

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Hande GÜÇLÜ

DİYABETİK KATARAKTTA JAK/STAT SİNYAL ARTIŞINA BAĞLI EMT AKTİVASYONUN ROLÜ

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Tülay Engin

EDİRNE-2024



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde emeği geçen, tez sürecimde yardımlarını ve desteğini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Hande GÜÇLÜ'ye, uzmanlık eğitimim boyunca eğitimime katkıda bulunan tüm hocalarıma, tez çalışmamın laboratuvar kısmını yöneten ve bana her zaman yardımcı olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR'a, projemizi destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi Başkanlığı'na (proje no: TÜBAP 2023/134), her zaman desteği ile yanımda olan sevgili eşim Ozan Taylan ENGİN'e, beni bu günlere getiren aileme, asistanlığımın başından itibaren beraber çalışma fırsatı bulduğum meslektaşlarıma ve tüm göz hastalıkları çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
LENS.....	3
KATARAKT.....	8
DİYABETES MELLİTUS.....	9
DİYABETİK RETİNOPATİDE ÖNEMLİ MOLEKÜLER	
YOLAKLAR.....	14
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	22
BULGULAR.....	27
TARTIŞMA.....	48
SONUÇLAR.....	58
ÖZET.....	60
SUMMARY.....	62
KAYNAKLAR.....	64
EKLER.....	78

SİMGE VE KISALTMALAR

AGE	: Glikoliz Ara Ürünleri
AR	: Aldoz Redüktaz
ATP	: Adenozin Trifosfat
BM	: Bazal Membran
DAG	: Diaçilgliserol
DM	: Diyabetes Mellitus
DMÖ	: Diyabetik Makula Ödemi
DRP	: Diyabetik Retinopati
ECM	: Ekstrasellüler Matriks
EDGK	: En İyi Düzeltilmiş Görme Keskinliği
EMT	: Epitelyal Mezenkimal Transformasyon
FA	: Floresein Anjiyografi
GİB	: Göz İçi Basıncı
GLI1	: Glioma İlişkili Protein
HE	: Hematoksilen Eozin
HH	: Hedgehog
HMP	: Hekzos Monofosfat
IL-1β	: İnterlökin-1 β
IL-6	: İnterlökin-6

IL-6R	: İnterlökin-6 Reseptörü
IL-8	: İnterlökin-8
İHK	: İmmunohistokimya
IRMA	: İnterretinal Mikrovasküler Anomaliler
JAK	: Janus Kinaz
JLP	: JNK ile ilişkili Lösin Fermuar Proteini
JNK	: c- Jun N-Terminal Kinaz
K	: Potasyum
LATS1/2	: Büyük Tümör Baskılayıcı Kinaz 1/2
LEF	: Lenfoid Arttırıcı Faktör
MALAT1	: Metastazla İlişkili Akciğer Adenokarsinomu Transkript 1
MAPK	: Mitojen ile Aktive Edilen Protein Kinaz
MCP-1	: Monosit Kemotaktik Protein-1
Merlin	: Moesin-ezrin-radixin Benzeri Protein
MET	: Mezenkimal Epidermal Transformasyon
MIP	: Membran İçi Proteini
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
Na	: Sodyum
NAPD	: Nikotinamid Adenin Difosfat
NADPH	: Nikotinamid Adenin Difosfat Hidrojen
NHERF	: Na ⁺ /H ⁺ Değişirici Düzenleyici Faktör
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NPDR	: Nonproliferatif Diyabetik Retinopati
NRDM	: Diyabetik Retinopati Bulgusu Olmayan
NRF2	: Nükleer Faktör Eritroid 2 İlişkili Faktör
NV	: Neovaskülerizasyon
NVD	: Disk Üzerinde Neovaskülerizasyon
NVE	: Disk Dışı Neovaskülerizasyon
PBX3	: Pre-B Hücresi Lösemi Transkripsiyon Faktörü 3

PDR	: Proliferatif Diyabetik Retinopati
PKC	: Protein Kinaz C
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDH	: Sorbitol Dehidrojenaz
STAT	: Sinyal Dönüştürücü ve Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü
SHH	: Sonic Hedgehog Proteini
TCF	: T Hücre Faktörü
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör- α
TGF-β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β
TβR1	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β Reseptörü
VEGF	: Vasküler Endotelyal Growth Faktör
ZO-1	: Zona Okludens
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gamma

GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes Mellituslu hastalarda katarakt insidansı ve ilerlemesi arttığından, katarakt diyabetik hastalarda görme bozukluğunun nedenlerinden biri olarak kabul edilir (1, 2). Diyabet ve katarakt oluşumu arasındaki ilişki klinik epidemiyolojik ve temel araştırma çalışmalarında gösterilmiştir (3). Katarakt gelişiminin diyabetik hastalarda diyabetik olmayan hastalara kıyasla daha sık ve daha erken yaşta ortaya çıktığı bilinmektedir (4-6). Yapılan çalışmalarda, 65 yaşın altındaki diyabetli hastalarda katarakt prevalansının üç ila dört kat arttığı, 65 yaşın üzerindeki hastalarda iki kata kadar arttığı gösterilmiştir (7). Diyabet süresi daha uzun olan hastalarda ve metabolik kontrolü zayıf olanlarda risk artar. Diyabetiklerde en sık görülen katarakt tipi, diyabetik olmayanlara göre daha erken ortaya çıkma ve daha hızlı ilerleme eğilimi gösteren yaşa bağlı veya senil kataraktır (8). En yaygın cerrahi oftalmik prosedür olan katarakt cerrahisi etkili bir tedavi olmasına rağmen, diyabetik hastalarda katarakt gelişimini geciktirmek veya önlemek için patomekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir (3).

Diyabetik hastalarda hiperglisemi ile başlayan moleküler mekanizmalar arasında protein kinaz-C aktivasyonu, poliol yolları, artmış oksidatif stres ve glikozile edilmiş son ürünlerin artan üretimi yer alır (9-11). Oksidatif stres sonucu oluşan biyokimyasal değişiklikler retinanın mikrovasküler ağında fonksiyonel ve yapısal bozukluklara yol açmaktadır. Bu bozukluklar retinanın kan akımında değişikliklere yol açarak kapiller oklüzyona ve iskemiye neden olmaktadır. Retina hücrelerinde iskemi geliştiğinde buna yanıt olarak İnterlökün 6 (IL-6) ve Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF) salgılanır (12).

IL-6, inflamatuvar yanıtta merkezi bir role sahip olan pleiotropik bir inflamatuvar sitokindir (13). Hedef hücrelerde IL-6, zara bağlı reseptöre (IL-6R) bağlanır ve epitelyal mezenkimal transformasyonu (EMT) düzenleyen JAK/STAT sinyalinin aktivasyonunu indükler. Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3'ün etkinleştiricisi (STAT3), diyabetik

retinopatinin patogenezinde yer alan sinyal dönüştürücü ailesinin bir üyesidir. Çoğu hücrenin sitoplazmasında aktif olmayan bir monomer formunda bulunan STAT3 monomerleri, fosforilasyondan sonra toplanarak çekirdeğe aktarılır (14, 15).

E-kadherin ekspresyonunun kaybı EMT'de temel bir olaydır. Kalsiyuma bağımlı bir hücre adezyon molekülü olarak, E-kadherin epitel dokularında eksprese edilir. SNAI1, SNAI2 (SLUG), ZEB1, ZEB2 ve TWIST'in, EMT'de E-kadherin ekspresyonunu baskılayan kritik transkripsiyon faktörlerinden olduğu bilinmektedir. STAT3'ün aşırı ekspresyonunun, ZEB1 ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı ve buna bağlı olarak E-kadherin ekspresyonunu azalttığı ve N-kadherin, vimentin ekspresyonunu arttırdığı belirtilmiştir (16) (17).

Diyabetik kataraktlı insan lens epitel hücrelerinde IL6/JAK2/STAT3 sinyal kaskadının başlattığı, SNAI1, SNAI2 (SLUG), ZEB1 ve TWIST ekspresyon artışına bağlı E-kadherin kaybı ve N-kadherin artışı ile sonuçlanan diyabetik katarakt EMT'si üzerine çalışma henüz yapılmamıştır. Bu çalışmada diyabetik kataraktlı insan lens epitel hücrelerinde IL6/JAK2/STAT3 sinyal aktivasyonu sonucu artan transkripsiyon faktörlerine bağlı N-kadherin artışı ile sonuçlanan EMT'nin ve lens epitel hücrelerinde EMT'ye bağlı bazal membran kalınlığındaki artışın gösterilmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

LENS

Lens Anatomisi

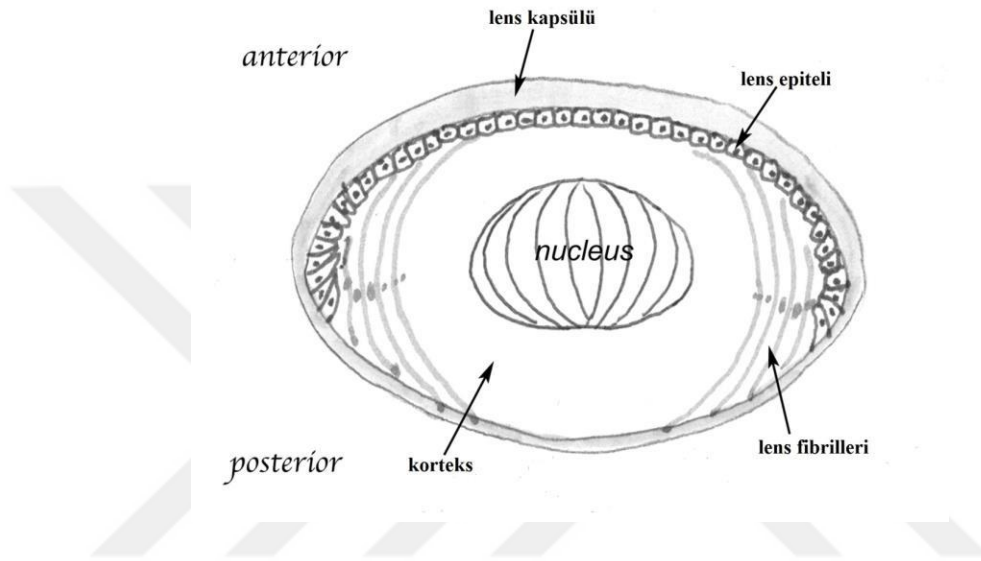
Yetişkin bir insanın göz merceği, asimetrik sferik bir yapıya sahiptir ve içerisinde sinir, damar ve bağ dokusu bulunmaz. Merceğin ön yüzeyi, arka yüzeyine göre daha az konvektir, bu nedenle mercek, bikonveks bir yapı sergiler. Merceğin ön ve arka yüzeylerinin tepe noktalarına ön-arka kutup denir ve bu noktaları birleştiren hayali çizgiye anteroposterior aks adı verilir. Ön ve arka yüzeyler, kenar kısımlarda birleşir ve bu birleşme noktasına ekvator denir. Ekvatorun çapı genellikle ortalama 8.8 ile 9.2 mm arasındadır. Ekvator aksı ile kutup aksı birbirine dik olarak yer alır (18).

Lens, anatomi itibariyle iris ve pupillanın arkasında, vitre önünde bulunan patellar fossa adı verilen bir alanda konumlanır. Ön kısmı hümör aköz sıvısı ile temas halindedir, arka kısmı ise vitre ile bağlantılıdır. Lensin ön yüzü ile kornea arasında yaklaşık 3.5 mm'lik bir mesafe bulunmaktadır. Arka yüzeyi, ligamentum hyaloidocapsulare olarak adlandırılan bir bölge ile vitre ile temasta bulunur. Lens kapsülü ile vitreusun hyaloid yüzü arasında ise Berger alanı adı verilen küçük bir boşluk mevcuttur.

Lensin stabilizasyonunu sağlayan temel yapı zonüler liflerdir. Bu lifler, lens ile processus ciliaris arasında uzanır ve siliyer cisim tarafından oluşturulur. Zonüler lifler, lensin ekvator bölgesine ve ekvatorun 1-2 mm ön ve arka kısmına yapışır, lens kapsülünün içine doğru uzanırlar. Ön lifler, 1 mm daha öne doğru yapışır. Ekvatoryal zonüler lifler, lensin uyumlu hareketini sağlarken, ön ve arka zonüler lifler lensin stabilitesine destek olur (19).

Lens, hayat boyunca büyümeye devam eder. Doğumdan itibaren yetişkin yaşlara doğru ilerledikçe, ekvatoryal çapı 6 mm'den 9 mm'ye, ön-arka çapı ise 3-3.5 mm'den 4-4.5 mm'ye

artar. Bu büyüme ile toplam lens ağırlığı da 90 mg'dan 225 mg'a çıkar. Yaşlanma süreci boyunca lens korteks kalınlığı da bir artış gösterir. Akomodasyon olmadığı durumda, gözün 60 D'lik ışığı kırma gücünün 15-20 D'si lens tarafından sağlanır (20). Geriye kalan 40 D'lik refraksiyon ise kornea tarafından gerçekleştirilir. Ek olarak, lensin kırıcılık indeksi merkezde 1.4 D iken, dış kısımlarında 1.36 D'dir (21).



Şekil 1. Lens ve temel bileşenleri (22).

Lens Histolojisi

Lens histolojik olarak üç bölümden oluşur: Kapsül, lens epiteli ve lens fibrillari.

Kapsül: Kapsülün dış tabakası, lensin doğal formunu muhafaza edebilmesi amacıyla aselüler bir elastik zarla çevrilidir. Kapsül, diğer bazal zarlardan farklı olarak sürekli bir kalınlaşma yeteneğine sahiptir ve bu özelliğiyle insan vücudundaki en kalın bazal zar olarak bilinir. Lens kapsülünün en kalın bölgesi, santral ekvatoryal bölgede yer alır ve yaklaşık 23 µm kalınlığındadır. En ince kısım ise arka kutupta bulunur ve yaklaşık olarak 4 mikron kalınlığındadır (22). Yenidoğan döneminde ön kapsül 8 µm kalınlığındayken, erişkinlikte bu kalınlık 14 µm'a ulaşabilir. Öte yandan, arka kapsül merkezi sabit bir kalınlığa sahiptir ve tüm yaşam boyunca 4 µm olarak kalır. Bu yapı, anteriorda lens epiteli tarafından, posteriorda ise lens lif hücreleri tarafından oluşturulur. Lens kapsülü, art arda eklenmiş lamellerden meydana gelir. Bu lameller, tip 4 kollajen, heparin sülfat, laminin ve fibronektin gibi bileşenleri içermektedir. Lens kapsülü, akomodasyon sırasında meydana gelen değişikliklere uyum

gösterir. Bu kapsül, kapillerlerden daha geçirgen bir yapıya sahiptir. Yaklaşık 70 kDa büyüklüğüne kadar olan proteinleri ve küçük molekülleri geçirebilir. Bu özellik sayesinde, lensin metabolizması için gerekli olan su ve elektrolit alışverişini sağlar (23, 24).

Lens epiteli: Lens epiteli, ön kapsülün altında tek sıra halinde düzenli bir şekilde uzanmıştır. Bu hücreler, bazal yüzeyleri ile ön kapsüle sıkıca yapışır ve ön yüzeyleri, uzayan lif hücreleri ile komşuluk içindedir. Bu hücreler metabolik olarak aktiftirler. Lens epitelinin komşu hücreleri ile temas halindeki yüzeyleri oldukça kıvrımlıdır. İki komşu epitel hücresi arasında desmozom ve zonula okludens gibi sıkı bağlantılar bulunur. Desmozomların ek bir görevi, mekanik stresin vimentin adı verilen bir ara filament aracılığıyla dağıtılmasını sağlamaktır. Bu sıkı bağlantılar, makromoleküllerin giriş çıkışını kontrol eder. Epitel hücresinin iskeleti temel olarak üç yapıdan oluşur; mikrofilyamentler (aktin), mikrotübüller (tubulin) ve ara filamanlar (vimentin). Bu iskelet yapılarının temel görevleri, hücrelerin şekil ve hacmini korumak, hücre bölünürken kromozomların hareketini sağlamak, ayrıca hücre üzerindeki mekanik stresin dağılımını sağlamaktır. Lens epitel hücrelerinin proliferasyon yeteneği, farklı bölgelerde değişiklik gösterir. Ekvatoryal bölgede bulunan hücrelerin proliferasyon yeteneği en fazla olanlardır. En yoğun hücreler, santral kısımda bulunur ve genellikle proliferasyon göstermezler. Bu hücreler, en büyük epitel hücreleri arasında yer alır. Pregerminatif bölgedeki hücreler ara sıra proliferasyon gösterirken, germinatif bölgedeki hücreler sürekli olarak proliferatif bir durumda bulunurlar ve yaşam boyunca yeni lif oluşumu ve lens hacminin korunmasından sorumludur. Lens lif hücrelerine dönüştükçe, protein miktarı artar ancak nükleus, mitokondri gibi organeller kaybolur. Bu değişikliklerle birlikte, lensten geçen ışığın saçılımı ve emilimi azalır, bu da ışığın lensin içinden daha rahat iletilmesine olanak tanır (21).

Lens fibrilleri: Lens lifleri, ekvatoryal lens epitel hücrelerinin uzamasıyla oluşur. Bu hücreler ortalama bir ömür boyunca 200 milyon lens fibrili üretirler. Hücreler bölündükten sonra uzamaya başlar ve U şeklinde bir kıvrılma gösterirler. En eski lif hücreleri en santral bölgede yer alır ve içlerindeki arasında en eskileri, embriyonik dönemden kalma lens nükleusu lif hücreleridir. Bu hücreler embriyonel dönemde oluşup lens merkezinde devamlılığını sürdüren hücrelerdir. En yeni hücreler ise en dış kısımda yer alır ve lens korteksini oluştururlar.

Yeni lif hücreleri oluştuğunda, eski lifler içeri doğru gömülür ve hücrelerin nükleusları anteriora doğru yer değiştirir. Bu durum, yeni liflerin nükleuslarının daima daha posteriora yer almasına ve lensin kavsini oluşturmaya neden olur. Ortalama olarak, 65 yaşındaki bir yetişkinin lensinin %65'i nükleus ve %35'i korteks haline gelir. Nükleus ve korteks arasında belirgin bir morfolojik fark bulunmamaktadır.

Diferansiyasyon sürecinde oluşan yeni lens fibrilleri, lensin diğer tarafından uzanan lens fibrilleri ile ön ve arka orta hatta buluşana kadar, posteriorda kapsül altında, anteriorda ise epitel altında uzarlar. Bu durumda, karşı kutuplardan uzayan lens fibrillerinin apikal ve bazal uçları arasında "sütür" adı verilen birleşim bölgeleri meydana gelir. Apikal hücrelerin uzantıları anterior Y sütürünü, bazal hücrelerin uzantıları ise posterior Y sütürünü oluşturur. Lens lifi hücreleri sütürlere vardıklarında uzamaları durur; bu aşamada tüm membran bağımlı organellerini kaybederler. Bu durum, ışığın lensten geçerken saçılmasını engeller.

Lens Fizyolojisi ve Biyokimyası

Bir insanın ortalama lensinin ağırlığının %65'i su, %33-34'ü protein, %1'i aminoasit, karbonhidrat, lipit ve elektrolitlerden oluşur. Bu lensin protein içeriği, diğer vücut dokularından daha yüksektir (25). Lens içindeki proteinler, suda çözünen (sitoplazmik) ve suda çözünmeyen (plazma membranı ve hücre iskeleti) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Suda çözünen proteinler, kristalinleri oluşturur ve toplam lens proteinlerinin %90'ını temsil eder (26). Kristalin proteinleri iki ana gruba ayrılır: alfa (α) ve beta (β)-gamma (γ) kristali. β ve γ proteinleri benzer dizilişlere sahip oldukları için β - γ kristalinleri olarak adlandırılır (27). Alfa kristalinler, lens proteinlerinin yaklaşık %32'sini oluşturur ve lensteki en ağır proteinlerdir. Ortalama ağırlıkları 600 kDa'dır. Lens içindeki alfa kristalinler, epitel hücrelerinin lens fibrillerine evrimleşmesinde önemli bir rol oynarlar. Suda çözünen proteinlerin %55'ini β kristalinler oluşturur. γ kristalinler ise çok küçük bir yapıya sahiptir (20 kDa) ve miktarları diğer kristalinlere göre daha düşüktür. Alfa kristalinler diğer kristalinlerden farklı olarak göz dışında da bulunabilirler (28).

Suda çözünemeyen proteinler, hücre membranın ve hücre iskeletinin yapısında yer alır. Suda çözünemeyen proteinler ürede çözünebilenler ve ürede çözünemeyenler olarak iki ana gruba ayrılır. Ürede çözünebilenler ana hücresel çatıyı oluştururlar. Ürede çözünemeyenler lens fibrillerinin plazma membranlarını oluştururlar. Bu proteinler, Membran İçi Proteini (MIP) dahil olmak üzere membran proteinlerinin yarısını oluşturur. Bu proteinler lense özgüdür ve diğer dokular için antijenik yapıya sahiptir.

Yaşla birlikte, lensin içindeki polipeptidlerde bozulma, erime ve sülfidril gruplarında azalma gibi değişiklikler meydana gelir. Bu durum, lens proteinlerinin suda çözünmez hale gelmesine ve agregatların oluşmasına neden olur. Sonuç olarak, lensin şeffaflığı azalır ve ışığın saçılmasına neden olan faktörler ortaya çıkar. Embriyonik dönemde daha yoğun olan lens, yaşla birlikte şeffaflığını kaybeder. Kornea, 295 nm dalga boyu altındaki ışınları absorbe ederken, lens 295-400 nm arasındaki ışınların büyük bir kısmını absorbe eder. Ancak, 400-1000 nm arası

ışınlara karşı geçirgendir. Mavi (440-500 nm) retina önünde, kırmızı ışık (620-770 nm) ise retina arkasında, sarı ışık ise (570-595 nm) retinada odaklanır.

Lenste en yüksek metabolik aktiviteye sahip olan hücreler, epiteldeki ve dış korteksteki hücrelerdir. Hümör aköz, lens için bir besin kaynağı deposu görevi görür ve atık maddelerin depolanmasına yardımcı olur. Lensin sadece ön yüzü aközle temas halindedir. Merkezdeki yaşlı ve eski hücrelerin dış ortamla bağlantısı, ara bağlantılar (gap junction) aracılığıyla sağlanır.

Enerji mekanizması: Lensin enerji üretimi glukoz metabolizmasına bağlıdır. Glukoz, lense basit difüzyon ve kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla alınır. Lens içinde, glukoz temel olarak anaerobik, aerobik (Krebs siklusu) ve Hekzos Mono Fosfat (HMP) yoluyla enerji üretiminde kullanılabilir. Lenste enerji metabolizmasının %80'i anaerobik yolla sağlanır. Anaerobik yolda, her bir glukoz molekülü iki Adenozin Trifosfat (ATP) üretimi sağlar. Bu süreçte oluşan laktik asidin bir kısmı, aerobik yol olan Krebs siklusunda kullanılır. Geriye kalan kısmı ise ön ve arka kamara sıvısı ile gözden ayrılır. Diğer taraftan, Krebs siklusunun gerçekleştirdiği aerobik glukoz metabolizması ile her bir glukoz karşılığında 38 ATP molekülü üretilir. Aerobik glukoz metabolizması, lensin sadece epitel tabakasında gerçekleşir. Oksijen açısından zengin ön kamara sıvısı, lensin ön yüzünden geçerken, gerekli olan oksijeni epitel hücresine aktarır.

Enerji üretilmesi için kullanılan diğer yol HMP yoludur. HMP yolu ile çok az miktarda ATP üretilir ancak bu yol ile oluşan Nikotin Adenin Dinükleotid Phosphat (NADP), lensin sorbitol yolu ve glutatyon redüktaz sentezi için kullanılır.

Bir diğer yol sorbitol yolu olup enerji üretiminin yaklaşık %5'i bu yol ile karşılanır. Burada glukoz önce aldoz redüktaz ile sorbitole dönüşür, daha sonra da alkol dehidrogenaz ile fruktoza çevrilir. Sorbitolün metabolizmasında bir bozukluk meydana gelirse ve sorbitol lens içinde birikirse, osmotik etkisi nedeniyle lensin su çekmesine ve şişmesine neden olur. Bu durumun diabetik katarakt oluşumunda önemli bir etkisi olduğu belirtilmiştir. Yaşlanma süreci ile hekzokinaz azalabilir ve bu da enerji üretiminde azalmaya yol açabilir. Aynı zamanda elektrolit metabolizmasının kontrolü de zorlaşabilir.

Sıvı-elektrolit dengesi: Yetişkin bir insanın lensinin toplam ağırlığının %66'sını su oluşturur. Bu suyun %80'i genellikle lens kapsülünde bulunur. Ancak, nükleusa doğru ilerledikçe bu oran azalır. Lens içindeki sıvı dengesi büyük ölçüde sodyum (Na) ve potasyum (K) iyonlarına bağlıdır. Na-K ATPaz yoluyla sağlanan enerji ile, lens epitel hücrelerinde aktif bir pompa çalışır. Bu mekanizma sayesinde, epitel katmanında Na dışarı çıkarken, K içeri doğru hareket eder. Lens içindeki Na/K dengesini sağlanması için arka kapsülden pasif difüzyon yoluyla Na lens içine girerken, K lens dışına çıkar. Bu işlem, lensin normal fonksiyonlarını

sürdürebilmesi ve saydamlığını koruyabilmesi için önemlidir. Ancak, Na-K pompası hasar alırsa, osmotik denge bozulabilir. Bu durumda, hücreler su ile şişer ve lensin saydamlığını yitirir [23].

KATARAKT

Katarakt, göz merceğinde lokal veya yaygın opasite artışıdır. İleri yaşlarda, lensin epitel hücreleri düzleşir ve çoğalma hızları azalır. Bu durum epitel yoğunluğunun azalmasına neden olur (29). Aynı zamanda, lens kapsülü de zaman içinde kalınlaşır. Bu değişiklikler, göz merceğinin saydamlığını azaltarak katarakt oluşumuna neden olur (30).

