik za DR (16, 17, 89), a to potvrđuju i rezultati ove studije . U literaturi se navodi pozitivna korelacija DR kod mlađih bolesnika tipa 1 DM s porastom dobi (165, 166), za razliku od dijabetičara starije dobi i tipa 2 u kojih takva povezanost nije dokazana (72, 167), kao što nije dokazana ni i u ovoj studiji.

Epidemiološke studije ne pokazuju značajnu razliku u prevalenciji i progresiji DR među spolovima (72), kao i ovoj studiji, dok je veća učestalost PDR utvrđena u skupini mlađih muškaraca u odnosu na žene (166).

Poznato je da incidencija pojave DR raste s duljinom trajanja dijabetesa (72, 166). U ovoj studiji u svih ispitanika trajanje je bilo dulje od deset godina, a u skupini s razvijenom neliječenom DR trajanje dijabetesa statistički se značajno razlikovalo prema ostalim skupinama.

Utjecaj pušenja u nastanku i progresiji DR u ovoj studiji nije dokazan. Broj promatranih ispitanika je mali, ali i u WESDR na 2000 ispitanika autori ne navode povezanost DR s pušenjem, međutim utvrđena je 2,4 puta veća smrtnost pušača u odnosu na nepušače (169).

U našoj studiji nije dokazana statistički značajna povezanost krvnog tlaka i DR. Rezultati za su sukladni izvješću koje iznose Chobanian i sur. (168), a suprotni s opservacijskom studijom u kojoj Kingsley navodi pozitivne rezultate korelacije krvnog tlaka s DR (165).

Tjelesni indeks mase u ovoj studiji veći je u dijabetičara u odnosu prema nedijabetičarima, ali nije statistički značajno povezan s DR. U literaturi su rezultati podijeljeni. Mnogi radovi navode statistički značajnu povezanost DR s BMI (16, 167, 170-174), ali ima i radova u kojima se ta povezanost ne nalazi, baš kao i u ovom radu (175-178).

Dornan i suradnici iznose povezanost DR s povišenom razinom kolesterola, naročito LDL frakcije, dok u odnosu prema HDL kolesterolom ne nalaze povezanost (179). Povezanost nivoa masnoća s DR ovoj studiji nije dokazana.

U našoj studiji ne postoji statistički značajna korelacija ispitivanih pokazatelja upale (CRP, SE, fibrinogen) s dijabetičnom retinopatijom.

C-reaktivni protein, je protein u krvi iz obitelji pentraksina. Ima mnogo fizioloških uloga, kao što je vezivanje na površinu mrtvih ili umirućih stanica oštećenih upalom ili traumom, vezivanje na nuklearne antigene, patogene organizme i aktiviranje komplementa. Mjerenje koncentracije CRP u krvi koristi se kao pokazatelj upalne reakcije.

U našem radu ne postoji statistički značajna povezanost DR s CRP-om. Le i sur (180), kao i autori u „Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy (WESDR)” (181) i “Multi-ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)” (182) također nisu našli povezanost CRP i DR za razliku od van Heckea (183), Spijkermana (184), Schalckwijka (106) i Zorene (114), koji su tu povezanost prikazali u svojim studijama.

Sedimentacija eritrocita je test in vitro koji mjeri brzinu taloženja eritrocita iz krvi. Karboksilne grupe iz sijalinske kiseline prisutne u eritrocitima stvaraju elektromagnetni naboj na njihovoj površini, koji održava stabilnost suspenzije eritrocita u plazmi. Porastom koncentracije plazmatskih proteina, fibrinogena i drugih proteina smanjuje se elektronegativni naboj na membrani eritrocita i nastaje taloženje eritrocita. Brzina sedimentacije može biti ubrzana u fiziološkim stanjima (starost, trudnoća) ili u patološkim stanjima (akutne i kronične infekcije, anemije, sistemske bolesti vezivnog tkiva i maligne bolesti). U našoj studiji ne postoji statistički značajna korelacija DR sa sedimentacijom eritrocita. Rezultati nisu usporedivi s drugim studijama, jer takvih podataka u literaturi nema.

Fibrinogen je plazmatski glikoprotein sintetiziran u jetri, a građen je od tri različita polipeptidna lanca. Cirkulira žilama, i kada dođe u dodir s oštećenim ili oboljelim tkivom, promijeni se u protein fibrin, prilijepe se na oštećeno mjesto na unutarnjoj stijenci žile i stvori mrežu koja lovi kolesterol, teške metale i druge tvari. Kada tkivo ozdravi, proteolitski enzimi lako razbiju fibrin, odnosno aterosklerozni plak. Osobe koje imaju nizak nivo proteolitskih enzima imaju veću mogućnost razvoja krvnih ugrušaka i ateroskleroze. Kako je dijabetična retinopatija mikroangiopatija karakterizirana promjenama u malim krvnim žilama mrežnice, posebno praćena okluzijom tih žila, povezanost fibrina s pojavom DR pokušava se otkriti već dugi niz godina. U ovoj studiji nije dokazana povezanost fibrina s pojavom DR, što je sukladno s rezultatima koje navodi Madan i sur. (188), za razliku od studija koje su pokazale povezanost DR s poremećenom koagulacijom (185), Asakawe (186) i Fujisama (187), su pokazali povezanost povišenih vrijednosti fibrina s pogoršanjem DR.

Postoje znanstvene spoznaje da povećane vrijednosti proupalnih citokina mogu potaknuti smrt živčanih stanica, dok povećane vrijednosti protuupalnih citokina mogu to oštećenje prevenirati (189). Navodi se da je odnos proupalnih i protuupalnih citokina u mozgu novorođenčeta kritičan čimbenik nastanka oštećenja mozga.

O mogućim razlozima različitosti u vrijednostima citokina navode se genetski polimorfizam u pojedinca, tako da genotip pojedinca može modulirati proupalni ili protuupalni odgovor (189) ili da tip oštećenja može utjecati na tip odgovora, kao što je npr. endotoksin jaki stimulus za proupalne citokine (190).

