

Diabetik retinopatide serum nitrik oksit düzeyindeki değişiklikler

Naciye Kurtul¹, Hülya Aksoy², Sadrettin Peñçe³, Ebubekir Bakan², Orhan Baykal⁴

¹Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Kahramanmaraş

²Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum

³Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep

⁴Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum

ÖZET

Diabetik retinopati (DR) kontrol edilemeyen diabetes mellitusun komplikasyonlarından biridir. Yoğun araştırmalara rağmen DR'nin başlangıç ve ilerlemesinin fizyopatolojisi tam olarak bilinmemektedir. DR ve diğer diabetik vasküler bozuklukların patogenezinde endotelial fonksiyon bozukluğu bulunmaktadır. Nitrik oksit (NO) endotel hücrelerinden salgılanan önemli bir vazodilatör olup vasküler tonusun düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

Bu çalışmada Tip II diabetiklerin serum NO düzeyleri spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Retinopati derecesi ile NO düzeyi arasındaki ilişkiyi araştırmak üzere hastalar (n=32) retinopati derecelerine göre sınıflandırıldı.

Diabetik retinopatili hastalarda serum NO düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azaldığı görüldü. Serum NO düzeylerindeki bu azalmanın DR'nin patolojisinde önemli olduğu kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Diabetes mellitus, nitrik oksit, retinopati

SUMMARY

The alterations of serum nitric oxide levels in diabetic retinopathy

Diabetic retinopathy (DR) is one of the major complications of diabetes mellitus. Despite intensive research effort the pathogenic mechanisms important to the initiation and progression of DR are still poorly understood. Endothelial dysfunction has been implicated in the pathogenesis of DR. Nitric oxide (NO) is a potent vasodilator released by endothelial cells that may play an important role in modulating the vascular tone.

In this study, serum NO level in samples obtained from Type II diabetic patients with retinopathy was measured spectrophotometricly. Thirtytwo patients that were included in the study, were grouped with respect to the degree of retinopathy. An association between serum NO level of the patients and the degree of retinopathy was sought.

The serum NO level in patients with diabetic retinopathy was significantly decreased compare to control group. For this reason it is concluded that this change in serum level of NO may have a role in pathophysiology of diabetic retinopathy.

Key Words: Diabetes mellitus, nitric oxide, retinopathy

GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM), mutlak ya da bağıl insülin eksikliği ya da insülin direnci nedeniyle ortaya çıkan önemli metabolizma hastalığıdır. Hastalığın seyri sırasında retinopati, nefropati, nöropati, ateroskleroz gibi spesifik komplikasyonlar gelişmekte ve dünyada her yıl binlerce kişi diabet komplikasyonlarından ölmektedir. Hastalık ve komplikasyonları, büyük ekonomik kayıplara da neden olmaktadır.

Nitrik oksit (NO) önceleri vasküler sistemde, endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) olarak tanımlandı. Nitrik oksit sentetaz'ın (NOS) genetik olarak farklı üç izoformu tespit edilmiştir. Bunlar; düşük miktarda NO üretilerek

vasküler tonusu ayarlayan konstitutif endotelial izoform (eNOS), düşük miktar NO sentezleyen sinaptik şekillenme ve nörotransmisyonu düzenleyen konstitutif nöronal izoform (nNOS) ve yüksek miktarda NO üreterek immün inflamatuvar olaylarda rol alan ve hücre aracılı immün cevapta etkili bir komponent olan uyarılabilen izoformdur (iNOS). nNOS ve eNOS, NO üretimi için Ca^{++} /kalmodulin kompleksine bağımlıdır, buna karşın iNOS ise Ca^{++} dan bağımsızdır. Uzun süreli diabet komplikasyonlarının patogenezinde endotelial fonksiyon bozukluğu yer almaktadır. Diabette NO yolu ile vazodilatasyonun bozulacağını gösteren in vitro ve in vivo çalışmalar bulunmaktadır (1-4). NO vasküler endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz (eNOS)'la L-argininden sentezlenir. NO güçlü bir vazodilatördür (5-8) ve insanlarda vasküler tonusun regülasyonuna katılmaktadır (9).

✉ Dr. Sadrettin Peñçe, Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, 27310, Gaziantep

Oldukça fazla biyolojik fonksiyona sahip olan NO'in retinadaki fonksiyonları ile ilgili araştırmalarda yapılmaktadır (10).