Deneyisel kataraktlarda gözlenen en erken elektron mikroskopik değişiklikler, epitelyal ve genç yüzeysel kortikal hücrelerin vakuolizasyonudur. Lens liflerinin başlangıçta şişmesi, su içeriğini artırır; ancak katarakt geliştikçe, su içeriğinde azalmaya neden olur. Potasyum, muhtemelen hücre zarlarındaki iyon pompalarının bozulmasının bir sonucu olarak, katarakt ilerledikçe kaybedilir. Kataraktlarda, kalsiyum içeriği artar, oksijen tüketimi azalır ve askorbik asit miktarı düşer; aynı zamanda, glutatyon seviyeleri sıfıra yaklaşır. Katarakt geliştikçe, özellikle çözünür protein miktarında azalma ve albüminoidlerde artış gözlenir. Bu mekanizmanın en belirgin örneği nükleer kataraktır (31).

Katarakt oluşum mekanizması tam aydınlatılamamıştır, ancak gelişimindeki bazı risk faktörleri bilinmektedir.

Yaş: Katarakt oluşumunda en önemli risk faktörü olup 70 yaşındaki bir bireyde katarakt riski, 50 yaşındaki bireye göre 13 kat daha fazladır (32).

Cinsiyet: Kadınlarda katarakt insidansı erkeklerden daha yüksektir. Bu durum kadınlarda postmenopozal dönemdeki östrojen eksikliğine bağlanmıştır (33).

İrk: Siyah ırkta, beyaz ırka göre kortikal ve nükleer katarakt daha sıklığı daha fazladır (34).

Diyabet: Uzun süreli diyabet hastalarında katarakt gelişim riskinin arttığı görülmüştür. 70 yaşından önce bu artış daha fazla iken, 70 yaşından sonra bu oranda bir azalma meydana gelmektedir (7).

Sigara ve alkol: Sigara içenlerde riskin 2-3 kat arttığı gösterilmiştir. İçilen sigara miktarındaki artış ile nükleer opasite oluşma miktarının artması ilişkilendirilmiştir. Sigarada bulunan bazı maddeler, oksidasyona yol açarak katarakt gelişimine yol açar. Alkol direkt toksik etki ile ve oksidasyona neden olarak katarakta yol açabilmektedir (33).

Beslenme: A vitamini, tiamin, niasin ve riboflavin gibi bazı vitamin eksiklikleri, katarakt riskinin artması ile ilişkilendirilmiştir (35, 36). Antioksidan olarak görev yapan E ve

C vitamini ile antioksidan aktivite için gerekli çinko, bakır ve selenyum gibi minerallerin az alınması katarakt riskini artırır (37).

Aile hikayesi: Aile öyküsünün katarakt riskinde artışa yol açtığı tespit edilmiştir (38).

İlaçlar: Başta sistemik steroidler olmak üzere topikal, inhaler ve krem steroidler de katarakt ile ilişkilendirilmiştir. Steroide bağlı katarakt mekanizması tam olarak bilinmemektedir, ancak ozmotik denge bozukluğu, oksidatif strese bağlı hasar ve lens büyüme faktörlerinin inhibisyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir (33). Fenotiazinler, kanser ilaçları, miyotik kolinerjikler, fotosensitif ilaçlar, trankilizanlar, diüretikler ve gut mediatörleri de katarakt oluşumunda etkisinin olduğu gösterilen ilaçlardır (39, 40).

Radyasyon: Ultraviyole radyasyonun, senil katarakt ile ilişkilendirildiği pek çok araştırma bulunmaktadır. Kızılötesi ışınlar, özellikle arka subkapsüler katarakt ve eksfoliasyon sendromuna neden olabilir. Ayrıca, X ışınları ve gama ışınlarına maruz kalma, katarakt gelişimiyle bağlantılıdır. Radyasyona maruziyet, genellikle birkaç aydan birkaç yıla kadar değişebilen bir latent döneme sahiptir ve radyasyona maruz kalan teknisyenler, malignite tedavisi gören hastalar ve nükleer santrallerde çalışanlar gibi yetersiz korunmuş bireylerde katarakt gelişme riski daha yüksektir (33).

DIYABETES MELLİTUS

Diyabetes Mellitus (DM), pankreasın beta hücrelerinden salgılanan insülin hormonunun eksikliği veya periferik reseptörlerdeki insülin duyarsızlığı nedeniyle gelişen bir metabolik ve sistemik hastalıktır. Bu durum, kan glukoz seviyelerinde yükselme, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluk, kapiller membran değişiklikleri gibi etkilere neden olur. DM, kronik seyirli bir hastalık olup, makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlara yol açabilir (41).

Koroner arter hastalığı, periferik arter hastalığı ve serebrvasküler hastalık makrovasküler komplikasyonlar arasında yer alırken; diyabetik retinopati, nefropati, nöropati ve kardiyomiyopati mikrovasküler komplikasyonlar arasında yer alır.

Diyabetik Retinopati

Diyabetik Retinopati (DRP), Diyabetes Mellitus'un en yaygın mikrovasküler komplikasyonudur. Çalışma çağındaki popülasyonda önlenebilir körlüğün en önemli nedenlerinden biri olarak ortaya çıkar (42). 2010 yılında, yaklaşık 285 milyon kişiye diyabet tanısı konulduğu ve bu hastaların en az %30'unda DRP bulgularının geliştiği bildirilmiştir (43). Şu anki verilere göre, diyabet hastalarındaki DRP gelişenlerin yaygınlık oranı %34,6

düzeylerinde iken, gelişmiş ülkelerde bu oran %40,3'e yakındır (44). Diyabet hastalığının süresi diyabetik retinopati gelişmesindeki en önemli risk faktörüdür. 2 yıldan daha kısa süreli tip 1 diyabeti olan hastalarda DRP insidansı %2 iken, 15 yıl ve üzeri süredir tip 1 diyabeti olan hastalarda DRP insidansı %98'e çıkmaktadır. İnsülinli veya insülinli tedavi alan tip 2 diyabet hastalarında 5 yıllık sürede DRP gelişme insidansı %20 iken, 15 yıllık sürede DRP gelişme insidansı %80'dir. Düşük glisemik kontrol, yüksek arteriyel kan basıncı, uyku apne sendromu, nefropati gelişimi, lipid parametrelerinde düzensizlik, gebelik de DRP gelişimine neden olabilecek diğer risk faktörleridir (45).

Diyabetik retinopati patogenezi: Diyabete bağlı olarak ortaya çıkan kronik hiperglisemi, DRP'nin ilerlemesinin temel sebebidir (46). Kontrolsüz hiperglisemi durumu, aldoz redüktaz yolunun aktive edilmesine, sorbitol birikimine, protein kinaz C aktivasyonuna, AGE'lerin oluşumuna, oksidatif strese ve anjiyojenik yolların aktivasyonuna yol açar. Bu alternatif yolların normoglisemik koşullarda aktivitesi, genellikle önemsenmeyecek kadar düşük düzeydedir. Ancak, diyabete bağlı kan glukoz seviyelerinin yükseldiği durumlarda bu alternatif yolların etkinliği artar. Bu durumda vücutta oksidatif stres oluşumu, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi tetiklenir ve diyabetin komplikasyonları ortaya çıkar. ROS seviyelerinin artması ve antioksidan moleküllerin azalması, inflamasyonu artırarak oksidatif stres için elverişli bir zemin oluşturur ve sonuç olarak vücutta DRP gibi uç organ hasarı komplikasyonları meydana gelir (47, 48).

1.Sorbitol (Poliol) yolu: Retina hücrelerinde, hücre içindeki glikoz heksokinaz tarafından işlenir. Diyabete bağlı olarak, hücre içi glikoz seviyeleri heksokinazın doyumunu aşacak kadar yükselir. Bu durumda, artan glikoz miktarı sorbitol (poliol) yoluna yönlendirilir (46). Aldoza redüktaz (AR) enzimi, hücre içindeki fazla glikozu sorbitole dönüştürür. Bu dönüşüm aşamasında Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), AR'nin kofaktörü olarak görev yapar, bu da glutatyon redüktazın etkisinin azalmasına neden olabilir. Oluşan sorbitol, daha sonra sorbitol dehidrojenaz (SDH) ile reaksiyona girerek fruktoza dönüşür. Fruktoz ise daha sonra fruktoz-3-fosfata fosforile edilebilir veya 3-deoksiglukozona dönüştürülebilir (49). Ayrıca sorbitol hücre dışına taşınmadığı için osmotik hasar nedeniyle hücre apoptozuna neden olur. SDH aktivitesindeki artış, tek başına reaktif oksidatif türlerinin artışına neden olabilir. Ayrıca, AR aktivitesindeki artış da NADPH tüketimini artırır. Bu durumun bir sonucu olarak glutatyon redüktaz aktivitesi azalır ve bu durum ROS'un etkisiz hale gelmiş formuna dönüşümünü azaltır. Sonuç olarak, retina hücrelerinde sitotoksik bir ortamın oluşma potansiyeli ortaya çıkar (49, 50).

2. Glikoliz ara ürünlerinin (AGE) artması: Normal koşullarda, vücutta glikoliz ara ürünleri (AGE) belirli bir konsantrasyonda tutulur [47]. Diyabet hastalarında, hiperglisemi sebebiyle AGE oluşumu belirgin bir şekilde hızlanır (49). AGE'ler, enzimatik ve nonenzimatik mekanizmalar aracılığıyla oluşabilir. Enzimatik yolla, proteinlerin lizin kalıntılarına bağlanabilen metilglisoksal gibi gliseraldehit-3-fosfatın bir ürünü olan bileşikler tarafından AGE oluşturulabilir. Nonenzimatik yolla ise glikoz, proteinlerin lizin kalıntılarına doğrudan bağlanarak AGE'leri oluşturabilir (51). AGE'ler NADPH oksidazı aktive ederek süperoksit oluşumuna katılabilir ve prooksidan moleküllerin oluşumundaki yolların içinde yer alarak oksidatif stresin oluşumuna neden olabilirler (52).

3. Heksozamin yolağı: Hiperglisemi durumunda, kandaki fazla glikozun bir kısmı heksozamin yoluna yönlendirilir. Heksozamin yolunun aktivitesindeki artış, glikozamin-6-fosfatın oluşumuna neden olur. Oluşan glikozamin-6-fosfat, glikoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesini inhibe eder (53). NADPH, asıl üretildiği yer olan pentoz fosfat yolu üzerinden elde edilir. Bu molekül redüktandır ve aynı zamanda glutatyon redüktaz ve katalaz gibi enzimlerin kofaktörü olarak antioksidan yapımında görev alır. Bu nedenle, NADPH miktarındaki azalma, oksidan/antioksidan dengesinin bozulmasına yol açabilir (54).

4. Protein kinaz C yolağı: Kronik hiperglisemiye bağlı olarak artan bir yoldur. Protein kinaz C (PKC) aktivitesinin arttığı durumlarda hücrelerde kontrolsüz büyüme olabilir. Hiperglisemi, dokulara glikoz girişini artırır. Bu artan glikoz, gliseraldehit-3-fosfata dönüşür ve ardından gliserol fosfata. Gliserol fosfat, diaçilgliserol'ün (DAG) prekürsörü olduğu için, hücre içindeki DAG miktarını artırır. Artan DAG, PKC enzim ailesini uyarır. PKC yolağının aktivasyonu, vasküler geçirgenlik artışına, sitokin üretiminde artışa ve bazal membran kalınlaşmasına neden olur. Bunlar diyabetin komplikasyonları ile ilişkilidir. NADPH oksidaz enzimi, NADPH'ın NADP'ye oksidasyonundan sorumludur.. Bu enzim, birçok hücrede ROS oluşumunda görev alır. PKC yolu aracılığıyla, NADPH'ın fosforilasyonu ve membran translokasyonu sağlanarak NADPH aktif hale getirilir (55).

5. Gliseraldehit oto-oksidasyon yolağı: Gliseraldehit 3-fosfat, fruktoz 1,6-fosfattan türetilen bir ara metabolit olup; hiperglisemik koşullarda, GADPH enzim aktivitesi baskılandığı için hücre içinde birikir. Artan gliseraldehit 3-P'nin hücre içinde oto-oksidasyonu sonucu, α -ketoaldehitler ve hidrojen peroksit gibi toksik iki ürün meydana gelir. Bunlar AGE ve hidroksil radikallerinin oluşumuna neden olurlar (56).

6. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF): VEGF, diyabetik retinopati bulgularının ortaya çıkmasına neden olan faktörlerden bir tanesidir. VEGF protein ailesinden olan VEGF-A, VEGF reseptörü 1'e (VEGFR1 veya Flt-1) ve VEGF reseptörü 2'ye (VEGFR2

veya KDR/Flk-1) bağlanarak anjiyogenezise ve vasküler geçirgenliğin artışına aracılık eder. Bunun sonucunda iç kan-retina bariyeri bozulur, retinada ödem ve mikrohemoraji oluşur. VEGF, inflamasyon bölgesinde vasküleritenin artmasına neden olarak proinflamatuvar mediyatörleri inflamasyon bölgesine çeker ve inflamatuvar reaksiyonun şiddetini artırır. Artan inflamatuvar yanıtın akut dönemde faydalı olabileceği kabul edilebilir. Ancak, eğer bu durum kronikleşirse, hücrelere ve organlara zarar verebilir. Uzun dönemde metabolik stresin artışına, ödeme, immün sistem hücrelerinin invazyonuna ve skar oluşumuna neden olarak retinada kalıcı hasara sebep olabilir (57).

7. İnflamasyon: DRP'deki retina hasarının nedenlerinden biri, sitokinler ve lökositlere bağlı düşük dereceli kronik inflamasyondur (58). İnflamasyona bağlı değişiklikler; vasküler geçirgenlikte artış, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödem, hücre apoptozu, anjiyojenik faktörlerin ekspresyonu ve neovaskülarizasyon gibi faktörleri içerebilir. Diyabetik hastaların retinasında, hastalığın erken evrelerinden itibaren inflamatuvar değişiklikler gözlemlenebilmektedir. Damar endoteline bağlanan makrofajlar, monositler, nötrofiller ve mikroglialar kan-retina bariyerinin bozulmasına, kapiller damarlarda oklüzyona ve endotel hücre ölümüne yol açabilirler (59). Monosit kemotaktik protein 1 (MCP-1), tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), makrofaj inflamatuvar protein 1- α (MIP-1 α) ve makrofaj inflamatuvar protein-1 β (MIP-1 β), interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8) ve interlökin-1 β (IL-1 β) gibi proinflamatuvar sitokinlerin salgılanması indüklenir. Bu sitokinler, diyabetik retinopatinin meydana gelmesinde ve progresyonunda etkin bir rol oynarlar. Proinflamatuvar sitokinlerin vücuttaki düzeylerindeki artışı, diyabetik retinopatinin şiddetindeki artışla ilişkilidir (60).

Diyabetik retinopati, daha önce tamamen mikrovasküler bir hastalık olarak kabul edilirken, şu anda retina mikrosirkülasyonunda değişikliklere neden olan kronik inflamatuvar bir hastalık olarak görülmektedir. Hiperglisemiye yanıt olarak retina glial hücrelerinde proinflamatuvar sitokinler üretilir. Bu süreçte Kaspaz-1 aktive olur ve bu süreç Müller hücrelerinin ölümüne neden olan IL-1 β üretimine yol açar (59).

IL-6, proinflamatuvar bir sitokin olup, monositlerin ve T lenfositlerin infiltrasyonunda doğrudan rol alabilir. Aynı zamanda kronik inflamasyon ve miyofibroblast hücrelerinde aşırı aktivasyona neden olabilir. Bu süreç sonucunda ekstraselüler matriks içeriği artar ve fibrotik süreç hızlanarak retina dekolmanına neden olabilir (59, 61).

DRP hastalarının aköz hümör ve vitreus sıvıları üzerine yapılan çalışmalarda, bu sıvı içeriklerinde büyüme faktörleri ve inflamatuvar sitokinlerin yüksek düzeylerde bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, inflamatuvar süreçlerin DRP ile bağlantılı olduğunu düşündürmektedir (62, 63). Retinadaki hücrelerde nükleer faktör kappa B (NF- κ B)

aktivasyonu, proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α ve IL-1 β) ve adezyon molekülleri (ICAM-1, E-selektin gibi) seviyelerinin artmasına yol açar (64, 65). NF- κ B'nin ve inflamatuvar yolların aktivasyonu; perisit kaybına, vasküler permeabilitenin artmasına ve mikroanevrizmaların oluşmasına neden olur. Bu süreçlerin sonucunda retinopati gelişmektedir (64).

Diyabetik retinopati sınıflaması: 2003 yılında oluşturulan 'Uluslararası Diyabetik Retinopati ve Diyabetik Makula Ödemi Ağırılığı Ölçeği' DRP için son sınıflamadır. Buna göre:

- 1. Diyabetik retinopati yok (NRDM)**
- 2. Hafif dereceli Nonproliferatif DRP (Hafif NPDR):** Sadece mikroanevrizmalar mevcuttur.
- 3. Orta dereceli Nonproliferatif DRP (Orta NPDR):** Mikroanevrizmalar, yumuşak eksüdalar, hemorajiler, venöz boncuklanma, intraretinal mikroanjiopatiler gelişir. Ağır NPDR bulguları görülmez.
- 4. Ağır Dereceli Nonproliferatif DRP (Ağır NPDR):** Aşağıdaki bulgulardan herhangi biri mevcuttur:
 - Dört kadranda 20'den fazla intraretinal hemoraji
 - ≥ 2 kadranda venöz boncuklanma
 - ≥ 1 kadranda intraretinal mikrovasküler anomaliler
 - Proliferatif DRP bulguları olmaması
- 5. Proliferatif DRP (PDR):** Ağır dereceli NDRP'ye ek olarak aşağıdaki bulgulardan biri veya daha fazlası olması:
 - Neovaskülarizasyon
 - Vitre içi kanama
 - Preretinal kanama

Perisit kaybı, kontraktıl yapıların bozulmasına ve anevrizma gelişimine yol açar. Bu durumda mikroanevrizmalar meydana gelir. Genellikle mikroanevrizmalar, kapiller yatağın venöz uç kısmında görülür ve floresein anjiyografide (FA) hiperfloresan noktalar olarak tanımlanır. Mikroanevrizması olan ancak diyabetik retinopati gelişmeyen diyabet hastalarına yılda bir kontrol önerilirken, hafif DRP'si olan hastalarda ise 6-12 ay aralıklarla kontrol önerilir.

Mikroanevrizmalarda rüptür meydana gelirse, bu durum hemorajilere neden olabilir. Bu hemorajiler genellikle mum alevi tarzında veya kırmızı nokta şeklinde görülebilirler. Ayrıca,

dilate olmuş kapillerlerden veya mikroanevrizmalardan kaynaklanan lipoprotein sızıntısına bağlı olarak sert eksüdalar oluşabilir. Bu sert eksüdalar halkasal birleşme göstererek sirsine retinopatisini oluşturabilir. Retinal arteriyollerin uç kısmındaki sinir liflerinde meydana gelen odak iskemi sonucu yumuşak eksüdalar oluşabilir. Yumuşak eksüdalar genellikle sarımsı-beyaz renkte ve düzensiz sınırlıdır.

Venüllerdeki anevrizma benzeri genişlemeler, venöz boncuklanma olarak adlandırılır ve artmış iskemi belirtisi olabilir. İntraretinal mikrovasküler anomaliler (IRMA), diyabete bağlı olarak kapiller perfüzyonun zarar gördüğü bölgelerde oluşan, retinal arteriyoller ile retinal venüller arasında oluşan anormal şant damarlarıdır. Bu anomaliler genellikle intraretinal yerleşim gösterme eğilimindedir.

Neovaskülarizasyon ile IRMA'nın ayrımı FA ile yapılabilir. FA'da neovaskülarizasyon olan bölgelerde floreseinin sızıntısı gözlemlenebilir, ancak IRMA'da sızıntı görülmez. Orta dereceli nonproliferatif diyabetik retinopatisi olan hastalara 3-6 ay aralıklarla kontrol muayenesi yapılması önerilmektedir.

Ağır dereceli nonproliferatif diyabetik retinopatisi olan hastalar erken dönemde semptomsuz olabilirler. Ancak bu evrede makula ödemi gelişmişse görme kaybı ortaya çıkabilir. Bu evredeki hastalara kontrol amacıyla 3 aydan daha kısa aralıklarla muayene yapılması gerekmektedir.

VEGF salınımına bağlı olarak gelişen neovaskülarizasyon, proliferatif diyabetik retinopatinin en önemli bulgusudur. Hastalığın ilerlediğini gösteren bu neovaskülarizasyonlar, optik disk üzerinde veya disk çapının 1 birim çevresinde gelişmişse disk neovaskülarizasyonu (NVD) olarak adlandırılırken; 1 disk çapından daha uzak perifer bölgesinde gelişmişse, retina neovaskülarizasyonu (NVE) olarak adlandırılır. Tip 1 DM hastaların 15 yıllık takiplerinde %25 oranında proliferatif diyabetik retinopatiye ilerlediği saptanmıştır. Tip 2 DM hastalarda bu risk %16 düzeyindedir (66, 67).

DIYABETİK RETİNOPATİDE ÖNEMLİ MOLEKÜLER YOLAKLAR

Epitelyal Mezenkimal Transformasyon (EMT)

Epitel hücrelerinin epitel özelliklerinin azalabileceği ve mezenkimal özellikler kazanabileceği fikri, 1980'lerin başında, civciv embriyolarının ilkel çizgisinde epitelyalden mezenkimal fenotipe değişiklikleri tanımlayan Elizabeth Hay tarafından ortaya atılmıştır (68). Başlangıçta 'epitelyalden mezenkimal dönüşüm' olarak tanımlanan bu farklılaşma süreci artık

yaygın olarak epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) olarak bilinmektedir. Epitel hücrelerinin kısmen veya tamamen mezenkimal hücrelere dönüşme ve geri dönme yeteneği, epitelyal fenotipin esnekliğini gösterir.

EMT sırasında hücre şeklini tanımlayan ve gen ifadesini yeniden programlayan sinyal programlarında bir dizi değişiklik meydana gelir. Bunun sonucunda epitel hücreleri bağlantılarını ve apikal-bazal polaritelerini kaybeder; epitel hücre iskeletleri yeniden düzenlenir (16, 69). Doku ve sinyal bağlamlarına bağlı olarak epitel hücreleri yalnızca bazı özelliklerini kaybedebilir veya bazı epitelyal ve mezenkimal özellikler gösterebilir. Bu süreç boyunca, fibronektin, vimentin, düz kas aktin ve N-kadherin gibi mezenkimal hücre belirteçlerinin kazanımı ve E-kadherin ve α - ve γ -katenin gibi epitelyal hücre belirteçlerinin kaybı eşlik eder (70).

Epitelyal mezenkimal geçişin ilk adımları, sıkı bağlantı, aralık bağlantı, yapışık bağlantı ve desmozom gibi epitelyal hücre-hücre temaslarının parçalanması yoluyla hücre polaritesinin kaybıdır. EMT boyunca epitelyal genlerin ekspresyonu, mezenkimal gen ekspresyonunun aktivasyonu ile eř zamanlı olarak baskılanır. Epitelyal aktin mimarisi yeniden düzenlenir ve hücreler, hücre dışı matriks (ECM) proteinlerini parçalayabilen matriks metaloproteinazları (MMP) eksprese ederek hareketlilik ve istilacı kapasiteler kazanır. Mezenkimal-epitelyal geçiş (MET) süreci, EMT'ye tabi tutulan hücrelerin epitelyal duruma geri dönmesini sağlar (71). Fizyolojik doku bağlamına bağlı olarak üç tip EMT ayırt edilebilir. Tip 1 EMT embriyogenezde ve organ gelişiminde meydana gelir; tip 2 EMT doku rejenerasyonu ve organ fibrozisi için önemlidir; tip 3 EMT kanserin ilerlemesi ve kanser kök hücre özellikleri ile ilişkilidir (72-74). Birincil EMT'de, önceden EMT geçmişi olmayan ektodermal veya epitelyal hücreler mezenkimal hücrelere farklılaşır. İkincil EMT'de, halihazırda EMT'ye tabi tutulmuş ve epitel durumuna geri dönen hücreler yeni bir EMT sürecini başlatır (16). Benzer şekilde, yayılımın ardından kanser hücreleri MET aracılığıyla epitelyal bir duruma geri dönebilir ve bu da birincil tümöre benzer fenotiplere sahip ikincil karsinomların oluşumu ile ilişkilendirilir (75).