Kako je mrežnica anatomski i funkcionalno dio mozga, jer se tijekom embrionalnog razvoja kralješnjaka s vidnim živcem formirala kao izdanak razvijajućeg mozga, moguće je da je genetski polimorfizam pojedinca „odgovoran“ za količinu producirane količine citokina u mrežnici, kao i za stupanj dijabetičnog oštećenja.

Rezultati naše studije ukazuju na pozitivnu povezanost proupalnog citokina IL-12 s prisutnošću DR. Buduća istraživanja na ovom području trebala bi biti više usmjerena na upalne mehanizme vezane za razvoj DR i ispitivanja učinkovitost protuupalne terapije u liječenju i prevenciji dijabetične mikroangiopatije.

Posebno bi jednostavan i učinkovit mogao biti topički način liječenja protutijelom male molekularne mase koje bi se preko rožnice, očne vodice i staklovine resorbiralo do mrežnice i vezalo na interleukinski receptor na mrežnici, te spriječilo upalno djelovanje citokina.

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ispitivanja kod 76 ispitanika podijeljenih u četiri različite skupine došlo se do sljedećih zaključaka:

1. Koncentracije IL-12 u očnoj vodici dijabetičara s neliječenom dijabetičnom retinopatijom su najveće i statistički se značajno razlikuju u usporedbi s ostalim skupinama: ispitanicima bez dijabetesa, dijabetičarima bez dijabetične retinopatije i dijabetičarima s laserski liječenom dijabetičnom retinopatijom.
2. Koncentracije IL-12 u očnoj vodici između ispitanika bez dijabetesa, dijabetičara bez dijabetične retinopatije i dijabetičara s laserski liječenom dijabetičnom retinopatijom statistički se značajno ne razlikuju.
3. Postoji povezanost koncentracije IL-12 u očnoj vodici s prisutnošću dijabetične retinopatije
4. Ne postoji povezanost koncentracije IL-12 u serumu s prisutnošću dijabetične retinopatije.
5. Koncentracije IL-12 u serumu dijabetičara s ili bez dijabetične retinopatije, dijabetičarima s laserski liječenom dijabetičnom retinopatijom i osoba bez dijabetesa statistički se značajno ne razlikuju.

6. Ne postoji korelacija koncentracije IL-12 ni u serumu, ni i u očnoj vodici s uobičajenim čimbenicima rizika:

- a) duljinom trajanja dijabetesa
- b) spolom
- c) dobi ispitanika
- d) BMI- om
- e) pušenjem
- f) ukupnim kolesterolom
- g) HDL kolesterolom
- h) LDL kolesterolom
- i) trigliceridima
- j) sistoličkim tlakom

7. Ne postoji korelacija IL-12 ni u očnoj vodici ni u serumu s pokazateljima upale:

- a) CRP-om
- b) fibrinogenom

8. Statistički značajna korelacija dijabetične retinopatije postoji s :

- a) glikoziliranim hemoglobinom
- b) trajanjem DM

## 7. SAŽETAK

Postoje dokazi da upala ima važnu ulogu u patogenezi dijabetesa.

Citokini imaju centralnu ulogu u pozitivnom i negativnom reguliranju imunoloških reakcija koje povezuju imuni s hematopoetskim, endokrinim i živčanim sustavom. Poznato je da je interleukin 12 (IL-12) jaki proupalni citokin.

U ovu studiju uključeno je 76 ispitanika podijeljenih u četiri skupine: 23 dijabetičara s neliječenom retinopatijom, 17 dijabetičara s liječenom retinopatijom, 12 dijabetičara bez retinopatije i 24 zdrava kontrolna ispitanika. Analizirana je koncentracija IL-12 u očnoj vodici i serumu.

Uspoređujući koncentracije u očnoj vodici dobivena je statistički značajna razlika između skupina ( $\chi^2(3, N=76)=27.137$ ;  $p=5.5 \cdot 10^{-6}$ ) s najvećom izmjerenom vrijednosti IL-12 u skupini dijabetičara s neliječenom retinopatijom (12,40 pg/mL).

Nisu pronađene statistički značajne razlike u serumskim koncentracijama IL-12 između skupina ( $F=0.405$ ,  $p=0,750$ ).

Korelacijska analiza koncentracija IL-12 u serumu i očnoj vodici pokazala je linearnu povezanost između ove dvije varijable samo u ispitanika bez dijabetesa ( $p=0,003$ ).

Ova studija je pokazala značajno veću koncentraciju proupalnog citokina IL-12 u očnoj vodici kod bolesnika s neliječenom dijabetičnom retinopatijom u odnosu na dijabetičare s liječenom dijabetičnom retinopatijom, dijabetičare bez dijabetične retinopatije i zdrave ispitanike.

Kako se serumske koncentracije IL-12 nisu razlikovale među ispitanim skupinama pretpostavlja da se radi o lokalnoj sintezi i sekreciji IL-12.



## 8. SUMMARY

Previous studies suggest that inflammation plays an important role in pathogenesis of diabetes. Cytokines may play positive or negative role in immunological reactions. Among many cytokines, interleukin 12 (IL-12) is known to be a strong pro-inflammatory cytokine.

A total of 76 participants were enrolled in this study and classified in 4 groups: 23 diabetic patients with non-treated retinopathy, 17 diabetic patients with treated retinopathy, 12 diabetic patients without retinopathy, and 24 healthy control patients. Serum and aqueous humor samples were taken for the analysis of IL-12 concentration. There was a significant difference between the groups in IL-12 concentrations in the aqueous humor ( $\chi^2(3, N=76)=27.137$ ;  $p=5.5*10^{-6}$ ) with highest values measured in the non-treated diabetic retinopathy group (12,40 pg/mL). No significant differences in IL-12 serum concentrations between the groups were found ( $F=0.405$ ,  $P=0.750$ ). Correlation analysis of IL-12 concentrations in the serum and aqueous humor showed association between the two variables only in non-diabetic patients ( $P=0.003$ ).

