



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**TİP 1 VE TİP 2 DİYABET HASTALIĞININ İNFLAMATUAR SÜRECİNDE,
TROMBOSİTLERDE CD40-CD40 LİGAND EKSPRESYONUNUN, DİYABET
HASTALARI VE SAĞLIKLI BİREYLERDE FLOW SİTOMETRİ İLE
KARŞILAŞTIRILMASI.**

DR.SUNA BATUROĞLU
UZMANLIK TEZİ

BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. YAVUZ TAGA

İSTANBUL-2008

TEŞEKKÜR

Tıpta Uzmanlık Öğrencisi olarak Klinik Biyokimya eğitimim süresince yakın ilgi, önemli katkı ve yönlendirmelerinden dolayı, Anabilim Dalı Başkanımız , değerli danışmanım,

Prof. Dr. Yavuz Tağa'ya

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri;

Prof. Dr. Kaya Emerk'e

Prof. Dr. Nesrin Kartal Özer'e

Prof. Dr. Serpil Bilsel'e

Prof. Dr. A. Süha Yalçın'a

Prof. Dr. Goncagül Haklar'a

Prof. Dr. Önder Şirikçi'ye

Tezimde kullandığım Diyabet Hastalarına ulaşmamda bana yardımcı olan,
Haydarpaşa Numune Hastanesi Diyabet polikliniği 'nden;

Dr. Sami Bulgurlu'ya

ve aynı poliklinikten samimiyetle bana yardım eden

Dr. Nilcihan Yolcu'ya ve Nuray Hemşireye

Uzmanlık eğitimim süresince her zaman yardım ve desteklerini gördüğüm,

Aileme

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
KISALTMALAR	IV
ÖZET	1
SUMMARY	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ	3
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1.Diabetes Mellitus	
2.1.1. Tanımı	6
2.1.2. Sınıflaması	6
2.1.3. Tanı kriterleri	10
2.1.4. Epidemiyolojisi	11
2.1.5. Etiyopatogenezi	12
2.1.6. DM ve Metabolik sendrom	13
2.2.Ateroskleroz	14
2.2.1. Ateroskleroz Patogenezi	17
2.2.2. Ateroskleroz ve CD40-CD40 Ligandı	21
2.2.3. Ateroskleroz ve Diyabet	24
2.3.Flow sitometri	
2.3.1.Tanımı	28
2.3.2.Tıpta kullanımı	32
3.GEREÇLER VE YÖNTEMLER	34
4.BULGULAR	36
5.TARTIŞMA	43
6.KAYNAKLAR	48

KISALTMALAR;

ADA:	American Diabetes Association
AGE:	Advanced glycation end products
AHA:	American Heart Association
AKŞ:	Açlık Kan Şekeri
DM:	Diabetes Mellitus
DKH:	Düz kas hücresi
EH:	Endotel hücresi
ICAM:	Intra cell adhesion molecule
IDDM:	Insulin Dependent Diabetes Mellitus
IL :	Interleukin
KKH:	Koroner kalp hastalığı
MFI:	Mean Fluorescence Intensity
NFKB:	Nuclear factor kappa-B
NIDDM:	Non insulin dependent Diabetes Mellitus
PAI:	Plazminogen Activator Inhibitor
ROT:	Reaktif Oksijen Türleri
SYA:	Serbest Yağ Asidi
TNF:	Tumors necrosis factor
TRAF:	TNF α receptor-associated factors
TZP:	Trombositten Zengin Plazma
VCAM:	Vascular cell adhesion molecule
WHO:	World Health Organization

ÖZET

Diyabet; hiperglisemi ile seyreden insülin eksikliği veya etkisizliği sonucu gelişen kronik bir hastalıktır. Diyabet hastalarında görülen hiperglisemi, vücudun birçok molekülünde modifikasyona yol açarak inflamasyonu başlatır. Aterosklerozun patogeneğinde birçok hücrel ve moleküler mekanizmanın rol oynamasının yanında etyolojisinde; infeksiyon ajanları, genetik yatkınlık ve diyabet gibi birçok hastalık suçlanmaktadır. Bunların yanısıra; CD40-CD40L sisteminin de protrombotik ve proinflamatuvar bir ortam yaratarak, ateroskerozu tetiklediği yönünde hipotezler öne sürülmektedir.

Diyabet hastalarında, makrovasküler komplikasyonlarda, trombositlerde CD40 ve CD40L ekspresyon artışının önemli katkı sağladığı birçok çalışmada gözlenmiştir. Bu çalışmalar ışığında biz de, trombositlerde CD40veCD40L ekspresyonunu diyabetliler ile sağlıklı bireyler arasında karşılaştırmak istedik. Bizim çalışmamızın amacı; diyabet hastalarında ateroskleroza yatkınlık olduğu bilgisinden yola çıkarak, CD40 ve CD40L değer artışlarını DM'da da gösterebilmektir.

Çalışmamıza; ADA(Amerikan Diyabet Birliği) standartlarına göre, diyabet tanısı almış ve 5 yıldır takip edilen 59 hastayı dahil ettik. Tip 1 diyabet hastalarının daha genç popülasyona dahil olması sebebiyle kontrol gruplarını ikiye ayırdık. Kontrol gruplarını Tip1 için 35 yaş altı, Tip2 için 35 yaş üstü sağlıklı bireylerden oluşturduk. İstatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 10,0 programı ve student t testi kullandık.

Tip 1 DM grubu ile Tip 1 Kontrol grubunun CD40 ve CD40 L ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görmedik. Ancak Tip 2 DM ile Tip 2 Kontrol grubunun CD40 ve CD40L ölçümleri arasında istatistiksel ileri düzeyde anlamlı farklılık gördük. Ayrıca, Tip 1 DM ile Tip 2 DM grubunun CD40 ve CD40L ölçümleri arasında da anlamlı farklılık bulduk.

Bu bulgular bize; CD40 ile CD40L ekspresyonunda ki artışın, Tip2 diyabetin makrovasküler komplikasyonlarının belirteçlerinden biri olabileceğini gösterdi. Ancak, CD40-CD40L ekspresyon artışlarının; DM'da gelişen ateroskleroza erken bir belirteç olup olamayacağını belirlemek için, daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

SUMMARY

Diabetes Mellitus is a chronic syndrome of impaired carbohydrate, protein and fat metabolism, going with hyperglycemia, owing to insufficient secretion of insulin or insulin resistance. The hyperglycemia observed in DM patients causes modifications on many molecules and thereby, trigger inflammation. Many cellular and molecular mechanisms were considered in the pathogenesis of atherosclerosis. Many infectious agents, genetic predisposition and DM were held responsible in atherosclerosis etiology. Also CD40-CD40L system is put forward as a hypothesis, for triggering atherosclerosis by creating a prothrombotic and proinflammatory environment.

In many studies, it was shown that, the upregulation of CD40L expression on T lymphocyte and platelets contribute to the development of macrovascular complication in DM patients. In the light of these data we decided to evaluate CD40-CD40L expression on platelets in both DM patients and healthy controls. The specific purpose of this study is to show CD40-CD40L increase which is specific for atherosclerosis in DM.

In this study we included 59 DM patients, who were diagnosed on the basis of ADA standardization and had DM follow up for 5 years. As, type1 DM group mean age is younger so we divided the control group in two subgroups according to age. For type1 DM, the age at the control group is under 35, for type2 DM, it is above 35. Statistical analysis was performed using SPSS 10.0.

There were no significant differences between type1 DM and its control group in CD40 and CD40L levels. But there were distinct and significant differences between type2 DM and its control group in CD40 and CD40L levels. And also there were a significant difference between type1 and type2 DM patients CD40 and CD40L levels.

The study shows that the upregulation in CD40 and CD40L expression could be used as a marker of macrovascular complication seen in type2 DM. But in order to evaluate whether CD40-CD40L expression upregulation could be used as an early marker of atherosclerosis developed in DM, further investigations are needed.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabet tüm dünyada çok yaygın olarak görülen, komplike bir hastalıktır. Karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarındaki bozukluklar sonucu çeşitli semptomlar oluşur ve kronik hiperglisemi ile kendini gösterir. Amerikan Diyabet Birliği (ADA), tüm dünyada diyabet hastalarının sayısının hızla arttığını bildirmektedir(1).

Bir multisistem hastalığı olan diyabet, çok önemli mikrovasküler (retinopati, nefropati, polinöropati) ve makrovasküler komplikasyonlara yol açar. Diyabet, aterosklerozun gelişmesinde çok önemli bir risk faktörüdür. Diyabette görülen hiperglisemi; makromoleküllerde modifikasyona yol açar. Bunların en bilineni, ileri glikozilasyon son ürünleridir(Advanced glycation end products-AGE-). Bu makromoleküllerdeki değişiklikler; proinflamatuvar makrofaj sitokin üretimini ve vasküler endoteldeki inflamatuvar olayların gelişimini arttırarak, ateroskleroz oluşumunu hızlandırmaktadır (9).

Diyabette görülen aterosklerozun patogenezinde; birçok belli başlı nedenle birlikte, CD40 ve CD40 Ligand etkileşimi de rol oynamaktadır. CD40 ve CD40L sistemi selüler ve humoral immunitede önemli bir yer tutmakta ve dolayısıyla CD40 ile CD40L etkileşimi de; proinflamatuvar ve proaterojenik bir süreç ile aterosklerozun gelişmesine katkıda bulunmaktadır(5).

CD40L'nın protrombotik ve proinflamatuvar bir ortam yaratarak, aterosklerozu tetiklediği birçok çalışma ışığında ileri sürülmektedir. Bu çalışmalarda CD40L ekspresyon artışı ile diyabetik makrovasküler komplikasyonları arasında paralellikler bulunmuştur. CD40L'nın DM ve kardiovasküler hastalıklar için, uzun dönem bir belirteç olabileceği, ancak ileri çalışmalarla desteklenmesi gerektiği bildirilmiştir(10).

Biz bu çalışmamızda; diyabet hastalarında artmış ateroskleroz risk sebebiyle, CD40-CD40L ekspresyonunun, sağlıklı kişilere oranla daha yüksek olabileceği hipotezi üzerine kurduk. Diyabet hastalarında CD40-CD40L ekspresyon artışını göstermenin; ileri döneme ait bir kardiovasküler hastalık riskinin öngürüsü olabileceğini düşündük. Böylece bu riskin yüksek olduğu diyabet hastalarında, CD40-CD40L ekspresyonunu göstererek, kardiovasküler hastalıklar için, önceden önlem alınabileceğini düşünmekteyiz.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. DİABETES MELLİTUS

Diabetes Mellitus (DM); insülinin mutlak eksikliği, sentez ve sekresyon bozukluğu veya reseptör düzeyinde etkisizliği sonucu gelişen kronik bir hastalıktır(21).

DM; 21'inci yüzyılda karşı karşıya kalınan dünyanın önemli bir halk sağlığı problemidir. Değişen yaşam biçimleri ve sağkalım sürelerinin uzaması, özellikle Tip2 DM'un prevalansını hızla arttırmaktadır. 2020 yılında dünya genelinde Tip2 diyabet prevalansının muhtemelen ikiye katlanacağı tahmin edilmektedir(11). Diyabet hastalarında çok sık gelişen komplikasyonlar sonucu, bu hastaların bakım maliyeti artmakta ve sağlık sistemlerine önemli bir yük getirmektedir(1).

Diyabet hastalığı ile ilgili en eski kayıtlar; M.Ö. 1550 yıllarında yazılmış Mısır papirüslerine kadar dayanır. 'Diabetes' kelimesi yunanca akıp gitmek anlamına gelen 'dia+betes' ve bal kadar tatlı anlamına gelen, 'Mellitus' kelimelerinden türetilmiştir(22).

1869 yılında Paul Langerhans; pankreas bezi içindeki küçük hücre topluluklarını göstermiş ve bu hücre toplulukları, günümüzde "Langerhans adacıkları" olarak adlandırılmıştır. Yirminci yüzyılın başında ölümcül bir hastalık olan diyabet; 1921'de Kanada Toronto Üniversitesi'nden Frederick G. Banting, Charles H. Best, biyokimyacı James B. Collip ve fizyolog J.J.R.Macleod'un ortak çalışmaları sonucu insülinin izole edilmesiyle, tedavi edilebilmeye başlanmıştır. Collip insülini daha da saflaştırmış, 1922'de hasta üzerinde başarılı bir şekilde uygulamıştır. 1955'de Frederick Sanger; insülin polipeptid zincirinin aminoasit dizilimini tanımlamış ve o yıl Nobel ödülünü almıştır (22).

2.1.1.DM Tanımı

DM; kronik hiperglisemi ile karakterize, insülin sekresyon bozukluğu veya insülinin kullanılmamasından kaynaklanan karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluklar dolayısıyla gelişen bir hastalıktır. İnsülinin mutlak eksikliği veya sentez ve sekresyon bozukluğu veya reseptör düzeyinde etkisizliği sonucu oluşur. Uzun dönemde çeşitli makro ve mikro komplikasyonlara yol açar. Bunlar; nefropati, retinopati gibi mikrovasküler ve damar duvarı bozukluklarına bağlı gelişen; ateroskleroz gibi makrovasküler komplikasyonlardır(21).

Diyabet çeşitli patolojik süreçlerle ilerler. Bu süreçler; pankreas β hücrelerinde gelişen tahribat sonucu insülin yetmezliği veya birçok karmaşık mekanizmanın tetiklediği insülin direncini içermektedir.

DM'un Tip1 ve Tip2 diye iki ana grubu olmasına karşın bunların patogenezinde birçok aydınlatılmamış ve iç içe geçmiş durum olduğundan dolayı, tam olarak tiplendirilemeyen grupları da vardır. 1997'de 'World Health Organization' Dünya Sağlık Örgütü'nden (WHO) adapte edilerek, 'American Diabetes Association' Amerikan Diabet Birliği (ADA) tarafından bir sınıflama geliştirilmiştir(23).

2.1.2.DM'un Sınıflanması

Diyabetin etiyolojik sınıflandırılması WHO ve ADA tarafından aşağıdaki şekilde bildirilmiştir(21,23).

Hipergliseminin etiyolojik sınıflaması

1) Tip1; β hücre tahribatı ile giden mutlak insülin yetmezliği.

A: Otoimmünite

B: İdiopatik

2) Tip2; Çoğunlukla insülin direnci ile giden insülin eksikliği.

3) Diğer tipleri

- β hücresinde genetik defekt
- insülin sekresyonunda genetik defekt
- Ekzokrin pankreas hastalıkları
- Endokrinopatiler
- İlaç ve kimyasallar
- İnfeksiyon

4) Gestasyonel Diyabet

Tip1 DM

'Insulin Dependent Diabetes Mellitus' İnsüline bağımlı Diyabet (IDDM) diye de adlandırılır. Primer olarak pankreas bezinin β hücrelerinde harabiyet sonucu, mutlak insülin ihtiyacı ile ortaya çıkar. Vücut; β hücrelerine karşı otoantikörlerle bir tahribat başlatmaktadır. Bu otoantikörler;

Anti-GAD (Glutamik Asit Dekarbokilaz Antikoru)

Anti-islet cell (Adacık Hücre antikoru)

Anti-insulin antibodies-AIAA (İnsülin Antikoru) vb. dir.

Tip1DM; Tip1A ve Tip1B olarak iki gruba ayrılabilir. Tip1 A'da bir veya daha fazla otoantikör saptanmaktadır(21,22). Ayrıca sıklıkla 'Human Leukocyte Antigen' (HLA) DR-3, DR-4 doku grubu genleri ile birliktelik gösterir(24).

Tip 1 B ise; idiyomatik olduğu varsayılan ve Tip 1 A' daki gibi, düşük insülin ve C-peptid seviyeleriyle karakterize bir formudur.

Tip1 DM'da görülen açlık hiperglisemisi, hızla ciddi ketoasidoz ve koma tablosuna yol açabilir. Plazmada insülin ve C-Peptid düzeylerinde düşüklük mevcuttur. Tip1DM; Graves hastalığı, Hashimoto ve Addison gibi diğer otoimmün hastalıklarla da beraber görülebilir. Tip1DM tedavisinde ana ilke eksik olan insülini yerine koymaktır(21).

Tip2 DM

'Non insülin dependent diabetes mellitus' insüline bağımlı olmayan diyabet (NIDDM) diye de adlandırılabilir. Diyabetin en yaygın formudur (% 90) ve insülin sekresyonu veya etkisinde bozuklukla kendini gösterir. Etyolojisi tam olarak aydınlatılamamasına karşın, genetik yatkınlık ve çevresel faktörlerin rol oynadığı, ileri dönemlerinde β hücrelerinde harabiyetle sonlanan bir hastalıktır. Hastalarda genellikle insülin direnci ve göreceli bir insülin eksikliği vardır. İlk başlarda insülin tedavisi gerekmez de ileri evresinde, glisemik kontrol için insülin gerekmektedir (21,25).

