

Diyabetik Retinopatide Vasküler Endotelial Parametrelerin Değerlendirilmesi

Evaluation of Vascular Endothelial Parameters in Diabetic Retinopathy

Sedat ÖZMEN,^a
Serdal ÇELEBİ,^b
Faruk KALKAN,^c
A. Şahap KÜKNER,^b
Ümit DOĞAN,^b
Harika ÇELEBİ^d

^aGöz Hastalıkları Kliniği,
Suluova Devlet Hastanesi, Amasya

^bGöz Hastalıkları AD,
Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Tıp Fakültesi, Bolu

^cBiyokimya Kliniği,
Etlik İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi,

^dHematoloji Kliniği,
Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve
Araştırma Hastanesi, Ankara

Geliş Tarihi/Received: 06.08.2012
Kabul Tarihi/Accepted: 28.11.2012

Bu çalışma, TOD 45. Ulusal Kongresi
(5-9 Ekim 2011, Girne)'nde poster olarak
sunulmuştur.

Yazışma Adresi/Correspondence:
Ümit DOĞAN
Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Tıp Fakültesi,
Göz Hastalıkları AD, Bolu,
TÜRKİYE/TURKEY
u_dogan@hotmail.com

ÖZET Amaç: Bu çalışmada, diyabetik retinopatide damar endotelinden salgılanan mediyatörlerden; endotelin-1, plazma von Willebrand faktör (vWF), doku plazminojen aktivatörü (t-PA), plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) ve asimetric dimetil arjinin (ADMA) düzeylerini değerlendirdik. Diyabetin damar endoteli ve koagülasyon fibrinolitik dengesi üzerindeki etkisini belirlemeyi amaçladık. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışmamızda 25 sağlıklı birey (Grup-1), 26 diyabeti olup retinopatisi olmayan hasta (Grup-2) ve 26 diyabetik retinopatisi olan hasta (Grup-3) olmak üzere üç grup oluşturuldu. Tüm gruplardan 10 mL venöz kan alınıp, plazma ve serum ayrılıp, santrifüj edildi. Hazırlanan plazma ve serum ELİSA yöntemi ile çalışıldı ve sonuçların istatistiksel analizi Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testleri ile yapıldı. **Bulgular:** Kruskal Wallis testi ile değerlendirildiğinde endotelin-1 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanırken (p=0,037), t-PA ve PAI-1 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla, p=0,833, p=0,172). Mann-Whitney U testi ile gruplar arası fark değerlendirildiğinde; ADMA, endotelin-1 ve vWF düzeyleri grup 3'te grup 1'e göre yüksek olarak saptandı (sırasıyla p=0,001, p=0,021, p=0,007). Grup 2'de grup 1'e göre ADMA ve vWF düzeyleri yüksek olarak saptandı (sırasıyla, p=0,002, p=0,004). Grup 1 ile grup 2 arasında t-PA, PAI-1 ve endotelin-1 düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla p=0,910, p=0,873 ve p=0,992). Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında t-PA, PAI-1 ve endotelin-1 düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla p=0,915, p=0,266 ve p=0,060). **Sonuç:** Endotelial hasar diyabetin erken dönemlerinde başlamaktadır. Diyabetin ilerlemesi ile endotelial hasar da artmaktadır. Diyabet hastalarının koagülasyon-fibrinolitik dengesi koagülasyon lehine bozulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: (ADMAAdda(5)-MSer(7))mikrosistin-LR; doku plazminojen aktivatörü; plazminojen aktivatör inhibitörü 1; endotelin 1, Ala(1,15)-; von Willebrand faktörü; diyabetik retinopati