To the best of our knowledge, this is the first study to show a significantly higher concentration of pro-inflammatory cytokine IL-12 in the aqueous humor of non-treated diabetic retinopathy patients in comparison with diabetic patients treated for retinopathy, diabetic patients without retinopathy or with healthy individuals.

Because the serum levels of IL-12 did not differ considerably between the studied groups, it is possible that this is due to its local production and secretion.

## 9. LITERATURA

1. The global burden of diabetes. U: Diabetes atlas 2<sup>nd</sup> ed. Brussel:International Diabetes Federation. 2003;15-111.
2. Metelko Ž, Pavlič Ž, Renar I, Poljičanin T, Szirowitza L, Turek S. Prevalence of diabetes mellitus in Croatia. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008;81:263-7.
3. WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus. Second Report. Geneva: WHO, 1980. Technical Report Series 646.
4. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes.* 1979;28:1039-57.
5. World Health Organization. Diabetes Mellitus: Report of a WHO Study Group. Geneva: WHO, 1985. Technical Report Series 727.
6. American Diabetes Association. Plasma Glucose and Prediction of Microvascular Disease and Mortality. Evaluation of 1997 American Diabetes Association and 1999 World Health Organisation criteria for diagnosis of diabetes. *Diabetes Care.* 2000;23:1113-8.
7. Aganović I, Metelko Ž. Šećerna bolest U. Vrhovac B, Francetić F, Jakšić B, Labar B, Vucelić B, ur. *Interna medicina.* Zagreb: Naklada Ljevak; 2003;1264-84.
8. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 1997;20:1183-97.
9. Marklu L, Kurbaszek A. Coronary artery disease in type 2 diabetes. *Int Diabetes Monitor.* 2003;5:151-8.
10. American Diabetes Association. Diabetes Prevention Program. *Diabetes Care.* 2002; 521-4.

11. The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003;2006:S5-S20.
12. Franz MJ, Powers MA, Leontos C, HotzmeisternLA, Kulkarni K, Monk A, Wedel N, Gradwell E. The evidence for medical nutrition therapy for type 1 and type 2 diabetes in adults. *J Am Diet Assoc*. 2010;110:1859-89.
13. Risk perception and communication: From diabetes to cardiovascular disease. *Rev Med Suisse*. 2010;6(252):1182-7.
14. Vandemerg X. Good practice and update in oral antidiabetic agents. *Rev Med Brux*. 2010;31(4):371-6.
15. Metelko Ž, Lipovac V, Žmire J, Škrabalo Z, Prešek M, Granić M. Šećerna bolest U: Vrhovac B i sur. *Interna medicina*. Zagreb: Naprijed. 1991;1308-31.
16. The Diabetes Control and Complication Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complication in Insulin-Dependent Diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993;329:977-86.
17. The Diabetes Control and Complication Trial Research Group. Progression of retinopathy with intensive versus conventional treatment in the Diabetes Control and Complication Trial. *Ophthalmology*. 1995;102:647-61.
18. UK Prospective Diabetes Study (UPKDS) Group. Intensive blood - glucose control with sulphonylureases or insulin compared with conventional treatment and risk of complication in patients with type 2 diabetes. *Lancet*. 1998;352-87.
19. Sorbinil Retinopathy Trial Research Group A randomized trial of sorbinil, and aldose reductase inhibitor in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 1990;108.1234-44.
20. Corbett JA, Tilton RG, Chang K. Aminoguanidin a novel inhibitor of nitric oxid formation, prevent diabetic vascular dysfunction. *Diabetes*. 1992;41:552-6.
21. Hammes HP, Ling J, Renner O, Shani M Lundqvist A, Betsholz C, Brownlee M, Deutsh U. Pericytes and pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2002;51:3107-12.

22. Šikić J. Mrežnica, U: Šikić J i sur. Oftalmologija.Zagreb. Narodne novine 2003;125-37.
23. Glaser BM, D'Ammore PA, Michels RG, Patz A, Fenselau A. Demonstration of vasoproliferative activity from mammalian retina. *J Cell Biol.* 1980;84:298-304.
24. Joice NC, Haire MF, Palade GF. Contractile proteins in pericytes, II. Immunocytochemical evidence for the presence of two isomyosins in graded concentrations. *J Cell Biol.* 1985;100:1387-95.
25. Kador PF, Akagi Y, Takahashi Y, Ikebe H, Wyman M, Kinoshita JH. Prevention of pericyte ghost formation in retinal capillaries of galactose-fed dogs by aldose reductase inhibitors. *Arch Ophthalmol.* 1998;106:1099-102.
26. Chantelau E, Eggert H, Seppel T, Schonau E, Althaus C. Elevation of serum IGF-J precedes proliferative diabetic retinopathy in Mauriac's syndrome. *Br J Ophthalmol.* 1997;81:169-70.
27. Engerman RI, Kern TS. Response to Robinson. *Diabetes.* 1994;43:338-9.
28. Grant M, Russel B, Fitzgerald C, Merimee TJ. Insulin-like growth factor in vitreous studied in control and diabetic subject with neovascularisation. *Diabetes.* 1986;35:416-20.
29. Frank RN, Hoffman WH, Podgar MJ, Joondeph HC, Lewis RA, Margherio RR, Nachazel DP, Weiss H, Christoferson KW, Cronin MA. Retinopathy in juvenile-onset type I diabetes of short duration. *Diabetes.* 1992;31:874-82.
30. Joice NC, Haire MF, Palade GF. Contractile proteins in pericytes..Imunoperoxidase localisation of tropomyosin. *J Cell Biol.* 1985;100:1379-86.
31. Pr'er J, Maumanee AE. Studies of diabetic retinopathy, I. Retinopathy in a dog with spontaneous diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol* 1962;54:532-41.
32. Pieper GM, Siebeneich W, Roza AM, Jordan M, Adams MB. Chronic treatment in vivo with dimethylthiourea, a hydroxyl radical scavenger, prevents diabetes-induced endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996;28:741-5.
33. Bloodworth JMB Jr. Fine structure of retina in human and canine diabetes mellitus. In Kimura SI, Caygill WM .eds. *Vascular complications of diabetes mellitus.* St. Louis . Mosby.1967;123-7.