Gençlerde görülme oranları, beslenme alışkanlıklarının değişmesi nedeniyle son yıllarda artmıştır. Çoğu Tip2DM hastaları obezdir ve obezite insülin direncini tetikler. Tip2 diyabet hastaları, tanı konulmadan hayatlarını uzun yıllar idame ettirebilirler. Bu hastalar; serum insülin seviyeleri yüksek olmasına rağmen, insülin direnci sebebiyle kan glukoz düzeyini kontrol altına alamazlar (21).

Tip2 DM'da; ailevi yatkınlık kuvvetli bir şekilde görülmektedir Genetiğin yanında, ebeveynlerin yaşam tarzları ve yeme alışkanlıkları bir tür kalıtım gibi çocuklarına kalmaktadır. Kötü beslenme, obezite ve fiziksel inaktivite Tip2 DM gelişme riskini arttırmaktadır(21).

Diğer Tipler

- β hücrelerinde genetik defekt

MODY1(kromozom 20) 'Maturity Onset Diabetes of the Young'

MODY2 (kromozom 7)

Mitokondrial DNA mutasyonları

-İnsülin sekresyonunda genetik defekt

TipA insülin rezistansı

Rabson-Mendenhall sendromu

Lipoatrofik diyabet

-Diğer genetik sendromlar

Down sendromu

Frederik ataksisi

Huntington hastalığı

Turner sendromu

-Ekzokrin Pankreas hastalığı

Pankreatit

Travma

Neoplazma

Kistik fibroz

Hemakromatozis

-Endokrinopatiler

Cushing sendromu

Akromegali

Glukagonoma

Hipertiroidizm

Somatostatoma

-İlaç ve kimyasallar

Nikotik asit

Glukokortikoid

Tiroid hormonları

Tiazidler

Fenitoin

Streptozosin

Alloksan

Pentamidin

-İnfeksiyonlar

Konjenital Rubella

Sitomegalovirüs

Coxsackie B4

Gestasyonel Diyabet

Gestasyonel diabetes mellitus; ilk kez gebelik sırasında fark edilen, herhangi bir düzeydeki glukoz intoleransı olarak tanımlanır. Hamilelerde normalde; açlık ve postprandial glukoz konsantrasyonları, hamile olmayanlara göre daha düşük seyrederek. Bu konsantrasyonlardaki herhangi bir yükseliş gestasyonel diyabeti akla getirmelidir(23).

Gestasyonel diyabet genellikle semptomlara neden olmaz. Bu nedenle, ADA bu riskin değerlendirilmesi için tüm gebe kadınların taranmasını ve risk altındaki bireylere oral glukoz tolerans testi (OGTT), yapılmasını önermektedir. Gestasyonel diyabet; hem bebek hem de anne için risklidir. Yüksek glukoz konsantrasyonları; erken dönem intrauterin ölümlere, konjenital anomalilere sebep olabilir. Ayrıca fetal makrozomi riski bu hastalarda artmıştır(26).

Hamilelikte; 126 mg/dL veya günün herhangi bir saatinde 200mg/dL glukoz seviyesi diyabet tanısı için eşik değeri ifade eder. Gestasyonel diyabet tanısı için testler genellikle 24–28. gebelik haftasında yapılır(21).

2.1.3. DM'un Tanı kriterleri

Diyabet hastalığı; tanısı konulmadan önce, (özellikle Tip2) çok uzun bir süre gizli olarak kalabilir. Birçok müphem semptomun yanında; polidipsi, poliüri, polifaji, tekrarlayan görme bozuklukları, periferik nöropatiler gibi belirtileri de mevcuttur.

Diyabet tanısında bozulmuş glukoz toleransı, önemli bir yer tutar. Bozulmuş glukoz toleransı; diyabet tablosu tam olarak oturmadan önce uzun süre görülen bir durumdur. Bu durumda olan kişilerde,10 yıl içinde diyabet gelişme riski çok yüksektir(29).2003 ADA' nın önerdiği tanı kriterleri, tablo 1'de gösterilmektedir(21).

Tablo 1. DM Tanı kriterleri

Glukoz konsantrasyonu, mg/ dL (mmol / L)

<u>Sağlıklı Bireyler</u>	kapiller kan	venöz kan
	AKŞ (Açlık Kan Şekeri) veya tokluk kan şekeri (2.saatt)	<110(<6,1) <140 (<7,8)
<u>DM</u>		
AKŞ (Açlık Kan Şekeri) veya tokluk kan şekeri (2.saatt)	≥110 (≥6.1) ≥200 (≥ 11.1)	≥126 (≥7.0) ≥200 (≥11.1)
<u>Bozulmuş glukoz toleransı</u>		
AKŞ ve tokluk kan şekeri (2.saatt)	<110 (< 6.1) 140-199 (7.8- 11.0)	< 126 (< 7.0) 140-199 (7.8-11.0)

Gestasyonel diyabet için de ADA'nın sunduğu kriterler tablo 2'de gösterilmiştir. İki veya daha fazla parametrede yükseklik mevcutsa, tanıyı koydurur (21).

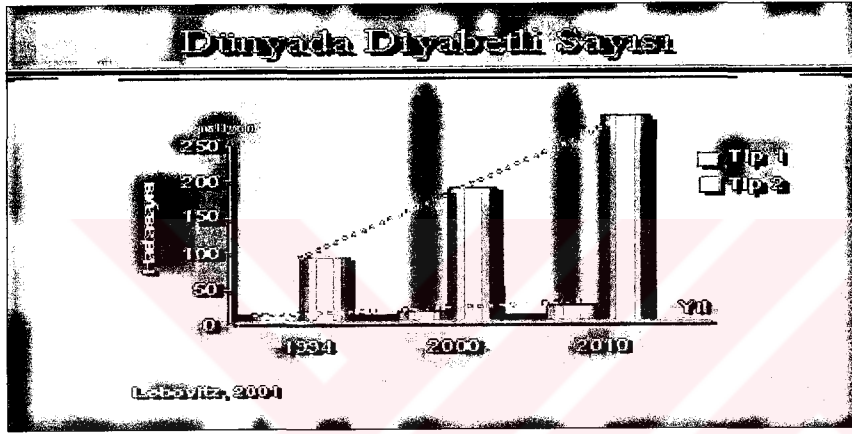
Tablo 2.Gestasyonel diyabet tanı kriterleri

mg /dL(mmol /L)	ADA		WHO
	75 gr oral glukoz	100 gr oral glukoz	75 gr glukoz
AKŞ	≥95 (5.3)	≥95 (5.3)	≥126 (7.0)
1.saatt	≥180 (10.0)	≥180 (10.0)	
2.saatt	≥155 (8.6)	≥155 (8.6)	≥140 (7.8)

2.1.4. DM Epidemiyolojisi

Diabetes mellitus tüm toplumlarda giderek yaygınlaşarak, daha büyük insan gruplarını etkilemektedir. 1995 yılı itibariyle dünya nüfusunun %4,0.ü diyabetli iken, bu rakamın 2025 yılında %5,4 seviyesine tırmanacağı tahmin edilmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde diyabet hastalığında ki artışın, daha da hızlı olacağı ve toplumdaki diyabetli sayısının 30 yılda %170 artacağı hesaplanmıştır (28).

Dünya sağlık örgütünün verilerine göre, dünyada 194 milyon diyabet hastası mevcuttur. 2030 yılında ise 330 milyon kişide diyabet görüleceği öngörülmüştür(16).



Şekil 1:Dünyada Diyabet hastalarının hızla artışı

Epidemiyolojik veriler, toplumdan topluma çok büyük değişkenlik gösterir. Amerika Birleşik Devletler’inde(ABD) diyabetin insidansı; 100.000 kişide 11,7–16,4 arasında gösterilmiştir(28). Bunlar kaba verilerdir, bunların daha detaylandırılabilmesi için; yaşanan bölge, etnik köken, yaş ve cinsiyette göz önünde bulundurulmalıdır.

ABD verilerine göre; diyabetin prevalansı, amerikan toplumunda % 5,1’dir. Bunun yanında % 2,7 oranında da tanı konulmamış gizli diyabet olduğu varsayılmaktadır(28).

Görüldüğü gibi; dünyada DM’un prevalans ve insidansı hızla artmaktadır. 2030 yılında şu anki dünyada görülen diyabet vakalarının, ikiye katlanacağı birçok kaynaktan desteklenmektedir(15,28).

Ülkemizde Satman ve arkadaşları tarafından, 2001 yılında yapılan kesitsel bir çalışmada, (TURDEP-Turkish Diabetes Epidemiology Study) diyabet prevalansı %7,2, bozulmuş glukoz toleransı da %6,7 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada; glukoz intoleransının yaş ile birlikte artışı gösterilmiştir(30).

2.1.5. DM'un Etiyopatogenezi

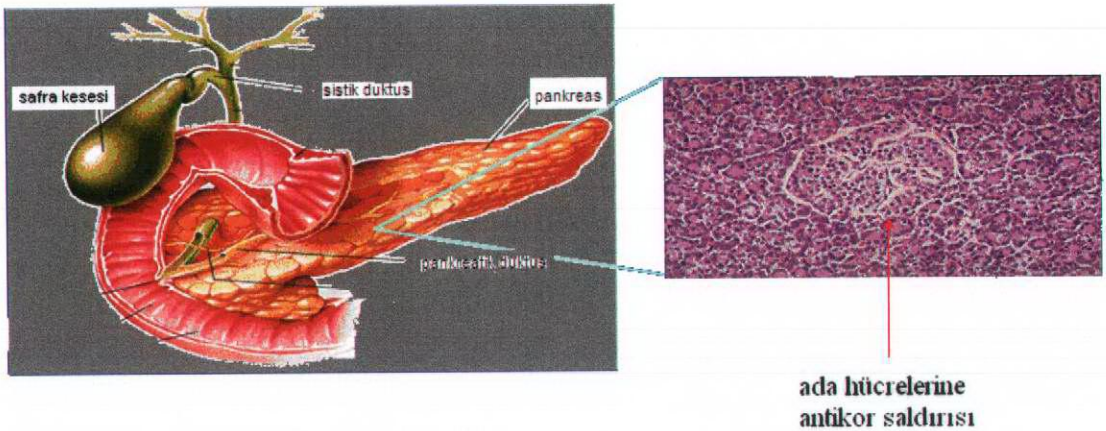
Tip1 DM

Tip 1 DM'da genetik yatkınlık ve aydınlatılmayan birçok sebepten dolayı; otoimmün süreç devreye girer ve β hücre hasarı ile sonuçlanarak, hastalık oluşur. Özellikle HLA DR3 ve HLA DR4 birlikteliği normal popülasyona göre çok yüksektir. HLA DR3 diğer otoimmün hastalıklarla sıklıkla birlikte görülür (Örn; Çöliak). Tip1 diyabetlilerin % 20'sinin tiroid antikorlarının pozitif olduğu gösterilmiştir (12).

Ayrıca; tek yumurta ikizlerinde %60 oranında birlikte DM olma ihtimali varken, çift yumurta ikizlerinde bu oran % 8 civarındadır. Anne veya babanın birinde diyabet varken; çocukta görülme olasılığı %3–6 iken, her iki ebeveynde DM olduğunda bu oranın % 30'lara çıkabileceği öne sürülmektedir(13).

Enfeksiyonun da, Tip1 DM için önemli bir etyolojik faktör olduğu bilinmektedir. Özellikle konjenital rubella, sitomegalovirus, kabakulak, coxsackieB4 ve ensefalomyelit virüsü, ajanlar arasında sayılır. Birçok toksin, bebeklikte inek sütüne erken başlanması, ileri yaş annelik, psikolojik stres de etyolojik faktörler arasında sayılmaktadır(14).

Bu etyolojik faktörler sonucunda; pankreasın β hücrelerine karşı otoantikor üretilir ve adacık hücreleri tahrip olarak insülin salgılayamamaya başlar(Şekil2) (14).



Şekil 2: Tip 1 DM'un patogenezi

Tip2 DM

Tip2 DM ilk olarak iskelet kasında insülin direnci ve sonrasında göreceli olarak insülin yetmezliği ile karakterize glukoz metabolizma bozukluğudur. Genetik yatkınlık, obezite, sedanter yaşam, beslenme alışkanlıkları, yaşlanma, stres ve gebelik gibi birçok sebepten dolayı ortaya çıkabilir. Hareketsiz yaşam biçimi ve obezite, önemli bir risk faktörüdür. Tip 2 diyabetik hastalarının %55’de obezite rastlanmakta ve kronik obezite insülin direncine neden olmaktadır(Şekil 3)(17).

İnsülin direncinin sebepleri;

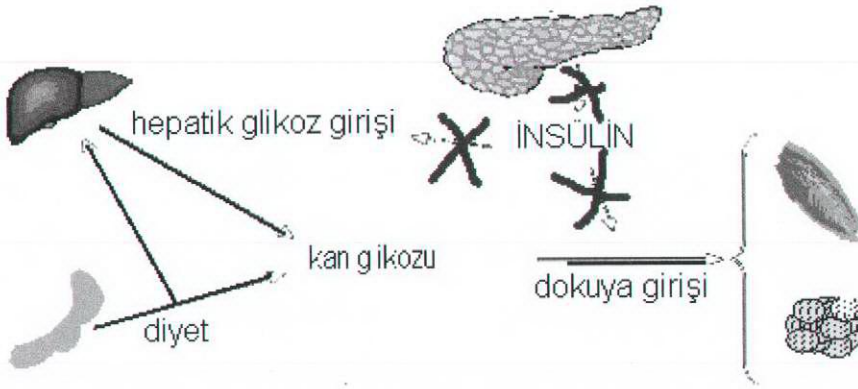
a)Hücrelerin insüline duyarlılığında azalma;

- Reseptör etkileşiminde bozukluk,
- Reseptör sayısında azalma,
- Hücre içi insülin sinyalizasyonunu sağlayan proteinlerde azalma,
- Hücre içi glukozun fosforilasyonunu kontrol eden enzim aktivitesi azalması

b)Hücrelerin insüline yanıtında azalma (Ligand-reseptör etkileşiminden sonraki basamaklarda bozukluk ile kendini gösterir.)

c)Yağ metabolizmasında;

- Obezitede görülen, dolaşımda serbest yağ asitlerinin artması,
- İskelet kasında yağ birikimi ve bu yağların okside olamamaları,
- Yağ dokusunda üretilen sitokinlerin salınımının bozulması (18).



Şekil 3: Tip 2 DM'un patogenezi

2.1.6. DM ve Metabolik Sendrom

Metabolik sendrom, kardiovasküler hastalıklara zemin hazırlayan bir çok metabolik sistem bozukluğu ile seyreden önemli mortalite ve morbidite nedenidir. Hipertrigliseridemi, hiperinsülinemi, hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve obezite gibi ateromatöz risk faktörlerinin, insülin direnci ile birlikte olduğu durumdur.

Metabolik Sendrom; bozulmuş açlık glukozu veya insülin direnci, santral obezite, dislipidemi ve hipertansiyonun birlikteliği olarak tanımlanır. Patofizyolojisinde insülin direnci sorumlu tutulmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü tarafından aşağıda sunulan kriterleri mevcuttur(65).

-Diyabet

-Bozulmuş açlık glukozu

-Bozulmuş glukoz toleransı

-İnsülin direnci

Yukarıdaki durumlarla birlikte;

-Hipertansiyon,

-Hiperlipidemi,

-Santral obezite

-Mikroalbuminüriden en az ikisinin olması, metabolik sendrom tanısını koydurur.

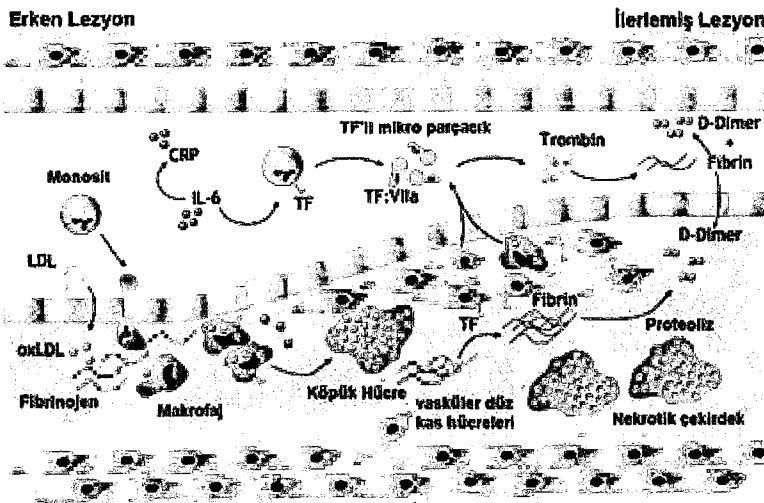
Metabolik Sendrom oluşumunda birçok faktör sorumlu tutulurken, en çok suçlanan faktör insülin direncidir. Suçlanan diğer faktörler ise visceral obezite, proinflamatuvar sitokinler, reaktif oksijen türleri, bozulmuş glukoz ve lipid metabolizması ile endotel disfonksiyonudur(66).