ABSTRACT Objective: In this study, we evaluated the serum levels of endothelin-1 and plasma levels of von Willebrand factor (vWF), tissue plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and asymmetric dimethyl arginine (ADMA) which are secreted from vascular endothelium in diabetic retinopathy. We aimed to determine the effects of diabetes on vascular endothelium and balance of coagulation-fibrinolysis. **Material and Methods:** In this study, three groups were formed as follows; group 1 included 25 healthy individuals, group 2 included 26 diabetic patients without retinopathy, group 3 included 26 diabetic retinopathy patients. 10 mL venous blood samples were collected from all groups, plasma and serum were separated and centrifuged. Prepared plasma and serum samples were studied using ELISA and statistical analysis of the data was evaluated using Kruskal Wallis and Mann-Whitney U tests. **Results:** Kruskal Wallis test revealed statistically significant difference in endothelin-1 levels between the groups (p=0.037) but there was no statistically significant difference in the levels of t-PA and PAI-1 between the groups (p=0.833 and p=0.172, respectively). Mann-Whitney U test revealed statistically significant difference in the levels of ADMA, endothelin-1 and vWF between group 3 and group 1 (p=0.001, p=0.021, p=0.007, respectively). Levels of ADMA and vWF in group 2 were significantly higher than group 1 (p=0.002, p=0.004, respectively). There was no significant difference in the levels of t-PA, PAI-1, and endothelin-1 between group 1 and group 2 (p=0.910, p=0.873 and 0.992, respectively). There was no significant difference in the levels of t-PA, PAI-1, and endothelin-1 between group 2 and group 3 (p=0.915, p=0.266 and 0.060, respectively). **Conclusion:** Endothelial damage begins at the early stages of diabetes. Endothelial damage increases as diabetes progresses. Coagulation-fibrinolysis balance deteriorated in favour of coagulation in diabetic patients.

Key Words: (ADMAAdda(5)-MSer(7))microcystin-LR; tissue plasminogen activator; plasminogen activator inhibitor 1; endothelin 1, Ala(1,15)-; von Willebrand Factor; diabetic retinopathy

Diabetes mellitus (DM), morbidite ve mortalitesi giderek artan, yüksek kan glukoz seviyesi ile karakterize metabolik bir bozukluktur. Diyabet hastalarında morbidite ve mortalitenin en önemli nedeni; koroner, serebral ve periferel damar tutulumu ile karşımıza çıkan aterosklerotik vasküler hastalıklardır. Diyabet hastalarında retinopati, nefropati ve nöropati olarak yansıyan mikroanjiyopatik komplikasyonlar da sık olarak görülmektedir. Diyabetik retinopati, 20-70 yaşlar arasındaki en önemli körlük nedeni olarak gösterilmektedir.¹ Diyabetik retinopatinin gelişimi ve ilerlemesinde diyabetin süresi, hipertansiyon, hamilelik, hormonal değişiklikler, genetik özellikler, kan şekeri ve glikolize hemoglobinin düzeyleri gibi birçok faktörün etkisi gösterilmiştir.²⁻⁸ Diyabetik retinopati gelişiminde damar endotel fonksiyon bozukluğunun göstergesi olan faktörler üzerinde durulmaktadır.⁹⁻¹⁴ Von Willebrand Faktör (vWF), Doku plazminojen aktivatörü (t-PA), doku plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1), endotelin-1 (ET-1), asimetrik dimetil arjinin (ADMA) endotel fonksiyonlarını gösteren mediyatörlerdir.

Fibrinolitik yolağın son ürünü plazmindir. Plazmin fibrini yıkar ve d-dimeri de içeren fibrin yıkım ürünlerinin oluşmasına yol açar. Plazmin plazminojenden oluşur. Bu dönüşümü t-PA uyarırken, alfa-2 antiplazmin ve PAI-1 ise sınırlandırır.¹¹

Bilinen en güçlü vazodilatör olan nitrik oksit (NO)'in sentezinde görev alan NO sentaz (NOS), ADMA tarafından inhibe edilir ve sonuç olarak endotele bağlı vazodilatasyon önlenir, vasküler direnç ise artar. Ayrıca, ADMA endotel disfonksiyonunun bir göstergesi olarak da kabul edilmektedir.^{10,15,16}