Birçok hastalık NO'in fonksiyon ve sentezindeki bozukluklarla ilişkili olarak ortaya çıkmaktadır. NO ateroskleroz, esansiyel hipertansiyon, sekonder hipertansiyon, pulmoner hipertansiyon, hiperkolesterolemi, diyabet, akut ve kronik renal yetmezlik hipotansiyon, nörodejeneratif hastalıklar gibi patolojik olaylarda rol oynamaktadır (11,12).

Diabetik retinopati (DR), DM'un en önemli komplikasyonlarından biridir. DR, retina kapillerlerinin dolaşan kandaki yüksek glikoz düzeylerine uzun süre maruz kalması sonucunda oluşan yapısal ve bunların doğurduğu fonksiyonel değişikliklerdir. Genellikle diyabetin erken dönemlerinde meydana gelir. Diğer semptomlar olmasa bile gelişebilir ve görme fonksiyonlarını etkiler. 20-65 yaş arasındaki körlüğün en sık nedenidir (13-15).

Diabetik retinopati görülme sıklığı 15 yıllık insüline bağımlı diyabetlerde %98, insülin kullanan 30 yaşın üzerindeki diyabetlerde %82, insülin kullanmayanlarda ise %58 civarındadır. Diabetik retinopatide ilk lezyonlar kapiller oklüzyona bağlı ufak nonperfüze alanlar ve bunu kompanseasyonu için diğer bazı kapillerlerin dilatasyonudur. Lokal kapiller dilatasyonlar (mikroanevrizmalar) oftalmoskopik olarak diyabetik retinopatinin en erken bulgusudur. Dilate kapillerlerde geçirgenlik artmıştır, yaygınlığına göre fokal yada diffüz retinal ödeme neden olur. Kapiller oklüzyonun yaygınlaşmasıyla, daha büyük damarlar da tutulur. Arteriol tıkanıklıkları retinada daha geniş alanlarda perfüzyonun azalmasına neden olur ve sonuçta yumuşak eksudalar meydana çıkar. Yumuşak eksuda tek başına veya az sayıda mikro anevrizma ile birlikte diyabetik retinopatinin yegane bulgusudur. Damarlardaki oklüzyon zaman içinde yavaş geliştiğinde veya retina sinir lifleri tabakasının veya retina periferisinde ortaya çıktığında retina atrofik görünüm alır. Yaygın kapiller oklüzyon alanlarında intraretinal mikrovasküler anormallikler gelişebilir. Bunlara venöz boğumlanma gibi venöz anormalliklerin veya multipl yumuşak eksudaların eşlik etmesi, 6-18 ay içerisinde olasılıkla proliferatif lezyonların gelişeceğinin habercisidir. Venöz luplar, reduplikasyon ve boğumlanmalar gibi venöz değişiklikler, retina harabiyetinin arttığı evrelerde görülür. Bunlara genellikle periferik ven oklüzyonları eşlik eder.

Nonproliferatif diyabetik retinopati evresindeki değişikliklere ek olarak gelişen bu lezyonlardan bir veya bir kaçının görüldüğü evreye preproliferatif diyabetik denir (16,17).

Yaygın kapiller oklüzyon, arteriol ve venül tutulumu ile gelişen geniş alanlardaki iskemi ve hipoksi sonucu yeni damar oluşumları ortaya çıkarlar. Frajil olan yeni damar oluşumları kolaylıkla yırtılarak preretinal veya intravitreal kanamalara neden olurlar. Fibröz dokunun kontraksiyonu ile retina traksiyonu ve retina dekolmanının geliştiği evreye proliferatif diyabetik retinopati adı verilir (18).

Diabetik anjiopatinin oluşmasında, glukoprotein sentezinde, glikolizasyonda, sorbitol ve fruktoz üretiminde, trombosit agregasyon ve aglütinasyonunda artma etkili rol oynayan metabolik faktörlerdir (19).

Hiperglisemi, growth faktörler, prostaglandinler, insülin, katekolaminler, trombosit hiperagregasyonu, poliansatüre yağ asitlerinin katabolizması ile oluşan serbest radikaller, kalbin ve büyük damar duvarlarının mikroanjiyopatisi, hiperkolesterolemi, hipertrigliseridemi, hipertansiyon, sigara, genetik yatkınlık, cinsiyet ve yaş anjiyopati oluşumunu kolaylaştıran faktörlerdir (20).

