

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Marina S. Anđelić Jelić

**Značaj genetskog polimorfizma matriksnih
metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9 u nastanku
mikrovaskularnih komplikacija kod pacijenata
sa tipom 2 šećerne bolesti**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Marina S. Anđelić Jelić

**Importance of MMP-2 and MMP-9 gene
polymorphism in the development of
microvascular complications in type 2
diabetes patients**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022.

MENTOR:

Akademik Prof. dr sci. med. Nebojša M. Lalić, specijalista interne medicine – endokrinolog
Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, UKCS, redovni profesor na
Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, redovni član SANU

KOMENTOR :

Dragica Radojković, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
(IMGGI), Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE

1. **Prof. dr sci. med. Katarina Lalić**, specijalista interne medicine – endokrinolog, Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, UKCS, redovni profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.
2. **Prof. dr sci.med.Teodora Beljić Živković**, specijalista interne medicine – endokrinolog, Kliničko bolnički centar Zvezdara, redovni profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.
3. **Aleksandra Nikolić**, naučni savetnik, Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), Univerzitet u Beogradu

Značaj genetskog polimorfizma matriksnih metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9 u nastanku mikrovaskularnih komplikacija kod pacijenata sa tipom 2 šećerne bolesti

Sažetak

Uvod. Vaskularne komplikacije su vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta kod pacijenata sa diabetes mellitusom. Patofiziološki mehanizmi koji leže u osnovi nastanka ovih komplikacija su brojni i još uvek nedovoljni ispitani i nedavno je postulirano da matriksne metaloproteinaze MMP-2 i MMP-9, cink zavisne endopeptidaze, mogu, preko remodelovanja ekstracelularnog matriksa da doprinesu nastanku i progresiji dijabetesnih vaskularnih komplikacija. Cilj ove studije je bio da se proceni da li postoji razlika u učestalosti polimorfizma jednog nukleotida (SNP) u genima za MMP-2 (na poziciji -1306C>T) i MMP-9 (na poziciji 1562C>T) kod pacijenata sa tipom 2 diabetes mellitusom (T2DM) i zdravih kontrola i da se utvrdi da li postoji povezanost ovih genskih varijanti sa prisustvom mikrovaskularnih komplikacija kod pacijenata sa dijabetesom.

Metodologija. U studiju je bilo uključeno 97 pacijenata sa T2DM, dok je kontrolnu grupu činilo 56 zdravih kontrola. Svi pacijentu sa T2DM su bili evaluirani u smislu postojanja mikrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti. Genotipovi su određivani metodom lančane reakcije polimerizacije koja je bila praćena restrikcionom analizom pomoću specifičnih endonukleaza (PCR-RFLP metoda) nakon čega je određivana frekvencija njihovog javljanja.

Rezultati. Genska varijanta MMP-2 -1306C>T je pokazala negativnu korelaciju sa postojanjem T2DM ($p=0,042$). Pokazano je da prisustvo alela C (-1306C) povećava mogućnost nastanka tipa 2 diabetesa za 2.1 put., dok prisustvo T alela (-1306T) predstavlja protektivni faktor u razvoju diabetesa. Pokazano je da je MMP-2 genska varijanta -1306C>T bila povezana sa nastankom dijabetesne polineuropatije i to tako da je prisustvo T alela imalo protektivnu ulogu u smislu nastanka polineuropatije, dok je prisustvo C alela (-1306C) povećavalo rizik 3.2 puta za nastanak polineuropatije.

Zaključak. Ovo je po našim saznanjima prva studija koja je ispitivala navedene polimorfizme MMP-2 i MMP-9 i sve tri mikrovaskularne komplikacije šećerne bolesti. Naši rezultati su pokazali da polimorfizam u genu za MMP-2 nosi dvostruko veći rizik za T2DM i po prvi put je pokazana povezanost ovog polimorfizma i nastanka dijabetesne polineuropatije.

Ključne reči: diabetes mellitus, matriksna metaloproteinaza-2 i -9, SNP (polimorfizam jednog nukleotida), mikrovaskularne komplikacije, dijabetesna polineuropatija

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Interna medicina-Endokrinologija

UDK br:

Importance of MMP-2 and MMP-9 gene polymorphism in the development of microvascular complications in type 2 diabetes patients

Abstract

Background. Vascular complications are leading cause of increased morbidity and mortality of diabetic patients. Pathophysiological mechanisms included in the development and progression of diabetic complications are various and lately it has been postulated that matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9, zinc-dependent endopeptidases through remodeling of extracellular matrix can contribute to the onset and progression of diabetic vascular complications. The aim of our study was to assess whether there is a major difference in single nucleotide polymorphisms in the MMP-2 (at position -1306C>T) and MMP-9 (at position -1562C>T) gene in type 2 diabetic patients and healthy controls and to determine whether there is association of these gene variants with the presence of microvascular complications in diabetic patients.

Methods. Our study included 97 type 2 diabetes patients and control group which comprised 56 healthy controls. All diabetic patients were screened for microvascular diabetes complications. Genotypes were detected by polymerase chain reactions followed by restriction analyses with specific endonucleases (PCR-RFLP) and their frequencies determined.

Results. MMP-2 gene variant -1306C>T showed negative correlation with the presence of T2DM ($p=0,042$). It was shown that presence of allele -1306C increases the probability of developing type 2 diabetes 2.1 times and that allele -1306 T has protective role regarding type 2 diabetes. MMP-2 variant -1306T showed negative correlation with diabetic polyneuropathy ($p=0.017$) which means that allele-1306T has protective role regarding diabetic polyneuropathy while presence of allele -1306C increases the probability of developing diabetic polyneuropathy 3.2 times.

Conclusion. To our knowledge, this is the first study investigating MMP2 and MMP9 genetic variants and all three microvascular complications. Our study showed that MMP-2 gene variant (-1306C) doubles the risk of developing type 2 diabetes and for the first time showed association of this gene variant and presence of diabetic polyneuropathy

Key words: diabetes mellitus, matrix metalloproteinase-2 and -9, SNP (single nucleotide polymorphism), microvascular complications, diabetic polyneuropathy.

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Internal medicine – endocrinology

UDK No

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Diabetes mellitus-definicija, podela i epidemiologija.....	1
1.2. Mikrovaskularne komplikacije diabetes mellitusa.....	2
1.2.1. Dijabetesna retinopatija.....	3
1.2.2. Dijabetesna nefropatija.....	7
1.2.3. Dijabetesna polineuropatija.....	10
1.3. Matriksne metaloproteinaze (MMP).....	12
1.3.1. MMP- struktura i podela.....	12
1.3.2. MMP- aktivacija i regulacija.....	19
1.4. MMP i Diabetes mellitus.....	20
1.4.1. MMP i dijabetesna retinopatija.....	21
1.4.2. MMP i dijabetesna nefropatija.....	22
1.4.3. MMP i dijabetesna polineuropatija.....	23
1.5. Polimorfizmi gena.....	25
1.5.1. Polimorfizmi gena za MMP-2 i MMP-9.....	26
1.5.2. Polimorfizmi gena za MMP-2 i MMP-9 i dijabetesna retinopatija.....	27
1.5.3. Polimorfizmi gena za MMP-2 i MMP-9 i dijabetesna nefropatija.....	27
1.5.4. Polimorfizmi gena za MMP-2 i MMP-9 I dijabetesna polineuropatija.....	28
2. Ciljevi istraživanja	29
3. Materijal i metode	30
3.1. Dizajn studije.....	30
3.2. Ispitanici.....	30
3.3.1. Antropometrijska merenja.....	30
3.3.2. Laboratorijska ispitivanja.....	30
3.4. Procena prisustva mikrovaskularnih komplikacija diabetes mellitusa.....	31
3.5. Genetičke analize-Genotipizacija polimorfizama za MMP-2 i MMP-9.....	31
3.6. Statistička analiza.....	32
4. Rezultati	33
4.1. Deskripcija ispitivane populacije.....	33
4.1.1. Životna dob ispitanika.....	33

4.1.2. Polna struktura ispitanika.....	34
4.1.3. Stepen uhranjenosti pacijenata sa DM.....	35
4.1.4. Navike u pušenju pacijenata sa DM.....	35
4.1.5. Dužina trajanja DM.....	36
4.1.6. Terapijski režimi pacijenata sa DM.....	36
4.1.7. Parametri metaboličke kontrole DM.....	37
4.1.8. Lipidogram kod pacijenata sa DM.....	38
4.1.9. Parametri bubrežne funkcije kod pacijenata sa DM.....	38
4.2. Prisustvo mikrovaskularnih komplikacija kod pacijenata sa DM.....	39
4.2.1. Korelacija karakteristika pacijenata sa DM i komplikacija DM.....	39
4.2.1.1. Korelacija karakteristika pacijenata sa DM i prisustva retinopatije.....	39
4.2.1.2. Korelacija karakteristika pacijenata sa DM i prisustva nefropatije.....	40
4.2.1.3. Korelacija karakteristika pacijenata sa DM i prisustva polineuropatije.....	41
4.3. Genski polimorfizmi za MMP-2 (-1306C>T) i MMP-9 (-1562C>T).....	43
4.3.1. Učestalost genske varijante MMP-2-1306C>T kod pacijenata sa DM.....	43
4.3.2. Učestalost genske varijante MMP-9-1562C>T kod pacijenata sa DM.....	46
4.4. Povezanost genskih polimorfizama za MMP-2(-1306C>T) i MMP-9(-1562C>T) sa mikrovaskularnim komplikacijama DM.....	49
4.4.1. Povezanost genskih polimorfizama za MMP-2 i MMP-9 sa retinopatijom.....	49
4.4.2. Povezanost genskih polimorfizama za MMP-2 i MMP-9 sa nefropatijom.....	55
4.4.3. Povezanost genskih polimorfizama za MMP-2 I MMP-9 sa polineuropatijom.....	61
4.5. Genotip pacijenata sa DM i karakteristike pacijenata	68
4.6. Regresioni modeli sa komplikacijama DM kao zavisnim varijablama.....	74
5. Diskusija.....	77
6. Zaključci.....	85
7. Literatura.....	86

1. Uvod

1.1. Diabetes mellitus-definicija, podela i epidemiologija

Diabetes mellitus (DM) predstavlja grupu metaboličkih poremećaja koje se karakterišu hiperglikemijom koja nastaje kao rezultat heterogenih etiopatogenetskih poremećaja u sekreciji insulina, delovanju insulina ili usled postojanja oba ova poremećaja (1). Ovaj poremećaj metabolizma ugljenih hidrata je udružen sa poremećajima u metabolizmu proteina i masti a hronična hiperglikemija je udružena sa hroničnim oštećenjima i poremećenom funkcijom različitih organa, posebno oka, bubrega, nervnog sistema, srca i krvnih sudova.

KLASIFIKACIJA DIABETES MELLITUS-a

1. **Tip 1 dijabetes - T1DM** (autoimuna destrukcija beta ćelija pankreasa koja vodi apsolutnoj deficijenciji insulina, uključujući i latentni autoimuni dijabetes odraslih tzv LADA dijabetes)
2. **Tip 2 dijabetes- T2DM** (insulinska rezistencija udružena sa progresivnim gubitkom adekvatne beta ćelijeke sekrecije)
3. **Drugi specifični oblici dijabetesa** (u sklopu različitih oboljenja a) Genetski defeciti funkcije beta ćelija (MODY 2,3,4,5,6, mitohondrijalna DNA) b) genetski uslovljen defekt u delovanju insulina (tip A insulinska rezistencija, Leprenhaunov sy, lipoatrofični dijabetes), c) usled bolesti egzokrinog pankreasa (pankreatitis, neoplazije, cistična fibroza,hemohromatoza) d) u okviru drugih endokrinih bolesti (akromegalija, Kušingov sy,feohromocitom, hipertireoza, aldosteronom, somatostatinom, ostalo) e) indukovan lekovima ili hemikalijama (nikotinska kiselina, kortikosteroidi,tireoidni hormoni,diazoksid,tiazidi, ostali) f) indukovan infekcijama (kongenitalna rubela, citomegalovirusne infekcije,ostalo) g) nasledne bolesti (Downov sy, Klinefelterov sy, Turnerov sy, Huntingtonova horea, porfirija, Wolframov sindrom, Friedreichova ataksija, Laurence-Moon-Biedlov sindrom , Miotična distrofija, Prader Wilijev sindrom, ostalo)
4. **Gestacijski dijabetes** (dijabetes dijagnostikov u drugom ili trećem trimestru trudnoće)

Diabetes mellitus danas predstavlja, ne samo veliki i rastući medicinski , već i socijalni problem. Po najnovijim podacima Internacionalne Federacije za Dijabetes (IDF) iz 2021. god broj obolelih od DM i to životne dobi od 20-79 godina iznosi 537 miliona , što znači da svaki deseti čovek na planeti ima dijabetes (2). Smatra se da će broj obolelih od diabetes mellitusa porasti na 643 miliona u 2030 godini a na 783 miliona u 2045. godin, ukoliko se nešto hitno ne preduzme (2).Ono što još više zabrinjava je podatak da 3 od 4 pacijentta sa DM živi u srednje i nisko razvijenim odn. nerazvijenim zemljama sa relativno nerazvijenom dijabetološkom zaštitom. Koliko je značajan morbiditet i mortalitet od DM govori i podatak da je u 2021. godini broj smrtnih slučajeva prouzrokovan dijabetesom iznosio 6.7 miliona (jedan smrtni slučaj svakih pet sekundi). Troškovi lečenja pacijenata takodrastično rastu iz godine u godinu, i u 2021 god smatra se da je potrošeno 966 milijardi USD što predstavlja rast od 316 % za poslednjih patnaest godina (2).

U Evropi su slične brojke - u 2021. godini broj osoba sa DM je iznosio 61 milion (jedna od 11 osoba), smatra se da je jedna od tri osobe sa DM nedijagnostikovana, očekuje se da će broj obolelih od DM porasti na 67 miliona do 2030. god a na 69 miliona do 2045.god , a broj smrtnih slučajeva zbog DM je iznosio 1.1 milion (2).

U Srbiji se, na osnovu podataka Instituta za javno zdravlje " Dr Milan Jovanović Batut" smatra da 770.000 ljudi ima DM, a gotovo trećina pacijenata ima jednu ili više kasnih komplikacija u trenutku postavljanja dijagnoze dijabetesa. Na osnovu istih podataka, zna se da u Srbiji godišnje premine oko 3000 osoba od posledica dijabetesa, što našu zemlju svrstava u zemlje sa visokim stopama mortaliteta od dijabetesa.