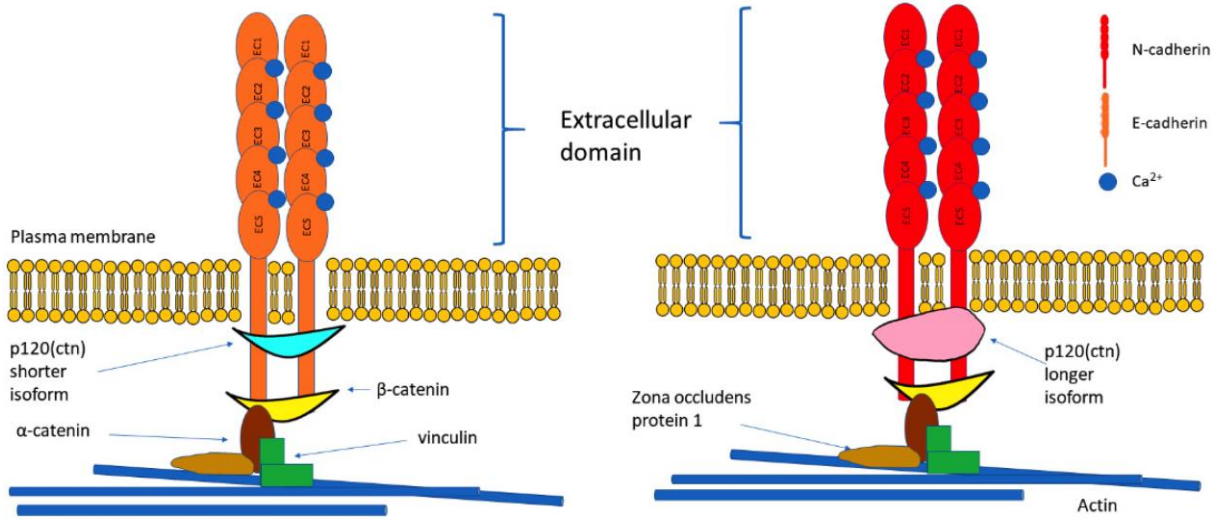
EMT'nin ayırt edici özelliği, yapışık bağlantıların dengesizleşmesini güçlendirmek için E-kadherinin aşağı regülasyonudur. Ek olarak, claudin ve okludin ile desmoplakin ve plakofilini kodlayan genlerin baskılanması, sırasıyla apikal sıkı bağlantıların ve desmozomların znmesine yol açar (76). Gen ifadesindeki bu değişiklikler, epitelyal hücre-hücre bağlantılarının yeniden oluşumunu engeller ve epitelyal bariyer fonksiyonunun kaybına neden olur (77). Epitelyal hücre bağlantı proteinlerini kodlayan genlerin baskılanmasına, mezenkimal yapışmayı destekleyen genlerin aktivasyonu eşlik eder. Spesifik olarak, E-kadherinin aşağı regülasyonu, mezenkimal N-kadherinin artan ekspresyonu ile dengelenir, bu da hücre

yapışmasını değiştiren bir 'kadherin anahtarı' ile sonuçlanır (78). Bu geçiş sayesinde, değişime uğrayan hücreler epitelyal hücrelerle ilişkilerini kaybeder ve homotipik N-kadherin etkileşimleri yoluyla mezenkimal hücrelere yönelik bir afinite kazanır. Bu etkileşimler homotipik E-kadherin etkileşimlerinden daha zayıftır ve hücre göçünü ve istilasını kolaylaştırır (79).

Takeichi tarafından ilk kez tanımlanan kadherinler, Ca^{2+} iyonlarına bağımlı olarak çalışan hücre yüzeyi molekülleri olarak bilinir. Bu transmembran protein ailesi, hücreler arasındaki sağlam yapışmayı sağlayarak birçok biyolojik süreçte kritik bir rol oynar (80). Kadherinlerin Ca^{2+} iyonlarına olan duyarlılığı, doğru konformasyonlarını sürdürmeleri ve işlevlerini gerçekleştirmeleri için gereklidir. Ca^{2+} iyonlarının eksikliği durumunda, kadherin molekülleri proteoliz yoluyla parçalanabilir, bu da hücreler arasındaki bağlantının zayıflamasına neden olabilir (81). Kadherin süper ailesi, farklı alt ailelerden (kadherinler, protokadherinler ve kaderinle ilişkili proteinler) gelen 114 kalsiyuma bağımlı membran proteinini içerir. Bu farklı alt aileler, hücre yapışması, gelişim, doku organizasyonu ve hücre migrasyonu gibi çeşitli biyolojik süreçlerde önemli roller oynar (82, 83).

Kadherinler, hücre-hücre yapışmasının düzenlenmesinde kilit bir rol alırlarken, aynı zamanda gelişim süreçlerinde de önemli katkılarda bulunurlar. Kadherinler, embriyonik gelişim, organ oluşumu ve doku farklılaşması gibi morfogenetik süreçlerde modülasyon sağlar (84, 85).

Klasik kaderinler, tek açıklıklı transmembran yapıya sahip olup, altta yatan aktin hücre iskeletine bağlanmak için sitoplazmik alanları aracılığıyla katenin ailesi üyeleriyle işbirliği yaparlar. Bu kadherinler, moleküler özelliklerine göre tip I ve tip II alt gruplara ayrılır (86). Tip I kadherinlerin homofilik yapışma mekanizması için geniş çapta kabul gören bir model, bir 'iplikçik-dimer' modelidir. Bu model, kadherin motifi yoluyla etkileşimlerin, EC1'in 'adezyon kolu' olarak bilinen altı adet yüksek oranda korunmuş N-terminal kalıntısını ve EC1 gövdesindeki korunmuş 'alıcı cebini' içeren bir trans etkileşim mekanizmasını içerir. Bu mekanizmada, bir kaderinden gelen yapışma kolu, karşı tarafın alıcı cebine girer (87).



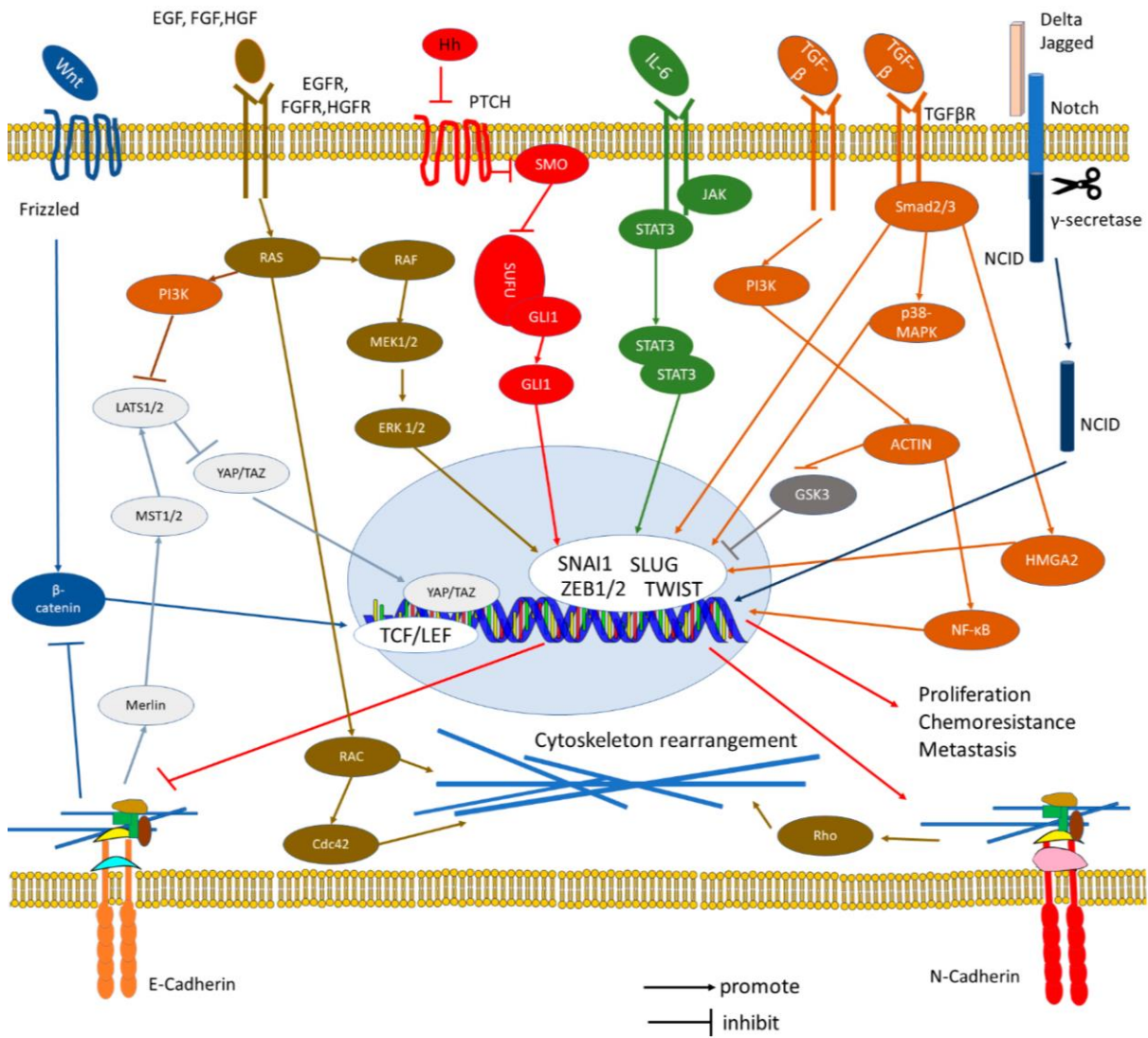
Şekil 2. E-kadherin ve N-kadherinin yapısı (88).

E- ve N-kadherin, P-kadherin, R-kadherin ve M-kadherin, tip I klasik kaderinlere ait olan bir grup transmembran proteindir. Bu kadherinlerin sitoplazmik kuyrukları, β -katenin ile bağlanan α -katenin'e bağlanarak kaderin-katenin yapışma kompleksini oluşturur (89). α -katenin ve β -katenin, F-aktin'e doğrudan bağlanamazlar, bu nedenle F-aktin ile etkileşim için vinculin, eplin veya zona okludens protein 1 (ZO1) gibi ek adaptörler gereklidir (90). Özellikle, E-kadherin adezyonlarıyla karşılaştırıldığında, N-kadherin adezyonları vinculin ile oldukça geniştir (91). Adherens bağlantıları, kadezom proteinlerinin translayon sonrası düzenlenmesi aracılığıyla kontrol edilir. Bu düzenleme süreci, serin veya treonin fosforilasyonu, tirozin fosforilasyonu ve proteolizi içermektedir. Ayrıca, transkripsiyon, translayon ve hücre içi trafik seviyeleri de bu bağlantıların düzenlenmesinde etkilidir (90).

E-kadherin, kadherin ailesinin önemli bir üyesidir ve epitel hücre fenotipinin korunmasında kritik bir rol oynar. Ayrıca, çeşitli sinyal yollarını modüle ederek dokuların homeostazını düzenlemede önemli bir işlev görür (92). E-kadherine kıyasla, N-kadherin daha yaygın olarak epitelyal olmayan dokularda bulunur ve farklı hücre tiplerinde, örneğin nöral hücreler, endotelyal hücreler, stromal hücreler ve osteoblastlar gibi çeşitli hücre tiplerinde ifade edilir (93, 94). N-kadherin, devam eden EMT bir göstergesi olarak işlev görür (95, 96). Adherens bağlantıları, aktin hücre iskeleti ile ilişkili kadherinleri içeren α -, β - ve γ -kateninlere bağlanarak oluşur (97). EMT sürecinde, E-kadherinin bölünmesi, yapışık bağlantıların dengesizleşmesine ve hücre proliferasyonunu destekleyen bir transkripsiyonel aktivatör olan β -katenin salınımına neden olabilir (78, 98).

EMT Sinyal Yolakları

EMT, SNAIL ailesinin üyeleri, TWIST ailesi ve ZEB ailesi dahil olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından desteklenir. SNAIL1, SNAIL2 (SLUG), ZEB1 ve ZEB2'nin, E-kadherin geninin promoter bölgesinde yer alan E-box dizilerine doğrudan bağlanarak transkripsiyonunu baskıladığı bildirilmiştir (92, 99, 100). EMT'yi indükleyen transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu, büyüme faktörü ve sitokin sinyalleme ile düzenlenir (101-103). Önemli EMT ile ilgili sinyal yolları arasındaki ilişki Şekil 3'te özetlenmiştir.



Şekil 3. EMT ile ilgili sinyal yolları (88).

Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β (TGF- β) yolağı: EMT'nin bir indükleyicisi olarak bilinmektedir. TGF- β sinyallerine hücrel yanıtı aktive etmek için tip 1 TGF- β reseptörünün (T β R1) tip 2 TGF- β reseptörü tarafından fosforile edilmesi gerekir (104). T β RI, kanonik TGF- β /Smad sinyalinin başlatılmasına yardımcı olan TGF- β sinyalleriyle aktive edilir ve ardından C-terminal fosforilasyonu yoluyla Smad2 ve Smad3'ü aktive eder. Fosforile edilmiş Smad2 ve Smad3, Smad4 ile kompleksler oluşturur ve hedef gen transkripsiyonunun inhibisyonunu veya aktivasyonunu başlatmak için çekirdeğe yer değiştirir. Smad3, doğrudan promotörlerine bağlanarak SNAIL ve SLUG'un transkripsiyonlarını aktive eder (105). ZEB proteinlerinin ekspresyonu da TGF- β tarafından dolaylı olarak modüle edilir (106). TGF- β ile aktifleştirilen Smad3/4 kompleksi, CDH2 promotöründe farklı bir Smad bağlama bileşeni ile etkileşim yoluyla N-kadherin ekspresyonunu yukarı yönde düzenler (107).

Mitojen Aktif Protein Kinaz (MAPK) yolağı: EMT'de TGF- β /Smad sinyalleşmesinin düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. TGF- β 1'in, vimentin ekspresyonunu arttırmak ve E-kadherin ekspresyonunu azaltmak için akciğer kanseri hücrelerinde p38, MAPK ve c-Jun N-Terminal Kinaz genlerini aktive ettiği gösterilmiştir (108). N-kadherin, JNK ile ilişkili lösin fermuar proteini (JLP) ile p38-MAPK arasındaki ilişkiyi engeller, böylece beyinde JNK'nin indüklediği p38-MAPK yolunu baskılar (109). Meme kanseri hücrelerinde p38 γ MAPK'nin, GATA Bağlayıcı Protein 3'ü antagonize ederek miR-200b ve Suz12'yi modüle ederek EMT'yi indüklediği kanıtlanmıştır (110).

Ras yolu inhibitörlerinin yüksek konsantrasyonuna sahip meme kanseri hücrelerinde, E-kadherin bağlantılarının yeniden yapılandırılmasının, E-kadherinin güçlendirilmiş ekspresyonunu ve MAPK yolunun inhibisyonunu gerektirdiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, Ras yolu veya MAPK yolunun tek başına inhibisyonun, E-kadherin bağlantılarının yeniden oluşmasında yeterli olduğu belirtilmiştir (111). Kolorektal kanserde, lösemi öncesi transkripsiyon faktörü 3'ün (PBX3), kanser hücrelerinin istilacılığını iyileştirmek için MAPK/ERK yolunu indüklediği bilinmektedir (112). Son zamanlarda, yüksek PBX3 ekspresyonunun, kolorektal kanserin EMT indüksiyonunda miR-200'ün dolaylı aracılığı ile Wnt aktivasyonu, SNAIL ve ZEB1 tarafından desteklendiği kanıtlanmıştır (113). Mide kanserinde yüksek PBX3 ekspresyonu, AKT sinyal yolu üzerinden EMT'yi teşvik ederek E-kadherin ekspresyonunda azalmaya; N-kadherin, vimentin ve MMP-9 ekspresyonunda artışa yol açmıştır (114).

JAK/STAT yolağı: Hücre çoğalması, farklılaşması, göçü ve apoptoz gibi çeşitli hücre fonksiyonlarını düzenler (115, 116). Genetik olarak ablasyona uğramış E-kadherin ve insan embriyonik böbrek hücrelerine sahip boş embriyonal kök hücrelerde N-kadherin ekspresyonu,

STAT3 aktivitesinde bir artışa neden olur. Cadherin-11 ve N-kadherin arasındaki homofilik etkileşimler hücre çoğalmasına, hayatta kalmasına ve göçüne yol açan STAT3'ün yukarı regülasyonundan sorumludur (117).

Kolorektal kanser hücrelerinde STAT3'ün yıkılması sonucunda, E-kadherin ekspresyonunda önemli bir artış ve N-kadherin ve vimentin ekspresyonunda azalma olduğu gösterilmiştir. STAT3'ün indüklediği kolorektal kanser hücre istilasının ve E-kadherin aşağı regülasyonunun ZEB1'e bağlı olduğunu ve ZEB1'in aşağı regülasyonu ile kurtarılabileceği belirtilmiştir (118). Bir anti-diyabetik ilaç olan metforminin, akciğer kanseri hücrelerinde IL-6 kaynaklı STAT3 aktivasyonunu ve EMT'yi baskıladığı kanıtlanmıştır (119).

Hedgehog (HH) yolu: Bu yolun anormal aktivasyonu, E- ve N-kadherinin yanı sıra diğer mezenkimal belirteçlerin ekspresyonunu değiştirerek çeşitli kanserlerde EMT'ye aracılık eder. Glioma İlişkili Protein (GLI1) ile dönüştürülmüş epitel hücrelerinde SNAI1 inhibisyonunun E-kadherin düzeylerini arttırdığı ve bunların bağlanmadan bağımsız büyüme yeteneklerini zayıflattığı kanıtlanmıştır (120). Ayrıca HH ve MAPK yolunun kanonik olmayan GLI1 aktivasyonunun, tiroid kanseri hücre hatlarında E-kadherin ekspresyonunun azalmasına yol açabileceği ve bunun daha sonra BRAF mutasyonunun indüklediği SNAI1 ekspresyonunu arttırabileceği belirtilmiştir (121). Bunun yanı sıra, Sonic hedgehog proteini (SHH)/GLI1 ekspresyonu, S100 gen ailesinin bir üyesi ve pankreas kanserinde önemli bir EMT moleküler belirteci olan S100A4'ün ekspresyon seviyesinde önemli bir artışa neden olurken, E-kadherini belirgin şekilde azaltmıştır (122). S100A4 geninin, EMT sırasında diğer mezenkimal belirteçlerle birlikte TWIST ve SNAI1'in ekspresyonunu yukarı regüle ettiği gösterilmiştir (123).

Wnt yolu: Genel olarak kadherinler, β -katenin'i T Hücre Faktörü (TCF) ailesi transkripsiyon faktörlerinden plazma zarına ayıran, Wnt yolunun negatif düzenleyicileri olarak kabul edilir. Wnt proteinleri hücre yüzeyindeki Frizzled ailesine bağlandığında Wnt sinyali başlatılır. Sinyal daha sonra sitoplazmik β -katenin'i stabilize etmek için çeşitli sitoplazmik bileşenleri aracılığıyla β -katenin'e dönüştürülür. Biriken β -katenin, Lenfoid Arttırıcı Faktör (LEF)/TCF proteinleri ile etkileşime girerek Wnt hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive etmek için çekirdeğe girer (124). Wnt sinyalleşmesinin EMT'yi desteklediği, N-kadherin, TWIST ve SLUG'u arttırdığı; E-kadherin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Azalan E-kadherin ekspresyonu, sitoplazmada daha yüksek β -katenin varlığına yol açar. Böylece LEF/TCF transkripsiyonel aktivitesinde ve Wnt sinyalleşmesinde artış meydana gelir (125, 126).

Wnt sinyali karmaşık mekanizmalar üzerinden düzenlenir. E-kadherin, N-terminal fosforilasyonunu indükleyerek β -katenin sinyalini inhibe eder. Fosforile edilmiş β -katenin, aksin-fosfodestruktür kompleksi yoluyla kaderin içeren hücre temaslarına lokalize olarak Wnt sinyalini sınırlar. Ayrıca, tirozin kinaz ve fosfatazlar da fosforilasyon bölgesine bağlı olarak kaderin-katenin kompleksini pozitif veya negatif olarak düzenler (127).

Hippo-YAP/TAZ yolağı: Hücresel proliferasyon ve apoptoz arasındaki dengeyi düzenleyerek organ boyutunu ve tümör oluşumunu düzenlemede çok önemli bir rol oynayan evrimsel olarak korunmuş bir sinyal yoludur. Hippo-YAP sinyali, EMT sürecini düzenleyerek E- ve N-kadherin ifadesini etkiler (128). Memelilerin klasik Hippo-YAP yolunda, MST1/2 kinazlar hidrofobik motifi fosforile eder ve ikinci bir Büyük Tümör Baskılayıcı Kinaz (LATS) 1/2 setini aktive eder (128, 129). Aktive edilmiş LATS1/2 daha sonra büyümeyi teşvik eden transkripsiyonel ortak aktivatör YAP1/TAZ'ı fosforile ederek bu proteinlerin sitoplazmada tutulmasına yol açar. Hippo-YAP sinyal yolunun inhibisyonu, YAP1/TAZ'ın çekirdeğe translokasyonunu teşvik eder, böylece aşağı yöndeki genlerin aktivasyonuna izin verir (130).

Genel olarak, α -katenin kadherinlerle doğrudan etkileşime girmez ancak β -katenin'e bağlanarak kadherin-katenin kompleksini aktin hücre iskeletine bağlar (130). E-kadherin, YAP nükleer lokalizasyonunu hücre yoğunluğuna bağlı bir şekilde düzenlemede çok önemlidir ve mekanizma, E-kadherin ile α - ve β -katenin etkileşimine bağlıdır. Hippo-YAP1 sinyalleşmesinin düzenlenmesinde E-kadherinin kendisi değil, kaderin-katenin kompleksinin yer aldığı bilinmektedir (131). Moesin-ezrin-radixin benzeri protein (Merlin), nükleer ihracat dizileri yoluyla fiziksel olarak etkileşime girebilir ve YAP/TAZ aktivitesini baskılayabilir. Merlin'in tükenmesi, hücrelerin YAP/TAZ nükleer lokalizasyonunun baskılanmasını azaltır (132). Benzer şekilde, Merlin'in ve onun adaptör proteini Na⁺/H⁺ değiştirici düzenleyici faktörünün (NHERF) tükenmesi, E-kadherin ligasyonu aracılı inhibisyonu aşağı yönde düzenler (131). Mide kanseri hücrelerinde SOX9, Hippo-YAP yolunu aktive ederek EMT'yi teşvik eder ve SOX9'un inhibisyonu, E-kadherin ekspresyonunu arttırmış ve N-kadherin, vimentin ve SNAIL gibi mezenkimal belirteçleri aşağı regüle etmiştir (133, 134).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu prospektif çalışmaya Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Mart 2023-Şubat 2024 tarihleri arasında katarakt cerrahisi yapılması planlanan 53 diyabetik retinopati bulgusu olan ve 26 diyabetik retinopati bulgusu olmayan hasta olmak üzere 79 hastanın gözü dahil edildi. Çalışma Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi ve iyi klinik uygulamaları gözetilerek yapılmıştır. Tüm katılımcılar onam alınmadan önce bilgilendirilmiş olup, çalışma öncesinde hastalara çalışmanın amacı ve yapılacak işlemler hakkında detaylı bilgi verildi. Çalışmaya başlamadan önce Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı (Etik Kurul Tarih: 22.05.2023, Karar No: 09/01). Bu çalışma 2023/134 nolu proje numarası ile Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Proje birimi (TÜBAP) tarafından desteklendi.

VAKA KATEGORİZASYONU

NRDM Grubu (Kontrol Grubu): Diyabet ve kataraktı olan, diyabetik retinopatisi olmayan 26 hasta

NPDR Grubu: Diyabet ve kataraktı olan, nonproliferatif diyabetik retinopati tanılı 28 hasta

PDR Grubu: Diyabet ve kataraktı olan, proliferatif retinopati tanılı 25 hasta

ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLME KRİTERLERİ

1. 18-90 yaş arası olan
2. Diyabetes mellitus tanısı olan
3. Oküler travma geçirmemiş olan
4. Komplikasyonsuz fakoemülsifikasyon ve arka kamara göz içi lens implantasyonu geçirmiş olan

5. Fundus muayenesi yapmaya engel oftalmolojik patolojisi olmayan
6. Düzenli takipleri olan ve muayeneleri eksiksiz yapılmış olan hastalar çalışmaya dahil edildi.

ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLMEME KRİTERLERİ

1. Fundoskopik muayene yapılamayacak seviyede yoğun kataraktı olan
2. Travmatik kataraktı olan
3. Konjenital kataraktı olan
4. Kornea kesifliği olan
5. <18 yaş ve >90 yaş olan
6. Oküler ameliyat öyküsü olan
7. Ek oküler hastalığı olan
8. Romatolojik hastalığı olan hastalar çalışma dışında bırakılmıştır.

Çalışma kapsamına alınan tüm hastalara ait cinsiyet, yaş, opere edilecek göz bilgileri ve DM süresi kayıt edildi. Ameliyat edilecek tüm hastaların preoperatif göz içi basıncı (GİB) değerleri, en iyi düzeltilmiş görme keskinliği (EDGK) değerleri belirlendi. Hastaların biyomikroskop muayenesinde pupil dilatasyon miktarı, lens kesafetinin tipi ve derecesi değerlendirildi. Bütün hastalara pupilla dilatasyonu sonrası detaylı fundus muayenesi yapıldı. Hastaların ETDRS' ye göre retinopatisi NRDM, NPDR ve PDR olarak sınıflandırıldı.

Tüm olgulara fakoemülsifikasyon ve göz içi lens implantasyonu cerrahisi uygulandı. 2.8 mm'lik şeffaf korneal insizyonla ön kamaraya girilerek viskoelastik madde ile ön kamara oluşturuldu. Kistotom yardımıyla ön kapsül flep oluşturularak kapsülöreksis forsepsiyle yaklaşık 5.0 - 5.5 mm boyutunda devamlı sirküler bir kapsülöreksis yapıldı. Soyulan kapsül parçası minimal travma ile göz dışına alınarak, bir kısmı daha önceden hazırlanmış olan formol içeren eppendorf tüplerinde; kalan kısmı eppendorf tüpünde -80°C derin dondurucuda saklandı.

HE BOYAMA VE İMMUNHİSTOKİMYA ÇALIŞMALARI

Her gruptan 10 adet lens kapsülü %10 nötr tamponlu formaline aktarılıp fiksasyondan sonra parafine gömülüp hematoksilin ve eozin (HE) ile boyandı. Mikroskop görüntüleri bilgisayar ortamına alınıp histolojik değerlendirme ve morfometrik inceleme iki uzman tarafından kör bir şekilde yapıldı.

Morfometri

Kesitler kör olarak iki uzman tarafından puanlama sistemi ile değerlendirildi. Skorlama için histopatolojik parametreler olarak vakuoller, epitelyal hücre azalması, nükleer piknosis veya nükleer kondensasyon, kopmalar, sitoplazmik uzantılar kullanıldı. Her biri için puanlama sistemi olarak 0 yok veya nadir, 1 hafif, 2 multifokal ve hafif, 3 çok odaklı ve orta, 4 çok odaklı ve şiddetli şeklinde değerlendirildi.