DR retinal prekapillerler, arterioller, kapillerler ve venülleri etkileyen bir mikroanjiyopatidir. Diyabetik retinopatiye neden olan metabolik değişikliğin esas ve patojenik mekanizması henüz açıklığa kavuşmamıştır (21-23). Diyabetik retinada kapiller tıkanma ve damar permeabilitesinin bozulmasına yol açan metabolik değişikliğin esas ve patogenez konusunda çeşitli teoriler öne sürülmektedir. Bunlardan biri; hipergliseminin biyokimyasal proseslerdeki değişmeye neden olması ve neticede retinal damarlarda anatomik ve fonksiyonel değişiklikler görülmesidir (22,24). Söz konusu biyokimyasal değişimler arasında endotelin, prostanoidler, histamin, nitrik oksit gibi vasoaktif maddelerin sentez ve fonksiyonlarındaki değişiklikler gösterilmektedir (22,25). Bunlardan başka retina endotel hücreleri ve perisitler, retina kan akımı, anjiogenesis retinopatinin patogenezinde son yıllarda üzerinde çokça durulan konulardır (13,26,27). Diyabetik retinopatide mikroanjiyopatiye bağlı olarak retinaın kapiller yatağında mikrovasküler tıkanma ve mikrovasküler sızıntı olmak üzere iki türlü cevap gelişir. Bunların başlıca nedenleri arasında kapillerler endotel hücre

Tablo 1. Çalışmada yer alan bireylerin yaş, cinsiyet, diabet süresi, eritrosit HbA_{1c} değerleri, Aritmetik ortalama±Standart Sapma, X±SS

Grup	Sayı	Kadın/Erkek	Yaş(yıl)	DS (yıl)	AKŞ (g/dL)	HbA _{1c} (%)
BDR'li Tip II DM	7	1/6	55.71±10.87	11.71±5.31	258.42±94.62	8.95±3.22
PrePDR'li Tip II DM	6	3/3	55.16±9.86	12.83±3.97	284.16±73.46	9.42±1.27
PDR'li Tip II DM	10	5/5	57.30±5.94	12.90±5.36	299.15±83.17	12.18±2.21
Kontrol	7	2/5	55.28±6.92	-	99.71±12.82	4.72±1.78

DS;diabet süresi, HbA_{1c},eritrosit glikozile hemoglobin, AKŞ; açlık kan şekeri

harabiyeti ve proliferasyonu da yer almaktadır (13,26,28-30).

Farklı hayvan türlerinde yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda retinal kan akımının kontrolünde NO'nin rolü olduğu bildirilmektedir (31,32). Ayrıca retinadaki yaşküler hasarın kısmen NO yoluyla oluştuğu belirtilmektedir (33). Başka bir çalışmada da, L-arginin-NO sistemi ile üretilen NO konsantrasyon değişikliklerinin diabetik retinopatinin fizyopatolojisinin de yer alabileceği öne sürülmektedir (34)

HbA_{1c} molekülü, HbA'nın nonenzimatik glikolizasyonu sonucu oluşur. Glukoz kalıntıları, β globulin zincirlerinin N terminal valin'lerinin NH₂ gruplarına bağlı olarak bulunur. Bundan başka glikolize hemoglobin olarak bilinen HbA_{1a} ve HbA_{1b} de vardır. Glikolize hemoglobinlerin serumdaki normal değerleri; HbA_{1a}: < %1, HbA_{1b}: < %2 ve HbA_{1c}: %3 tür. HbA_{1c} düzeyi diabetli hastalarda 2-3 katına çıkar. Glikolize hemoglobinler kırmızı hücrelerinin ortalama 120 günlük yaşamı boyunca sentezlenir (35-37).

Bu çalışmada diabetik retinopatinin ilerlemesine bağlı olarak serum NO düzeyindeki değişiklikleri araştırmak amacıyla farklı retinopati derecesine sahip Tip II DM'lu hastalarda HbA_{1c} ve serum NO düzeyleri ölçülerek, elde edilen değerler kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesinde Tip II DM tanısı ile tedavi gören ve yine Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi Göz Servisinde diabetik retinopati yönünden muayeneleri yapılarak, retinopati dereceleri belirlenen hastalar ve sağlıklı, kontrol grubu üzerinde gerçekleştirildi. Subjeler bulgularına göre background diabetik retinopati grubu (BDR), preproliferatif diabetik retinopati grubu (pre-PDR), proliferatif diabetik retinopati grubu (PDR) olarak sınıflandırıldı. Kontrol grubu da sağlıklı, gönüllü bireylerden oluşturuldu.