34. Engerman RL, Colquhoun PJ. Epithelial and mesothelial basement membranes in diabetic patients and dogs. *Diabetologia*. 1982;23:521-4.
35. Friedenwald JS: A new approach to some problems of retinal vascular disease. *Am J Ophthalmol*. 1949;32:487-98.
36. Das A, Frank RN, Zhang NL, Samandani E .Increase in collagen type IV and laminin in glucose - incrised retinal capillary basement membrane thickening prevention by an aldose reductase inhinitor. *Exp Eye Res*. 1990;50:269-90.
37. Frank RN, Kern RJ, Kennedy A, Frank KW. Galactose - induced retinal capillary basement membrane thickening: prevention by sorbinil. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1983;24:1519-24.
38. Robinson WG Jr, Laver NM, Jacot JL, Glover JP, Basso MD, Blouin P, Hohman TC. Diabetic – like retinopathy ameliorated with aldose- reductase inhibitor WAY-121, 509. *Invest Ophthlmo Vis Sci*. 1996;37:1149-56.
39. Robinson WG Jr, Kador PF, Akagi Y, Kinoshita JH, Gonzales R, Dvornik D. Prevention of basement membrane thickening in retinal capillares by a novel inhibitor of aldose reductase, tolestat. *Diabetes*. 1986;35:295-9.
40. Tilzon RG, Pugliese G, Williamson IR. Diabetes-induced glomerular changes in rats are not prevented by sorbinil. *Diabetes*. 1989;38:94.
41. Das A, Frank RN, Zhang NL. Sorbinil does not prevent galactose-induced glomerular capillary basement membrane thickening. *Diabetologia*. 1990;33:515-21.
42. Form DM, Pratt BM, Madri DA. Endothelial cell proliferation during angiogenesis in vitro modulation by basement membrane components. *Lab Invest*. 1986;55:521-30.
43. Furcht LT. Critical factors controlling angiogenesis and products, and growth factors. 1986;55:505-9.
44. Frank RN, Mancini MA. Presumed retinovitreal neovascularisation in dystrophic retinas of spontaneously hypertensive rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986;27:346-55.
45. Weber MI, Mancini MA, Frank RN. Retinovitreal neovascularisation in the Royal College of Surgeon rat. *Curr Eye Res*. 1989;8:61-74.

46. Hanneken A, de Juan E, Luttly GA, Fox GM, Shiffer S, Hjelmeland LM. Altered distribution of basic fibroblast growth factor in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 1991;109:1005-11.
47. Vigny M, Ollier-Harmann MP, Lavigne M, Fayein N, Jenny JC, Laurent M, Courtois Y. Specific binding of basic fibroblast growth factor to basement membrane-like structures and to purified heparin sulfate proteoglycan of the EHS tumor. *J Cell Physiol.* 1988;137:321-8.
48. Cogan DG, Toussaint D, Kuwabara T. Retinal vascular patterns. IV. Diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 1961;66:366-78.
49. Kawabara T, Cogan DG. Retinal vascular patterns. VI. Mural cells of the retinal capillaries. *Arch Ophthalmol.* 1963;69:492-502.
50. Addison DI, Garner A, Ashton N. Degeneration of intramural pericytes in diabetic retinopathy. *Br Med J.* 1970;11:264-6.
51. Speiser P, Gittelsohn AM, Patz A. Studies on diabetic retinopathy. III. Influence of diabetes on intramural pericytes. *Arch Ophthalmol.* 1968;80:332-37.
52. Yanoff M. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med.* 1966;274:1344-9.
53. Akagi Y, Kador PF, Kuwabara T, Kinoshita H. Aldose reductase localization in human natural cell. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1983;24:1516-9.
54. Kern TS, Engerman RL. Distribution of aldose reductase in ocular tissues. *Exp Eye Res.* 1981;33:175-82.
55. Ludvigson MA, Sorensen RL. Immunohistochemical localization of aldose reductase. II. Rat eye and kidney. *Diabetes.* 1980;29:450-9.
56. Friedenwald JS. Diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 1950;33:1187-99.
57. Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA. An activated form of transforming growth factor  $\beta$  is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:4544-8.
58. Lindahl P, Johanson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF- $\beta$  deficient mice. *Science* 1997;277:242-5.

59. Mizutani M, Kern TS, Lorenzi M. Accelerated death of retinal microvascular cells In human and experimental diabetic retinopathy. *J Clin Invest.* 1996;97:2883-90.
60. Tamiguchi Y. Ultrastructure of newly formed blood vessels in diabetic retinopathy. *J Ophthalmol.* 1976;20:19-31.
61. Wallow IHL, Engerman WL Permeability and patency of retinal blood vessels in experimental diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1977;16:447-461.
62. Easner E. Role of vesicular transport breakdown of the blood-retinal barrier. *Lab Invest.* 1987;56:457-60.
63. Easner E, Pino RM, Griewski RA. Breakdown of blood retinal barrier in RCS rats with inherited retinal degeneration. *Lab Invest* 1988;43:418-26.
64. Viores SA, Galeghetu C, Campochiaro PA, Green WR. Immunohistochemical localisation of blood-retinal barrier breakdown in human diabetics. *Am J Pathol.* 1989;134:231-5.
65. Folkman MJ, Long DM, Becker FF. Tumor growth in organ culture. 1962;13:81-3.
66. Taylor PR, Martinez - Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD . Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:901-44.
67. Hansson GK Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease . *N Engl J Med.* 2005;352:1685-94.
68. Hutton WL, Snyder WB, Vaiser A, Siperstein MD. Retinal microangiography without associated glucose intolerance. *Trans Am Acad Ophthal Otolaryngol.* 1972;76:968-80.
69. Linner E, Svanborg A, Zelander T. Retinal and renal lesion of diabetic type, without obvious disturbances in glucose metabolism, in a patient with family history of diabetes. *Am J Med.* 1965,39:298-304.
70. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes UKPDS 38. *BMJ.* 1998;317:703-13.

