

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TİP 2 DİABETES MELLİTUSLU HASTALARDA
ÜRİNER TİP IV KOLLAJEN ve MATRİKS
METALLOPROTEİNAZ-9 DÜZEYLERİ VE DİYABETİK
NEFROPATİ AÇISINDAN YARARLILIĞI

UZMANLIK TEZİ
DR. MEHMET TÜRK

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. DİLER ASLAN

DENİZLİ – 2009

Prof. Dr. Diler Aslan danışmanlığında Dr. Mehmet Türk tarafından yapılan “Tip 2 Diabetes Mellituslu Hastalarda Üriner Tip IV Kollajen ve Matriks Metalloproteinaz-9 Düzeyleri ve Diyabetik Nefropati Açısından Yararlılığı” başlıklı çalışma jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN Prof. Dr. Diler ASLAN



ÜYE Prof. Dr. Bünyamin KAPTANOĞLU



ÜYE Prof. Dr. Süleyman DEMİR



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

17/ 02 /2009

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANI


Prof. Dr. Zafer AYBEK
Dekan

TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalıŐmalarım s¼recinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tez danıŐmanım Prof. Dr. Diler ASLAN'a, uzmanlık eğitimimdeki katkılarından dolayı Prof. Dr. B¼nyamin KAPTANOĞLU'na, Prof. Dr. Simin ROTA'ya, Prof. Dr. S¼leyman DEMİR'e, Doç. Dr. H¼lya AYBEK'e, Yrd. Doç. Dr. YaŐar ENLİ'ye; bu alandaki çalışmaları ile bize yol g¼steren, Prof. Dr. G¼l G¼NER'e; tez çalıŐmalarımdaki yardım ve desteklerinden dolayı arkadaşlarım Dr. Murat ÇELİKER'e Dr. Feride SERT'e, Dr. Ramazan AKBAY'a, Dr. Funda ERCAN'a, Dr. Őahika ÖZEN'e, Dr. Didem PINARBAŐILI'ya, Dr. Koray KORKMAZCAN'a, Dr. Emine KAVALCI'ya, Dr. Fatih YAMAN'a, Dr. Cafer GÖNEN'e ve Dr. Mahmut ŐENYURT'a, uzmanlık eğitimim s¼resince destek ve anlayıŐlarından dolayı merkez laboratuvarında çalıŐan t¼m personele teŐekk¼r ederim. Uzmanlık eğitimim ve tez d¼nemimde her t¼rl¼ fedakarlık ve desteğini benden esirgemeyen ve anlayıŐla hep yanımda olan sevgili eŐim Hasibe T¼RK'e ve biricik kızım Bihter'e teŐekk¼r ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
Diabetes Mellitus	3
Epidemiyoloji	3
Sınıflandırma	3
Tip 1 Diabetes Mellitus	3
Tip 2 Diabetes Mellitus	4
Tanı	5
Tanı ve İzlemede Kullanılan Testler	6
Diabetes Mellitus'un Kronik Komplikasyonları	8
Diyabetik Nefropati	9
Kollajen	12
Tip IV Kollajen	15
Matriks Metalloproteinazlar	15
Matriks Metalloproteinaz-9	19
GEREÇ VE YÖNTEM	21
BULGULAR	31
TARTIŞMA	48
SONUÇLAR	59
ÖZET	61
SUMMARY	63
KAYNAKLAR	65

TABLolar ÇİZELGESİ

	Sayfa No
Tablo 1: Diabetes Mellitus'un Etyolojik Sınıflandırması.....	4
Tablo 2: Diabetes Mellitus tanı kriterleri.....	5
Tablo 3: Albümin atılımındaki anormalliklerin tanımları.....	8
Tablo 4: Diabetes mellitus kronik komplikasyonları.....	8
Tablo 5: Omurgalılarda bulunan önemli kollajen molekülleri ve vücuttaki dağılımları	14
Tablo 6: Ölçülen analitlerin ölçüm yöntemleri ve ölçümde kullanılan cihazlar	23
Tablo 7: Biyokimyasal testlerin analitik performansı.....	31
Tablo 8: Biyokimyasal testlerin Mart 2008 dış kalite kontrol sonuçları.....	32
Tablo 9: Biyokimyasal testlerin Nisan 2008 dış kalite kontrol sonuçları....	32
Tablo 10: Kontrol ve diyabetli hasta grubunun antropometrik özellikleri ve ölçüm sonuçları	33
Tablo 11: Albümin atılımı gruplarına göre bireylerin antropometrik özellikleri ve ölçüm sonuçları.....	38
Tablo 12: Albümin atılım gruplarındaki farklılıkların dağılımı.....	39
Tablo 13: HbA _{1c} düzeylerine göre bireylerin antropometrik özellikleri ve ölçüm sonuçları.....	40
Tablo 14: HbA _{1c} düzeyi gruplarındaki farklılıkların dağılımı.....	41

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

	Sayfa No
Şekil 1: Kollajen molekülünün yapısı	13
Şekil 2: Matriks Metalloproteinazların Genel Yapısı	18
Şekil 3: Diyabet süresi gruplarında idrarda albümin atılımı	34
Şekil 4: Diyabet süresi gruplarında idrarda Tip IV kollajen atılımı.....	35
Şekil 5: Diyabet süresi gruplarında idrarda MMP-9 atılımı.....	35
Şekil 6: Nefropati evresi gruplarında idrarda Tip IV kollajen atılımı.....	36
Şekil 7: Nefropati evresi gruplarında idrarda MMP-9 atılımı.....	37
Şekil 8: Albümin atılımı gruplarında dağılımlar.....	42
Şekil 9: HbA _{1C} gruplarında dağılımlar.....	45

GİRİŞ

Diabetes mellitus akut komplikasyonların önlenmesi ve kronik komplikasyon riskinin azaltılması için sürekli tıbbi bakım ve hasta eğitimi gerektiren kronik bir hastalıktır (1).

Diabetes mellitus, beklenen yaşam süresini 5 ile 10 yıl arasında azaltmaktadır. Diabetes mellitus, böbrek yetmezliği, 65 yaş altındaki körlük ve travmatik nedenler dışında yapılan amputasyonların en yaygın görülen nedenidir. Bu komplikasyonlar topluma ve bireye çok büyük maliyetlere neden olmaktadır. Komplikasyonların başlaması yaşam kalitesinde azalmaya neden olmaktadır. Erken tanı ve özenli tedavi ile bu komplikasyonları önlemek, geciktirmek veya etkilerini azaltmak mümkündür (2,3).

DM'nin komplikasyonları mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar olarak ikiye ayrılır. Mikrovasküler komplikasyonları; retinopati, nefropati ve nöropatidir. Makrovasküler komplikasyonları ise koroner kalp hastalığı, periferik damar hastalığı ve serebrovasküler hastalıklardır (2,4,5).

Diyabetik nefropati, diabetes mellitusun en önemli mikrovasküler komplikasyonudur (6). Tip 1 diyabetli hastaların üçte birinde diyabetik nefropati görülmektedir (7). Özellikle Tip 2 diyabetle ilişkili olan diyabetik nefropati, dünya çapında son dönem böbrek yetmezliğinin en çok görülen sebebidir (8). Amerika Birleşik Devletlerinde son dönem böbrek yetmezliğinin en yaygın nedeni Tip 2 diyabete bağlı diyabetik nefropatidir (9). Ülkemizde ise 2001 yılı Türk nefroloji derneği raporuna göre yeni tanı konulan son dönem böbrek yetmezlikli hastaların % 25,3'ünün etyolojisinde diabetes mellitus yer almaktadır (10).

Tip 2 diabetes mellitus, klinik olarak tanı konmadan ortalama 9-12 yıl önce başladığı kabul edilen kronik bir hastalıktır. Bu prelinik dönemde mikrovasküler değişiklikler ortaya çıkıp ilerlediğinden, tanı konulduğu anda hastaların %15-20'sinde retinopati, %5-10'unda proteinüri saptanmaktadır. Bu hasta grubunda hipertansiyon, dislipidemi, obezite ve kardiyovasküler hastalıklar, normal

popülasyona göre 2-4 kat daha fazla bildirilmektedir. Kronik komplikasyonlar geliştikten sonra tedavi oldukça güçleşmekte ve sağlık harcamalarında diyabetik hastalara düşen pay hızla artmaktadır (11).

Tip 1 ve Tip 2 diyabetli hastalarda yapılan çalışmalar sıkı diyabet kontrolünün özellikle mikrovasküler komplikasyonların başlamasını geciktirdiği ve ilerlemesini yavaşlattığını göstermiştir (6,12-14). Bu nedenle nefropatinin erken dönemde saptanması ve tedavi sürecinin düzenlenmesi, komplikasyonların önlenmesi açısından önemlidir fakat diyabetik nefropatinin erken saptanabilmesi için ideal bir belirteç bulunmamaktadır (15,16).

Diyabetik nefropati ile ilgili klinik ve patolojik çalışmalar hem glomerüller, hem de intersitisyumda matriks birikimini ortaya koymaktadır (17). Matriks metalloproteinazlar ekstrasellüler matriksi yıkan enzimlerdir (18). “Jelatinaz B” olarak da adlandırılan Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9), glomerül bazal membranın temel bileşenini oluşturan Tip IV kollajeni yıkan başlıca enzimlerden birisidir (19). Tip 2 diyabetik nefropatili hastaların erken dönemlerinde Tip IV kollajen ve MMP-9’un idrar ile atılımında, albümin atılımından önce artış saptayan az sayıda çalışma bulunmaktadır (20-22).

Bu tez çalışmasında, Tip 2 diyabetli hastalarda, üriner MMP-9 ve üriner Tip IV kollajen düzeylerinin, hiperglisemi, üriner albümin atılımı, DM’lu yıllar ve HbA_{1c} yüzdeleri ile aralarındaki ilişki incelenerek, diyabetin önemli mikrovasküler komplikasyonlarından olan nefropati açısından erken tanı belirteci olarak kullanılıp kullanılamayacağını değerlendirilmesi amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

DİABETES MELLİTUS

Diabetes mellitus (DM), glukozun hücre içine taşınmasında rol alan insülinin salgılanmasında, etkisinde veya her ikisinde birden ortaya çıkan eksiklik sonucu karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarında bozukluklar ile birlikte, kronik hiperglisemi ile karakterize, çoklu etyolojiye sahip metabolik bir hastalığı tanımlar. Tüm organ ve sistemleri etkileyen bu kronik hastalığın akut, kısa dönem ve uzun dönemli komplikasyonlarından, açlık hipoglisemisi veya postprandial hiperglisemi sorumludur. Kronik hiperglisemi, özellikle göz, böbrek, sinir, kalp ve kan damarları olmak üzere çeşitli organlarda uzun dönemde hasarlanma, fonksiyon bozukluğu ve yetmezlik ile ilişkilidir (23,26).

Epidemiyoloji

Dünya üzerinde, tüm yaş gruplarında diyabet prevalansı 2000 yılı itibariyle %2,8'dir. 2030 yılında %4,4 olacağı öngörülmektedir (24). Ülkemizde yapılan epidemiyoloji çalışmasında diyabet prevalansı %7,2 bulunmuştur (25).

Sınıflandırma

Diabetes Mellitus 4 ana gruba ayrılmaktadır (Tablo-1) (26).

Tip 1 Diabetes Mellitus

İmmün kaynaklı ve idyopatik olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır (26,27).

İmmün kaynaklı diyabet, sıklıkla çocuklarda ve genç erişkinlerde görülen diyabet şeklidir. Pankreas beta hücrelerinin hücre kaynaklı otoimmün yıkımı sonucu gelişir. Tip 1 diyabetik hastaların çok az bir kısmı idyopatik diyabet kategorisine girer. Bunların çoğunluğu Afrika veya Asya orijinlidir. Bu diyabet formu kuvvetli kalıtsaldır, otoimmüniteye ait kanıt yoktur (26,27).

Tablo-1: Diabetes Mellitus'un Etyolojik Sınıflandırması (26)

1. Tip 1 DM (beta hücre harabiyeti, genelde mutlak insülin eksikliği mevcuttur)
 - 1.1 İmmünolojik
 - 1.2 İdyopatik
 2. Tip 2 DM (İnsülin direnci veya insülin salgı bozukluğu ön plandadır)
 3. Gestasyonel Diabetes Mellitus
 4. Diğer özgül tipler
 - 4.1. Beta hücre işlevindekigenetik bozukluklar
MODY 1 (Kromozom 20, HNF-alfa); MODY 2 (Kromozom 7, glukokinaz); MODY 3 (Kromozom 12, HNF-1alfa); MODY 4 (Kromozom 13, IPF-1); MODY 5 (Kromozom 17, HNF 1Beta); MODY 6 (Kromozom 2, Neuro D); Mitokondrial DNA 3243 mutasyonu; diğerleri
 - 4.2. İnsülin etkisinde genetik defektler
Tip A insülin direnci, Leprechaunism, Rabson-Mandenhall Sendromu, Lipoatrofik diyabet, diğerleri
 - 4.3. Ekzokrin pankreas hastalıkları
Pankreatit, Travma/Pankreatektomi, Kistik Fibrozis, Hemokromatozis, Fibrokalküloz Pankreatopati, diğerleri
 - 4.4. Endokrinopatiler
Akromegali, Cushing Sendromu, Glukagonoma, Feokromasitoma, Hipertiroidi, Somatostatinoma, Aldesteronoma, diğerleri
 - 4.5. İlaç ve kimyasal maddeler
Vakor, Pentamidin, Nikotinic asit, Glukokortikoidler, Tiroid hormonu, Diazoksit, Beta-adrenerjik agonistler, Tiazidler, Dilantin, Alfa INF, diğerleri
 - 4.6. İnfeksiyonlar
Konjenital Rubella, CMV, diğerleri
 - 4.7. İmmün kaynaklı nadir diyabet formları
Anti insülin reseptör antikörleri, "Stiffman" sendromu, diğerleri
 - 4.8. Diabetle birlikte görülen diğer genetik sendromlar
Down sendromu, Klinefelter sendromu, Turner sendromu, Wolfram sendromu, Friedreich ataksisi, Huntington koresi, Laurence-Moon-Biedl Sendromu, Miyotonik Distrofi, Porfiria, Prader-Willi Sendromu, diğerleri
-

Tip 2 Diabetes Mellitus

Diyabetli hastaların %90-95'ini kapsayan, Tip 2 diyabet hem insülin sekresyonunda, hem de insülin duyarlılığındaki bozukluk sonucu oluşan bir hastalıktır. Spesifik etyoloji bilinmese de bu tip diyabette, beta hücrelerinin otoimmün yıkımı yoktur (26,28).

Bu diyabet şeklinde, hiperglisemi dereceli olarak arttığından yıllarca tanı

konamaz. Erken evrelerde hastanın durumu diyabetin klasik semptomlarını algılayabileceği kadar ciddi değildir. Bununla birlikte böyle hastalar, makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonların gelişimi açısından artmış riske sahiptir (26).

Bu hastalarda insülin sekresyonu defektiftir ve insülin direncini karşılamada yetersizdir. İnsülin direnci kilo verme ve/veya hipergliseminin farmakolojik tedavisi ile düzelebilir ama nadiren normale döner. Bu tip diyabet gelişimi, yaşın ilerlemesi, obezitenin varlığı ve fiziksel aktivitenin yokluğu ile artmaktadır. Geçmişte gestasyonel diyabeti olan kadınlarda, hipertansiyonlu veya dislipidemili bireylerde daha sık görülür ve sıklığı farklı ırk/etnik alt gruplarda değişir. Güçlü bir genetik yatkınlığa sahiptir fakat diyabetin bu formunun genetiği komplekstir ve açıkça tanımlanmamıştır (26).

Tanı

Diabetes mellitus tanısı için üç yol vardır, ancak belirgin hiperglisemi yokluğunda bu üç yaklaşımdan birisi başka bir gün içinde kullanılarak, tanının teyid edilmesi gerekir. Diyabet tanısı için kullanılan tanı kriterleri Tablo-2’de gösterilmiştir (1,26).

Tablo-2: Diabetes Mellitus tanı kriterleri (1,26)

1. Poliüri, polidipsi ve açıklanamayan ani kilo kaybı gibi diyabet semptomlarının bulunması ile birlikte günün herhangi bir saatinde, aç veya tok olunmasına bakılmaksızın ölçülen plazma glukoz düzeyinin 200 mg/dL (11.1mmol/L)’ye eşit veya üzerinde olması.

veya

2. En az 8 saatlik tam açlık sonrası, açlık plazma glukoz düzeyinin 126 mg/dL (7,0 mmol/L)’ye eşit veya üzerinde olması.

veya

3. 75 g’lık oral glukoz tolerans testi sırasında 2. saat plazma glukoz düzeyinin 200 mg/dL (11.1mmol/L)’ye eşit veya üzerinde olması.

Diabetes Mellitus'un Tanı ve İzleminde Kullanılan Testler

Glukoz

Diabetes mellitus'un yönetiminde, semptomları kontrol etmek ve hem uzun dönem komplikasyonları azaltmak, hem de hayatta kalma süresinin arttırılması için, iyi glisemik kontrolün sağlanması önemlidir. Diyabetle ilgili yapılan çalışmalarda, kan glukoz düzeyleri ile diyabetik komplikasyonların oluşması arasında kuvvetli ilişki gösterilmiştir. Ayrıca hipergliseminin en iyi şekilde tedavisi ile hem Tip 1, hem de Tip 2 diyabetli hastalarda, hem mikrovasküler hem de makrovasküler komplikasyonların görülme riskinde azalma kanıtlanmıştır (12,13,29-33).

Kan glukozu tam kan, plazma veya serumda ölçülebilir. Kan sabahları ve bir gecelik açlık sonrası alınmalıdır. Glukoz ölçümünde enzimatik yöntemler göreceli olarak iyi standardize edilmişlerdir (34).

Ketonlar

İdrarda veya kanda ketonları, özellikle Tip 1 diyabetli hastaların ve gestasyonel diyabetlilerin izlenmesinde önemli testlerdir. Ketonların varlığı gerçekleşmek üzere olan veya gerçekleşmiş ketoasidozu gösterir (35).

Glike Hemoglobin (HbA_{1c})

Hemoglobin nonenzimatik glikasyona uğrayan birçok proteinden biridir ve glike hemoglobin glukoz tarafından nonenzimatik glikasyona uğrayan hemoglobin için genel bir terimdir. HbA_{1c}, bu glike türlerin en yaygın olarak bulunanını tanımlar (36).

HbA_{1c} diyabetli hastalarda uzun dönem glisemi durumunun rutin izleminde yaygın olarak kullanılır. Glike hemoglobin, önceki 6-8 haftanın ortalama glukoz konsantrasyonunun değerlendirilmesinde kullanılır. Yapılan çalışmalar, hastaların mikrovasküler komplikasyon riskinin değerlendirilmesinde HbA_{1c}'nin önemli bir belirteç olduğunu göstermiştir (12,13,37,38).

Birçok klinik çalışmada, HbA_{1c} seviyesindeki düşüşlerin hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabetli hastalardaki diyabetik komplikasyonların gelişme riskini düşürdüğü gösterilmiştir (14,39,40).

Lipitler

Diyabetli tüm bireylerin lipit profilleri her yıl kontrol edilmelidir. Minimum lipit profili total kolesterol, trigliserit, HDL-kolesterol ve LDL-kolesterol ölçümlerini içermelidir (41). Total ve LDL kolesterol düzeylerinin artması, HDL kolesterol düzeylerinin düşmesi, kardiyak hastalık için iyi bilinen risk faktörleridir ve nefropatiye ilerlemede katkılarının olabileceğine dair kanıtlar vardır. Trigliserit düzeylerinin yüksekliği de Tip 2 diyabetik nefropatide risk faktörü olarak tanımlanmıştır (42).

İdrarda Albümin (Mikroalbüminüri)

Mikroalbüminüri 24 saatte 30-300 mg albüminin idrardan atılımı olarak tanımlanır. Mikroalbüminüri ve diyabetik renal hastalık yakın ilişkilidir. Yapılan bazı çalışmalara göre mikroalbuminürinin, hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabetli hastalarda, diyabetik nefropati gelişiminin güçlü bir habercisi olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca mikroalbuminüri gelişmesi kardiyovasküler hastalıklardan prematüre ölüm ve morbidite riskinde artışa neden olmaktadır. Bu nedenlerle idrarla albümin atılım düzeyi ölçümü diyabetli hastaların rutin takibinin ayrılmaz bir parçası olmuştur (43-49).

Amerikan Diyabet Derneği (ADA), Tip 2 DM'e tanı konulduğunda ve Tip 1 DM'e tanı konulduktan 5 yıl sonra mikroalbüminüri taraması yapılması; sonra yılda 1 kez taramaya devam edilmesini önermektedir (50).

Mikroalbüminüri taraması 3 yöntemle yapılabilir (50).

1. Spot idrarda albümin/kreatinin oranının ölçümü
2. 24 saatlik idrarda ölçüm (Aynı anda kreatinin klirensi ölçümü yapılabilir)
3. Zamana dayalı idrarda ölçüm (4 veya 8 saatlik)

Spot idrarda albümin/kreatinin oranının saptanması 24 saat boyunca idrar toplamaktan daha pratik bulunmuştur ve doğru sonuç verdiği için tercih edilmektedir. Albümin atılımında bilinen diurnal varyasyon nedeniyle sabah ilk idrar veya sabah idrarları en idealidir. Fakat bu zamanlama kullanılamıyorsa, aynı bireyde farklı dönemlerdeki ölçüm aynı saatlerde yapılmalıdır. İdrar atılımı ile ilgili kavramlar Tablo-3'de verilmiştir (51).

Tablo-3: Albümin atılımındaki anormalliklerin tanımları (51)

Kategori	Spot idrar albümini (mg/gr kreatinin)	24 saatlik idrar albümini (mg/24 saat)	Sürekli idrar albümini (µg/dakika)
Normal	< 30	< 30	< 20
Mikroalbüminüri	30 - 299	30 - 299	20 - 199
Klinik albüminüri	≥ 300	≥ 300	≥ 200

DİABETES MELLİTUS'UN KRONİK KOMPLİKASYONLARI

DM'nin kronik komplikasyonları mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar olarak ikiye ayrılır (Tablo-4) (2,52).