Kontrol ve diabetiklerden alınan açlık kan numuneleri antikoagülansız tüplere konuldu. Serumları ayrılarak, çalışılincaya kadar -80 °C'de saklandı. Serum NO (nitrit+nitrat olarak) düzeyleri serumdaki NO₃ → NO₂'ye redükte edilerek NO₂ ye dönüştürüldü. Daha sonra total NO₂ düzeyi Griess reaktifi ile renklendirilerek spektrofotometrik olarak ölçüldü (38). Griess reaktifi sulfanilamid ve N (1-naftil) etilendiamin içermektedir. Bu metoda göre analiz iki kademede gerçekleşir: Birinci kademede nitrat redüktaz kullanılarak nitrat, nitrite dönüştürülür. İkinci kademede de Griess reaktifinin eklenmesiyle elde edilen diazo boyasının absorbanısı spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Serum glukoz değerleri ticari kitle (Boehringer Mannheim, Mannheim Germany) otoanalizörde (Hitachi 717; Hitachi, Tokyo, Japan). HbA_{1c}, kromatografik-spektrofotometrik olarak, ticari kitle (Biosystems, Barcelona, Spain) ölçüldü.

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS paket programı kullanıldı. Varyans analizi yapılarak kontrol ve diabetik retinopati grupları arasındaki serum NO değerlerindeki farkın önemliliği belirlendi.

BULGULAR

Çalışmada yer alan bireylerin yaş, diabet süresi (DS), eritrosit glikozile hemoglobin (HbA_{1c}), açlık kan şekeri (AKŞ) Tablo 1'de gösterildi.

Kontrol ve diabetik retinopatili vakaların serum NO değerleri Tablo 2'de gösterildi. NO değerleri diabetik retinopati gruplarında kontrollerden daha düşük bulundu. Diabetik retinopatili grupların herbirinde NO değerleri ile kontrollerin NO değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi (p<0.001).

TARTIŞMA

Diabette vasküler komplikasyonlar nedeniyle mortalite ve morbidite oldukça fazladır (1). Uzun süreli diabet komplikasyonlarının patogeneğinde endotelial fonksiyon bozukluğu

Tablo 2. Kontrol ve Diabetiklerin Serum NO Değerleri (μM), Aritmetik Ortalama \pm Standart Sapma, $X\pm\text{SS}$

BDR'li Tip II DM (n=7)	PrePDR'li Tip II DM (n=6)	PDR'li Tip II DM (n=10)	Kontrol (n=7)
19.02 \pm 3.25*	18.73 \pm 2.34*	17.60 \pm 4.16*	30.85 \pm 7.86

NO; Nitrik oksit * kontrolle karşılaştırma $p<0.001$

rol oynamaktadır. Diabetli hastaların dolaşımındaki NO konsantrasyon değişikliklerinin vazodilatasyonun regülasyonunu etkilediğini gösteren in vitro ve in vivo çalışmalar mevcuttur (1-4).

Çalışmamızda DR'li grupların herbirinde ölçülen serum NO değerleri kontrollerdekinden daha düşüktü. Hipertansiyon diabetik hastalarda oldukça yaygındır. Sıklıkla Tip II DM'un gelişmesi sırasında hipertansiyon da gelişmektedir (39,40). NO, güçlü bir vazodilatatördür (5,8). Vasküler sistemde endotel hücreleri tarafından sentezlenen NO, vasküler tonusu ve kan basıncını düzenler. NO sentezinin inhibisyonu vasküler tonusu, kan basıncını artırır ve ateroskleroza hızlandırır. İnsanda kardiovasküler sistemde, L-arjinin-NO yolundaki anormalliklerin, hipertansiyon, diabet ve hiperkolesterolemi gibi durumların fizyopatolojisinde rol oynadığına dair bulgular rapor edilmiştir (11,12,41-43).