İmmunohistokimya (İHK)

Lens kapsülü örnekler %10 nötr tamponlu formalinde sabitlendi. İmmünohistokimyasal işaretleme, standart protokollere göre yapıldı. Numunelerinin parafine gömülmesi ve 4 µm kalınlığında kesitlerin alınmasından sonra, kesitler, antijen geri kazanım ardından Avidin-biyotin yöntemi kullanılarak immünoperoksidaza tabi tutuldu. Her numunenin %3 hidrojen peroksit, sitrat tamponu (pH 6) kaynatma ve Tween 20 ile Trisbuffer salin kullanılarak standart bir şekilde işlenmesinin ardından, birincil antikolar (1:50- 1:100) gece boyunca oda sıcaklığında uygulandı ve ardından 2 saat boyunca ikincil antikolar ile inkübasyon yapıldı. STAT3, ZEB1, E-kadherin ve N-kadherin proteinlerinin ekspresyonları incelendi.

H-skor

İmmünohistokimyasal boyama h-skoru yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Boyamanın yoğunlukları sırasıyla zayıf (+), orta (++) ve güçlü (+++) olarak skorlandı. Hücreler her yoğunluk için üç farklı mikroskopik alanda sayıldı. İlgili puan daha sonra H-puanı = $\sum P_i$ (işaretlenme yoğunluğu + 1) formülü kullanılarak hesaplandı. P_i , %0 ila %100 arasında değişen yoğunluk açısından boyalı hücrelerin yüzdesidir. H-skoru en az iki araştırmacı tarafından bağımsız 0 ila 300 arasında değişen puanlar ile değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunuldu. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans (ANOVA) analizi GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) kullanılarak yapıldı ve ardından çoklu karşılaştırmalar için Tukey post hoc testi uygulandı. Anlamlılık $p < 0,05$ olarak gösterildi.

MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR

Eppendorf tüpünde -80°C derin dondurucuda saklanan lens kapsüllerinden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıp, gen ekspresyonları belirlendi.

RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi

Dokulardan total RNA izolasyonunda Trizol ve Total RNA PureLink® RNA Mini Kit (Life Sciences, USA) kullanıldı ve RNA'lar kit protokolüne göre izole edildi. Bu işlemde kit içerisinde hazır olarak verilen lyses buffer + %1' lik 2-merkaptoetanol kullanılarak hücreler lyses edildi, daha sonra özel kolonlardan geçirilerek kolona tutturulan RNA'lar kit içerisinde sunulan yıkama solüsyonu ile kolonlar yıkanarak diğer bileşikler temizlendikten sonra, saf su ile eppendorf tüp içerisine toplandı. Kan, dokularından izole edilen RNA miktarları Qubit® Fluorometer (Invitrogen, USA) ile belirlenecek tüm RNA miktarları DNA, RNA free ultra saf su (Sigma, USA) ile eşitlendi. Eşitlenen toplam RNA' lardan High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanılarak PCR şartları Step 1: 25°C, 10 dk; Step 2: 37 °C, 120 dk; Step 3: 85 °C, 5 dk olacak şekilde programlandı ve cDNA sentezi yapıldı. Elde edilen cDNA' lar daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere -20 C'de saklandı.

Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Çalışma kapsamında IL6/JAK2/STAT3 ilişkili epitel mezankimal geçiş yolağı genleri olan sırasıyla IL6, IL6 reseptör, JAK2, STAT3, SNA1, SLUG, ZEB1, TWIST, E-kadherin, N-kadherin gen ekspresyonları araştırıldı. Bu kapsamda bir önceki bölümde elde edilen cDNA'lar qPCR'da SYBR Green qPCR Mastermix protokolüne uygun olarak Quant studio 5 (Thermo Scientific, USA) gerçek zamanlı PCR' da (qRT-PCR) 384 well pleytlerde spesifik primerleri ile çoğaltıldı. Çoğaltma işlemi esnasında elde edilen piklere ait Ct değerleri gen ekspresyonların belirlenmesinde kullanıldı ve $\Delta\Delta C_t$ metodu ile hesaplandı. Kalibrasyon ve düzeltme faktörü olarak GAPDH, 18 S, β -aktin primerleri kullanıldı. Homeobox gen açısından bir sorunla karşılaşıldığında kullanılan gen bölgelerine uygun yeni primerler dizayn edildi.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen ekspresyon değerlerinin ortalamaları arasındaki fark tek yönlü ANOVA ile belirlendi ve ortalamaların girdiği gruplar çalışma verilerin durumuna göre Tukey ya da Duncan testi ile saptandı. Parametrelerin birbiriyle ilişkileri Pearson korelasyon testi ile hesaplandı. Proje kapsamında elde edilen tüm değerler, ayrıca bu değerlerin birbirlerine oranları başlıca bileşen analizine (Principle Component Analyses, PCA) tabi tutuldu. Çalışmada istatistik analizler XL-STAT demo (Addinsoft, ABD) ve SPSS 20, Üniversite Lisanslı (IBM, ABD) programları ile yapıldı, $p < 0,05$ olarak değerlendirildi.

Çalışma kapsamında kullanılan cihazların adı, markası ve menşeleri Tablo 1’ de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihazların adları, marka ve menşei

Cihaz	Markası Modeli ve Ülkesi
Biyogüvenlik Kabini	Heraeus, Almanya
Karbondioksitli İnkübatör	Heraeus, Almanya
Santrifüj	Centurion Scientific, İngiltere
İnvert Mikroskop	Nikon- Eclipse Ts100, Japonya
Otomatik Pipet Seti	Gilson, ABD
Dijital Pipetör	Thermo Scientific, ABD
Mikroplate Okuyucu	Thermo Fisher Scientific-Multiskan™ GO, ABD
Soğutmalı santrifüj	Hettich- Micro 200R, Almanya
Santrifüj	Hettich-Micro 200R, Almanya
Nanodrop	OPTİZEN-NanoQ, Kore
PCR Cihazı	Applied Biosystems-ProFlex, ABD
Real-Time PCR Cihazı	Applied Biosystems-StepOnePlus, ABD
Real-Time PCR Cihazı	Applied Biosystems-7500, ABD
Gelişmiş Vorteks Karıştırıcı	WİSD-WiseMix, İngiltere
Analitik Terazî	AND-HR 250 AZ
Doku Homojenizatörü	QIAGEN, Almanya
Karıştırıcı Blok	Bioer Technology, Çin
4°C Buzdolabı	VESTEL, Türkiye
-20°C Derin Dondurucu	VESTEL, Türkiye
-80°C Derin Dondurucu	WİSD, İngiltere
Ultra Saf Su Cihazı	TKA, Almanya
Distile Su Cihazı	TKA, Almanya
Tali Görüntü Tabanlı Sitometre	İnvitrogen, ABD
Trinoküler Floresan Işık Mikroskobu	Carl Zeiss-AXİO, Almanya

BULGULAR

DEMOGRAFİK VE KLİNİK VERİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Bu çalışmaya toplam 79 hasta dahil edildi. Katılımcıların 36'sı (%45,6) kadın, 43'ü (%54,4) erkek idi. NRDM, NPDR ve PDR grupları yaş ortalaması sırasıyla 67,69, 70,79 ve 64,76 olarak hesaplandı. NPDR grubunda yaş ortalaması diğer gruplardan daha yüksek idi. NRDM grubunda hastaların 17'si oral antidiyabetik ilaç, 9'u insülin; NPDR grubunda hastaların 20'si oral antidiyabetik ilaç, 8'i insülin; PDR grubunda hastaların 7'si oral antidiyabetik ilaç, 18'i insülin kullanmakta idi. Diyabet tanı süresinin NRDM, NPDR ve PDR gruplarında sırasıyla 15, 12 ve 18,76 yıl olduğu kaydedildi. Ayrıntılı demografik ve klinik veriler Tablo 2'de verilmiştir.

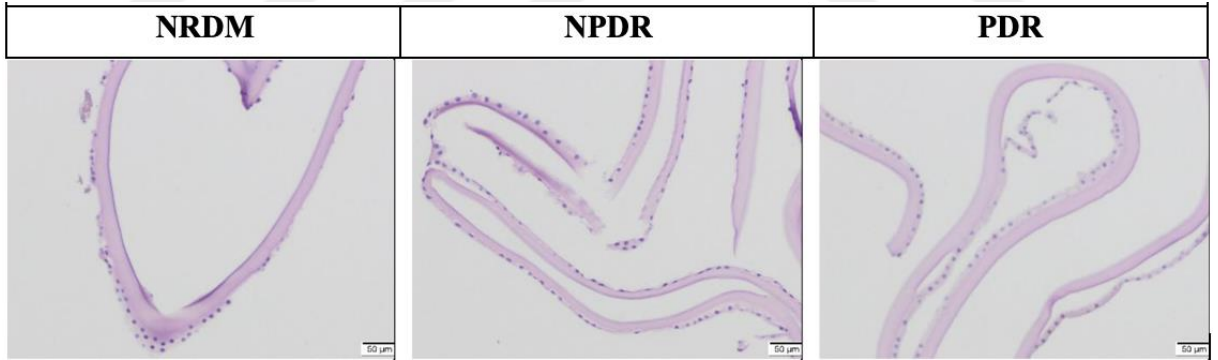
Tablo 2. Demografik ve klinik veriler

	NRDM (N= 26)	NPDR (N= 28)	PDR (N= 25)	Total (N=79)
Yaş (Ortalama)	67,69	70,79	64,76	67,86
Kadın/ Erkek	14/12	10/18	12/13	36/43
Sağ/ Sol	17/9	14/14	17/8	48/31
Diyabet süresi (Yıl)	15	12	18,76	15,13
OAD/ İnsülin	17/9	20/8	7/18	44/35

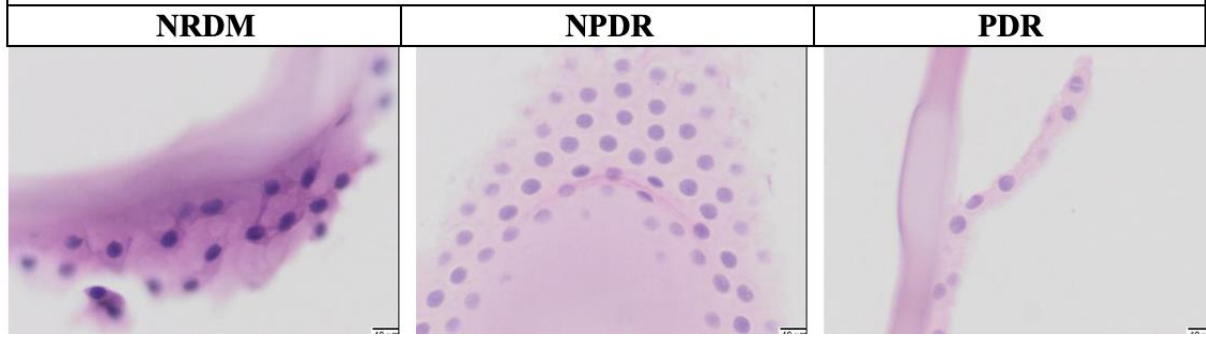
NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; **NPDR:** Nonproliferatif diyabetik retinopati; **PDR:** Proliferatif diyabetik retinopati; **N:** Kişi sayısı; **OAD:** Oral antidiyabetik.

HE BOYAMA BULGULARI

Histopatolojik olarak NRDM grubu örneklerinde değişen derecelerde dejeneratif değişiklikler izlendi. Hücre içi vakuoller, sitozolik dilüsyonla birlikte ödem ve apoptotik çekirdekler gözlendi. Komşu hücreleri kaplayan sitoplazmik süreçlerden dolayı çok katmanlı bir epitel saptandı. Bazal membranın bağlanması genellikle düzgün ve sıkıydı. NPDR grup bulgularında daha şiddetli olarak daha fazla vakuol ve apoptotik çekirdek vardı. Geniş hücre içi boşluklar ve çok sayıda hasarlı hücre fark edildi. Birçok hücre bazal membranla bağlantılıydı, ancak bazıları tamamen ayrılmıştı. Sadece epitelin üst tarafında değil aynı zamanda alt tarafına doğru da daha fazla sitoplazmik çıkıntı fark edildi; buna bağlı olarak epitelin çok katmanlı hale geldiği izlendi. PDR gurubunda değişiklikler daha şiddetliydi. Epitelin üst ve alt tarafında farklı boyutlarda daha belirgin sitoplazmik süreçler saptandı. Bazı bölgelerde lens epitel hücreleri tamamen kaybolmuştu. Çoğu zaman, sitoplazmik membranın kalınlığı daha büyük ve epitel yüzeyi pürüzlüydü. BM düzensizliği, çok sayıda hücre içi vakuol, çok sayıda apoptotik çekirdek, ödem ve hücreler arası boşlukların arttığı gözlendi (Şekil 4, 5).



Şekil 4. NRDM, NPDR ve PDR tanımlı olguların lens epitel hücrelerinde HE boyama görüntüleri (X200 büyütme). NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati; HE: Hematoksilen-eozin.



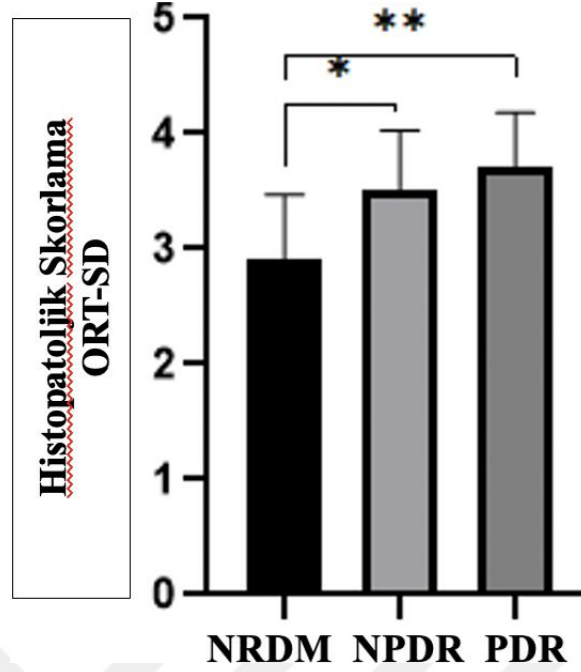
Şekil 5. NRDM, NPDR ve PDR tanılı olguların lens epitel hücrelerinde HE boyama büyük büyütme görüntüleri (X400 büyütme). NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati; HE: Hematoksilen-eozin.

Lens kapsülü epitel hücrelerinde dejeneratif değişiklikler, histopatolojik parametrelere göre çok odaklı ve şiddetli ise 4, çok odaklı ve orta ise 3, multifokal ve hafif ise 2, yok veya nadir ise 0 olarak değerlendirildi. Bu skorlama kullanılarak gruplar analiz edildiğinde hem PDR grubunda ($p<0,01$) hem de NPDR grubunda ($p<0,05$) dejeneratif değişikliklerin NRDM grubuna kıyasla artmış olduğu saptandı (Tablo 3) (Şekil 6).

Tablo 3: Lens epitel hücrelerinde dejeneratif değişikliklerin hematoksilen-eozin boyama ile histopatolojik skorlaması

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	<i>p</i>
NRDM vs. NPDR	2,90	3,45	-0,55	0,03
NRDM vs. PDR	2,90	3,60	-0,70	0,007
NPDR vs. PDR	3,45	3,60	-0,15	0,75

NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; **NPDR:** Nonproliferatif diyabetik retinopati; **PDR:** Proliferatif diyabetik retinopati; **Mean;** Ortalama; **Mean Diff:** Ortalama fark.



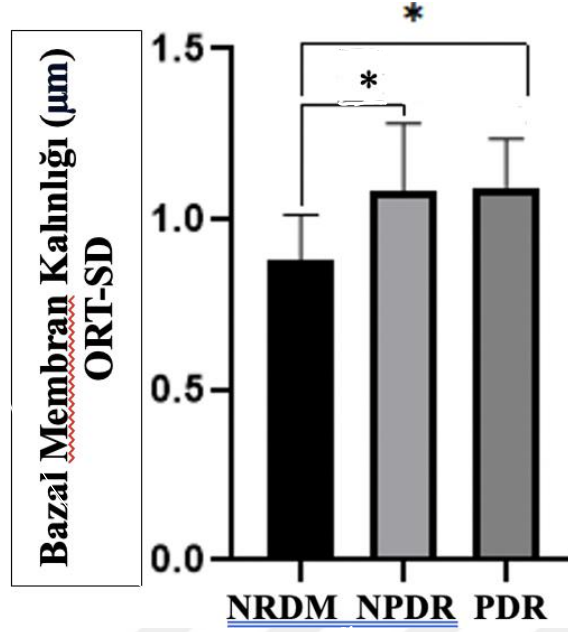
Şekil 6. NRDM, NPDR ve PDR tanılı olguların lens epitel hücrelerinde hematoxilen-eozin boyama ile histopatolojik skorlama. NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati. $N_{NRDM} = 10$, $N_{NPDR} = 10$, $N_{PDR} = 10$. * Ortalamalar istatistiksel olarak farklıdır, Tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Lens kapsülü epitel hücrelerinde bazal membran (BM) kalınlığı NRDM grubunda $0,8802 \mu m$, NPDR grubunda $1,083 \mu m$, PDR grubunda $1,094 \mu m$ olarak tespit edildi. Kontrol grubuna kıyasla, PDR ve NPDR gruplarında BM kalınlığında anlamlı artış saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 4) (Şekil 7).

Tablo 4: Lens kapsülü BM kalınlığının değerlendirilmesi (μm)

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	<i>p</i>
NRDM vs. NPDR	0,88	1,08	-0,20	0,02
NRDM vs. PDR	0,88	1,09	-0,21	0,01
NPDR vs. PDR	1,08	1,09	-0,01	0,98

NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati; Mean: Ortalama; Mean Diff: Ortalama fark.



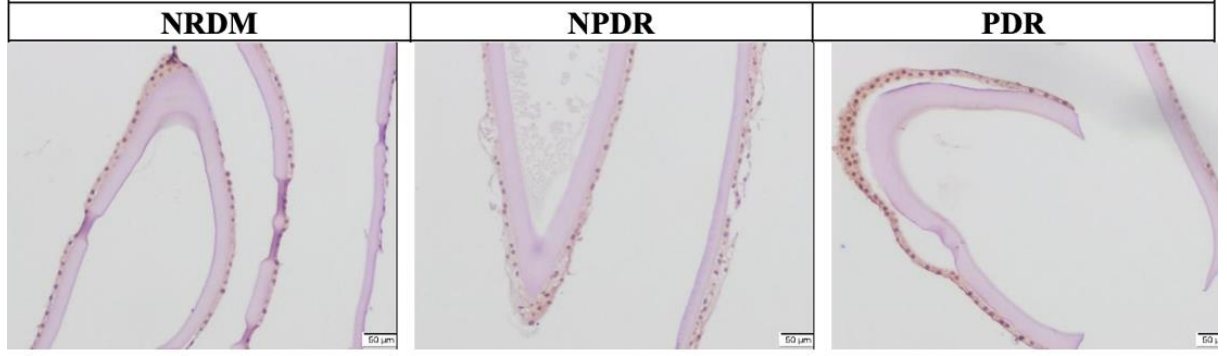
Şekil 7. NRDM, NPDR ve PDR tanılı olguların kataraktlı lens kapsülü bazal membran kalınlıklarının değerlendirilmesi (µm). NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati. $N_{NRDM} = 10$, $N_{NPDR} = 10$, $N_{PDR} = 10$. * Ortalamalar istatistiksel olarak farklıdır, Tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, $p \leq 0.05$.

İMMUNOHİSTOKİMYA BULGULARI

Lens epitel hücrelerinde immunohistokimyasal olarak STAT3, ZEB1, E-kadherin ve N-kadherin proteinlerinin ekspresyonları incelendi. İmmünohistokimyasal boyama h-skoru yöntemi kullanılarak değerlendirildi

STAT3 İHK Görüntülenmesi

Lens epitel hücrelerinde STAT3 İHK boyaması üç grupta da izlenmiş olup, PDR ve NPDR grubunda boyanmanın daha fazla olduğu Şekil 8’de gösterilmiştir.



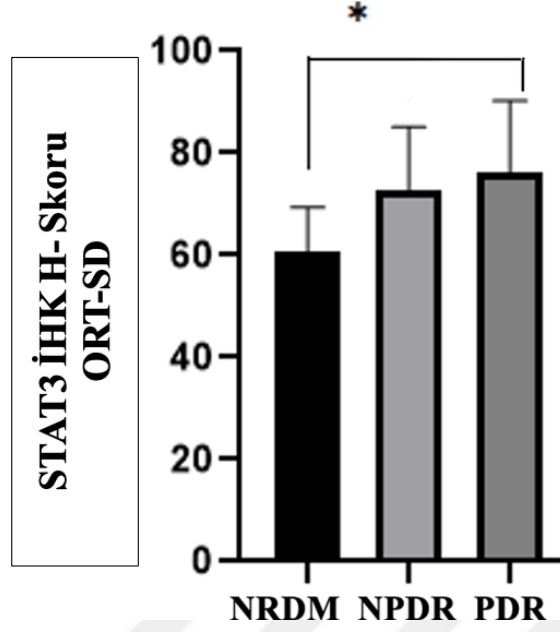
Şekil 8. NRDM, NPDR ve PDR tanılı olguların lens epitel hücrelerinde STAT3 İHK boyama (X200 büyütme). NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati; İHK: İmmunohistokimya.

STAT3 ekspresyonu, PDR grubunda NRDM grubuna kıyasla daha yüksek tespit edilmiştir ($p<0,05$). NPDR grubunda ise NRDM grubuna göre anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 5) (Şekil 9).

Tablo 5: Lens epitel hücrelerinin immunohistokimyasal boyama STAT3 protein ekspresyon düzeyleri

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	<i>p</i>
NRDM vs. NPDR	60,55	72,67	-12,11	0,08
NRDM vs. PDR	60,55	76,09	-15,54	0,02
NPDR vs. PDR	72,67	76,09	-3,428	0,80

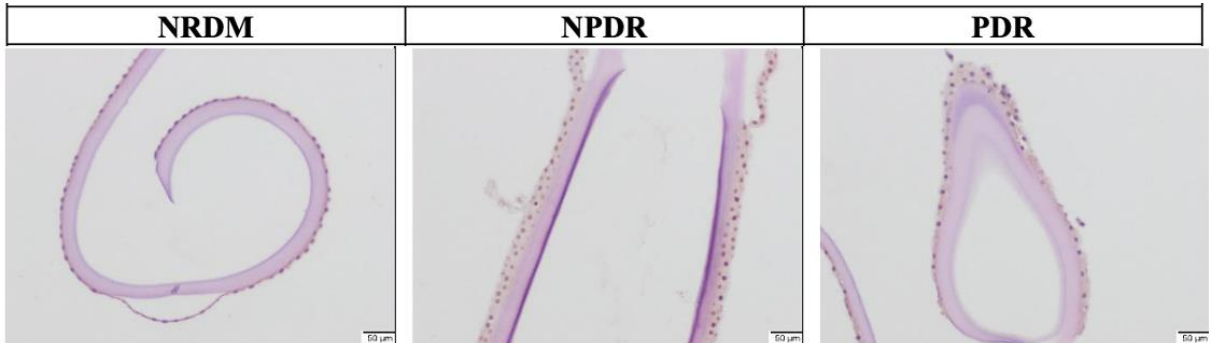
NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; **NPDR:** Nonproliferatif diyabetik retinopati; **PDR:** Proliferatif diyabetik retinopati; **Mean;** Ortalama; **Mean Diff:** Ortalama fark.



Şekil 9. NRDM, NPDR ve PDR tanılı olguların lens epitel hücrelerinde STAT3 ekspresyonunun İHK H-Skoru ile değerlendirilmesi. NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati; İHK: İmmunohistokimya. $N_{NRDM} = 10$, $N_{NPDR} = 10$, $N_{PDR} = 10$. * Ortalamalar istatistiksel olarak farklıdır, Tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, $p \leq 0.05$.

ZEB1 İHK Görüntülenmesi

Lens kapsülü epitel hücrelerinde ZEB1 boyanması NPDR ve PDR gruplarında daha fazla izlenmiştir (Şekil 10).



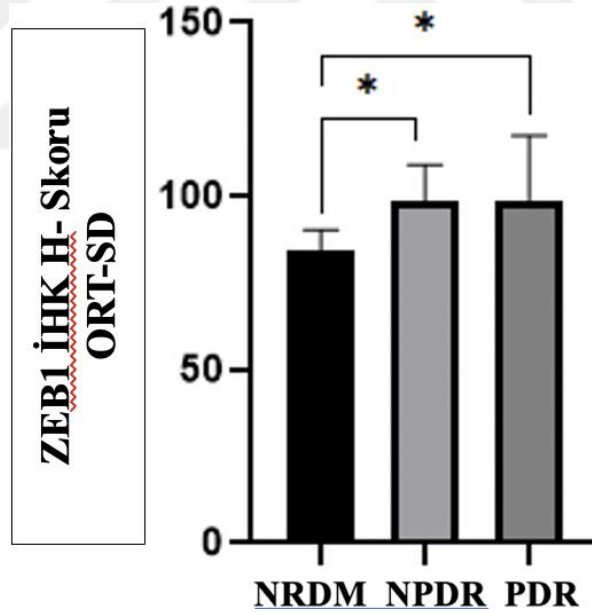
Şekil 10. NRDM, NPDR ve PDR tanılı olguların lens epitel hücrelerinde ZEB1 İHK boyama (X200 büyütme). NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati; İHK: İmmunohistokimya.

ZEB1 ekspresyon düzeyinin, PDR ve NPDR grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı artmış olduğu saptandı ($p<0,05$). PDR grubunda NPDR grubuna göre ZEB1 ekspresyonu daha yüksek olmasına rağmen aralarında istatistiksel anlamlı fark izlenmedi (Tablo 6) (Şekil 11).