Yapılan bir çalışmada ABD’de yaşayan genç popülasyondaki metabolik sendrom prevalansının obezitenin derecesiyle birlikte arttığı ve ciddi düzeyde obezitesi olan gençlerde bu prevalansın % 50'lere ulaştığı bildirilmiştir(66).

2.2. ATEROSKLEROZ

Ateroskleroz; ilerleyici (progresif) arteryel darlık ve tıkanmalarla meydana gelen, arterlerin esnekliğinin bozulması ve antitrombotik özelliklerinin azalmasıyla seyreden bir hastalıktır. Damar duvarında; lipidlerin, fibroblastların ve makrofajların birikmesi sonucu gelişir. Esas olarak bu birikime eşlik eden hücresel ve moleküler mekanizmaların ve enflamasyonun rolü vardır(33).

Bu mekanizmaların pek çoğu tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen, çeşitli etiyolojik faktörlerin rolü bilinmektedir. Bunların başında; enfeksiyon ajanları (*Chlamydia pneumoniae* gibi), genetik herediter özellikler (homosistinemi), hipertansiyon, DM, hiperlipidemi, sigara kullanımı, sedanter yaşam, obezite gibi etkenler gelir. Aterosklerozun gelişimini; düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ve lipoprotein (a) artışı hızlandırırken, yüksek dansiteli lipoproteinlerin (HDL) artışı inhibe eder. Aterosklerotik sürecin başlamasındaysa; plazma bileşimindeki trombosit, lenfosit ve monositlerle, endotel hücreleri arasındaki yıllarca süren etkileşimlerin başrolde olduğu bilinmektedir. Aterosklerotik süreçte; lökosit ve düz kas hücrelerinin subendotelyal alana gelerek çeşitli sitokin ve mitojenlerin (PDGF = trombosit kökenli büyüme faktörü) salınımını proliferetmesi gibi çeşitli nedenler rol alır.



Şekil:4 Aterosklerozda damar duvarı

Şekil:4’de gösterildiği gibi; gelişmekte olan plakta lipoproteinlerden ve bunların okside formlarından zengin bir birikimin oluşması, hem doğrudan damar duvarının yapısal ve fonksiyonel özelliklerini bozmakta, hem de monosit ve ilgili hücrelerin aktivasyonuna yol açarak inflamatuvar bir sürecin aktive olmasına neden olmaktadır. Ayrıca; makrofajların okside lipidleri fagosite etmesi sonucu, köpük hücreleri oluşmakta, bu köpük hücreleri de monosit aktivasyonunu ve sitokin üretimini arttırarak, bu kısır döngüye katkıda bulunmaktadır(34).

Aterosklerozun Patolojik Lezyonları:

Aterosklerozun en erken patolojik bulgusu, yağlı izler (fatty streak) olup daha sonra bu bölgelerde fibröz plaklar gelişir. Komplikasyonlardan sorumlu olan esas lezyonlar bu plaklardır. Başlıca komplikasyonları; trombus gelişimine yol açan fissür/ülserasyon oluşumu, anevrizma gelişimi, sekonder kalsifikasyon gelişimi ve arterde stenoza yol açmaları sonucu, ilgili damarın beslediği organ ve dokularda akut veya kronik iskemik hastalık ve fonksiyon bozukluklarının gelişmesidir (31).

Günümüzde en çok desteklenen teoriler; zedelenme ve infeksiyon teorileridir. Aslında her iki teoride de, inflamatuvar reaksiyonları indükleyen olaylar zinciri içinde gelişen süreç birbirinin içinde yer alır. Bu sürecin akut ve kronik inflamatuvar cevapları, immünohistopatolojik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Mekanik ve metabolik travmalar dışında, kronik inflamasyonun en önemli tetikleyicileri olarak okside-LDL-kolesterol ve Chlamydia'lar gösterilmektedir. Ancak aterosklerozda, hala aydınlatılmamış bir çok mekanizma mevcuttur (31). Aterosklerotik plak esas olarak; birikmiş intrasellüler ve ekstrasellüler lipitler, düz kas hücreleri, bağ dokusu ve glikozaminoglikanlardan oluşur.

Aterosklerozun gelişim evreleri ve tipleri Amerikan Kalp Birliği (AHA) tarafından 1995 yılında tablo 3’deki gibi özetlenmiştir(31,35).

Tablo 3: Aterosklerozun patolojik lezyon tipleri veya gelişim evreleri

Plak tipi	Plak karakteristiği	İlişkili klinik sendrom
1- İntimal kalınlaşma	Köpük hücrelerinin infiltrasyonu	Aseptomatik
2- Yağlı çizgilenme	İnfiltrate makrofaj ve düz kas hücrelerinin içinde lipid birikimi	Aseptomatik
3- Preaterom	Ekstrasellüler lipid birikimi ve bağ dokusu artışı	Aseptomatik
4-Ateroma	Ekstrasellüler intimal lipid çekirdeği; makrofaj, köpük hücresi ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu	Genellikle aseptomatik, stable angina ile birlikte olabilir.
5- Fibroz plak	Fibröz tabakalı aterom Lipid çekirdeğinde yaygın kalsifikasyon	Stable angina pectoris veya aseptomatik
6- Komplike lezyon	İntramural hemoraji ve/veya trombus olan, yırtılmış tip IV veya V lezyon	Akut koroner sendromlar

2.2.1. Ateroskleroz Patogenezi

Ateroskleroz; arter duvarının intima ve media tabakasındaki değişimlerin eşlik ettiği, lipidlerin, makrofajların ve de fibröz dokunun yerel birikiminden doğan değişikliklerin bir kombinasyonu olarak tanımlanır(32). Lezyon, makrofajlarda lipid birikmesi, intimadaki düz kas hücrelerinde lipid damlacıklarının belirmesi ile sarı-grimsi yağ çizgilerine (fatty streak) dönüşür. Yağ çizgilerinde düz kas hücreleri yer almakla birlikte baskın hücre tipi makrofajlardır.

Aterosklerozun patogenezinde; geçerli olan modelin iki önemli bölümü vardır. Bunların ilki; tam olarak anlaşılammış olan, endotelde bozulmaya neden olacak herhangi bir olay olmadan, hasar veya fonksiyon bozukluğunun oluşması, ikincisi ise duvarın kendi kendine iyileşebilmesi için gerekli inhibitör sinyallerinin bir dengede tutulamayarak, aterokslerotik lezyonlarda ilerlemenin oluşmasıdır(33).

Bu bölgeye toplanan makrofajlar; dolaşımdan LDL-kolesterolu alarak köpük hücrelerini oluştururken, trombositler bu hasarlı bölgeye yapışarak çöker ve trombosit kaynaklı büyüme faktörlerini salarak düz kas hücrelerinin mediadan intimaya göçüne ve poliferasyonuna yol açarlar. Aterosklerozun ana sebebi hiperlipemi, özellikle hiperkolesterolemidir. Özellikle düşük dansiteli lipoprotein (LDL), çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) ve lipoprotein(a) bu aterojeniteden sorumludur. Bu hipotezle ilgili olarak;

1. Arter duvarında kolesterol birikmesi, hem deneysel hem de postmortem çalışmalarla kanıtlanmıştır.
2. Çok çeşitli deney hayvanlarında, plazma kolesterolünün yükseltilmesi ile ateroskleroz oluşturulabilmektedir.
3. Plazma kolesterolu yüksek kişiler, erken yaşta koroner kalp hastalığına (KKH) yakalanmaktalar.
4. Ortalama plazma kolesterol değerleri düşük olan Japonlar, Amerikaya göç ettiklerinde diyet alışkanlıkları değişmiş ve plazma kolesterol düzeyleri yükselerek KKH 'ına yakalanma sıklığı artmıştır.
5. LDL reseptör eksikliği olan ailesel hiperkolesterolemili hastalarda, plazma kolesterol düzeyleri artarak erken yaşta ateroskleroz gelişir.

6. Plazma kolesterolu diyet ve ilaç tedavisi ile düşürüldüğünde KKH riski de azalmaktadır.

Endotel hasarı durumunda, tetiği çeken mekanizma bilinmiyorsa da dislipidemi, hipertansiyon, sigara ve DM gibi hastalıklar patogeneizde etkilidir. Ayrıca; viral enfeksiyonlar, immün hasar ve homosistein düzeylerinde artışın da bu hasara neden olduğu düşünülmektedir (34).

Hiperlipidemi ve Vasküler Hasar

Okside olmamış normal LDL'nin kendisi sitotoksik değildir ve de endotelin fonksiyonlarında herhangi bir değişime neden olmaz. LDL'nin makrofajlar tarafından alınıp köpük hücreleri oluşturması için, önce LDL'nin yapısında bazı değişiklikler olması gerekmektedir. Ancak modifiye LDL'ler makrofajlar tarafından alınabilmektedir (34).

Deneysel çalışmalar; LDL'nin kimyasal modifikasyonunun (asetil LDL, asetoasetil LDL, malondialdehit LDL gibi) soucunda makrofajlar tarafından kolesterol alımının arttığını göstermiştir. Bu kimyasal modifiye LDL'ler, makrofajlarda LDL reseptörlerinden farklı reseptörler tarafından alınmaktadır. Arter duvarındaki birçok hücre LDL'yi okside edebilmektedir. Ayrıca dolaşımda uzun süre kalan LDL'de, kolayca okside olabilmektedir. LDL oksidasyonu; LDL fosfolipidlerindeki doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ile başlamaktadır. Bunun sonucu, lesitin lizolesitine dönüşmekte ve Apo B'nin çöpçü reseptör tarafından tanınmasına yol açan kısmı, yıkıma uğramaktadır. Endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve özellikle makrofaj / monositler, doğal LDL'leri okside formlara dönüştürebilmektedir. Bu modifiye LDL, makrofaj ve düz kas hücrelerinde bulunan özgün reseptörler ile tanınırlar(63).

Okside LDL partikülleri, içerdikleri lipid peroksidasyon ürünleri ile sitotoksiktirler. Ayrıca okside LDL'ler; dolaşımdaki monositler için de kemotaktiktir ve monositlerin endotele ve düz kas hücrelerine adezyonunu kolaylaştıran monosit kemotaktik protein-1 (MCB-1) üretimini artırır. DM'lu hastalarda oluşan glikolize LDL de, okside LDL benzeri etkilere sahiptir(35).

Aterosklerozdaki Hücresel Mekanizmalar

Endotel Hücreleri(EH): Endotel hücreleri, normalde vasküler yapılarda tek tabaka halinde bulunurlar ve yavaş değişim(turnover) gösterirler. EH; koagülasyon sisteminini başlatan ve subendotelial dokuda yer alan kollajenle, trombositlerin etkileşimini önleyen bir bariyerdir ve normal şartlarda kanın dokuyla temasını önler. EH; her hangi bir damar hasarı, sitokinler (IL-6) veya proinflatuar bir etkiye maruz kaldığında, koagülasyon sisteminin koagulan lehine bozarlar. Özellikle lipopolisakkaritlerle ve Tümör Nekrotizan Faktör(TNF α) ile uyarılan EH'leri, proinflatuar molekülleri sentezlemeye başlarlar. Endotelde hasara neden olan başlıca faktörler; hiperlidemi, hipertansiyon, DM, sigara, hiperfibrinojenemi, hiperhomosisteinemi, herpes enfeksiyonu ve immün mekanizmalardır. EH fonksiyonlarındaki bozukluklar, aterosklerozdaki histolojik özelliklerin bulunmasından daha önce saptanabilir (64).

Düz kas hücreleri(DKH): DKH'nin birbirinden farklı iki fenotipik özelliği mevcut olup, bir kısmı vazomotor değişikliklere karşı etki gösterirken, diğer bir kısmı ise gen ekspresyonuna ve de ekstraselüler matris sentez yeteneğine sahiptirler. EH hasarı sonunda, subendotelial intimada makrofaj birikimi olduğunda, makrofaj ve endotel hücrelerinden açığa çıkan büyüme faktörleri, DKH'lerinde aktivasyona ve proliferasyona yol açar.

Makrofajlar: Aterosklerozda; lökositler, enflamasyonun en erken lezyonlarında bulunmaktadır. Normalde endotel, beyaz kürelerin bağlanmasını önleyen bir mekanizmaya sahiptir. Fakat aterojenik diyetin başlangıcından hemen sonra arteriyel hücre yüzeylerinde çeşitli beyaz küre gruplarını bağlayan adezyon molekülleri eksprese olmaya başlarlar. Vasküler adezyon molekülü-1(VCAM-1) denilen bu moleküller aterom plaklarında görülür. VCAM-1 ayrıca , intraselüler adezyon moleküllerinin (ICAM-1) yapımını da arttırırlar.Damar duvarında EH'e yapışan monositler buradan hemen intimaya geçerek adezyon moleküllerinin ve sitokinlerin salınımını arttırırlar. Ateroskleroz'un erken dönemlerinde monositlerin arter duvarına adezyonu, migrasyonu ve daha sonrada makrofajlara dönüşümü önemli bir kısır döngüyü oluşturur(64).

Trombositler: Ateroskleroz'da, çok önemli bir role sahiptirler. Endotel bütünlüğünün kaybolduğu durumlarda geriye dönüşümsüz bir şekilde adezyona yol

açarlar. Adezyondan sonra aktive trombositler, platelet kaynaklı ve endotel hücre büyüme faktörü (PD -ECGF) salgılanmasına yol açarlar. Bu faktörler, damar duvarındaki profilerasyonu arttırmaya meyilidir. Ayrıca trombositler, serotonin ve tromboksan A2 gibi vazoaktif maddeleri salgılayarak da aterosklerozda önemli bir rol oynarlar.

Adezyon molekülleri: Bu moleküllerden olan VCAM-1 ve ICAM-1; immünglobulin gen ailesinin üyeleridir ve EH'de bulunurlar. Bunlar monositler ve lenfositlerden belirginleşen transmembran proteinler olup, beta integrin ailesi ile etkileşim gösterirler. Aterogenezde endotel hücrelerince yapılan VCAM-1 ve ICAM-1 oluşması, monosit kemotaksisini başlatan önemli bir bileşendir.

İnterleukin-1 (IL-1): IL'ler, EH fonksiyonlarını bozarak, fibrinolizi inhibe ederek, prokoagülan moleküllerinin ekspresyonunu artırır ve adezyon moleküllerini uyarırlar. IL-1, ayrıca düz kas hücrelerindeki proliferasyonu da uyararak, düz kas hücrelerinin prostaglandin ve nitrik oksit üretimine neden olur.

Endotelin: Endotelin; düz kas hücrelerinde ve endotel hücrelerinde proliferasyonu uyaran moleküllerdir(31). Endotelin'in aktivasyonu diğer büyüme faktörlerince de potansiyalize edilir. Okside LDL, endotel hücrelerinden endotelin üretimini artırır. İleri aterosklerotik durumlarda; dolaşımdaki endotelin düzeyleri yükselmiştir ve endotelin, dolaşan monositlerin ve aktif makrofajların hasarlı bölgeye toplanmasını sağlayan sitokinleri de salgılar(33,64).

2.2.2. CD40-CD40 Ligandı ve Ateroskleroz

1990'lardan sonra yapılan çalışmalarda, aterosklerozun oluşmasında ve ilerlemesinde CD40 ve CD40L'inin önemli bir rol üstlendiği gösterilmiştir. CD40-CD40L'i; aterosklerozun gelişimini ağırlaştırıcı eden protrombotik ve proinflamatuar ortamın oluşumunda birçok immün mekanizmayla birlikte önemli rol oynar(19).

CD40-CD40L birleşmesinin tam inhibisyonunda, aterosklerozun ilerlemesinin durduğu ve stabil aterosklerotik plak fenotipi oluşumunun başlatıldığı bilinmektedir. Aterosklerozun komplikasyonları sıklıkla bu plağın rüptüre olması sonucu oluştuğu için, bu plağın stabilitesi, aterosklerozun mortalite ve morbiditesi için önemlidir(36).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda; aterosklerozla birlikte, kronik inflammatuar ve otoimmün hastalıkların incelenmesinde; CD40-CD40L'inin major bir rol oynadığı yönünde hipotezler kabul görmektedir(37).

Birçok hastalıkta, deneysel olarak anti-CD40 antikörları kullanılmakta ve CD40'ın CD40L'i ile birleşmesi önlenerek, bir kısım inflammatuar hastalıkta gelecek için umut vaat eden başarılı sonuçlar alınmaktadır. Örneğin; 2003 yılında yapılan bir çalışmada, 18 Crohn hastasına tek doz anti-CD40 antikoru verilmiş. Daha sonra alınan biopsilerde, hastalık aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir(38).

CD40 ve CD40L'inin antikörları, ateroskleroz gelişimini durdurmak için deneysel olarak kullanılmaktadır. Ancak bu sistemin uzun süreli inhibisyonunun nelere yol açabileceğini bilmek için, daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır(36). KKH'da; CD40 L'nin koroner arter endotel hücrelerinden salındığı gösterilmiştir ve bunun bir oksidatif stres mediatörü olabileceği öne sürülmüştür(62).