Bu çalışmada yer alan hastaların hipertansiyon tablosuna bakıldığında; BDR'li grubun %42'si (2-15 yıl arasında, ortalama 6 yıl), prePDR'li grubun %50'si (1-9 yıl arasında, ortalama 4.3 yıl), PDR'li grubun %60'ı (1-15 yıl arasında, ortalama 4.1 yıl) hipertansif olduğu görüldü. Ancak bu çalışmada retinopatinin ilerlemesine bağlı olarak NO düzeylerindeki değişimin araştırılması amaçlandığından; Tip II DM'lu hastalar, retinopati gruplarına göre sınıflandırıldı. Herbir gruptaki hipertansif ve hipertansif olmayan diabetiklerin serum NO düzeyleri ise örnek sayısının azlığı nedeniyle karşılaştırılmadı. Yine, hipertansiyonun serum NO düzeylerini etkileyebileceği düşünülerek, DR grupları arasındaki istatistiki sonuçlar dikkate alınmadı ve bu nedenle belirtilmedi. Bu konuda hem hipertansiyonun hem de DR derecelerinin birlikte dikkate alınarak yapılacak bir çalışmanın yararlı olacağı düşüncesindeyiz.

HbA_{1c} düzeyi diabetli hastalarda 2-3 katına çıkmaktadır. Glikolize hemoglobinler kırmızı hücrelerinin ortalama 120 günlük yaşamı boyunca sentezlenir; bu nedenle HbA_{1c} konsantrasyonu son 120 günlük AKŞ düzeyini dolayısıyla diabet durumunu gösterir (35-

37).Çalışmamızda diabetik retinopati gruplarda HbA_{1c} düzeyleri kontrol grubunun 2-3 katı yüksek bulundu. Retinopati derecesi ilerledikçe ve AKŞ düzeyi yükseldikçe HbA_{1c} konsantrasyonunda yükselmekte idi.

Yılmaz G ve arkadaşları proliferatif retinopati hastaların vitreous sıvısında NO düzeylerine baktılar. NO konsantrasyonunu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulmuşlar ve diabetik retinopatinin patogenezinde rol oynayabileceğini bildirmişlerdir (44).

Diabetin kronik komplikasyonlarından olan vasküler lezyonların gelişmesinde NO yetersizliğinin katkısı olduğunu gösteren araştırmalar mevcuttur (45,46). Mikroanjyopatide azalmış NO konsantrasyonlarına bağlı olarak arter genişlemesinin azaldığı gösterilmiştir(47). Önceleri fonksiyonu bozulan endotelin tek başına azalan NO'den sorumlu olduğu düşünülmekteydi. Hattori ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada diabetik hastalarda artan süperoksit radikallerinin NO'in büyük kısmını bloke ettiği (NO'i \rightarrow ONOO-'e dönüştürerek) gösterilmiştir (48). Tüm bu verilerin ışığında bazı araştırmacılar Tip I diabetin etyolojisinde NO'in rolü ile ilgili mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bazı araştırmacılara göre otoimmün nedenlerle aktive olmuş makrofajlar büyük miktarlarda NO salgılayarak pankreasın adacık hücrelerini hasara uğratmakta ve insülin üretimi bozulmaktadır. Yüksek konsantrasyonlardaki NO sitotoksik özelliكتedir. Aynı zamanda bu yaklaşım hayvanlarda deneysel diabet modeli üzerinde incelenmiş ve NOS inhibitörleri kullanılarak hasarlanmanın azaltıldığı belirtilmiştir (49,50).

Bizim araştırmamızın bulgularına göre farklı retinopati derecelerine sahip olan Tip II DM'lu hastalarda serum NO düzeyi azalmaktadır. Bilindiği gibi diabet komplikasyonlarının oluşmasının esas nedeni uzun süreli hiperglisemi ve anormal glikoz metabolizmasıdır. Muhtemelen glikozun normal metabolize edilememesi sonucunda başka biyokimyasal yollar (lipidlerin oksidasyonu, glukozdan normalde çok az oluşan sorbitol gibi başka

ürünlerin meydana gelmesi) devreye girmektedir. Bunu sonucunda organizmanın biyokimyasal ortamında tamamlanamayan oksidoredüksiyon tepkimeleri nedeniyle reaktif ara ürünler oluşmaktadır (serbest radikaller ve lipid peroksitleri). Oluşan bu reaktif ürünler muhtemeldirki ortamdaki NO molekülleri ile etkileşime girerek $NO + O \longrightarrow ONOO-$ reaksiyonunda görüldüğü gibi zararlayıcı bir molekül olan peroksi nitrit anyonuna

dönüşmektedir. Bu durumda NO düzeyleri azalacak ve NO normal fonksiyonları gerçekleştiremeyecektir. Bu fonksiyonlardan biri olan vasodilatasyon mekanizması zayıflayacak ve hipertansiyona meyil; aynı şekilde retinayı besleyen damarlarda yetersiz vasodilatasyon ve vasodilatasyon ve uzun vadede retinopati gelişebilecektir.