Tablo-4: Diabetes mellitus kronik komplikasyonları (2,52).

1. Mikrovasküler Komplikasyonlar
a) Nefropati
b) Retinopati
c) Nöropati
2. Makrovasküler Komplikasyonlar
a) Aterosklerotik kalp hastalığı
b) Periferik vasküler hastalık
c) Serebrovasküler hastalık

DM'un komplikasyonları yaygındır ve toplum ve birey için çok büyük maliyetlere neden olmaktadır. Komplikasyonların başlaması, özellikle de hem

mikrovasküler hem de makrovasküler hastalıkların birlikte bulunması ile, yaşam kalitesinde azalmaya neden olmaktadır (2).

İngiltere’de toplam sağlık bütçesinin % 4-5’ini diyabetli hastaların bakımına yapılan masrafların oluşturduğu hesaplanmıştır. Amerika Birleşik Devletlerinde halk sağlığı için harcanan her 7 dolardan 1’inin diyabetle ilişkili çok sayıdaki komplikasyonlar yüzünden, diyabetli hastalara harcandığı hesaplanmıştır. Tip 2 diyabetli hastalara kişi başına yapılan yıllık masrafların anormal böbrek fonksiyonu varlığında %65, ilerlemiş böbrek hastalığı olanlarda %195 ve son dönem böbrek yetmezliği olanlarda %771 arttığı gösterilmiştir (53-55).

Bu nedenlerle diyabete bağlı nefropatinin erken dönemde saptanabilmesi hem yaşam kalitesinin artırılması hem de toplum ve bireye yükleyeceği maliyetlerin önlenmesi için çok önemlidir. Böbrek hastalığının erken saptanması; kan basıncının sıkı kontrolü, anjiyotensin çevirici enzim (ACE) inhibitörleri veya anjiyotensin 2 reseptör blokörü ile tedavi ve gliseminin çok titiz bir şekilde kontrolü gibi, diyabetli hastalarda kronik böbrek yetmezliğine gidişi yavaşlatacak faktörlerle tedaviye olanak sağlar (56,57).

Geleneksel olarak yeni başlayan nefropati, daha sonra makroalbuminüriye (idrarda 300 mg/gün’den fazla albumin atılımı) ilerleyen ve ardından böbrek yetmezliği ile sonuçlanan, mikroalbuminürinin (idrarda 30-300 mg/gün albumin atılımı) görülmesi ile tanımlanır (9,51). Middleton ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, diyabetli hastalardaki kronik böbrek yetmezliğini taramada kullanılan kreatinin veya albuminüriye dayalı güncel tarama stratejilerinin, önemli sayıda kronik böbrek yetmezlikli hastanın saptanmasında yetersiz kaldığı bulunmuştur (56).

DIYABETİK NEFROPATİ

Diyabetik nefropati hem Tip 1, hem de Tip 2 diyabetli hastalarda en sık görülen mikrovasküler komplikasyondur ve son dönem böbrek yetmezliğine yol açmaktadır. Bununla birlikte diyabetik nefropati, hem Tip 1, hem de Tip 2 diyabetli hastalarda mortalite ve morbiditenin en önemli nedenleri arasındadır. Gelişmiş ülkelerde son

dönem böbrek yetmezliği nedeniyle diyalize giren hastaların önemli bir bölümünde etyoloji diyabetir. Yine bu ülkelerde her yıl ilk kez renal replasman tedavisine başlayan hastaların üçte birinde tanı diyabetik nefropatidir (58,59).

Diyabetik bir hastada üç ila altı ay arasında en az iki idrar analizinde günlük 300 mg ve üzerinde albüminüri veya günlük 500 mg ve üzerinde proteinüri saptanması ile diyabetik nefropati tanısı konulur. Bu hastalar uygun şekilde tedavi edilmez ve izlenmezlerse proteinüri sıklıkla nefrotik düzeye ilerler ve böbrek fonksiyonları zamanla kaybolur. Bu böbrek fonksiyon değişiklikleri, glomerüler bazal membran kalınlaşması, ekstrasellüler matriks birikimi ile mezangial genişleme, sayısında ve/veya yoğunluğunda azalmayı içeren glomerüler epitelyal hücrelerde (podosit) değişiklikler, glomerülosklerozis ve tubulointerstisyel fibrozisi içeren yapısal anormalliklerin sonucu olarak gelişmektedir (58-60). Glomerüler bazal membran değişiklikleri, glomerüler hiperfiltrasyon ile birlikte ve artan glomerüler hidrostatik basınç mikroalbuminüriye neden olur. Diyabetik nefropatideki böbrek fonksiyon kaybına mezangial değişiklikler neden olmaktadır. Diyabetik nefropatideki mezangial genişleme ve bazal membran kalınlaşması aralarında Tip IV kollajenin de bulunduğu proteinlerin birikimi sonucu olmaktadır (61). Bazı hastalarda glomerüler bazal membran kalınlaşması mikroalbuminüri ile ilişkiliyken, bazılarında bu patolojik değişikliğe karşın mikroalbuminüri gözlenmez. Bu nedenle mikroalbuminürinin gözlenmemesi diyabetik nefropatinin dışlanması için yeterli olamayabilmektedir (17).

Diyabetik nefropati, ABD’de ve Avrupa ülkelerinde son dönem böbrek yetmezliği nedenleri arasında birinci sıradadır ve ABD’de yeni gelişen son dönem böbrek yetmezliğinin %40’ını diyabetik nefropati oluşturmaktadır (51). Ülkemizde ise 2001 yılı Türk Nefroloji Derneği raporuna göre yeni tanı konulan son dönem böbrek yetmezlikli hastaların %25.3’ünün etyolojisinde diabetes mellitus yer almaktadır (10).

Prevalans ve İnsidans

Tip 1 DM’in %30-50’sinde, Tip 2 DM’in %15’inde nefropati gelişir. İnsidans erkeklerde ve diyabeti 15 yaşından önce başlayanlarda daha yüksektir (62).

Tip 1 DM'lu hastalardan mikroalbüminüri ortaya çıkanların; %80'inde 10-15 yıl içinde klinik nefropati geliştiği görülmektedir. Klinik nefropati gelişenlerin; 10 yıl içinde %50'si, 20 yıl içinde %75'den fazlası son dönem böbrek yetmezliğine ilerlemektedir. Mikroalbüminürisi olan tip 2 diyabetli hastaların %20-40'ında nefropati gelişmektedir. Klinik nefropati gelişenlerin %20'sinde ise 20 yıl içinde son dönem böbrek yetmezliği gelişmektedir. Tip 2 DM'un sıklığı Tip 1 DM'a göre 10-15 kat fazla olduğundan, diyabetik nefropatili hastaların önemli bir bölümünü Tip 2 DM'lu hastalar oluşturmaktadır. Bu rakamlar diyabete bağlı böbrek hastalığının önemli bir toplumsal ve ekonomik problem olduğunu göstermektedir (59,62).

Diyabetik Nefropatinin Patofizyolojisi

Glomerüler hiperfiltrasyon veya glomerüler filtrasyon hızında (GFR) artmanın diyabetli hastalarda böbrek bozukluğunun patogenezinde tetikleyici faktör olduğu düşünülmektedir. Glukoz intoleransı kötüleştikçe idrarda protein atılımı ve mikroalbüminüriye rağmen ortalama GFR artmaktadır. Hipergliseminin renovasküler sistemi etkilemesi ile diyabetik glomeruloskleroz ortaya çıkabilir. Glomeruloskleroz büyüme faktörlerinin uyarılışına bağlı olmaktadır. İlerleyici parankimal hasar glomerüllerin seçici geçirgenliğini bozar ve proteinlerin glomerüler kapillerden filtre olmasını sağlar. İnflamatuvar ve vazoaaktif aracı moleküllerin proksimal tubuluslarda inflamasyona neden olması zamanla renal skar ile sonuçlanır. Ayrıca genetik faktörler, sistemik hipertansiyon, fazla protein alımı, hiperlipidemi gibi faktörler de diyabetik nefropatinin gelişiminde rol oynayabilirler (58-62).

Diyabetik Nefropatinin Evrelendirilmesi

Diyabetik Nefropati; 5 evrede tanımlanmıştır (59,62).

Evre 1 (Hipertrofi-Hiperfiltrasyon Dönemi): Böbrek büyüklüğü ve GFR artmış olarak bulunur. Morfolojik bozukluk olarak glomerül hipertrofisi görülür.

Evre 2 (Sessiz Dönem): GFR değerlerindeki artış devam etmekte, idrarda albüminüri normal sınırlarda bulunmaktadır. Klinik olarak birinci evreden ayrılmayan bu dönemde ilave olarak böbrekte bazal membran kalınlaşması vardır.

Evre 3: Mikroalbuminürinin oluştuğu dönemdir. İdrarla atılan protein miktarı 20-40 µg/dk arasındadır. Bazal membran kalınlaşması, mezengium hacminde artış, filtrasyon yüzeyinde kalınlaşma izlenir. GFR' deki azalma bazal membran kalınlaşması ve interstisyum hacmi artışı ile doğru orantılıdır. Bu dönemden sonra progresyon önlenemeyebilir.

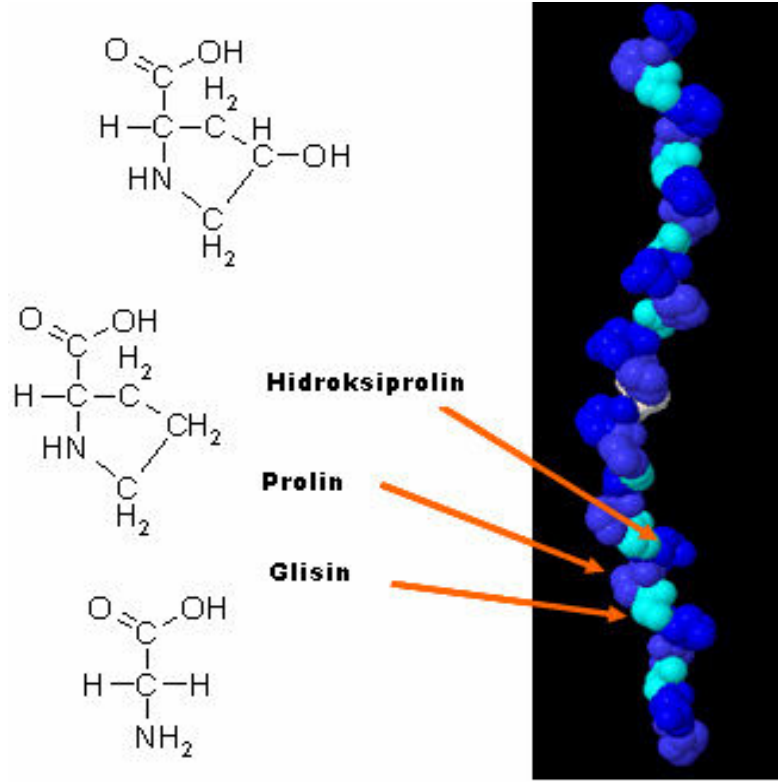
Evre 4 (Klinik Nefropati Dönemi): Bu dönemde 300 mg/gün'den fazla proteinüri vardır. Sıklıkla tabloya hipertansiyon eklenmiştir. Böbreklerde yapısal olarak glomeruloskleroz vardır.

Evre 5 (Son Dönem Böbrek Yetmezliği): Bu dönemde böbrek yetmezliği gelişir. Hipertansiyon bütün vakalarda izlenir. %75 hastada 10 yılda renal replasman tedavisi gerekir.

KOLLAJEN

Toplam vücut proteinlerinin %30, toplam vücut ağırlığının %6 kadarını oluşturan kollajen, insan vücudunda en yaygın olarak bulunan proteindir. Temel fonksiyonu vücut organ ve dokularını şekillendirmek ve yapısal güç sağlamaktır. Yüksek oranda glisin (%33) içeren kollajenin yapısında, prolin (%10) ile amino asit türevleri olan hidroksiprolin (%10) ve hidroksilizin (%1) bulunmaktadır (63).

Temel kollajen molekülü, α -zinciri adı verilen ve her biri yaklaşık 1000 amino asit kalıntısı içeren 95 kDa molekül ağırlığında üç adet polipeptid zincirden oluşmaktadır. Polipeptid zincirinin yapısında, her biri 100'den fazla tekrarlanan Gli-X-Y şeklindeki dizilimde, her üçlü aminoasit diziliminde glisin mevcuttur. Bu üçlü aminoasit parçaları tek bir α zinciri oluşturur ki, bu zincir kollajenin en küçük yapısal birimidir. Üç adet α zinciri üçlü heliksi, bir kollajen monomeri oluşturur. Bu kollajen monomerleri kollajen demetleri ve ağları oluşturarak doku içerisinde organize olmaktadır (Şekil-1) (63,64).



Şekil-1: Kollajen molekülünün yapısı

Son yıllarda yapılan araştırmalarda, en az 28 değişik farklı kollajen tipi bulunduğu gösterilmiştir. Ekstrasellüler matrikste bunlardan, en az 13'ü bulunmaktadır (Tablo-5) (63,65,66).

Tablo-5: Omurgalılarda bulunan önemli kollajen molekülleri ve vücuttaki dağılımları

Kollajen tipi	Zincir kompozisyonu	Yapısal özellik	Doku Dağılımı
I	$\alpha 1$ (I), $\alpha 2$ (I)	Büyük çaplı, çizgili fibriller	Deri, kemik, tendon, ligaman, kornea gibi dokularda yaygındır.
II	$\alpha 1$ (II)	Küçük çaplı, çizgili fibriller	Kıkırdak, vitröz sıvı, anulus fibrozus, nukleus pulposus
III	$\alpha 1$ (III)	Küçük çaplı, çizgili fibriller	Fetal deri, tendon, aorta, kornea,
IV	$\alpha 1$ (IV), $\alpha 2$ (IV), $\alpha 3$ (IV), $\alpha 4$ (IV), $\alpha 5$ (IV), $\alpha 6$ (IV)	Fibrilsiz ağ yapısı	Tüm bazal membranlar
V	$\alpha 1$ (V), $\alpha 2$ (V), $\alpha 3$ (V)	İnce çizgili fibriller	Deri, kemik, tendon, ligaman
VI	$\alpha 1$ (VI), $\alpha 2$ (VI), $\alpha 3$ (VI)	3-5 nm boncuklu fibriller	Deri, kemik, tendon, ligaman, kıkırdak
VII	$\alpha 1$ (VII)	Temel oluşturan fibriller	Deri, oral mukoza, serviks
VIII	$\alpha 1$ (VIII), $\alpha 2$ (VIII)	Hekzagonal merdiven yapısı	Descement membranı, embriyo kalbi, plasenta kapilleri
IX	$\alpha 1$ (IX), $\alpha 2$ (IX), $\alpha 3$ (IX)	Fibriller polimer oluşturmaz.	Kıkırdak, vitröz sıvı
X	$\alpha 1$ (X)	Hekzagonal merdiven yapısı düzeninde ince filamentler oluşturabilmektedir.	Hipertrofik ve mineralize olan kıkırdak
XI	$\alpha 1$ (XI), $\alpha 2$ (XI), $\alpha 3$ (XI)	Kollajen Tip II ile heterotipik fibrillere kopolimerize olabilmektedir	Kıkırdak
XII	$\alpha 1$ (XII)	Fibriller polimer oluşturmaz.	Tendon, ligaman gibi kollajen I içeren bağ dokuları
XIII	$\alpha 1$ (XIII)	Tip 2 membran protein	İnsan fetal epidermisi ve barsak mukozasında yaygındır.

Tip IV Kollajen

Tip IV Kollajen, omurgalılarda 28 farklı tipi bulunan geniş kollajen ailesinin benzersiz bir üyesidir. Birçok kollajenden farklı olarak, Tip IV Kollajen sadece bazal membranda bulunur ve $\alpha 1$ (IV)'den $\alpha 6$ (IV)'ya kadar belirlenmiş, genetik olarak farklı 6 α zincirlerden oluşmuştur. Her bir α zinciri 400 nm uzunluğundadır ve N-terminal 7S bölge (26 kDa, 28 nm), bir üçlü helikal kollajenöz bölge (120kDa, 320 nm) ve C-terminal kollajenöz olmayan globüler bölgeden (25kDa, 52 nm) oluşur. Kollajenöz bölge, X ve Y yerine sıklıkla prolin ve hidrokisprolin veya lisin ve hidrokisilizin'nin geçtiği tekrarlayan Gli-X-Y amino asit dizisinden oluşur. Birçok potansiyel kombinasyonların dışında, zincirler birbirini etkileyip, toplanarak dikkate değer oranda $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ ve $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ 'dan oluşan sadece üç farklı üçlü heliksten oluşmaktadır. İlk olarak tanımlanan ve klasik zincirler olarak isimlendirilen $\alpha 1$ (IV) ve $\alpha 2$ (IV) zincirleri tüm dokuların bazal membranında bulunmakla birlikte diğer dört zincir gelişim sırasında sınırlı doku dağılımı göstermektedir. Örneğin $\alpha 3$ (IV), $\alpha 4$ (IV) ve $\alpha 5$ (IV) zincirleri böbrek glomerüler bazal membranı, akciğer, testis ve gözde bulunmakla birlikte $\alpha 5$ (IV) ve $\alpha 6$ (IV) zincirleri deri, düz kas ve böbrek bazal membranında bulunmaktadır (67,68).

Tip IV kollajen glomerüler bazal membran ve mezangial matriksin temel bileşenidir. Serum ve idrar örneklerindeki Tip IV kollajen düzeyleri, böbrek hastalıklarında matriks dönüşüm hızını yansıtmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda mikroalbuminüri olan diyabetli hastaların idrar Tip IV kollajen düzeyleri, normoalbuminürik diyabetli hastalardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar, diyabetli hastalarda üriner Tip IV kollajen düzeylerinin, idrarla albumin atılımı başlamasından önce yükselmeye başladığını ve seri üriner Tip IV kollajen ölçümlerinin, diyabetteki böbrek hasarlanmasının erken saptanmasında kullanılabilecek bir belirteç olduğunu düşündürmektedir (20,21,69).

MATRIKS METALLOPROTEİNAZLAR

Ekstrasellüler matriks (ESM), hücrelerarası boşluklarda özel bir ortam oluşturan dinamik, interaktif bir yapıdır. Dokulardaki hücrelerin bir arada tutulmasına yardımcı olur ve bunun yanı sıra hücre büyümesi ve farklılaşmasını

kontrol eden pek çok hormon için rezervuar görevi yapar. Bu yapı hücrelerin özel fonksiyonları gerçekleştirmesi için kendilerini yönlendirecek hücre içi sinyalleme yolları ile direkt ya da indirekt olarak etkileşmesini sağlar. Matriks ile hücreler arasında meydana gelen bu etkileşmeler organizmanın normal gelişimi ve fonksiyonu için kritik rol oynar (70,71).

Vasküler ESM molekülleri damar duvarındaki intimal endotel hücreleri, medyal düz kas hücreleri ve adventisyal fibroblastlar tarafından sentez edilirler. Yapılarında 3 temel protein bulunur. Bunlar proteoglikanlar, kollajen fibrilleri ve çoklu yapıştırıcı matriks glikoproteinleridir. Oldukça viskoz yapıda olan proteoglikanlar hücrelere yastık görevi yapar. Kollajen fibrilleri çözünür yapıda değildir; hücreye esneklik ve güç kazandırır. Çoklu yapıştırıcı matriks glikoproteinleri ise çözünür yapıda olup proteoglikanlar ve kollajenin hücre yüzeyine bağlanmasını sağlar (70).

Hücre-matriks etkileşmeleri, ESM bileşenlerinin hidrolizinden sorumlu olan proteolitik enzimler (ekstrasellüler proteazlar) tarafından düzenlenir. Bu enzimler ESM yapısının bileşimini ve bütünlüğünü düzenleyerek matriks molekülleri tarafından oluşturulan sinyallerin kontrolü, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve ölümünde de temel rol oynar. Bu enzim sistemlerinin içinde MMP'ler önemli bir grubu oluşturmaktadır (70,71).

Matriks Metalloproteinazların Özellikleri

Matriks metalloproteinazlar (MMP), ekstrasellüler matriksi parçalayan, nötral pH da aktif olan, multigenik bir endopeptidaz ailesidir. Tümü proenzim olarak fibroblastlar, osteoblastlar, kondrositler, endotel hücreleri, makrofajlar, nötrofiller gibi çeşitli bağ dokusu hücrelerinden salgılanırlar (72,73).

Matriks metalloproteinazlar yara iyileşmesi, anjiyogenez, kemiğin yeniden yapılanması, uterus ve meme dokusu fizyolojik fonksiyonları, ovulasyon, embriyogenezis, embriyo implantasyonu, laktasyon gibi fizyolojik süreçlerde yer aldığı gibi aynı zamanda artrit, ateroskleroz, doku ülseri, tümör hücrelerinin invazyonu ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de rol oynarlar (71,72,74).

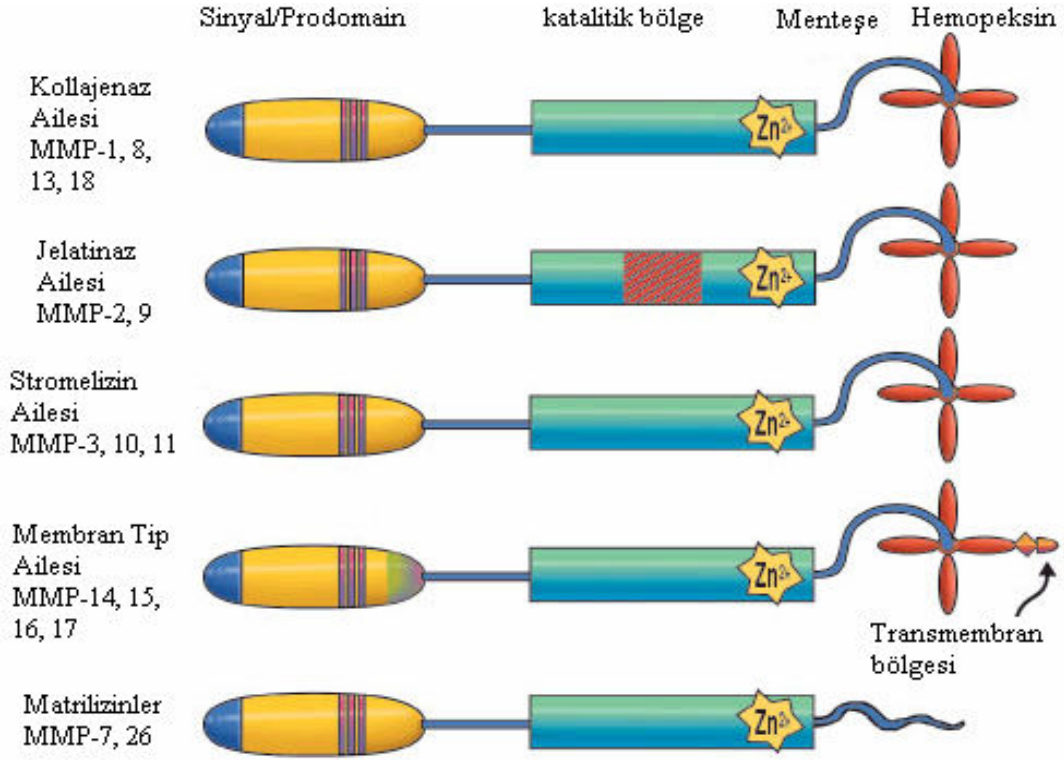
Matriks metalloproteinazlar aşağıdaki özelliklere sahiptir (72).