1.2. Mikrovaskularne komplikacije diabetes mellitusa

Hronična hiperglikemija, koja je karakteristična za DM, dovodi do promena na svim krvnim sudovima u organizmu dovodeći tako do disfunkcije mnogih organa. Hronične komplikacije dijabetesa se tako tradicionalno dele na makro- i mikrovaskularne. U makrovaskularne komplikacije spadaju koronarna arterijska bolest, periferna okluzivna arterijska bolest i cerebrovaskularni insult (CVI). U mikrovaskularne komplikacije DM spadaju dijabetesna retinopatija (DR), dijabetesna nefropatija (DN) i dijabetesna neuropatija (DPN). Ova mikrovaskularna trijada je jedinstvena za šećernu bolest (3). Epidemiološke studije pokazuju značajnu korelaciju između vaskularnih komplikacija dijabetesa. Pokazano je da je dijabetesna retinopatija značajno povezana sa javljanjem dijabetesne nefropatije i da je snažan prediktor u nastanku šloga i kardiovaskularnih oboljenja (4,5). Takođe postoji i udruženost DR sa dijabetesnom polineuropatijom (6) kao i dijabetesne polineuropatije sa nefropatijom (7), tako da ova udruženost mikrovaskularnih komplikacija kod jednog pacijenta, bez obzira što nema velikih meta analiza koje bi to i potvrdile, nameće potrebu da se kod svakog pacijenta nakon dijagnostikovane jedne mikrovaskularne komplikacije, radi screening i za ostale dve komplikacije. Štaviše, pokazano je da mikrovaskularne komplikacije mogu biti bolji i značajniji factor rizika za nastanak kardiovaskularnih oboljenja nego arterijski pritisak, HbA1c ili LDL holesterol i da prisustvo više mikrovaskularnih komplikacija dvostruko povećava rizik za nastanak kardiovaskularnih oboljenja kao i da dvostruko povećava kardiovaskularni mortalitet. (5,8).

Vaskularne komplikacije kako mikro- tako i makrovaskularne su sve češće, i vodeći su uzrok morbiditeta i mortaliteta kod osoba sa dijabetesom. Zbog toga je otkrivanje i definisanje tačnih patogenetskih mehanizama koji leže u samoj osnovi bolesti, ali i u osnovi vaskularnih komplikacija, jako bitno kako bi se, pre svega, prevenirala pojava komplikacija ali i definisali novi terapijski pristupi koji bi ispravljali ove patološke mehanizme.

Hiperglikemija stoji u osnovi svih mikrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti kako u tipu 1 tako i u tipu 2 dijabetesa. Velike prospektivne studije su pokazale da se dobrom glikemijskom kontrolom može značajno smanjiti nastanak mikrovaskularnih komplikacija mada se on ne može u potpunosti prevenirati (9,10). Ali hiperglikemija per se, nije uvek dovoljan okidač koji će dovesti do promena na malim krvnim sudovima. Patogenetski mehanizmi koji leže u osnovi mikrovaskularnih komplikacija su različiti, brojni i još uvek nedovoljno ispitani.

Klasični mehanizmi nastanka mikrovaskularnih komplikacija DM su prvi put opisani pre više od pedeset godina. Od tada pa do danas oni obuhvataju jedan standardan cluster od četiri mehanizma kojima se stalno dodaju novi , koji se uklapaju u sliku nastanka, evolucije, progresije i lečenja

mikrovaskularnih dijabetičnih komplikacija. Prvi standardni mehanizam nastanka mikrovaskularnih komplikacija DM je bio mehanizam poliolskog puta koji je opisan još 1966 godine (11). Nakon toga opisani su i prihvaćeni drugi mehanizmi i to mehanizam povećanog stvaranja krajnjih produkata glikacije (advanced glycation end products-AGE), mehanizam hiperglikemijom indukovane aktivacije protein kinaze C (signalnog molekula koji povećava vaskularnu permeabilnost i dovodi do endotelne disfunkcije) i mehanizam heksozaminskog puta kao i ujedinjujući mehanizam nastanka superoksida. (12,13). Opisani su i prihvaćeni i drugi mehanizmi kao što su povećana produkcija i aktivnost slobodnih kiseoničnih radikala (ROS), aktivacija brojnih inflamatornih citokina, aktivacija sistema renin-angiotenzin sistem (RAS), aktivacija sistema kallikrein-bradikinin (14). Svi ovi, hiperglikemijom izazvani poremećeni intra- i ekstracelularni molekularni mehanizmi vode poremećenoj transdukciji tj. prenosu signala i kao krajnju posledicu imaju disfunkciju i oštećenje ćelija (14).

Danas se smatra da i genetski faktori imaju veoma važnu ulogu u nastanku mikrovaskularnih komplikacija DM (15).

1.2.1. Dijabetesna retinopatija

Dijabetesna retinopatija je vrlo česta komplikacija šećerne boelsti koja pogađa trećinu pacijenata sa dijabetesom (16,17). Dijabetesna retinopatija se razvija godinama i nakon trajanja bolesti preko dvadeset godina skoro svi pacijenti sa T1DM i većina pacijenata sa T2DM će imati neke promene na retini.(18,19,20,21). Takođe, DR je najčešći uzrok oštećenja vida i glavni razlog gubitka vida u radno sposbonoj populaciji (22). Smatra se da će broj osoba sa DR porasti na 191 miliona do 2030. godine (23). Ono što je danas takođe u fokusu je i to da je DR signifikantno povezana sa povećanim kardiovaskularnim rizikom, tj. povećanim rizikom za nastanak cerebrovaskularnog inzulta, infarkta miokarda i kongestivne srčane insuficijencije (24).

Najznačajniji faktori rizika za nastanak DR su dužina trajanja šećerne bolesti, loša glikemijska kontrola i arterijska hipertenzija (25,26,27,28). U ostale faktora rizika spadaju i indeks telesne mase (BMI), dislipidemija, anemija, pušenje, pubertet i trudnoća (5,29,30,31,32). Dijabetesna retinopatija kao i ostale mikrovaskularne komplikacije šećerne bolesti uglavnom postaje manifestna nakon nekoliko godina trajanja osnovne bolesti, mada je pokazano da se ona može javiti i godinama pre nastanka DM, čak i u fazi predijabetesa (33) ili se otkriti odmah po dijagnozi šećerne bolesti (34). S obzirom da je asimtomatska u početku, neophodan je detaljan oftalmološki pregled pri postavljanju dijagnoze a zatim jednom godišnje kod pacijenata sa T2DM, a kod mladih i osoba sa T1DM indikovani oftalmološki pregled u smislu screeninga za DR, pri postavljanju dijagnoze DM a zatim jednom u pet godina (35).

Pokazano je da postoji grupa pacijenta kod kojih, bez obzira na lošu glikoregulaciju i lošu regulaciju arterijskog pritiska neće doći do razvoja DR. S druge strane, postoje i pacijenti kod kojih će, bez obzira na dobo regulisanu šećerbu bolest i dobro regulisan arterijski pritisak doći do pojave DR (27). Sve ovo ukazuje na to da pored poznatih faktora rizika i nasledni faktorii igraju veoma važnu ulogu u nastanku DR. Tako je pokazano da je faktor nasleđivanja odgovaran u 25-50 % za nastajanje proliferativne dijabetesne retinopatije (36,37) U studiji sa jednojajčanim blizancima pokazano je da u 68 % pacijenata sa tipom 1 DM postoji DR kod oba blizanca dok je kod pacijenata sa tipom 2 DM, ta konkordanca čak 95 % (38). Uticaj genetskih faktora su pokazale i druge studije (39,40,41,42).

Osnovna klinička podela dijabetesne retinopatije se zasniva na tome da li u retini postoje novi krvni sudovi ili ne, tj. da li je prisutna neovaskularizacija ili ne. Na osnovu toga razlikujemo:

-neproliferativnu retinopatiju (NPDR) i

-proliferativnu retinopatiju (PDR)

Neproliferativna retinopatija se dalje klasifikuje u četiri stadijuma: **blaga, umerena, teška i veoma teška** (43)

Prvi klinički znaci neproliferativne retinopatije jesu mikroaneurizme, tačkasta i ctasta krvarenja, promene izgleda mrlja od vate (cotton wool spots) i intraretinalne mikrovaskularne anomalije (IRMAs) (44). Ono što je možda najznačajniji proces u patogenezi DR jeste narušavanje krvno-retinalne barijere. Krvno-retinalu barijeru na nivou kapilara retine čine: endotelne ćelije, bazalna membrana i periciti. Periciti su ćelije koje se nalaze oko kapilara i koje daju strukturnu potporu endotelnim ćelijama od kojih su odvojeni bazalnom membranom. Pored toga, periciti moduliraju funkciju endotelnih ćelija tako što regulišu ekspresiju proteina koji učestvuju u spoju između ćelija koji se označavaju kao tesni spojevi između ćelija (tight junction).(45). Na nivou krvno- retinalne barijere dolazi do tri značajna procesa: gubitka tesnih veza između endotelnih ćelija, zadebljanja bazalne membrane i do gubitka pericita (43). Zadebljanje bazalne membrane se dešava rano u dijabetesu i povezano je sa hiperglikemijom indukovanom povećanom sintezom proteina ekstracelularnog matriksa i to fibronektina i kolagena kao i poremećenom razgradnjom istih (46). Selektivni gubitak pericita je takođe jedan od prvih histopatoloških znakova u DR. (47). Gubitak pericita dovodi do slabljenja zida kapilara što vodi stvaranju mikroaneurizmi (48). Nakon gubitka i apoptoze pericita za koju se još uvek ne zna zašto nastaje u dijabetesu dolazi i do apoptoze endotelnih ćelija. Kao rezultat nastaju acelularni kapilari koji dovode do neadekvatne perfuzije retine (43).

Usled oštećenja krvno-retinalne barijere dolazi do povećane permeabilnosti retinalnih kapilara i povećanog curenja plazme u retinu što vodi nastanku edema retine. Taj edem najčešće nastaje u žutoj mrlji tj makuli i označava se kao makularni edem. Kod makularnog edema ustvari postoji zadebljanje ili otok makule koji nastaje usled sub- i intaretinalne akumulacije tečnosti u nivou makule. Makularni edem je najčešći razlog slepila kod pacijenata sa DR i može se javiti u bilo kojoj fazi DR ali je češći u kasnijim fazama bolesti (49,50).

Sa dužim trajanjem i progresijom NPDR u PDR dolazi do progresije ishemije retine što za posledicu ima oslobađanje faktora rasta i nastanak procesa neovaskularizacije odn. stvaranja novih krvnih sudova ili kako se još naziva angiogeneze (44,51). Ti novi krvni sudovi obično su lokalizovani na površini retine i penetriraju u unutrašnju membranu sočiva. Kako su vrlo krta i propusni često dovode do vitrealnih krvarenja a ponavljana vitrealna krvarenja mogu dovesti do ablacije retine i posledičnog slepila (52).

Proces angiogeneze je dobro kontrolisan process koji je determinisan balansom između proangiogenih i antiangiogenih endogenih faktora i u kome, u određenim patološkim stanjima kao što su hipoksija i inflamacija može doći do shifta u smeru angiogeneze što se označava kao angiogeni switch. (53,54). U ovom procesu dolazi do proliferacije i migracije endotelnih ćelija, sazrevanja krvnih sudova i do remodelovanja ekstracelularnog matriksa što je ključno u regulaciji čitavog procesa angiogeneze (53,55,56,57). Najznačajniji proangiogeni faktor u DR jeste vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF). Glavni stimulus za povećanu sintezu ovog faktora rasta jeste retinalna ishemija. Ona dovodi do povećane regulacije odn. sinteze VEGF preko aktivacije HIF-1 (hipoksijom indukovani faktor 1) (58). Povećanje koncentracije VEGF registrovano je u više vrsti ćelija i to u pericitima, endotelnim ćelijama retine, pigmentnim epitelnim ćelijama retine ali i

u Milerovim ćelijama (glijalne ćelije) kao i u astrocitima. (59,60,61) VEGF je glikoprotein koji pripada familiji VEGF familiji koja je sastavljena od šest proteina: VEGF-A,-B,-C,-D,-E, i placentalnog faktora rasta (PGF) od kojih je VEGF-A najznačajniji i najviše korišćen u kliničkoj praksi (62). VEGF dovodi do proliferacije endotelnih ćelija aktivacijom MAP (mitogen aktivirajući protein) proteina (63). Takođe, VEGF dovodi i do povećane vaskularne permeabilnosti a taj mehanizam ostvaruje indukujući fosforilaciju proteina tight-junction kao što su okcludin i zonula-okcludens 1 (56). Brojne studije do sada su pokazale povećanu koncentraciju VEGF kako u serumu, tako i u sočivu osoba sa DR i dijabetesnim makularnim edemom (64, 65,66, 67). Intravitrealna terapija anti-VEGF agensima danas predstavlja terapiju izbora kako u poodmaklim, tako i u ranim stadijumima DR (56, 68,69).

U procesu angiogeneze ulogu imaju i drugi angiogeni faktori kao što su angiopetin 1 i angiopoetin 2 koji regulišu vaskularnu permeabilnost i to preko endotelnog receptora za tirozin kinazu – Tie2 (56,70). Pokazano je i da angiopetin-2 kao i antagonista Tie-2 mogu dovesti do povećanog curenja iz retine dijabetesnih pacova (71). Danas se smatra da, pored VEGF, i drugi angiogeni faktori mogu biti potencijalni terapijski targeti. (56)

Danas se DR sve više smatra neurovaskularnom komplikacijom u kojoj retinalna neurodegeneracija predstavlja jedan od ranih događaja u razvoju DR. Oštećenje neurovaskularne (NVU) jedinice je primarni događaj u patogenezi DR i može se kod pacijenata meriti i procenjivati i morfološki i funkcionalno (72). NVU jedinicu čine vaskularne ćelije (endotelne ćelije i periciti), neuroni različitog tipa (ganglijske ćelije, amakrine ćelije, horizontalni i bipolarni neuroni), i ćelije glije (Milerove ćelije i astrociti). Kako intra-retinalni krvni sudovi nemaju autonomnu inervaciju, s toga je autoregulatorni odgovor NVU na različite cirkulatorne i neuralne stimulus od ključnog značaja za regulisanje prokrvljenosti unutrašnjeg dela retine (72). Čak je pokazano, na životinjskom modelu, da neurodegeneracija odn gubitak ganglijskih ćelija i smanjenje debljine retine može predhoditi pojavi prvih znakova mikrovaskularnih oštećenja (73). Patognomonični znaci neurodegeneracije retine jesu apoptoza neurona, smanjena funkcija neurona retine i reaktivna glijoza (74). Aktivacija ćelija glije (pre svega Milerovih ćelija) dovodi do dodatnog oštećenja retinalnih neurona kao i do oslobađanja inflamatornih citokina koji vode dodatnom oštećenju retine (72,75).