KAYNAKLAR

1. Calver A, Collier J, Vallance P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest*. 1992; 90:2548-2554.
2. Kiff RJ, Gardiner SM, Compton AM, Bennett T. The effects of endothelin-1 and N^G-nitro L-arginine methyl ester on regional haemodynamics in conscious rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Br J Pharmacol* 1991;103:1321-1326.
3. Komers R, Allen TJ, Cooper ME. Role of endothelium-derived nitric oxide in the pathogenesis of the renal hemodynamic changes of experimental diabetes. *Diabetes* 1994; 43:1190-1197.
4. Lawrence E, Brain SD. Altered microvascular reactivity to endothelin-1, endothelin-3 and N^G-nitro L-arginine methyl ester in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Br J Pharmacol* 1992; 106:1035-1040.
5. Moncada S, Radomski MW, Palmer RMJ. Endothelium derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol* 1988; 37:2495-2501.
6. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J* 1992; 6:3051-3064.
7. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333:664-666.
8. Wang ZY, Hakanson R. Role of nitric oxide (NO) in ocular inflammation. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 2447-2450.
9. Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RMJ, Moncada A. Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 1990; 15:486-492.
10. Goldstein IM, Ostwald P, Roth S. Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease. *Vision Res* 1996;36(18):2979-2994.
11. MacAllister RJ, Vallance P. The L-arginine: Nitric oxide pathway in the human cardiovascular system. *JIFCC* 1996; 8:152-158.
12. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *Lancet* 1994; 343: 1199-1206.
13. Hattat N. Diabet retinopatisinin etyopatogenezisi. *Oftalmoloji* 1993; 2(1): 13-15.
14. MacGregor LC, Rosecan LR, Laties AM, Matschinsky FM. Altered retinal metabolism in diabetes. *The J Biol Chem* 1986; 261(9): 4046-4051.
15. Müftüoğlu G. Retinanın damar hastalıkları. In: Özkan Ş, Pazarlı H, Oğuz V, Akar S, (eds) Göz hastalıkları. İstanbul, İst. Üniv. Tıp Fak. Yay, 1997: 291-297.
16. American Diabetes Association. Diabetic retinopathy. *Diabetes care* 1998; 21(1):157-59.
17. Klein R. Retinopathy and other ocular complications in diabetes. In: Porte D, Sherwin RS (eds) *Ellenberg and Rifkin's Diabetes Mellitus*. (5th ed) Stamford, Appleton and Lange, 1997; 931-969.
18. Mallet B, Vialettes B, Haroche S, Escoffier P. Stabilization of severe proliferative diabetic retinopathy by long term treatment with SMS 201-995. *Diabetes and Metabolism* 1992; 18:438-444.
19. Ulbig MRW, Hamilton AMP. Factors influencing the natural history of diabetic retinopathy. *Eye* 1993; 7:242-249.
20. Damcı T, Oşar Z. Diabet komplikasyonlarının önlenmesi ve tedavisi. *Türk Diabet Yıllığı* 1996-97 1997; 12:249-253.
21. Ghirlanda G, Leo ASD, Caputo S, Cercone S, Greco AV. From functional to microvascular abnormalities in early diabetic retinopathy. *Diabetes/Metabolism Rev* 1997; 13:15-35.
22. Klein R, Klein BEK. Diabetic Eye disease. *Lancet* 1997; 350:197-204.
23. Sözen T. Diabetes mellitusun dejeneratif komplikasyonları. In: Gedik O, Akalın S, (eds) *Diabetes Mellitus* Ankara, Güneş Kitabevi, 1989: 93-138.
24. Brinchmann-Hansen O, Dahl-Jorgensen K, Sandvik L, Hanssen KF. Blood glucose concentrations and progression of diabetic retinopathy: the seven year results of the Oslo study. *Br Med J* 1992; 304: 19-22.
25. McCarty MF. Nitric oxide deficiency, leukocyte activation, and resultant ischemia are crucial to the pathogenesis of diabetic retinopathy/neuropathy—preventive potential of antioxidants, essential fatty acids, chromium, ginkgolides, and pentoxifylline. *Med Hypotheses* 1998; 50(5):435-449.
26. Rand I. Recent advances in diabetic retinopathy. *Am J Med* 1981; 70: 595-602.