- a. Ekstrasellüler matriksin en az bir komponentini parçalayan proteinazlardır.
- b. Çinko (Zn) iyonu içerirler ve bu nedenle şelatlayıcı ajanlarla inhibe olabilirler.
- c. Latent formda salgılanırlar ve proteolitik aktivitelerini göstermeleri için aktifleştirilmeleri gereklidir.
- d. Metalloproteinazlara özgül doku inhibitörleri ile (Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, TIMP) inhibe olurlar.
- e. Moleküler klonlama yöntemleri ile çeşitli grup üyelerinin aminoasit benzerlikleri olduğu gösterilmiştir.

Metalloproteinazların Yapısı

Matriks metalloproteinazların primer yapısı incelendiğinde bu proteinlerin birkaç farklı bölge içerdiği görülür (Şekil-2) (72,74,75)

- a) Predomain: İlk bölge predomain olarak tanımlanan, molekülü sekresyon için hedefleyen, ancak daha sonra uzaklaştırılan ve latent enzimde bulunmayan sinyal peptid dizisidir.
- b) Prodomain: Prodomain yapısında bulunan sistein rezidülerinin enzimin latent formunun korunmasında rol oynadığına inanılır. Prodomainin çıkarılması, inaktif proenzimin aktif forma dönüşmesini sağlar.
- c) Katalitik bölge: Fonksiyonel stabilitenin korunması için gerekli olan çinko iyonunu içeren bölgedir.
- d) Prolinden zengin bölge: Katalitik bölge ve son bölge arasında yer alır.
- e) Hemopeksin benzeri bölge: Son kısımda hem bağlayan moleküllere dizin benzerliği nedeniyle, hemopeksin olarak adlandırılan bölge yer alır. Hemopeksin benzeri bölge, N ve C terminal kısımları bağlayan disülfid bağı içerir ve katalitik bölgeye 5-10 aminoasitlik prolinden zengin bir bölge ile bağlanır. Bu bölgenin fonksiyonu bilinmemekle birlikte substrat spesifitesini sağlama ya da hücre yüzey reseptör alanını tanıma fonksiyonu gösterdiği ileri sürülmektedir. Substrata bağlanma ve TIMP ile etkileşime girmedi fonksiyonel rolü vardır.



Şekil-2: Matriks Metalloproteinazların Genel Yapısı

Metalloproteinazların sınıflandırılması

Matriks metalloproteinaz ailesinin eskiden tanımlanmış 7 üyesi varken, yeni keşfedilen metalloproteinazların bunlara eklenmesi ile sayıları giderek artmıştır. Metalloproteinazların farklı kişiler tarafından keşfi, oldukça karmaşık bir adlandırma sistemine neden olmuş ve bu nedenle MMPs ailesinin üyelerinin herbiri birden fazla isimle adlandırılmıştır. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği özgül enzim numaraları ve basit isimler vermeyi önermiştir (72).

MMP'lar substrat spesifitelerine göre sınıflandırılır (76,77);

Kollajenazlar: MMP-1 (interstisyel kollajenaz), MMP-8 (nötrofil kollajenaz), MMP-13 (kollajenaz 3), MMP-18 (kollajenaz 4)

Jelatinazlar: MMP-2, MMP-9

Stromelizinler: MMP-3, MMP-10, MMP-11

Matrilizinler: MMP-7, MMP-26

Membran tip metalloproteinaz 1-6 (MT-MMP) : MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP -17, MMP -24, MMP-25

Diğer MMP-ler: MMP-12 (makrofaj metalloelastaz), MMP-19, MMP-20 (enamelysin), MMP-23 (CA-MMP), MMP-27, MMP-28 (epilysin), MMP-21.

Jelatinazlar

Bu grupta 72 kDa ağırlığında jelatinaz A (MMP-2) ve 92 kDa ağırlığında jelatinaz B (MMP-9) olmak üzere iki enzim bulunmaktadır. Jelatinase A ve B, diğer matriks metalloproteinaz enzimlerinde bulunmayan, katalitik bölgelerinde fibronektinin kollajen bağlayan bölgesi ile ilişkili olan, sisteinden zengin jelatin bağlayan bir ekstra domain içerirler (72,75,78).

Matriks Metalloproteinaz-2 (Jelatinaz A)

Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2) oldukça yaygın bir dağılıma sahiptir. Özellikle, fibroblastlar, keratinositler, kondrositler, monositler, osteoblastlar ve endotel hücreleri olmak üzere birçok hücre tarafından sentezlenir (78).

Matriks Metalloproteinaz-9 (Jelatinaz B)

Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9) akciğer alveoler makrofajları, monositler, lenfositler, polimorfonükleer lökositler ve keratinositler tarafından sekrete edilir. Makrofaj ve lökositler bu enzimi göçleri sırasında vücuttaki farklı doku kompartmanlarına penetre olabilmek için kullanırlar. Jelatinaz B (MMP-9), jelatin ve Tip IV bazal membran kollajeni için substrat özgülüdür. Latent formu 92 kDa, aktif formu 84 kDa ağırlığındadır. Diğer substratları Tip I, III, V kollajen, elastin ve fibronektindir. Katalitik bölge içinde üç kez tekrar eden fibronektin benzeri bölgeler içerirler. Bu bölge özellikle jelatin, Tip IV kollajen ve elastin yıkımında rol almaktadır (72,74,78).

Yapılan bir çalışmada Tip 2 diyabetik nefropatili hastaların erken dönemlerinde MMP-9'un idrar ile atılımında artış saptanmıştır. MMP-9'un, Tip 2 diyabetik nefropatinin ilerlemesi ve patolojisinde rol oynadığı ve Tip 2 diyabetiklerde erken dönemde üriner Tip IV kollajenin yanısıra, MMP-9 ölçümünün

de, renal hastalıklarda hasarı değerlendirmede faydalı olabileceği düşünölmektedir (20).

Metalloproteinaz Enzim Aktivitesinin İnhibisyonu

MMP aktivitesinin kontrolünde spesifik doku inhibitörleri olan doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMP)'ler anahtar rol oynarlar. Bundan başka α 2-makroglobulin, heparin, tetrasiklinler ve sentetik inhibitörler de aktif MMP inhibitörleri arasında yer alırlar (70).

TIMP'ler bağ dokusu metabolizmasının düzenlenmesinde temel olan proteinlerdir. Pek çok dokuda ve vücut sıvılarında bulunurlar. MMP'lere geriye dönüşümsüz ve kovalent olmayan biçimde bağlanarak latent enzim formunun aktivasyonunu ve katalitik aktivitenin sürdürölmesini de inhibe ederler. Böylece TIMP'ler MMP enzim aktivitesini ve MMP/TIMP dengesini sıkı kontrol altında tutarlar. İnsanlarda TIMP-1, 2, 3 ve 4 olmak üzere bugüne dek tanımlanmış 4 TIMP türü bulunmaktadır. TIMP'ler de MMP'ler gibi vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, kan hücreleri, bağ dokusu hücreleri ve makrofajlar tarafından sentez edilirler (70,79).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma Grubu

Hasta Grubu

Çalışmaya, Mart 2008 ve Nisan 2008 ayları arasında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Endokrinoloji polikliniğine başvuran daha önce Tip 2 diabetes mellitus tanısı konmuş 66 hasta alındı.

n= 66; yaş: $57,3 \pm 7,9$ (39-74)

Erkek: n= 26; yaş: $59,0,3 \pm 7,9$ (41-74)

Kadın: n= 40; yaş: $56,3 \pm 9,8$ (39-73)

Diabetes mellitus dışında bilinen kronik karaciğer hastalığı, romatoid artrit ve SLE gibi sistemik hastalığı, iki hafta öncesine kadar enfeksiyon ve travma öyküsü olanlar çalışma dışı bırakıldı.

Hasta grubu albümin atılım düzeylerine göre 3 grupta toplandı (normoalbüminüri: albümin atılımı < 30 mg albümin/gr kreatinin, mikroalbüminüri: albümin atılımı 30 - 300 mg albümin/gr kreatinin, makroalbüminüri: albümin atılımı > 300 mg albümin/gr kreatinin).

Ayrıca hasta grubu, HbA_{1c} düzeylerine göre iyi kontrollü (HbA_{1c} < %7) ve kötü kontrollü (HbA_{1c} ≥ %7) olmak üzere 2 alt gruba ayrıldı.

Kontrol Grubu

Kontrol grubu ise klinik şikayet ve bulgusu olmayan, sağlıklı 20 bireyden oluşturuldu.

n= 20; yaş: $48,7 \pm 11,0$ (27-66)

Erkek: n= 9; yaş: $46,8 \pm 9,9$ (35-63)

Kadın: n= 11; yaş: $50,4 \pm 12,2$ (27-66)

Hasta Örneklerinin Toplanması ve Analiz Örneklerinin Hazırlanması

Hastalardan venöz kan örnekleri sabah 08.⁰⁰- 10.³⁰ saatleri arasında, 8-12 saatlik açlıktan sonra oturur pozisyonda, vakumlu tüplere (Jelli vakumlu düz biyokimya tüpü; Vacutest, İtalya) alındı. Aynı zamanda sabah 08.⁰⁰- 10.³⁰ saatleri arasında spot idrarları alınarak, tüm kan ve idrar analizleri aynı gün içerisinde Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarında yapıldı. Hastalardan alınan venöz kandan glukoz, kreatinin, BUN, total kolesterol, trigliserit, HDL ve HbA_{1c}, idrar örneklerinde de albumin ve kreatinin düzeyleri ölçüldü. LDL ve VLDL Friedwald formülüne göre hesaplandı [VLDL= Trigliserit/5; LDL=Total kolesterol – (HDL + trigliserit/5)] (TG<400 mg/dL ise) Aynı saatte alınan idrar örneğinden MMP-9 ve Tip IV kollajen ölçülmesi için, idrar yalnız bir kez dondurulmak ve çözüldüğünde aynı anda çalışmak koşulu ile -20 C°de derin dondurucuda analiz tarihine kadar saklandı. Ayrıca, diyabet tanısı ve süresi, kilo ve boy verileri kaydedildi.

Etik Kurul Onayı

Çalışma öncesi Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu'nun onayı alındı. Ayrıca çalışma grubundaki tüm katılımcılara “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu” ile yapılacaklar hakkında bilgi verildi ve sonrasında gönüllü olduklarına ilişkin imzaları ile izinleri alındı.

GEREÇ

Kullanılan Cihazlar

- Masa üstü santrifüj (NF 1215, Nüve, Türkiye)
- -20 C° Derin dondurucu (Beko, Türkiye)
- +4 C° Buzdolabı (Vestel, Türkiye)
- Ayarlanabilir otomatik pipet seti (10-100 µL, 100-1000 µL) (CAPP, Danimarka)
- Çok kanallı otomatik pipet (30-300 µL) (CAPP, Danimarka)
- Modüler P analizörü (Roche/Hitachi, Japonya)
- ELISA okuyucu [Digital and Analog System (DAS), İtalya]

- Orbital karıştırıcı (OS-10, Biosan, Letonya)

Kullanılan Sarf Malzemeleri

- 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL'lik pipet uçları (CAPP, Danimarka)
- 1.5 mL'lik Eppendorf mikro tüpler (Isolab, Almanya)
- Jelli vakumlu düz biyokimya tüpü (Vacutest, İtalya)
- Kollajen IV idrar saklama tüpü (Biotrin, Japonya)

BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

Ölçülen Analitler

Hastaların kanında glukoz, kreatinin, BUN, total kolesterol, trigliserit, HDL ve HbA1c, idrar örneklerinde de albumin, kreatinin, MMP-9 ve Tip IV kollajen ölçümleri yapıldı. (Tablo-6)

Tablo-6: Ölçülen analitlerin ölçüm yöntemleri ve ölçümde kullanılan cihazlar

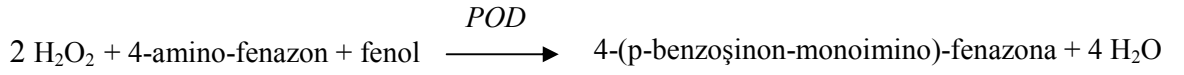
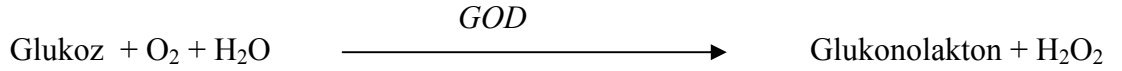
Analit Adı	Ölçüm Yöntemi	Kullanılan Cihaz
Glukoz	Enzimatik kolorimetrik	Roche/Hitachi MODULAR P
BUN (Kan Üre Azotu)	Kinetik UV	Roche/Hitachi MODULAR P
Kreatinin	Kinetik kolorimetrik	Roche/Hitachi MODULAR P
Total kolesterol	Enzimatik kolorimetrik	Roche/Hitachi MODULAR P
Trigliserit	Enzimatik kolorimetrik	Roche/Hitachi MODULAR P
HDL kolesterol	Enzimatik kolorimetrik	Roche/Hitachi MODULAR P
HbA1c	İyon değişimi	Agilent 1100 Chromsystems
Mikroalbumin	İmmünoturbidimetrik	Roche/Hitachi MODULAR P
MMP-9	ELISA	Digital and Analog System
Tip IV kollajen	ELISA	Digital and Analog System

Ölçüm Yöntemleri

Tablo-6’da gözlenen ölçüm yöntem ilkeleri aşağıda özetlenmektedir.

Glukoz

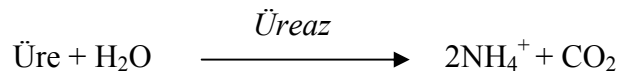
Glukoz konsantrasyonu enzimatik kolorimetrik analiz yöntemi ile belirlendi. Glukoz, atmosferik oksijenin varlığında glukoz oksidaz (GOD) tarafından glukonolaktona oksitlenir. Açığa çıkan hidrojen peroksit, peroksidaz (POD), 4-amino-fenazon ve fenolün mevcudiyetinde 4 - (p-benzoşinon-monoimino) - fenazona oksitlenir. Kırmızı boyanın renk yoğunluğu glukoz konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak tespit edilir.



Referans aralığı 55-115 mg/dL (3,05-6,38 mmol/L)’dir.

Kan Üre Azotu (BUN)

BUN konsantrasyonu kinetik UV yöntemi kullanılarak belirlendi. Üre üreaz tarafından hidrolize edilir ve CO₂ ile amonyak oluşur.



Oluşan amonyak daha sonra ortamda üreaz/glutamat dehidrogenaz(GLDH) bulunduğu α-ketoglutarat ve NADH ile reaksiyona girer ve glutamat ile NAD⁺ oluşur.

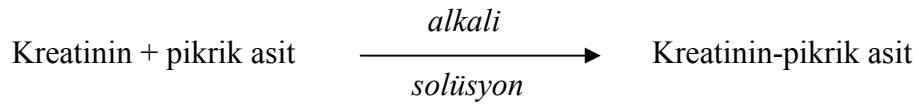


NADH tüketiminden dolayı absorbansta meydana gelen azalma kinetik olarak ölçülür.

Referans aralığı 6-20 mg/dL (2,14-7,14 mmol/L)'dir.

Kreatinin

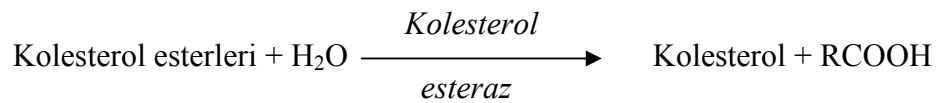
Ölçüm kinetik kolorimetrik yöntem ile yapıldı. Bu yöntemde, alkali ortamda, kreatin, pikrik asit ile sarı-turuncu bir kompleks oluşturur. Renk eğilimi kreatin yoğunluğuyla doğru orantılıdır ve fotometrik olarak ölçülebilir.



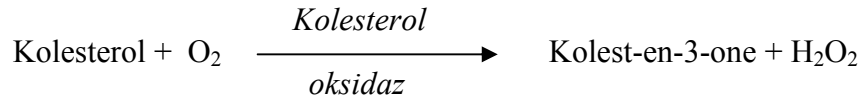
Referans aralığı erkeklerde 0,70 –1,20 mg/dL (62 -106 µmol/L), kadınlarda 0,50 – 0,90 mg/dL (44 - 80 µmol/L)'dir.

Total Kolesterol

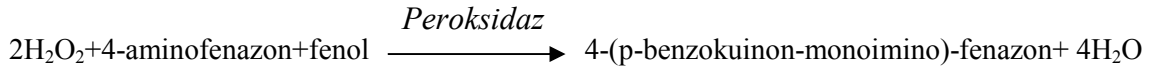
Total kolesterol konsantrasyonu enzimatik kolorimetrik yöntemle ölçüldü. Kolesterol, kolesterol esterase ile serbest kolesterol ve yağ asidi oluşturacak şekilde parçalanır.



Kolesterol, kolesterol oksidazın yardımı ile oksijen tarafından kolest-4-en-3-one ve hidrojen peroksit'e dönüştürülür.



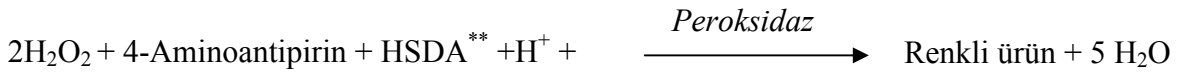
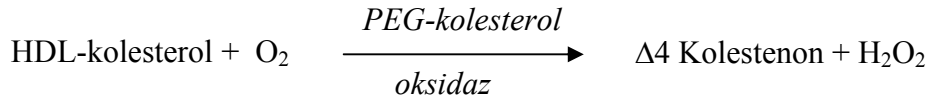
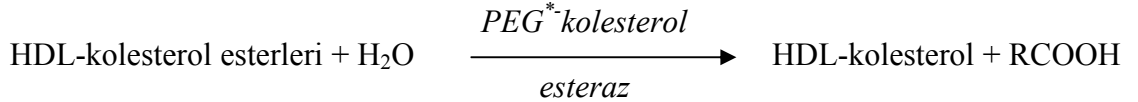
Açığa çıkan hidrojen peroksit, peroksidazın katalitik hareketi altından 4-aminofenazon ve fenol ile reaksiyona girerek kırmızı bir boya oluşturur. Renk yoğunluğu kolesterol konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak tespit edilebilir.



Referans değeri erkeklerde ve kadınlarda < 200 mg/dL (5,2 mmol/L)'dir.

HDL-Kolesterol

HDL-kolesterol ölçümü enzimatik kolorimetrik yöntem ile yapıldı. Bu yöntemde, aşağıdaki reaksiyonlar sonunda oluşan renkli bileşiğin verdiği absorbans spektrofotometrik olarak ölçüldü.



* PEG: Polietilen glikol

** HSDA: Sodyum N-(2-hidroksi-3-sülfopropil)-3,5-dimethoksianilin

Referans aralığı erkeklerde 35-55 mg/dL (0,90-1,45 mmol/L), kadınlarda 45-65 mg/dL (1,15-1,68 mmol/L) 'dir.

VLDL-Kolesterol ve LDL-Kolesterol

VLDL- kolesterol ve LDL-kolesterol düzeyi ‘‘Friedwald’’ formülüne göre hesaplandı. Serum trigliserit düzeyi 400 mg/dL’ nin üzerinde olduğu zaman, bu formül kullanılmamaktadır.

$$\text{VLDL-kolesterol} = \text{Trigliserit}/5$$

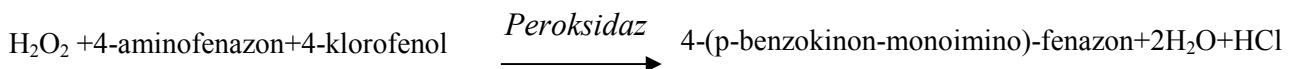
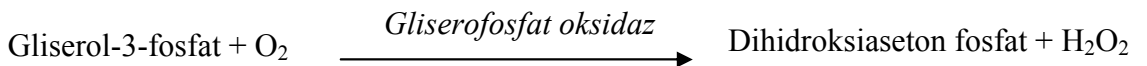
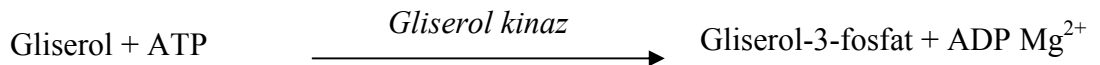
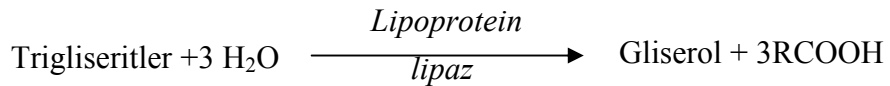
$$\text{LDL-Kolesterol} = \text{Total kolesterol} - [(\text{HDL-kolesterol}) + (\text{Trigliserit}/5)]$$

VLDL- kolesterolün referans aralığı erkeklerde 8 -32 mg/dL (0,20-0,82 mmol/L), kadınlarda 7 - 47 mg/dL (0,18 - 1,20 mmol/L) ’dir.