71. Frank RN, Hoffman WH, Podgar MJ, Joondeph HC, Lewis RA, Margherio RR, Nachazel DP, Weiss H, Chricoferson KW, Cronin MA. Retinopathy in juvenile-onset diabetes of short duration. *Ophthalmology*. 1980;87:1-9.
72. Klein R, Klein B, Moss SE, Davis MD, DeMets DI. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age of diagnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol*.1984;102:520-6.
73. Aiello LP, Beetham WP, Balodimos MC, Bradley RF. Ruby laser photocoagulation in treatment of diabetic proliferating retinopathy.preliminary report. Goldberg MF, Fine SL. Eds. Symposium : Treatment of Diabetic Retinopathy. US Public Health Service pub no 1980, Washington, DC. 1969.US Government Printing Office.
74. Klein R, Klein B, Moss SE, Davis MD, DeMets DI. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy IV. Diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 1984;91:1464-74.
75. Knowles HC, Guest GM, Lampe J, Kessler M, Skillman TG. The course of juvenile diabetes treated with unmeasured diet. *Diabetes*;1965;14:239-73.
76. Murphy RP, Nanda M, Plotnick I, Enger C, Vitale S, Patz A. The relationship of puberty to diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*.1990;108;215-8.
77. Klein R, Klein B, Moss SE, Davis MD, DeMets DI. Is the blood pressure a predictor of incidence or progression of diabetics retinopathy? *Arch Inter Med*. 1989;149:2427-37.
78. Knowler WC, Bennet PH, Ballintine EJ. Increased incidence of retinopathy in diabetics with elevated blood pressure: six years follow-up study in Pima Indians. *N Engl J Med*. 1980;302:645-50.
79. Kornerup T. Studies in diabetic retinopathy: an investigation of 1,000 cases of diabetics. *Acta Med Scand*. 1955;153:81-101.
80. Klein R, Klein B, Moss SE, Klein R. Effect of pregnancy on progression of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 1990;13:34-40.
81. Rand LI, Krolewski AS, Aiello IM, Warram JH, Baker RS, Maki T. Multiple factors in the prediction of risk of proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med*. 1985; 313:1433-8.



82. Krolewski AS, Canessa M, Warram JH, Laffel L, Christlieb AR, Knowler WC, Rand LI. Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl. J Med.* 1988;318:140-5.
83. Krolewski AS, Doria A, Mage J, Warram JH, Housman D. Molecular genetic approaches to the identification of genes involved in development of nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol.* (suppl4). 1992;40:S9-17.
84. Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH, Nelson RG, Knowler WC. Familial predisposition renal disease in two generation of Pima Indians with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1990;33:438-43.
85. Becker B. Diabetes and glaucoma. In Kimura SJ, Caygil.eds. *Vascular complications of diabetes mellitus.* St Louis Mosby.1967;143-6.
86. Jain IS, Luthra CL, Das T. Diabetic retinopathy and its relation in error of refraction. *Arch Ophthalmol.* 1967;77:59-60.
87. Tattersall R, Gale E. Patient self - monitoring of blood glucose and refinements of conventional insulin treatment. *Am J Med.* 1981;70:177-82.
88. Gabbay KH. The sorbitol pathway and complication of diabetes. *N Engl. J Med.* 1973; 288:831-6.
89. Klein R, Klein B, Moss SE, Davis MD, De Mets DI. Glycosylated hemoglobin predicts the incidence and progression of diabetic retinopathy. *JAMA.* 1989;268: 2864-71.
90. Tesfariam B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 1994;16:383-91.
91. Brownlee M, Cerami A. The biochemistry of complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Biochem.* 1981;50:385-432.
92. Gabbay KH, Sosenko JM, Banuchi GA, Minoshor MJ, Fluckiger R. Glycosylated hemoglobins increased glycosylation of hemoglobin A in diabetic patients. *Diabetes.* 1979;28:337-40.
93. Hammes HP, Martin S, Federin K, Geisen K, Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci.* 1991;88:115-8.

94. Engerman RL, Kern TS. Experimental galactosemia produces diabetic-like retinopathy. *Diabetes*. 1984;33:97-100.
95. Kador PF, Akagi Y, Takahashi Y, Ikebe H, Wyman M, Kinoshita JH. Prevention of retinal vessel changes associated with diabetic retinopathy in galactose - fed dogs by aldose reductase inhibitors. *Arch Ophthalmol*. 1990;108:1301-9.
96. Robinson WG Jr, Nagatta M, Laver N, Hohman TS, Kinoshita JH. Diabetic - like retinopathy in rats prevented with an aldose reductase inhibitor. *Invest Vis Sci*. 1989;30:2285-92.
97. Engerman RL. Pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes*. 1989;38:1203-6.
98. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000;29:229-30.
99. Melow S. Mitochondrial oxidative stress. Physiologic consequences and potential for a role in aging. *Ann NY Acad Sci*. 2000;908:219-25.
100. La SC. Regulation of glutathione synthesis. *Curr Top Coll Regul*. 2000;36:95-116.
101. King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol*. 2008;79:1527-34.
102. Klein B, Knudston M, Tsai M, Klein R. The relation of markers of inflammation and endothelial dysfunction to the prevalence and progression of diabetic Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 2009;127:175-82.
103. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology* 5<sup>th</sup> ed. Mosby, London. 1998;123-8.
104. Zhao L, Cuff C, Moss E, Wille U, Klein E, Practico D, Rader D, Hunter C, Pure E, Funk C. Selective interleukin-12 synthesis defect in 12/15 lipoxygenase - deficient macrophages associated with reduced atherosclerosis in a mouse model of familial hypercholesterolemia. *J Bio Chem*. 2002;277:3530-6.
105. Lee TS, Yen HC, Pan CC, Chau LY. The role of interleukin 12 in the development in atherosclerosis in ApoE- deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:734-42.