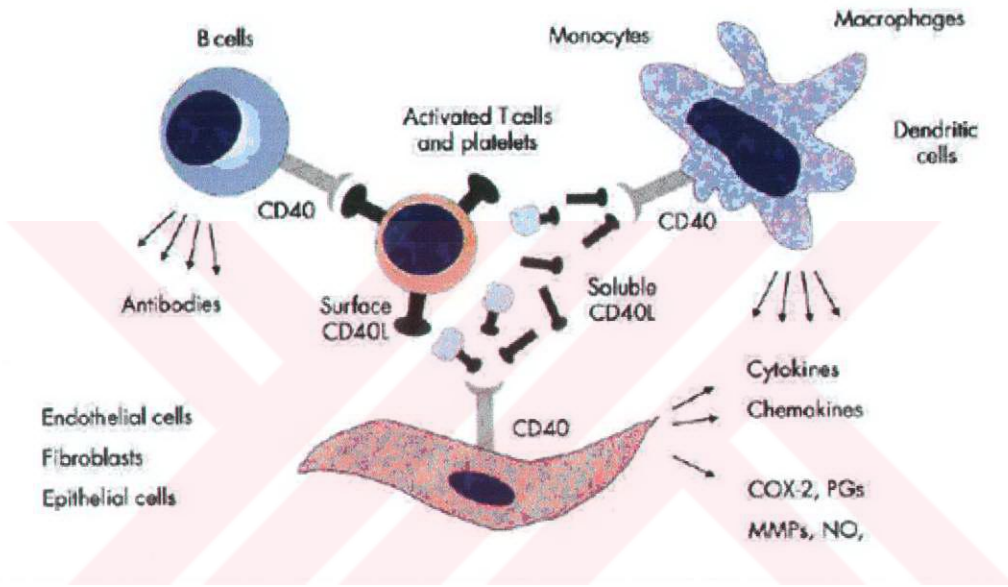
CD40 ve CD40L Sistemi;

CD40 ve CD40Ligandı; tumor nekrotizan faktör reseptör ailesine yapısal benzerlik gösteren, membran glikoproteinleridir. CD40 ile CD40L'inin birleşmesi; humoral ve hücrel immünitede anahtar rol oynamaktadır. Birçok mekanizmayla birlikte bu mekanizmanın da aktiflenmesi, inflammatuar bir süreç olan aterosklerozun hızlanmasına sebep olmaktadır(10).

CD40; 50 kiloDalton(kDa) ağırlığında, çoğunlukla B lenfositlerin üzerinde bulunan, TNF ailesinden integral bir proteindir. B lenfositlerin yanı sıra; makrofajlar, EH ve trombositlerin yüzeyinde de bulunur.

CD40 ile trimer şeklinde bağlanan, CD40 ligandı; 39 kDa ağırlığındadır. CD40L'ı ilk olarak CD154 diye isimlendirilmiştir. Ve esas olarak, aktive T lenfosit hücrelerinden eksprese edilir. Ancak yapılan birçok çalışmada, T hücrelerinin yanı sıra B lenfosit hücrelerinden, makrofajlardan, EH, trombositlerden, eozinofillerden ve bazofillerden de salındığı gösterilmiştir(36,39).

CD40 ligandı yapısal olarak TNF α 'ya benzeyen bir transmembran proteindir. Bu ligandın hem çözümlü hemde membrana bağlı formu vardır. Birçok faktörün T hücrelerini aktive etmesi üzerine eksprese edilerek, CD40 ile birleşir ve enflamatuvar cevabı oluşturur. Trombositler de, CD40L'nin majör kaynakları arasındadır(55).



Şekil 5: CD40 ile CD40 ligandının birleşmesi

CD40 ve CD40L'inin birleşmesi sonucu, özellikle T hücre bağımlı immun sistemin üzerinden inflamatuvar cevap oluşur. Şekil 5'de gösterildiği gibi birçok etkenle aktive olan T hücreleri, CD40L'ını eksprese eder. Aynı zamanda trombositlerin aktiflenmesi ile de CD40L'ı eksprese olur. Bir kısım CD40L'da hücre yüzeyinden ayrılarak serbest dolaşıma geçer ve bunlara solübl CD40L'ı (sCD40L) denir. Genellikle T hücreleri üzerindeki CD40L'ı ile etkileşen B hücrelerinden de; CD40L ekspresyonu yaparlar. Ve bunlar, çoğunlukla hücre yüzeyinden salınarak sCD40L'ını oluştururlar(67).

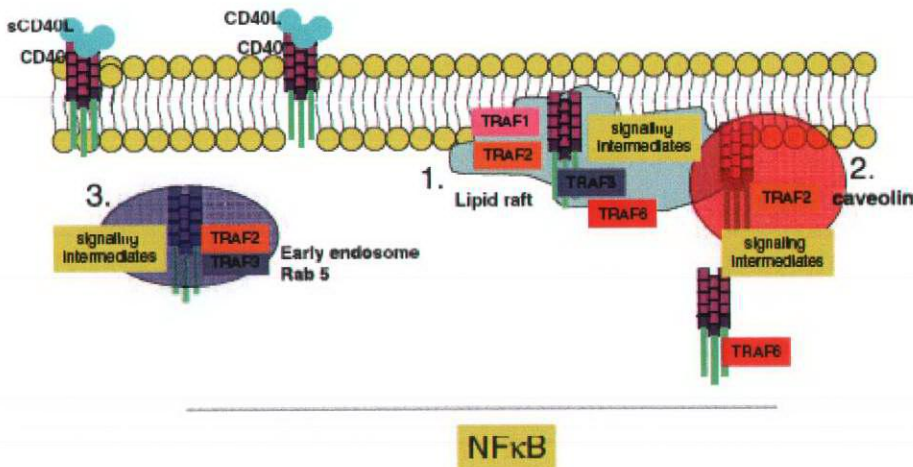
CD40; Şekil 6'da görüldüğü gibi, B lenfositlerinin yanısıra, makrofajlardan, endotel hücrelerinden, fibroblastlardan ve epitel hücrelerinden de eksprese edilebilir. CD40 ile CD40L'inin birleşmesi sonucu ortama birçok sitokinler, nitrik oksit ve

kimokinler salgılanır. Böylece inflamasyonun başlaması tetiklenmiş olur. T hücrelerinin bir kısmı dolaşımdan, transmigrasyonla damar duvarı içine girerek, endoteldeki hücre yüzeyi CD40 ile T hücre yüzeyindeki CD40L'nin birleşmesine yol açarlar. Böylece; inflamatuvar süreç bir şelale gibi büyüyerek inflamasyonun yayılmasına sebep olur(68).

CD40 ile CD40L'ı birleştğinde, EH'den adezyon molekülleri eksprese edilmeye başlar. Böylece çok çeşitli hücre tiplerinden (monositler, fibroblastlar, dentritik hücreler, DKH gibi) proenflamatuvar sitokinlerin (IL-1, IL-6, IL-12, TNF α) salınımı indüklenerek inflamasyon başlar. Sitokinler, ICAM-1, VCAM-1 gibi adezyon molekülleri ve selektin gibi immun ve enflamatuvar süreci başlatan, bir çok immunmediatörün, salınımı da bunu kolaylaştırır(39).

CD40-CD40 L birleşmesi; ateroskleroz yanında, multipl skleroz, lupus, kollajen artirit, enflamatuvar barsak hastalıkları gibi kronik hastalıklarla da ilişkilidir(39).

CD40'ın hücre içine alınmasını açıklayan birçok hipotez mevcuttur(Şekil 6). Birincisi; B lenfositlerinde tanımlanmıştır; CD40, ligand ile bağlandıktan sonra lipid yarıklarından hücre içine girer. Bunlar TRAF 1-2-3-6 (TNF α reseptör-associated factor) denilen, TNF α reseptör ailesi ile ilişkili proteinlerle birleşir ve sinyal yollarını aktifler(36).

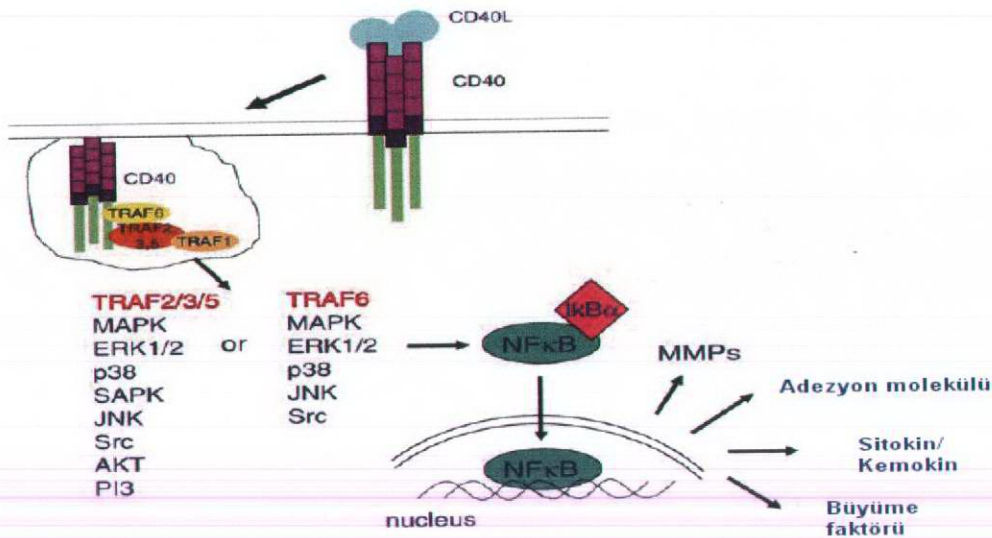


Şekil 6: CD40'ın hücre içine giriş mekanizmaları

İkinci mekanizma; renal tübüler hücrelerde, CD40, caveoller gibi özelleşmiş yarıklardan geçerek hücre içine girer. TRAF2 üzerinden sinyal yollarını aktifleyen CD40, caveollerden ayrılarak sitoplazma içindeki TRAF 6'ya bağlanır. Üçüncü mekanizma ise; endotel hücrelerinde tanımlanmıştır. CD40L'ı, CD40'a bağlanır, CD40 Rab5 gibi proteinlere bağlanarak endosomla hücre içine alınır. TRAF2 ve TRAF 3 üzerinden sinyal yollarını aktifler.

Şekil 7'de gösterildiği gibi; CD40L'ı CD40'a bağlandıktan sonra sinyal sistemleri devreye girer. Bu sinyal aktivitesi ile adaptör molekül diye adlandırılan TNF ile ilişkili proteinler, birçok kinazlar ve efektör proteinleri aktifler. CD40 bu proteinler ile bağlanır ve aktivasyonla inflamasyonu başlatan birçok molekül devreye girerek, proinflamatuvar yol aktiflenir. Böylece CD40 hücre içine girer ve endositik yollar aktive olarak hücre içinden birçok molekül salgılanır. Örneğin; JNF (Janus kinase), P38, MAPK (Mitojen activated protein kinase), Nuclear factor kappa-B (NFκB) vb. (40,41). Birçok yolağı aktiflemesine rağmen, esas olarak CD40 sinyalizasyon sistemi NFκB'yi aktifler (41). CD40L'ının solübl formları hücre içine girebilir, diğerleri eksprese edildikleri hücre yüzeyinde kalırlar (67).

Birçok deneysel çalışmada CD40 ile CD40L'ının birleşmesinin inhibisyonu sonucu; aterosklerozun yavaşlatıldığı görülmeye rağmen, uzun dönemde bu inhibisyonun bağışıklık sisteminde problemler yaratabileceği öne sürülmektedir (36).



Şekil 7: CD40-CD40L etkileşimi ve NFκB aktivasyonu

2.2.3. Ateroskleroz ve DM

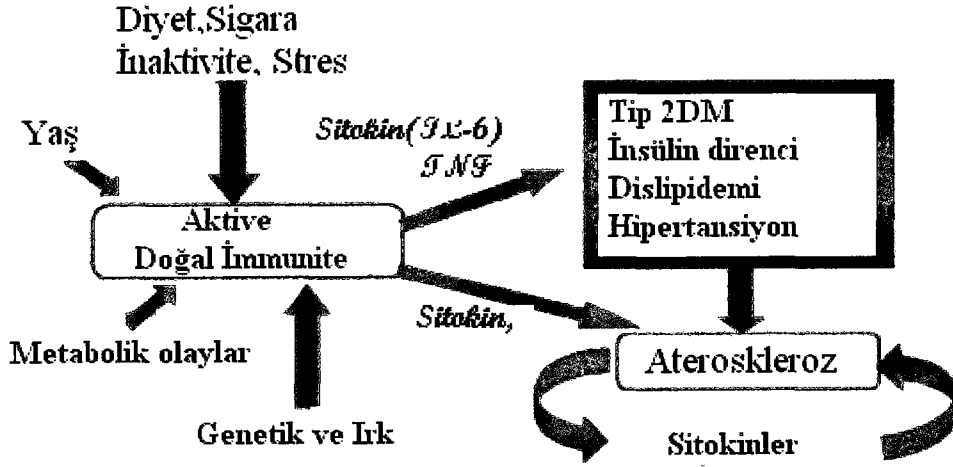
Diyabet; ateroskleroz ve artmış kardiovasküler risk ile birlikte seyreden bir hastalıktır. DM'un en önemli makrovasküler komplikasyonu; ateroskleroz ve buna bağlı gelişen koroner kalp hastalıklarıdır(KKH).

Diyabetteki hiperglisemi makromoleküllerde modifikasyona yol açar(ileri glikozillenme son ürünleri-AGE oluşumu). AGE resptörleri (RAGE); de proinflamatuvar makrofaj sitokin üretimini ve vasküler endoteldeki inflamatuvar olayların gelişimini arttırarak, ateroskleroz oluşumunu hızlandırmaktadır(9).

Hiperglisemi ve sonucunda kanda artan serbest yağ asitleri (SYA); potansiyel olarak; EH fonksiyonlarını değiştirirler. Diyabette oluşan AGE; damar duvarı katılığına ve ateromatöz değişikliklere sebebiyet verir. EH disfonksiyonu ile özellikle Tip2DM 'da görülen, insülin direncine bağlı vazodilatasyonun azalması da, protrombotik ve enflamatuvar durumu şiddetlendirir(2).

Diyabette aterosklerozun erken evrelerinde; hipergliseminin direkt olarak endotel hasarını oluşturduğu ve bunlara, birbirinden bağımsız birçok mekanizma ile yol açtığı ileri sürülmektedir. Bunlar; protein kinazC izoformlarının aktivasyonu, AGE oluşumunda artma, proinflamatuvar nükleer transkripsiyon faktörlerinin (NFkB) aktivasyonu olarak sıralanabilir. Bütün bu mekanizmalar ile mitokondride; Elektron transport zinciri aracılı süperoksitlerin oluşmu artmaktadır. Hipergliseminin indüklediği, Reaktif Oksijen Türleri(ROT) ; endotel disfonksiyonunu şiddetlendirip, vazokonstriktör prostoglandinler ve prostosiklinlerin sentezini arttırmaktadır. Ayrıca hiperglisemi ile artmış ROT seviyeleri sonucu, vasküler geçirgenlik artmaktadır(59). Hipergliseminin; makrofaj metalloproteinazın (MMP) ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir(60).

Şekil 8 'de de gösterildiği gibi; aterosklerozun patogenezinde diyabetle birlikte birçok faktör önemli rol oynamaktadır.



Şekil 8: Ateroskleroz oluşumunda rol alan faktörler(59).

Tip 2 DM'da(daha az oranda da Tip 1 DM) bozulmuş fibrinoliz sonucu, koagülasyon sisteminin dengesinde aksamalar olur. Ayrıca; DKH'de artan migrasyon ve proliferasyon nedeniyle, ateroskleroz oluşumu hızlanmıştır. Hiperglisemi ve kanda SYA, oksideLDL artışı ve glikozillenme ürünleri EH'nin bariyer fonksiyonlarını bozar.Artmış EH disfonksiyonu ile birlikte, DKH'lerinde; prokoagulan moleküller, adezyon moleküller, kemotaktik faktörler, sitokinler ve büyüme faktörlerinin yapımı artar. Böylece monositler aktif hale dönüşerek, intimaya tutunmaları kolaylaşır. Tüm bu olaylar; damar duvarının tunika medyasında hücre ölümünü tetikleyerek plakların oluşmasına neden olurlar(3).

Diyabet; protein ve nükleik asitlerin oksidasyonu ve glikoksidasyonu ve AGE'lerin birikmesi sonucu makrofajlardan sitokin salınımını artırır. Tip 2 DM'da ateroskleroz sonucu oluşan plaklar, yaygın doku nekrozu ile birliktedirler.Tip1 DM'da ise; artmış fibröz doku ve daha az köpük hücrelerini içeren daha stabil plaklar saptanır. Bu da paradoksal olarak koruyucu bir durumu yansıtır. Çünkü bu plağın stabilitesi, mortalite ve morbiditeyi önemli ölçüde azaltır(36).