Tablo 6: Lens epitel hücrelerinin immunohistokimyasal boyama ZEB1 protein ekspresyon düzeyleri

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	<i>p</i>
NRDM vs. NPDR	84,07	98,35	-14,28	0,04
NRDM vs. PDR	84,07	98,92	-14,86	0,03
NPDR vs. PDR	98,35	98,92	-0,57	0,99

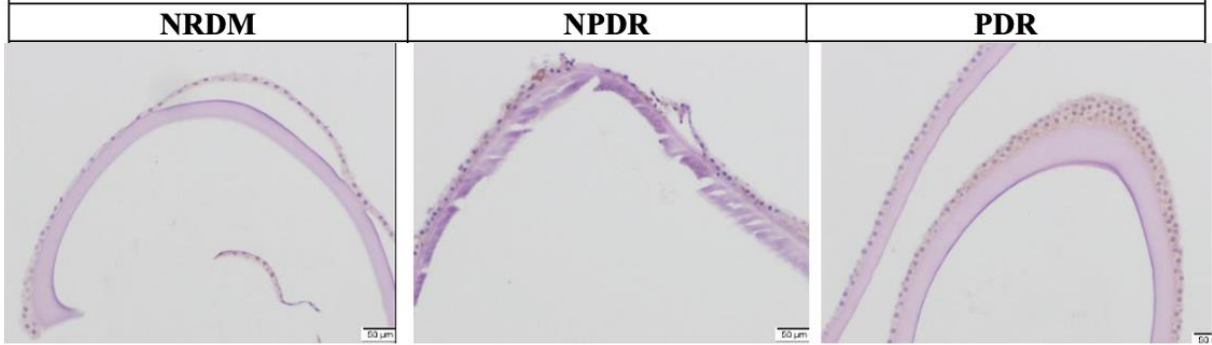
NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; **NPDR:** Nonproliferatif diyabetik retinopati; **PDR:** Proliferatif diyabetik retinopati; **Mean;** Ortalama; **Mean Diff:** Ortalama fark.



Şekil 11. NRDM, NPDR ve PDR tanımlı olguların lens epitel hücrelerinde ZEB1 ekspresyonunun İHK H-Skoru ile değerlendirilmesi. NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati; İHK: İmmunohistokimya. $N_{NRDM}=10$, $N_{NPDR}=10$, $N_{PDR}=10$. * Ortalamalar istatistiksel olarak farklıdır, Tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, $p\leq0.05$

E-kadherin İHK Görüntülenmesi

Lens kapsülü epitel hücreleri E-kadherin boyanması üç grupta da izlenmiştir (Şekil 12).



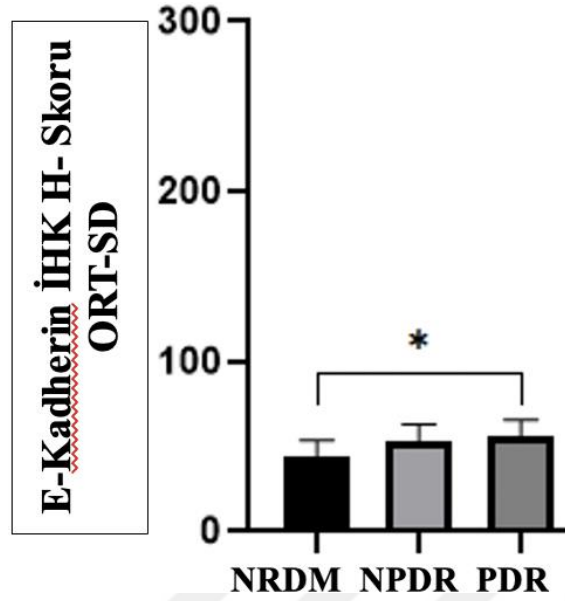
Şekil 12. NRDM, NPDR ve PDR tanılı olguların lens epitel hücrelerinde E-kadherin İHK boyama (X200 büyütme). NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati; İHK: İmmunohistokimya.

E-kadherin ekspresyonunun PDR grubunda NRDM grubuna kıyasla artmış olduğu bulundu ($p<0,05$). Diğer gruplar arasında E-kadherin ekspresyonu açısından fark izlenmedi (Tablo 7) (Şekil 13).

Tablo 7: Lens epitel hücrelerinin immunohistokimyasal boyama E-kadherin protein ekspresyon düzeyleri

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	<i>p</i>
NRDM vs. NPDR	43,69	53,32	-9,628	0,09
NRDM vs. PDR	43,69	55,58	-11,89	0,03
NPDR vs. PDR	53,32	55,58	-2,266	0,86

NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati; Mean; Ortalama; Mean Diff: Ortalama fark.



Şekil 13. NRDM, NPDR ve PDR tanılı olguların lens epitel hücrelerinde E-kadherin ekspresyonunun İHK H-Skoru ile değerlendirilmesi. NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati; İHK: İmmunohistokimya. $N_{NRDM} = 10$, $N_{NPDR} = 10$, $N_{PDR} = 10$. * Ortalamalar istatistiksel olarak farklıdır, Tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, $p \leq 0.05$.

N-kadherin İHK Görüntülenmesi

Lens kapsülü epitel hücrelerinde N-kadherin boyanması üç grupta da izlenmiş olup, PDR ve NPDR grubunda boyanmanın daha fazla olduğu Şekil 14'te gösterilmiştir.



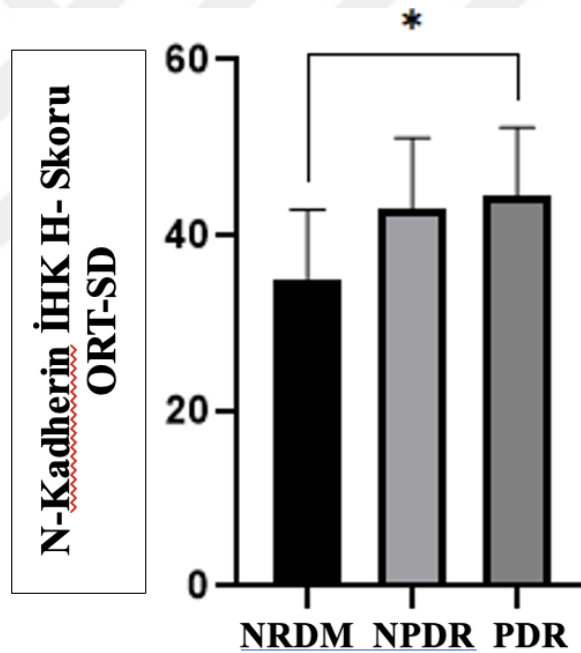
Şekil 14. NRDM, NPDR ve PDR tanılı olguların lens epitel hücrelerinde N-kadherin İHK boyama (X200 büyütme). NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati; İHK: İmmunohistokimya.

PDR grubu N-kadherin ekspresyon düzeyi, NRDM grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek idi ($p<0,05$). PDR ve NPDR grupları arasında anlamlı fark izlenmedi (Tablo 8) (Şekil 15).

Tablo 8: Lens epitel hücrelerinin immunohistokimyasal boyama N-kadherin protein ekspresyon düzeyleri

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	<i>p</i>
NRDM vs. NPDR	35,05	42,95	-7,90	0,08
NRDM vs. PDR	35,05	44,47	-9,41	0,03
NPDR vs. PDR	42,95	44,47	-1,51	0,90

NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; **NPDR:** Nonproliferatif diyabetik retinopati; **PDR:** Proliferatif diyabetik retinopati; **Mean;** Ortalama; **Mean Diff:** Ortalama fark.



Şekil 15. NRDM, NPDR ve PDR tanımlı olguların lens epitel hücrelerinde N-kadherin ekspresyonunun İHK H-Skoru ile değerlendirilmesi. NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati; İHK: İmmunohistokimya. $N_{NRDM} = 10$, $N_{NPDR} = 10$, $N_{PDR} = 10$. * Ortalamalar istatistiksel olarak farklıdır, Tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, $p \leq 0.05$.

GEN EKSPRESYON BULGULARI

Lens kapsülü epitel hücrelerinde RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıp; qRT-PCR ile IL-6, IL-6R, JAK-2, STAT3, SNAI1, SLUG (SNAI2), ZEB1, TWIST, E-kadherin ve N-kadherin gen ekspresyonları belirlendi.

IL-6 ve IL-6R Ekspresyon Düzeyleri

IL-6 gen ekspresyon artışı PDR ve NPDR gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. PDR ($p \leq 0.001$) ve NPDR ($p < 0.05$) gruplarında sırasıyla 18 kat ve 12 kat daha yüksek düzeyde aktivite gösterdiği saptanmıştır (Tablo 9) (Şekil 16). Benzer şekilde IL-6R ekspresyon artışı da PDR ve NPDR gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. PDR ve NPDR gruplarında IL6R'nin sırasıyla 48 kat ve 42 kat daha fazla eksprese edildiği gösterilmiştir ($p < 0,01$) (Tablo 10) (Şekil 16).

Tablo 9: Lens epitel hücrelerinde qRT-PCR IL-6 ekspresyon düzeyleri

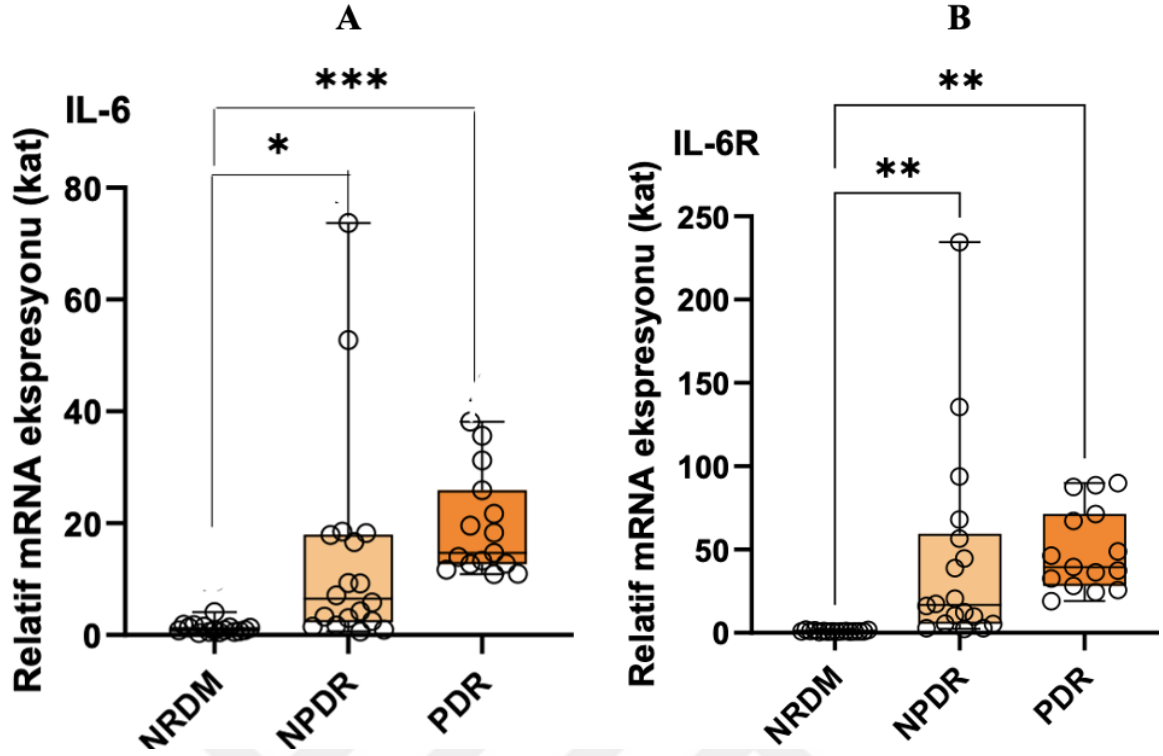
	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	<i>p</i>
NRDM vs. NPDR	1,21	13,73	-12,52	0,018
NRDM vs. PDR	1,21	19,43	-18,22	0,001
NPDR vs. PDR	13,73	19,43	-4,49	0,42

NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; **NPDR:** Nonproliferatif diyabetik retinopati; **PDR:** Proliferatif diyabetik retinopati; **Mean;** Ortalama; **Mean Diff:** Ortalama fark.

Tablo 10: Lens epitel hücrelerinde qRT-PCR IL-6R ekspresyon düzeyleri

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	<i>p</i>
NRDM vs. NPDR	1,05	43,21	-42,15	0,008
NRDM vs. PDR	1,05	49,54	-48,48	0,003
NPDR vs. PDR	43,21	49,54	-6,32	0,88

NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; **NPDR:** Nonproliferatif diyabetik retinopati; **PDR:** Proliferatif diyabetik retinopati; **Mean;** Ortalama; **Mean Diff:** Ortalama fark.



Şekil 16. NRDM, NPDR ve PDR tanımlı olguların lens epitel hücrelerinde qRT-PCR (A) IL-6 relatif ekspresyon düzeyleri ve (B) IL-6R relatif ekspresyon düzeyleri. NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati. $N_{NRDM}=16$, $N_{NPDR}=18$, $N_{PDR}=15$. * Ortalamalar istatistiksel olarak farklıdır, Tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

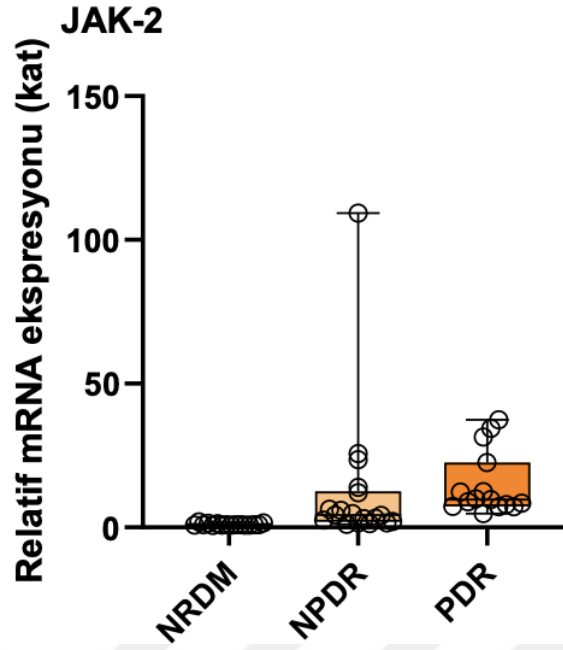
JAK-2 Ekspresyon Düzeyleri

Lens epitel hücrelerinde JAK-2 ekspresyon düzeyinde gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi (Tablo 11) (Şekil 17).

Tablo 11: Lens epitel hücrelerinde qRT-PCR JAK-2 ekspresyon düzeyleri

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	<i>p</i>
NRDM vs. NPDR	1,04	12,58	-11,54	0,11
NRDM vs. PDR	1,04	14,80	-13,75	0,06
NPDR vs. PDR	12,58	14,80	-2,21	0,92

NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati; **Mean**: Ortalama; **Mean Diff**: Ortalama fark.



Şekil 17. NRDM, NPDR ve PDR tanılı olguların lens epitel hücrelerinde qRT-PCR JAK-2 relatif ekspresyon düzeyleri. NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati. $N_{NRDM}=16$, $N_{NPDR}=18$, $N_{PDR}=15$. * Ortalamalar istatistiksel olarak farklıdır, Tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi.

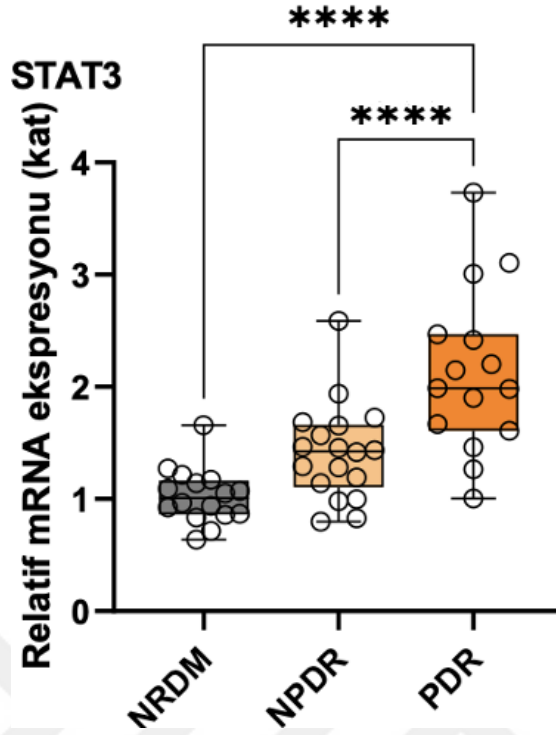
STAT3 Ekspresyon Düzeyleri

STAT3 gen ekspresyonunun PDR grubunda NPDR ve NRDM gruplarına kıyasla sırasıyla ortalama 0,7 kat ve 1,1 kat daha yüksek düzeyde olduğu saptandı ($p<0,0001$). NPDR ve NRDM grupları arasında istatistiksel fark izlenmedi (Tablo 12) (Şekil 18).

Tablo 12: Lens epitel hücrelerinde qRT-PCR STAT3 ekspresyon düzeyleri

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	<i>p</i>
NRDM vs. NPDR	1,02	1,41	-0,38	0,073
NRDM vs. PDR	1,02	2,13	-1,10	0,000
NPDR vs. PDR	1,41	2,13	-0,71	0,000

NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati; Mean: Ortalama; Mean Diff: Ortalama fark.



Şekil 18. NRDM, NPDR ve PDR tanılı olguların lens epitel hücrelerinde qRT-PCR STAT3 relatif ekspresyon düzeyleri. NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati. $N_{NRDM}=16$, $N_{NPDR}=18$, $N_{PDR}=15$. * Ortalamalar istatistiksel olarak farklıdır, Tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, **** $p<0.0001$.

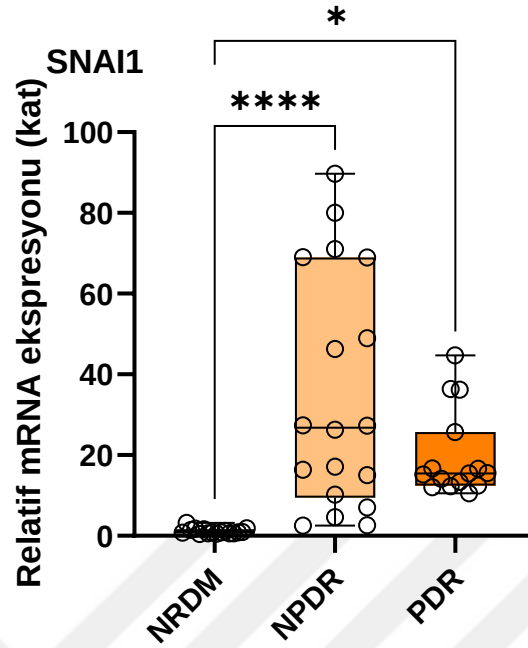
SNAI1 Ekspresyon Düzeyleri

SNAI1 ekspresyonunun PDR ve NPDR gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği izlendi. PDR ($p<0,05$) ve NPDR ($p<0,0001$) gruplarında sırasıyla 18 kat ve 33 kat fazla SNAI1 ekspresyon artışı olduğu görüldü. PDR ve NPDR grupları arasında anlamlı fark izlenmedi (Tablo 13) (Şekil 19).

Tablo 13: Lens epitel hücrelerinde qRT-PCR SNAI1 ekspresyon düzeyleri

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	P
NRDM vs. NPDR	1,15	35,03	-33,87	0,000
NRDM vs. PDR	1,15	19,82	-18,66	0,02
NPDR vs. PDR	35,03	19,82	15,20	0,06

NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati; Mean; Ortalama; Mean Diff: Ortalama fark.



Şekil 19. NRDM, NPDR ve PDR tanılı olguların lens epitel hücrelerinde qRT-PCR SNAI1 relatif ekspresyon düzeyleri. NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati. $N_{NRDM} = 16$, $N_{NPDR} = 18$, $N_{PDR} = 15$. * Ortalamalar istatistiksel olarak farklıdır, Tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, $p \leq 0.05$, **** $p < 0.0001$.

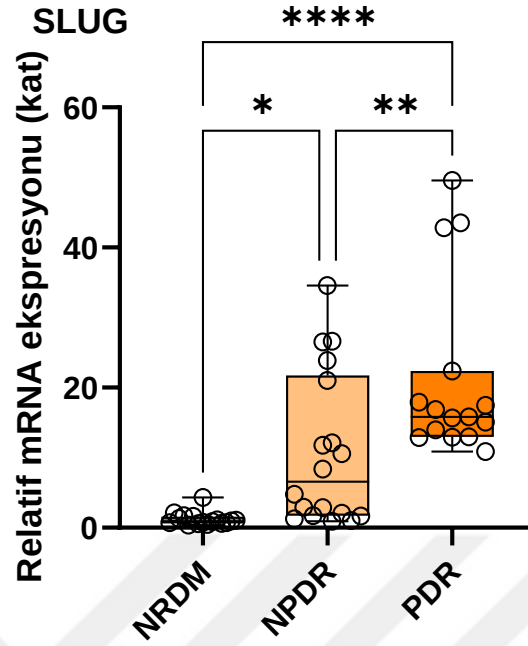
SLUG Ekspresyon Düzeyleri

SLUG ekspresyon düzeyi açısından yapılan analizde gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. NPDR ($p < 0,05$) grubunda ortalama 9,6 kat, PDR ($p < 0,0001$) grubunda 20 kat fazla SLUG gen ekspresyon artışı saptandı. Çalışma grupları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı idi. PDR grubunda SLUG ekspresyonunun NPDR'ye kıyasla 10 kat fazla olduğu tespit edildi ($p < 0,01$) (Tablo 14) (Şekil 20).

Tablo 14: Lens epitel hücrelerinde qRT-PCR SLUG ekspresyon düzeyleri

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	<i>p</i>
NRDM vs. NPDR	1,22	10,82	-9,60	0,016
NRDM vs. PDR	1,22	21,38	-20,16	0,000
NPDR vs. PDR	10,82	21,38	-10,56	0,009

NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; **NPDR:** Nonproliferatif diyabetik retinopati; **PDR:** Proliferatif diyabetik retinopati; **Mean;** Ortalama; **Mean Diff:** Ortalama fark.



Şekil 20. NRDM, NPDR ve PDR tanıli olguların lens epitel hücrelerinde qRT-PCR SLUG relatif ekspresyon düzeyleri. NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati. $N_{NRDM} = 16$, $N_{NPDR} = 18$, $N_{PDR} = 15$. * Ortalamalar istatistiksel olarak farklıdır, Tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p < 0.0001$.

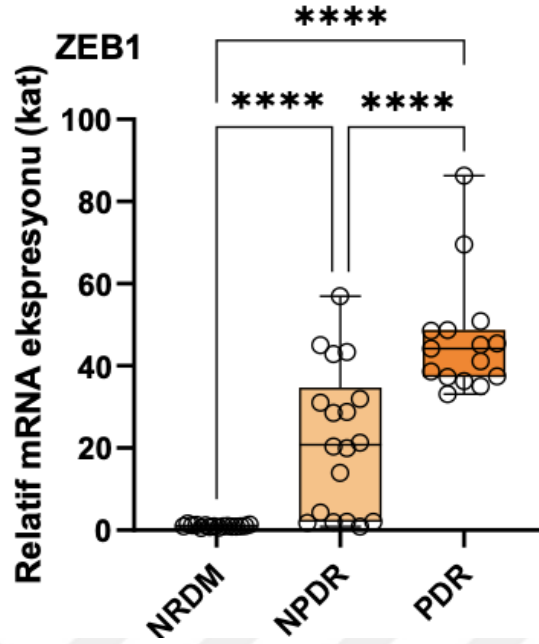
ZEB1 Ekspresyon Düzeyleri

ZEB1 ekspresyon düzeyleri analiz edildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü. PDR grubunda 45 katlık, NPDR grubunda 21 katlık ekspresyon artışı saptandı. PDR grubundaki ekspresyon düzeyi NPDR grubuna göre anlamlı olarak fazla bulundu ($p < 0,0001$) (Tablo 15) (Şekil 21).

Tablo 15: Lens epitel hücrelerinde qRT-PCR ZEB1 ekspresyon düzeyleri

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	P
NRDM vs. NPDR	1,03	22,06	-21,03	0,000
NRDM vs. PDR	1,03	46,51	-45,47	0,000
NPDR vs. PDR	22,06	46,51	-24,44	0,000

NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati; **Mean**: Ortalama; **Mean Diff**: Ortalama fark.



Şekil 21. NRDM, NPDR ve PDR tanımlı olguların lens epitel hücrelerinde qRT-PCR ZEB1 relatif ekspresyon düzeyleri. NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati. $N_{NRDM} = 16$, $N_{NPDR} = 18$, $N_{PDR} = 15$. * Ortalamalar istatistiksel olarak farklıdır, Tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, **** $p < 0.0001$.

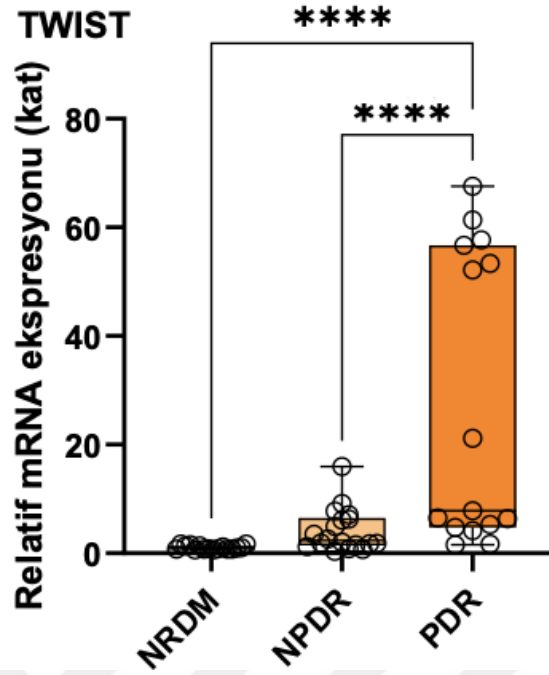
TWIST Ekspresyon Düzeyleri

TWIST gen ekspresyonunun PDR grubunda NRDM grubuna kıyasla 26 kat, NPDR grubuna kıyasla 23 kat daha yüksek düzeyde aktivite olduğu gösterildi ($p < 0,0001$). NPDR ile NRDM grupları arasında anlamlı fark izlenmedi (Tablo 16) (Şekil 22).