LDL-kolesterolün referans aralığı 65 - 175 mg/dL (1,68 - 4,50 mmol/L) ’dir.

Trigliserit

Ölçüm enzimatik kolorimetrik yöntemle yapıldı. Bu yöntemde trigliseritlerin gliserole, hızlı ve tam olarak hidroliz olabilmesi için lipoprotein lipaz kullanılır. Üretilen hidrojen peroksit daha sonra 4-aminofenazon ve 4-klorofenol ile kırmızı bir boya maddesi oluşturmak için peroksidazın katalitik etkisi altında reaksiyona girer.



Referans değeri erkeklerde ve kadınlarda < 200 mg/dL (5,2 mmol/L)’dir.

İdrarda Albümin (Mikroalbuminüri için)

Spot idrarda mikroalbuminüri varlığı immünoturbidimetrik yöntemle belirlendi. Örnekteki antijenlerle reaksiyona giren anti-albumin antikorlarının oluşturduğu, antijen-antikor komplekslerinin oluşturduğu aglutinasyon, turbidimetrik olarak ölçülür.

Referans aralığı çocuklarda 0 - 37 mg/g kreatinin, yetişkinde 0 - 20 mg/g kreatinin'dir.

Hemoglobin A_{1c}

HbA_{1c}, iyon değişimi yöntemi ile HPLC de çalışıldı.

Referans aralığı % 4,4 – 6,1'dir.

Tip IV Kollajen

İdrar Tip IV kollajen düzeyleri, Biotrin Urinary Collagen IV EIA kiti kullanılarak, manuel yöntemle çalışıldı. Kullanılan yöntem tek basamaklı sandviç EIA yöntemidir. Örnekteki Tip IV kollajen bir katı faz monoklonal antikor ve bir monoklonal antikor-enzim konjugatına bağlanır. Bu da Tip IV kollajen molekülü ile katı faz ve enzim işaretli antikorlar arasında sandviç oluşturur. Bağlı olmayan enzim işaretli antikor ve örnek uzaklaştırıldıktan sonra plaka enzim substrat ile inkübe edilerek renk oluşumu sağlanır. Oluşan renk örnekteki Tip IV kollajen miktarı ile direkt olarak orantılıdır.

Analiz öncesi tüm reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına getirildi. Her kuyucuğa, 150 µL konjugat pipetlendi. Daha sonra standart ve serum örneklerinden 50'şer µL kuyucuklara eklendi. Plağın kapağı kapatılarak oda ısısında 24 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası kuyucuklar, 350 µL yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Yıkama sonrası her kuyucuğa 100 µL substrat eklendi ve oda ısısında 1 saat inkübe

edildi. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa 100 µL durdurma çözeltisi eklendi ve substrat ile tam olarak karışması sağlandı. Hemen ELISA okuyucuda 450 nm de optik dansiteleri okundu.

Referans aralığı 0 – 7,3 µg/g kreatinin'dir.

Matriks Metalloproteinaz-9

MMP-9 konsantrasyonlarının saptanmasında kantitatif sandviç ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent assay) kiti kullanıldı (Quantikine R&D Systems, ABD). Bu teknik total MMP-9'u (aktif ve pro-MMP-9) saptamak üzere geliştirilmiş bir immunölçüm tekniğidir.

Analiz öncesi tüm reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına getirildi. MMP-9 için spesifik monoklonal antikorlar ile kaplanmış kuyucuklara MMP-9 standartları ve serum örneklerinden 100'er µL pipetlendi. Örneklerdeki MMP-9'un antikorlara bağlanması için oda ısısında, orbital karıştırıcı üzerinde 2 saat inkübasyona bırakıldı.

Antijen-antikor bağlanmalarının gerçekleştiği bu süreçten sonra yıkama işlemi uygulandı. Kuyucuklar, 400 µL yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı. Yıkama ile bağlanmamış olan antikorlar uzaklaştırıldı. Yıkama sonrası enzimle işaretlenmiş MMP-9 antikorları içeren konjugat kuyucuklara pipetlenip (100 µL) oda ısısında ve yine karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası kuyucuklar, 400 µL yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı. Yıkama ile bağlanmayan antikorların uzaklaştırılmasından sonra substrat çözeltisi her kuyucuğa 200 µL eklendi ve oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası her kuyuya 50 µL durdurma çözeltisi eklendi ve zaman kaybetmeden ELISA okuyucuda 450 nm de optik dansiteleri okundu.

Referans aralığı 0 – 33,62 ng/mL'dir.

Kalite Kontrol

Çalışmanın yapıldığı süre içerisinde laboratuvarımızın iç ve dış kalite kontrol sonuçlarından yararlandı. Çalışmanın yürütüldüğü sürede (Mart – Nisan 2008), glukoz, BUN, kreatinin, total kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserit, mikroalbumin ve HbA_{1c} analitlerinden elde edilen iç kalite kontrol sonuçları Tablo-7’de, glukoz, BUN, kreatinin, total kolesterol, HDL-kolesterol ve trigliserit analitlerinin dış kalite kontrol sonuçları Tablo-8 ve Tablo-9’da verilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS 11.0 (Chicago, ABD) paket programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Düzeyler aritmetik ortalama \pm standart sapma ($\bar{X} \pm SD$) ve ortanca (minimum-maksimum) olarak ifade edildi.

Oluşturulan çalışma gruplarındaki n sayılarına göre parametrik veya parametrik olmayan yöntemler kullanıldı. İki grup arasındaki farkın saptanmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Tüm analizlerde $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Değişkenler arasındaki ilişkinin gücünü belirlemek amacı ile korelasyon analizi yapıldı. Korelasyon analizinde r (pearson korelasyon katsayısı) değeri 0.000-0.49 aralığı zayıf ilişki, 0.50-0.69 aralığı orta ilişki, ≥ 0.70 olanlar güçlü ilişki olarak kabul edildi.

BULGULAR

Kalite Kontrol Sonuçları

Çalışmanın yürütüldüğü sürede (Mart – Nisan 2008), glukoz, BUN, kreatinin, total kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserit, mikroalbumin ve HbA_{1c} analitlerinden elde edilen iç kalite kontrol sonuçları Tablo-7’de verilmiştir.

Tablo-7: Biyokimyasal testlerin analitik performansı

Analit	Kontrol düzeyi	Hedef Değer	n	X _{ort}	±SD	%CV
Glukoz (mg/dL)	Düzyey 1	79 – 107	74	95	3,36	3,55
	Düzyey 2	222 – 300	84	264,2	6,54	2,47
BUN (mg/dL)	Düzyey 1	35 – 47	67	41,7	1,77	4,25
	Düzyey 2	129- 175	67	152,5	3,93	2,58
Kreatinin (mg/dL)	Düzyey 1	1,0 – 1,4	68	1,24	0,049	3,98
	Düzyey 2	3,4 – 4,95	63	4,2	0,13	3,1
T.kolesterol (mg/dL)	Düzyey 1	79 – 107	66	89,7	2,09	2,33
	Düzyey 2	172 – 232	64	195,6	5,29	2,7
HDL-kol. (mg/dL)		34 –56	18	45,8	2,03	4,43
Trigliserit (mg/dL)	Düzyey 1	101 –137	59	116,4	5,66	4,8
	Düzyey 2	175 –237	57	204,4	8,10	3,9
Mikroalbumin (mg/g kreat)	Düzyey 1	2,4 – 3,9	15	2,95	0,17	5,98
	Düzyey 2	7,6 – 12,3	14	10,1	0,35	3,4
HbA _{1c} (%)	Düzyey 1	5,2 – 6,4	21	5,66	0,22	3,9
	Düzyey 2	8,3 – 10,7	16	9,54	0,21	2,2

Çalışmanın yürütüldüğü sürede (Mart – Nisan 2008), glukoz, BUN, kreatinin, total kolesterol, HDL-kolesterol ve trigliserit analitlerinin dış kalite kontrol sonuçları Tablo-8 ve Tablo-9’da verilmiştir.

Tablo-8: Biyokimyasal testlerin Mart 2008 dış kalite kontrol sonuçları

Tarih	10.03.2008			24.03.2008		
Analit	Bizim Sonucumuz (mg/dL)	Grup Ortalama Değeri (mg/dL)	SDI	Bizim Sonucumuz (mg/dL)	Grup Ortalama Değeri (mg/dL)	SDI
Glukoz	464	437	+ 1,85	470	459	+ 0,61
BUN	234,1	217	+ 2,63	23,8	22,5	+ 1,01
Kreatinin	0,54	0,56	- 0,20	10,5	9,9	+ 2,11
T.kolesterol	361	332	+ 2,72	108	108	+ 0,10
HDL-kol.	58,0	60,5	- 0,36	27,0	24,6	+ 1,33
Trigliserit	227	212	+ 2,34	50,0	58,3	- 3,34

Tablo-9: Biyokimyasal testlerin Nisan 2008 dış kalite kontrol sonuçları

Tarih	07.04.2008			21.04.2008		
Analit	Bizim Sonucumuz (mg/dL)	Grup Ortalama Değeri (mg/dL)	SDI	Bizim Sonucumuz (mg/dL)	Grup Ortalama Değeri (mg/dL)	SDI
Glukoz	340	336	+ 0,60	239	237,8	+ 0,33
BUN	171,9	171,0	+ 0,26	113,8	120,0	- 1,79
Kreatinin	2,85	2,94	+ 1,11	5,42	5,35	+ 0,45
T.kolesterol	280	276	+ 0,61	213	217,7	- 0,72
HDL-kol.	49,0	52,8	- 0,67	47	45,7	+ 2,80
Trigliserit	170	177	+ 1,18	141	138	+ 2,10

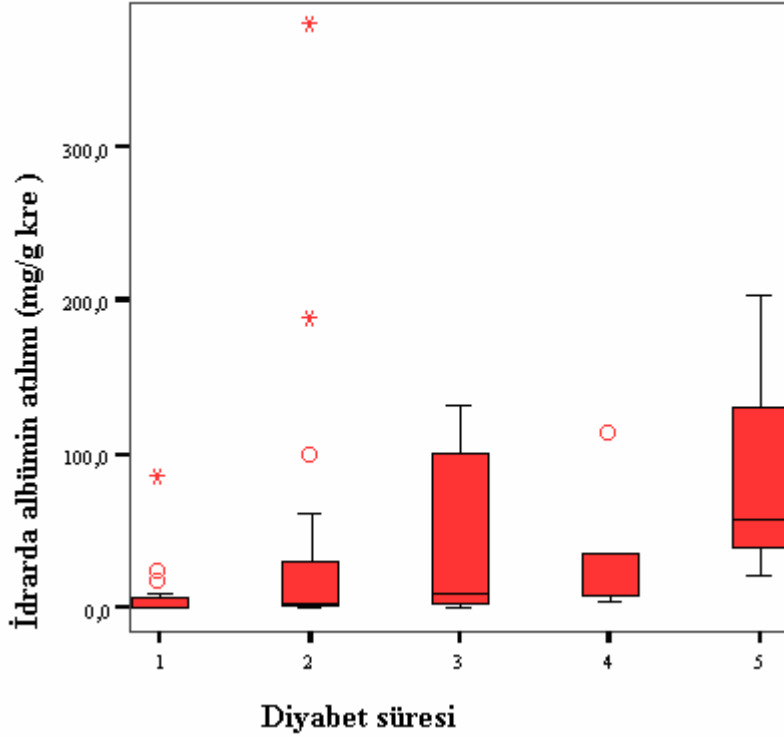
Çalışma Gruplarının Özellikleri

Çalışma kapsamına alınan sağlıklı kontrollerin ve diyabetik hasta grubunun antropometrik özellikleri ve ölçüm sonuçları Tablo-10'da gözlenmektedir.

Tablo-10: Kontrol ve diyabetli hasta grubunun antropometrik özellikleri ve ölçüm sonuçları

Demografik Özellik ve Analit Düzeyleri	Kontrol Grubu (n=20) Ortalama±SD (Ortanca (min-maks))	Diyabetik Hasta Grubu (n=66) Ortalama±SD (Ortanca (min-maks))	P
Yaş (yıl)	48,8 ± 11,1 50,5 (27-66)	57,4 ± 9,2 57,0 (39-74)	0,005
Diyabet Süresi (Yıl)	—	8,4 ± 6,4 8,0 (1 –25)	
İnsülin	—	27	
İlaç Kullanımı			
Oral Antidiyabetik	—	35	
İnsülin + Oral Antidiyabetik	—	4	
Vücut Kütle İndeksi (kg/m ²)	27,4 ± 5,1 28,3 (17,8-37,5)	29,4 ± 5,3 29,4 (21,1-47,5)	0,196
Glukoz (mg/dL)	98,4 ± 12,2 100 (74-123)	141,6 ± 48,2 128 (64-287)	0,000
BUN (mg/dL)	14,4 ± 3,5 14,5 (8-22)	24,4 ± 21,4 16,5 (9-114)	0,019
Kreatinin (mg/dL)	0,8 ± 0,2 0,73 (0,6-1,1)	1,4 ± 1,7 0,8 (0,4-9,9)	0,216
Total kolesterol (mg/dL)	199,4 ± 43,9 195,5 (134-323)	187,4 ± 42,9 184,5 (96-331)	0,248
Trigliserit (mg/dL)	164,8 ± 96,5 145,5 (65-482)	155,4 ± 71,0 156,0 (41-338)	0,976
HDL-kolesterol (mg/dL)	49,3 ± 14,2 44,5 (31-77)	50,9 ± 15,8 47,5 (24-95)	0,709
LDL-kolesterol (mg/dL)	118,1 ± 36,5 117,0 (59-230)	106,0 ± 35,8 102,0 (37-245)	0,100
HbA _{1c} (%)	5,2 ± 0,4 5,2 (4,7-6,0)	7,1 ± 1,2 6,8 (5,1-11,3)	0,000
İdrarda albumin (mg/g kreat)	1,8 ± 3,1 0,5 (0,1-9,9)	30,3 ± 62,6 5,4 (0,0-378,4)	0,001
Tip IV kollajen (µg/g kreatinin)	2,7 ± 1,34 2,64 (0,34-5,34)	15,8 ± 44,1 5,0 (1,4-316,0)	0,000
Matriks metalloproteinaz-9 (ng/g kreatinin)	2,9 ± 4,2 0,51 (0,1-15,6)	25,5 ± 47,1 7,06 (0,1-244,9)	0,000

Diyabet süresi ile idrarda albümin atılımı arasında istatistiksel olarak $p=0,001$ anlamlılığında, pozitif yönde ilişki ($r=0,344$) gözlemlendi. Diyabet sürelerine göre oluşturulan grupların idrarda albümin atılım düzeyleri Şekil-3'te gözlenmektedir.

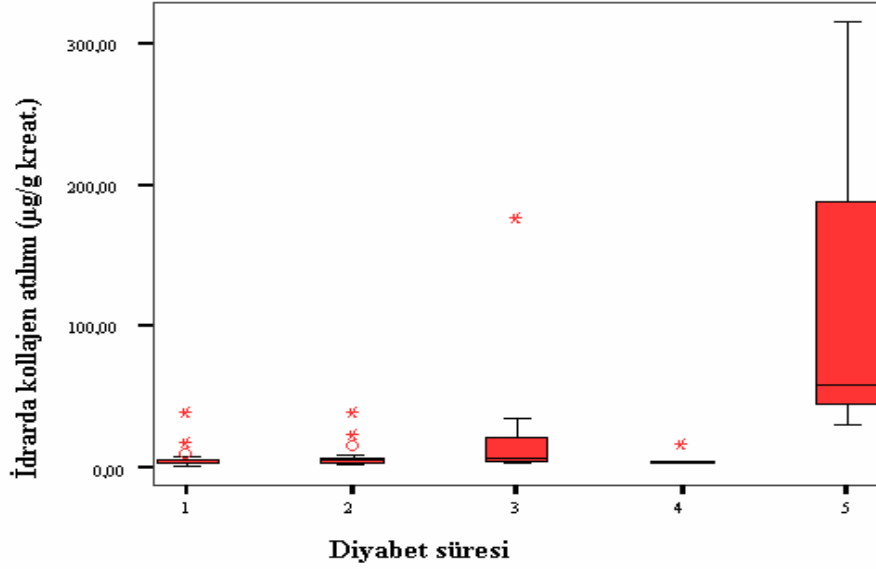


Şekil-3: Diyabet süresi gruplarında idrarda albümin atılımı Gruplar diyabet sürelerine göre: 1. 0-5 yıl, 2. 6-10 yıl, 3. 11-15 yıl, 4. 16-20 yıl, 5. 20 yıl üzeri

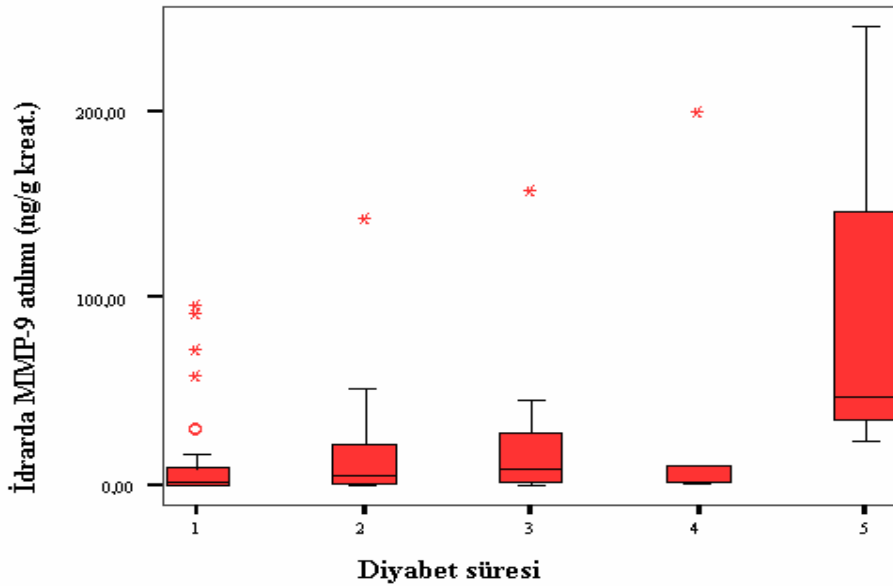
Diyabet süresi ile idrarda Tip IV kollajen atılımı arasında istatistiksel olarak $p=0,000$ anlamlılığında, pozitif yönde ilişki ($r=0,382$) gözlemlendi. Diyabet sürelerine göre oluşturulan grupların idrarda Tip IV kollajen atılım düzeyleri Şekil-4'te gözlenmektedir.

Diyabet süresi ile idrarda MMP-9 atılımı arasında istatistiksel olarak $p=0,001$ anlamlılığında, pozitif yönde ilişki ($r=0,347$) gözlemlendi. Diyabet sürelerine göre oluşturulan grupların idrarda MMP-9 atılım düzeyleri Şekil-5'te gözlenmektedir.

Diyabet süresi ile serum glukoz düzeyi arasında istatistiksel olarak $p=0,000$ anlamlılığında, pozitif yönde ilişki ($r=0,449$), HbA_{1c} arasında istatistiksel olarak $p=0,000$ anlamlılığında, pozitif yönde ilişki ($r=0,513$) gözlemlendi.



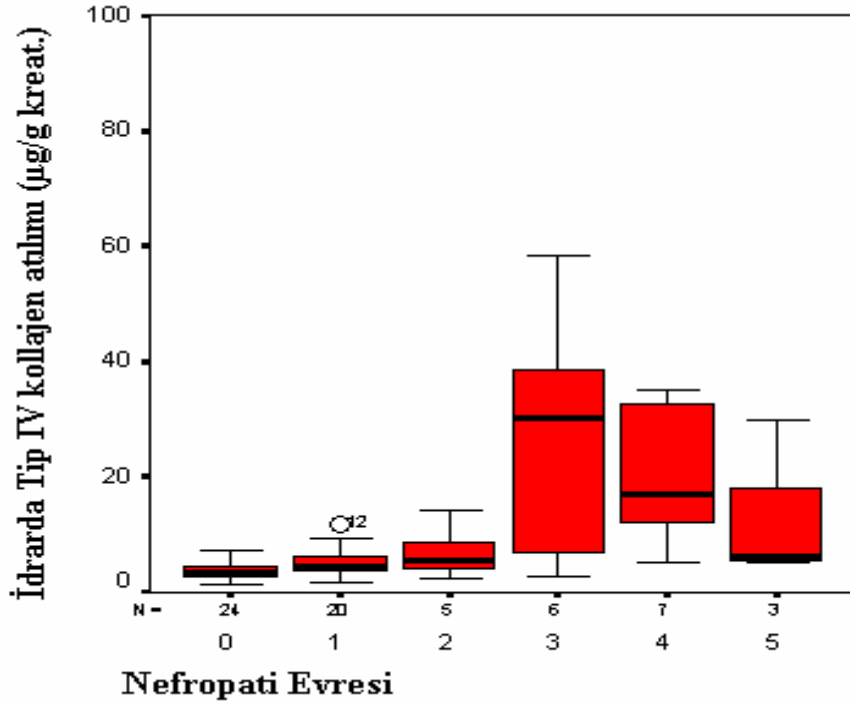
Şekil-4: Diyabet süresi gruplarında idrarda Tip IV kollajen atılımı Gruplar diyabet sürelerine göre: 1. 0-5 yıl, 2. 6-10 yıl, 3. 11-15 yıl, 4. 16-20 yıl, 5. 20 yıl üzeri



Şekil-5: Diyabet süresi gruplarında idrarda MMP-9 atılımı Gruplar diyabet sürelerine göre: 1. 0-5 yıl, 2. 6-10 yıl, 3. 11-15 yıl, 4. 16-20 yıl, 5. 20 yıl üzeri

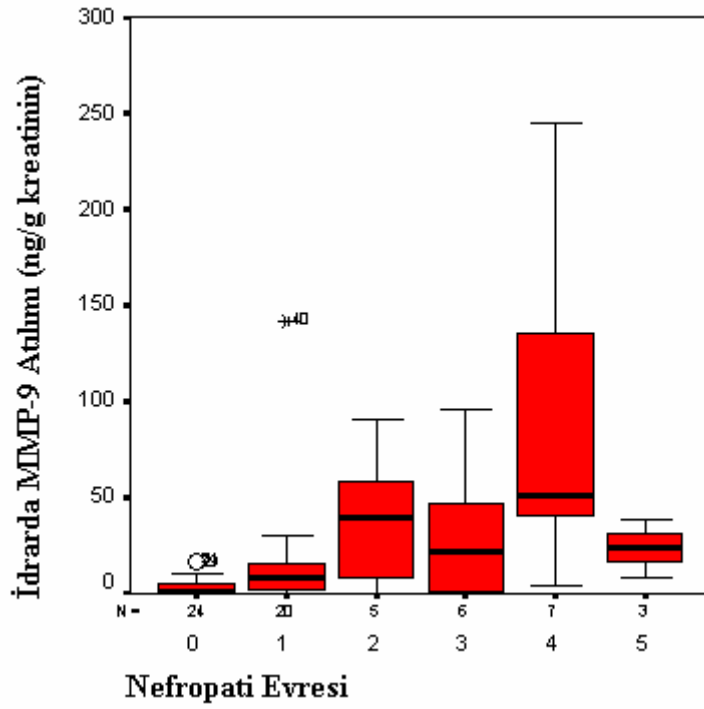
Diyabet süresi ile vücut kütle indeksi arasında bir ilişki tespit edilmedi. ($r=0,066$, $p=0,547$)

Diyabetik hastaların nefropati evresi ile idrarda Tip IV kollajen atılımı arasında istatistiksel olarak $p=0,004$ anlamlılığında, pozitif yönde ilişki ($r=0,352$) gözlemlendi. Nefropati evrelerine göre oluşturulan grupların idrarda Tip IV kollajen atılım düzeyleri Şekil-6’da gözlenmektedir.