Hem Tip 1DM, hem de Tip 2DM'a; protrombotik bir durum eşlik eder. İnsülin direnci ve hiperglisemi; SYA, fibrinojen, koagülasyon faktörüVII ve Plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI-1) artışına neden olur(4).

Tip 2 diyabetde görülen, insülin direnci sendromu; koroner arter hastalığının hızlanmasında sorumludur. Bu nedenle insülin direncinin düzeltilmesi, gliseminin normale dönmesi ile koroner aterosklerotik hastalığın ilerleyişini yavaşlatabilir. Diyabet, koroner kalp hastalığının erken başlaması için önemli bir risk faktörüdür ve

KKH oluşumunda, hiperkolesterolemi ile güçlü bir birliktelik gösterir(35). DM; KKH riskini kadınlarda yedi kat, erkeklerde üç kat arttırmaktadır. DM'da; hipergliseminin kanın viskozitesini artırması nedeniyle, trombosit aktivitesi artar, ayrıca plazma fibrinojen ve PAI-1 düzeyleri yükselir. Endotel disfonksiyonu da sıklıkla DM'da görülen damar disfonksiyonundan sorumludur(35).

Diyabet, ateroskleroz ve dolayısı ile artmış kardiovasküler risk birlikteliği sebebi ile CD40veCD40L etkileşiminin rolü araştırılmaktadır. Aterosklerozda özellikle trombositlerde yapılan çalışmalarda; CD40 ile CD40L ekspresyon artışının, proinflamatuvar ve proaterojenik süreçte rol oynadığı ileri sürülmektedir(42).

KKH'da; CD40L'nın da koroner arter endotel hücrelerinden eksprese olduğu gösterilmiştir ve bunun bir oksidatif stres mediatörü olabileceği öne sürülmektedir. Böylece vasküler hastalıklarda, CD40L'nın endotelial disfonksiyona katkıda bulunduğu gösterilmiştir(19).

Birçok çalışmada; insüline bağlı diyabet hastalarında, immun düzenleyici moleküllerin kuvvetli bir etkileşiminin olduğu ileri sürülmektedir(7). Ayrıca; Tip2 diyabet hastalarının, ateroskleroza bağlı olarak kardiovasküler hastalık riski, normal popülasyona göre çok yüksek olması nedeniyle, diyabetin bir inflamasyon süreci olduğu ileri sürülmektedir.

Tip1 DM; patogeneğinde CD4 T hücrelerinin rol oynadığı, pankreas β hücrelerinin harabiyetiyle giden, klinikte hiperglisemi ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Otoimmün hastalıklı hayvan modellerinde CD4 T hücrelerinden CD40L ekspresyon artışı gösterilmiştir(7).

Tip2 DM; artmış kardiovasküler hastalık riski ile ilişkilidir. Endotelial disfonksiyonun, aterosklerozun erken bir markırı olduğu düşünülmektedir. Tip 2 diyabette de, CD40veCD40L etkileşiminin olduğu bilinmektedir. Ayrıca bu etkileşim, sadece komplikasyonlu vakalarda değil, henüz komplikasyon gelişmemiş olgularda da vasküler disfonksiyonla ile beraber gözlenmiştir(8).

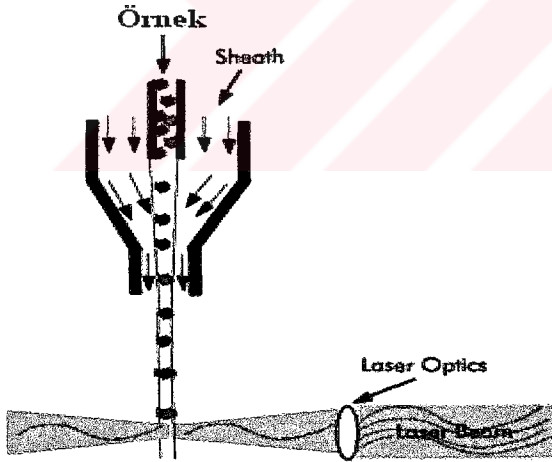
DM'da görülen ateroskleroza yatkınlık, birçok sebebe dayanmakla beraber, özellikle trombositlerde CD40 ve CD40L'nın protrombotik ve proinflamatuvar bir ortam yaratarak, aterosklerozu tetiklediği yönünde hipotezler ileri sürülmektedir. Diyabetiklerde makrovasküler komplikasyonun gelişmesinde, CD40L ekspresyonunun artışının katkıda bulunduğu çalışmalarla desteklenmiştir(10).

2.3. FLOW SİTOMETRİ

2.3.1. Tanımı

Sıvı akımında hareket eden, heterojen hücre süspansiyonları içerisindeki her bir hücrenin özelliklerinin ölçülebildiği bir teknolojidir. Tek hücre seviyesinde hızlı, çok parametrelili analiz sağlar. Bir sıvı içerisinde süspansiyon haline getirilen hücrelerin; büyüklüğü, granülaritesi, vizkozitesine belirleyerek analiz yapar(43).

Süspansiyon içindeki hücreler; akış kanalı boyunca teker teker tanınmak esasına göre incelenir. Hücrelerin içinde bulunduğu süspansiyon, akışın stabilitesini ve düzgünlüğünü sağlayan 'sheath fluid' denilen bir sıvının merkezine doğru injekte edilip, hücrelerin akım boyunca bu sıvı ile beraber hareket etmesi sağlanır. Küçük bir delik boyunca, bir partikülün geçişi süresince oluşan elektiriksel iletkenlikteki değişikliklerin yanında, hücrelerin monoklonal antikorlarla işaretlenip, üzerlerine gönderilen lazer ışığı ile birçok farklı fotodedektörler yardımı ile saçılımlarının gösterilmesi temeline dayanır(Şekil-9)(44).



Şekil 9: Flow sitometri çalışma mekanizması

Ana kural, hücrelerin süspansiyon haline gelmesi ve monoklonal Antikor ile işaretlenmesidir. Dokuların ise parçalanıp, belirli filitrelerden geçirilerek süspansiyon haline getirilmesi gerekir. Hücrelerin izolasyonu ve saf eldesinden sonra bir veya daha fazla floresan bağlı monoklonal antikorlar hücre ile konjuge edilir (işaretlenir). Antikorların floresan yaymaları, florokrom maddelerle konjuge olmaları sayesinde

olur. Bu floresana bağılı antikörlara prob denir ve problemler genellikle yüzey antijenine veya hücre içi elemanlara spesifiktirler(45).

Flow sitometri, çok sayıda hücreyi hızlı sayarak, çok az sayıdaki neoplastik hücreleri bile geniş bir hücre popülasyonu içinde saptayabilir. Aynı zamanda hücre alt gruplarını ayırır ve heterojen hücre popülasyonlarını saflaştırabilir(43).

Bu yöntemin avantajları;

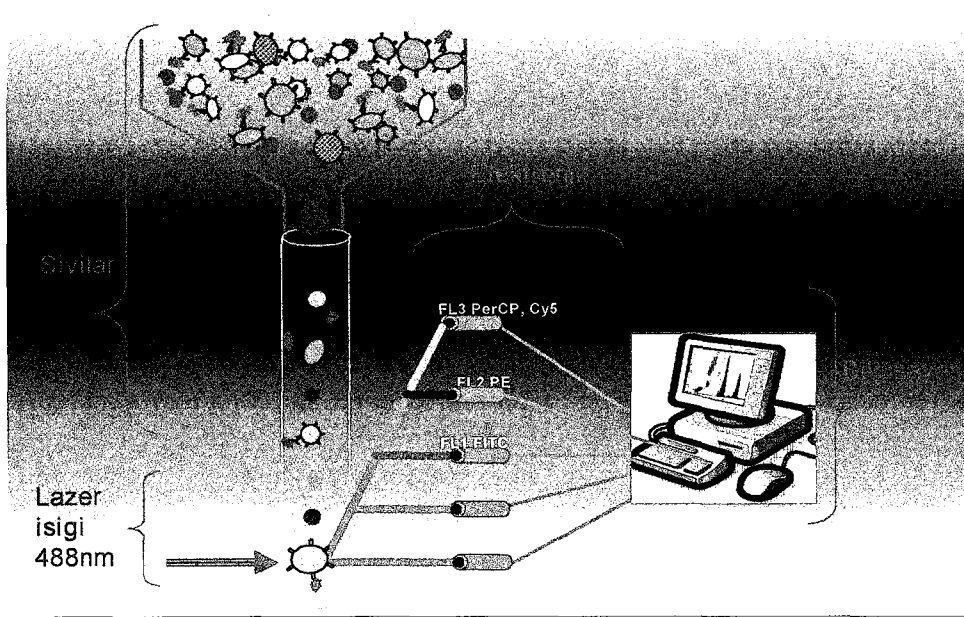
- Hızlı ve objektif bir yöntem olması,
- Hücrelerin fiziksel ve kimyasal özellikleriyle ilgili ölçümler yapması,
- Morfolojik yöntemler göre daha fazla sayıda hücrenin incelenebilmesi,
- Ölçümlerin tekrarlanabilirliği daha iyi olması,
- Daha az iş gücü ve zaman gerektirmesi.

Flow sitometrinin bölümleri;

Örnek toplayıcı, Sheath fluid(akış sistemi), Işık kaynağı(lazer), Sferik ve çapraz silindirik filitreler, Sinyal dedektörleri (fotodedektör) ve bilgisayardır(Şekil-10).

Fotodedektörler;

- FALS (Forward Angle Light Scatter)(önden saçılımı gösterir.)-Hücre boyutu
- RALS (Right Angle Light Scatter)(yandan saçılımı gösterir)-İçyapı
- Yeşil floresan
- Kırmızı floresan (43).



Şekil 10: Flow sitometrinin bölümleri

Hücre süspansiyonu; akışın stabil ve düzgünlüğü için, 'sheat fluid' denilen sıvının merkezine yavaşça injekte edilir ve hücreler akım boyunca bu sıvı ile beraber geçer. Girdikleri akım kabininin geometrik şekli nedeniyle hücreler tek sıra halindedirler.

Monoklonal antikor ile işaretli hücreler, üzerilerine gelen lazer ışığı ile yaydıkları ışığın yoğunluğuna göre; hücre boyutu, içyapısı, yüzey morfolojisi ve canlılıkları ile ilgili değerlendirilebilirler. Daha başka modellerinde de; hücre süspansiyonu ince bir delikten geçirilirken, iki tarafta 2 elektrot ve sabit bir akım vardır. Her hücre delikten geçerken, direnç artar ve elektriksel potansiyel farkında ani bir artış olur ve ani yükselişler amplifiye edilir ve sayılır(43).

Boyama teknikleri

-Hücre yüzeyinde eksprese edilen antijene karşı spesifik antikor kullanılır.

-Boyama tekniklerinin gelişmesi ile hücrelerin birden fazla antikorla karakterizasyonunu sağlanmıştır.

-Her boyanın (florokrom); emisyonu istenmeyen floresanını azaltmak için optik filitreler kullanılır.

-Boyaların; FITC (fluorescein isothiocyanate), PE (phycoerythrin), PETR (phycoerythrin-Texas red), PECY5 (phycoerythrin-cyanin 5), PI (propidium iodide) FDA(floresein di asetat), Rhodamine gibi bir çok çeşidi vardır.

-Boyaların özelliklerine bir kaç örnek verilecek olursa; PI (propidium iodide); ölü hücreler ile kırmızı floresans verirken, FDA(floresein di asetat); canlı hücrelerle yeşil floresans verir.

-Rhodamine 123; plazma membranı bozulmamış, aktif mitokondrisi olan hücreler ile parlak yeşil floresans verirken, ölü hücreler çok soluk boyanır ve PI ile güçlü floresans verir. Canlı hücrelerin boyanması için daha uzun süre inkübasyon gerekir. Ölü hücrelerin boyanması daha kısa sürede gerçekleşir(46).

2.3.2. Tıpta Kullanım alanları:

1-İmmünofenotipleme: Eksprese edilen antijene karşı geliştirilmiş immunofloresan işaretli monoklonal antikorlar kullanılarak hücreler birbirinden ayrılır. Lökosit yüzey molekülleri ile immunofenotiplemeler yapılır. Hücre yüzeyinde bulunan protein yapısındaki antijenik yapılar CD(Cluster of differentiation) diye isimlendirilir. CD'ler sadece lökositler üzerinde değil; dendritik hücre, trombosit, eritrosit vb gibi birçok hücre yüzeyinde de bulunur(46).Günümüzde yaklaşık 247 CD yüzey antijen vardır ve her geçen gün yenileri gruba eklenmektedir. Özellikle lösemi lenfoma immünofenotiplemesi, hematolojik malignitelerin belirlenmesi, immün yetmezliklerin teşhisi ve otoimmün hastalıkların tanısında flow sitometri çok sık olarak kullanılmaktadır.

2-Hücre içi Sitokin Tayini: Sitokinler doğal ve kazanılmış immünitede rol oynayan protein ailesidir. Her hangi bir uyarı ile hücreden salınan sitokin, başka bir hücrenin reseptörlerine bağlanır. Hücre büyümesi, hücre aktivasyonu, inflamasyon, fibrosis gibi önemli olayların düzenlenmesinde rol alır. Flow sitometre; işaretli anti-sitokin antikor kullanarak ölçümleri yapar. Hücre yüzeyinde, avidin-işaretli sitokin spesifik antikorları kullanılırken, hücre içinde direkt sitokin boya kullanılır.

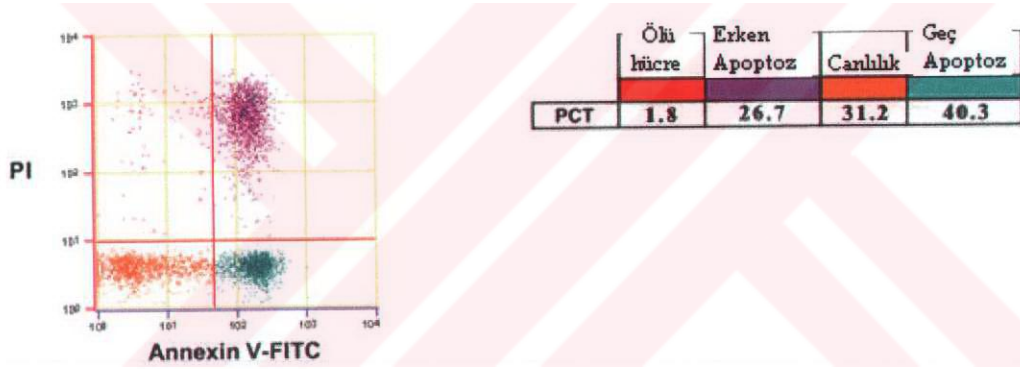
3-DNA analizi: Flow sitometri; ploidi tayini ve eşzamanlı hücre siklusunun her fazında bulunan hücre sayısı tespit edebilir. Acridine Orange (AO) adlı boya sıklıkla kullanılır. AO'ın metakromatik boyanma özelliğine bağlı olarak, çift sarmal DNA yeşil ve tek sarmal DNA ise kırmızı floresan verir. Daha çok denature DNA içeren apoptotik hücreler; daha yoğun kırmızı boyanırken, apoptotik olmayan hücreler parlak yeşil boyanıp düşük oranda kırmızı floresans verir. Bu yöntemle kırmızı floresans gösteren histogramlar ölçülüp, hücre apoptozisi saptanabilir.

Flow DNA analizinde; özel boyalar kullanılarak tek hücre düzeyinde analiz yapılabilir. DNA boya, DNA'da istenen spesifik bölgelere bağlanır. Örneğin: Hoechst boyası, DNA'da A-T zengin bölgelere veya Mitramisin ise G-C'den zengin bölgelere bağlanır. Birçok boya DNA analizinde kullanılır. (en sık; PI, AO, Hoechst). Analiz sırasında, hücre membranı ortadan kaldırılır ve DNA boyasının hücre içine girmesi sağlanır. DNA boyasının, RNA'ya bağlanmaması için RNase ile RNA uzaklaştırılır. Flow'da DNA analizi yapılırken iki tür bilgiye ulaşılır:

- Go ve G1 de bulunan hücrelerin ortalama DNA içeriği

-Hücre siklusunun her fazında bulunan hücre sayısı(47).

4-Apoptoz Tayini; Apoptoz; aşırı hücre proliferasyonu ve migrasyonunu engelleyen bir seri biyokimyasal reaksiyon sonucu oluşan, programlı hücre ölümüdür. Aslında, vücudun bir savunma mekanizmasıdır. Flow analizinde; henüz hücrelerde nükleer değişiklik olmadan tespit edilebilir. En sık Annexin V olmak üzere, Rhodamin, PI, Hoechst 33258 boyaları da kullanılır. Apoptozun erken döneminde; hücre membranı, bütünlüğünü korur. Ancak, membrandaki fosfolipid asimetrisi kaybolur ve normalde membran iç kısmında bulunan fosfatidilserin hücre yüzeyine çıkar. AnnexinV; seçici olarak hücre yüzeyindeki fosfatidil serine bağlanır. Erken dönemde AnnexinV, spesifik bir görüntü oluşturur(Şekil 11). Ancak yine de, apoptoz ile nekrotik hücre ölümünü kesin ayırmak için, monoklonal antikorlarla birlikte kullanılmalıdır(48).