Tablo 16: Lens epitel hücrelerinde qRT-PCR TWIST ekspresyon düzeyleri

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	<i>p</i>
NRDM vs. NPDR	1,06	4,21	-3,15	0,81
NRDM vs. PDR	1,06	27,21	-26,15	0,000
NPDR vs. PDR	4,21	27,21	-23,0	0,000

NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; **NPDR:** Nonproliferatif diyabetik retinopati; **PDR:** Proliferatif diyabetik retinopati; **Mean;** Ortalama; **Mean Diff:** Ortalama fark.



Şekil 22. NRDM, NPDR ve PDR tanılı olguların lens epitel hücrelerinde qRT-PCR TWIST relatif ekspresyon düzeyleri. NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati. $N_{NRDM}=16$, $N_{NPDR}=18$, $N_{PDR}=15$. * Ortalamalar istatistiksel olarak farklıdır, Tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, **** $p<0.0001$.

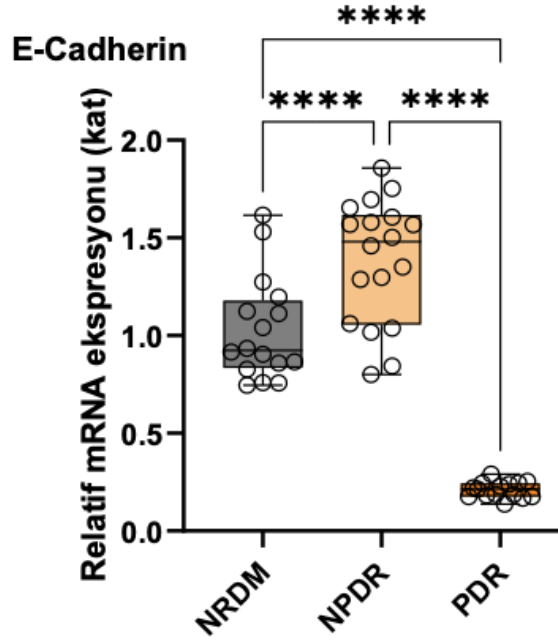
E-kadherin Ekspresyon Düzeyleri

E-kadherin gen ekspresyonunda PDR grubunda NRDM ve NPDR gruplarına göre anlamlı azalma görüldü ($p<0,0001$) (Tablo 17) (Şekil 23).

Tablo 17: Lens epitel hücrelerinde qRT-PCR E-kadherin ekspresyon düzeyleri

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	<i>p</i>
NRDM vs. NPDR	1,02	1,38	-0,35	0,000
NRDM vs. PDR	1,02	0,21	0,81	0,000
NPDR vs. PDR	1,38	0,21	1,17	0,000

NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; **NPDR:** Nonproliferatif diyabetik retinopati; **PDR:** Proliferatif diyabetik retinopati; **Mean;** Ortalama; **Mean Diff:** Ortalama fark.



Şekil 23. NRDM, NPDR ve PDR tanılı olguların lens epitel hücrelerinde qRT-PCR E-kadherin relatif ekspresyon düzeyleri. NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati. $N_{NRDM} = 16$, $N_{NPDR} = 18$, $N_{PDR} = 15$. * Ortalamalar istatistik olarak farklıdır, Tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, **** $p < 0.0001$.

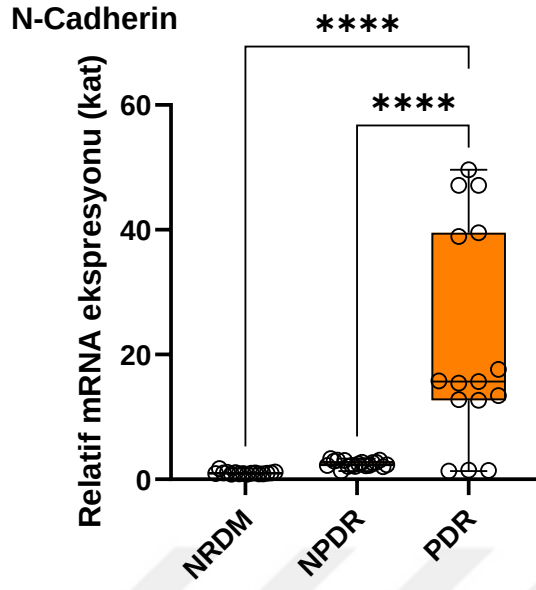
N-kadherin Ekspresyon Düzeyleri

N-kadherin ekspresyonunun PDR grubunda NRDM ve NPDR gruplarına kıyasla sırasıyla 21 kat ve 19 kat daha yüksek düzeyde olduğu belirlendi ($p < 0,0001$). NPDR ve NRDM grupları arasında anlamlı fark tespit edilmedi (Tablo 18) (Şekil 24).

Tablo 18: Lens epitel hücrelerinde qRT-PCR N-kadherin ekspresyon düzeyleri

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	P
NRDM vs. NPDR	1,01	2,47	-1,46	0,89
NRDM vs. PDR	1,01	21,99	-20,98	0,000
NPDR vs. PDR	2,47	21,99	-19,51	0,000

NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati; Mean: Ortalama; Mean Diff: Ortalama fark.



Şekil 24. NRDM, NPDR ve PDR tanıılı olguların lens epitel hücrelerinde qRT-PCR N-kadherin relatif ekspresyon düzeyleri. NRDM: Diyabetik retinopati bulgusu yok; NPDR: Nonproliferatif diyabetik retinopati; PDR: Proliferatif diyabetik retinopati. $N_{NRDM}=16$, $N_{NPDR}=18$, $N_{PDR}=15$. * Ortalamalar istatistiksel olarak farklıdır, Tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, **** $p<0.0001$.

TARTIŞMA

Diyabetle ilişkili reaksiyonlar, gözlerdeki yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açar. Diyabetin iyi kontrol alınamadığı durumlarda bu değişiklikler katarakt, glokom ve retinopati gibi uzun vadeli diyabetik komplikasyonlara neden olabilmektedir.

Katarakt DM'nin en erken başlayan komplikasyonlarından biridir ve diyabetli hastalarda fazla glikozun katarakt gelişimini nasıl başlattığı henüz net olarak açıklanamamıştır. Aldoz redüktaz aktivitesi ile ilişkili sorbitol oluşumu, oksidatif stres, protein glikasyonu ve ileri glikasyon son ürünlerinin oluşumu dahil olmak üzere birçok ortak faktör, diyabetik katarakt gelişiminde rol oynamaktadır.

Normal merceğin yapısı neredeyse tamamen şeffaftır ve bu şeffaflık fiziksel ve kimyasal süreçlerle düzenlenir. Lens kapsülü ve epiteldeki bu süreçlerde bozulmanın, lensin opaklaşmasına ve katarakt oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir (135).

Lens epitel hücreleri tarafından salgılanan modifiye edilmiş şeffaf bir bazal membran olan lens kapsülü, insan vücudundaki spesifik yapıya ve işlevlere sahip en kalın bazal membrandır. Lens epitel hücreleri yassı küboidal altıgen şekilleri ile karakteristik bir epitel morfolojisi sergiler. Hücreler arası çok az boşluk olup, hücreler tek bir katman halinde sıkı bir şekilde paketlenmiştir. Morfolojik benzerliklerine rağmen, diyabetiklerdeki kataraktlı lensler, sağlıklı bireylerdekine göre daha düşük epitel hücre yoğunluğuna sahiptir; kataraktlı lens kapsülü ve epiteli, değişen altıgen hücresel dizilimler gösterir (136, 137).

Çalışmamızda NRDM, NPDR ve PDR tanılı kataraktı olan olguların ön kapsül lens epitel hücreleri histopatolojik olarak incelendi. NRDM grubu lens kapsülü katmanlı bir epitele sahipti; epitel hücrelerinin, bazal membran bağlanması genellikle düzgün ve sıkıydı. NPDR grubunda daha belirgin katmanlı bir epitel yapısı izlendi; epitel hücrelerinin bazal membranla bağlantılı olduğu, ancak bazılarının tamamen ayrılmış olduğu görüldü. PDR grubunda ise, çok

daha katmanlı bir epitel yapısı ve bazı bölgelerde lens epitel hücrelerinin tamamen kaybolduğu, hücreler arası boşlukların arttığı saptandı.

Literatürde bir çalışmada nonproliferatif diyabetik retinopatili katarakt ve diyabetik olmayan kataraktlı olguların lens kapsülü bazal membran kalınlığı karşılaştırılmış ve diyabetik grupta bazal membran kalınlığının anlamlı derecede fazla olduğu gösterilmiştir (138). Çalışmamızda da bazal membran kalınlığının diyabetik retinopati bulguları olan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmış olduğu saptandı, bu literatürdeki çalışmalar ile benzerdi. PDR grubu bazal membran kalınlığının ise NPDR'ye göre daha fazla olduğu ancak iki grup arasında istatistiksel fark olmadığı izlendi. Lens kapsülü bazal membran kalınlığının yaşla birlikte arttığı bilinmektedir. PDR grubunda bazal membran kalınlığının beklenenden düşük olmasının, çalışmaya dahil edilen NPDR grubu yaş ortalamasının, PDR grubundan daha yüksek olması ile açıklanabileceği düşünülmüştür.

Lens epitel hücreleri histopatolojik olarak incelendiğinde, içerisinde apikal olarak dağılmış ribozom, polizom, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi organeller ve yuvarlak bir çekirdek barındırdığı izlenir (136). Bugüne kadar birçok çalışmada insan lens epitelinde hücre içi biriken sorbitol ve AGE'lerin, ozmotik strese ve hidropik dejenerasyona yol açtığı gösterilmiştir. Artan ozmotik stresin, epitel hücrelerinde apoptotik bir süreci başlattığı, mitokondriyal disfonksiyon ve endoplazmik retikulumda strese yol açarak lens opaklaşmasını hızlandığı tahmin edilmektedir (139, 140). Diyabetik lens epitelindeki bu dejeneratif değişiklikler, yaşlanan hücrelere özgü endoplazmik retikulum, golgi aygıtı ve mitokondrideki değişiklikler ile benzerdir (141).

Çalışmamızda incelenen lens epitel örneklerinde dejeneratif değişiklik şiddetinin, diyabetik retinopati düzeyi ile pozitif ilişkili olduğu tespit edildi. NRDM grubu değişen derecelerde dejeneratif değişikliklere sahipti; hücre içi vakuoller, sitozolik dilüsyonla birlikte ödem ve apoptotik çekirdekler mevcuttu. NPDR epitelinde geniş hücre içi boşluklar, daha şiddetli olarak daha fazla vakuol ve apoptotik çekirdek vardı. PDR grubunda ise çok sayıda hücre içi vakuol, çok sayıda apoptotik çekirdek, ödem ve artmış hücre içi boşluklar gözlendi.

Ozdamar ve ark. (142) 2010'da yaptıkları çalışmada, Tip 2 DM olan katarakt hastaları ile normal katarakt hastalarının lens epitel hücrelerinin elektron mikroskobu analizinde, DM grubundaki hücrelerin apoptotik çekirdek, belirgin mitokondri kristalleri ve dilate endoplazmik retikulum sarnıçları gibi ciddi dejeneratif değişikliklere sahip olduğunu, kontrol grubunda ise lens epitel hücreleri ve tüm elemanların tamamen normal görünümde olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda lens epitel hücrelerindeki dejeneratif değişikliklerin histopatolojik skorlama kullanılarak analiz edildiğinde, hem PDR grubunda hem de NPDR grubunda, NRDM grubuna

kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği tespit edildi. Bu literatürdeki diğer çalışmalar ile benzerdi. Çalışma grupları karşılaştırıldığında, PDR grubunda dejeneratif değişiklik daha fazla olmasına rağmen NPDR grubu ile arasında anlamlı fark izlenmemiştir.

Diyabetik hastalarda hiperglisemi kaynaklı biyokimyasal değişiklikler, retinanın mikrovasküler ağında fonksiyonel ve yapısal bozukluklara neden olur. Bu bozukluklar, retinanın kan akımında değişikliklere yol açarak, kapiller oklüzyon ve iskemiye neden olur. İskemi geliştiğinde, retina hücrelerinde VEGF ve IL-6 faktörleri salgılanır (12).

IL-6, proinflamatuvar özelliklere sahip çok işlevli bir sitokindir. PDR ve diyabetik maküler ödemde yüksek IL-6 düzeyleri rapor edilmiştir (143, 144). Çalışmalar, IL-6 trans-sinyalinin, insan retina endotel hücrelerinde oksidatif strese, inflamasyona yol açarak endotel bariyerinin bozulmasına neden olduğunu; sıkı bağlantı proteinlerini azaltarak vasküler sızıntıyı arttırdığını göstermiştir (145-147). Ayrıca, nonproliferatif diyabetik retinopatili bir fare modelinde, IL-6 transsinyal inhibisyonun, retinada diyabetin neden olduğu oksidatif hasarı önemli ölçüde azaltması IL-6'nın diyabetik retinopati patogenezinde önemli bir rolü olduğunu ileri sürmektedir (148).

Chen ve ark. (149) 2023'te yaptığı çalışmada diyabetik katarakt ve yaşa bağlı katarakt hastalarının aköz humorlerini incelemiş, IL-6 ve IL-6R ekspresyon seviyelerinin diyabetik kataraktı olanlarda, yaşa bağlı kataraktı olanlara kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunu ortaya çıkarmıştır. Buna benzer Li ve ark. (150) 2021'de yaptıkları in vitro çalışmada, diyabeti olan ve olmayan hastaların aköz hümeördeki IL-6 sitokin seviyelerini ELISA ile tespit etmiş ve diyabet grubunda artmış IL-6 salınımını kanıtlamıştır. Bu bağlamda çalışmamızda da sonuçlar benzerdi; IL-6 geninin NRDM grubuna kıyasla NPDR ve PDR gruplarında sırasıyla 12 ve 18 kat daha fazla eksprese edildiği saptandı. Ayrıca IL-6R'nin de PDR ve NPDR grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek düzeyde aktivite gösterdiği izlendi.

IL-6 ve IL-6R artışı PDR'de NPDR grubundan fazlaydı, ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi. Buna karşın, diyabetik retinopati grubunda IL-6 düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunun gösterildiği Yao ve ark. (151) 2019'da yaptığı bir meta-analizde, alt grup analizi yapılmış ve PDR grubundaki IL-6 düzeyleri de NPDR grubundakilerden daha yüksek saptanmıştır. Literatür çalışmalarına bakıldığında farklı sonuçların bulunması, NPDR ve PDR hastalarında IL-6 ve IL-6R gen ekspresyonu düzeylerinin başka çalışmalar ile derinleştirilmesini gerekli kılmaktadır.

Hedef hücrelerde IL-6'nın aşırı salınımı, JAK/STAT sinyal yolunun güçlü bir aktivatörüdür. IL-6, epitelyal-mezenkimal geçiş sürecini teşvik etmek için bu yolu aktive ederek proinflamatuvar bir rol oynamaktadır (152, 153). IL-6/JAK2/STAT3 sinyal yolu, önemli

inflatuar sinyal yollarından biridir. İmmün regülasyon, anjiyogenez, hücre proliferasyonu ve farklılaşması gibi birçok fizyolojik ve patolojik sürece katılır (154). Ayrıca IL-6/JAK2/STAT3 yolunun aktivasyonu, EMT ve tümörün oluşumu, gelişimi, metastazı ve invazyonu gibi biyolojik davranışlarla yakından ilişkili olup, anormal ekspresyonu tümör prognozu açısından yol gösterici öneme sahiptir (155).

Feng ve ark. (156) 2023'te Eriokaliksin'in in vitro insan lens epitel hücrelerinde JAK/STAT3 yolunu inhibe ederek hücre büyümesini, metastazını ve iltihaplanmasını engellediğini göstermişlerdir. Eriokaliksin uygulanan grupta, kontrol grubuna kıyasla TNF-a, IL-1 β , IL-6, p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3, α -SMA ve SNAIL seviyelerinin aşağı doğru düzenlendiği raporlanmıştır. Başka bir çalışmada bir tümör baskılayıcı gen olan ING5'in, EGFR ve IL-6 üretimini inhibe ederek, Wnt/ β -katenin yolunu etkisizleştirilmesi aracılığıyla JAK2/STAT3 ve AKT yollarını etkisiz hale getirdiği; dolayısıyla akciğer kanserinde metastazı önlediği tespit edilmiştir (157).

Çalışmamızda JAK-2 gen ekspresyonunun PDR ve NPDR gruplarında, NRDM grubuna kıyasla artış gösterdiği ancak gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Moleküler düzeyde hedef genlerin bilinmesi nedeniyle JAK-2'nin diyabetik retinopati patogenezinde rol oynadığı aşikardır. Başka çalışmalar ile JAK-2 ekspresyonunun diyabetik retinopati şiddetindeki rolünün aydınlatılması gerekmektedir.

Çalışmalar göstermektedir ki, IL-6 aşağı akış kaskadı JAK2/STAT3 yolunun aktivasyonunu indükleyerek hücre çoğalması, farklılaşması, anjiyogenezi ve bağışıklık sisteminden tümör hücresi kaçışını artırır (158). Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü olan STAT3, diyabetik retinopati patogenezinde de yer alan sinyal dönüştürücü ailesinin bir üyesidir. Sitoplazmada aktif olmayan bir monomer formunda bulunan STAT3'ün, fosforilasyondan sonra SNAI, SLUG, ZEB1, TWIST gibi proteinlerin transkripsiyonunu düzenlemek üzere, monomerleri toplanarak çekirdeğe aktarılır. Epitelyal mezenkimal dönüşümün önemli bir sinyal yolu olan JAK2/STAT3 kaskadı, hücre dışı matris oluşturma, inflammatuar, apoptotik ve hücrel sinyal proteinlerini üreten genlerin ekspresyonunu kontrol eder (159).

Literatürde STAT3'ün EMT'yi arttırdığı ile ilgili çalışmalar bildirilmiştir. Zhao ve ark. (119) akciğer adenokarsinomunda, EMT'nin altında yatan mekanizmaları ve bu sürecin nasıl inhibe edilebileceğini araştırmış; bir anti-diyabetik ilaç olan metforminin, akciğer kanseri hücrelerinde IL-6 kaynaklı STAT3 aktivasyonunu ve EMT'yi baskıladığını kanıtlamıştır. Bir başka çalışmada Xiong ve ark. (118) kolorektal kanser hücrelerinde, STAT3'ün yıkılması

sonucunda, E-kadherin ekspresyonunda önemli bir artış; N-kadherin ve vimentin ekspresyonunda azalma olduğunu bildirmiştir.

Çalışmamızda STAT3 ekspresyonu hem histopatolojik hem de gen ekspresyonu yönünden araştırıldı. İHK STAT3 ekspresyonu, PDR grubunda NRDM grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yüksek tespit edildi. PDR grubunda İHK STAT3 ekspresyonu, NPDR grubuna göre fazla olmasına rağmen aralarında istatistiksel olarak fark bulunmadı.

qRT-PCR sonuçlarında ise STAT3 gen ekspresyonun, İHK sonuçlarına benzer olarak, PDR grubunda kontrol grubuna kıyasla yukarı regüle olduğu görüldü. Ayrıca PDR ve NPDR grupları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı saptandı. Bu bağlamda, diyabetik retinopati şiddeti ile STAT3 gen ekspresyonu aktivitesinin yakından ilişkili olduğu söylenebilir. STAT3 aktivitesinin, diyabetik retinopatinin ilerlemesi ile ilişkili olduğu, Chen ve ark. (160) Tip 1 diyabeti olan fareler üzerine yaptığı çalışmada da kanıtlanmıştır. STAT3'ün inhibisyonu Tip1 DM farelerde retinal inflamasyonu ve hücre ölümünü azaltmıştır. Çalışmamızda PDR grubunda qRT-PCR ile STAT3 ekspresyonun, NPDR grubundan anlamlı olarak fazla olması daha önceki çalışmalar ile benzerdi.

Diyabetik katarakt EMT'sinde önemli transkripsiyon faktörlerinden biri SNAIL1'dir. Zhang ve ark. (161) in vitro diyabetik katarakt modelinde MiR-30a-5p'nin aşırı ekspresyonun, bilinen bir EMT modülatörü olan SNAIL1'in ve E-kadherinin ekspresyonunu azalttığını; miR-30a'nın insan diyabetik katarakt için SNAIL1'i hedefleme yoluyla EMT'yi baskılayabilecek yeni bir terapötik müdahale hedefi olduğunu saptadı. Ye ve ark. (162) 2020'de, Metastazla ilişkili akciğer adenokarsinomu transkript 1'in (MALAT1) yüksek glikoz koşulları altında insan lens epitel hücrelerinde EMT'nin düzenlenmesindeki işlevini ve mekanizmasını araştırmayı amaçlamıştır. MALAT1, α -SMA, nükleer faktör eritroid türevi 2 (NRF2) ve fibronektinin diyabetik katarakt hastalarının lens epitel hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği; E-kadherin ve ZO-1 ekspresyonlarının azaldığı, ayrıca MALAT1'in, EMT'yi ROS/NRF2/Notch1/SNAIL1 yoluyla düzenlediği raporlanmıştır.

Yapılan çalışmada qRT-PCR ile SNAIL1 ekspresyonun PDR ve NPDR gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği izlendi. PDR ve NPDR gruplarında sırasıyla 18 ve 33 kat daha yüksek aktivitede SNAIL1 ekspresyonu saptandı. Bu sonuçlar SNAIL1'in diyabetik katarakt EMT'sinde rol aldığını göstermektedir. Ancak, PDR grubundaki artış, NPDR grubuna kıyasla daha azdı, bunun sebebi açıklanamadı. Literatürde PDR ve NPDR insan lens epiteli SNAIL1 ekspresyonu hakkında çalışmaya rastlanmadı. Diyabetik katarakt patogenezinde SNAIL1 rolünün anlaşılması için başka araştırmalara ihtiyaç vardır.

EMT transkripsiyon faktörlerinden, SNAIL ailesi proteinleri SNAI1 ve SLUG (SNAI2), hem fizyolojik hem de patolojik EMT'de önemli roller oynar (163). SLUG da dahil olmak üzere SNAIL ailesi E-kadherinin transkripsiyonel baskılayıcısı olarak tanımlanmıştır (164). Bu bağlamda, Wu ve ark. (165) 2021'de fruktozun neden olduğu tip 2 DM'li farelerin lens epitel hücrelerinde SNAI1 ve SLUG gibi EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin düzeyi artarken, EMT'yi azalttığı bilinen 3H-1,2-dithiole-3-thione (D3T) uygulamasının, bu etkiyi tersine çevirdiğini raporlamıştır.

Çalışmamızda qRT-PCR sonuçlarında SLUG ekspresyonunun NPDR grubunda 9,6 kat, PDR grubunda 20 kat fazla aktivite gösterdiği tespit edildi. Çalışma grupları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlıydı; PDR grubunda SLUG ekspresyonunun NPDR'ye kıyasla 10 kat fazla olduğu gösterildi. Üç grup arasında da anlamlı fark olması, SLUG ekspresyonunun hem diyabetik retinopati şiddetinde hem de diyabetik katarakt EMT patogenezinde önemli role sahip olduğunu kanıtlar düzeydedir. Literatürde PDR, NPDR ve NRDM grupları arasında SLUG ekspresyonunun karşılaştırıldığı çalışma olmaması açısından bu çalışma önem arz etmektedir.

EMT, hücre-hücre bağlantılarının çözünmesini ve apikal-bazolateral polaritenin kaybını içeren, epitel hücrelerinin invaziv özelliklere sahip göçmen mezenkimal hücrelere geçişiyle sonuçlanan karmaşık bir süreçtir [12]. EMT sonrası mezenkimal hücreler, vimentin ve N-kadherin gibi mezenkimal belirteçlerle donatılmış, E-kadherin ve γ -katenin gibi epitelyal belirteçleri kaybetmiştir. E-kadherin ekspresyonunun kaybı EMT sürecinin bir özelliği olarak kabul edilir [13]. Bu transformasyon sırasında SNAIL, SLUG, ZEB1, ZEB2, TWIST gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri, E-kadherin ifadesini baskılayan anahtar kontrolörlerdir. MikroRNA'lar (miRNA), ZEB1 ve ZEB2 gibi E-kadherinin doğrudan baskılanmasında rol oynayan anahtar transkripsiyon faktörlerini hedefleyerek EMT düzenlemesinde de yer alır (166, 167).

Literatürde ZEB1 ekspresyonunun diyabetik retinopati patogenezindeki rolü hakkında çalışmaya rastlanmadı. Kanser hücrelerinde ZEB1 ekspresyonunun EMT üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Lens epitel hücrelerinde ZEB proteinini, katarakt cerrahisi sonrası gelişen arka kapsül opasifikasyonu patomekanizmasındaki rolü açısından incelenmiştir. Katarakt cerrahisinin en yaygın yan etkisi olan arka kapsül opasifikasyonun, rezidüel lens epitel hücrelerinin hücre farklılaşmasına veya epitelyal-mezenkimal geçişe maruz kalmasıyla ortaya çıktığı kanıtlanmıştır (168). Abby ve ark. (169) 2014'te bir fare modelinde katarakt ameliyatı üzerine yaptıkları çalışmada ZEB transkripsiyon faktörlerinin, katarakt ameliyatından sonra epitelyal-mezenkimal geçişe bağlı gelişen arka kapsül opasifikasyonun ortaya çıkmasında rol oynadığını bildirmiştir. Başka bir çalışmada da metformin, diğer kanser türlerinde EMT'yi ve

JAK2/STAT3 fosforilasyonunu inhibe edebildiğinden, meme kanserinde IL-6 kaynaklı EMT'ye etkisi araştırılmış; metforminin transkripsiyon faktörleri ZEB1, TWIST1 ve SLUG gibi EMT mekanizmasının temel sürücülerinin ekspresyonunu azaltarak meme kanseri kök hücre EMT'sini düzenleyebildiği saptanmıştır (119, 170). Xiong ve ark. (171) kolorektal kanserde EMT üzerine yapılan çalışmada, STAT3'ün aşırı ekspresyonun, kanser hücrelerinde ZEB1 ekspresyonunu pozitif etkileyerek, E-kadherini önemli ölçüde azalttığını, N-kadherin ve vimentin ekspresyonlarını arttırdığını ifade etmiştir.