Endotelden salgılanan ET-1, damar endotel hasarı sonrasında hemostazda görevli vazokonstriktör bir proteindir.¹⁷

vWF, hasarlı damar duvarına yapışarak trombositlerin damar endoteline yapışmasını sağlayan ve trombüs oluşumuna neden olan bir faktördür.¹¹

Çalışmamızda, damar endotelinden sentezlenen mediyatörlerin ve dolayısıyla damar endotelinin DM ve diyabetik retinopatide etkilenme düzeyini göstermeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız, Helsinki Deklarasyonu 2008 prensiplerine uygun olarak, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulunun 2010/33 no'lu onayı ve tüm hastalardan aydınlatılmış onam formu alınarak yapılmıştır. Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Ana Bilim Dalı Polikliniğine başvuran ardışık hastalar arasından kontrol ve çalışma grupları oluşturuldu. 40 yaş üzeri sistemik hastalığı ve retinopatiye yol açacak oküler hastalığı olmayanlar [Grup 1 (n=25)] kontrol grubu olarak belirlendi. 40 yaş üzeri Tip-2 DM olup, diyabetik retinopatisi olmayanlar Grup 2 (n=26) olarak belirlendi. 40 yaş üzeri Tip-2 DM olup, diyabetik retinopatisi olanlar Grup 3 (n=26) olarak belirlendi.

Dilate fundus muayenesinde mikroanevrizma, retinal kanama, maküler ödem, sert eksüda, yumuşak eksüda, intraretinal mikrovasküler anormallikler, neovaskülarizasyon, vitreus hemorajisi, traksiyonel retina dekolmanı bulgularından bir veya daha fazlasına sahip olan hastalar diyabetik retinopatisi olan çalışma grubuna (grup 3) dâhil edildi.

Retinada benzer bulgulara neden olabilecek hipertansiyon, lösemi, radyasyona bağlı retinopati, Eales hastalığı, sistemik malignite, kollajen doku hastalığı olanlar ve 40 yaş altı olgular çalışma kapsamı dışında bırakıldı.

Bütün gruplardaki kişilerden 10 mL venöz kan örneği alındı. Bu kanın 6 mL'si kuru biyokimya tüpüne, 4 mL'si ise sodyum EDTA'lı tüpe konuldu. Serumda çalışılacak parametreler için kuru tüpler bekletilmeden 3000 devirde 15 dakika santrifüj edildi ve kalan serum ependorf tüplerine alınarak -70°C'de saklandı. Plazmada çalışılacak parametreler için alınan kan ise 2000 devirde 10 dakika santrifüj edildi ve oluşturulan plazma ependorf tüplerine alınarak -70°C'de saklandı. Bütün gruplardan alınan örnekler tamamlandıktan sonra, plazma ve serumlar soğuk zincir halinde T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Etlik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarına gönderildi. Çalışmada kullanılan bütün parametreler ELISA yöntemi ile

çalışıldı. Santrifüj edilmiş serumlardan endotelin-1 düzeyi (Endothelin Elisa/96 test/Biomedical), çalışıldı. Santrifüje edilmiş plazmadan ise vWF düzeyi (VWF Elisa Kit/96 test/American Diagnostica), PAI-1 düzeyi (PAI-1/96 test Elisa/American Diagnostica), t-PA düzeyi (TPA Strip-Well Elisa Kit/96 test/American Diagnostica) ve ADMA düzeyi (ADMA Elisa/96 test/Immundiagnostica) çalışıldı.

İstatistiksel analizler, SPSS (statistical package for social sciences) 16.0 bilgisayar paket programında yapıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) şeklinde ifade edildi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada, veriler normal dağılmadığından tüm grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis, grupların ikili karşılaştırılmalarında Mann-Whitney U testleri kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık değeri olarak $p < 0,05$ kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya katılan olguların demografik özellikleri Tablo 1'de görülmektedir. Yaş ve cinsiyet açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı [p değerleri sırasıyla 0,061 (bağımsız örneklem tek yönlü varyans analizi testi) ve 0,189 (ki-kare testi)]. Çalışmamızda gruplar arasında ortalama vWF, t-PA, PAI-1, endotelin-1 ve ADMA düzeyleri Tablo 2'de görülmektedir.