27. Arısoy İ. Diabetik anjiyopati ve tedavisi. *Türk Diabet Yıllığı*. İstanbul, Nurettin Uycan Basım San., 1984; 93-111.
28. Juvenil diabetes foundation international countdown: retinopathy. *Search Progress Report* 1988; 9:16-18.
29. Kanski JJ. Retinal vascular disorders. *Clin Ophthalmolgy Butterworths* 1984; 344-369.
30. Addison DJ, Garner A, Ashton N. The degeneration of intramural pericytes in diabetic retinopathy. *Br Med J*, 1970; 1: 264-266.
31. Deussen A, Sonntag M, Vogel R. L-arginine-derived nitric oxide: A major determinant of uveal blood flow. *Experimental Eye Research* 1993; 57:127-134.
32. Toda N, Kitamura Y, Okamura T. Role of nitroxidic nerve in dog retinal arterioles in vivo and arteries in vitro. *American Journal of Physiology* 1994; 266: 1985-1992.
33. Tilton RG, Chang K, Hasan KS. Prevention of diabetic vascular dysfunction by guanidines: Inhibition of nitric oxide synthase versus advanced glycation end-product formation. *Diabetes* 1993; 42:221-232.
34. Schmetterer L, Findl O, Fasching P, Ferber W, Strenn K, Breiteneder H, Adam H, Eichler HG, Woltz M. Nitric oxide and ocular blood flow in patients with IDDM. *Diabetes* 1997; 46:653-658.
35. Champe PC, Harvey RA. *Biyokimya, Lippincott's Mustared Review serisi (2.baskı) (Çev.Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E.)*. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi 1997; 25-111.
36. Nathan DG, Oski FA. Human hemoglobins; normal and abnormal methemoglobinemia. In Bunn HF (ed) *Hematoloji of infancy and childhood (4th ed)* Philadelphia, WB Saunders, 1993; 6:1-30.
37. Lukens JN, Lee GR. The abnormal hemoglobins. In Lee GR, Bithell CT, Foerster J, Athens JW, Lukens JN (eds) *Wintrobe's Clinical Hematology (9th ed)*. Pennsylvania, Lee and Febiger, 1993; 1006-1053.
38. Bories PN, Bories C. Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin Chem* 1995; 4(6):904-907.
39. Carlos AP, Philip R. Hypertension in diabetes mellitus. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 1996; 25(2):421-423.
40. Carl A. A multicenter study: United Kingdom Prospective Diabetes Study. *Hypertension* 1985; 7:118.
41. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Eng J Med*, 1993; 329:2002-2012.
42. Raij L. Nitric oxide and the kidney. *Circulation* 1993; 87[V]: 26-29.
43. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88:4651-4655.
44. Yılmaz G, Esser P, Kociek N, Aydın P, Heiman K. Elevated vitreous nitric oxide levels in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2000; 130: 87-90.
45. Elabbady AA, Gagnon C, Hassouna MM. Diabetes mellitus increase NO synthase in penises but not in major pelvic ganglia of rats. *B J Urol* 1995; 76:196-202.
46. Kolb H, Kolb BV. Nitric oxide: A pathogenic factor in autoimmunity. *Immunol Tod* 1992; 13:157-161.
47. Luscher TF, Richard V. Interaction between endothel derivating NO and SIN-1 İn human and porcine blood vessels. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 14:67-80.
48. Hattori Y, Kawasaki H, Abe K. Super oxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxationin diabetic rat. *Am J Physiol* 1991; 261:1086-1091.
49. Corbett JA, Mc Daniel ML. Nitric oxide mediated autoimmune destruction of beta cell? Possible therapeutic interventions in IDDM. *Diabetes USA* 1992; 41(8):899-903.
50. Panagiotidis G, Alm P, Lundquist I. Inhibition of islet NO syntase increases arginine-induced insulin release. *Eur J Pharmacol* 1992; 229:277-281.