106. Schalckwijk C.G, Poland DC, van Dijk W, Kok A, Emeis JJ, Drager AM, Doni A, Van Hinsbergh VW, Stehouwer CD. Plasma concentration of C - reactive protein is increased in type I diabetic patients without clinical microangiopathy and correlates with markers of endothelial dysfunction : evidence for chronic inflammation. *Diabetologia*. 1999;42:351-7.
107. Lechleitner M, Koch T, Herold M, Dziren A, Hoppichler F. Tumour necrosis factor alpha plasma level in patients with type I diabetes mellitus and its associations with glycaemic control and cardiovascular risk factors. *J Intern Med*. 2000;248:67-76.
108. Schmidt MI, Duncan BB, Sharretti AR, Lindberg G, Savage PJ, Offenbacher S, Azambuja MI, Tracy RP, Heiss G. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet*. 1999;353:1649-52.
109. Schram M, Chativeredi N, Schalkwijk C, Giogino F, Ebeling P, Fuller J, Stehouwer C. Vascular risk factors and markers of endothelial function as determinants of inflammatory markers in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26:2165-73.
110. Wnkler G, Dworak O, Salamon D, Speer G, Cseh K. Increased interleukin-12 plasma concentration in both, insulin dependent and insulin independent diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1998;4:488.
111. Zorena K, Misliwska J, Mysliwiec M, Balcerska A, Lipowski P, Raczynska K. Interleukin 12 as a anti - angiogenic mediator in type 1 diabetic children. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab*. 2007;13:27-31.
112. Zorena K, Misliwska J, Mysliwiec M, Balcerska A, Lipowski P, Raczynska K. Interleukin-12 vascular endothelial grow factor an tumor necrosis factor – alpha in process of neoangiogeneseis of diabetic retinopathy in children. *Klin Oczna*. 2007; 109:155-9.
113. Zorena K, Misliwska J, Mysliwiec M, Balcerska A, Lipowski P, Raczynska K. Interleukin - 12 and tumor necrosis factor - alpha equilibrium is a prerequisite for clinical course free from late complications in children with type1 diabetes mellitus. *Scand J Immunol*. 2008;67:204-8.

114. Khalifa RA, Khalef NA, Moemen LA, Lahib HN. The role of Interleukin 12 (IL - 12), interferon - inducible protein 10 (IP - 10) and interleukin 18 (IL - 18) in angiogenic activity of diabetic retinopathy. *Research Journal of Medical Sciences*. 2009;4: 510-4.
115. Tabbles LA, Woodgatt JR. The stress - activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci*. 1999;55:1230-54.
116. Basu S, Kolesnick R. Stress signals for apoptosis : ceramide and c - Jun kinase. *Oncogene*. 1998;17:3277-85.
117. Xia P, Aiello LP, Labii H, Jing ZY, Park DI, Robinson GS, Takagi H, Newsome WP, Jousek MR, King GL. Characterisation of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *J Clin Invest*. 1996;98:2018-26.
118. Shiba T, Inogushi, T, Sportsman JR, Heath WF, Busell S, King GL. Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *Am J Physiol*. 1993;265:783-93.
119. Ishii , Jirousek MR, Koya D, Takgai C, Xia P, Clemont A, Bursell SE, Kern TR, Ballas LM, Heath WF, Stramm LE, Feener EP, King GL. Amelioration of vascular dysfunction in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science*. 1996;272:59-60.
120. Michaelson IC. The mode of development of the vascular system of in the retina, with some observations on its significance for certain retinal disease. *Trans Ophthalmol Soc UK*. 1948;68:137-80.
121. Citirik M, Kabatas EU, Batman C, Akin KO, Kabatas N. Vitreous vascular endothelial growth factor concentrations in proliferative diabetic retinopathy versus proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res*. 2011;47(1):7-12.
122. Luty GA, McLeod DS, Merges C. Localisation of vascular endothelial growth factor in human retina and choroid. *Arch Ophthalmol*. 1996;114:971-9. Vitreous Vascular Endothelial Growth Factor Concentrations in Proliferative Diabetic Retinopathy versus Proliferative Vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res*. 2011;47(1): 7-12.

123. Kakkassery V, Winterhalter S, Jousseaume AM. Anti-VEGF inhibitors and their Role in treatment of diabetic macular oedema. *Klin Monats Augenhilfkd.* 2010; 227(9):701-11.
124. Karim R, Tang B. Use of anti-vascular endothelial growth factor for diabetic macular edema. *Clin Ophthalmol.* 2010;4:493-517.
125. Klein R, Klein B, Moss SE. The Wisconsin epidemiological study of diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Rev.* 1989;5(7):559-70.
126. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Blindness caused by diabetes. Massachusetts. 1987-1994. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 1996;45(43):937-41.
127. Ferris FL. How effective are treatments for diabetic retinopathy? *JAMA.* 1993;269:1290-1.
128. Chibber R, Ben-Mahmud BM, Chibber S, Kohner EM. Leukocytes in diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Re.* 2007;3:3-14.
129. Lintz CA, Ciofalo J, McLeod DS. Relationship of polymorphonuclear leukocytes in diabetic retinopathy. *Sci. Ophthalmol.* 1999;14:233-9.
130. Simo R, Hernandez C. Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: hopes and fears for a new therapeutic strategy. *Diabetologia.* 2008;51:1774-80.
131. Dacey DJ, Khan AA, Rajendra S, Apte JS. Interleukin-10 promotes pathological angiogenesis by regulating macrophage response to hypoxia during development. *Plos One.* 2008;3:3381.
132. Taylor RS, Stacey PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Linn H, Brown GD. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:901-44.
133. Diabetic Retinopathy Study Research Group. A modification of Airlie House classification of diabetic retinopathy. Report No 7. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1981;21:210-26.
134. Stavrou EP, Wood JM. Central visual field changes using flicker perimetry in type 2 diabetes mellitus. *Acta Ophthalmol.* 2005;83:574-80.
135. Johnson RN, Schatz H, McDonald HR, Everett A. Fluorescein angiography: basic principles and interpretation. U: Ryan SJ ed. *Retina.* St Louis: Mosby. 1994,911-84.