Kontrol grubu (grup 1) ile diğer gruplar arasında PAI-1 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Tablo 3). Kontrol grubu ile diğer grupların ortalama ADMA düzeyi karşılaştırıldığında; grup 2 ve grup 3'te, grup 1'e

göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı (p değerleri sırasıyla 0,002 ve 0,001). Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,606$) (Tablo 3). Ortalama ET-1 düzeyi gruplar arası karşılaştırıldığında; grup 3'te grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olarak saptandı ($p=0,021$) (Tablo 3). Grup 1 ile grup 2 ve grup 2 ile grup 3 arasında ET-1 düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p değerleri sırasıyla 0,992 ve 0,060) (Tablo 3). Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında t-PA düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (p değerleri sırasıyla 0,910 ve 0,833) (Tablo 3). Ortalama vWF düzeyi gruplar arasında karşılaştırıldığında; grup 2 ve grup 3'teki değerler grup 1'e göre anlamlı düzeyde yüksekken (p değerleri sırasıyla 0,04 ve 0,07), grup 2 ile grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,428$).

TARTIŞMA

Diyabetik retinopatinin gelişiminde en önemli faktör, damar endotel disfonksiyonudur. Damar endo-

TABLO 1: Grupların demografik özellikleri.

	Kadın		Erkek		Yaş ortalaması \pm SD	
	n	%	n	%		
Grup 1	25	9	36	16	64	66,24 \pm 12,68
Grup 2	26	16	61,5	10	38,5	58,85 \pm 10,27
Grup 3	26	13	50	13	50	63,92 \pm 10,62
Toplam	77	38	49,4	39	50,6	62,93 \pm 10,97

n: Hasta sayısı; SD: Standart sapma.

TABLO 2: Grupların ortalama vWF, t-PA, PAI-1, Endotelin-1, ADMA değerleri

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	p*
vWF (μ U/mL)	8,80 \pm 1,55	10,32 \pm 1,41	10,79 \pm 2,27	0,005
t-PA (ng/mL)	9,80 \pm 7,18	9,78 \pm 7,13	11,67 \pm 10,56	0,983
PAI-1 (ng/mL)	7096,20 \pm 1164,36	7280,12 \pm 1496,26	7426,63 \pm 1520,44	0,348
Endotelin-1 (fmol/mL)	0,92 \pm 1,17	1,28 \pm 1,52	2,13 \pm 3,38	0,051
ADMA (μ mol/L)	0,56 \pm 0,10	0,64 \pm 0,10	0,66 \pm 0,08	0,001

Değerler ortalama \pm SD olarak verilmiştir.

* Kruskal-Wallis testi

vWF: Von Willebrand faktörü; t-PA: Doku plazminojen aktivatörü; PAI-1: Plazminojen aktivatör inhibitörü-1; ADMA: Asimetrik dimetil arjinin

TABLO 3: Gruplar arası Mann-Whitney U testi ile yapılan karşılaştırma sonuçları (p değerleri).

	vWF	t-PA	PAI-1	Endotelin-1	ADMA
Grup 1-Grup 2	0,004	0,910	0,873	0,992	0,002
Grup 1-Grup 3	0,007	0,833	0,172	0,021	0,001
Grup 2-Grup 3	0,428	0,915	0,266	0,060	0,606

vWF: Von Willebrand faktör; t-PA: Doku plazminojen aktivatörü; PAI-1: Plazminojen aktivatör inhibitörü-1; ADMA: Asimetrik dimetil arjinin.