Çalışmamızda ZEB1 de, STAT3 gibi hem histopatolojik hem de gen ekspresyonu yönünden araştırıldı. İHK ZEB1 ekspresyon düzeyinin, PDR ve NPDR gruplarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği saptandı. PDR grubunda NPDR grubuna göre ZEB1 ekspresyonu daha yüksek olmasına rağmen aralarında anlamlı fark izlenmedi.

qRT-PCR ZEB1 gen ekspresyonunun ise, PDR ve NPDR'de kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 45 kat ve 21 kat yüksek aktivite gösterdiği bulundu. Bu ZEB1'in diyabetik katarakt EMT'sinde yer aldığını göstermiştir. Ayrıca ZEB1 ekspresyonun PDR'de, NPDR grubuna kıyasla anlamlı olarak 24 kat daha fazla olduğu izlendi. Bu bağlamda çalışmamız ZEB1'in diyabetik retinopati şiddeti ile korele olduğu hakkında bilgi sağlamakta olup, ZEB1 ekspresyonun diyabetik retinopati şiddeti üzerine etkisi açısından ilk bulguları sunmuştur.

E-kadherin, epitelyal hücre morfolojisinin korunmasında temel rol oynayan hücre-hücre yapışma bağlantılarının merkezi bir bileşeni olup, E-kadherin ifadesinin kaybı EMT'nin ayırt edici bir özelliğidir (172-174). TWIST, E-kadherin ekspresyonunu baskılayan EMT'nin temel indükleyicilerindendir. Yapılan bir çalışmada, C vitamininin epitelyal-mezenkimal transformasyon üzerindeki etkisini doğrulamak için insan lens hücre kültüründe TWIST ekspresyonu incelenmiş; C vitaminin TWIST ve N-kadherin ekspresyonunu azalttığı, E-kadherin ifadesinin yukarı doğru düzenlediği raporlanmıştır (175). Boye ve ark. (122) 2010'da pankreas kanserinde önemli bir EMT belirteci olan S100A4'ün ekspresyon seviyesinde önemli bir artış olurken, E-kadherin'in belirgin şekilde azaldığını bildirmişlerdir. S100A4 geninin, EMT sırasında diğer mezenkimal belirteçlerle birlikte TWIST ve SNAIL'in ekspresyonunu teşvik ettiği gösterilmiştir (123). Başka bir çalışmada, yüksek düzeyde metastatik meme karsinomu hücrelerinde, artmış TWIST ekspresyonu, E-cadherin ekspresyonu kaybıyla ilişkilendirilmiştir. TWIST ekspresyonun, E-kadherin aracılı hücre-hücre yapışmasının kaybına, mezenkimal işaretleyicilerin aktivasyonuna ve hücre hareketliliğinin indüklenmesine neden olduğu; TWIST'in epitelyal-mezenkimal geçişi teşvik ederek metastaza katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (176).

Çalışmamızda qRT-PCR TWIST ekspresyon düzeyinin, PDR grubunda NRDM grubuna kıyasla 26 kat, NPDR grubuna kıyasla 23 kat yukarı yönde regüle olduğu tespit edildi. Çalışma grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olması, diyabetik retinopati gelişme şiddetinde TWIST'in rolü olabileceğini göstermektedir. Bu bağlamda, diyabetik katarakta TWIST aracılı EMT aktivasyonun yukarı doğru düzenlendiği ortaya konuldu.

Diyabetik katarakt, kan şekeri yüksek olan hastalarda sıklıkla erken yaşlarda ortaya çıkar ve hızlı ilerler (1, 177). Lens epitel hücrelerinin doğru farklılaşması ve morfolojisi merceğin normal şeffaflığını korurken, hücrelerdeki gelişim, proliferasyon, farklılaşma ve apoptozdaki patolojik değişiklikler katarakta yol açabilir (178, 179). Katarakt oluşumunun ilerlemesinde, epitelyal hücrenin lif hücrelerine farklılaşması sırasında EMT' nin varlığı rapor edilmiştir (180, 181).

Lens epitel hücrelerinin epitelyal-mezenkimal geçişinin diyabetik katarakt patogenezinde rol oynadığı rapor edilmiştir ve çok sayıda çalışma, yüksek glikozun lens epitel hücrelerinde hem in vivo hem de in vitro EMT sürecini desteklediğini göstermiştir (182, 183). EMT, N-kadherin, α -SMA gibi mezenkimal biyobelirteçlerin yukarı regülasyonu ve E-kadherin gibi epitelyal hücre biyobelirteçlerinin aşağı regülasyonu ile epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelere farklılaşmasıdır (184, 185). Lens epitel hücrelerinin anormal EMT'si meydana geldiğinde, bu hücreler, artmış göç kapasitesi, invazyon, apoptoza karşı direnç ve katarakt oluşumuna da katkıda bulunan hücre dışı matriks bileşeninin artan üretimi dahil olmak üzere mezenkimal hücrelerin fenotip özelliklerine ulaşır (186, 187).

Du ve ark. (182) diyabetik katarakt yönetimi ve tedavisindeki üzerine yaptıkları çalışmada streptozotosin enjeksiyonu sonrası diyabetik farelerde azalmış antioksidan fonksiyon, artmış poliol yolu aktivitesi ve enzimatik olmayan glikasyonun eşlik ettiği lens opaklığı ve önemli ölçüde artan α -SMA ve azalan E-kadherin ifadeleriyle EMT'yi kanıtlamışlardır. Diyabetik farelerde bir flavonoid olan quercetin ile tedavi sonrası oksidatif stresin iyileştiği, aldoz redüktaz aktivasyonunun inhibe olduğu, ileri glikasyon son ürün üretiminin azaldığı ve erken aşamalarda EMT'nin baskılandığı saptanmıştır. Chen ve ark. (188) 2023'te diyabetik farelere uygulanan nano-Dapa damlası veya oral Dapa'nın ileri glikasyon ürünlerinin reseptörü kaynaklı EMT'yi başarıyla azalttığını, böylece diyabetik hastalarda katarakt patogenezinin önleyebildiğini bildirmiştir. Diyabetik farelerin lens epitel hücrelerinde yüksek seviyelerde bulunan N-kadherin, Dapa uygulaması sonrası azalmış, E-kadherin seviyesi yükselmiştir.

EMT, diyabetik retina açısından incelenmiş, diyabetik retinopatinin fibrozisinde EMT'nin patojenik bir rol oynadığı anlaşılmıştır. Bir çalışmada, diyabetik farelerin retina

pigment epitel hücre kültürlerinde E-kadherin ekspresyonu azalırken, SNAIL, N-kadherin, vimentin, β -katenin ve α -SMA seviyelerinin anlamlı düzeyde arttığı raporlanmıştır (189).

Çalışmamızda E-kadherin ve N-kadherin seviyeleri hem İHK hem qRT-PCR ile gen ekspresyonu açısından araştırıldı. E-kadherin ekspresyonun İHK ve qRT-PCR ile değerlendirilmesinde farklı sonuçlar elde edildi. İHK E-kadherin ekspresyonun PDR grubunda artmış olduğu saptandı. Diyabetik retinopati gelişimi ile EMT'nin korelasyon gösterdiği daha önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır. Bu bağlamda, E-kadherin seviyelerinin diyabetik retinopati şiddetinin yüksek olduğu PDR grubunda daha düşük olması beklenmekteydi, bulgular bununla uyumlu değildi ve sebebi açıklanamadı.

qRT-PCR E-kadherin ekspresyonu açısından gruplar incelendiğinde PDR grubunda E-kadherin ekspresyonun diğer gruplara kıyasla anlamlı olarak aşağı yönde regüle olduğu saptandı. Epitel hücrelerinde mezenkimal farklılaşmanın bir belirtici olan E-kadherin kaybının diyabetik retinopatinin şiddetli olduğu grupta daha fazla olması, literatürdeki diğer çalışmaları desteklemektedir.

İHK N-kadherin ekspresyonu, PDR grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek saptandı. Bu bulgu, diyabetik katarakt EMT'sinde N-kadherin düzeyinin arttığını desteklemektedir. PDR ve NPDR grupları arasında fark olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı değildi. qRT-PCR N-kadherin sonuçları ise N-kadherinin PDR grubunda NRDM'ye kıyasla 21 kat, NPDR'ye kıyasla 19 kat daha yüksek aktivitede olduğunu gösterdi. N-kadherin İHK ve qRT-PCR gen ekspresyon sonuçları birbiri ile uyumluydu. Çalışmamız N-kadherinin hem diyabetik katarakt EMT'sinde hem de diyabetik retinopati gelişme sürecinde rol aldığını kanıtlamaktadır.

NPDR ve PDR grupları arasında bazı gen ekspresyonları açısından anlamlı farklılık saptanması, diyabetik retinopati düzeyi ile EMT arasında bazı genler açısından korelasyon olduğunu kanıtlar düzeydedir. STAT3, SLUG (SNAIL2), ZEB1, TWIST ve N-kadherin ekspresyonu diyabetik retinopati düzeyi ile ilişkilendirildi.

İki farklı laboratuvarında incelenen lens kapsülü örneklerinde, STAT3, ZEB1 ve N-kadherinin hem İHK hem qRT-PCR ile gen ekspresyon düzeylerinin diyabetik katarakt olan hastalarda benzer düzeyde artmış saptanması sonuçların güvenilirliğini desteklemesi açısından oldukça önemlidir.

En azından bizim ulaşabildiğimiz veri tabanlarında yaptığımız araştırmaya göre bu tez, EMT aktivasyonunda rol alan genlerin proliferatif ve proliferatif olmayan diyabetik retinopatili katarakt lens epitel hücrelerinde karşılaştırmalı olarak incelendiği ilk araştırma bulgularını

sunmaktadır. Çalışmamızın diyabetik retinopati gelişme patomekanizmasının aydınlatılmasında faydalı olabileceği düşünülmektedir.



SONUÇLAR

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Göz Hastalıkları ameliyathanesinde Mart 2023-Şubat 2024 tarihleri arasında katarakt cerrahisi yapılan 79 hasta baz alınmıştır. Katarakt cerrahisi sırasında göz dışına alınan kapsüller toplandı ve gruplara ayrıldı. Çalışma grupları 28 nonprolifereatif diyabetik retinopatisi olan (28 göz) ve 25 proliferatif retinopatisi olan (25 göz); kontrol grubu olarak 26 diyabetik retinopati bulgusu olmayan (26 göz) gönüllü dahil edilen çalışmada, kataraktlı lens epitel hücrelerinde JAK/STAT sinyali üzerinden EMT aktivasyonunu araştırmak üzere tıbbi patoloji laboratuvarında HE boyama, STAT3, ZEB1, E-kadherin ve N-kadherin İHK ekspresyonları; tıbbi biyoloji laboratuvarında qRT-PCR ile IL-6, IL-6R, JAK-2, STAT3, SNAI1, SLUG, ZEB1, TWIST, E-kadherin ve N-kadherin gen ekspresyonları araştırılmıştır. Prospektif kesitsel araştırmamızda elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmuştur:

1. Lens epitel hücrelerinde başlıca PDR grubunda olmak üzere diyabetik retinopati gruplarının her ikisinde dejeneratif değişiklikler izlenmiştir.
2. Bazal membran kalınlığının diyabetik retinopati gelişen olgularda artmış olduğu saptandı. Diyabetik retinopatili gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında PDR'de NPDR grubuna kıyasla bazal membranın daha kalın olduğu, iki grup arasında istatistiksel fark olmadığı kaydedildi. NPDR grubu yaş ortalamasının daha yüksek olmasından ötürü, bazal membran kalınlığının yaşa bağlı değişmesinin sonuçları etkilemiş olabileceği düşünülmüştür.
3. IL-6, IL-6R ve JAK-2 ekspresyonu açısından hastalar arasında geniş bir varyasyon bulundu. Bu varyasyonlar sonucunda PDR grubunda daha yüksek fark olsa da istatistiksel olarak anlamlı sonuç saptanmadı.
4. NPDR ve PDR grupları arasında STAT3, SLUG (SNAI2), ZEB1 ve TWIST transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunda anlamlı fark tespit edilmesi, bu genlerin hem

diyabetik katarakt EMT'sinde hem de diyabetik retinopati gelişmesinde rol aldığını düşündürmüştür.

5. STAT3, ZEB1 ve N-kadherin gen ekspresyon seviyesinin diyabetik kataraktı olan hastalarda anlamlı düzeyde arttığı, İHK sonuçlarında elde edilen protein düzeylerinin de gen ekspresyon sonuçlarımızı desteklediği belirlendi.

6. Hem İHK hem de qRT-PCR sonuçlarımız EMT belirteci olan E-kadherin kaybının, proliferatif diyabetik retinopati olgularında daha fazla olduğunu gösterdi.

7. Bir diğer EMT belirteci olan N-kadherin artışının, diyabetik retinopati seviyesi ile korele olduğu saptandı. Sonuçlarımız N-kadherinin hem diyabetik katarakt EMT'sinde hem de diyabetik retinopati gelişme patomekanizmasında rol aldığını düşündürmektedir.



ÖZET

Bu çalışma, diyabetik katarakt gelişme patomekanizmasının aydınlatılması, gelişmesinin önlenmesi için Janus kinaz/Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörünün sinyal artışına bağlı gelişen diyabetik katarakta epitelyal-mezenkimal transformasyonun aydınlatılması amacıyla tasarlanmıştır. Ayrıca diyabetik retinopati seviyesinin artmasında muhtemel rol aldığı düşünülen transkripsiyon faktörleri de araştırılmıştır.

28 proliferatif olmayan diyabetik retinopati tanılı, 25 proliferatif diyabetik retinopati tanılı toplam 53 diyabetik kataraktı olan hasta çalışma grubu olarak; 26 diyabetik retinopati bulgusu olmayan hasta kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Her gruptan rastgele 10'ar lens kapsülünde hematoksilen-eozin boyama ile histolojik değerlendirme ve morfometrik inceleme yapıldı; immunohistokimya ile Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3, Çinko parmak transkripsiyon faktörü, E-kadherin ve N-kadherin proteinlerinin ekspresyonları ölçüldü. Diğer kapsül örneklerinde İnterlökin 6/Janus kinaz/Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 ile ilişkili epitel mezankimal geçiş yolağı genleri olan İnterlökin 6, İnterlökin 6 reseptörü, Janus kinaz, Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3, Salyangoz ailesi transkripsiyon faktörleri, Çinko parmak transkripsiyon faktörü, Büküm ile ilgili protein, E-kadherin ve N-kadherin ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlendi.

Çalışmamızda lens epitel hücrelerindeki dejeneratif değişikliklerin ve bazal membran kalınlığının, diyabetik retinopati gelişen olgularda artmış olduğu gösterildi. Benzer şekilde, İnterlökin 6, İnterlökin 6 reseptörü ve Janus kinaz ekspresyonun da diyabetik retinopati bulguları olan olgularda daha yüksek olduğu ortaya kondu.

Diyabetik katarakt lens epitel hücrelerinin epitelyal-mezenkimal farklılaşmasında İnterlökin 6/Janus kinaz/Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 sinyal artışı ile

ilişkili Salyangoz ailesi transkripsiyon faktörleri, Çinko parmak transkripsiyon faktörü ve Büküm ile ilgili transkripsiyon faktörlerinin rol aldığı; bu genlerin ekspresyonun diyabetik retinopati düzeyi ile korele olduğu görüldü.

Epitelyal-mezenkimal transformasyon belirteci olan E-kadherin kaybının ve N-kadherin artışının proliferatif diyabetik retinopati olgularında daha fazla olduğu, N-kadherinin hem diyabetik katarakt hem de diyabetik retinopati gelişme patomekanizmasında rol aldığı gösterildi.

Sonuç olarak İnterlökin 6/Janus kinaz/Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 ilişkili diyabetik katarakt lens epitel hücrelerinin epitelyal-mezenkimal farklılaşmasında İnterlökin 6, İnterlökin 6 reseptörü, Janus kinaz, Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3, Salyangoz ailesi transkripsiyon faktörleri, Çinko parmak transkripsiyon faktörü, Büküm ile ilgili protein, E-kadherin ve N-kadherin genlerinin rol aldığını, diyabetik kataraktlı lens epitel hücrelerinde E-kadherinin azaldığını, N-kadherinin arttığını gözlemledik.

Diyabetik kataraktta epitelyal-mezenkimal transformasyon patogenezinde rol oynayan genlerin işlevinin anlaşılması için yaptığımız çalışmanın diyabetik katarakt için moleküler hedefli yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine katkıda bulunacağı kanaatindeyiz.

SUMMARY

This study was designed to elucidate the pathomechanism of diabetic cataract development and to elucidate the epithelial-mesenchymal transformation in diabetic cataract due to increased signaling of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription. We also investigated transcription factors possibly involved in the increased level of diabetic retinopathy.

A total of 53 diabetic cataract patients (28 with non-proliferative diabetic retinopathy and 25 with proliferative diabetic retinopathy) were included as the study group and 26 patients without diabetic retinopathy were included as the control group. Histologic evaluation and morphometric examination with hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry were performed on 10 lens capsules randomly from each group and the expression of Signal transducer and activator of transcription 3, Zinc finger transcription factor, E-cadherin and N-cadherin proteins were measured. Interleukin 6, Interleukin 6 receptor, Janus kinase, Interleukin 6 receptor, Janus kinase, Interleukin 6/Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription 3-related epithelial mesenchymal transition pathway genes were detected in other capsule samples, Signal transducer and activator of transcription 3, Snail family transcription factors, Zinc finger transcription factor, Twist-related protein, E-cadherin and N-cadherin expression levels were determined by real-time polymerase chain reaction.

Our study showed that degenerative changes in lens epithelial cells and basement membrane thickness were increased in patients with diabetic retinopathy. Similarly, Interleukin 6, Interleukin 6 receptor and Janus kinase expression were also found to be higher in patients with diabetic retinopathy.

Interleukin 6/Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription 3 signaling-related Snail family transcription factors, Zinc finger transcription factor and Twist-related

transcription factors were found to be involved in epithelial-mesenchymal differentiation of diabetic cataract lens epithelial cells and the expression of these genes correlated with the level of diabetic retinopathy.

Loss of E-cadherin, a marker of epithelial-mesenchymal transformation, and increase in N-cadherin were higher in proliferative diabetic retinopathy cases, and N-cadherin was shown to be involved in the pathomechanism of both diabetic cataract and diabetic retinopathy.

In conclusion, Interleukin 6, Interleukin 6 receptor, Janus kinase, Janus kinase, Signal transducer and activator of transcription 3, Signal transducer and activator of transcription 3 in the epithelial-mesenchymal differentiation of diabetic cataract lens epithelial cells, We observed that snail family transcription factors, zinc finger transcription factor, twist-related protein, E-cadherin and N-cadherin genes are involved, E-cadherin decreased and N-cadherin increased in diabetic cataract lens epithelial cells.

We believe that our study to understand the function of genes involved in the pathogenesis of epithelial-mesenchymal transformation in diabetic cataract will contribute to the development of new molecularly targeted treatment options for diabetic cataract.

KAYNAKLAR

1. Harding JJ, Egerton M, Van Heyningen R, Harding R. Diabetes, glaucoma, sex, and cataract: analysis of combined data from two case control studies. *British Journal of Ophthalmology* 1993;77(1):2-6.
2. Gordis L, Gold E, Seltser R. Privacy protection in epidemiologic and medical research: A challenge and a responsibility. *American Journal of Epidemiology* 1977;105(3):163-8.
3. Stanga P, Boyd S, Hamilton A. Ocular manifestations of diabetes mellitus. *Current Opinion in Ophthalmology* 1999;10(6):483-9.
4. Klein BE, Klein R, Moss SE. Prevalence of cataracts in a population-based study of persons with diabetes mellitus. *Ophthalmology* 1985;92(9):1191-6.
5. Nielsen NV, Vinding T. The prevalence of cataract in insulin-dependent and non-insulin-dependent-diabetes mellitus. *Acta Ophthalmologica* 1984;62(4):595-602.
6. Benson WE. Cataract surgery and diabetic retinopathy. *Current Opinion in Ophthalmology* 1992;3(3):396-400.
7. Ederer F, Hiller R, Taylor HR. Senile lens changes and diabetes in two population studies. *American Journal of Ophthalmology* 1981;91(3):381-95.
8. Hegde KR, Kowluru RA, Mohr S, Nagaraj RH, Petrash JM. New horizons in research on diabetic complications of the eye: special emphasis on diabetic cataracts and retinopathy. *Journal of Ophthalmology* 2010;979040.
9. Semeraro F, Cancarini A, Rezzola S, Romano M, Costagliola C. Diabetic retinopathy: vascular and inflammatory disease. *Journal of Diabetes Research* 2015;2015.
10. Mohamed Q, Gillies MC, Wong TY. Management of diabetic retinopathy: A systematic review. *Jama* 2007;298(8):902-16.

11. Wang S-W, Sun Y-M. The IL-6/JAK/STAT3 pathway: Potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer. *International Journal of Oncology* 2014;44(4):1032-40.
12. Noma H, Funatsu H, Mimura T, Harino S, Hori S. Vitreous levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor in macular edema with central retinal vein occlusion. *Ophthalmology* 2009;116(1):87-93.
13. Jonas JB, Tao Y, Neumaier M, Findeisen P. Cytokine concentration in aqueous humour of eyes with exudative age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmologica* 2012;90(5):e381-e8.
14. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *International Journal of Biological Sciences* 2012;8(9):1237.
15. Joussen AM, Doehmen S, Le ML, Koizumi K, Radetzky S, Krohne TU, et al. TNF- α mediated apoptosis plays an important role in the development of early diabetic retinopathy and long-term histopathological alterations. *Molecular Vision* 2009;15:1418.
16. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139(5):871-90.
17. Cavallaro U, Liebner S, Dejana E. Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. *Experimental cell research* 2006;312(5):659-67.
18. Dai E, Boulton ME. Basic Science of the lens. *Ophthalmology* Edinburgh: Mosby/Elsevier 2008:381-93.
19. Seland JH. The lens capsule and zonulae. *Acta Ophthalmologica* 1992;70(S205):7-12.
20. Anatomy, in Lens and Cataract. American Academy of Ophthalmology, Section 11 2016-2017;188.
21. Negishi K, Bissen-Miyajima H, Kato K, Kurosaka D, Nagamoto T. Evaluation of a zonal-progressive multifocal intraocular lens. *American Journal of Ophthalmology*. 1997;124(3):321-30.
22. Ozcetin H. Güncel katarakt cerrahisi. İstanbul SCA LA Yayıncılık 2005;299-390.
23. Ozcetin H. Lens ve hastalıkları Klinik Göz Hastalıkları: Nobel Kitapevi İstanbul 2003;104
24. Anatomy in Ophtalmology 2007.
25. Brown NP, Bron AJ. Lens disorders: A clinical manual of cataract diagnosis. *Ophthalmic Literature* 1996;1(49):64.
26. Hoehenwarter W, Klose J, Jungblut PR. Eye lens proteomics. *Amino Acids* 2006;30:369-89.

27. Huang CH, Wang YT, Tsai CF, Chen YJ, Lee JS, Chiou SH. Phosphoproteomics characterization of novel phosphorylated sites of lens proteins from normal and cataractous human eye lenses. *Molecular Vision* 2011;17:186.
28. Andley UP. Crystallins in the eye: Function and pathology. *Progress in retinal and eye Research* 2007;26(1):78-98.
29. Kuszak J. The ultrastructure of epithelial and fiber cells in the crystalline lens. *International Review of Cytology* 1995;163:305-50.
30. Meyer D, Liebenberg P. Cataract etiology: A comprehensive review. *Clinical Practice in Small Incision Cataract Surgery* 2004:33-84.
31. Glover TD, Constantinescu GM. Surgery for cataracts. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 1997;27(5):1143-73.
32. Hiller R, Sperduto RD, Ederer F. Epidemiologic associations with cataract in the 1971–1972 National Health and Nutrition Examination Survey. *American Journal of Epidemiology* 1983;118(2):239-49.
33. Gupta VB, Rajagopala M, Ravishankar B. Etiopathogenesis of cataract: An appraisal. *Indian Journal of Ophthalmology* 2014;62(2):103.
34. Hiller R, Sperduto RD, Ederer F. Epidemiologic associations with nuclear, cortical and posterior subcapsular cataracts. *American Journal of Epidemiology* 1986;124(6):916-25.
35. Cumming RG, Mitchell P, Smith W. Diet and cataract: The blue mountains eye study. *Ophthalmology* 2000;107(3):450-6.
36. Leske MC, Wu SY, Hyman L, Sperduto R, Underwood B, Chylack LT, et al. Biochemical factors in the lens opacities case-control study. *Archives of Ophthalmology* 1995;113(9):1113-9.
37. Gupta S, Selvan VK, Agrawal S, Saxena R. Advances in pharmacological strategies for the prevention of cataract development. *Indian Journal of Ophthalmology* 2009;57(3):175.
38. Leske MC, Chylack LT, Wu S-Y. The lens opacities case-control study: Risk factors for cataract. *Archives of Ophthalmology* 1991;109(2):244-51.
39. Leske MC, Sperduto RD. The epidemiology of senile cataracts: A review. *American Journal of Epidemiology* 1983;118(2):152-65.
40. Harding J, Van Heyningen R. Epidemiology and risk factors for cataract. *Eye* 1987;1(5):537-41.
41. Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı Tedavi ve İzlem Klavuzu 2009.
42. David A, Antonetti RK, Thomas W Gardner. Diabetic retinopathy. *The New England Journal of Medicine* 2012;366(13):1227-39.