Şekil-6: Nefropati evresi gruplarında idrarda Tip IV kollajen atılımı Gruplar nefropati evrelerine göre: 0- Nefropati yok, 1- 1. evre, 2- 2. evre, 3- 3.evre, 4- 4. evre, 5- 5.evre

Diyabetik hastaların nefropati evresi ile idrarda MMP-9 atılımı arasında istatistiksel olarak $p=0,000$ anlamlılığında, pozitif yönde ilişki ($r=0,477$) gözlemlendi. Nefropati evrelerine göre oluşturulan grupların idrarda MMP-9 atılım düzeyleri Şekil-7’de gözlenmektedir.



Şekil-7: Nefropati evresi gruplarında idrarda MMP-9 atılımı Gruplar nefropati evrelerine göre: 0- Nefropati yok, 1- 1. evre, 2- 2. evre, 3- 3.evre, 4- 4. evre, 5- 5.evre

Diyabetli hasta grubu, albümin atılım düzeylerine göre normoalbuminürik, mikroalbuminürik ve makroalbuminürik olarak 3 farklı şekilde gruplandırıldı. Kontrol grubu ile bu 3 grubun yaş, vücut kütle indeksi ve diğer ölçüm sonuçları Tablo-11’de verilmektedir.

Tablo-11: Albümin atılımı gruplarına göre bireylerin antropometrik özellikleri ve ölçüm sonuçları

Demografik Özellik ve Analit Düzeyleri	Kontrol Grubu (n=20)	Normoalbuminürik Grup (n=24)	Mikroalbuminürik Grup (n=22)	Makroalbuminürik Grup (n=20)
	Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	Ortalama±SD Ortanca(min-maks)	Ortalama±SD Ortanca(min-maks)	Ortalama±SD Ortanca(min-maks)
Yaş (yıl)	48,8 ± 11,09 50,5 (27-66)	56,0 ± 9,29 56,5 (39-74)	57,6 ± 9,1 56,5 (41-73)	58,8 ± 9,2 59,0 (43-73)
Vücut Kütle İndeksi (kg/m ²)	27,4 ± 5,1 28,3 (17,8-37,5)	28,3 ± 4,3 28,4 (22,2-39,5)	32,1 ± 5,2 30,8 (22-47)	27,6 ± 5,6 25,5 (21,1-38,9)
Glukoz (mg/dL)	98,4 ± 12,2 100,0 (74-123)	130,9 ± 42,4 113,0 (80-267)	152,9 ± 47,54 145,0 (88-287)	141,8 ± 61,2 134,0 (64-256)
BUN (mg/dL)	14,4 ± 3,5 14,5 (8-22)	14,8 ± 5,9 13,0 (9-28)	19,4 ± 9,1 17,0 (11-55)	41,4 ± 31,4 22,5 (15-114)
Kreatinin (mg/dL)	0,8 ± 0,2 0,73 (0,6-1,1)	0,7 ± 0,2 0,6 (0,5-1,2)	1,0 ± 0,7 0,8 (0,4-4,2)	2,7 ± 2,5 1,8 (0,7-9,9)
Total kolesterol (mg/dL)	199,4 ± 43,9 195,5 (134-323)	135,7 ± 58,9 176,0 (119-241)	193,1 ± 42,4 182,5 (134-291)	195,4 ± 49,1 195,0 (96-331)
Trigliserit (mg/dL)	164,8 ± 96,5 145,5 (65-482)	155,4 ± 71,0 121,0 (46-231)	176,8 ± 77,2 169,0 (41-327)	155,5 ± 73,6 147,0 (45-338)
HDL-kolesterol (mg/dL)	49,3 ± 14,2 44,5 (31-77)	53,9 ± 15,9 52,5 (30-84)	45,2 ± 12,3 45,0 (24-74)	53,8 ± 18,7 50,0 (30-95)
LDL-kolesterol (mg/dL)	118,0 ± 36,5 117,0 (59-230)	95,7 ± 28,4 90,0 (45-151)	112,7 ± 34,3 103,0 (55-202)	111,0 ± 43,4 105,5 (37-245)
HbA _{1c} (%)	5,2 ± 0,4 5,2 (4,7-6,0)	6,7 ± 1,0 6,6 (5,1-9,4)	7,0 ± 1,1 6,7 (5,3-9,4)	7,7 ± 1,5 7,3 (5,9-11,3)
İdrarda albumin (mg /g kreat)	1,8 ± 3,1 0,5 (0,1-9,9)	0,8 ± 1,1 0,4 (0,0-3,8)	6,4 ± 4,0 6,2 (1,2-16,6)	92,0 ± 87,3 71,5 (10,5-378,4)
Tip IV kollajen (µg/g kreatinin)	2,7 ± 1,3 2,6 (0,34-5,34)	3,8 ± 1,5 3,4 (1,4-7,3)	5,8 ± 3,5 4,7 (1,8-16,9)	41,2 ± 75,3 15,4 (2,6 –316,0)
Matriks metalloproteinaz-9 (ng/g kreatinin)	2,9 ± 4,2 0,5 (0,1-15,6)	3,9 ± 5,0 1,1 (0,2-16,8)	18,0 ± 32,0 8,7 (0,1-142,1)	59,7 ± 67,5 39,0(0,3 –244,9)

Tablo-12: Albümin atılım gruplarındaki farklılıkların dağılımı

	Normoalbuminürik	Mikroalbuminürik	Makroalbuminürik
Kontrol	VKİ p = 0.010 Glukoz p= 0.001 LDL-Kol p= 0.033 HbA1c p= 0.000 Tip IV Kol p= 0.020	VKİ p= 0.007 Glukoz p= 0.000 BUN p= 0.014 HbA1c p= 0.000 İd. Alb. p= 0.000 Tip IV Kol p=0.000 MMP-9 p= 0.002	Glukoz p= 0.007 BUN p= 0.000 Kreat. p= 0.000 HbA1c p= 0.000 İd. Alb. p= 0.000 Tip IV Kol p=0.000 MMP-9 p= 0.000 TIMP-1 p= 0.000
Normoalbuminürik		VKİ p= 0.005 BUN p= 0.011 Kreat p= 0.034 İd. Alb. p= 0.000 Tip IV Kol p=0.016 MMP-9 p= 0.012	Diab. Süre p= 0.002 BUN p= 0.000 Kreat. p= 0.000 HbA1c p= 0.012 İd. Alb. p= 0.000 Tip IV Kol p=0.000 MMP-9 p= 0.000 TIMP-1 p= 0.000
Mikroalbuminürik			VKİ p= 0.004 BUN p= 0.011 Kreat. p= 0.001 İd. Alb p= 0.000 Tip IV Kol p=0.002 MMP-9 p= 0.003 TIMP-1 p= 0.000

Diyabetli hasta grubu, HbA_{1c} düzeylerine göre iyi kontrollü (HbA_{1c} < %7) ve kötü kontrollü (HbA_{1c} ≥ %7) olmak üzere 2 alt gruba ayrılarak ölçümler değerlendirildi. Kontrol grubu ile bu 2 grubun yaş, vücut kütle indeksi ve diğer ölçüm sonuçları Tablo-13’de verilmektedir.

Tablo-13: HbA_{1c} düzeylerine göre bireylerin antropometrik özellikleri ve ölçüm sonuçları

Değişken	Kontrol Grubu (n=20)	HbA _{1c} <%7 (n=37)	HbA _{1c} ≥%7(n =29)
	Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	Ortalama±SD Ortanca(min-maks)	Ortalama±SD Ortanca(min-maks)
Yaş (yıl)	48,8 ± 11,09 50,5 (27-66)	55,2 ± 9,6 54,0 (39-71)	60,2 ± 7,9 59,0 (49-74)
Vücut Kütle İndeksi (kg/m ²)	27,4 ± 5,1 28,3 (17,8-37,5)	29,0 ± 4,5 29,3 (21,1-39,5)	29,9 ± 6,3 28,2 (21,6-47,5)
Glukoz (mg/dL)	98,4 ± 12,2 100,0 (74-123)	122,0 ± 30,2 113,0 (64-193)	166,4 ± 55,5 168,0 (76-287)
BUN (mg/dL)	14,4 ± 3,5 14,5 (8-22)	22,6 ± 21,8 16,0 (9 -114)	26,6 ± 21,1 17,0 (9 -91)
Kreatinin (mg/dL)	0,8 ± 0,2 0,73 (0,6-1,1)	1,3 ± 1,8 0,8 (0,4-9,9)	1,5 ± 1,5 0,8 (0,5-6,7)
Total kolesterol (mg/dL)	199,4 ± 43,9 195,5 (134-323)	179,0 ± 33,0 179,0 (119-254)	198,0 ± 51,5 199,0 (96-331)
Trigliserit (mg/dL)	164,8 ± 96,5 145,5 (65-482)	153,1 ± 75,7 149,0 (45-338)	158,2 ± 65,6 166,0 (41-327)
HDL-kolesterol (mg/dL)	49,3 ± 14,2 44,5 (31-77)	52,8 ± 16,9 47,0 (29-95)	48,6 ± 14,3 48,0 (24-79)
LDL-kolesterol (mg/dL)	118,0 ± 36,5 117,0 (59-230)	96,5 ± 27,0 95,0 (45-162)	118,1 ± 42,0 111,0 (37-245)
HbA _{1c} (%)	5,2 ± 0,4 5,2 (4,7-6,0)	6,2 ± 0,5 6,4 (5,1-6,9)	8,2 ± 1,0 7,8 (7,1-11,3)
İdrarda albumin (mg/g kreat)	1,8 ± 3,1 0,5 (0,1-9,9)	14,8 ± 29,9 2,4 (0,1-119,4)	50,2 ± 85,0 10,5 (0,0-378,4)
Tip IV kollajen (µg/g kreatinin)	2,7 ± 1,3 2,6 (0,34-5,34)	9,4 ± 28,3 4,3 (1,3 -176,2)	23,9 ± 58,0 5,2 (2,4-316,0)
Matriks metalloproteinaz-9 (ng/g kreatinin)	2,9 ± 4,2 0,5 (0,1-15,6)	26,0 ± 46,6 8,3 (0,2-198,4)	25,0 ± 48,6 5,2 (0,1-244,9)

Tablo-14: HbA_{1c} düzeyi gruplarındaki farklılıkların dağılımı

	HbA _{1c} <%7	HbA _{1c} >%7
Kontrol	Glukoz p= 0.001 LDL-Kol p= 0.013 İd. Alb p= 0.026 Tip IV Kol p= 0.001 MMP-9 p= 0.001	Glukoz p= 0.001 BUN p= 0.002 Kreat p= 0.041 İd. Alb p= 0.000 Tip IV Kol. p= 0.000 MMP-9 p= 0.006 TIMP-1 p= 0.005
HbA_{1c}<%7		Diab. Süre p= 0.024 Glukoz p= 0.001 LDL-Kol p= 0.018 İd. Alb p= 0.009 Tip IV Kol p= 0.018 TIMP-1 p= 0.045

Kontrol grubu ile normoalbuminürik grup karşılaştırıldığında, yaş (p=0,038), vücut kütle indeksi (p=0,010), glukoz (p=0,001), kreatinin (p=0,153), LDL-kolesterol (p=0,033), HbA_{1c} (p=0,000), idrarda mikroalbumin atılımı(p=0,488), ve idrarda Tip IV kollajen atılımı (p=0,002) düzeylerinde anlamlı farklılık bulundu. İdrarda MMP-9 atılım (p=0,195) düzeylerinde ise anlamlı farklılık bulunamadı (Tablo-12) (Şekil-8).

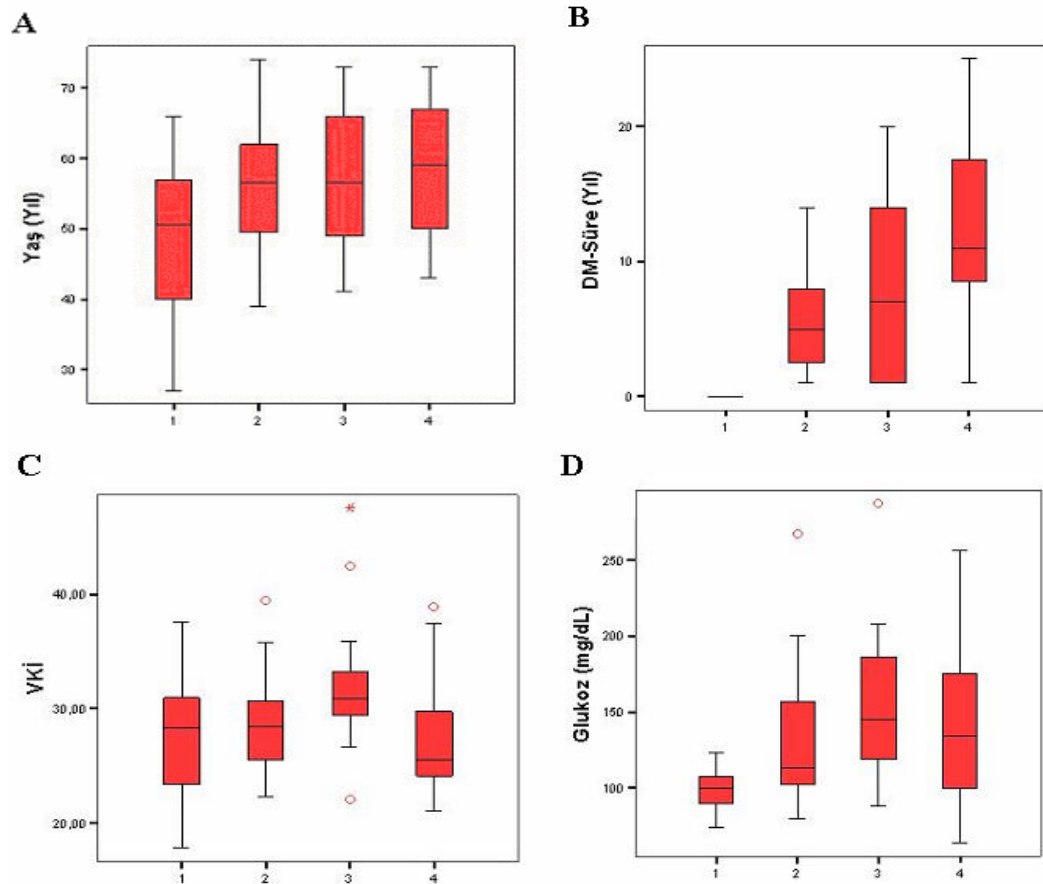
Kontrol grubu ile mikroalbuminürik grup karşılaştırıldığında, yaş (p=0,020), vücut kütle indeksi (p=0,007), glukoz (p=0,000), BUN (p=0,014), HbA_{1c} (p=0,000), idrarda mikroalbumin atılımı (p=0,000), idrarda Tip IV kollajen atılımı (p=0,000) ve idrarda MMP-9 atılımı (p=0,002) düzeylerinde düzeylerinde anlamlı farklılık bulundu (Tablo-12) (Şekil-8).

Kontrol grubu ile makroalbuminürik grup karşılaştırıldığında, yaş (p=0,009), glukoz (p=0,007), BUN (p=0,000), kreatinin (p=0,000), HbA_{1c} (p=0,000), idrarda mikroalbumin atılımı (p=0,000), idrarda Tip IV kollajen atılımı (p=0,000) ve idrarda MMP-9 atılımı (p=0,000) düzeylerinde düzeylerinde anlamlı farklılık bulundu (Tablo-12) (Şekil-8).

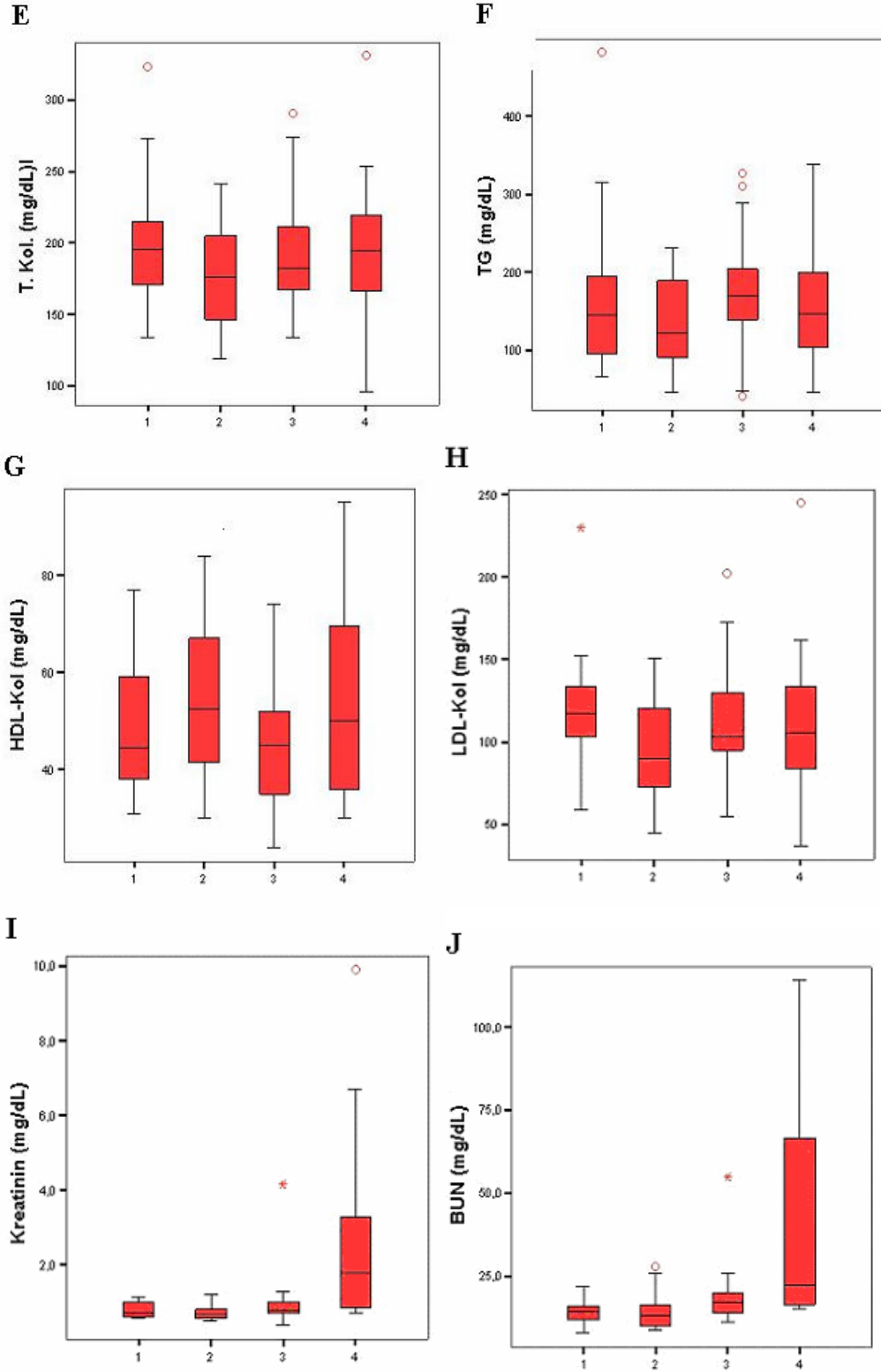
Normoalbuminürik grup ile mikroalbuminürik grup karşılaştırıldığında, vücut kütle indeksi (p=0,005), BUN (p=0,011), kreatinin (p=0,034), idrarda mikroalbumin atılımı (p=0,000), idrarda Tip IV kollajen atılımı (p=0,016) ve idrarda MMP-9 atılımı (p=0,012) düzeylerinde anlamlı farklılık bulundu (Tablo-12) (Şekil-8).

Normoalbuminürik grup ile makroalbuminürik grup karşılaştırıldığında, diyabet süresi (0,002), BUN (p=0,000), kreatinin (p=0,000), HbA_{1c} (p=0,012), idrarda mikroalbumin atılımı (p=0,000), idrarda Tip IV kollajen atılımı (p=0,000) ve idrarda MMP-9 atılımı (p=0,000) düzeylerinde anlamlı farklılık bulundu (Tablo-12) (Şekil-8).