teli tek katlı bir tabaka olup, vasküler hemostaz ve kan akımının düzenlenmesinde, vasküler tonusun ayarlanmasında, damar geçirgenliğinin düzenlenmesinde, koagülasyon ve fibrinolizis dengesinin düzenlenmesinde, inflamatuvar aktivitede ve hücre proliferasyonunda aktif rol oynamaktadır.^{12,13}

Erem ve ark., vasküler komplikasyonu olan ve olmayan Tip 2 DM hastaları ile DM olmayan sağlıklı bireylerin koagülasyon parametrelerinden vWF, PAI-1, fibrinojen ve AT III düzeylerini değerlendirdikleri çalışmalarında, DM hastalarında plazma AT III, fibrinojen ve vWF aktivitesinin anlamlı düzeyde yüksek olduğunu belirtmişlerdir.¹⁸

VWF, damar endotelinden sentezlenen hemostazda görevli bir faktördür. Çalışmamızda plazma vWF düzeyi, diyabet olup retinopatisi olanlarda ve diyabet olup retinopatisi olmayanlarda, kontrol grubuna göre yüksek düzeyde saptandı (p değerleri sırasıyla 0,007 ve 0,004). Bu sonuç, diyabetin erken dönemlerinde endotel hasarının başladığını düşündürmektedir. Diyabet hastalarında vWF düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek düzeyde saptanması, diyabette koagülasyon-fibrinolizis dengesinin koagülasyon yönüne kaydığını göstermektedir.

Damar endoteli, kanı damarda sıvı halde tutabilmek için koagülasyon ve fibrinolizisi denge halinde tutmaktadır. Damar endotelinden, kanı sıvı halde tutmaya çalışan t-PA ve travma esnasında ortaya çıkan hemorajiyi kontrol altında tutmak ve pıhtılaşmayı sağlamak amaçlı vWF ve PAI-1 salgılanmaktadır.

Madan ve ark., diyabetik retinopatili ve diyabet olup retinopatisi olmayan hastalarla kontrol grubu arasında plazma koagülasyon ve fibrinoliz

parametrelerini değerlendirdikleri çalışmalarında, diyabetik retinopati grubunda vWF aktivitesinin ve PAI-1 düzeyinin diğer gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu bildirmişlerdir.¹⁹ Cho ve ark., Tip 2 DM hastalarında fibrinolizis parametrelerinden plazma t-PA antijeni ve PAI-1 antijeni düzeyini kontrol grubuna göre yüksek olarak belirlemiş, ancak proliferatif diyabetik retinopatili olan hastalarda t-PA ve PAI-1 antijen düzeyinin, diyabet olup retinopatisi olmayan ve “background” diyabetik retinopatili olan gruba göre farklı olmadığını belirtmişlerdir.²⁰ Maser ve ark., Tip 1 DM hastasında t-PA ve PAI-1 düzeylerini değerlendirdikleri çalışmalarında, erkek hastalarda diyabetik nöropati, mikroalbuminüri, alt ekstremitte hastalığı ve retinopati olan gruplarda bu komplikasyonları olmayanlara göre belirgin düzeyde yüksek saptamış, kadınlarda ise retinopati olan grupta olmayanlara göre belirgin düzeyde yüksek t-PA/PAI-1 kompleks düzeyi olduğunu belirlemişler, bu sonucu diyabetin ileri döneminde koagülasyon fibrinolizis dengesinde bozulma oluştuğunu belirterek açıklamışlardır.²¹ Zalewska-Rydzkowska ve ark., diyabet hastalarında makroanjyopati ve aterosklerotik obliterasyon hastalarında, plazma t-PA, u-PA, PAI-1 düzeyi ve aktivitesi, fibrinojen düzeyi fibrin yıkım ürünleri düzeyini değerlendirdikleri çalışmalarında t-PA, PAI-1 düzeyi ve aktivitesi ve fibrinojen düzeyini ve fibrin yıkım ürünleri düzeylerini makroanjyopati grubunda ve aterosklerotik obliterasyon grubunda kontrol grubuna göre yüksek düzeyde saptamışlardır.²² Bizim çalışmamızda da, sözü edilen çalışmalara benzer şekilde, özellikle diyabetik retinopatili grupta vWF anlamlı olarak yüksek düzeylerde olup, t-PA ve PAI-1 düzeyleri artmış olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde değildi. Bu farklılığın çalışmalardaki grupların yaş, diyabet süresi ve şiddeti gibi faktörlerden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Morise ve ark., diyabetik retinopatili, diyabet olup retinopatisi olmayan hastalar ve kontrol grubunda plazma ET-1 ve vWF düzeylerini değerlendirdikleri çalışmalarında, ET-1 ve vWF düzeylerinin diyabetik retinopati grubunda diğer gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu

belirtmişlerdir.²³ Biz de benzer şekilde, diyabetik retinopati grubunda ET-1 ve vWF düzeylerini kontrol grubundan yüksek tespit ettik. Diyabetik retinopati grubunda ET-1 seviyesinin yüksek düzeyde saptanması, diyabetik retinopatide damar endotel hasarının meydana geldiğini gösterdiği gibi, aynı zamanda vazokonstriktör mediyatör olan ET-1 seviyesinin artışı ile diyabetik retinopatide vasküler direncin artacağını, bunun ise retinal iskemiye artıracığını düşünmekteyiz.

Bilinen en güçlü vazodilatör olan NO'nun sentezinde görev alan NOS, ADMA tarafından inhibe edilir ve sonuç olarak endotele bağlı vazodilatasyon önlenir, vasküler direnç ise artar.

Malecki ve ark., Tip 2 DM hastaları ve kontrol grubu hastalarında plazma ADMA düzeylerini değerlendirdikleri çalışmalarında, en yüksek ADMA düzeyinin diyabetik retinopati grubunda, ikinci olarak diyabet olup retinopati olmayan grupta ve en düşük olarak ise kontrol grubunda olduğunu belirtmişlerdir.¹⁰ Abhary ve ark., diyabet olup retinopatisi olmayan ve diyabetik retinopatisi olan hastalarda ADMA, L-arjinin ve SDMA düzeyini değerlendir-

dikleri çalışmalarında, diyabetik maküler ödemi olan ve proliferatif diyabetik retinopatisi olan hastalarda kontrol grubuna göre ADMA, L-arjinin ve SDMA düzeylerinin yüksek olduğunu belirtmişlerdir.⁹ Çalışmamızda ise plazma ADMA düzeyleri, diyabetik retinopatili olanlar ve diyabet olup retinopatisi olmayanlarda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı (p değerleri sırasıyla 0,001 ve 0,002). Bu sonuç, bize diyabetin erken dönemlerinde endotelial disfonksiyonun başladığını, ayrıca NO azalmasına sekonder olarak vazodilatasyonun azaldığını, bunun ise retinal iskemi gelişimine neden olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, endotelial hasar diyabetin erken dönemlerinde başlamakta, diyabetin ilerlemesi ile endotelial hasar da artmaktadır. Ayrıca, diyabet hastalarında koagülasyon-fibrinolizis dengesi koagülasyon lehine bozulmaktadır. Endotelial parametrelerin diyabetik retinopatinin gelişimi üzerindeki etkilerini değerlendirmek için daha geniş kapsamlı ve prospektif çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Klein R, Klein BE, Moss SE. The Wisconsin epidemiological study of diabetic retinopathy: a review. *Diabetes Metab Rev* 1989;5(7):559-70.
2. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 1993;329(14):977-86.
3. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol* 1984;102(4):520-6.
4. Krolewski AS, Canessa M, Warram JH, Laffel LM, Christlieb AR, Knowler WC, et al. Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1988;318(3):140-5.
5. Moloney JB, Drury MI. The effect of pregnancy on the natural course of diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1982;93(6):745-56.
6. Meyer-Schwickerath R, Pfeiffer A, Blum WF, Freyberger H, Klein M, Lösche C, et al. Vitreous levels of the insulin-like growth factors I and II, and the insulin-like growth factor binding proteins 2 and 3, increase in neovascular eye disease. Studies in nondiabetic and diabetic subjects. *J Clin Invest* 1993;92(6):2620-5.
7. Ko BC, Lam KS, Wat NM, Chung SS. An (A-C)_n dinucleotide repeat polymorphic marker at the 5' end of the aldose reductase gene is associated with early-onset diabetic retinopathy in NIDDM patients. *Diabetes* 1995;44(7):727-32.
8. Sönmez K, Bardak KY, Özürtürk Y. [Variations of posterior vitreous detachment and neovascularization in cases of diabetes mellitus]. *Türkiye Klinikleri J Ophthalmol* 2012;21(2):71-8.
9. Abhary S, Kasmeridis N, Burdon KP, Kuot A, Whiting MJ, Yew WP, et al. Diabetic retinopathy is associated with elevated serum asymmetric and symmetric dimethylarginines. *Diabetes Care* 2009;32(11):2084-6.
10. Malecki MT, Undas A, Cyganek K, Mirkiewicz-Sieradzka B, Wolkow P, Osmenda G, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) is associated with retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007;30(11):2899-901.
11. Bajaj MS, Birktoft JJ, Steer SA, Bajaj SP. Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 2001;86(4):959-72.
12. van den Oever IA, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. *Mediators Inflamm* 2010;2010:792393.
13. Stehouwer CD, Lambert J, Donker AJ, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc Res* 1997;34(1):55-68.