Şekil 11: Annexin boyası ile apoptoz tayinine örnek

5-‘Sorting’ Hücre ayırma: Süspansiyon içindeki hücelere; lazer ışığı gönderildikten sonra, ultrasonik vibrasyon uygulanır. Bu ultrasonik vibrasyon; akış halindeki sıvıyı damlacıklara (hücelere) parçalar. Bu parçacıklar; yüksüz, +, - yüklü damlacıklar olarak, elektriksel alandan geçirilir ve yüküne göre saptırma plakları ile birbirinden ayrılır. Örneğin; pankreas adacık β hücre izolasyonu bu yöntemle ayrılır(43).

6-Mikrobiyolojide Kullanımı; Mikroorganizma canlılığı, sayısı, identifikasyonu da flow sitometre tayini ile saptanabilir.

3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER:

Hastalar;

Bu çalışma için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulundan B.30,2.MAR.0.01.00.02/AEK-784 sayılı ve Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Başhekimliğinden B104ism434017-4158 sayılı onaylar alınmıştır. Çalışmaya; Haziran 2007 - Ekim 2007 tarihleri arasında, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Diyabet Polikliniği'ne başvuran hastalar ve sağlıklı gönüllüler dahil edilmiştir.

Çalışmamıza; ADA standartlarına göre, diyabet tanısı almış ve 5 yıldır takip edilen 59 hastayı dahil ettik. Tip 1 DM hastalarının, daha genç populasyonda yer alması sebebiyle, kontrol gruplarını iki gruba ayırdık. Kontrol gruplarını, Tip1 için 35 yaş altı, Tip2 için 35 yaş üstü sağlıklı bireylerden oluşturduk. Ayrıca, kontrol gruplarını; herhangi kronik bir hastalığı olmayan rutin biyokimya tetkiklerinde de AKŞ'i 110mg/dL 'nin altında, total kolesterolü 220' yi geçmemiş bireylerden seçtik. Kontrol grubumuzu, 28 tanesi 35 yaş atı, 28 tanesi de 35 yaş üstü olmak üzere toplam 56 kişiden oluşturduk. Tip 2DM'un kontrol grubuna; 65 yaş üzeri bireyleri dahil etmedik. Böylece; tanı konulamamış kronik kalp veya diğer kronik hastalık riskini uzaklaştırmaya çalıştık. Aktif enfeksiyonu olanları, diyabet harici diğer multisistem hastalığı olanları (örn; koroner kalp hastalığı, serebro vasküler hastalık, miyokard enfaktüsü geçirmiş olmak gibi), ileri derecede diyabete bağlı gelişmiş böbrek ve sinir sistemi komplikasyonlu diyabet hastalarını, aspirin kullanan diyabet hastalarını ve gebeleri bu çalışmaya dahil etmedik.

Daha önceki çalışmalarda elde edilen verilerle, aterosklerozdaki CD40 ve CD40L etkileşiminin daha çok trombosit kaynaklı olduğu öngörüldüğünden, hemde elde edilmesi daha pratik olduğundan biz de çalışmamızı trombositler üzerinde yapmayı uygun gördük.

Çalışmaya alınan hastaların ve kontrol gruplarının, onayları alınarak 2ml EDTA'lı tüpte kanları alınmıştır. Ayrıca HbA1c için ve AKŞ ve total kolesterol tayinleri için uygun örnekler alındı. (Kontrol grubuna HbA1c, tanısal bir kriter olmadığı için dahil edilmedi .)

Kitler (Reagents): Beckman Coulter Corporation, CA, USA

IgG1-PE; İzotopik kontrol

IgG1-FITC; İzotopik kontrol

CD62-FITC; Trombosit has konjuge antikoru

CD40-PE; İntegral membran proteini antikoru

CD154 (CD40 L); CD40 ligandı olan membran proteini antikoru

Flow sitometri analizleri; EPICS XL[®] (Beckman Coulter Corporation) cihazı ile yapıldı. Her tüpte 20.000 hücre sayıldı. List mode analizleri System II yazılım programı ile yapıldı. Flow sitometri sisteminin lazer ayarı ve floresans ayarları, her kullanım öncesinde 'FlowCheck' kalibrasyon boncukları kullanılarak yapıldı.

Yöntem;

EDTA'lı vakumlu tüplere alınan kan örnekleri aynı gün içinde işleme konularak çalışıldı. Tüpler; 1200 RPM'(Rotation Per Minute)de 10 dakika santrifüj edilerek; Trombositten Zengin Plazmaları (TZP) ayrıldı. Ayrı bir yerde 3 tüp hazırlandı;

1.tüpün içine, İzotopik kontroller olan 10µL IgG (FITC) + 10µL IgG (PE) konuldu.

2.tüpün içine, 10µL CD61 +10µL CD40 konuldu

3.tüpün içine, 10µL CD61 + 10µL CD40 L konuldu.

Tüm tüplerin üzerine; 100 µL TZP eklendikten sonra, 20–25 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra tüm tüplerin üzerine 1000µL PBS tamponu konuldu. Ve analizleri EPICS XL (Beckman Coulter Corporation), system II yazılım programı ile 20.000 hücre sayılarak yapıldı. Her ölçümde FS (Forward Scatter), SS (Side Scatter), FL1 (Floresans 1) ve FL3 (Floresans 3) parametreleri kullanıldı. Değerler; Mean Fluorescence Intensity (MFI) olarak verildi.

Çalışma grubunun ve kontrol grubunun serum AKŞ, Total kolesterol değerleri spektrofotometrik yöntem ile Modular P800 (Roche Diagnostics, Mainheim, Germany) cihazında ve HbA1c değerleri ise HPLC Varyant 2 (Bio-Rad, USA) cihazı ile ölçüldü.

İstatistiksel İncelemeler

Bu çalışmada, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) Windows 10,0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında student t testi kullanıldı. Parametreler arası ilişkiler ise Pearson Korelasyon analizi ile değerlendirildi. Sonuçlar % 95'lik güven aralığında, anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirildi.



4. BULGULAR;

Çalışma; Haziran 2007 - Ekim 2007 tarihleri arasında Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Diyabet Polikliniği'ne başvuran toplam 115 olgu üzerinde yapılmıştır. Olgular dört grup altında incelenmektedir; Tip1 DM 'da 28 olgu; Tip 1 kontrol grubunda 28 olgu; Tip 2 DM'da 31 olgu ve Tip 2 kontrolde ise 28 olgu incelemeye alınmıştır. Olguların yaşları 19 ile 65 arasında değişmekte olup ortalaması $38,51 \pm 13,72$ 'dir

Tablo 4: Parametrelerin dağılımları

	Tip 1 DM	Tip 1 Kontrol	Tip 2 DM	Tip 2 Kontrol
	(n=28)	(n=28)	(n=31)	(n=28)
	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD
Yaş	29,89±6,91	24,96±5,12	50,54±9,56	47,35±10,21
Cinsiyet (K/E)	15/13	18/10	19/12	15/13
T. Kolesterol	168,00±32,74	180,35±26,39	210,70±42,49	198,75±31,00
LDL Kolesterol	93,78±26,97	96,75±17,70	129,00±35,68	122,85±27,84
HDL Kolesterol	50,96±14,78	56,67±10,05	41,70±9,34	43,57±14,10
HbA 1c	7,72±1,38	-	7,86±1,43	-

Yaş dağılımlarına bakıldığında Tip 1 DM grubu 20 ile 43 yaş arasında değişmekte olup ortalama yaş $29,89 \pm 6,91$; Tip 1 Kontrol grubunda 19 ile 35 arasında değişmekte olup ortalama $24,96 \pm 5,12$; Tip 2 DM'da 30 ile 65 arasında değişmekte olup ortalama $50,54 \pm 9,56$ ve Tip 2 Kontrol grubunda 35 ile 65 arasında değişmekle birlikte ortalaması $47,35 \pm 10,21$ 'dir.

Total kolesterol düzeyleri; Tip 1 DM'da $168,0 \pm 32,74$; Tip 1 Kontrol grubunda $180,35 \pm 26,39$; Tip 2 DM'da $210,70 \pm 42,49$ ve Tip 2 Kontrol grubunda ise $198,75 \pm 31,0$ 'dir. LDL düzeyleri; Tip 1 DM'da $93,78 \pm 26,97$; Tip 1 Kontrol de $96,75 \pm 17,0$; Tip 2 DM'da $129,0 \pm 35,68$ ve Tip 2 Kontrol de ise $122,85 \pm 27,84$ 'dür. HDL düzeyleri; Tip 1 DM'da $50,96 \pm 14,78$; Tip 1 Kontrol grubunda $56,67 \pm 10,05$; Tip 2 DM grubunda $41,70 \pm 9,34$ ve Tip 2 Kontrol grubunda ise $43,57 \pm 14,10$ 'dur.

HbA1c düzeyleri; Tip1DM grubunda $7,72\pm1,38$; Tip 2 DM grubunda ise $7,86\pm1,43$ 'dür.

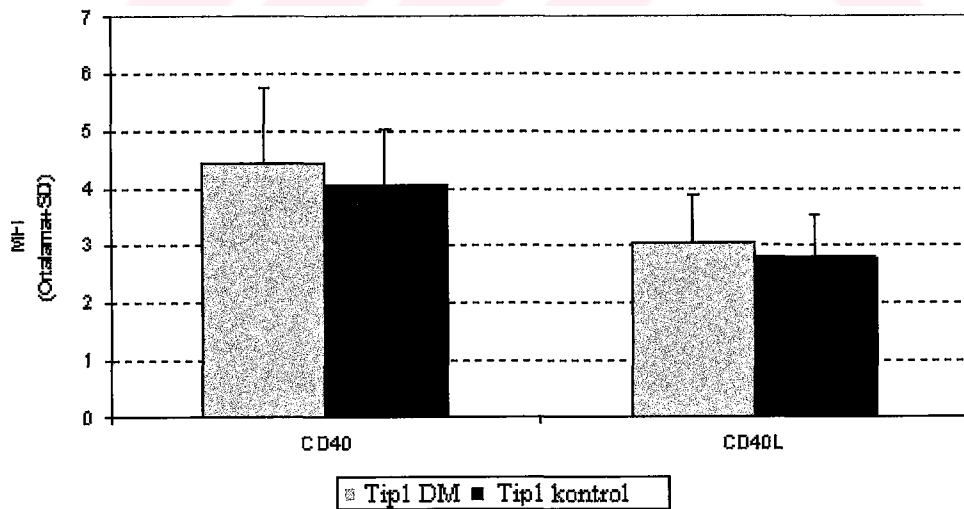
Tablo 5: Tip 1 DM ve Tip 1 Kontrol gruplarının CD40 MFI ve CD40 L MFI düzeyleri değerlendirmesi

	Tip 1 DM Grup Ort±SD	Tip 1 Kontrol Grup Ort±SD	Test Değ; p
CD40 MFI	4,45±1,37	4,06±0,96	t:1,245; p:0,333
CD40 L MFI	3,03±0,87	2,79±0,73	t:1,132; p:0,262

t: student t tes

Tip 1DM Grubu ile Tip 1 Kontrol grubunun CD40 MFI ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemektedir ($p>0,05$); Tip 1 DM'da CD40 MFI ölçümleri bir miktar yüksek olmakla beraber bu anlamlı olarak değerlendirilmemiştir (Tablo5).

Tip1 DM Grubu ile Tip 1 Kontrol grubunun CD40 L MFI ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemektedir ($p>0,05$); Tip1 DM'da yine CD40 L MFI ölçümleri bir miktar yüksek olmakla beraber bu anlamlı değildir (Şekil:12)



Şekil 12: Tip1 DM ve Tip Kontrol gruplarında CD40 MFI ve CD40 L MFI ölçümleri dağılımı

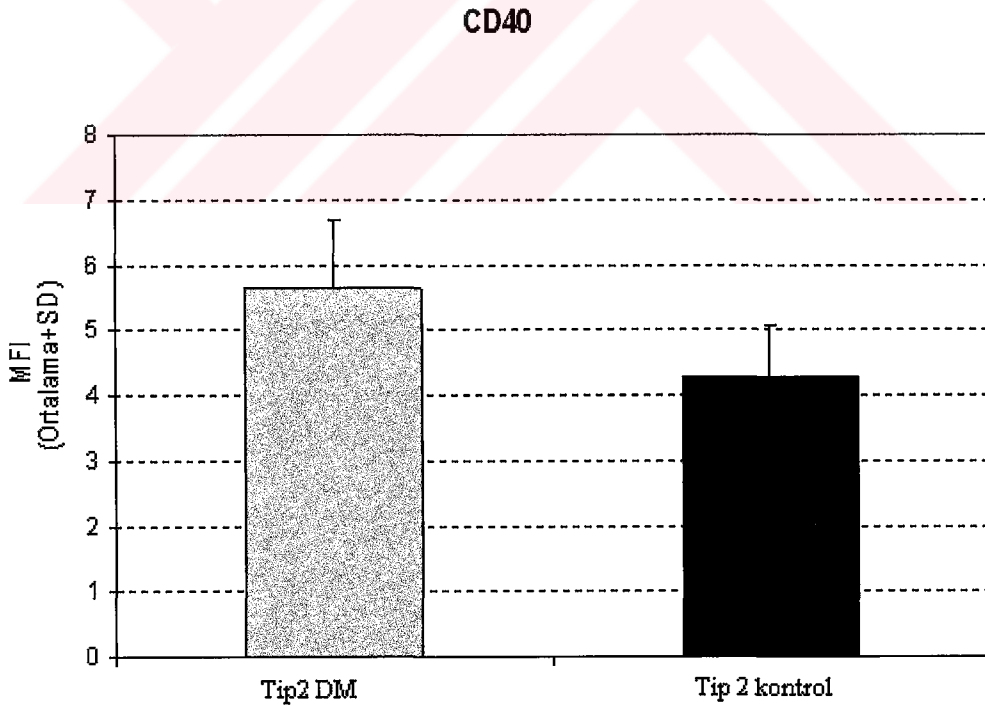
Tablo 6: Tip2 DM ve Tip 2 Kontrol gruplarının CD40 MFI ve CD40 L MFI düzeyleri değerlendirmesi

	Tip 2 DM Grup Ort±SD	Tip 2 Kontrol Grup Ort±SD	Test Değ; p
CD40 MFI	5,64±1,04	4,26±0,81	<i>t:5,628;</i> <i>p:0,001**</i>
CD40 L MFI	3,62±0,81	2,98±0,75	<i>t:3,126;</i> <i>p:0,003**</i>

t: student t test

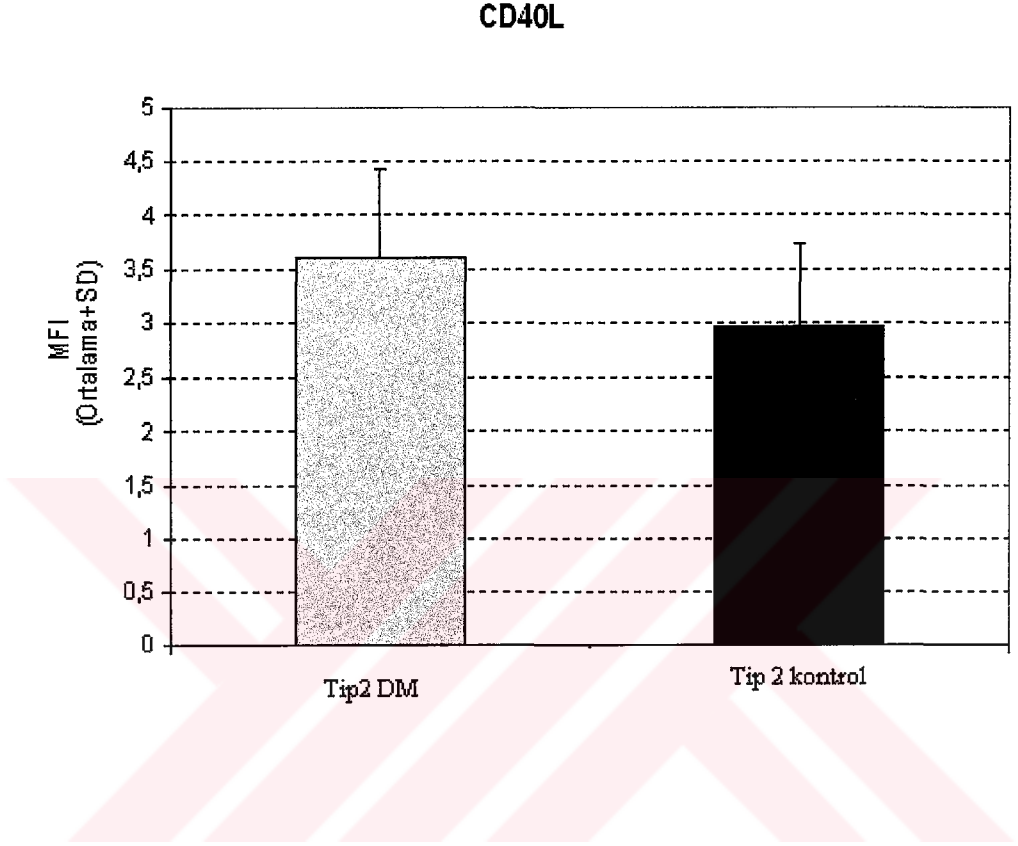
** *p<0.01*

Tip2 DM ile Tip 2 Kontrol grubunun CD40 MFI ölçümleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,01$); Tip 2 DM'da CD40 MFI ölçümlerinin kontrol grubuna göre yüksekliği anlamlı bulunmuştur(Tablo-6, Şekil-13).