Danas je poznato da u nastanku i razvoju DR veoma značajnu ulogu ima i inflamacija (76,77,78,79) Hronična inflamacija niskog intenziteta može biti prisutna u različitim fazama DR i praktično ima ulogu u dva najznačajnija procesa koja vode oštećenju vida kod osoba sa DR a to su: povećana retinalna vazopermeabilnost i neovaskularizacija. (80). Dijabetes tj. hiperglikemija per se dovodi do povećane lokalne i sistemmske produkcije brojnih inflamatornih molekula kao što su: citokini, hemokini, adhezivne molecule, transkripcioni i faktori rasta (80,81,82). Sa jedne strane, povećana koncentracija ovih molekula dovodi do povećane migracije i aktivacije leukocita dovodeći do fenomena leukostaze, što sa svoje strane posebno doprinosi retinalnoj hipoksiji i oštećenju endotelnih ćelija krvnih sudova retine dovodeći do oštećenja krvno-retinalne barijere. (83,84). Sa druge strane i aktivirani periciti učestvuju u produkciji proinflamatornih citokina koji dovode do aktivacije brojnih imunskih ćelija koje učestvuju u inflamaciji retine (85). S obzirom na sve značajniju ulogu inflamacije u patogenezi DR, sve više biomarkera inflamacije se koristi kako bi se pre svega, pomoću njih otkrili oni pojedinci koji su u povećanom riziku za nastanak ove mikrovaskularne komplikacije a sa druge strane služe i kao potencijalna meta za nove terapijske agense.

Različiti citokini i hemokini su nađeni u povišenoj koncentraciji kako u sistemske cirkulaciji tako i u okularnim tečnostima i tkivima kao što su: retina, sočivo, očna vodica i suze. Jedan od najviše proučavanih parametara inflamacije u DR jeste CRP (C-reaktivni protein) za koji su dobijeni kontradiktorni rezultati. Neke studije su pokazale da su koncentracije CRP povišene kod osoba sa

DR i to u oba tipa DM. a neke nisu dale takve rezultate (86,87). Takođe je pokazano da CRP može biti prediktor stepena težine DR (88,89).

Tumor necrosis factor alfa (TNF-alfa) je inflamatorni citokin koji povećava leukostazu, povećava produkciju slobodnih radikala i povećava permeabilnost retinalnih kapilara i na taj način dovodi do oštećenja krvno-retinalne barijere (80,90). Pokazano je da i on može služiti kao parameter težine DR, jer su njegove koncentracije značajno povišene u PDR (86,91).

Interleukin-6 (IL-6) takođe dovodi do povećane vaskularne permeabilnosti a ima i značajnu ulogu u procesu angiogeneze dovodeći do povećane ekspresije VEGF. Nađene su povišene koncentracije IL-6 kako u sočivu, tako i u serumu osoba sa DR a IL-6 se pokazao i kao predictor nastanka PDR i makularnog edema (91,92,93). Kod osoba sa DR pokazano je značajno povećanje koncentracija i interleukina-1 beta (IL-1 beta) i interleukina-8 (IL-8) i u sočivu i u serumu osoba sa DR (94,95).

Pored inflamatornih citokina, važnu ulogu u procesu inflamacije imaju i adhezivne molekule i to intracelularna adhezivna molekula-1 (ICAM-1), vaskularna adhezivna ćelijska molekula (VCAM-1) i E- selektin. Svi oni ubrzavaju proces leukostaze ali učestvuju i u procesu angiogeneze a njihove povećane koncentracije su nađene u serumu i sočivu osoba sa PDR (96,97). Produkcija ovih adhezivnih molekula je povećana u prisustvu proinflamatornih citokina kao što su TNF-alfa i IL-1 beta kao i u stanjima hiperglikemije tako da su potrebne dalje studije da bi se tačno definisala uloga ovih molekula (80).

Na nekim animalnim modelima je pokazana povećana ekspresija adipokina koji se označava kao retinol-vezujući protein 4 (retinol-binding protein 4 RBP-4) i to u stanjima rane aktivacije ćelija glije i u fazi progresivne retinalne degeneracije (98). Takođe je pokazano da su koncentracije RBP-4 povećane kod osoba sa DR i to posebno kod osoba sa težim oblicima DR kod kojih je postojala opasnost od gubitka vida (99).

Inflamacija igra veoma važnu ulogu i u procesu angiogeneze i pokazano je da ova dva procesa idu simultano i koriste zajedničke molekularne mehanizme i inflamatorne medijatore kao što su IL-6, TNF-alfa koji uglavnom dovode do povećane ekspresije VEGF. Pokazano je i da u procesu angiogeneze značajnu ulogu ima i interleukin-12 (IL-12) koji stimuliše produkciju TNF-alfa ali može imati i antiangiogeno dejstvo što je pokazano kod osoba sa DR koje su imale povišene vrednosti TNF-alfa ali i snižene vrednosti IL -12 (100).

Oksidativni stres igra, možda i najvažniju ulogu u patogenezi DR. On nastaje kao neravnoteža između stvaranja i uklanjanja slobodnih radikala tj. ROS (reaktivnih vrsta kiseonika) koji se uglavnom stvaraju u mitohondrijama i koji dovode do značajnih oštećenja u i oko retinalnih krvnih sudova koja vode pojavi DR (101). Niz metaboličkih abnormalnosti izazvanih hiperglikemijom dovodi do povećanog oksidativnog stresa u retini. Prva od njih jeste aktivacija poliolnog puta pri čemu dolazi do nakupljanja sorbitola koji vodi povećanom tonusu krvnog suda, povećanom osmotskom pritisku i smrti ćelija. Takođe dolazi i do stvaranja pekursora AGE i povećanog izlaganja ćelija retine oksidativnom stresu. Hiperglikemija dovodi, preko povećanog stvaranja diacilglicerola u procesu glikolize do aktivacije protein kinaze C-koju čini porodica enzima odn 12 izoformi od kojih su α , $-\beta$, $-\delta$, and $-\epsilon$ bitni za nastanak DR (102). Niz procesa u ćelijama retine zavisi od PKC a ono što je najbitnije, zahvaljujući aktivaciji enzima NADPH oksidaze povećana je produkcija ROS pre svega u endotelnim ćelijama i pericitima što ih čini izloženim velikom oksidativnom stresu (101). U procesu stvaranja AGE produkata, dolazi do njihovog vezivanja za receptore (RAGE) i tom prilikom aktivacije nuklearnog faktora $-\kappa B$ što kao rezultat ima apoptozu pericita i povećanu ekspresiju VEGF koja vodi povećanoj vaskularnoj permeabilnosti (103). Takođe, vezivanjem AGE produkata za njihove receptore dolazi i do aktivacije NADPH oksidaze

što takođe za rezultat ima povećano stvaranje ROS (101). Aktivacijom heksozaminskog puta dolazi do povećanog stvaranja heksozamina koji stimuliše produkciju ROS u mitohondrijama (104).

Svi ovi poremećeni molekularni mehanizmi vode povećanom oksidativnom stresu, a oksidativni stress, sa druge strane potencira sve ove poremećaje formirajući jedan začaran krug u kome dolazi do oštećenja mitohondrija, apoptoze retinalnih ćelija, lipidne peroksidacije i strukturnog i funkcionalnog oštećenja retine (101).

1.2.2. Dijabetesna nefropatija

Dijabetesna nefropatija predstavlja jednu od najčešćih i najtežih komplikacija šećerne bolesti koja značajno povećava morbiditet i mortalitet pacijenata sa šećernom bolešću (105). Javlja se u 20-40 % pacijenata sa DM i predstavlja vodeći uzrok nastanka terminalne bubrežne bolesti (106,107). Glavni faktori rizika udruženi sa nastankom DN jesu loša glikoregulacija, arterijska hipertenzija, pušenje i dislipidemija (108). Danas se sve više koristi termin dijabetesna bolest bubrega (diabetic kidney disease- DKD) koja se definiše kao perzistentna strukturna ili funkcionalna bubrežna abnormalnost u trajanju dužem od tri meseca. DKD se dijagnostikuje na osnovu povećane ekskrecije albumina (povećanog odnosa albumini u urinu/kreatinin ≥ 30 mg/g) i smanjenja glomerulske filtracije ($GFR < 60$ mL/min per 1.73 m²) (109).

Najznačajniji factor progresije DKD u terminalnu bubrežnu bolest jeste glomerulska filtracija tj. njen pad. Albuminurija takođe predstavlja znak progresije ali nema dovoljnu specifičnost i senzitivnost za nastanak terminalne bubrežne slabosti kao ni za procenu progresije pada GFR. Kod pacijenata sa T1DM je pokazano da samo trećina onih koji su imali mikroalbuminuriju imali i progresivni gubitak bubrežne funkcije (110) a da je kod pacijenata sa T2DM koji su imali progresiju DKD veliki broj imao albuminuriju u granicama fizioloških (111,112).

Patofiziološki mehanizmi koji dovode do pojave DN su brojni i još uvek nedovoljno ispitani ali svi oni dovode do tri ključne promene: glomerulske hipertrofije koja vodi hiperfiltraciji, glomerulske i tubulointersticijalne inflamacije i disregulacije ćelijske apoptoze i promena u ekstracelularnom matriksu (113). Pored hiperglikemije, glavni promotor glomerulske hiperfiltracije jeste povećana koncentracija amino kiselina usled povećane proteinske ishrane. Kod loše metaboličke kontrole šećerne bolesti, bubreg je veoma osetljiv na povećanu koncentraciju amino kiselina što vodi hiperfiltraciji. Kod osoba sa T2DM arterijska hipertenzija i gojaznost mogu dodatno doprineti hiperfiltraciji i pokazano je da do 40 % pacijenata sa T2DM ima značajnu hiperfiltraciju (114). Smatra se da je osnovni mehanizam koji dovodi do ove hiperfiltracije povećana proksimalna reapsorpcija glukoze i natrijuma na nivou proksimalnih tubula (preko SGLT2 receptota odn natrijum-glukoznog transportera 2), što za posledicu ima smanjen priliv Na u zonu macule dens-e što vodi smanjenoj tubuloglomerulskoj povratnoj sprezi. Kao rezultat dolazi do dilatacije aferentne arteriole glomerula i povećanja produkcije angiotenzina II koji dovodi do vazokonstrikcije eferentne arteriole glomerula i usled ta dva mehanizma dolazi do povećanja intraglomerulskog pritiska i posledične hiperfiltracije (115).

Prve strukturne promene koje se javljaju u ranim fazama DN jesu na nivou glomerula. Prvo što je vidljivo jeste zadebljanje bazalne membrane glomerula, zatim dolazi i do hipertrofije mezangijalnih ćelija. Mezangijalne ćelije čine 30-40 % ćelija u glomerulu i one su odgovorne za otklanjanje imunih kompleksa i proteina. Istovremeno dolazi i do ekspanzije mezangijalnog matriksa kao i do gubitka podocita. Podociti su epitelne ćelije koje pokrivaju spoljašnju stranu bazalne membrane glomerula i nakon gubitka više od 20 % podocita dolazi do poremećene glomerulske filtracije i posledične proteinurije (116).

Pored promena na glomerulima, u toku razvoja DN dolazi i do značajnih strukturnih i funkcionalnih promena i na bubrežnim tubulima i na intersticijumu. Promene na tubulointersticijumu obuhvataju zadebljanje tubularne bazalne membrane, atrofiju tubula, intersticijalnu fibrozu što sve može voditi jednoj diskonekciji između glomerula i tubula koji se označava kao postojanje atubularnih glomerula i ovaj fenomen je praktično karakterističan za ireverzibilne promene u DN (117).

Renalna fibroza predstavlja poslednju stepenicu u razvoju DN i pored hemodinamskih promena u glomerulima, ishemije i različitih promena u glukoznom metabolizmu, u njenom nastanku značajnu ulogu imaju oksidativni stres, inflamacija kao i aktivacija sistema renin-angiotenzin-aldosteron (RAAS) (118).

Oksidativni stres koji je determinisan povećanom produkcijom ROS uzrokovanom hiperglikemijom, predstavlja možda i najvažniju komponentu u patogenezi DN. Povećana produkcija ROS je posledica sa jedne strane aktivacije više enzimskih sistema (NADPH oksidaze, lipoksigenaze, ksantin oksidaze, NOS i mitohondrijalnog respiratornog sistema) a sa druge strane poremećenih mehanizama odbrane antioksidanasa (superoksid dizmutaze-SOD, katalaza, glutation peroksidaza i paraoksonaza) Ovaj disbalans vodi oksidaciji makromolekula, oštećenju tkiva i posledičnoj disfunkciji (120). Oksidativni stres može dovesti do oštećenja u bubregu i direktno i indirektno. Direktno, hiperglikemijom izazvan povećan oksidativni stres, može dovesti do oštećenja endotelijalnih ćelija, podocita, mezangijalnih ćelija što za posledicu ima nastanak proteinurije i tubulointersticijske fibroze. Indirektno, oksidativni stres može indukovati druge patološke puteve koji dovode do oštećenja bubrega i sa kojima je u stalnom dvosmernom odnosu (121). Oksidativni stres je povezan sa brojnim drugim metaboličkim i hemodinamskim promenama u bubregu tako da npr dovodi do povećane sekrecije angiotenzina II, aktivacije PKC i povećane ekspresije transformišućeg faktora rasta-beta ($TGF-\beta$) (122). Povećana aktivacija $TGF-\beta$ stimuliše sintezu i povećano remodelovanje ekstracelularnog matriksa mezangijuma i dovodi do fibroznih promena u tubulskom intersticijumu (121,123).

Renin-angiotenzin-aldosteron system (RAAS) takođe igra veoma važnu ulogu u progresiji DN i pokazano je da inhibicija ovog sistema može značajno usporiti progresiju bolesti i to smanjenjem proteinurije i održavanjem normalne bubrežne funkcije (124). Jedna od najznačajnijih komponenti ovog sistema je angiotenzin II. Angiotenzin II je citokin koji deluje na bubreg kako sistemski, tako i aktiviranjem lokalnog RAAS u bubregu (125). Ćelije bubrega sintetišu renin, reninske receptore, angiotenzinske receptore i angiotenzin II nezavisno od sistemskog RAAS. Čak je pokazano da su koncentracije angiotenzina II u intersticijumu bubrega nekoliko hiljada puta veće nego u plazmi (126). U stanjima hiperglikemije povećana je sinteza renina i angiotenzina II u mezangijalnim ćelijama i ta povećana intrarenalna koncentracija angiotenzina II je odgovorna za brojne procese u bubregu. Osim hemodinamskog odgovora u smislu povećanog intraglomerulskog pritiska i povećane permeabilnosti koja vodi proteinuriji, dolazi i do stimulacije proliferacije i hipertrofije ćelija bubrega, sinteze drugih citokina i daljeg stimulisanja procesa inflamacije. Takođež utiče i na proliferaciju mezangijalnog ekstracelularnog matriksa (127).

Pokazano je da inflamacija ima veoma važnu ulogu u nastanku mikrovaskularnih komplikacija DM pa i DN. Stalna inflamacija kako u samom bubrežnom tkivu tako i u sistemske cirkulaciji predstavlja vrlo značajan factor u nastanku i progresiji DN (128). Koncentracija inflamatornih citokina, pre svega IL-1, IL-6, TNF- alfa, TGF- β 1, i IL-18 je značajno povišena kod osoba sa DN (129).