136. Barton FB, Fong DS, Knatterud GL; ETDRS Research Group. Classification of Farnsworth - Munsell 100 - Hue test results in the early treatment diabetic retinopathy study. *Am J Ophthalmol.* 2004;138:119-24.
137. Horii T, Murakami T, Nishijima K, Sakamoto A, Ota M, Yoshimura N. Optical coherence tomographic characteristic of microaneurysms in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 2010;150:840-8.
138. Guan K, Hudson C, Flangan JG. Comparison of Heidelberg retina Tomograph II and Retinal Thickness Analyzer in the assessment in diabetic macular edema. *Invest Vis Sci.* 2004;45:610-6.
139. Ziegler O, Guerci B, Algan M, Lonchamp P, Weber M, Drouin P. Improved visual evoked potential latencies in poorly controlled diabetic patients after short - term strict metabolic control. *Diabetes care.* 1994;17:1141-7.
140. Holfort SK, Klemp K, Kofoed PK, Sander B, Larsen M. Scotopic electrophysiology of retina during transient hyperglycemia in type 2 diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:2790-4.
141. Tsuboi S. Fluid movement across the blood - retinal barrier: a review of studies by vitreous fluorophotometry. *Jpn J Ophthalmol.* 1990; 34:133-41.
142. Goldberg MF, Fine SL, editors. Symposium on the treatment of diabetic retinopathy. Publication Number 1890 ed. Arlington VA: UD Department of Health Education and Welfare. 1968.
143. Yilmaz T, Cordero - Coma M, Lavaque AJ, Gallagher MJ, Padula WV. Triamcinolone and intraocular sustained - release delivery systems in diabetic retinopathy. 2011;12:337-46.
144. Cho WB, Moon JW, Kim HC. Intravitreal triamcinolone and bevacizumab as adjunctive treatments to panretinal photocoagulation in diabetic retinopathy. *Curr Pharm Biotechnol.* 2010;94:858-63.
145. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report Number 12 : Phundus photographic risk factors for progression of diabetic retinopathy. *Ophthalmology.* 1991;98:823-33.

146. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report Number 14 : Indication for photocoagulation treatment of diabetic retinopathy. *Int Ophthalmol Clin.* 1987;27: 239-53.
147. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report Number 19: Focal Photocoagulation treatment of diabetic macular edema. Relationship of treatment effect to fluorescein angiographic and other retinal characteristics at baseline. *Arch Ophthalmol.* 1995;113:1144-55.
148. Olk RJ. Modified grid argon (blue-green) laser photocoagulation for diffuse diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 1986;93:938-50.
149. Friberg TR, Ekatarini C, Karatza MD. The treatment of macular disease using a micropulsed and continuous wave 810 nm diode laser. *Ophthalmology.* 1987;104: 2030-8.
150. Kern TS, Engerman RL. Pharmacological inhibition of diabetic retinopathy: aminoguanidin and aspirin. *Diabetes.* 2001;50:1636-42.
151. el-Shabrawi Y, Livir-Rallatos C, Christen W, Baltatzis S, Foster CS. High levels of interleukin - 12 in the aqueous humor and vitreous of patients with uveitis. *Ophthalmology.* 1998;105:1659-63.
152. Funatsu H, Yamashita H, Noma H, Mimura T, Nakamura S, Sajata K, Hodi S. Aqueous humor levels of cytokines are related to vitreous levels in progression of diabetic patients in diabetic retinopathy. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.* 2005;24:313-8.
153. Noma H, Funatsu H, Mimura T, Harino S, Hodi S. Aqueous humor levels of vasoactive molecules correlate with vitreous levels and macular edema in central retinal vein occlusion. *Eur J Ophthalmol.* 2010;20:402-9.
154. Willermain F, Caspers - Velu L, Baudson N, Dubois C, Hamdane M, Willems F, Bruyns C. Role and expression of CD 40 on human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:3485-91.
155. Hudkin JS, Schoover CD, Emets JJ, Coopack SW. C- reactive protein in healthy subjects associations with obesity, insulin resistance and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vas Biol.* 1999;19:972-8.

156. Mendall MA, Pazel P, Asamie M, Bullam L, Morris J, Srachan DP, Camm AJ, Northfield TC. Relation of serum cytokine concentrations in cardiovascular risk factors and coronary heart disease. *Heart*. 1997;78:273-7.
157. Onat A, Sansoy W, Yildirim B, Keles I, Uysal O, Hergenc G. C-reactive protein and coronary heart disease in Western Turkey. *Am J Cardiol*. 2001;88:601-7.
158. Frohlich M, Inhof A, Berg G, Hutchinson WL, Pepys MB, Boeing H, Muehle L, Brenner H, Koenig W. Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. *Diabetes Care*. 2000;23:1835-9.
159. Ford ES. Body mass index, diabetes and C-reactive protein among adult U.S. adults. *Diabetes Care*. 1999;22:1971-7.
160. Yamada S, Gotoh T, Nakashima Y, Kayaba KA, Ishikawa S, Nago N, Nakamura Y, Itoh Y, Kayii E. Distribution of serum C-reactive protein and its association with atherosclerotic risk factors in Japanese population. Jichi Medical School Cohort Study. *Am J Epidemiol*. 2001;15:1183-90.
161. Wu T, Dorn JP, Donahue LP, Sempos CT, Trevisan N. Association of serum C-reactive protein with fasting insulin, glucose, and glycosylated hemoglobin. The Third National Health and Nutrition Examination Survey. 1988-1994. *Am J Epidemiol* 2002;155:65-71.
162. Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G, Mykkane L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of insulin resistance syndrome. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation*. 2000;102:42-7.
163. Koenig W, Sund M, Frohlich M, Fischer HG, Lowel H, Hutchinson WL, Pepys MB. C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study 1984-1992. *Circulation* 1999;99:237-42.
164. Chambers JC, Eda S, Bassett P, Karim Y, Thompson SG, Galimorre JR, Pepys MB, Kooner JS. C-reactive protein, insulin resistance, central obesity and coronary heart disease in Indian Asians from United Kingdom compared with European whites. *Circulation* 2001;104:145-50.