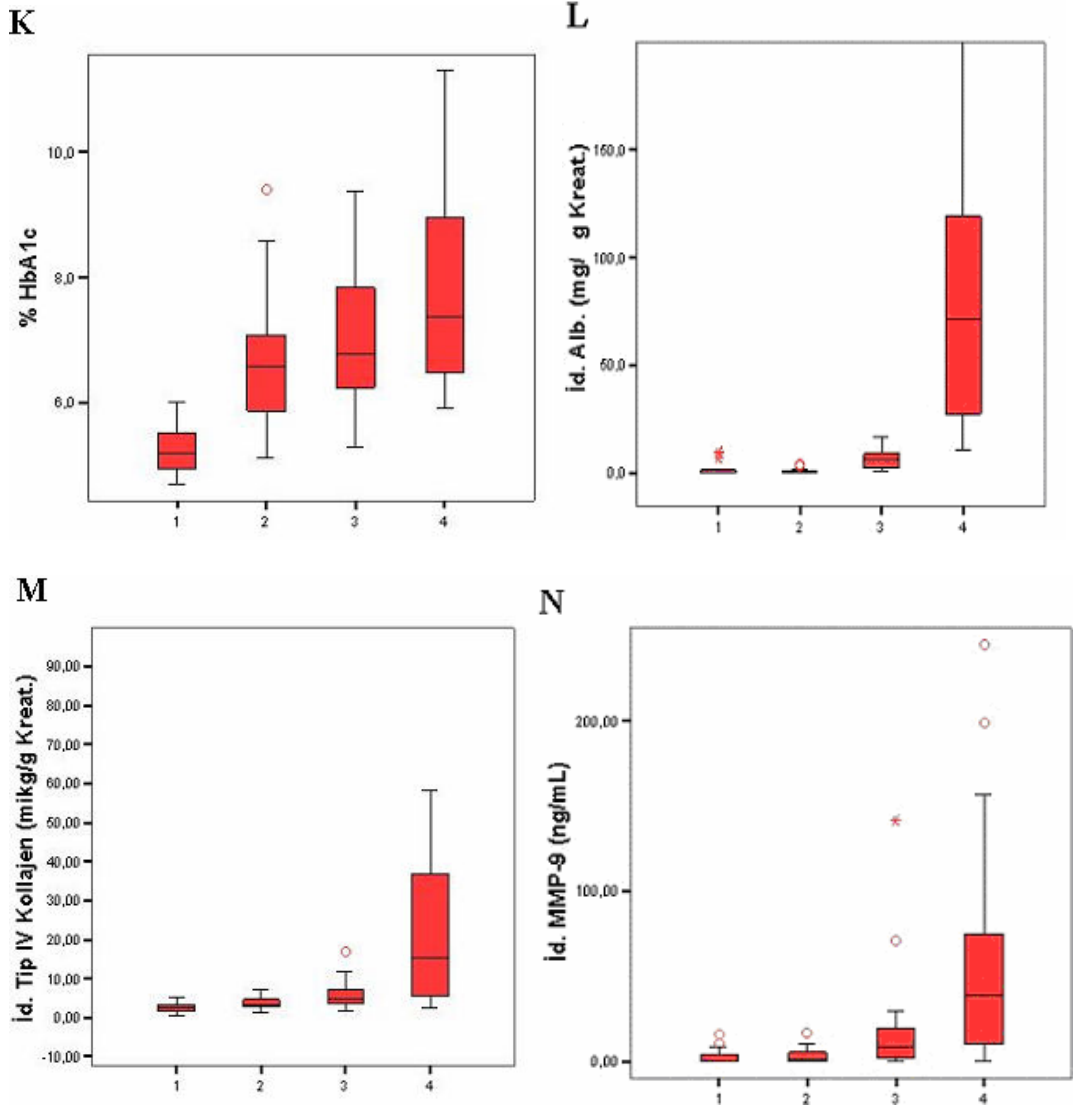
Mikroalbuminürik grup ile makroalbuminürik grup karşılaştırıldığında, vücut kütle indeksi (p=0,004), BUN (p=0,011), kreatinin (p=0,001), idrarda mikroalbumin atılımı (p=0,000), idrarda Tip IV kollajen atılımı (p=0,002) ve idrarda MMP-9 atılımı (p=0,003) düzeylerinde anlamlı farklılık bulundu (Tablo-12) (Şekil-8).



Şekil-8: Albümin atılımı gruplarında dağılımlar A: Yaş (yıl), B: Diyabet Süresi (yıl), C: Vücut Kütle İndeksi (kg/m²), D: Glukoz (mg/dL)



Şekil-8'in devamı: Albümin atılımı gruplarında dağılımlar E: Total kolesterol (mg/dL), F: Trigliserit (mg/dL), G: HDL-kolesterol (mg/dL), H: LDL-kolesterol (mg/dL), I: Kreatinin (mg/dL), J: BUN (mg/dL)

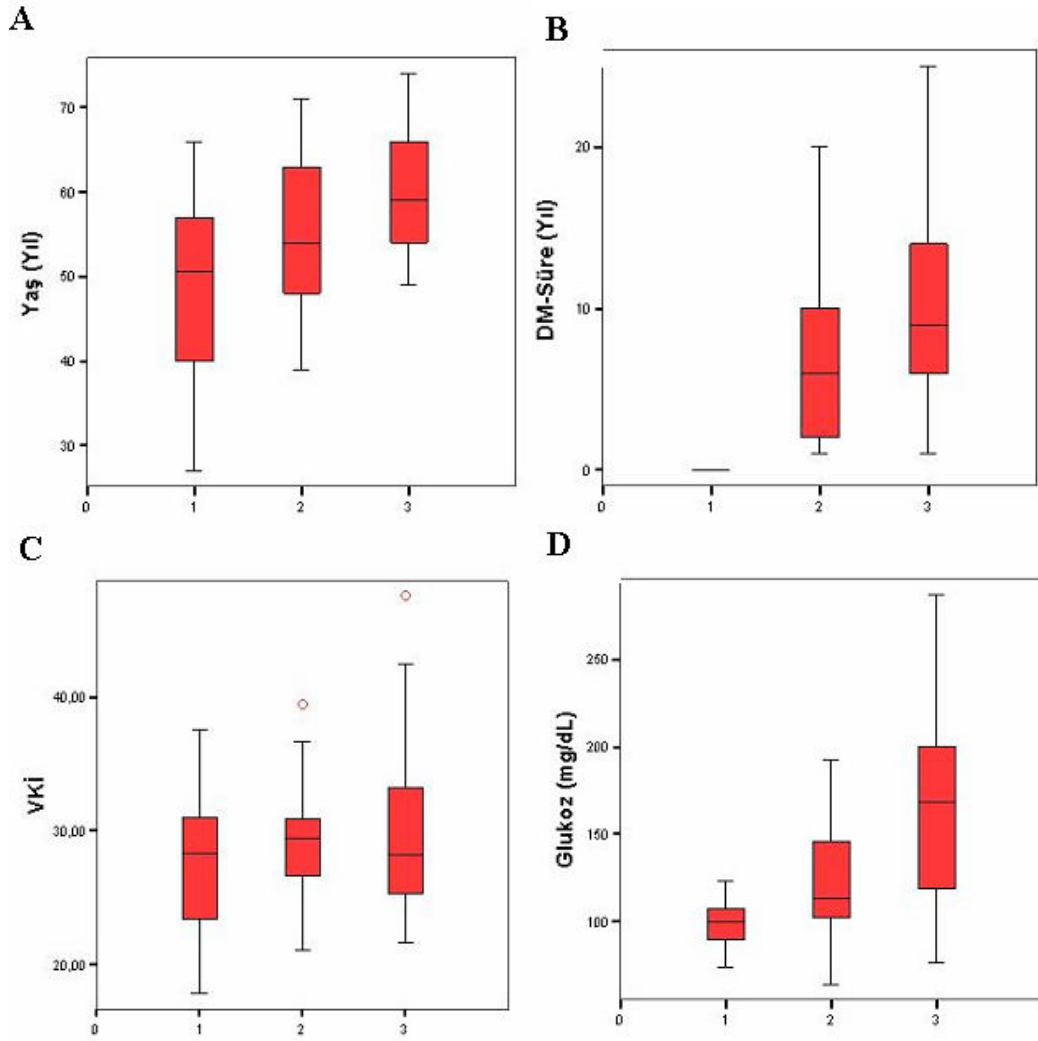


Şekil-8'in devamı: Albümin atılımı gruplarında dağılımlar K: HbA_{1c} (%), L: İdrarda albumin atılımı (mg/g kreat), M: İdrarda Tip IV kollajen atılımı (µg/g kreatinin), N: İdrarda matris metalloproteinaz-9 atılımı (ng/g kreatinin) Gruplar: 1-Kontrol grubu, 2-Normoalbuminürik grup, 3-Mikroalbuminürik grup, 4-Makroalbuminürik grup

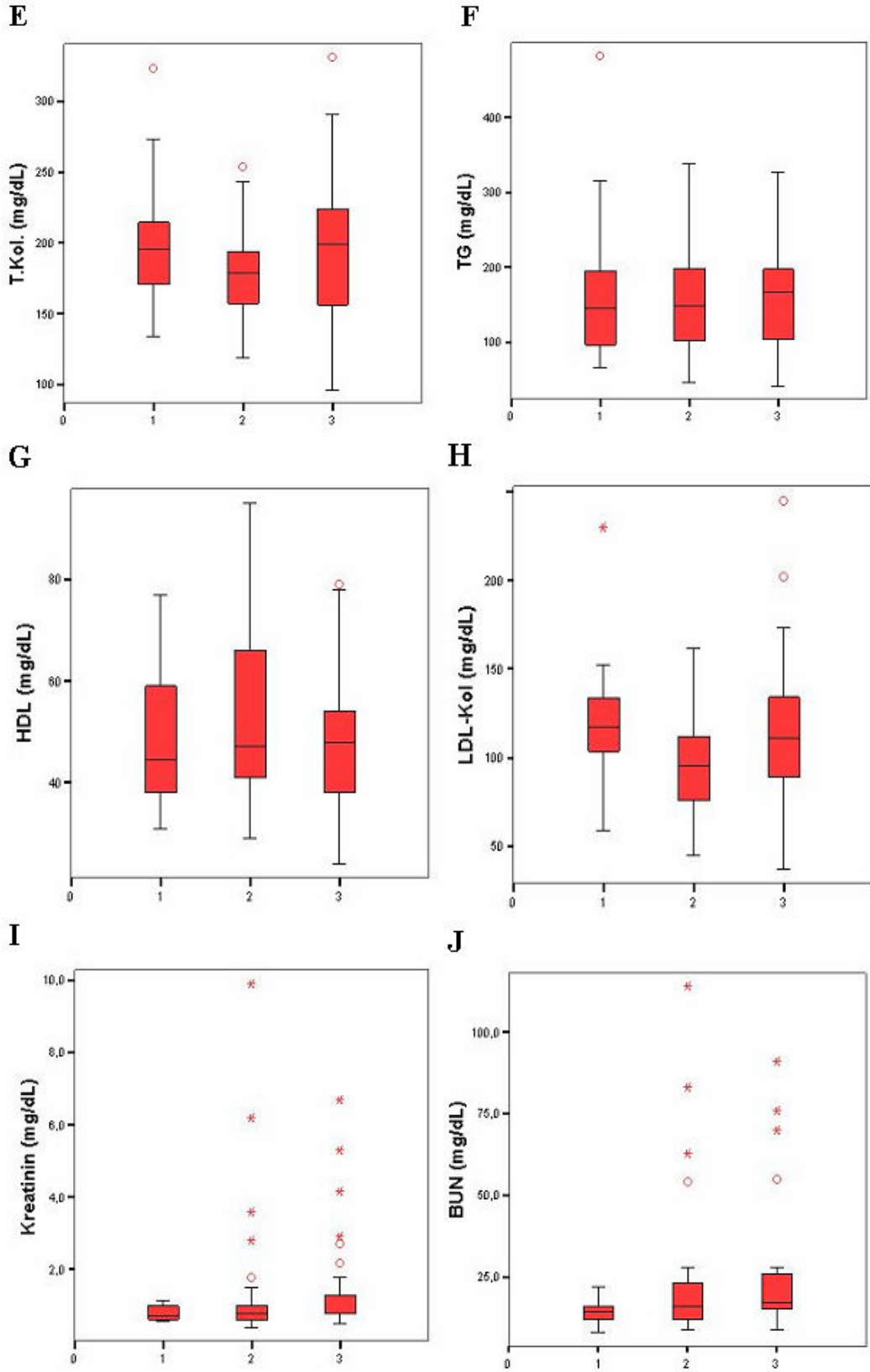
Diyabetli hasta grubu ayrıca, HbA_{1c} yüzdelerine göre iyi glisemik kontrollü (HbA_{1c}< %7) ve kötü glisemik kontrollü (HbA_{1c}≥ %7) olanlar olarak 2 farklı şekilde gruplandırıldı. Kontrol grubu ile iyi glisemik kontrollü grup karşılaştırıldığında, vücut kütle indeksi (p=0,222), glukoz (p=0,001), LDL-kolesterol (p=0,013), HbA_{1c} (p=0,000), idrarda mikroalbumin atılımı (p=0,026), idrarda Tip IV kollajen atılımı (p=0,001) ve idrarda MMP-9 atılımı (p=0,001) düzeylerinde anlamlı farklılık bulundu (Tablo-14) (Şekil-9).

Kontrol grubu ile kötü glisemik kontrollü grup karşılaştırıldığında, yaş(p=0,001), glukoz (p=0,000), BUN (p=0,002), kreatinin (p=0,041), HbA_{1c} (p=0,000), idrarda mikroalbumin atılımı(p=0,000), idrarda Tip IV kollajen atılımı (p=0,000) ve idrarda MMP-9 atılımı (p=0,006) düzeylerinde anlamlı farklılık bulundu (Tablo-14) (Şekil-9).

İyi glisemik kontrollü ile kötü glisemik kontrollü grup karşılaştırıldığında, yaş (p=0,037), diyabet süresi (0,024), glukoz (p=0,001), HbA_{1c} (p=0,000), idrarda mikroalbumin atılımı (p=0,000), idrarda Tip IV kollajen atılımı (p=0,018) düzeylerinde anlamlı farklılık bulundu. İdrarda MMP-9 atılım düzeylerinde ise anlamlı farklılık bulunamadı (p=0,811) (Tablo-14) (Şekil-9).



Şekil-9: HbA_{1c} gruplarında dağılımlar. A: Yaş (yıl), B: Diyabet Süresi (yıl), C: Vücut Kütle İndeksi (kg/m²), D: Glukoz (mg/dL)



Şekil-9'un devamı: HbA_{1c} gruplarında dağılımlar E: Total kolesterol (mg/dL), F: Trigliserit(mg/dL), G: HDL-kolesterol (mg/dL), H: LDL-kolesterol (mg/dL), I: Kreatinin (mg/dL), J: BUN (mg/dL)

TARTIŞMA

Çalışmamızda Tip IV kollajenin idrarda atılımının, diyabetik hastalarda normoalbuminürik grup da dahil olmak üzere tüm gruplarda kontrol grubundan anlamlı derecede artmış olduğu saptandı. Bu sonuç Tip IV kollajenin, diyabetik nefropati gelişmesinin erken dönemde saptanabilmesi açısından yararlı olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda MMP-9'un idrarda atılımının, diyabetik hastalarda mikroalbuminürik grup ve makroalbuminürik gruplarda, kontrol grubundan anlamlı derecede artmış olduğu saptandı. Fakat normoalbuminürik diyabetik hasta grubunun idrarda MMP-9 atılımı, kontrol grubunun idrarda MMP-9 atılımından yüksek olmasına rağmen, istatistiksel olarak iki grup arasında fark saptanmadı.

Diyabetik nefropati, diyabetin en önemli komplikasyonlarından biri olup prognozu önemli ölçüde etkilemektedir ve erken tanısı önemlidir (58,80,82). Son dönem böbrek yetmezliği nedenleri arasında diyabetin oranı son yıllarda giderek artmaktadır (82). Batı ülkelerindeki son dönem böbrek yetmezliğinin en önemli nedeni diyabetik nefropatidir (8,51,60,82,83,84).

Diyabete bağlı nefropatinin erken dönemde saptanabilmesi hem yaşam kalitesinin artırılması hem de toplum ve bireye yükleyeceği maliyetlerin önlenmesi açısından çok önemlidir. Ancak diyabetik böbrek hasarı klinik olarak sessiz seyrettiği için bu amaca ulaşmak oldukça güçtür (56,82). Böbrek hastalığının erken saptanması; kan basıncının sıkı kontrolü, anjiyotensin çevirici enzim (ACE) inhibitörleri veya anjiyotensin 2 reseptör blokörü ile tedavi ve gliseminin çok titiz bir şekilde kontrolü gibi, diyabetli hastalarda kronik böbrek yetmezliğine gidişi yavaşlatacak faktörlerle tedaviye imkan sağlar ancak tedavinin klinik olarak aşikar nefropati gelişiminden sonra başlaması son dönem böbrek yetmezliğine gidişi durdurmamaktadır (56,57,83). Bu nedenle etkili tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi ve diyabetik hastaların prognozu açısından nefropatinin erken tanısı oldukça önem arz etmektedir (81,83,85,86).

Diyabetik nefropatinin ortaya çıkması çok uzun yıllar almaktadır. Amerikan Klinik Endokrinolog Derneğinin kılavuzunda Tip 1 Diabetes Mellituslu hastalara tanı konduktan beş yıl sonra ve Tip 2 Diabetes Mellituslu hastalara ise tanı konduğu anda kronik böbrek hastalığı için tarama testlerinin yapılmasını önermektedir. Bu testler idrarda albümin atılımının, glomerüler filtrasyon hızının ve serum kreatinin düzeyi ölçümüdür (87).

İdrarda albümin atılımının saptanması diyabetik nefropati tanısında çok değerli bir yöntem olmakla birlikte; son yıllarda yapılan çalışmalarda idrarda atılan albümin düzeyinin prediktif değeri ile ilgili soru işaretleri oluşmuştur (84). Mikroalbuminüri bulunan bazı hastalarda normal böbrek yapısı gözlemlenirken, normoalbuminüri bulunan bazı hastalarda ise nefropatik lezyonlar gözlemlenmiştir (17,82,84,88).

İdrar albümin düzeyi ekstrarenal faktörlerden (egzersiz, idrar yolu enfeksiyonu, kalp yetmezliği, ilaçlar vb) etkilenmekte ve 24 saatlik idrar toplanmasındaki zorluklar sorun olmaktadır. İdrar albümin atılımında günden güne %40-50'ye varan değişiklikler olmaktadır (81). İdrarda albümin atılımına rağmen diyabetik nefropati gelişmediğini ve bazı mikroalbuminüri vakalarında mikroalbuminürinin normal sınırlara dönebildiğini gösteren bazı çalışmalarda mevcuttur (89). Ayrıca mikroalbuminüri evre 3 diyabetik nefropatinin bir bulgusudur (81) ve hastaya mikroalbuminüri tanısı konduğu anda glomerüllerde zaten glomerülopati geliştiği gösteren çalışmalar vardır (22,80). Bu nedenle nefropatinin erken dönemde saptanarak daha erken tedaviye başlanması komplikasyonların önlenmesi açısından önemlidir ve diyabetik nefropatiyi, mikroalbuminüri gelişiminden önce tespit edecek belirteçlere ihtiyaç vardır (15,16,22,80)

Serum kreatinin düzeyi ve glomerüler filtrasyon hızı ekstrarenal faktörlerden (vücut kas indeksi, yaş, cinsiyet, ilaçlar, karaciğer hastalıkları vb.) etkilenebilir. Serum kreatinin glomerüllerden serbestçe süzülür ve reabsorpsiyona uğramaz fakat küçük miktarlarda sekrete edilir. Serum kreatinindeki artış tubuler kreatinin sekresyonunda artışa neden olur bu yüzden glomerüler filtrasyon hızı orta seviyede azalma (40 ml/dk) gösterene kadar serum kreatinin seviyeleri artmaz. Bu bulgular serum kreatinin seviyelerinin glomerüler filtrasyon hızındaki küçük değişiklikleri

saptamada duyarsız olduğunu göstermektedir (90). Glomerüler filtrasyon hızının hesaplanabilmesi için idrar toplanması gereklidir, fakat bu hem zahmetlidir hem de idrar biriktirilmesi sırasında yanlışlıklar yapılmaktadır (90). Ayrıca Middleton ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, diyabetli hastalardaki kronik böbrek yetmezliğini taramada kullanılan kreatinin veya albüminüriye dayalı güncel tarama stratejilerinin, önemli sayıda kronik böbrek yetmezlikli hastanın saptanmasında yetersiz kaldığı bulunmuştur (56). Bu nedenlerle diyabetik nefropatinin erken tanısında idrarda albümin atılımını, glomerüler filtrasyon hızını ve serum kreatinin düzeyi ölçümleri yeteri kadar duyarlı ve spesifik göstergeler değillerdir.

Diabetes Mellituslu hastalarda böbrek fonksiyonundaki azalmayı saptamada seri Sistatin C ölçümünün kreatinin ölçümünden daha değerli olduğunu (90, 91) ileri süren ve ribonükleaz, β -2 mikroglobulin, retinol bağlayıcı protein, α -1 mikroglobulin, idrarla atılan lizozim, heparan sülfat ve glikozaminoglikan gibi maddelerin nefropatinin erken tanısında kullanılabileceğini ileri süren yayınlar varsa da bu tetkikler henüz tanı amaçlı kullanılmamaktadır (81,86). Dolayısıyla diyabetik nefropatinin erken dönemde tespit edilebilmesi için başka tanı araçlarının gerekli olduğu düşünülmektedir (9,80,83,84,86,92). Bu bilgiler ışığında bu çalışmada, Tip 2 diyabetli hastalarda, üriner MMP-9 ve üriner Tip IV kollajen düzeylerinin, diyabetin önemli mikrovasküler komplikasyonlarından olan nefropati açısından klinik etkinliğinin ve erken tanı belirteci olarak kullanılıp kullanılmayacağını değerlendirilmesi amaçlandı.

Diyabetik nefropati, ekstrasellüler matriks turnover hızında, matriks birikimi yönünde değişiklik ile karakterizedir. Bu değişiklikler glomerüler bazal membranda kalınlaşma, matriks birikimi sonucu mezengial genişleme, glomerüler epitelyal hücrelerde değişiklikler, glomerulosklerozis ve tubulointerstisyel fibroze yol açarak sonunda son dönem böbrek yetmezliğine neden olur (20,58). Uzun süreli diyabet hastası olan Tip 2 diyabetik hastaların küçük damar duvarı ve kapillerlerindeki karakteristik lezyon bazal membran kalınlaşmasıdır ve bu diyabetik nefropatinin oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Vücuttaki her bazal membran gibi glomerüler ekstrasellüler matrikste kollajenler, kollajen dışında protein yapılar (laminin, fibronektin, entaktin/nidojen) ve proteoglikanlardan oluşmuştur (20,61,93).