Na eksperimentalnim modelima DN je pokazano da dolazi do povećane sinteze i sekrecije inflamatornih i fibrogenih citokina koji ne samo da imaju negativan direktan efekat na ćelije bubrega nego dovode i do ekspanzije ekstracelularnog matriksa (130).

U procesu inflamacije važnu ulogu imaju i transkripcioni faktori od kojih je jedan od najznačajnijih nuklearni faktor- κ B (NF- κ B). NF- κ B se aktivira hiperglikemijom, AGE produktima, ROS, mehaničkim stresom i nakon aktivacije stimuliše transkripciju proinflamatornih citokina, hemokina i ćelijskih adhezivnih molekula koje učestvuju u procesu oštećenja bubrega u DN (131).

Smatra se da i neki drugi transkripcioni faktori kao što je eritroidni nuklearni faktor-2 (Nrf2) čija je nefroprotektivnost pokazana na eksperimentalnim modelima (132).

Inflamacija i oksidativni stress su dva kamena temeljca patofiziologije DN, koja se medjusobno stalno prepliću i utiču jedan na drugi. Glavni patofiziološki mehanizam koji povezuje oksidativni stress, inflamaciju i progresiju DN jeste rana lezija bubrega izazvana različitim molekulanim mehanizmima koji dovode do povećanog stvaranja slobodnih radikala i indukcije inflamacije (133),

Pored opisanih patofizioloških mehanizama koji leže u osnovi DN, danas se sve više istražuju novi mehanizmi koji će u budućnosti biti i osnova novih terapijskih pristupa. U te nove molekularne mehanizme koji su u osnovi nastanka DN spadaju genetske i epigenetske modifikacije, autofagija podocita i mitohondrijalna disfunkcija (118). U epigenetske modifikacije spadaju DNK (dezoksiribonukleinska kiselina) metilacija, post-translaciona modifikacija histone i delovanje mikroRNK koje onemogućavaju process translacije proteina. Svi ovi epigenetski faktori nastaju kao direktna posledica oksidativnog stresa, inflamacije i hiperglikemije i dovode do poremećene ekspresije gena ali bez promena u DNK sekvenci (134).

Autofagija podocita se pokazala kao renoprotektivni mehanizam u razvoju DKD (135). Čak je i u uzorcima biopsije bubrega pacijenata sa DKD i masivnom proteinurijom pokazan smanjen nivo autofagije u podocitima (136). Autofagijom podocita se ustvari održava homeostaza intracelularne sredine i to preko autofagijom-related proteina Agp 12 koji učestvuje u autofagozomnoj formaciji i preko mTOR-a koji inhibira autofagiju (137,138).

Pored klasične uloge mitohondrija u oksidativnom stresu danas se sve više opisuje i mitohondijalna disfunkcija koja podrazumeva smanjenu produkciju ROS. U uslovima značajne hiperglikemije dolazi do redukcije stvaranja superoksida u mitohondrijama, smanjenja oksidativne fosforilacije i produkcije mitohondrijalne ATP (118). Prolongirano smanjenje oksidativne fosforilacije, sa druge strane, dovodi do povećanog oslobađanja proinflamatornih citokina i intenziviranja inflamacije i oksidativnog stresa (139).

Multifaktorijalna patogeneza DKD se danas zasniva, ne samo na tradicionalnim objašnjenjima hemodinamskih i metaboličkih poremećaja nego se, sve više akcenat stavlja i na genetske faktore rizika kao i na epigenetske modifikacije u nastanku dijabetesne bolesti bubrega.

1.2.3. Dijabetesna polineuropatija

Dijabetesna polineuropatija predstavlja najčešću komplikaciju dijabetesa koja se javlja u praktično polovini pacijenata sa dijabetesom u toku njihovog života (140,141). Dijabetesna polineuropatija se definiše kao prisustvo simptoma i/ili znakova disfunkcije perifernih nerava kod osoba sa dijabetesom nakon isključenja drugih razloga. (142). Dijagnoza se zasniva ne samo na prisustvu simptoma, već i na kvantitativnim testovima kojima se meri stepen oštećenja perifernih nerava, a neretko ona može biti i asimptomatska.

Prevalenca DPN je veća kod pacijenata sa T2DM i neke studije su pokazale da ona može biti od 39-51 % (143,144,145). Sa godinama života i sa godinama trajanja šećerne bolesti prevalenca se znatno povećava kod oba tipa DM (146). Pored tradicionalnih faktora rizika kao što su životna dob, dužina trajanja dijabetesa i loša glikemijska kontrola pokazano je da i drugi faktori rizika kao što su indeks telesne mase (BMI), pušenje, arterijska hipertenzija i povišen nivo triglicerida imaju ulogu u nastanku DPN (147,148).

Postoji nekoliko oblika dijabetesne periferne neuropatije. Ona može biti senzorna, motorna, fokalna ili multifokalna i autonomna. Najčešći oblik, koji se javlja u 75 % slučajeva jeste distalna simetrična polineuropatija. Ona može zahvatati primarno mala vlakna, primarno velika vlakna ili i jedna i druga (142). Distalna simetrična polineuropatija dovodi do pojave neuropatskog bola u 10-30 % pacijenata (149). Atipične forme dijabetesne polineuropatije čine: mononeuropatije (kao što je mononeuritis multiplex), radikulopatije i neuropatije izazvane lekovima (142). DPN može dovesti do raznih komplikacija, pre svega hroničnog neuropatskog bola, ulkusa na stopalima, raznih infekcija stopala i posledičnih amputacija (150). Glavni faktori rizika za nastanak ulkusa na stopalu jesu: starija životna dob, duže trajanje DM, arterijska hipertenzija, pušenje i prisustvo dijabetesne retinopatije (151). Smatra se da čak četvrtina pacijenata sa DM u toku svog životnog veka razvije ulkus koji se jako često komplukuje infekcijom, gangrenom i posledičnom amputacijom (152).

Patogenetski mehanizmi koji leže u osnovi DPN su kao i kod ostalih vaskularnih komplikacija DM brojni i još uvek nedovoljno ispitani. Kao i za druge dve mikrovaskularne komplikacije važi da se prve promene javljaju na mikrovaskularnom koritu sačinjenom od kapilara, u ovom slučaju na nivou nerva. Nervi su normalno prokrvljeni preko vasa nervorum koji su ključni za normalno funkcionisanje i održavanje normalne strukture nerva (153). Biopsije suralnog nerva kod pacijenata sa DM su pokazale iste one promene na kapilarnoj mreži koje se javljaju i u drugim mikrovaskularnim komplikacijama a to su: zadebljanje bazalne membrane, gubitak kapilarnih pericita i hiperplazija endotelnih ćelija (154). Sve ove promene koje su, pre svega izazvane hiperglikemijom, zajedno sa povećanom permeabilnošću dovode do smanjenog protoka i dostave kiseonika kroz male endoneurialne krvne sudove. Kao posledica javlja se endoneurialna hipoksija, edem nervnih vlakana tj. aksona kao i smanjena brzina provodljivosti kroz ova nervna vlakna (155). Ipak, smanjen protok kroz kapilare nerava kao ni gubitak kapilarne mreže nije pokazan u svim eksperimentalnim studijama (156). Zbog toga je predložena jedna nova hipoteza a to je da umesto globalnog sniženja protoka kroz kapilare nerava ustvari postoji redukovana količina glukoze i kiseonika koja se preuzima od strane nervih vlakana što vodi njihovoj disfunkciji (157). Taj individualni kapilarni protok ima različitu distribuciju i mera te heterogenosti jeste jedan novi indeks koji se označava kao heterogeno kapilarno tranzitno vreme (CTH) (157).

Međutim, pored ovih promena na mikrovaskulaturi ono što je nesumnjivo pokazano je da u DPN postoji rana degeneracija senzornih neurona i to u ganglijama dorzalnih korenova kičmene moždine. Na eksperimentalnim modelima dijabetesa ovi neuroni pokazuju i strukturne i

funkcionalne defekte kako na nivou perikaria odn tela neurona tako i na nivou njihovih aksona odn terminalnih završetaka u epidermisu. Pored atrofije neurona i aksona pokazana je i smanjena provodljivost impulsa kroz nerve kao i gubitak senzacija za dodir (158). Smatra se da je aksonska degeneracija, ustvari prva patološka promena koja se javlja u DPN i da aksoni kasnije podležu regeneraciji, ali ne potpunoj već samo delimičnoj usled stalnog štetnog uticaja hronične hiperglikemije.

U razvoju DPN, kao i u razvoju drugih mikrovaskularnih komplikacija DM ključnu ulogu imaju inflamacija, oksidativni stress i mitohondrijalna disfunkcija. Usled hronične hiperglikemije dolazi do aktivacije mitogen-aktivirane protein kinaze (MAPK) koja dovodi do aktivacije citosolnog transkripcionog faktora nuklearni faktor- κ B (NF- κ B) koji kao i u DN ima veoma važnu ulogu u aktiviranju inflamatornih citokina i to TNF-alfa, IL-1, IL-6, ciklooksigenaze 2 (COX-2) kao i azot oksid sintetaze (iNOS)(159). IL-6 i CRP su direktno povezani sa prisustvom dijabetesne polineuropatije kao i sa stepenom njene težine dok je IL-18 snižen kod osoba sa DPN (160).

Oksidativni stres zauzima veoma važnu ulogu u nastanku DPN. Hronična hiperglikemija dovodi do aktivacije više signalnih puteva: poliolskog puta, heksozaminskog puta, aktivacije protein kinaze C i stvaranja AGE produkata što sve vodi povećanoj produkciji ROS kako u mitohondrijama tako i u citoplazmi. Povećana produkcija ROS dovodi do oštećenja lipida koji su prisutni u mijelinskoj ovojnici nerava, dovodeći na taj način do procesa demijelinizacije, gubitka aksona i inarušavanja mikrovaskulature u perifernim nervima (161). Oksidativni stres koji je prisutan u stanjima hronične hiperglikemije dovodi do modifikacija u mitohondrijalnom genetskom materiju odn. mitohondrijalnoj DNK i ukoliko perzistira dovodi do tzv. mitohondrijalne disfunkcije koja vodi u još veću produkciju ROS koja za posledicu ima definitivno oštećenje ćelije (162).

Mitohondrijalna disfunkcija takode ima svoje mesto u patogenezi DPN. Mitohondrije su organelle u kojima se stvara 90 % slobodnih radikala tj. ROS (163). Ovi slobodni radikali dovode do procesa lipidne peroksidacije, modifikacije proteina i oštećenja nukleinskih kiselina što kao krajnji rezultat ima degeneraciju aksona i segmentnu demijelinizaciju (159).

1.3. Matriksne metaloproteinaze

Matriksne metaloproteinaze (MMP) pripadaju grupi proteolitičkih enzima tzv. endopeptidaza koje učestvuju u degradaciji i remodelovanju ekstracelularnog matriksa (164).

Ekstracelularni matriks (ECM) je mreža makromolekula koju čine stotine molekula koje pripadaju strukturnim proteinima (kolagen, elastin), proteoglikanima (agrekan 1, sindekan), adhezivnim proteinima (laminin, fibronektin), glikozaminoglikanima (hijaluronska kiselina) i enzimima koji mogu da razlože ove proteinske molekule tj matriksnim metaloproteinazama. (164,165). ECM ne samo da odvaja tkiva jedna od drugih, nego pored ove veoma važne strukturne uloge, ima i ulogu u diferencijaciji ćelija, njihovom rastu, migraciji, interćelijskoj komunikaciji i apoptozu (166).

MMP su prvi put opisane kao enzimi koji omogućavaju rast tumora 1949. god. (167), da bi prve MMP i to iz grupe kolagenaza bile izolovane 1962. god. od strane Grossa i Lapiera i to iz repa punoglavaca u čijoj su resorpciji fibrilarnog kolagena imali ključnu ulogu (168). Nakon toga prošlo je više od dvadeset godina da bi MMP opet ušle u žižu interesovanja i da bi danas bile shvaćene kao glavni enzimi odgovorni za turnover ECM (164,169,170).

MMP pored degradacije proteina ECM imaju veoma važnu ulogu i u degradaciji membranskih proteina, faktora rasta i citokina tako da su nezaobilazni igrači u mnogim biološkim procesima kao što su embriogeneza, diferencijacija i proliferacija ćelija, apoptoza, inflamacija, angiogeneza, reparacija i zaceljivanje tkiva. Samim tim i uloga MMP u raznim humanim bolestima kao što su tumori pre svega maligni, kardiovaskularna oboljenja (infarkt miokarda, arterijska hipertenzija, aneurizma aorte ateroskleroza), diabetes melitus sa svojim vaskularnim komplikacijama, neurodegenerativna oboljenja, oboljenja koštano-zglobnog sistema (osteoarthritis, reumatoidni arthritis), različita ginekološka oboljenja, je sve više predmet naučnih istraživanja.

1.3.1. MMP- struktura i podela

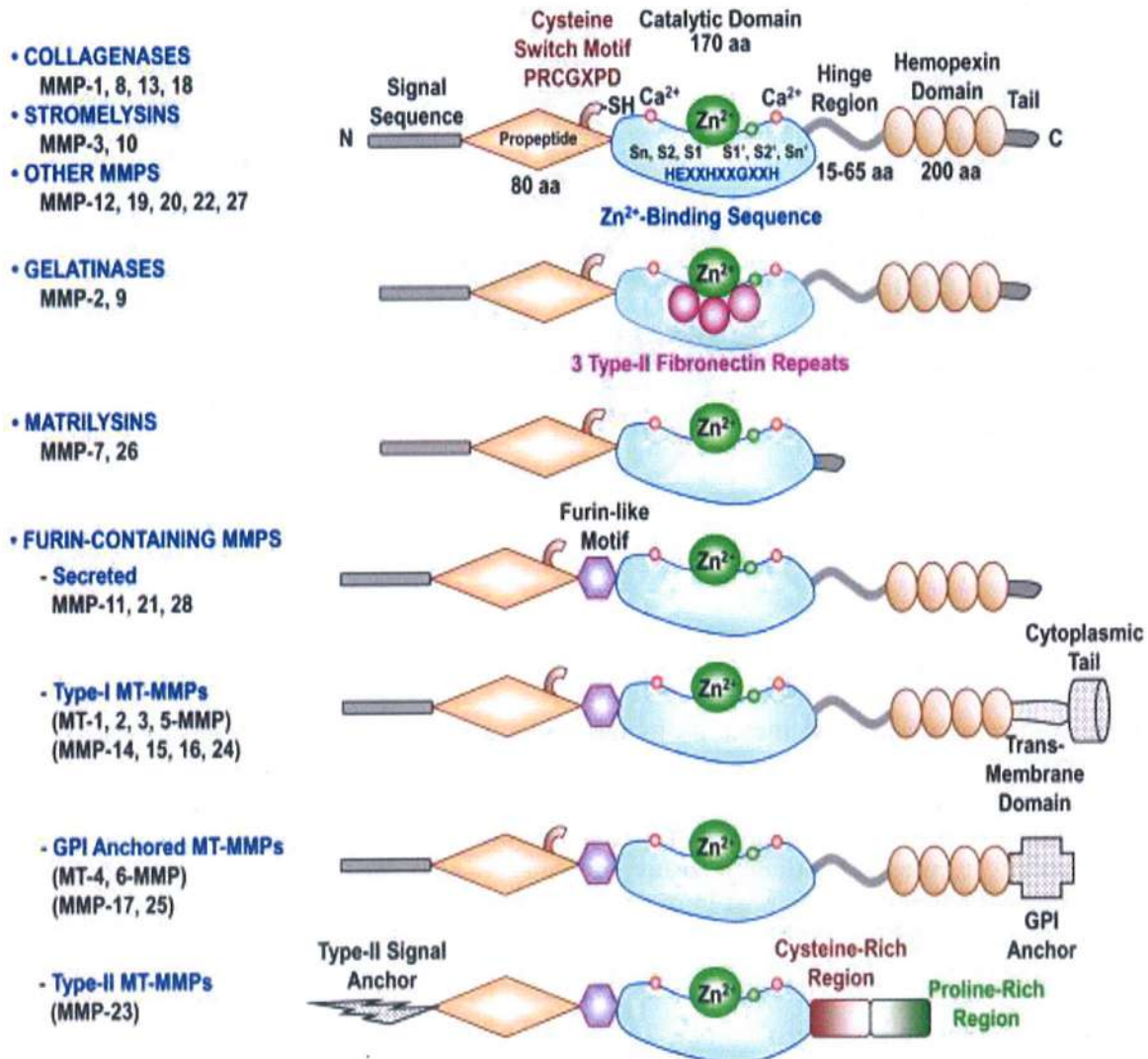
Poznato je da se MMP nalaze u virusima, bakterijama, biljkama i životinjama. Kod kičmenjaka postoji 28 različitih tipova MMP, a kod čoveka 23 (165,166,169,170).