43. Karam TKY, Rao LG, Rao KA, Shenoy SB, Bhandary SV. Diabetic retinopathy in patients with diabetic foot syndrome in South India. *Indian Journal of Ophthalmology* 2018;547-50.
44. Thapa R, Bajimaya S, Sharma S, Rai B, Paudyal G. Systemic association of newly diagnosed proliferative diabetic retinopathy among type 2 diabetes patients presented at a tertiary eye hospital of Nepal. *Nepalese Journal of Ophthalmology: A Biannual Peer-reviewed Academic Journal of the Nepal Ophthalmic Society* 2015;7(1):26-32.
45. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy: III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Archives of Ophthalmology* 1984;102(4):527-32.
46. Yumnamcha T, Guerra M, Singh LP, Ibrahim AS. Metabolic dysregulation and neurovascular dysfunction in diabetic retinopathy. *Antioxidants* 2020;9(12):1244.
47. Ciulla TA, Amador AG, Zinman B. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema: pathophysiology, screening, and novel therapies. *Diabetes Care* 2003;26(9):2653-64.
48. Wright Jr E, Scism-Bacon J, Glass L. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *International Journal of Clinical Practice* 2006;60(3):308-14.
49. Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, Chibber R. Pathophysiology of diabetic retinopathy. *International Scholarly Research Notices* 2013.
50. Lorenzi M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Journal of Diabetes Research* 2007.
51. Luo X, Wu J, Jing S, Yan L-J. Hyperglycemic stress and carbon stress in diabetic glucotoxicity. *Aging and Disease* 2016;7(1):90.
52. Nagai R, Murray DB, Metz TO, Baynes JW. Chelation: a fundamental mechanism of action of AGE inhibitors, AGE breakers, and other inhibitors of diabetes complications. *Diabetes* 2012;61(3):549-59.
53. Horal M, Zhang Z, Stanton R, Virkamäki A, Loeken MR. Activation of the hexosamine pathway causes oxidative stress and abnormal embryo gene expression: involvement in diabetic teratogenesis. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 2004;70(8):519-27.
54. Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, So WV, et al. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* 2008;451(7181):964-9.
55. Geraldine P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circulation Research* 2010;106(8):1319-31.
56. Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279(41):42351-4.

57. Cohen SR, Gardner TW. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Retinal Pharmacotherapeutics* 2016;55:137-46.
58. Jager A, van Hinsbergh VW, Kostense PJ, Emeis JJ, Yudkin JS, Nijpels G, et al. von Willebrand factor, C-reactive protein, and 5-year mortality in diabetic and nondiabetic subjects: the Hoorn Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1999;19(12):3071-8.
59. Klaassen I, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Progress in Retinal and Eye Research* 2013;34:19-48.
60. Wang W, Lo AC. Diabetic retinopathy: pathophysiology and treatments. *International journal of molecular sciences* 2018;19(6):1816.
61. El-Asrar AMA, De Hertogh G, van den Eynde K, Alam K, Van Raemdonck K, Opdenakker G, et al. Myofibroblasts in proliferative diabetic retinopathy can originate from infiltrating fibrocytes and through endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT). *Experimental Eye Research* 2015;132:179-89.
62. Adamis A. Is diabetic retinopathy an inflammatory disease? *BMJ Publishing Group Ltd* 2002;363-5.
63. Noda K, Nakao S, Ishida S, Ishibashi T. Leukocyte adhesion molecules in diabetic retinopathy. *Journal of Ophthalmology* 2012.
64. Romeo G, Liu W-H, Asnaghi V, Kern TS, Lorenzi M. Activation of nuclear factor- κ B induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes. *Diabetes* 2002;51(7):2241-8.
65. Zhang W, Liu H, Al-Shabrawey M, Caldwell RW, Caldwell RB. *Inflammation and diabetic retinal microvascular complications*. Elsevier 2011.
66. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. IX. Four-year incidence and progression of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmology* 1989;107(2):237-43.
67. Klein R, Klein BEK, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy: X. Four-year incidence and progression of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 years or more. *Archives of Ophthalmology* 1989;107(2):244-9.
68. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 1995;154(1):8-20.
69. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature reviews Molecular Cell Biology* 2006;7(2):131-42.
70. Kang Y, Massagué J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 2004;118(3):277-9.

71. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation* 2009;119(6):1420-8.
72. Lim J, Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development* 2012;139(19):3471-86.
73. Zeisberg M, Kalluri R. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2013;304(3):216-25.
74. Scheel C, Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: Concepts and molecular links. *Seminars in Cancer Biology* 2012.
75. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-74.
76. Huang RYJ, Guilford P, Thiery JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Science* 2012;125(19):4417-22.
77. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer* 2007;7(6):415-28.
78. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews* 2009;28:15-33.
79. Theveneau E, Mayor R. Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells. *Current Opinion in Cell Biology* 2012;24(5):677-84.
80. Takeichi M. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *The Journal of Cell Biology* 1977;75(2):464-74.
81. Takeichi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annual Review of Biochemistry* 1990;59(1):237-52.
82. Hulpiau P, Gul IS, Van Roy F. Evolution of cadherins and associated catenins. Tokyo: Springer Japan 2016;13-37.
83. Gul IS, Hulpiau P, Saeys Y, van Roy F. Evolution and diversity of cadherins and catenins. *Exp Cell Res* 2017;358(1):3-9.
84. Stemmler MP. Cadherins in development and cancer. *Molecular BioSystems* 2008;4(8):835-50.
85. Vestweber D. Cadherins in tissue architecture and disease. *Journal of Molecular Medicine* 2015;93:5-11.
86. Colas-Algora N, Millan J. How many cadherins do human endothelial cells express? *Cellular and Molecular Life Sciences* 2019;76:1299-317.
87. Parisini E, Higgins JM, Liu JH, Brenner MB, Wang JH. The crystal structure of human E-cadherin domains 1 and 2, and comparison with other cadherins in the context of adhesion mechanism. *Journal of Molecular Biology* 2007;373(2):401-11.

88. Loh CY, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, therapeutic implications and challenges. *Cells* 2019;8(10):1118.
89. Seddiki R, Narayana GHNS, Strale PO, Balcioglu HE, Peyret G, Yao M, et al. Force-dependent binding of vinculin to α -catenin regulates cell–cell contact stability and collective cell behavior. *Molecular Biology of The Cell* 2018;29(4):380-8.
90. Zaidel-Bar R. Cadherin adhesome at a glance. *Journal of Cell Science* 2013;126(2):373-8.
91. Bertocchi C, Wang Y, Ravasio A, Hara Y, Wu Y, Sailov T, et al. Nanoscale architecture of cadherin-based cell adhesions. *Nature Cell Biology* 2017;19(1):28-37.
92. Van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2008;65:3756-88.
93. Van Roy F. Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2014;14(2):121-34.
94. Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, Vandyke K. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer* 2018;18(1):1-16.
95. Wang M, Ren D, Guo W, Huang S, Wang Z, Li Q, et al. N-cadherin promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like traits via ErbB signaling in prostate cancer cells. *International Journal of Oncology* 2016;48(2):595-606.
96. Jennbacken K, Tešan T, Wang W, Gustavsson H, Damber JE, Welén K. N-cadherin increases after androgen deprivation and is associated with metastasis in prostate cancer. *Endocrine-related cancer* 2010;17(2):469-79.
97. Nagafuchi A. Molecular architecture of adherens junctions. *Current Opinion in Cell Biology* 2001;13(5):600-3.
98. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2012;13(12):767-79.
99. Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biology* 2000;2(2):84-9.
100. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology* 2000;2(2):76-83.
101. Gheldof A, Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 2013;116:317-36.
102. Ding W, You H, Dang H, LeBlanc F, Galicia V, Lu SC, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition of murine liver tumor cells promotes invasion. *Hepatology* 2010;52(3):945-53.

103. Grotegut S, von Schweinitz D, Christofori G, Lehenbre F. Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *The EMBO Journal* 2006;25(15):3534-45.
104. Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2005;21:659-93.
105. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research* 2009;19(2):156-72.
106. Shirakihara T, Saitoh M, Miyazono K. Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by δ EF1 proteins in epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β . *Molecular Biology of The Cell* 2007;18(9):3533-44.
107. Yang H, Wang L, Zhao J, Chen Y, Lei Z, Liu X, et al. TGF- β -activated SMAD3/4 complex transcriptionally upregulates N-cadherin expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2015;87(3):249-57.
108. Chen HH, Zhou XL, Shi YL, Yang J. Roles of p38 MAPK and JNK in TGF- β 1-induced human alveolar epithelial to mesenchymal transition. *Archives of Medical Research* 2013;44(2):93-8.
109. Ando K, Uemura K, Kuzuya A, Maesako M, Asada-Utsugi M, Kubota M, et al. N-cadherin regulates p38 MAPK signaling via association with JNK-associated leucine zipper protein: implications for neurodegeneration in Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286(9):7619-28.
110. Xu M, Wang S, Wang Y, Wu H, Frank JA, Zhang Z, Luo J. Role of p38 γ MAPK in regulation of EMT and cancer stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2018;1864(11):3605-17.
111. Li Q, Mattingly RR. Restoration of E-cadherin cell-cell junctions requires both expression of E-cadherin and suppression of ERK MAP kinase activation in Ras-transformed breast epithelial cells. *Neoplasia* 2008;10(12):1444-58.
112. Han HB, Gu J, Ji DB, Li ZW, Zhang Y, Zhao W, et al. PBX3 promotes migration and invasion of colorectal cancer cells via activation of MAPK/ERK signaling pathway. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 2014;20(48):18260.
113. Lamprecht S, Kaller M, Schmidt EM, Blaj C, Schiergens TS, Engel J, et al. PBX3 is part of an EMT regulatory network and indicates poor outcome in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 2018;24(8):1974-86.
114. Wang S, Li C, Wang W, Xing C. PBX3 promotes gastric cancer invasion and metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Oncology Letters* 2016;12(5):3485-91.
115. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science* 2004;117(8):1281-3.
116. Loh CY, Arya A, Naema AF, Wong WF, Sethi G, Looi CY. Signal transducer and activator of transcription (STATs) proteins in cancer and inflammation: Functions and therapeutic implication. *Frontiers in Oncology* 2019;9:48.

117. Geletu M, Arulanandam R, Chevalier S, Saez B, Larue L, Feracci H, et al. Classical cadherins control survival through the gp130/Stat3 axis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2013;1833(8):1947-59.
118. Xiong H, Hong J, Du W, Lin YW, Ren LL, Wang YC, et al. Roles of STAT3 and ZEB1 proteins in E-cadherin down-regulation and human colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry* 2012;287(8):5819-32.
119. Zhao Z, Cheng X, Wang Y, Han R, Li L, Xiang T, et al. Metformin inhibits the IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition and lung adenocarcinoma growth and metastasis. *Plos One* 2014;9(4):e95884.
120. Li X, Deng W, Nail CD, Bailey SK, Kraus MH, Ruppert JM, et al. Snail induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation. *Oncogene* 2006;25(4):609-21.
121. Xu X, Lu Y, Li Y, Prinz RA. Sonic Hedgehog signaling in thyroid cancer. *Frontiers in Endocrinology* 2017;8:284.
122. Xu X, Su B, Xie C, Wei S, Zhou Y, Liu H, et al. Sonic hedgehog-Gli1 signaling pathway regulates the epithelial mesenchymal transition (EMT) by mediating a new target gene, S100A4, in pancreatic cancer cells. *Plos One* 2014;9(7):96441.
123. Boye K, Mælandsmo GM. S100A4 and metastasis: A small actor playing many roles. *The American Journal of Pathology* 2010;176(2):528-35.
124. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science* 1997;275(5307):1787-90.
125. Hay E, Buczkowski T, Marty C, Da Nascimento S, Sonnet P, Marie PJ. Peptide-based mediated disruption of N-cadherin-LRP5/6 interaction promotes Wnt signaling and bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research* 2012;27(9):1852-63.
126. Heuberger J, Birchmeier W. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2010;2(2):a002915.
127. Nelson WJ. Regulation of cell–cell adhesion by the cadherin–catenin complex. *Biochemical Society Transactions* 2008;36(2):149-55.
128. Schlegelmilch K, Mohseni M, Kirak O, Pruszk J, Rodriguez JR, Zhou D, et al. Yap1 acts downstream of α -catenin to control epidermal proliferation. *Cell* 2011;144(5):782-95.
129. Dobrokhotov O, Samsonov M, Sokabe M, Hirata H. Mechanoregulation and pathology of YAP/TAZ via Hippo and non-Hippo mechanisms. *Clinical and Translational Medicine* 2018;7(1):1-14.
130. Klezovitch O, Vasioukhin V. Cadherin signaling: keeping cells in touch. *F1000 Research* 2015;4:550.

131. Kim NG, Koh E, Chen X, Gumbiner BM. E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;108(29):11930-5.
132. Furukawa KT, Yamashita K, Sakurai N, Ohno S. The epithelial circumferential actin belt regulates YAP/TAZ through nucleocytoplasmic shuttling of merlin. *Cell Reports* 2017;20(6):1435-47.
133. Zhou H, Li G, Huang S, Feng Y, Zhou A. SOX9 promotes epithelial-mesenchymal transition via the Hippo-YAP signaling pathway in gastric carcinoma cells. *Oncology Letters* 2019;18(1):599-608.
134. Han Q, Kremerskothen J, Lin X, Zhang X, Rong X, Zhang D, et al. WWc3 inhibits epithelial–mesenchymal transition of lung cancer by activating hippo-YaP signaling. *Oncology Targets and Therapy* 2018;2581-91.
135. Erol YO, Ozogul C, Elgin U, Helvacioğlu F, Zilelioglu O. Electron microscopic investigation of anterior lens capsule and epithelium in patients with diabetes mellitus. *International Journal of Clinical Medicine* 2018;9(10):778.
136. William K, Ovalle PCN. *Netter's Essential Histology*, 2nd Edition. Philadelphia: Saunders/Elsevier 2013;1-29.
137. Bron AJ, Brown NA, Harding JJ, Ganea E. The lens and cataract in diabetes. *International Ophthalmology Clinics* 1998;38(2):37-67.
138. Bakalian S. Anterior lens capsule thickness in diabetic and non-diabetic patients 2004.
139. Tang WH, Martin KA, Hwa J. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. *Front Pharmacology* 2012;3:87.
140. Mulhern ML, Madson CJ, Danford A, Ikesugi K, Kador PF, Shinohara T. The unfolded protein response in lens epithelial cells from galactosemic rat lenses. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2006;47(9):3951-9.
141. Straatsma BR, Lightfoot DO, Barke RM, Horwitz J. Lens capsule and epithelium in age-related cataract. *American Journal of Ophthalmology* 1991;112(3):283-96.
142. Ozdamar Y, Ozogul C, Elgin U, Acaroglu G, Helvacioğlu F, Zilelioglu O. Histopathologic investigation of anterior lens capsule in diabetic eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2010;51(13):4599-.
143. Funatsu H, Yamashita H, Noma H, Mimura T, Nakamura S, Sakata K, Hori S. Aqueous humor levels of cytokines are related to vitreous levels and progression of diabetic retinopathy in diabetic patients. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2005;243(1):3-8.
144. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *Journal Biological Chemistry* 1996;271(2):736-41.

145. Yun JH, Park SW, Kim KJ, Bae JS, Lee EH, Paek SH, et al. Endothelial STAT3 activation increases vascular leakage through downregulating tight junction proteins: implications for diabetic retinopathy. *Journal of Cellular Physiology* 2017;232(5):1123-34.
146. Jo DH, Yun JH, Cho CS, Kim JH, Kim JH, Cho CH. Interaction between microglia and retinal pigment epithelial cells determines the integrity of outer blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. *Glia* 2019;67(2):321-31.
147. Valle ML, Dworshak J, Sharma A, Ibrahim AS, Al-Shabrawey M, Sharma S. Inhibition of interleukin-6 trans-signaling prevents inflammation and endothelial barrier disruption in retinal endothelial cells. *Experimental Eye Research* 2019;178:27-36.
148. Robinson R, Srinivasan M, Shanmugam A, Ward A, Ganapathy V, Bloom J, et al. Interleukin-6 trans-signaling inhibition prevents oxidative stress in a mouse model of early diabetic retinopathy. *Redox Biology* 2020;34:101574.
149. Chen Y, Hao W, Wang M, Wu F, Long D, Li T, et al. Cytokine status and significant increase of IL-6 and sIL-6R in the aqueous humor of diabetic cataract patients revealed by quantitative multiplexed assays. *Journal of International Medical Research* 2023;51(9):3000605231175765.
150. Li H, Xu L, Song H. MiR-29a Alleviates High glucose-induced inflammation and mitochondrial dysfunction via modulation of IL-6/STAT3 in Diabetic Cataracts. *Current Eye Research* 2021;46(9):1325-32.
151. Yao Y, Li R, Du J, Long L, Li X, Luo N. Interleukin-6 and diabetic retinopathy: A systematic review and meta-analysis. *Current Eye Research* 2019;44(5):564-74.
152. Xiao J, Gong Y, Chen Y, Yu D, Wang X, Zhang X, et al. IL-6 promotes epithelial-to-mesenchymal transition of human peritoneal mesothelial cells possibly through the JAK2/STAT3 signaling pathway. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2017;313(2):310-8.
153. Singh AK, Bhadauria AS, Kumar U, Raj V, Rai A, Kumar P, et al. Novel Indole-fused benzo-oxazepines (IFBOs) inhibit invasion of hepatocellular carcinoma by targeting IL-6 mediated JAK2/STAT3 oncogenic signals. *Scientific Reports* 2018;8(1):5932.
154. Zhang X, Lu H, Hong W, Liu L, Wang S, Zhou M, et al. Tyrphostin B42 attenuates trichostatin A-mediated resistance in pancreatic cancer cells by antagonizing IL-6/JAK2/STAT3 signaling. *Oncology Reports* 2018;39(4):1892-900.
155. Xia XH, Xiao CJ, Shan H. Facilitation of liver cancer SMCC7721 cell aging by sirtuin 4 via inhibiting JAK2/STAT3 signal pathway. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences* 2017;21(6).
156. Feng X, Hu W, Wang G, Wang W. Eriocalyxin B mediates the migration and inflammation of TGF β 2 induced human lens epithelial cells by inhibiting JAK/STAT3 pathway. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2023;22:493-8.

157. Liu XL, Meng J, Zhang XT, Liang XH, Zhang F, Zhao GR, et al. ING5 inhibits lung cancer invasion and epithelial–mesenchymal transition by inhibiting the WNT/ β -catenin pathway. *Thoracic Cancer* 2019;10(4):848-55.
158. Fofaria NM, Srivastava SK. STAT3 induces anoikis resistance, promotes cell invasion and metastatic potential in pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* 2015;36(1):142-50.
159. Du Z, Shen Y, Yang W, Mecklenbrauker I, Neel BG, Ivashkiv LB. Inhibition of IFN- α signaling by a PKC- and protein tyrosine phosphatase SHP-2-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005;102(29):10267-72.
160. Chen Y, Wang JJ, Li J, Hosoya KI, Ratan R, Townes T, et al. Activating transcription factor 4 mediates hyperglycaemia-induced endothelial inflammation and retinal vascular leakage through activation of STAT3 in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia* 2012;55(9):2533-45.
161. Zhang L, Wang Y, Li W, Tsonis PA, Li Z, Xie L, et al. MicroRNA-30a Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition in diabetic cataracts through targeting SNAI1. *Scientific Reports* 2017;7(1):1117.
162. Ye W, Ma J, Wang F, Wu T, He M, Li J, et al. LncRNA MALAT1 regulates miR-144-3p to facilitate Epithelial-Mesenchymal Transition of lens epithelial cells via the ROS/NRF2/Notch1/Snail pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020;2020:8184314.
163. Sterneck E, Poria DK, Balamurugan K. Slug and E-cadherin: stealth accomplices? *Frontiers in Molecular Biosciences* 2020;7:554454.
164. Choi J, Park SY, Joo CK. Transforming Growth Factor- β 1 represses E-Cadherin production via Slug expression in lens epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2007;48(6):2708-18.
165. Wu TT, Chen YY, Ho CY, Yeh TC, Sun GC, Tseng CJ, et al. 3H-1,2-Dithiole-3-Thione protects lens epithelial cells against fructose-induced Epithelial-Mesenchymal Transition via activation of AMPK to eliminate AKR1B1-induced oxidative stress in diabetes mellitus. *Antioxidants* 2021;10(7):1086.
166. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes & Development* 2008;22(7):894-907.
167. Adam L, Zhong M, Choi W, Qi W, Nicoloso M, Arora A, et al. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy. *Clinical Cancer Research* 2009;15(16):5060-72.
168. Apple DJ, Escobar-Gomez M, Zaugg B, Kleinmann G, Borkenstein AF. Modern cataract surgery: unfinished business and unanswered questions. *Survey of Ophthalmology* 2011;56(6 Suppl):S3-53.

169. Manthey AL, Terrell AM, Wang Y, Taube JR, Yallowitz AR, Duncan MK. The Zeb proteins δ EF1 and Sip1 may have distinct functions in lens cells following cataract surgery. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2014;55(8):5445-55.
170. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Cufi S, Del Barco S, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin regulates breast cancer stem cell ontogeny by transcriptional regulation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) status. *Cell Cycle* 2010;9(18):3831-8.
171. Xiong H, Hong J, Du W, Lin YW, Ren LL, Wang YC, et al. Roles of STAT3 and ZEB1 proteins in E-cadherin down-regulation and human colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry* 2012;287(8):5819-32.
172. Harris TJ, Tepass U. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010;11(7):502-14.
173. Maruthamuthu V, Sabass B, Schwarz US, Gardel ML. Cell-ECM traction force modulates endogenous tension at cell-cell contacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;108(12):4708-13.
174. Chen R, Yang Q, Lee JD. BMK1 kinase suppresses epithelial-mesenchymal transition through the Akt/GSK3 β signaling pathway. *Cancer Research* 2012;72(6):1579-87.
175. Zhao L, Quan Y, Wang J, Wang F, Zheng Y, Zhou A. Vitamin C inhibit the proliferation, migration and epithelial-mesenchymal-transition of lens epithelial cells by destabilizing HIF-1 α . *International of Journal Clinical and Experimental Medicine* 2015;8(9):15155-63.
176. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004;117(7):927-39.
177. Pollreis A, Schmidt-Erfurth U. Diabetic cataract—pathogenesis, epidemiology and treatment. *Journal of Ophthalmology* 2010;2010:608751.
178. Su D, Hu S, Guan L, Wu X, Shi C, Yang X, et al. Down-regulation of GJA3 is associated with lens epithelial cell apoptosis and age-related cataract. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2017;484(1):159-64.
179. Worgul B, Merriam Jr G, Medvedovsky C. Cortical cataract development--an expression of primary damage to the lens epithelium. *Lens and Eye Toxicity Research* 1989;6(4):559-71.
180. Zablocki GJ, Ruzyski PA, Overturf MA, Palla S, Reddy GB, Petrash JM. Aldose reductase-mediated induction of epithelium-to-mesenchymal transition (EMT) in lens. *Chemico-Biological Interactions* 2011;191(1-3):351-6.
181. Raghavan CT, Smuda M, Smith AJ, Howell S, Smith DG, Singh A, et al. AGEs in human lens capsule promote the TGF β 2-mediated EMT of lens epithelial cells: implications for age-associated fibrosis. *Aging Cell* 2016;15(3):465-76.

182. Du L, Hao M, Li C, Wu W, Wang W, Ma Z, et al. Quercetin inhibited epithelial mesenchymal transition in diabetic rats, high-glucose-cultured lens, and SRA01/04 cells through transforming growth factor- β 2/phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Molecular and Cell Endocrinology* 2017;452:44-56.
183. Obrosova IG, Chung SS, Kador PF. Diabetic cataracts: mechanisms and management. *Diabetes Metabolism Research and Reviews* 2010;26(3):172-80.
184. Shu DY, Lovicu FJ. Myofibroblast transdifferentiation: The dark force in ocular wound healing and fibrosis. *Progress in Retinal and Eye Research* 2017;60:44-65.
185. Saika S, Yamanaka O, Flanders KC, Okada Y, Miyamoto T, Sumioka T, et al. Epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target for prevention of ocular tissue fibrosis. *Endocrine Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 2008;8(1):69-76.
186. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003;112(12):1776-84.
187. De Longh RU, Wederell E, Lovicu FJ, McAvoy JW. Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: a model for cataract formation. *Cells Tissues Organs* 2005;179(1-2):43-55.
188. Chen YY, Chen CK, Wu TT, Ho CY, Yeh TC, Sun GC, et al. Attenuation of epithelial-mesenchymal transition via SGLT2 inhibition and diabetic cataract suppression by dapagliflozin nanoparticles treatment. *Life Sciences* 2023;330:122005.
189. Zhou T, Che D, Ma J, Gao G. The pathogenic role of Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in the fibrosis of diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2015;56(7):4244.

EKLER



TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-GOBAEK 2023/94	
	PROTOKOL ADI	Diyabetik Katarakta JAK/STAT İndüksiyonuna Bağlı EMT Aktivasyon Rolü	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Doç. Dr. Hande GÜÇLÜ	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:09/01		
	Tarih:22.05.2023		
	Fakültemiz Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hande GÜÇLÜ'nün sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Araş. Gör. Dr. Tulay VARDAR'ın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödendiği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.		
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-GOBAEK Yönergesi			

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Dr. Öğr. Üyesi Fatma Gülsüm ONAL Başkan	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E H	E H	
Prof. Dr. Hakan GÜRKAN Başkan Yardımcısı	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E H	E H	
Doç. Dr. Selçuk KORKMAZ Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Mehmet Erdal VARDAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Semaz TOPALOĞLU Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Sezgi SARIKAYA SOLAK Üye	Deri ve Zührevi Hastalıklar	T.Ü.T.F. Deri ve Zührevi Hastalıklar A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Galip EKUKLU Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Filiz TÜTÜNCÜLER KÖKENLİ Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	E H	E H	Mazeretli
Dr. Öğr. Üyesi Sinan ATEŞ Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Doğan ALBAYRAK Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Doç. Dr. Burhan Can ÇANAKÇI Üye	Endodonti	T.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi	E	E H	E H	Mazeretli
Doç. Dr. Hilal KEKİLİCEK Üye	Protez-Ortez ve Biyomekani	T.Ü. Sağlık Bilimleri Fakültesi	K	E H	E H	
Avukat Emine NURLU Üye		T.Ü. Rektörlüğü	K	E H	E H	
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye	Emekli Öğretmen	Serbest Üye	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilişki

**Toplantıda Bulunma