165. Kingsley LA, Dorman JS, Doft BH, et al. An epidemiologic approach to the study of retinopathy: the Pittsburgh diabetic morbidity and retinopathy studies. *Diabetes Res Clin Pract.* 1988;4:99-109.
166. Klein R, Klein B, Moss SE et al. Retinopathy in young onset diabetic patients. *Diabetes Care.* 1995;8:311-5.
167. Klein R, Klein B, Moss SE, Davis MD, De Mets DI. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age of diagnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol.* 1984;102:527-32.
168. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. *JAMA.* 2003;289:2560-72.
169. Moss SE, Klein R, Klein BEK. The association of cigarette smoking with diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 1991;14:119-26.
170. Katušić D, Tomić M, Jukić T, Kordić R, Šikić J, Vukojević N, Šarić B. Obesity - a risk factor for diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Coll Antropol.* 2005;29:47-50.
171. Dowse GK, Humphrey AR, Collins VR, et al. Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy in the multiethnic population of Mauritius. *Am J Epidemiol.* 1998;147:448-457.
172. Cheung N, Wong TY. Obesity and eye diseases. *Surv Ophthalmol.* 2007;52:180-195.
173. Chaturvedi N, Fuller JH. Mortality risk by body weight and weight change in people with NIDDM. The WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetes Care.* 1995;18:766-774.
174. Lee ET, Lee VS, Lu M, Russell D. Development of proliferative retinopathy in NIDDM: a follow-up study of American Indians in Oklahoma. *Diabetes.* 1992;41:359-367.

175. West KM, Erdreich LJ, Stober JA. A detailed study of risk factors for retinopathy and nephropathy in diabetes. *Diabetes*. 1980;29:501–8.
176. Nilsson SV, Nilsson JE, Frostberg N, Emilsson T. The Kristianstad survey. II. Studies in a representative adult diabetic population with special reference to comparison with an adequate control group. *Acta Med Scand Suppl*. 1967;469:1–42.
177. Kornerup T. Studies in diabetic retinopathy: an investigation of 1,000 cases of diabetes. *Acta Med Scand*. 1955;153:81–101.
178. Klein R, Klein BE, Moss SE. Is obesity related to microvascular and macrovascular complications in diabetes? The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Arch Intern Med*. 1997;157:650–6.
179. Dorman TL, Carter RD, Bron JH, Turner RC, Mann JI. Low density lipoprotein, Cholesterol and association with severity of diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 198;22:167.
180. Le DS, Miles R, Savage PJ et al. The association of plasma fibrinogen concentration with diabetic microvascular complication in young adults with early-onset of type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008;82:317-23.
181. Klein BE, Knudtson MD, Tsai MY, Klein R. The relation markers of inflammation and endothelial dysfunction to the prevalence and progression of diabetic retinopathy: Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 2009;127:1175–82.
182. Nguyen TT, Alibrahim E, Amirul IF, et al. Inflammatory, hemostatic, and other novel biomarkers for diabetic retinopathy: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Diabetes Care*. 2009;32:1704–9.
183. Van Hecke MV, Dekker JM, Nijpels G, et al. Inflammation and endothelial dysfunction are associated with retinopathy: the Hoorn Study. *Diabetologia*. 2005;48:1300–6.
184. Spijkerman AM, Gall MA, Tarnow L, et al. Endothelial dysfunction and low-grade inflammation and the progression of retinopathy in Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2007;24:969–76.

185. Fibrinogen studies collaboration. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality. *JAMA*. 2005;294:1799-1809.
186. Asakawa H, Tokunaga K, Kawakami F. Elevation of fibrinogen and thrombin-antithrombin III complex levels of type 2 diabetes mellitus patients with retinopathy and nephropathy. *J Diabetes Complications*. 2000;14:121-6.
187. Fujisawa T, Ikegami H, Yamato E, Kawaguchi Y, Ueda H, Shintani M et al. Association of plasma fibrinogen level and blood pressure with diabetic retinopathy, and renal complications associated with proliferative diabetic retinopathy, in Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 1999;16:522-6.
188. Madan R, Gupta B, Saluja S, Kansra UC, Tripathi BK, Guliani BP. Coagulation Profile in Diabetes and its with Diabetic Microvascular Complications. *J Assoc Physicians India*. 2010;58:481-4.
189. Gibson CS, Machedman AH, Goldwater PN, Haan EA, Priest K, Dekler GA. The association between inherited cytokine polymorphism and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194:674-5.
190. Kendall G, Peebles D. Acute fetal hypoxia the modulating effect of infection. *Early Hum Dev*. 2005;81:27-34.

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođena 24.svibnja 1962. godine u Dubrovniku

Udana, majka dvoje djece.

### **Obrazovanje**

Osnovnu i srednju školu pohađala u Dubrovniku.

1980.g. - Upisala Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

1985.g. - Diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu s prosječnom ocjenom 4,2

1989.g. - Završila poslijediplomski studij “Klinička imunologija i alergologija” pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

2000.g.- Završila poslijediplomski studij “Klinička oftalmologija” pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

2006.g. Završila doktorski studij“ Klinička medicina“ pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu

### **Profesionalna karijera**

1987.g.- Položila stručni ispit.

Od 1987.g. do 1995 g. radila u Zdravstvenoj stanici Ston

Od 1991.g. u Domovinskom ratu na stonskom bojištu

Za učešće u Domovinskom ratu dobila Spomenicu domovinskog rata  
1995 g.- Dobila specijalizaciju iz oftalmologije za Opću bolnicu Dubrovnik  
1997-2000.g. Specijalizacija iz oftalmologije u Splitu i Zagrebu  
2000.g. Položila .specijalistički ispit iz oftalmologije u Zagrebu  
Od 5 mj.2006.g. šefica Službe za oftalmologiju Opće bolnice Dubrovnik  
2011.g. izabrana u nastavno zvanje predavača na Sveučilištu u Dubrovniku – Studij  
sestrinstva  
Uže područje interesa - bolesti mrežnice oka

### **Publikacije**

Objavila 9 radova u časopisima od kojih je 5 u Current Contents