Sve one spadaju u grupu cink -zavisnih endopeptidaza koje imaju različite supstrate na koje deluju ali što se tiče hemijske strukture pokazuju visok stepen sličnosti.

Tipična molekula MMP se sastoji iz nekoliko delova:

1. signalnog N terminalnog peptida različite dužine
2. prodomena-propeptid koji je sastavljen od oko 80 amino kiselina
3. katalitičkog domena koji je sastavljen od oko 170 amino kiselina i za koji se vezuje molekul cinka
4. vezujućeg peptida (linker peptid) ili tzv regiona udice koji je sastavljen od različitog broja amino kiselina najčešće 14-69 amino kiselina
5. hemopeksinskog domena koji je sastavljen od oko 200-210 amino kiselina

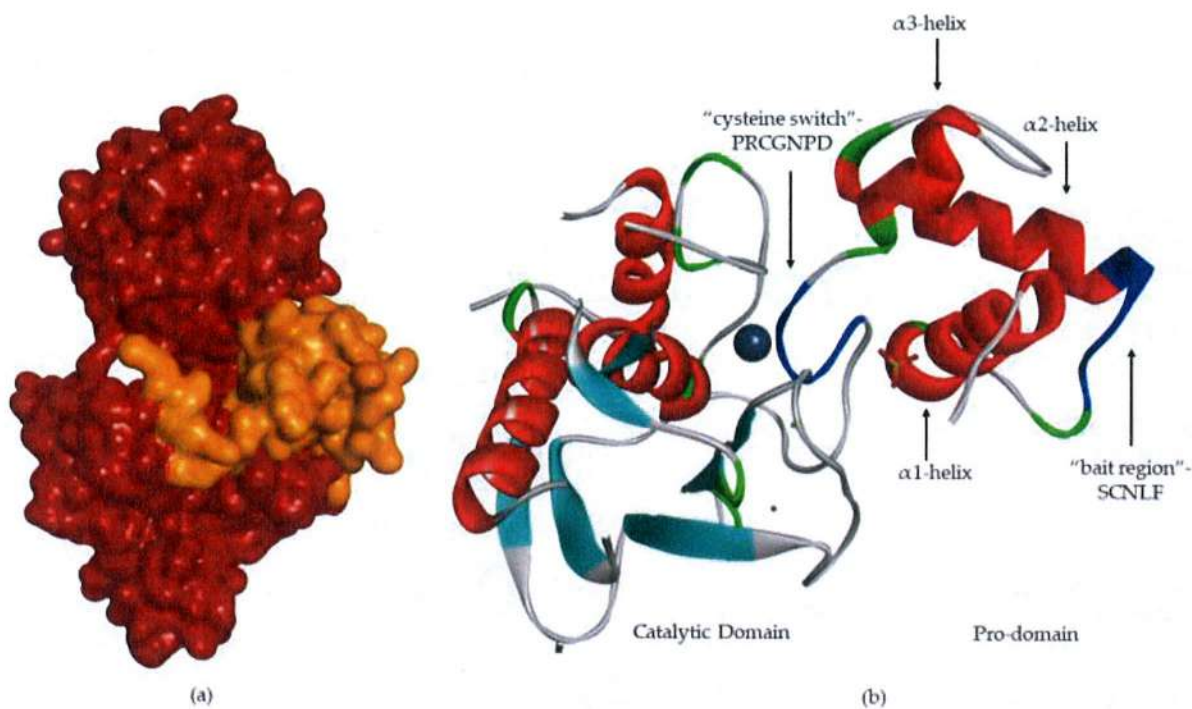
6. dodatnog transmembranskog domena sa malim citoplazmatskim C terminalnim domenom (prisutan samo kod MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24) (171,172)



Slika1. Struktura MMP (171,172)

Sve MMP se sintetišu N terminalnom signalnom sekvencom kao proenzimi i skladište se u endoplazmatskom retikulumu (165,173).

Prodomen sadži tri alfa heliksa, gde se između prvog i drugog nalazi petlja koja se još označava i kao region cepanja ili “mamac- region ” dok treći heliks sadži cisteinski prekidač (cisteinski switch) sa sulfhidrilnom grupom (SH-) koja vezuje jone cinka i drži MMP u latentnom, prozimoženom obliku .



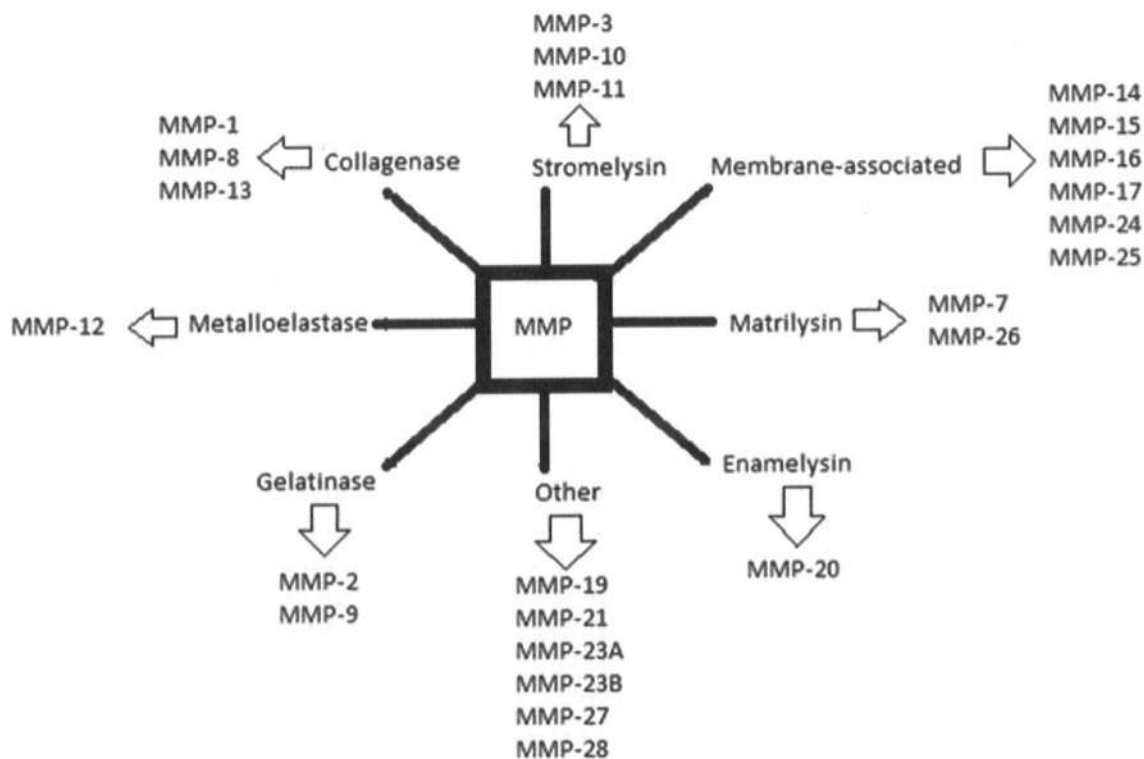
Slika 2. Prodomen MMP (165)

Katalitički domen sadrži aktivno mesto sa jonom cinka a pored tog katalitičkog jona sadrži još jedan jon cinka koji je strukturne prirode i dva ili tri jona kalcijuma radi stabilizacije. Strukturnu organizaciju ovog domena čini oko 170 amino kiselina koje su strukturno uređene u tri alfa α heliksa i pet beta β - listova koji su povezani sa osam petlji (165,174,175). Između drugog i trećeg alfa heliksa nalazi se omega Ω petlja čiji sastav i dužina značajno variraju između različitih MMP i praktično određuju njihovu selektivnost (174). Gama petlja ustvari ograničava odn. čini spoljašnju granicu S1 džepa. Molekuli MMP sadrže šest džepova od kojih je S1 najvažniji jer ustvari determiniše selektivnost molekule MMP za supstrat (165,174).

Hemopeksinski domen je sastavljen od oko 200 amino kiselina koje su strukturno raspoređene u četiri beta propelera (svaki propeler je sastavljen od četiri beta lista i jednog alfa α heliksa) (165,170,176). Ovaj domen je neophodan za razgradnju kolagena ali ne i za razgradnju drugih supstrata (165,169). Jedine MMP koje nemaju ovaj domen su MMP-7, MMP-23 i MMP-26 (177,178).

Naravno, neke MMP se razlikuju od drugih po tome što imaju jedinstven domen koji je bogat cisteinom (kao npr. MMP-23). MMP-2 i MMP-9 sadrže fibronectin u katalitičkom domenu. Ove razlike u stukturi dovode i do različitog mehanizma delovanja mada je ipak, osnovna struktura svih MMP vrlo slična.

Osnovna podela matriksnih metaloproteinaza je napravljena na osnovu njihove predominantne specifičnosti za supstrat i njihove strukturne organizacije na: **kolagenaze, želatinaze, stromelizine, matrilizine, MMP membranskog tipa i ostale MMP** (165,166,170,171,179,180,181).



Slika 3. Podela MMP (181)

Kolagenaze (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18) – najznačajnija uloga kolagenaza je, kao što im i samo ime kaže razgradnja tj. cepanje molekula fibrilarnog kolagena tipa I, II, III, IV i XI koji predstavljaju glavne kolagene kosti i ligamenata. Degradacija kolagena se vrši na na specifičan način i to tako što se prvo vrši razmotavanje trostrukog heliksa kolagena a zatim dolazi do hidrolize peptidnih veza između njih pri čemu nastaju tipični tro-čtvrtinski (3/4) i jedno-čtvrtinski (1/4) fragmenti (165). Za ovakav način cepanja kolagena neophodan je hemopeksinski domen MMP. Pored kolagena, supstrati za delovanje ovih enzima mogu biti i drugi proteini ECM kao što su : želatin, tenascin, agrekan, fibronectin, vitronectin, mijelinski bazični protein, ovostatin, proteoglikanski link protein. (165, 172, 175). Ove MMP imaju i afinitet za druge neproteinske molekule kao što su : kazein, alfa-1 antihimotripsin, IGF-BP-3 (insulin growth binding protein 3), IGF-BP-5, IL-1 beta, L-selektin, pro TNF alfa, pro MMP-8, -9, -13.

Kolagenaze sintetišu različite ćelije: fibroblasti, keratinociti, endotelne ćelije, makrofazi, hepatociti, hondrociti, osteoblasti i trombociti (181, 182, 183). Pokazano je da kolagenaze mogu imati ulogu u stvaranju tj. stabilizaciji karotidnog plaka (181, 184), aterosklerozi i procesu restenoze krvnog suda (185), bolestima vena (186), kao i bolestima bubrega (187, 188). Takođe je pokazano da je MMP-8

prva MMP koja se pojavljuje u toku zarastanja rana i da kod miševa kod kojih postoji smanjena koncentracija MMP-8 postoji i usporeno zaceljivanje kožnih rana kao i češća upalna reakcija oko njih (189).

Želatinaze (MMP-2 i MMP-9) su dugo smatrane najznačajnijim enzimima u proteolitičkoj razgradnji ECM. Strukturno su veoma slične ostalim MMP, ali ono što ih izdvaja jeste specifičan katalitički domen koji sadrži fibronectin koji je neophodan za vezivanje želatina (denaturisanog kolagena). MMP-2 i MMP-9 razgrađuju želatin, kolagen tipa IV, V, VIII, X, XI i XIV, elastin, proteoglikenske cor protein, fibronectin, laminin, versikan. Supstrati za njihovo delovanje su I : Il-1 beta, pro-TNF alfa, TGF beta, aktivna forma MMP-9 (važi samo za MMP-2), IGF-BP3 i-5 (samo MMP-2). Il-2 R (samo MMP-9), plasminogen (samo MMP-9) (165,170,171, 190, 191,192).

MMP-2 (želatinaza A, 72-kDa tip IV kolagenaza)

Predstavlja jednu od najispitivanijih MMP čija je uloga opisana u brojnim fiziološkim ali i patološkim procesima. Ona pre svega deluje kao želatinaza ali ima i slabo kolageno dejstvo. MMP-2 vrši razgradnju kolagena u dve faze: prvo delujući kao slaba kolagenaza a zatim i kao želatinaza zahvaljujući hemopeksinskom domenu. MMP-2 je ubikvitarna i eksprimovana u mnogim tkivima. Niz ćelija sintetiše MMP-2 i to: dermalni fibroblasti, endotelne ćelije, osteoblasti, hondrociti, leukociti, trombociti i monociti. Kao i druge MMP i MMP-2 se sintetiše u kao proenzim u latentnom, zimogenom obliku kao pro-MMP-2 a zatim dolazi do aktivacije u slobodnu aktivnu formu enzima. Pro MMP-2 formira kompleks sa tkivnim inhibitorom matriksnih metaloproteinaza-TIMP-2 i to preko hemopeksinskog domena koji se veže sa C terminalnim domenom TIMP-2 (166, 171, 183, 194). Ovako formiran kompleks predstavlja supstrat za delovanje jedne druge MMP i to MMP membranskog tipa 1 (MT1-MMP) koja se označava i kao MMP-14. MMP-14 dovodi do proteolitičkog cepanja prodomena od pro-MMP-2 pri čemu nastaje aktivna forma enzima MMP-2 (169, 195). U slučaju povišene koncentracije TIMP-2, enzimi MMP-14 i aktivna MMP-2 će biti inaktivirane i neće doći do dalje aktivacije inaktivne forme enzima. Ovo je glavni put aktivacije pro MMP-2, ali ona može biti aktivirana i pod dejstvom trombina i aktiviranog proteina C (196). Zahvaljujući sposobnosti sa vrši degradaciju kolagena u vaskularnoj bazalnoj membrane, MMP-2 ima veoma važnu ulogu u procesu neovaskularizacije kako pod fiziološkim uslovima tako i u mnogim patološkim procesima a pre svega u širenju tumorskih metastaza (197,198).