İlerlemiş glomerüler hastalıklar, mezengial matriks ve glomerüler bazal membranda Tip IV kollajen, proteoglikanlar ve laminin gibi kollajen dışında protein yapıların birikimi ile karakterizedir (61,94).

Tip IV kollajen glomerüler ekstrasellüler matriksin en önemli bileşenidir (92). Diyabetik böbrekte, glomerüler kapiller, küçük damarlar ve böbrek tübülüslerinin kalınlaşan bazal membranlarında, Tip IV kollajen artmaktadır. Artmış Tip IV kollajen özellikle mezengial alanlarda ve nodüler lezyonlarda belirgindir (61,93). Böbrek hastalıklarında serum ve üriner Tip IV kollajen düzeyleri matriks turnover hızını yansıtır olabilir (22,92). Diyabetli hastalardaki yüksek glukoz düzeyi nedeniyle Tip IV Kollajen meydana gelen yapısal değişiklikler, Tip IV Kollajenin MMP-3 ve MMP-9'a olan duyarlılığını azaltarak ekstrasellüler matriksin turnover hızını azalttığını öne süren yayınlar vardır (61). Ayrıca diyabetli hastalarda üriner Tip IV kollajen düzeylerinin, idrarla albumin atılımı başlamasından önce yükselmeye başladığını ve seri üriner Tip IV kollajen ölçümlerinin, diyabetteki böbrek hasarlanmasının erken saptanmasında kullanılabilecek bir belirteç olduğunu ileri süren yayınlar da vardır (20-22,69).

Tashiro ve arkadaşlarının (20) Tip 2 diyabetli hastalarda yaptığı çalışmada, makroalbuminüri hastaların idrarla Tip IV kollajen atılımı, normoalbuminürik ve mikroalbuminürik hasta grubu ile sağlıklı yetişkinlerin oluşturduğu gruptan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Yine bu çalışmada makroalbuminüri hastaların idrarla MMP-9 atılımı sağlıklı yetişkinlerin oluşturduğu gruptan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada diyabetik nefropatili hastaların idrarla MMP-9 ve Tip IV kollajen atılım seviyelerindeki artışın, hastalığın klinik düzeyi ile uygun şekilde yükselmekte olduğu gözlenmiştir.

Tomino ve arkadaşlarının (22) Tip 2 diyabetli hastalarda yaptığı çalışmada da, normoalbuminüri hastaların idrarla Tip IV kollajen atılımı, sağlıklı yetişkinlerin oluşturduğu gruptan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Mikroalbuminüri hastaların idrarla Tip IV kollajen atılımı, normoalbuminürik hasta grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Yine aynı çalışmada böbrek yetmezliği olan hasta grubu ile, makroalbuminürik ve mikroalbuminürik hasta gruplarının idrarla Tip IV kollajen

atılımı, normoalbuminürik hasta grubu ve sağlıklı yetişkinlerin oluşturduğu gruptan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Ayrıca üriner Tip IV kollajen seviyelerinin, diyabetik nefropatinin klinik ilerleme evresi ile uyumlu şekilde yükselmekte olduğu gözlenmiştir.

Lijima ve arkadaşlarının (69) Tip 2 diyabetli hastalarda yaptığı çalışmada da, mikroalbuminürik hastaların idrarla Tip IV kollajen atılımı, normoalbuminürik hasta grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Yine bu çalışmada normoalbuminürik 61 hastadan 28'inde (%45,9), artmış idrar Tip IV kollajen seviyeleri saptanmış (normal aralık: <3.5 µg/g kreatinin). Bir yıl sonra yapılan ölçümlerde bu 28 hastadan 7'sinin (%25), normoalbuminürik gruptan mikroalbuminürik gruba geçtiği bulunmuştur. Bu hastaların idrarla Tip IV kollajen atılım seviyeleride bir yıl sonraki ölçümlerde istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. Normoalbuminürik gruptaki diğer 21 hastanın ise bir yıl sonraki ölçümlerde idrarla Tip IV kollajen atılım seviyeleri anlamlı şekilde azalmıştır. Ayrıca mikroalbuminürik gruptaki hastaların üriner Tip IV kollajen seviyeleri bir yıl sonraki ölçümlerde anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur.

Yagame ve arkadaşlarının (21) Tip 2 diyabetli hastalarda yaptığı çalışmada da, böbrek yetmezliği olan hasta grubunun idrarla Tip IV kollajen atılımı, makroalbuminürik, mikroalbuminürik, normoalbuminürik hasta grupları ve sağlıklı yetişkinlerden, makroalbuminürik hasta grubundaki atılım, mikroalbuminürik, normoalbuminürik hasta grupları ve sağlıklı yetişkinlerden, mikroalbuminürik hasta grubundaki atılım, normoalbuminürik hasta grubu ve sağlıklı yetişkinlerden, normoalbuminürik hasta grubundaki atılım, sağlıklı yetişkinlerden anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Ayrıca yine bu çalışmada böbrek yetmezliği olan hasta grubunun serum Tip IV kollajen düzeyi, makroalbuminürik, mikroalbuminürik ve normoalbuminürik hasta gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Sağlıklı yetişkin grubunun serum Tip IV kollajen seviyesi, böbrek yetmezliği olan hasta grubunun ve makroalbuminürik hasta grubunun serum Tip IV kollajen seviyesinden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Fakat mikroalbuminürik hasta grubunun serum Tip IV kollajen seviyesi ile, normoalbuminürik hasta grubunun

serum Tip IV kollajen seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

Kotajima ve arkadaşlarının (95) Tip 2 diyabetli hastalarda yaptığı çalışmada da, Tip 2 diyabetli hastalarda idrarla Tip IV kollajen atılımı, sağlıklı yetişkin grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Tip 2 diyabetli hastalarda hem başlangıçta hem de 6 ay sonra yapılan idrarda Tip IV kollajen atılımı ile idrarda albümin atılımı ölçümleri arasında anlamlı korelasyon bulunmuştur. Aynı zamanda Tip 2 diyabetli hastalardan 6 ay sonra yapılan ölçümlerde 82 hastadan 24'ünde hem idrarla Tip IV kollajen atılımında, hem de idrarla albümin atılımında artış, 27'sinde ise sadece idrarla Tip IV kollajen atılımında artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar, mikroalbuminüri olmayan hastalarda, idrarla albümin atılımı olmamasına karşın böbreklerde hasarlanma olabileceğini ve idrarda Tip IV kollajen düzeyi, idrar albümin düzeyi daha duyarlı bir belirteç olduğunu göstermektedir.

Kado ve arkadaşlarının (96) Tip 2 diyabetli hastalarda yaptığı çalışmada da, Tip 2 diyabetli hastalarda idrarla Tip IV kollajen atılımı, sağlıklı yetişkinlerin grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur.

Banu ve arkadaşlarının (97) diyabetli hastalarda yaptığı çalışmada da, klinik olarak mikroanjiyopati bulguları olmayan diyabet hastalarının serum Tip IV kollajen düzeyi ve idrar Tip IV kollajen düzeyi, sağlıklı yetişkinlerden anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Normoalbuminürik hasta grubunun serum Tip IV kollajen düzeyi ve idrar Tip IV kollajen düzeyi, sağlıklı yetişkinlerden anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Böbrek yetmezliği olan makroalbuminürik ve mikroalbuminürik hasta gruplarının serum ve idrar Tip IV kollajen düzeyi normoalbuminürik hasta grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur.

Xu ve arkadaşlarının (93) Tip 2 diyabetli hastalarda yaptığı çalışmada da diyabetik nefropatili hasta grubunun serum Tip IV kollajen düzeyi, nefropatisi olmayan Tip 2 diyabetli hasta grubundan ve sağlıklı yetişkin grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Ayrıca makroalbuminürik hasta grubunun serum Tip IV kollajen düzeyi, mikroalbuminürik hasta grubundan anlamlı şekilde yüksek

bulunmuştur. Buna karşın nefropatisi olmayan Tip 2 diyabetli hasta grubunun serum Tip IV kollajen düzeyi ile sağlıklı yetişkinlerin oluşturduğu grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

Bu bulgular bizim bulgularımızla uyumluluk göstermektedir. Çalışmamızda makroalbuminürik, mikroalbuminürik, normoalbuminürik grupların, idrar Tip IV kollajen düzeyleri sağlıklı yetişkin grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bu anlamlı farklılık tüm gruplar arasında saptanmıştır (Tablo-13).

Glomerüler ekstrasellüler matriks'in yenilenmesinde fizyolojik düzenleyici olarak matriks metalloproteinazlar görev alır (20,75,98). Matriks metalloproteinazlar ekstrasellüler matriksi yıkan enzimlerdir. "Jelatinaz B" olarak da adlandırılan MMP-9, glomerül bazal membranın temel bileşenini oluşturan Tip IV kollajeni yıkan başlıca enzimlerden biridir (20, 94). Diyabetik nefropati ile anormal matriks metalloproteinaz ekspresyonu arasındaki ilişkiyi gösteren hayvan modeli çalışmaları vardır (75). Diyabetik nefropatili hastalarda glomerüler matriks metalloproteinaz ekspresyonunun azaldığı ve bunun yanı sıra matriks metalloproteinazın idrarla atılımında artış olduğu ileri sürülmüştür. Matriks metalloproteinazlardaki bu azalmanın, Tip IV kollajen yıkımını azaltarak diyabetik nefropatideki matriks birikimine neden olduğu düşünülmektedir (20).

Matriks metalloproteinaz grubu enzimlerin diabetes mellitus patogenezindeki rolü konusunda yapılan çalışmalar oldukça sınırlı olmakla birlikte araştırmacılar tarafından bu konuyla ilgili değişik hipotezler öne sürülmüştür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, yüksek glukoz maruz kalmanın, vasküler hücrelerde MMP/TIMP sisteminde uygunsuz düzenlenmelere neden olduğu kanıtlanmıştır. Gerçekten yüksek glukoz, ekstrasellüler matriks sentez ve yıkımındaki dengenin bozulmasına yol açan, matriks metalloproteinazların ekspresyon ve aktivitesini önemli şekilde arttırmaktadır. (98,99)

Uemura ve arkadaşları (100) diyabetik ratlarda yaptıkları çalışmada vasküler endotel hücrelerinde MMP-9'un arttığını tespit ettiler. Ayrıca bu ratların plazma

MMP-9 seviyesinde de anlamlı derecede artış saptadılar. Diabetes mellitus patogenezinde rol oynayan protein kinaz C aktivasyonu, oksidatif stres gibi hiperglisemiyle indüklenen olayların da etkisiyle matriks metalloproteinazların diyabette özellikle aktive edildikleri hipotezini öne sürdüler.

Tashiro ve arkadaşlarının (20) Tip 2 diyabetli hastalarda yaptığı çalışmada, makroalbuminüri hastaların idrarla MMP-9 atılımı sağlıklı yetişkinlerin oluşturduğu gruptan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur.

Lauhio ve arkadaşlarının (101) diabetes mellitus'lu hastaların idrarlarında yaptığı çalışmada, MMP-2 ve MMP-9'u içeren toplam jelatinolitik aktivite, diyabetik nefropatili hastalarda sağlıklı kontrollere göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Diyabetik nefropatili hastaların idrarlarındaki aktif MMP-9 oranı sağlıklı kontrollere göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Ayrıca diyabetik nefropatili hastaların idrarlarında matriks metalloproteinazların inaktif olan latent formlarından, aktif formlarına dönüşümlerinde rol oynayan tripsin-1 ve tripsin-2 konsantrasyonu sağlıklı kontrollere göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte tümör ilişkili tripsin inhibitörü (TATI) düzeyleri diyabetik nefropatili hastalarda, sağlıklı kontrollere göre yüksek bulunmasına karşın bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Derosa ve arkadaşlarının (98) Tip 2 diyabetli hastalarda yaptığı çalışmada, diyabetli hastaların plazma MMP-9, MMP-2, TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri, sağlıklı yetişkinlerin oluşturduğu grubun plazma MMP-9, MMP-2, TIMP-1 ve TIMP-2 düzeylerinden anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur.

Ebihara ve arkadaşlarının (102) Tip 2 diyabetli hastalarda yaptığı çalışmada da, mikroalbuminüri olmayan Tip 2 diyabetli 30 hasta 4 yıl takibe alınarak izlenmiş olup, bu hastaların başlangıçta, 1. ve 2. yıllarında idrarla albümin atılımı yokken, 4. yılda 8 hastada mikroalbuminüri oluşmuştur. 4. yılın sonunda mikroalbuminüri oluşan 8 hastanın başlangıç plazma MMP-9 düzeyleri normoalbuminürik olan 22 hastanın başlangıç plazma MMP-9 düzeylerinden istatistiksel olarak farklı değilken, 1. 2. ve 4. yılın sonunda yapılan ölçümlerde mikroalbuminürik 8 hastanın plazma

MMP-9 düzeyleri, normoalbuminürik 22 hastaninkinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada, 4 yıllık sürede mikroalbuminüri ortaya çıkan hastaların tümünde, klinik olarak mikroalbuminüri ortaya çıkmadan önce plazma MMP-9 konsantrasyonunda artışlar saptanmıştır. Aynı hastalar ACE inhibitörü ile tedavi edildiğinde mikroalbuminüri ve MMP-9 seviyelerinde düşme gözlenmiştir.

Wei ve arkadaşlarının (103) Tip 2 diyabetli hastalarda yaptığı çalışmada, makrovasküler komplikasyonları olan diyabetik nefropatili hastaların serum MMP-9, homosistein, IL-6 ve TNF- α düzeyleri, makrovasküler komplikasyonları olmayan diyabetik nefropatili hastalardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur.

Tayebjee ve arkadaşlarının (104) Tip 2 diyabetli hastalarda yaptığı çalışmada, Tip 2 diyabetli hastaların plazma MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 seviyeleri, kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur.

Shiau ve arkadaşlarının (105) Tayvan'lı Tip 1 diyabetli hastalarda yaptığı çalışmada, Tip 1 diyabetli hastaların plazma MMP-2 ve MMP-9 seviyeleri, kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bu çalışmadaki hastaların ortalama diyabetli yaşam süresi 4.5 yıldır ve sadece % 7.5 hastanın diyabet süreleri 10 yılın üstündedir. Bu durum matris metalloproteinaz düzeyleri ile diyabetin komplikasyonları arasındaki ilişkiyi yansıtmakta bu çalışmanın yetersiz kaldığını göstermektedir. Ancak birçok hastanın diyabetik nefropati ve diyabetin diğer komplikasyonları ile ilgili semptomlarının olmaması plazma matriks metalloproteinaz düzeylerinin diyabetik nefropati ve diyabetin diğer komplikasyonlarının oluşmasından önce arttığını düşündürmektedir.

Lee ve arkadaşlarının (106) Tip 2 diyabetli hastalarda yaptığı çalışmada ise, Tip 2 diyabetli hastalarının plazma MMP-9 konsantrasyonu ile sağlıklı yetişkinlerin oluşturduğu grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

Çalışmamızda mikroalbuminürik grubun idrarda MMP-9 atılım düzeylerini, normoalbuminürik hasta grubu ve sağlıklı yetişkinlerden istatistiksel olarak anlamlı

şekilde yüksek bulduk. Ayrıca makroalbuminürik grubun idrarda MMP-9 atılım düzeyleri de, mikroalbuminürik hasta grubu, normoalbuminürik hasta grubu ve sağlıklı yetişkinlerden istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptandı. Bununla birlikte normoalbuminürik grubun idrarda MMP-9 atılım düzeyleri, sağlıklı yetişkin gruptan yüksek olmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. Bu sonuç, idrarla Tip IV Kollajen atılımının diyabetli hastalarda, özellikle erken dönem böbrek hasarını değerlendirmede kullanımının MMP-9 atılımına göre daha yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

Diyabetik nefropatide MMP'lerin rolü üzerine yapılan çalışmaların bulguları oldukça farklı olduğundan bu konuda daha geniş çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Tip 2 diyabetli hastalarda Tip IV Kollajenin idrarla atılımının diyabetli özellikle normoalbuminürik grupta sağlıklı gruptan istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunması Tip IV kollajen idrar düzeylerinin ölçülmesinin diyabetik nefropatinin erken tanısı açısından yararlı bir ölçüm olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda kontrol grubu ile hasta grubunun yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi ($p=0,005$) (Tablo:11). Bununla birlikte kontrol grubumuzdaki yaşları 27, 31 ve 35 olan 3 hasta çıkarıldığında kontrol grubu ile hasta grubunun yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Diğer demografik özellik ve analit düzeyleri sonuçlarının istatistiklerinde değişiklik gözlenmedi. Bu nedenle bu bireyler kontrol grubundan çıkarılmadı.

Daha önce yapılan çalışmalarda (20,22) idrarda Tip IV Kollajenin ve MMP-9 atılım düzeylerinin nefropati evresi ile uyumlu şekilde arttığı bildirilmiştir. Bizde çalışmamızda idrarda hem Tip IV Kollajen hem de MMP-9 atılım düzeylerinin nefropati evresi ile pozitif yönde korelasyon gösterdiğini saptadık.

HbA_{1c} gruplarında gözlenen sonuçlar UKPDS (UK Prospective Diabetes Study Group) ve DCCT (Diabetes Control and Complications Trial Research Group) çalışmalarında (12-14) elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

Bu sonuca göre HbA_{1c}'nin diyabetik nefropati açısından diyabetik komplikasyonların izlenmesinde yararı tekrar vurgulanmış olmaktadır.

SONUÇLAR

- Normoalbuminürili hasta grubunun idrarda Tip IV kollajen atılımı, kontrol grubunun idrarda Tip IV kollajen atılımından istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir ($p=0,002$). Normoalbuminürili hasta grubunun idrarda MMP-9 atılım düzeyleri ise, kontrol grubundan yüksek olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı farklı değildir($p=0,195$).
- Mikroalbuminürili hasta grubunun idrarda Tip IV kollajen ve MMP-9 atılımı, kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı yüksektir (sırasıyla $p=0,000$, $p=0,002$).
- Mikroalbuminürili hasta grubunun idrarda Tip IV kollajen ve MMP-9 atılımı, normoalbuminürili hasta grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (sırasıyla $p=0,016$, $p=0,012$).
- Makroalbuminürili hasta grubunun idrarda Tip IV kollajen ve MMP-9 atılımı, kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (sırasıyla $p=0,000$, $p=0,000$).
- Makroalbuminürili hasta grubunun idrarda Tip IV kollajen ve MMP-9 atılımı, normoalbuminürili hasta grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (sırasıyla $p=0,000$, $p=0,000$).
- Makroalbuminürili hasta grubunun idrarda Tip IV kollajen ve MMP-9 atılımı, mikroalbuminürili hasta grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (sırasıyla $p=0,002$, $p=0,003$).
- HbA_{1c} yüzdelerine göre iyi glisemik kontrollü (HbA_{1c}< %7) hasta grubunun idrarda Tip IV kollajen ve MMP-9 atılımı, kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,001$).

- HbA_{1c} yüzdelerine göre kötü glisemik kontrollü (HbA_{1c} ≥ %7) hasta grubunun idrarda Tip IV kollajen ve MMP-9 atılımı, kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (sırasıyla p=0,000, p=0,006).
- HbA_{1c} yüzdelerine göre kötü glisemik kontrollü (HbA_{1c} ≥ %7) hasta grubunun idrarda Tip IV kollajen atılımı, iyi glisemik kontrollü (HbA_{1c} < %7) hasta grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (p=0,018). HbA_{1c} yüzdelerine göre kötü glisemik kontrollü (HbA_{1c} ≥ %7) hasta grubunun idrarda MMP-9 atılım düzeyleri ise, iyi glisemik kontrollü (HbA_{1c} < %7) hasta grubundan yüksek bulunmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur(p=0,195).
- İdrar Tip IV Kollajen düzeyi Tip 2 diyabetik hastalarda diyabetik nefropatinin erken tanısında yararlıdır.
- İdrar MMP-9 düzeyi ölçümü mikroalbüminüriye göre karşılaştırılabilir düzeydedir.
- HbA_{1c} diyabetik nefropatinin gelişmesinin izlenmesi açısından yararlı bir göstergedir.

ÖZET

Tip 2 Diabetes Mellituslu Hastalarda Üriner Tip IV Kollajen ve Matriks Metalloproteinaz-9 Düzeyleri ve Diyabetik Nefropati Açısından Yararlılığı.

Dr. Mehmet TÜRK

Diyabetik nefropati Tip 1 ve Tip 2 diyabetli hastalarda en sık görülen mikrovasküler komplikasyondur ve gelişmiş ülkelerde son dönem böbrek yetmezliğinin en sık görülen nedenidir.

Nefropatinin erken dönemde saptanması, yaşam kalitesi, mortalite ve tıbbi harcamalar açısından önemlidir. Diyabetik komplikasyonlar çeşitli tetkiklerle izlenir. İdrarda albümin atılımı böbrek işlevi için önemli göstergedir. Ancak diyabetik nefropati mikroalbüminüri saptandığında gelişmiş olmaktadır. HbA_{1c} komplikasyonları öngördürücüdür. Glomerüler bazal membranın önemli bileşeni Tip IV kollajen ve proteazı MMP-9'un idrarla atılımının izlenmesinin yararlı bir gösterge olabileceği düşünülmüştür. Bu alanda az sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızda, Tip 2 diyabetiklerde diyabetik nefropati gelişmesi açısından, üriner Tip IV kollajen ve MMP-9 düzeylerinin erken belirteç olma durumlarının değerlendirilmesi amaçlandı.

Hasta grubu Tip 2 diyabetli 39-74 yaş arasında 66 (Erkek - n: 26; yaş: 59 ± 7,9), (Kadın - n:40; yaş: 56,3 ± 9,8) ; kontrol grubu sağlıklı 20 bireyden (9 erkek, 11 kadın) (n:20; yaş: 48,7 ± 11,0) oluşturuldu.