Şekil 13: Tip2 DM ve kontrole göre CD 40 MFI ölçümleri dağılımı

Tip 2 DM ile Tip 2 Kontrol grubunun CD40L MFI ölçümleri arasında da istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,01$); Tip 2 DM'da CD40L MFI ölçümlerinin kontrol grubuna göre yüksekliği anlamlı bulunmuştur(Tablo-6, Şekil-14).



Şekil 14: Tip2 DM ve kontrole göre CD 40 L MFI ölçümleri dağılımı

Tablo 7: Tip 1 DM ve Tip 2 DM gruplarının CD40 MFI ve CD40L MFI düzeyleri değerlendirmesi

	Tip 1 DM	Tip 2 DM	Test Değ; p
	Ort±SD	Ort±SD	
CD40 MFI	4,45±1,37	5,64±1,04	t:3,731; p:0,001**
CD40 L MFI	3,03±0,87	3,62±0,81	t:2,667; p:0,010*

t: student t test

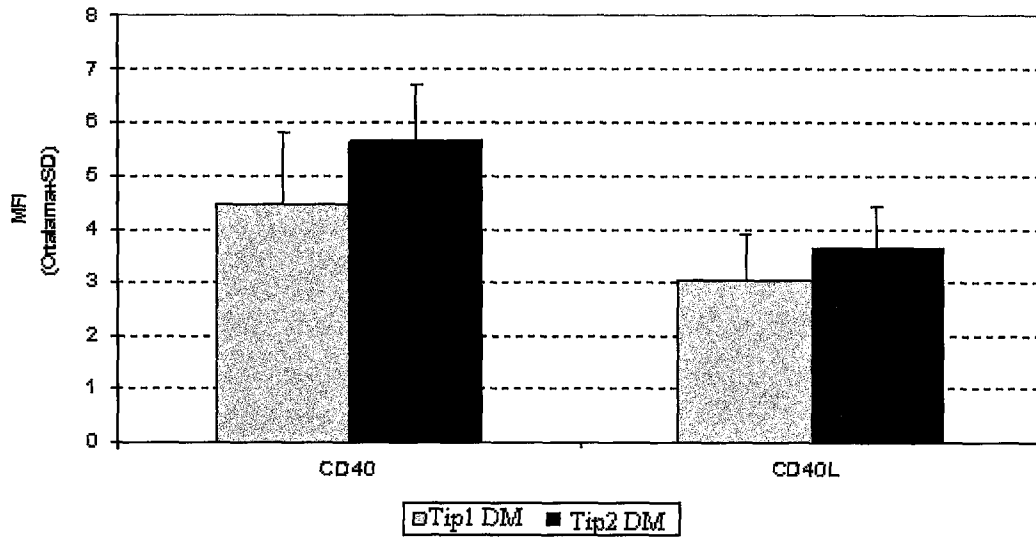
*p<0,05

**

p<0.01

Tip 1 DM ile Tip 2 DM Gruplarının CD40 MFI ölçümleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,01); Tip 2 DM'da CD40 MFI ölçümlerinin yüksekliği, Tip 1 DM grubuna göre anlamlı bulunmuştur(Tablo-7, Şekil-16).

Tip 1 DM ile Tip 2 DM gruplarının, CD40 L MFI ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,01); Tip2 DM'da CD40 L MFI ölçümlerinin yüksekliği, Tip 1 DM grubuna göre anlamlı bulunmuştur (Tablo7, Şekil-15)



Şekil 15: Tip 1DM ve Tip 2 DM gruplarında CD40 MFI ve CD40 L MFI ölçümleri dağılımı

Tip 1 DM grubunda ve Tip 1 kontrol grubunda; CD40 MFI ile total kolesterol düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$). CD40 L MFI ölçümleri ile total kolesterol düzeyleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir bağ bulunamamıştır. ($p>0,05$).

Tip 2 DM grubunda ve Tip 2 kontrol grubunda; CD40 MFI ile total kolesterol düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$). CD40 L MFI ölçümleri ile total kolesterol düzeyleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir bağ bulunamamıştır. ($p>0,05$).

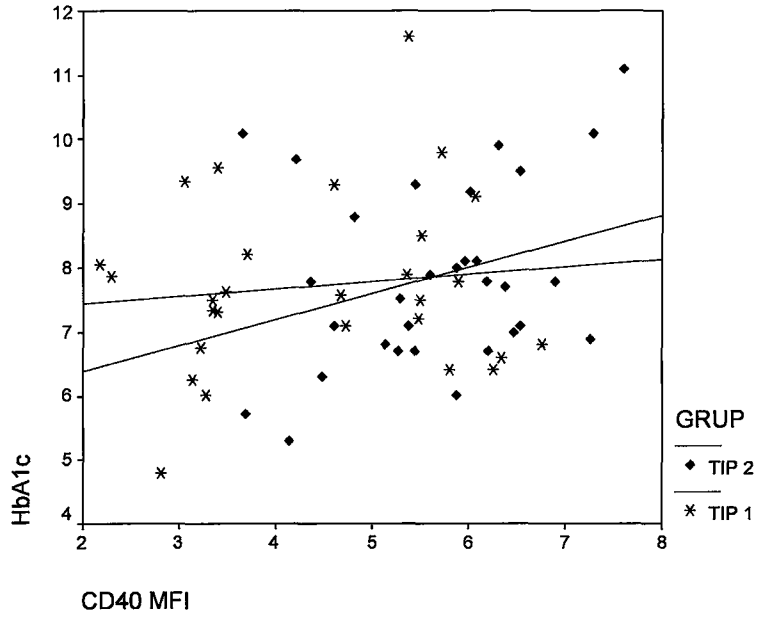
Tip 1 DM grubunda; CD40 MFI ile HbA1c düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$). CD40 L MFI ölçümleri ile HbA1c düzeyleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur ($p>0,05$)(Tablo-8).

Tip 2 DM grubunda; CD40 MFI ile HbA1c düzeyleri arasında pozitif yönde ve orta düzeyde ilişki görülmesine rağmen bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p>0,05$).. CD40 L MFI ölçümleri ile HbA1c düzeyleri arasında da pozitif yönde ve orta düzeyde ilişki görülmesine rağmen bu da istatistiksel olarak anlamlı değildir. ($p>0,05$)(Tablo-8, Şekil-16,17).

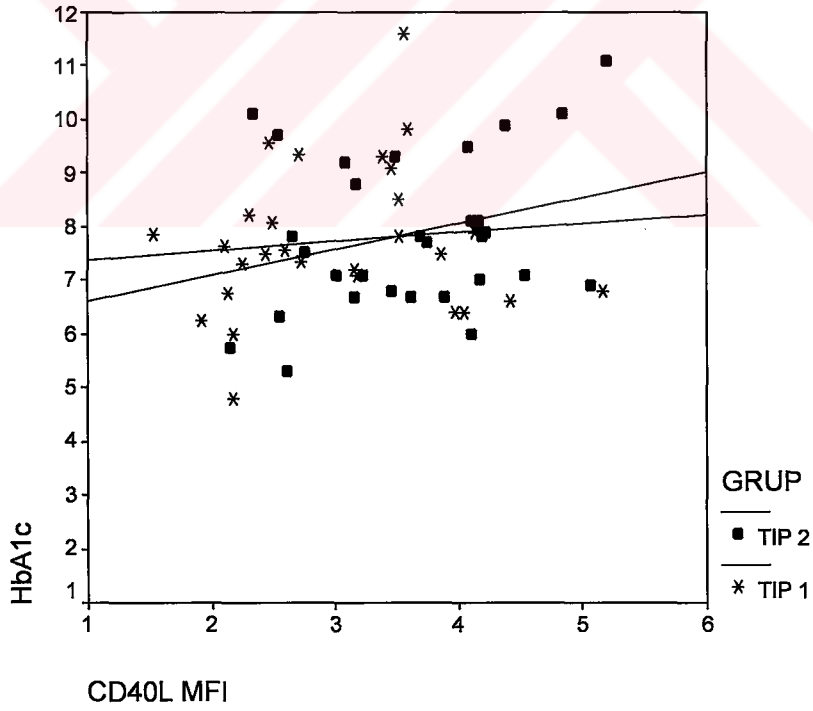
Tablo 8: Tip 1 DM ve Tip 2 DM gruplarında HbA1c düzeyleri ile CD40 MFI ve CD40 L MFI ölçümleri ilişkisi

		HbA 1c	
		r	P
Tip 1 DM	CD40 MFI	0,115	0,559
	CD40 L MFI	0,103	0,602
Tip 2 DM	CD40 MFI	0,298	0,103
	CD40 L MFI	0,276	0,133

r: pearson korelasyon katsayısı



Şekil 16: Tip 1 DM ve Tip 2 DM gruplarında CD40 MFI ile HbA1c ölçümleri



Şekil 17: Tip 1 DM ve Tip 2 DM gruplarında CD40L MFI ile HbA1c ölçümleri

5. TARTIŞMA

Diyabet; artmış kardiovasküler hastalık riski ile seyreden, kronik bir multisistem hastalığıdır. Diyabet hastaları; aynı yaştaki sağlıklı bireylere göre ateroskleroza daha yatkındırlar ve kardiyovasküler morbidite ve mortalite riskleri 2–4 kat daha artmıştır (53). Diyabetik hastalarda; normal populasyondan daha fazla koroner arter hastalığı görülür. Özellikle Tip2 DM'da iskemik olaylar ve myokard infarktüsü sıklıkla birlikte görülür(49). Diyabet hastalarında görülen kardiovasküler hastalıkların tehlikeli bir yönü de, asemptomatik seyretmesi ve daha ciddi komplikasyonlar geliştikten sonra tanı konulabilmesidir(50).

2002 yılında, ABD 'inde yapılan bir postmortem çalışmada; diyabetlilerde normal populasyona göre daha fazla damarsal harabiyet olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç; 15 yıl boyunca toplanan, 30 yaş üstü ani ölümler sonrası otopsi çalışma verilerinden elde edilmiştir. Bu çalışmada görülmüştür ki, diyabet tanısı aldıktan sonra ölen kişilerin; damarsal harabiyetleri ile yaşarken görülen klinik şikâyetleri paralel gitmemektedir. Bu durum, diyabet hastalarında görülen, kalp hastalıklarının sinsi seyirli olmasını ve daha ciddi komplikasyonlarla ortaya çıkmasını açıklamaktadır(51).

Yapılan ateroskleroz hayvan modeli çalışmalarında; CD40L antikor tedavisinin farelerde, ateroskleroz plakalarındaki lipid / kollajen oranını, kollajen lehine çevirerek damar elastikiyetinin düzelttiği gösterilmiştir. Böylece; aterosklerozun myokard enfarktüsü ve cerebrovasküler inmeler gibi komplikasyonlarını önleyebilmek için, bu antikorların kullanılabilmesi ileri sürülmektedir(19).

İn vivo yapılan çalışmalarda; diyabetiklerde, trombosit aktivasyonu yanında, aterosklerozda da görülen CD40 ve CD40L ekspresyon artışı da, gözlenmiştir. Diyabet hastalarında, diyabet olmayan kontrollere göre, anlamlı olarak artmış bir CD40 ve CD40L koekspresyonu vardır ve beraberinde sCD40L ile CD40L ekspresyon artışlarının birlikteliği gösterilmiştir(10, 55).

Bu çalışmalar ışığında, biz de diyabet hastalarında; trombositler üzerinde CD40 ve CD40L ekspresyonunun normal populasyona göre artabileceği hipotezini değerlendirmek istedik.

Tip2 DM da; sCD40L düzeylerinin arttığı ve bunun nedeninin, trombosit aktivasyonunun sorumlu olduğu yönünde yayınlar mevcuttur. Düşük doz aspirin

tedavisi ile bu aktivasyonun kısmen geri döndürüldüğü, ancak antiplatelet ajanların kullanılmasının daha başarılı sonuçlar verdiği bildirilmektedir(55).

Tip1 DM ve Tip2 DM'da görülen aterosklerozun patogenezinde; birçok belli başlı sebebin yanı sıra, trombositlerde CD40 ve CD40L ekspresyon artışı da sorumlu tutulmaktadır. Ancak; diyabet hastalığında CD40 ve CD40L'inin artışı ile ilgili çok az sayıda çalışma mevcuttur (7,8).

2004 yılında yapılan bir çalışmada, diyabet hastalarında, trombositlerde CD40 ve CD40 L ekspresyon artışına bakılmış. Ve hem Tip1 DM hem de Tip2 DM'da kontrol gruplarına göre, CD40 ve CD40L ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir(10).

Tip1 DM ile CD40 ve CD40L ilişkisi araştırılmış; CD40 eksprese eden hücrelerin diyabetle ilişkili 'self antijen' reaktif hücrelerini barındırdığı gösterilmiştir. İnsülinit denilen pankreas hücre inflamasyonu varlığında, T lenfosit hücrelerinden CD40L ekspresyonunun arttığı da gösterilmiştir. İmmun mekanizma göz önüne alındığında, sürekli yüksek düzeylerde CD40 ve CD40L değerlerinin birçok mekanizmayı tetikleyebileceği öne sürülmektedir(61).

Bizim çalışmamıza katılan, 28 Tip1 DM hastası, yaşları itibari ile çok genç popülasyona dahil idi. Bu nedenle, kontrol gruplarını yaşlarına göre ikiye ayırdık. Böylece; Tip1 DM ve Tip2 DM gruplarını kendi yaş grupları ile karşılaştırmış olduk. Tip1 DM grubu ile Tip1 Kontrol grubunun CD40 ve CD40 L değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göremedik. Ancak Tip2 DM grubu ile Tip2 Kontrol grubunun CD40 ve CD40L ölçümleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık gördük.

Ayrıca, Tip1 ile Tip2 DM gruplarının, CD40 ve CD40 L değerleri arasında da istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulduk. Birçok çalışmada; hem Tip1 hem de Tip2 DM hastalarında, CD40 ve CD40L ekspresyon artışı görülürken, biz çalışmamızda; sadece Tip2 DM'da bu artışı gözlemledik. Bu farklılığın nedeninin; Tip1 DM grubumuzun çok genç olması ve erken tanı ve tedaviye geçilerek, damarsal inflamasyonlarının, Tip2 DM grubuna göre daha az olabileceğini düşünmekteyiz.

Başka bir çalışmada; yine Tip1 DM'da trombositlerde CD40L ekspresyonunda ve plazma sCD40L konsantrasyonlarında artış gözlenmiştir. Bunun sebebinin; hiperglisemi ve glikozillenmiş makromoleküllerin proenflamatuar ve

protrombotik bir ortam yaratarak, inflamasyonun bir göstergesi olabilecek CD40 ve CD40L ekspresyon artışlarının olabileceği ileri sürülmüştür. Aynı çalışmada; sCD40L'in trombosit glikoprotein IIb/IIIa'ya bağlanarak trombosit aktivasyonuna sebep olduğu ve dolaşımdaki aktive trombositlerin, monositlere bağlanarak 'platelet-monosit' kompleksleri oluşturduğu yönünde hipotezler öne sürülmüştür. Aktive trombositlerin; monositlere bağlanarak, ateroskleroz patogeneğinde önemli bir süreç olan monositlerin endotele girişini arttırdığı bildirilmiştir. Böylece trombosit aktivasyonunun ve artmış trombosit-monosit bileşiklerinin, unstabl plak oluşumu ve rüptürüne yatkınlık yaratıp, aterosklerozda önemli bir basamak olduğu öne sürülmektedir(56).