MMP-9 (želatinaza B, 92-kDa tip IV kolagenaza)

MMP-9 je prvo otkrivena u neutrofilima 1974. Godine (Sopata i Dancewicz) a sintetiše je niz ćelija: neutrofili, makrofagi, osteoblasti, fibroblasti, epitelne ćelije, keratinociti i T ćelije . MMP-9 može da deluje i kao želatinaza i kao kolagenaza (165,171). Za razliku od MMP-2 koja je eksprimirana u mnogim tkivima, MMP-9 je stalno prisutna samo u neutrofilima gde je deponovana u specijalnim granulama iz kojih se, pod dejstvom različitih stimulusa može osloboditi (169). Za razliku od MMP-2, MMP-9 je najčešće inhibirana od strane TIMP-1 (169, 199).

Pokazano je da MMP-9 može da dovede do oslobađanja aktivne forme endotelijalnog faktora rasta (VEGF), i da na taj način ima veoma važnu ulogu u formiranju novih krvnih sudova tj. neovaskularizaciji (169,201). MMP-2 kao i MMP-9 kao supstrat koristi i neke citokine i hemokine kao što je IL-18 koji pretvara u potentni oblik. Aktivira i IL-1 beta kao i TGF beta (169,201).

Zbirno gledano, želatinaze MMP-2 i MMP-9 imaju veoma važnu ulogu kako u fiziološkim , tako i u brojnim patološkim stanjima. Do sada je opisana njihova povećana ekspresija i aktivnost u brojnim malignim tumorima, pre svega dojke (202), urogenitalnim tumorima, patološkim

stanjima pre svega širenju tumorskog procesa, vaskularnim bolestima, infektivnim bolestima, degenerativnim oboljenjima mozga, zarastanju rana.

Stromelizini (stromelizin 1- MMP-3, stromelizin 2- MMP-10, stromelizin 3- MMP-11) imaju strukturu domena veoma sličnu kolagenazama ali ne cepaju intersticijalni kolagen. MMP-3 i MMP-10 su veoma slični po strukturi i specifičnosti za supstrat dok MMP-11 ima veoma mali afinitet prema proteinima ECM (171). MMP-3 i MMP-10 se sekretuju iz ćelija kao inaktivni pro MMP za razliku od MMP-11 koji intracelularno biva aktiviran od furina tako da se iz ćelija oslobađa kao aktivni enzim (193)

MMP-3 razlaže kolagen tipa II, IV i IX kao i niz proteoglikana, elastin, fibronektin i laminin (171). Takođe dovodi i do aktivacije mnogih citokina i adipokina kao što su alfa-1 proteinaza inhibitor, fibrinogen, IGF-BP3, I-selektin, pro IL-1 beta, pro-TNF alfa. Takođe može aktivirati i druge MMP i to MMP-1, -7, -9. (203). Pokazano je da MMP-3 ima veoma važnu ulogu u nastanku artritisa pre svega regulacijom faktora rasta vezivnog tkiva (204), zatim u nastanku ateroskleroze (205), kao i širenju tumorskih metastaza (206),

MMP-10 pored toga što aktivno učestvuje u remodelovanju ECM, može aktivirati i druge MMP i to MMP-1, -8 i -10 (171). MMP-10 se eksprimira na makrofagima kao i na epitelnim ćelijama kao odgovor na povredu, pa je pokazano da ova MMP igra važnu ulogu u stvaranju ožiljka prilikom procesa zarastanja rana (207). Takođe je pokazana i značajna uloga u nastanku i progresiji periferne okluzivne arterijske bolesti donjih ekstremiteta (208), nastanku prolapsa genitalnih organa (209), respiratornim virusnim infekcijama (210), idiopatskoj plućnoj fibrozi (211) i u progresiji i diseminaciji nekih tumora (212,213).

MMP-11 je prvo identifikovan u stromalnim ćelijama oko invazivnog karcinoma dojke i smatran je kao jedan od stromalnih faktora koji doprinosi širenju epitelnih tumora (214) a danas se zna da njegova poremećena ekspresija ima ulogu u nastanku skvamoznog karcinoma larinksa (215) i skvamoznog oralnog karcinoma (216).

Matrilizini (matrilizin1-MMP-7, matrilizin-2-MMP-26) su enzimi koji nemaju hemopeksinski domen. Glavni supstrati za njihovo delovanje su: kolagen IV, X (samo za MMP-7), želatin, fibrinogen, fibronectin, različiti proteoglikanski molekuli.

MMP-7 ima ulogu u remodelovanju ECM pre svega tkiva onih organa koji su uključeni u reprodukciju (uterus) a takođe ima i važnu ulogu u razvoju i širenju tumorskog procesa kao što je skvamozni oralni karcinom (217).

MMP-26 se još naziva i endometaza i takođe je visoko ekspresivna u tkivu uterusa i placenti ali i u brojnim tumorskim epitelnim ćelijama i to pre svega karcinoma pluća, dojke i prostate (218). Pokazana je i povećana ekspresija MMP-26 kod diseminiranih tumorskih procesa, pre svega kod karcinoma pankreasa (219). Smatra se da je uloga MMP-26 u tumorskim procesima i njihovom širenju pre svega zasnovana na aktivaciji faktora rasta granulocitno-makrofagne kolonije (GM-CSF). (220).

MMP membranskog tipa (MT-1-MMP-14; MT-2-MMP-15; MT-3- MMP-16; MT-4-MMP-17; MT-5-MMP-24; MT-6-MMP-25) se aktiviraju intracelularno i aktivni enzimi se nalaze na površini ćelije.

MT-1 ili MMP-14 je ekspresivna u mnogim ćelijama. Ona se vezuje za TIMP-1 i aktivira MMP-2. Razlaže kolagen tipa I, II, III, proteoglikane hrskavice, fibronectin, laminin, alfa1-proteinazni

inhibitor, alfa-2 makroglobulin. MT-1 Ima veoma važnu ulogu u metabolizmu vezivnog tkiva (221), u procesu ateroskleroze odn rupturu plaka u stanjima akutnog infarkta miokarda (222) kao i u tumorskim procesima (223).

MT-2 ili MMP-15 je eksprimirana u velikim količinama kod carcinoma debelog creva (224).

MT-3 ili MMP-16 takođe može da aktivira pro MMP-2 u aktivnu formu enzima tako da i ovaj enzim ima ulogu u širenju tumorskog procesa (171). U kulturama progenitorskih ćelija kardiomiocita, MMP-16 može da aktivira MMP-2 i MMP-9 i da na taj način limitira proces regeneracije kardiomiocita (225). Povećana ekspresija MMP-16 je nađena i kod pacijenata sa melanomom i predstavljala je loš prognostički znak (226).

MT-4 ili MMP-17 se nalazi vezan za membranu pre svega leukocita gde se smatra da ima ulogu u kativaciji nekih inflamatornih medijatora kao što je TNF-alfa i takođe se smatra da ima ulogu u progresiji tumorskog procesa (227).

MT-5 ili MMP-24 takođe dovodi do aktivacije pro-MMP-2 u MMP-2 i dovodi do progresije tumora pogotovu timora mozga (228). Kako se radi o neuron-specifičnoj MMP pokazano je da ima i važnu ulogu u razvoju dermalne neuro-imune sinapse i da može biti veoma važna u kontroli bola (229).

MT-6 ili MMP-25 je kao i MMP-17 visoko eksprimirana na leukocitima. Smatra se da ima ulogu u multiploj sklerozi (230) kao i, karcinomu kolona (231).

Ostale MMP (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-27, MMP-28).

MMP-12 ili kako se još naziva makrofagna metaloelastaza je neophodna za migraciju makrofaga gde je visoko ekspirmirana. Ima značajnu ulogu u remodelovanju i inflamaciji vazdušnih puteva i analogno tome u astmi gde može biti veoma značajna kao nova terapijska opcija (232). Takođe je pokazana njena uloga i u nastanku CVI gde bi njena supresija takođe mogla biti značajan terapijski cilj (233).

MMP-19 može aktivirati latentnu formu MMP-9 u njen aktivni oblik, a ono što je veoma značajno je da je veoma potentat enzim razgradnje bazalne membrane (171). Ima veoma značajnu ulogu u nastanku idiopatske plućne fibrose (234), fibrose jetre (235), i u degenerativnim artritisima (236), karcinomu debelog creva (224) i karcinomu pluća (237).

MMP-20 ili enamelizin je veoma značajan u razvoju zuba (238).

MMP-21 ima veoma značajnu ulogu u embriogenezi kao i u progresiji tumora (171,239).

MMP-22 nema cisteinsku reziduu u proenzimskom domenu koja se označava kao cisteinski prekidač dok MMP-23 je jedinstvena, jer za razliku od svih ostalih MMP nema cisteinski prekidač u propeptidnom molekulu tako da je hemopeksinski domen zamnjen cistein-bogatim immunoglobulin-like domenom (171). Ova MMP takođe ima ulogu u procesima invazije odn širenja carcinoma dojke (240).

MMP-27 je vezana za ekspresiju u ćelijama endometrioze kako ovarijuma tako i peritoneuma (241) a smatra se da može imati ulogu i u rayvoju carcinoma dojke (242).

MMP-28 ili epilizin pokazuje najveću ekspresiju u epidermisu gde se smatra da ima ulogu u njegovoj reparaciji (171). Ima ulogu i u disfunkciji miokarda nakon infarkta miokarda (243),

karcinomu debelog creva (244) kao i u degenerativnom osteoartritisu i reumatoidnom artritisu (245).

1.3.2. MMP-aktivacija i regulacija

Proteolitička aktivnost matriksnih metaloproteinaza je regulisana na tri nivoa: na nivou transkripcije gena, na nivou aktivacije latentnih enzima i na nivou inhibicije od strane njihovih tkivnih inhibitora.

Ekspresija gena za MMP je uglavnom regulisana na nivou transkripcije, mada se danas smatra da i neki post-transkripcioni mehanizmi, kao i epigenetski mehanizmi regulacije mogu imati važnu ulogu u kontroli ekspresije MMP (246). Pokazano je da različiti faktori, kao što su inflamatorni citokini, faktori rasta i različiti hormoni mogu uticati na povećanu ili smanjenu ekspresiju gena za MMP. Tako, inflamatorni citokini: IL-1, IL-6, TNF alfa dovode do povećane ekspresije MMP (247,248,249). Povećana ekspresija vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) dovodi do povećane ekspresije gena za MMP-2 (250). U plakovima karotidnih arterija epidermalni factor rasta (EGF) dovodi do povećane MMP-1 i MMP-9 aktivnosti (251). Prostaglandin E2 (PGE2), jedna bioaktivna lipidna molekula dovodi do ushodne regulacije transkripcije gena za MMP-1, MMP-2, MMP-9 i MT1-MMP (252,253).

Sa druge strane, kortikosteroide, retinoična kiselina, heparin i IL-4 mogu imati inhibitorski efekat na ekspresiju MMP (254).

Na ekspresiju gena za MMP utiču i interakcije između različitih vrsta ćelija ali i između ćelija i strukturnih i funkcionalnih proteina ECM (255,256).

Sledeći nivo regulacije aktivnosti MMP jeste na nivou aktivacije latentnih enzima. Matriksne metaloproteinaze se sintetišu kao pre-proMMP a zatim nakon otklanjanja signalnog peptida nastaje pro MMP. Većina pro-MMP se sekretuje u ćeliji a aktivira se ili intracelularno, ili na površini same ćelije ili ekstracelularno (257).

Intracelularno se aktiviraju MMP-11 i MT1-MMP i to procesom proteolitičke aktivacije i to enzimima celularnim endopeptidazama kao što je furin (180). Intracelularno se i pod dejtvom oksidativnog stresa mogu aktivirati kolagenaze a procesom fosforilacije dolazi do aktivacije MMP-2 (257).

Na površini ćelije dolazi do aktivacije MMP-2 i MMP-9 i to stvaranjem kompleksa sa TIMP. Cistein iz cisteinskog prekidača ustvari drži ove pro-MMP oblike još uvek inaktivnim. Za pro-MMP se vezuju zatim TIMP i to TIMP-2 i TIMP-4 za pro-MMP-2 a TIMP-1 i TIMP-3 za pro-MMP-9 i ovo stvaranje kompleksa sa TIMP sa označava kao neinhibitorsko stvaranje kompleksa. TIMP se vezuju svojim C terminalnim domenima a njihovi N terminalni domeni ostaju slobodni i za njih se vezuju druge MMP kao što je MT1-MMP koja dovodi do cepanja prodomena i nastajanja aktivne forme MMP (180).

Na ekstracelularnom nivou proteolitička aktivnost MMP je regulisana od strane različitih enzima kao što su fibrinolitička proteaza, plasmin, tripsin kao i druge MMP (257).

Treći nivo regulacije aktivnosti MMP jeste na nivou njihovih tkivnih inhibitora. TIMP predstavljaju endogene proteinske regulatore koji su sastavljeni od 184-194 amino kiselina i ustvari

predstavljaju porodicu od četiri različita molekula- TIMP 1-4. (180). TIMP imaju veoma važnu ulogu ne samo u aktivaciji MMP već i u njihovom uklanjanju iz ekstracelularnog matriksa. Ovi molekuli su sastavljene iz dva domena: N domena koji je inhibitorni i koji se vezuje za aktivno mesto MMP i od C domena kojim može reagovati sa hemopeksinskim domenom nekih MMP (172). U fiziološkim uslovima TIMP su eksprimirani u različitim tkivima: u bubregu, mozgu, jetri, debelom crevu, koži, srcu, dojci i jajnicima.

TIMP-1 inhibira sve tipove MMP, izuzev MMP-14, MMP-16, MMP-18, MMP-19, MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP a najveći afinitet vezivanja ima za pro-MMP-9 i MMP-9 (172,246).

TIMP-2 inhibira MMP-2, MMP-9, MMP-14 i MT1-MMP. TIMP-3 inhibira MMP-2 i MMP-9 a TIMP-4 inhibira MMP-2, MMP-26 i MT1-MMP (172).

Na ekspresije gena za TIMP utiču različiti faktori prisutni u ECM, kao što su inflamatorni citokini, faktori rasta i dr.