Hasta grubu albümin atılım düzeylerine (mg albümin/gr kreatinin) göre 3 alt grupta (normoalbüminüri: <30; mikroalbüminüri: 30-300 ve makroalbüminüri: >300) toplandı.

Hasta grubu, HbA_{1c} düzeylerine göre iyi kontrollü (HbA_{1c} < %7) ve kötü kontrollü (HbA_{1c} ≥ %7) olarak 2 alt gruba ayrıldı.

İdrar Tip IV kollajen düzeyleri makroalbuminürik grupta mikroalbuminürik ($p=0,002$), normoalbuminürik ($p=0,000$) ve sağlıklı yetişkinlerden ($p=0,000$); mikroalbuminürik grupta, normoalbuminürik ($p=0,016$) ve sağlıklı yetişkinlerden ($p=0,000$); normoalbuminürik grupta sağlıklı yetişkinlerden ($p=0,002$). anlamlı derecede yüksekti.

İdrar MMP-9 düzeyleri, makroalbuminürik grupta mikroalbuminürik ($p=0,002$), normoalbuminürik ($p=0,000$) ve sağlıklı yetişkinlerden ($p=0,000$); mikroalbuminürik grupta normoalbuminürik ($p=0,012$) ve sağlıklı yetişkinlerden ($0,002$) anlamlı derecede yüksekti. Ancak normoalbuminürik gruptaki MMP-9 atılımı sağlıklı yetişkin grubundan anlamlı farklılık göstermedi ($p=0,195$).

İdrar Tip IV Kollajen düzeyleri, HbA_{1c} düzeylerine göre iyi kontrollü grupta, sağlıklı yetişkinlerden ($p=0,001$), kötü kontrollü grupta ise iyi kontrollü grup ($p=0,018$) ve sağlıklı yetişkinlerden ($p=0,000$) anlamlı şekilde yüksek bulundu.

İdrar MMP-9 düzeyleri, HbA_{1c} düzeylerine göre iyi kontrollü ($p=0,001$), ve kötü kontrollü ($p=0,006$) grupta, sağlıklı yetişkinlerden anlamlı derecede yüksekti; ancak kötü kontrollü grup ile iyi kontrollü grup arasında fark bulunmadı ($p=0,811$).

Sonuç olarak çalışmamızda idrar Tip IV Kollajen düzeyi Tip 2 diyabetik hastalarda diyabetik nefropatinin erken tanısında yararlıdır, idrar MMP-9 düzeyi ölçümü mikroalbuminüriye göre karşılaştırılabilir düzeydedir ve HbA_{1c} diyabetik nefropatinin gelişmesinin izlenmesinde yararlı bir göstergedir.

SUMMARY

Urine Type 4 Collogen and Matrix Metalloproteinase-9 levels in Type 2 diabetic patients and its usefulness in terms of diabetic nephropathy.

Dr. Mehmet TÜRK

Diabetic nephrophathy is the most frequent microvascular complication in Type 1 and Type 2 diabetic patients which is the most frequent reason of end stage renal failure in the developed countries.

Early detection of diabetic nephropathy is important for quality of life, mortality and medical expenses. In screening diabetic complications, several tests are performed. Urine albumin excretion is important for monitoring renal function. But, diabetic nephropathy has already been developed when microalbuminuria is detected,. HbA_{1c} measurement is useful for predicting complications. It is thought that screening the urinary Type 4 Collagen which is an important component of glomerular basal membran and its protease MMP-9 might be useful. There are few studies in this context. Our aim is to evaluate clinical usage of urinary Type 4 Collagen and MMP-9 levels, for early detection of diabetic nephropathy.

The study groups were composed of 66 diabetic patients between ages 39 – 74 (male - n: 26; age: 59 ± 7,9; female - n:40; age: 56,3 ±9,8) as the patient group, and 20 healthy individuals ((9 males, 11 females) (n:20; age: 48,7 ± 11,0) who have no clinical signs and symptoms as the control group..

According to their urinary albumin levels (mg albumin/ g creatinine), patient group were seperated into three subgroups: normoalbuminuric (<30), microalbuminuric (30-300), and macroalbuminuric (>300).

According to the HbA_{1c} levels, patient group seperated into two subgroups as well-controlled (HbA_{1c} < %7) and poorly controlled (HbA_{1c} ≥ %7).

Urinary Type 4 collagen levels were detected significantly higher; in macroalbuminuric group than microalbuminuric ($p=0,002$), normoalbuminuric ($p=0,000$) and control groups ($p=0,000$); in microalbuminuric group than normoalbuminuric ($p=0,016$) and control groups ($p=0,000$); in normoalbuminuric group than healthy adults ($p=0,002$).

Urinary MMP-9 levels were detected significantly higher in macroalbuminuric group than microalbuminuric ($p=0,002$), normoalbuminuric ($p=0,000$) and control groups ($p=0,000$); in microalbuminuric group than normoalbuminuric ($p=0,012$), and control groups ($p=0,002$). No significant difference was detected between urinary MMP-9 levels of normoalbuminuric group and healthy adults group ($p=0,195$).

Between the HbA_{1c} groups, urinary Type 4 collagen levels were detected significantly higher in well-controlled group than healthy adults ($p=0,001$), and in poorly controlled group than both well-controlled group ($p=0,018$) and healthy adults ($p=0,000$).

Between the HbA_{1c} groups, urinary MMP-9 levels were detected significantly higher in both well-controlled group ($p=0,001$) and poorly controlled group ($p=0,006$) than healthy adults according. There was no significant difference between poorly controlled group and well-controlled group ($p=0,811$).

As a result, we can conclude that determination of urinary Type 4 collagen level may be a useful marker for early detection of diabetic nephropathy in Type 2 diabetic patients, and measurement of urinary MMP-9 level is comparable with the urinary albumin measurement results. The other conclusion is that HbA_{1c} is a good surrogate marker for monitoring diabetes mellitus complications.

KAYNAKLAR

1. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes—2008. *Diabetes Care* 2008; 31: S12-S54.
2. Marshall SM, Flyvbjerg A. Prevention and early detection of vascular complications of diabetes. *BMJ* 2006; 333: 475-480.
3. Bennett CM, Guo M, Dharmage SC. HbA1c as a screening tool for detection of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetic Med* 2007; 24: 333–343.
4. Kurt M, Atmaca A, Gürlek A. Diyabetik nefropati. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004; 35: 12-17.
5. Rahman S, Rahman T, İsmail A, Rashid A. Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis. *Diabetes Obes Metab* 2007; 9: 767–780.
6. Nadir I, Topçu S, İçağasıoğlu S, Yıldırım N. Tip II Diabetes Mellitusta nefropati gelişiminde risk faktörleri. *Van Tıp Dergisi* 2003; 10(3): 65-68.
7. Thorn LM, Forsblom C, Fagerudd J, Fernholm KP, Kilpikari R, Groop PR. Clustering of risk factors in parents of patients with type 1 diabetes and nephropathy. *Diabetes Care* 2007; 30(5): 1162-1167.
8. Keane WF, Zhang Z, Lyle PA, Cooper ME, Zeeuw D, Grunfeld JP and et al. Risk scores for predicting outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy: The Renal Study. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1 761–767.
9. Otu HH, Can H, Spentzos D, Nelson GG, Hanson RL, Looker HC, and et al. Prediction of diabetic nephropathy using urine proteomic profiling 10 years prior to development of nephropathy. *Diabetes Care* 2007; 30: 638-643.
10. Türk Nefroloji Derneği 2001 Registry Raporu. İstanbul 2002.
11. Ersoy C, Tuncel E, Özdemir B, Ertürk E, İmamoğlu Ş. İnsülin kullanan tip 2 diabetes mellituslu hastalarda diyabet eğitimi ve metabolik kontrol. *Uludağ Ün Tıp Fak Dergisi* 2006; 32(2): 43-47.
12. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in IDDM. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-986.
13. UKPDS Group: Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. *Lancet* 1998; 352: 837-853.

14. UKPDS Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. *BMJ* 1998; 317: 703-13.
15. Mogensen CE. Microalbuminuria, blood pressure and diabetic renal disease: origin and development of ideas. *Diabetologia* 1999; 42: 263-85.
16. Tabaei BP, Al-Kassab AS, Ilag LL, Zawacki CM, Herman WH. Does microalbuminuria predict diabetic nephropathy? *Diabetes Care* 2001; 24: 1560-1566.
17. Tsilibary EC. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. *J Pathol* 2003; 200: 537-546.
18. Nagase H, Woessner FJ. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274(31): 2491-2494.
19. Mechan RP, Broekelmann TJ, Flizsar CJ, Shapiro SD, Welgus HG, Seniori RM. Elastin degradation by matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 1997; 272(29): 18071-18076.
20. Tashiro K, Koyanagi I, Ohara I, Ito T, Saitoh A, Horikoshi S, Tomino Y. Levels of urinary matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy. *J Clin Lab Anal* 2004; 18: 206-210.
21. Yagame M, Suzuki D, Jinde K, Saotome N, Sato H, Noguchi M and et al. Significance of urinary type IV collagen in patients with diabetic nephropathy using a highly sensitive one-step sandwich enzyme immunoassay. *J Clin Lab Anal* 1997; 11: 110-116.
22. Tomino Y, Suzuki S, Azushima C, Shou I, Lijima T, Yagame M and et al. Asian multicenter trial on urinary type IV collagen in patients with diabetic nephropathy. *J Clin Lab Anal* 2001; 15: 188-192.
23. 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* 2003; 26: 5S-20S.
24. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree A, King H. Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27: 1047-53.
25. Satman I, Yilmaz MT, and TURDEP group. Population-based study of diabetes and risk characteristics in turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care* 2002; 25: 1551-1556.

26. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2007; 30: 42-47.
27. Manna TD. Not every diabetic child has type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr* 2007; 83(5): 178-183.
28. Virally M, Blicklé JF, Girard J, Halimi S, Simon D, Guillausseau PJ. Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes Metab* 2007; 33: 231–244.
29. The Diabetes Control and Complications Trial/epidemiology of diabetes interventions and complications (DCCT/EDIC) study research group. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2005; 353: 2643-2653.
30. Black C, Cummins E, Royle P, Philip S, Waugh N. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of inhaled insulin in diabetes mellitus: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2007; 11: 1-126.
31. Kristensen JK, Stoevring H. A Follow-Up Study Of The occurrence and consequences of HbA1c measurements in an unselected cohort of non-pharmacologically treated patients with type 2 diabetes. *Scand J Prim Health Care* 2008; 26: 57-62.
32. Maynard JD, Rohrscheib M, Way JF, Nguyen CM, Ediger MN. Noninvasive type 2 diabetes screening superior sensitivity to fasting plasma glucose and A1c. *Diabetes Care* 2007; 30: 1120–1124.
33. Donner TW. Tight control of hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Insulin* 2006; 1: 166-172.
34. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002; 48(3): 436–472.
35. Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, Malone JJ, Nathan D, Peterson CM and et al. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: S91-S93.
36. Krishnamurti U, Steffes MW. Glycohemoglobin: A primary predictor of the development or reversal of complications of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2001; 47: 1157–1165.
37. Greenberg RA, Sacks DB Screening for diabetes: is it warranted? *Clin Chem Acta* 2002; 315: 61–69.

38. Kilpatrick ES, Rigby AS, Atkin SL. Variability in the relationship between mean plasma glucose and HbA1c: implications for the assessment of glycemic control. *Clin Chem* 2007; 53(5): 897–901.
39. Cho JH, Chang SA, Kwon HS, Choi YH, Ko SH, Moon SD and et al. Long-term effect of the internet-based glucose monitoring system on HbA1c reduction and glucose stability. *Diabetes Care* 2006; 29: 2625-2631.
40. Stratton IM, Adler AI, Neil HAW, Matthews DR, Manley SE, Cull CA and et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 2000; 321: 405-412.
41. Miedema K. Laboratory Tests in diagnosis and management of diabetes mellitus. practical considerations. *Clin Chem Lab Med* 2003;41(9): 1259–1265.
42. Campbell RC, Ruggenenti P, Remuzzi G. Halting The progression of chronic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: S190–S195.
43. Basi S, Fesler P, Mimran A, Lewis JB. Microalbuminuria in type 2 diabetes and hypertension a marker, treatment target or innocent bystander? *Diabetes Care* 2008; 31: S194-S201.
44. Bruno G, Merletti F, Biggeri A, Bargero G, Ferrero S, Pagano G and et al. Progression to overt nephropathy in type 2 diabetes: the casale monferrato study. *Diabetes Care* 2003; 26(7): 2150-5.
45. Satchell SC, Tooke JE. What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium? *Diabetologia* 2008; 51: 714–725.
46. Rossing P, Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving HH. Predictors of mortality in insulin dependent diabetes: 10 year observational follow up study. *BMJ* 1996; 313: 779–784.
47. Rossing P, Hougaard P, Parving HH, Risk factors for development of incipient and overt diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2002; 25(5): 859-864.
48. Jong PE, Curhan GC. Screening, monitoring, and treatment of albuminuria: public health perspectives. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2120–2126.
49. Jong PE, Ron T, Gansevoort RT, Bakker SJL. Macroalbuminuria and microalbuminuria: do both predict renal and cardiovascular events with similar strength? *J nephrol* 2007; 20: 375-380.

50. American Diabetes Association. Diabetic nephropathy *Diabetes Care*. 2003; 26: S94-S98.
51. American Diabetes Association. Nephropathy in diabetes *Diabetes Care*. 2004; 27: S79-S83.
52. Cusick M, Meleth AD, Agron E, Fisher MR, Reed GF, Knatterud GL and et al. Associations of mortality and diabetes complications in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28: 617–625.
53. Jonsson B. Revealing the cost of type II diabetes in Europe. *Diabetologia* 2002; 45: 5-12.
54. Rubin RJ, Altman WM, Mendelson DN. Health care expenditures for people with diabetes mellitus. *J Endocrinal Metab* 1994; 78: 809A–809A.
55. Brown JB, Pedula KL, Bakst AW. The progressive cost of complications in type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 1999; 159: 1873–1880.
56. Middleton RJ, Foley RN, Hegarty J, Cheung CM, McElduff P, Gibson JM and et al. The unrecognized prevalence of chronic kidney disease in diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 88–92.
57. Gaede P, Vedel P, Parving HH, Pedersen O. Intensified multifactorial intervention in patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria: the Steno type 2 randomised study. *Lancet* 1999; 353: 617–22.
58. Giunti S, Barit D, Cooper ME. Mechanisms of diabetic nephropathy. *Hypertension* 2006;48: 519-526.
59. Altıparmak MR, Apaydın S. Diabetik Nefropati. Editör: Yenigün M. Her yönüyle Diabetes Mellitus. İstanbul: Nobel Kitabevi, 2001: 383-389.
60. Ritz E. Diabetic Nephropathy. *Saudi J Kidney Dis Transplantation* 2006; 17(4): 481-490.
61. Mason RM, Wahab NA. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1358–1373.
62. Çetinkaya A. Diyabetik nefropati ve tedavisi. Editör: Yılmaz T. Diabetes mellitusun tedavisi 2003: 117-122.
63. Güner G. Bağ dokusu. Editör: Emerk K. Temel Biyokimya. Saray Kitabevi, 1997: 833-840.
64. Persikov AV, Brodsky B. Unstable molecules form stable tissues. *PNAS* 2002; 99(3): 1101–1103.

65. Kadler EK, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP Collagens at a glance *J Cell Sci* 2007; 120(12): 1955-1958.
66. Blum RS, Ruggiero F. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol* 2005; 53(7): 430–442.
67. Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech* 2008; 71:357–370.
68. Lebleu VS, Macdonald B, Kalluri R. Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med* 2007; 232: 1121-1129.
69. Lijima T, Suziki S, Sekizuka K, Hishiki T, Yagame M, Jinde K and et al. Follow-up study on urinary type IV collagen in patients with early stage diabetic nephropathy. *J Clin Lab Anal* 1998; 12: 378-82.
70. Reel B. Matriks metalloproteinaz enzimleri ve ateroskleroz *T Klin J Med Sci* 2006; 26: 527-537.
71. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Mol Cell Biochem* 2003; 253: 269–285.
72. Aksun SA, Özmen D, Bayındır O. Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar. *T Klin J Med Sci*. 2001; 21: 332-342.
73. Mandal M, Mandal A, Das S, Chakraborti T, Sajal C. Clinical implications of matrix metalloproteinases. *Mol Cell Biochem* 2003; 252: 305-329.
74. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003; 92: 827-839.
75. Catania JM, Chen G, Parrish AR. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: F905–F911.
76. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 562-573.
77. Bjorklund M, Koivunen E: Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1755: 37-69.
78. Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: Therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 121-31.
79. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 49: 187-98.

80. Patari A, Forsblom C, Havana M, Taipale H, Groop PH, Holthofer H and et al. Nephropathy in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 2969–2974.
81. Çelen YZ, Özbay E, Araz M, Okan V. Diabetes mellitus olgularında glomerüler filtrasyon değerlerinin incelenmesi. *Van Tıp Dergisi* 2000; 1: 24-27.
82. Caramori ML, Fioretto P, Mauer M The need for early predictors of diabetic nephropathy risk is albumin excretion rate sufficient? *Diabetes* 2000; 49: 1399-1408.
83. Steinke JM, Sinaiko AR, Kramer MS, Suissa S, Chavers BM, Mauer M. The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 2164–2171.
84. Perlemoine C, Beauvieux MC, Rigalleau V, Baillet L, Barthes N, Derache P and et al. Interest of cystatin C in screening diabetic patients for early impairment of renal function. *Metabolism* 2003; 52: 1258-1264.
85. Pucci L, Triscornia S, Lucchesi D, Fotino C, Pellegrini G, Pardini E and et al. Cystatin C and estimates of renal function: searching for a better measure of kidney function in diabetic patients. *Clin Chem* 2007; 53(3): 480–488.
86. Mojiminiyi OA, Abdella N. Evaluation of cystatin C and β -2 microglobulin as markers of renal function in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2003; 17: 160–168.
87. American Association of Clinical Endocrinologists. AACE diabetes mellitus guidelines. Microvascular complications. *Endocr Pract* 2007; 13: 50-55.
88. Fioretto P, Stehouwer CDA, Mauer M, Corona MC, Brocco E, Carraro A and et al. Heterogeneous nature of microalbuminuria in NIDDM: studies of endothelial function and renal structure. *Diabetologia* 1998; 41: 233-236.
89. Wirta OR, Pasternack AI, Mustonen JT, Koivula TA, Harmoinen A. Urinary albumin excretion rate and its determinants after 6 years in non-insulin-dependent diabetic patients *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 449-456.
90. Tanaka A, Suemaru K, Araki H. A new approach for evaluating renal function and its practical application. *J Pharmacol Sci* 2007; 105: 1–5.
91. Premaratne E, MacIsaac RJ, Finch S, Panagiotopoulos S, Ekinçi E, Jerums G. Serial measurements of cystatin C are more accurate than creatinine-based methods in detecting declining renal function in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2008; 31(5): 971-3.

92. Granier C, Makni K, Molina L, Jardin-Watelet B, Ayadi H, Jarraya F. Gene and protein markers of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 792–799.
93. Xu XL, Wu Z, Zhou Q, Zhang Y, Wu D The Role Of Determining The levels of serum collagen type IV in diagnosing early diabetic nephropathy. *Ren Fail* 2002; 24(6): 747–753.
94. Endo T, Nakabayashi K, Sekiuchi M, Kuroda T, Soejima A, Yamada A. Matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the peripheral blood of patients with various glomerular diseases and their implication in pathogenetic lesions: study based on an enzyme-linked assay and immunohistochemical staining. *Clin Exp Nephrol* 2006; 10: 253–261.
95. Kotajima N, Kimura T, Kanda T, Obata K, Kuwabara A, Fukumura Y and et al. Type IV collagen as an early marker for diabetic nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2000; 14(1): 13-17.
96. Kado S, Aoki A, Wada S, Katayama Y, Kugai N, Yoshizawa N, Nagata N. Urinary type IV collagen as a marker for early diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 1996; 31(1-3): 103-8.
97. Banu N, Hara H, Okamura M, Egusa G, Yamakido M. Urinary excretion of type IV collagen and laminin in the evaluation of nephropathy in NIDDM: comparison with urinary albumin and markers of tubular dysfunction and/or damage. *Diabetes Res Clin Pract* 1995; 29(1): 57-67.
98. Derosa G, D'Angelo A, Tinelli C, Devangelio E, Consoli A, Miccoli R. Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects. *Diabetes Metab* 2007; 33: 129-134.
99. Death AK, Fisher EJ, McGrath KCY, Yue DK. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. *Atherosclerosis* 2003; 168: 263-269.
100. Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH and et al. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity role of oxidative stress. *Circ Res* 2001; 88: 1291-1298.

101. Lauhio A, Sorsa T, Srinivas R, Stenman M, Tervahartiala T, Stenman UH and et al. Urinary matrix metalloproteinase -8, -9, -14 and their regulators (try-1, try-2, tati) in patients with diabetic nephropathy. *Ann Med* 2008; 40: 312-320.
102. Ebihara I, Nakamura T, Shimada N, Koide H. Increased plasma metalloproteinase-9 concentrations precede development of microalbuminuria in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 1998; 32(4): 544-550.
103. Wei J, Qiang Y, Yong-ping L, Hui-ming W, Xiang-qun H, Shu-qiao Y and et al. Serum matrix metalloproteinase-9 combined with homocysteine IL-6 TNF-a, CRP, HbA1c and lipid profile in the incipient diabetic nephropathy with or without macrovascular diseases. *J Med Col PLA* 2007; 22(2): 111- 114.
104. Tayebjee MH, Lim HS, Macfadyen RJ, Lip GYH. We estimated matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 2049-2051.
105. Shiao MY, Tsai ST, Tsai KJ, Haung ML, Hsu YT, Chang YH. Increased circulatory MMP-2 and MMP-9 levels and activities in patients with type 1 diabetes mellitus. *Mt Sinai J Med* 2006; 73(7); 1024-8.
106. Lee SW, Song KE, Shin DS, Ahn SM, Ha ES, Kim DJ and et al. Alterations in peripheral blood levels of TIMP-1, MMP-2, and MMP-9 in patients with type-2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 69(2): 175-179.