Çalışmamızda; Tip1 DM'da, kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göremeyeşimizi literatürdeki, şu bilgiye dayandırabiliriz. İnsülinin kuvvetli bir antiinflamatuvar etkisinin olduğu bilinmektedir. Bu etkinin, glukokortikoidlerin etkisine benzediği ve potansiyel bir antiaterojenik hormon olabileceği ileri sürülmektedir(57). Bir başka hipotezde de; insülinin bu etkisini, bilinen vazodilatatör ve trombosit antiagregasyon etkisine bağlamışlardır. Bu etkilerle insülinin; epikard ve myokardın mikrovasküler perfüzyonunu düzeltebileceği ve insülin tedavisinin bu yönden ateroskleroz için koruyucu olabileceği öne sürülmektedir(58). Bizim genç ve sadece insülin tedavisi alan Tip1 DM grubumuzda; CD40 ve CD40L ekspresyon artışının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olmaması, insülin tedavisinin bu pozitif etkilerine bağlanabilir. Ama yine de, daha geniş çalışmalara ve kontrol grupları ile diyabetik hastaların bazal özelliklerini daha sıkı bir protokole göre eşleştirilmesine ihtiyaç duyulduğunu söyleyebiliriz.

Hemoglobin A1c (HbA1c); hemoglobin A'nın, h zincirinin geri dönüşümsüz non enzimatik glikasyonunu sonucu oluşan ve diyabetik bireylerin uzun dönem kan şekeri kontrolünde objektif bir ölçüm parametresi olarak kullanılan bir değerdir. 2004'de yapılan bir çalışmada; Tip1 ve Tip2 DM hastalarının trombosit yüzeyinde CD40 ve CD40L değer artışları ile HbA1c arasında pozitif yönde bir ilişki bulunmuştur. Biz de bu çalışmaya paralel olarak; Tip1 ve Tip2 DM grubunda; CD40 ve CD40L MFI değerleri ile HbA1c düzeylerini karşılaştırdık ve aralarında pozitif yönde zayıf bir ilişki bulmamıza rağmen, bunu istatistiksel olarak anlamlı bulamadık(10).

Birçok araştırmada, CD40L ekspresyon artışı, sadece akut koroner sendromla ilişkili değil aynı zamanda hiperkolestrolemi ile de ilişkili bulunmuştur. Özellikle trombosit yüzeyinde CD40 ve CD40L düzeylerinin artmasının; ateroskeroz riskini gösterdiği yönünde hipotezler ileri sürölmektedir(54). Biz de bu bilgiler ışığında, hastaların ateroskleroza patogenezinde önemli rol oynayan lipid değerlerini de inceledik. Ancak; trombositlerde CD40 ve CD40 L ekspresyon artışları ile total kolesterol değer artışları arasında herhangi anlamlı bir ilişki gözlemleyemedik. Ancak diyabet tanısı almış hastalarımızın çoğunluğunun, lipid profilini düzenleyen ilaçlar kullanmasının, beklemediğimiz bu sonucun sebebi olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca, hastaların ve kontrol gruplarının HDL-kolesterol değer ortalamalarına baktığımızda; Tip1 DM grubu ile Tip 2 DM grubu arasında önemli bir fark bulduk. Tip1 DM HDL-k ortalaması 50,96 iken, Tip2 DM grubunun HDL-k ortalaması 41,70 idi. Bu farklılık literatürdeki verilerle paralellik göstermektedir. Çünkü Tip1 DM hastalarında, HDL düzeyleri normal seyretmektedir. Buna karşın, Tip2 DM’da genellikle HDL düzeyleri çok düşük seyretmektedir. Bunun nedenini; Tip2 DM’da; plazmada VLDL HDL arasındaki kolesterol ester tranferinin VLDL yönüne kayması olarak gösterilmektedir(35).

Literatürde de Tip2 DM ‘un Tip 1DM’a göre daha fazla mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlara maruz kaldığı bilinmektedir. Tip2 DM hastalarının geğ tanı almalarının da birçok nedenle birlikte, vasküler komplikasyonların görölme sıklığını açıklayabilmektedir(52).

Sonuç olarak bizim çalışmamızın amacı; diyabet hastalarında ateroskleroza yatkınlık olduğu savından yola çıkarak, ateroskleroza bir göstergesi olan, CD40 ve CD40L değer artışlarını, DM’da gösterebilmektir. Yukarıda da belirttiğimiz gibi bunu Tip2 DM’da görürken, Tip1 DM’da gözlemleyemedik. Bu bulgular bize CD40 ve CD40L değer artışının, diyabetin makrovasküler komplikasyonlarının gelişimine, birçok başka mekanizmanın yanında katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. Belki daha geniş gruplarla ve daha ileri yaş Tip1 DM hasta gruplarıyla çalışılması gerekmektedir. Ayrıca CD40 ve CD40L ekspresyon artışı; DM ve kardivasküler hastalıklar için uzun dönemli bir belirteç olarak kullanılabilmesi için, ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğuna inanmaktayız.

6. KAYNAKLAR

- 1) Report From The American Diabetes Association; Economic costs of diabetes in the U.S.in 2002.Diabetes care 26:917-932,2003
- 2) Eckel RH, Wassef M, Charit A Sobel Prevention conference VI: Diabetes and cardiovascular disease;pathogenesis of atherosclerosis in diabetes.Circulation 105:138-143,2002
- 3) Sobel BE;acceleration of restenosis by diabetes: pathogenic implications.Circulation 103:1185-1187,2001
- 4) Sobel BE .Taatjes DJ,Schneider ;Intramural plasminogen activator inhibitor type-1(PAI-1) and coronary atherosclerosis.Arterioscler thromb vasc biol.23:1979-1989,2003
- 5) HongyeL.Edward P.Nord.CD40/CD154 ligation induces mononuclear cell adhesion to human renal proximal tubule cells via increased ICAM-1 expression.Am J Physiol Renal Physiol.289(2005)145-153
- 6) Amrani A, Serra P, Yamanouchi J, Han B, Thiessen S, VerdaguerJ, et al. CD154- dependent priming of diabetogenic CD4 (+) T cells dissociated from activation of antigen- presenting cells. Immunity 2002; 16(5):719– 732.
- 7) Wagner DH Jr., Vaitaitis G, Sanderson R, Poulin M, Dobbs C., Haskins K. Expression of CD40 identifies a unique pathogenic T cell population in type 1 diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99(6):3782–3787.
- 8) Ihlemann N, Stokholm KH, Eskildsen PC. Impaired vascular reactivity is present despite normal levels of von Willebrand factor in patients with uncomplicated type 2 diabetes. Diabet Med 2002; 19(6):476–481.
- 9) Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis.Circulation 2002; 105: 1135–1143.
- 10) Yan J,Wu Z,Chen J,Li L,Kong X.Upregulation of CD40-CD40 ligand system in patients with diabetes mellitus.Clinica Chimica Acta 339(2004) 85-90.
- 11) Lebovitz HE, Sobel BE; Diabetes Mellitus Tanı ve sınıflaması; türkçe editör; Satman İ, Sağlam H.; Diabetes Mellitus ve ilgili sorunların tedavisi dördüncü baskı: (1,49) sayfa:1-8,477-484; American Diabetes Association, Virjine,USA (2004)

- 12) Gutteridge I F. Diabetes mellitus: a brief history, epidemiology, definition and classification. *Clin Exp Optom* 1999; 82:102–106.
- 13) Bondy PK, Mandell GL, et al: Disorders of Carbonhydrate Metabolism, Diabetes Mellitus. Ed. Beers MH, Berhow R. Merck Manual of Diagnosis and Theray, Endocrinology. Seventeenth edition; vol; 2, pp: 165-173, 1999
- 14) Feingold K.F., Gavin L.A., Schambelan M., Schriock E., Sebastian A., Stern J.L Endocryn disease T. M. Cecil Essentials of Medicine, 3 the.edition-W.B. Saunders Company, Tokyo,1993: 513–521.
- 15) Wild S, Chir MB, Roglic G, Green A, Sicree R, King H; Global Prevalence of Diabetes Estimates for the year 2000 and projections for 2030: *Diabetes Care* 27:1047–1053, 2004
- 16) Limpscombe LL, Hux JE. Trends in diabetes prevalence, incidence, and mortality in Ontario, Canada 1995-2005: a population –based study. *The Lancet* 2007; 369:750-56
- 17) Kopelman PG. Obesity as a medical problem; *Nature*: vol; 404: 6 April, 635-643, 2000
- 18) Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau JA; Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss .*Am J Physiol Endocrinol Metab* 277: E1130-1141,1999
- 19) Lutgens E, Cleutjens KB, Heeneman S, Koteliansky VE, Burkly LC, Daemen MJ. Both eary and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype.*Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:7462–7469.
- 20)Born. DM.ed The journey and the dream (a history of the American Diabetes Association).Alexandria, VA: American Diabetes Association,1990;16–57
- 21) Bennett HP, Knowler CW, Definition Diagnosis and Classificationn of Diabetes Mellitus and Glucose Homeostasis. Ed. Kahn C. Ronald, Weir C. Gordon, King L.George et al; *Joslin’s Diabetes Mellitus, fourteenth edition* ,(19) pp:331–339. Lippincott Williams and Wilkins, Boston, USA, 2005
- 22)Barnett DM, Kall LP, The History of Diabetes, Ed. Kahn C. Ronald, Weir C. Gordon, King L.George et al; *Joslin’s Diabetes Mellitus, fourteenth edition* ,(1) pp:1–17. Lippincott Williams and Wilkins, Boston, USA, 2005
- 23) American diabetes association; *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus; Diabetes care*, volume 27, supplement 1, january 2004

- 24) Greenbaum CJ, Cuthbertson D, Eisenbarth GS, et al. Islet cell antibody positive relatives with HLA_DQA1.0102, DQB1.0602: identification by the Diabetes Prevention Trial-1. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1255-1260
- 25) Almind K, Doria A, Kahn CR. Putting the genes for type 2 diabetes on the map. *Nat Med* 2001;7:277-279
- 26) Pettit DJ, Knowler WC, Baird HR, et al. Gestational diabetes: infant and maternal complications of pregnancy in relation to third-trimester glucose tolerance in the Pima Indians. *Diabetes Care* 1980;3:458-464
- 27) The DECODE study group. Age and sex specific prevalences of diabetes and impaired glucose regulation in 13 European cohorts. *Diabetes Care* 2003;26:61-69
- 28) Warram JH, Krolewski AS; *Epidemiology of Diabetes Mellitus*; Ed. Kahn C. Ronald, Weir C. Gordon, King L. George et al; *Joslin's Diabetes Mellitus*, fourteenth edition, (20) pp:341-354. Lippincott Williams and Wilkins, Boston, USA, 2005
- 29) King H, Aubert RE, Herman WH. Global Burden of Diabetes, 1995-2025. *Diabetes Care* 1998; 21,1414-31.
- 30) Satman I, Yılmaz T, Sengül A, Salman S, Uygur S, Bastar I, Tütüncü Y, et al. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey. *Diabetes Care* 2002; 25(19):1551-1556.
- 31) Stary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994;89,2462-2478
- 32) Wilson PW. Established risk factors and coronary artery disease: The Framingham study. *Am J Hypertens* 1994; 7: 7-12.
- 33) Baykal Y, Tüzün A, Kocabalkan F, et al. The Pathogenesis of atherosclerosis: *T Klin J Med Science* 1998, 18.360-368
- 34) Sigal E, Laughton CW, Mulkins MA. Oxidation, lipoxygenase, and atherogenesis. *Ann Natl Acad Sci* 1994; 714:211-214
- 35) Feener EP, Dzau VJ; *Pathogenesis of Cardiovascular Disease in Diabetes*: Ed. Kahn C. Ronald, Weir C. Gordon, King L. George et al; *Joslin's Diabetes Mellitus*, fourteenth edition, (52) pp:867-884. Lippincott Williams and Wilkins, Boston, USA, 2005

- 36) Lutgens E, Lievens D, Beckers L, Donners M, Daemen M. CD40 and its ligand in atherosclerosis; Trends Cardiovasc Med Vol. 17, 118 No. 4, 2007,118–123
- 37) Lutgens E, Daemen MJ: CD40-CD40L interactions in atherosclerosis. Trends Cardiovasc Med 12:27–32. 2002
- 38) Boumpas DT, Furie R, Manzi S, et al: A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis. Arthritis Rheum 48:719–727. 2003
- 39) Schoenbeck U, Mach F, Libby P et al, Molecules in focus CD154(CD40 ligand). The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 688 32 (2000) 687–693
- 40) Schonbeck U, Libby P: 2001. CD40 signaling and plaque instability. Circ Res 89: 1092–1103.
- 41) Chen Y, Chen J, Xiong Y, et al: 2006. Internalization of CD40 regulates its signal transduction in vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 345:106–117.
- 42) Homann D, Jahreis A, Wolfe T, Hughes A, Coon B, van Stipdonk MJ, et al. CD40L blockade prevents autoimmune diabetes by induction of bitypic NK/DC regulatory cells. Immunity 2002; 16(3):403 –415.
- 43) Haynes JL. Principles of Flow Cytometry; Cytometry Supplement 3:7-17 (1988)
- 44) Riley RS, Mahin EJ, Ross W. Clinical Applications of flow cytometry. Chapter 7,325-414, 1993
- 45) Reth M. B cell antigen receptors. Current Opin Immunology; 6:3, 1994
- 46) Mason D, et al. CD antigens 2001. International Immunology 13 (9): 1095- 98, 2001
- 47) Herbert DJ. Effects of several commonly used fixatives on DNA and total nuclear protein analysis by flow cytometry. Am. J. Clin. Pathol.91:535-541, 1989.
- 48) Darzynkiewicz Z, Juan G, Xun L, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in Cell Necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (Necrosis). Cytometry 27: 1-20, 1997
- 49) Gray RS, Fabsitz RR, Cowan LD, Lee ET, Howard BV, Savage PJ. Risk factor clustering in the insulin resistance syndrome. The Strong Heart Study. Am J Epidemiol 1998;148:869–78.

- 50) Burchfiel CM, Reed DM, Marcus EB, Strong JP, Hayashi T. Association of diabetes mellitus with coronary atherosclerosis and myocardial lesions. An autopsy study from the Honolulu Heart Program. *Am J Epidemiol* 1993;137:1328–40.
- 51) Goraya TY, Leibson CL, Palumbo PJ, Weston SA, Killian JM, et al. Coronary Atherosclerosis in Diabetes Mellitus A Population-Based Autopsy Study; *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 40(5) 2002; 946–53
- 52) Stern MP, Williams K, Haffner SM, Identification of persons at high risk for type 2 diabetes: do we need the oral glucose tolerance test? *Ann Intern Med* 136:575–581,2002
- 53)Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M.Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998;339:229–34.
- 54) Cipollone F, Mezzetti A, Porreca E, Febbo CD, Nutini M, Fazia M, et al. Association between enhanced soluble CD40L and prothrombotic state in hypercholesterolemia: effects of statin therapy. *Circulation* 2002;106:399– 402.
- 55)Santilli F, Davi G, Consoli A, Cipollone F, et al: Thromboxane-Dependent CD40 Ligand Release in Type 2 Diabetes Mellitus: *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 47, No. 2, 2006:391–397
- 56) Harding SA, Sommerfield AJ, Sarma J, Twomey PJ, Newby DE, Frier BM, Fox KA: Increased CD40 ligand and platelet–monocyte aggregates in patients with type 1 diabetes mellitus; *Atherosclerosis* 176 (2004) 321–325
- 57) Dandona P, Aljada A, Mohanty P, et al. Insulin inhibits intranuclear NFkB and stimulates Ikb in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86,3257–65.
- 58)Chaudhuri A, Janicke D, Wilson MF, et al. Anti-inflammatory and profibrinolytic effect of insulin in acute ST-segment–elevation myocardial infarction. *Circulation* 2004;109:849–54.
- 59) Moreno PR, Fuster V: New Aspects in the Pathogenesis of Diabetic Atherothrombosis; *Journal of the American College of Cardiology*Vol. 44, No. 12, 2004

- 60) Death AK, Fisher EJ, McGrath KC, Yue DK. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. *Atherosclerosis* 2003;168:263–9.
- 61) Waid DM, Wagner RJ, Putnam A, Vaitaitis GM, Pennock ND, Calverley DC, Gottlieb P, Wagner DH; A unique Tcell subset described as CD4⁺ CD40⁺ Tcells (TCD40) in human type 1 diabetes; *Clinical Immunology* (2007) 4: 1-11
- 62) Chai H, Yan S, Wang H, Zhang R, Lin PH, Yao Q, Chen C; CD40 ligand increases expression of its receptor CD40 in human coronary artery endothelial cells *Surgery* Volume 140, Number 2; 236–242. 2006
- 63) Lerman A, Burnett JC, Holmes DR, Bell MR et al; Endothelin in Coronary Endothelial Dysfunction and Early Atherosclerosis in Humans; *Circulation* 1995;92,2426–2431
- 64) Schalkwijk CG, Stehouwer CDA; Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction; *Clinical Science* (2005) 109, 143–159
- 65) Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus, provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539–53
- 66) Weiss R, Dziura J, Burgert TS. Obesity and metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med* 2004; 350: 2362–74
- 67) Wykes M. Theoretical Article; Why do B cells produce CD40 ligand?; *Immunology and Cell Biology* 2003; 81: 328-331
- 68) S Danese, M Sans, C Fiocchi. The CD40/CD40L Costimulatory pathway in Inflammatory Bowel Disease; *Gut* 2004;53,1035–1043.