Vrlo je važno da na aktivaciju MMP in vivo utiču i različita fiziološka stanja kao što su hipoksija i hiperglikemija.

Kako je process regulacije aktivnosti MMP vrlo složen i odvija se na više nivoa (na nivou transkripcije gena, aktivacije zimogena, inhibicije od strane TIMP, posttranslacionim nivou) vrlo je važno znati regulatorne faktore koji deluju na svakom nivou ove regulacije i u svakom tkivu kako bi se razvila osnova za otkrivanje novih terapijskih pristupa koja bi ispravljala patofiziološke mehanizme koje leže u osnovi mnogih bolesti.

1.4. MMP i Diabetes mellitus

Uloga matriksnih metaloproteinaza u razvoju šećerne bolesti kao i njenih komplikacija je sve više predmet brojnih ispitivanja. Hiperglikemija, na različite načine dovodi do poremećene ekspresije i aktivnosti MMP a sa druge strane sve je više dokaza da MMP (posebno MMP-2, MMP-9, MMP-11, MMP-13 i TIMP-4) imaju važnu ulogu u nastanku vaskularnih komplikacija DM.

U in vitro studijama, u hiperglikemijskim kulturama endotelnih ćelija pokazano je da hiperglikemija dovodi do povećane ekspresije MMP-1, MMP-2 i MMP-9 (258). Isto tako je pokazano i da je duže izlaganje hiperglikemiji bilo povezano sa povećanom sintezom i latentnih i aktivnih oblika MMP-2 i MMP-9 ali samo u endotelnim ćelijama ali ne i u makrofazima i glatko mišićnim ćelijama (259).

Hiperglikemija različitim mehanizmima povećava oksidativni stress i posledica toga jeste povećana ekspresija i povećana aktivnost MMP-9 u vaskularnim endotelnim ćelijama (260).

I rezultati in vivo studija su pokazali povećanu koncentraciju u plazmi MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 kod pacijenata sa DM u odnosu na zdrave kontrole (261). Takođe je u urinu pacijenata sa T1DM i T2DM registrovana povećana koncentracija i aktivnost MMP-2 i MMP-9 pogotovu kod pacijenata sa oboljenjem bubrega. (262). Potvrđene su i povišene koncentracije MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u plazmi osoba sa DM i akutnim koronarnim sindromom (263).

Dobro je poznata uloga MMP u nastanku i destabilizaciji plaka u procesu ateroskleroze, Nestabilnost i pucanje plaka je povezano sa povećanom aktivnošću MMP-9 koja je u plaku poreklom iz makrofaga i deluje na kolagen I, III, IV, V, XI (264).

Uloga MMP u nastanku i progresiji mikrovaskularnih komplikacija DM je sve više u fokusu.

1.4.1. MMP i dijabetesna retinopatija

Brojne studije do sada su pokazale da MMP imaju veoma važnu ulogu ne samo u nastanku, nego i u progresiji dijabetesne retinopatije. Od svih MMP, pokazano je da najvažniju ulogu u razvoju DR imaju MMP-2 i MMP-9 i da njihova povećana ekspresija i aktivacija u retini različitim mehanizmima preko oksidativnog stresa, mitohondrijalne destrukcije, inflamacije i angiogeneze značajno doprinosi patogenezi DR (265).

Povećana ekspresija MMP-2 i MMP-9 u DR je pokazana kako u in vitro tako i u in vivo studijama (266,267,268,269). To povećanje aktivnosti MMP je pokazano još u ranim fazama dijabetesne retinopatije, gde MMP igraju veoma važnu ulogu u proteolitičkoj razgradnji proteina tzv tight junction proteina (pre svega ocludina), narušavanju krvno-retinalne barijere i povećanoj permeabilnosti kapilara (270).

Pokazano je da MMP-2 ima veoma snažno apoptogeno dejstvo i da u značajnoj meri dovodi do apoptoze pericita, još jednog veoma važnog događaja u ranoj fazi DR (266,271). MMP-9 takođe učestvuje u apoptozi pericita (267,272).

Kako je oksidativni stress jedan od najvažnijih događaja u nastanku mikrovaskularnih komplikacija DM pa i DR, smatra se da oksidativni stress izazvan hiperglikemijom, ustvari dovodi do aktivacije MMP. Povećana produkcija ROS dovodi do povećane ekspresije MMP-2 i MMP-9 (265,271).

Kako je mitohondrijalna disfunkcija veoma važan mehanizam u nastanku apoptoze ćelija pokazano je da je oštećenje mitohondrija retine takođe modifikovano delovanjem MMP, pre svega MMP-2 i MMP-9. Aktivirane MMP se smatra da dovode do proteolize mitohondrijalnih membrana dovodeći do poremećene permeabilnosti mitohondrijalne membrane, njenom kolapsu i posledično uzrokovanoj apoptozi (265).

Smatra se da MMP imaju i proinflamatornu ulogu u razvoju DR, što je pokazano i na animalnim modelima (273,274). Postulirano je da MMP omogućavaju penetraciju inflamatornih ćelija i to razlaganjem krvno-retinalne barijere (275). Inflamatorne ćelije, pre svega leukociti oslobađaju MMP koje vrše razlaganje različitih proteina uključujući i proteine bazalne membrane kao što su fibronectin, laminin i heparan sulfat. (265).

Matriksne metaloproteinaze imaju i veoma važnu ulogu u procesu poremećene angiogeneze i neovaskularizacije u PDR. Povećana koncentracija VEGF kako u retini, tako i u sočivu je praćena i povećanom ekspresijom MMP-2 i MMP-9 (276,277).

Povećana aktivnost MMP-2 i MMP-9 u patogenezi PDR jeste proizvod povećane produkcije slobodnih radikala (ROS). MAPK i angiogenih faktora (pre svega VEGF) sa jedne strane i smanjene proizvodnje antioksidanasa i antiangiogenih faktora sa druge strane, što otvara vrata novim terapijskim pristupima.

Ukupno gledana, uloga MMP-2 i MMP-9 u patogenezi DR je vrlo značajna i zasnovana na njihovom proapoptotičnom, proinflamatornom i proangiogenom delovanju i rana blokada MMP bi značajno mogla da dovede do stabilizacije oksidativnog stresa, apoptoze i inflamacije i do prevencije nastanka i progresije dijabetesne retinopatije.

1.4.2. MMP i dijabetesna nefropatija

Uloga MMP u razvoju i progresiji dijabetesne nefropatije je sve više predmet brojnih ispitivanja. Kako je osnovna uloga MMP remodelovanje ekstracelularnog matriksa, a proliferacija mezangijuma predstavlja jednu od najznačajnijih karakteristika u patogenezi DN, postulirano je da bi MMP mogle imati važnu ulogu u nastanku dijabetesne nefropatije. Sem remodelovanja ECM, smatra se da MMP imaju veoma značajnu ulogu u oslobađanju i aktivaciji različitih faktora rasta kao što su, TNF- alfa, TGF- β 1, IGF (insulin like growth factor) i heparin-vezujući epidermalni factor rasta koji učestvuju u drugim patohenijskim promenama kao što su renalna hipertrofija, proliferacija ćelija tubularnog epitela, i na kraju fibroza bubrega koja vodi terminalnoj bolesti bubrega (278,279,280,281).

Eksperimentalne studije su pokazale da je ravnoteža između MMP i njihovih inhibitora narušena u DN ali su dale i kontradiktorne rezultate. Najviše proučavane su MMP-2 i MMP-9 i njihova uloga u razvoju DKD.

Početna povećana ekspresija MMP-2 i povećana enzimsko aktivnost je pokazana u ranim fazama dijabetesne nefropatije (282). Smanjena ekspresija gena za MMP-2 i njena smanjena enzimsko aktivnost nakon početne povećane ekspresije je pokazana kod eksperimentalnih modela dijabetesnih pacova (283,284). Smanjena glomerularna ekspresija MMP-2 je bila uzrok nastanka glomeruloskleroze u kasnijim fazama DN (285).

Sa druge strane neke studije su pokazale povećanu ekspresiju gena za MMP-2 kao i povećanu enzimsku aktivnost i to u fazi proliferacije mezangijuma (286). Povećana ekspresija MMP-2 kao i povećana aktivnost uzrokovana AGE I angiotenzinom II je takođe pokazana na animalnom modelu (287). Jedna od studija na eksperimentalnim životinjama je pokazala povećanu ekspresiju i aktivnost MMP-2 koja se kod jedne vrste miševa održavala na visokom nivou a kod drugih značajno smanjila iz čega je izvučen zaključak da MMP-2 može imati ulogu u genetskoj suseptibilnosti za razvoj DN (288).

Što se tiče genske i proteinske ekspresije MMP-9 pokazano je da ona može biti povećana (289), ili naizmenično povećana pa smanjena u zavisnosti od trajanja hiperglikemije (290). Neke studije nisu pokazale značajne razlike u ekspresiji MMP-2 i MMP-9 u eksperimentalnim životinjama sa dijabetesom u odnosu na zdrave (291).

Pokazana je i povećana urinarna enzimsko aktivnost MMP-9 i to pre nastanka albuminurije (292), a pokazana je i povećana urinarna ekskrecija MMP-9 koja je pozitivno korelirala sa albuminurijom u dijabetesnih pacova (293).

Eksperimentalne studije su pokazale da različiti inflamatorni medijatori mogu uticati na ekspresiju MMP, kao što je pokazano da TGF-beta dovodi do povećane ekspresije MMP-2 (294), endotelin 2 do smanjene ekspresije MMP-2 (295), VEGF dovodi do smanjene ekspresije MMP-2 u odmaklim fazama DN (296), a IL-20 dovodi do povećane ekspresije MMP-9 (297).

U humanim studijama je pokazano da je koncentracija i aktivnost MMP-2 i MMP-9 u urinu povišena i kod osoba sa T1DM i T2DM (298,299,300). Ovo povećanje aktivnosti u MMP se javlja i kod normoalbuminuričnih pacijenata (301). Druge studije su dale kontradiktorne rezultate, gde je pokazano da je koncentracija MMP-2, TIMP-1 i TIMP-2 snižena u plazmi pacijenata sa DM (302).

Što se tiče ekspresije MMP u bubregu takođe su dobijeni kontradiktorni rezultati. Neke studije su pokazale povećanu ekspresiju MMP-2 u tubulima bubrega gde je pokazano da olakšava epitelno-

mezenhimalnu tranziciju (303) kao i u glomerulima bubrega (304). Takođe je pokazana samo blago povećana MMP-2 i MMP-9 u glomerulima i TIMP-2 u mezangijumu (305). Povećana ekspresija MT-5 MMP u bubrezima dovodi do aktivacije i MMP-2 što takođe može biti razlog povećane ekspresije MMP-2 u bubrezima (306).

Neke su opet studije pokazale značajno smanjenu ekspresiju gena za MMP-2 u glomerulu bubrega kod osoba sa DN (307).

Povećana ekspresija MMP-9 u mezangijumu navodi na zaključak da je uloga ove MMP u meznigijalnoj ekspanziji značajna (308). Povećana ekspresija MMP-9 u glomerulima kao i povećane koncentracije MMP-9 u urinu pokazna je kod osoba pre nastanka albuminurije (309). Takođe je pokazana i korelacija između albuminurije i povećane koncentracije i aktivnosti MMP-9 u urinu i plazmi osoba sa T2DM (310,311). Jedna studija je pokazala da koncentracija MMP-9 u plazmi značajno korelira sa nalazom aberantnih podocita u urinu (312). Rezultati ovih studija ustvari nameću urinarni MMP-9 kao značajan marker za dijagnozu ranog oštećenja bubrega u DN.

Rezultati svih in vivo i in vitro studija još uvek su kontradiktorni i nedovoljno razjašnjeni kao i tačni mehanizmi kojima hiperglikemija dovodi do disregulacije MMP i njihovih TIMP.

Hiperglikemija i AGE dovode do hiposije, povećane produkcije ROS, aktivacije PKC signalnog puta što sve vodi disregulaciji i poremećenoj ekspresiji MMP i njihovih TIMP (313).

1.4.3. MMP i dijabetesna polineuropatija

Uloga MMP u nastanku dijabetesne polineuropatije je najmanje razjašnjena u odnosu na njihovu ulogu u nastanku drugih vaskularnih komplikacija DM.

Još u ranoj fazi dijabetesne polineuropatije su zapažene strukturne promene na perifernim nervima koje su pre svega uslovljene povećanim deponovanjem kolagena IV u endoneuriumu i kolagena IV i kolagena tipa V u perineurijumu, zatim dupliciranjem bazalne lamine oko endoneurialnih kapilarai zadebljanje bazalne lamine epineuraknih ćelija (314). Kao MMP-2 i MMP-9 imaju ključnu ulogu u remodelovanju ECM delovanju na kolegen jasno je postulirano da bi ove MMP mogle imati ulogu u nastanku DPN.

Poremećena aksonska regeneracija je pokazana kako u eksperimentalnoj tako i u kliničkoj dijabetesnoj polineuropatiji. Nemogućnost regeneracije aksona je bila obrnuto proporcionalna dužini trajanja dijabetesa (315).

MMP-2 i MMP-9 imaju niz veoma značajnih uloga kada je oštećenje perifernog nerva u pitanju. One imaju ulogu u narušavanju krvno-nerve barijere (316), regrutovanju makrofaga (317), proliferaciji i migraciji Švanovih ćelija (318) i mijelinskoj degradaciji (317.). U uslovima hiperglikemije dolazi do povećane glikacije proteina ekstracelularnog matriksa, povećanog stvaranja AGE što vodi smanjenoj degradaciji ECM a smanjena degradacija ECM dovodi do smanjene aktivnosti MMP. Smanjena proteolitička aktivnost sa druge strane može dovesti do nakupljanja proteina u bazalnoj membrani. Svi ovi mehanizmi zajedno dovode do disfunkcije MMP u perifernim nervima koja vodi degeneraciji aksona i njegovoj poremećenoj regeneraciji.

Dosadašnje studije su dale kontradiktorne rezultate što se tiče ekspresije MMP-2 i MMP-9 u dijabetesnoj polineuropatiji. Tako su neke studije pokazale smanjenu ekspresiju MMP-2 u

ishijadičnom nervu eksperimentalnih životinja sa dijabetesom. (319) a neke povećanu ekspresiju i MMP-2 i MMP-9 (320) a neke samo povećanu ekspresiju MMP-9 uz smanjenu ekspresiju MMP-2 (321)

Takođe je pokazano da u nastanku neuropatskog bola MMP-2 i MMP-9 imaju različite uloge i da u prvoj fazi dolazi do brze i značajne povećane ekspresije MMP-9 pre svega u ganglijama dorzalnih korenova kičmene moždine dok je MMP-2 ekspresija povećana u kasnijoj fazi i to uglavnom u astricitima I da je odgovorna za kasniju fazu održavanja neuropatskog bola (322).