14. Adamiec-Mroczek J, Oficjalska-Mlynczak J, Misiuk-Hojlo M. Roles of endothelin-1 and selected proinflammatory cytokines in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy: analysis of vitreous samples. *Cytokine* 2010;49(3):269-74.
15. Antoniadou C, Shirodaria C, Leeson P, Antonopoulos A, Warrick N, Van-Assche T, et al. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur Heart J* 2009;30(9):1142-50.
16. Kielstein JT, Boger RH, Bode-Boger SM, Frolich JC, Haller H, Ritz E, et al. Marked increase of asymmetric dimethylarginine in patients with incipient primary chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(1):170-6.
17. Hopfner RL, Gopalakrishnan V. Endothelin: emerging role in diabetic vascular complications. *Diabetologia* 1999;42(12):1383-94.
18. Erem C, Hacıhasanoğlu A, Celik S, Ovalı E, Ersöz HO, Ukiñ K, et al. Coagulation and fibrinolysis parameters in type 2 diabetic patients with and without diabetic vascular complications. *Med Princ Pract* 2005;14(1):22-30.
19. Madan R, Gupta B, Saluja S, Kansra UC, Tripathi BK, Guliani BP. Coagulation profile in diabetes and its association with diabetic microvascular complications. *J Assoc Physicians India* 2010;58:481-4.
20. Cho YW, Yang DH, Oh DY, Baick SH, Kim SK, Kim SJ, et al. Plasma t-PA and PAI-1 antigen concentrations in non-insulin dependent diabetic patients: implication for diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 1994;22(2-3):123-8.
21. Maser RE, Ellis D, Erbey JR, Orchard TJ. Do tissue plasminogen activator-plasminogen activator inhibitor-1 complexes relate to the complications of insulin-dependent diabetes mellitus? Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *J Diabetes Complications* 1997;11(4):243-9.
22. Zalewska-Rydzkowska D, Rosc D, Ponikowska I, Michalski A, Graczykowska-Koczorowska A, Rydzkowski M. [Plasminogen activators (t-PA and u-PA) and other fibrinolysis parameters in patients with atherosclerosis obliterans and diabetic macroangiopathy]. *Pol Merkur Lekarski* 2001;11(65):414-7.
23. Morise T, Takeuchi Y, Kawano M, Koni I, Takeda R. Increased plasma levels of immunoreactive endothelin and von Willebrand factor in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1995;18(1): 87-9.