Pokazano je da sistemska terapija alfalipoinom dovodi do smanjenja MMP-9 aktivnosti i normalizovanja MMP-2 što indirektno govori da MMP-9 može biti veoma značajan terapijski target (321).

Kod pacijenata sa tipom I DM pokazano je da su nivoi MMP-9 u plazmi korelirali sa stepenom neuropatskog oštećenja pre svega vezanog za poremećen osećaj za toplotu i poremećen vibratorni senzitivitet što MMP-9 postulira i kao mogući biomarker subkliničke DPN (323).

U brojnim studijama pokazana je i uloga MMP u zarastanju rana kod dijabetičara koje nastaju usled prisustva polineuropatije, poremećene cirkulacije i ne retko prisustva infekcije. MMP u ovom procesu imaju nekoliko uloga: prvo učestvuju u otklanjanju devitaliziranog tkiva a zatim učestvuju i procesima reparacije kao što su angiogeneza, kontrakcija matriksa rane, migracija fibroblasta i keratinocita i epitelizacija (324). Na eksperimentalnim modelima pokazano je da je zarastanje rana u dijabetesu prolongirano akumulacijom makrofaga i povišenim nivoima inflamatornih citokina sa jedne strane a smanjenim nivom faktora rasta sa druge strane (325).

Od citokina najznačajniji je IL-1 β za koji je pokazano da mehanizmom pozitivne povratne sprege održava stalnu inflamaciju u rani što doprinosi usporenom zarastanju (325). Povećana koncentracija ovog inflamatornog citokina može da dovede do povećane sekrecije i aktivnosti MMP-2 i MMP-9 što je i dokazano na animalnom modelu (324). Takođe je pokazano da je nivo MMP veći u hroničnim ranama kao što je dijabetesni ulkus nego u akutnim (326) a ako se uzme u obzir i povećana produkcija zbog povišenih nivoa IL-1 β onda je evidentno da je povećana degradacija ECM jedan od glavnih razloga neadekvatnog i usporenog zarastanja rana. Takođe stavlja i IL-1 β u red novih terapijskih ciljeva (324).

Pokazano je i da su koncentracije MMP-2 i MMP-3 ali ne MMP-9 povišene u plazmi osoba sa DM i hroničnom ranom (327).

Neke druge studije su pokazale da je nivo aktivnog oblika MMP-9 u hroničnim dijabetesnim ulkusima povećan (328) a takođe je pokazano da MMP-9 može biti limitirajući factor u procesu zarastanja (329,330).

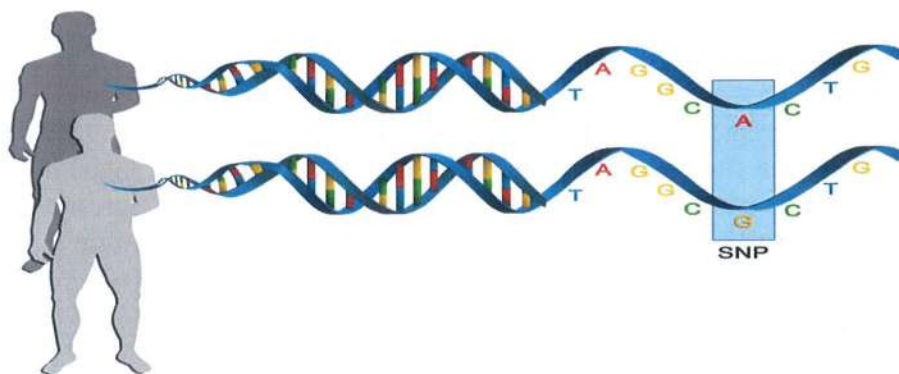
1.5. Polimorfizmi gena

Polimorfizam gena predstavlja normalnu varijaciju u nukleotidnom sastavu DNK koja se sreće u populaciji sa učestalošću većom od 1 %. Za gen kažemo da je polimorfan ukoliko postoje bar dve njegove varijante (alela) s tim što učestalost ređeg alela mora biti veća od 1 %, a ukoliko je niža smatra se mutacijom (331). Polimorfizmi mogu biti funkcionalni ili ne u zavisnosti od toga da li ostavljaju posledice na nivo ekspresije, funkciju ili stabilnost kodirajućeg proteina.

Polimorfizmi gena mogu biti:

1. polimorfizmi pojedinačnog nukleotida (single nucleotide polymorphism)- SNP (slika 4.)
2. deleciono-inserciono (del/ins) polimorfizam
3. varijabilan broj tandemskih ponovaka (variable number of tandem repeats)- VNTR

Najčešći su SNP polimorfizmi i smatra se da ih u humanom genomu ima oko 11 miliona a nastaju zamenom jedne baze drugom unutar DNK sekvence (332). Mogu se javiti u kodirajućem i u nekodirajućem segmentu DNK.(333).Fig 4 U kodirajućem segmentu su znatno ređi i ne moraju uvek dovesti do promene sekvence amino kiselina u proteinu. Za razliku od njih, polimorfizmi u nekodirajućem delu DNK su znatno češći, i mogu uticati na vezivanje transkripcionih faktora, degradaciju i stabilnost RNK. Kada je SNP u kodirajućem region (egzonu) ili intronu (nekodirajućem region) ima predznak “=” a kada su unutar promotorskog regiona imaju predznak “-”.



Slika 4. Polimorfizam pojedinačnog nukleotida.

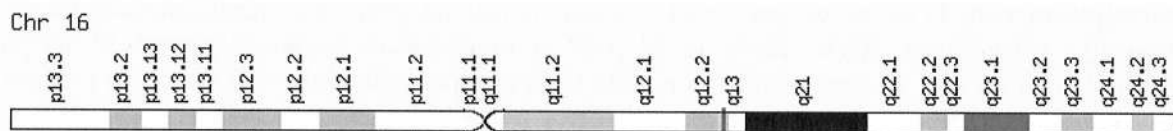
Smatra se da je samo 10 % svih SNP funkcionalno ali bez obzira na to što imaju veoma mali uticaj na regulaciju gena i aktivnost proteina, veoma su značajni za različitosti unutar jedne populacije,

pre svega u osetljivosti na razvoj određene bolesti ili na individualni odgovor na neki terapijski tretman. (334).

Ispitivanje polimorfizama gena se vrši pomoću asocijacionih studija gde se ispituje učestalost pojedinih genskih varijanti u grupi obolelih i poredi sa polimorfizmima zdravih pripadnika iste etničke populacije. Oni polimorfizmi koji se ispituju a koji se značajno češće javljaju kod obolelih nego u zdravoj populaciji se dovode u vezu sa prisustvom određene bolesti. Broj ispitivanih polimorfizama eksponencijalno raste kao i broj onih koji imaju značajnu ulogu u nastanku pojedinih bolesti.

1.5.1. Polimorfizmi gena za MMP-2 i MMP-9

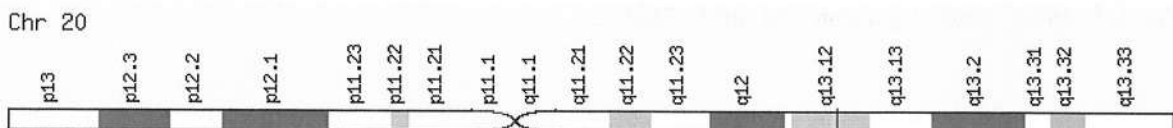
Matriksna metaloproteinaza 2 je kodirana genom za MMP-2 koji se nalazi na dugom kraku hromozoma 16 (16q13) (slika5). Unutar MMP-2 gena do sada je opisano 24 SNP varijanti od kojih je šest unutar promotora (335).



Slika 5. Shematski izgled hromozoma 16 i položaj MMP-2 gena (dostupna na www.genecards.org)

Od SNP varijanti u promotoru najvažija su dve varijante i to -1306 C>T i -735C>T gde je u oba slučaja došlo do zamene citozina (C) timinom (T). U oba slučaja ,pošto dolazi do ukidanja mesta SpI za koji se vezuju transkripcioni faktori dolazi do smanjenja genske ekspresije pa tako u slučaju -1306 C>T SNP , prisustvo C alela dovodi do 1.6x veće genske ekspresije u poredjenju sa T alelom (335).

Matriksna metaloproteinaza 9 je kodirana genom za MMP-9 koji se nalazi na hromozomu 20 u regionu 20q11.2-q13.1 (slika6)..



Slika 6. Shematski izgled hromozoma 20 i položaj MMP-9 gena (dostupna na www.genecards.org)

Od nekoliko opisanih SNP varijanti u promotorskom delu gena za MMP-9, najvažnija je varijanta -1562 C>T za koju je pokazano da utiče na proces transkripcije. Utvrđeno je da prisustvo T alela dovodi do značajno veće genske ekspresije (336).

1.5.2. Polimorfizmi gena za MMP-2 i MMP-9 i dijabetesna retinopatija

MMP-2 i MMP-9 imaju veoma važnu ulogu u nastanku dijabetesne retinopatije. Povezanost najčešćih SNP varijanti gena za MMP-2 i MMP-9 i dijabetesne retinopatije je ispitivana u nekoliko studija koje su dale kontradiktorne rezultate.

Tako je u jednoj studiji ispitivana učestalost MMP-2 varijante -1306C>T i nastanak dijabetesne retinopatije kod pacijenata sa T2DM, pokazano je da nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji alela i genotipova između pacijenata sa T2DM i zdravih kontrola. Takođe je utvrđeno da nosioci CC genotipa imaju dva puta veći rizik za nastanak DR. (337).

Ispitivana je i moguća povezanost najvažnijih SNP u MMP-2 i MMP-9 genu sa proliferativnom dijabetesnom retinopatijom. Ispitivano je sedam polimorfizama MMP-2 i MMP-9 gena, između ostalih MMP-2-1306C>T kao i MMP-9-1562C>T i pokazano je da nije bilo značajne razlike u distribuciji genotipova i alela između pacijenata sa DR i zdravih kontrola. Koncentracije MMP-2 u plazmi su bile značajno više u pacijenata sa PDR i to onih koji su bili nosioci 1306 CC ili -1306 CT genotipa (338).

U drugoj studiji sa proliferativnom DR kod Pima Indijanaca sa tipom 2 DM pokazano je da funkcionalni SNP-1562C>T u promotou gena za MMP-9 može predstavljati značajan factor rizika za nastanak PDR s obzirom na povećanu produkciju MMP-9 iz visoko eksprimiranih T alela (339).

1.5.3. Polimorfizmi gena za MMP-2 i MMP-9 i dijabetesna nefropatija

MMP-2 i MMP-9 različitim mehanizmima učestvuju u nastanku i progresiji dijabetesne nefropatije.

Do sada je utvrđen mali broj studija koje se odnose na ispitivanje genskih varijanti MMP-2 i MMP-9 u dijabetesnoj nefropatiji.

Samo jedna studija se bavila značajem -1306C>T varijante u MMP-2 genu u predikciji rizika za nastanak DN. Pokazano je da su nosioci C alela bili osetljiviji na razvoj i progresiju DN tj. da prisustvo ovog alela predstavlja veću verovatnoću kako za nastanak tako i za progresiju već postojeće DN (340).

U studiji na kineskoj populaciji pokazano je da je funkcionalni SNP MMP-9 -1562C>T bio udružen sa nastankom dijabetesne nefropatije, s tim što je prisustvo T alela bilo protektivni factor a prisustvo C alela faktor rizika za nastanak DN (341).

Isti rezultat je dobijen u egipatskoj studiji kod pacijenata sa T2DM gde je takođe pokazano da je genska varijanta MMP-9 -1562C>T bila udružena sa DN i da je T alel predstavljao protektivni factor u nastanku DN(342).

1.5.4. Polimorfizmi gena za MMP-2 i MMP-9 i dijabetesna polineuropatija

Jedina studija koja je do sada urađena jeste studija koja je ispitivala MMP-9 -1562C>T SNP , da li je ovaj SNP povezan sa nastankom dijabetesnog ulkusa. Pokazano je da je ova genska varijanta u promotorskom delu gena za MMP-9 dovela do značajnog povećanja transkripcije MMP-9 i da postoji značajna povezanost ovog SNP i nastanka dijabetesnog ulkusa. Takođe je pokazano da prisustvo T alela može značajno promovisati degradaciju ekstracelularnog matriksa (343).

Jedina meta analiza koja se odnosi na SNP gena za MMP-2 i MMP-9 i mikrovaskularne komplikacije DM je studija koja je obuhvatila 446 pacijenata sa T2DM i nekom od mikrovaskularnih komplikacija DM i 496 zdravih kontrola. Ispitivana je korelacija između MMP-9 -1562C>T SNP i rizika za nastanak mikrovaskularnih komplikacija DM i jedino je potvrđeno da prisustvo T alela može značajno smanjiti rizik za nastanak DN (344).

2. Ciljevi istraživanja

Obzirom da su polimorfizmi gena matriksnih metaloproteinaza nedovoljno ispitivani u vezi sa mikrovaskularnim komplikacijama šećerne bolesti cilj našeg istraživanja je bio:

1. Da se utvrdi učestalost genske varijante MMP-2 -1306C>T i genske varijante MMP-9-1562C>T u grupi osoba sa T2DM i zdravoj populaciji kao i da li postoji razlika između ove dve grupe
2. Da se utvrdi da li postoji povezanost navedenih polimorfizama sa prisustvom dijabetesne retinopatije
3. Da se utvrdi da li postoji povezanost navedenih polimorfizama sa prisustvom dijabetesne nefropatije
4. Da se utvrdi da li postoji povezanost navedenih polimorfizama sa prisustvom dijabetesne polineuropatije.

3. Materijal i metode

3.1. Dizajn studije

Ovo istraživanje sprovedeno je po tipu studije preseka u Kliničko bolničkom centru "Zvezdara", na Kliničkom odeljenju za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma. u periodu od 2013-2018. godine. Genetske studije su radjene na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta KBC Zvezdara i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu.

3.2 Ispitanici

U studiju je bilo uključeno 153 pacijenta, od kojih 97 sa T2DM i 56 zdravih kontrola. Grupa ispitanika sa T2DM je ili bila hospitalizovana na Kliničkom odeljenju za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma. KBC Zvezdara ili u Dnevnoj bolnici istog odeljenja. Svi ispitanici su pre izvođenja bilo kakvih procedura potpisali Pisani pristanak za učešće u studiji.

Svi podaci o dužini trajanja šećerne bolesti, terapiji antidijabetika na kojoj se nalaze (oralni antidijabetici ili insulin ili kombinovana terapija), drugim konkomitatnim oboljenjima i pušačkom stažu dobijeni su na osnovu dostupne medicinske dokumentacije i na osnovu datih anamnestičkih podataka.

3.3.1 Antropometrijska merenja

U opštem fizikalnom pregledu pored svih stavki koje internistički pregled zahteva, urađena su i antropometrijska merenja, Svim pacijentima je izmerena telesna visina (izražena u m), telesna masa (izražena u kg) i izračunat indeks telesne mase (ITM) kao količnik telesne mase i kvadrata telesne visine po sledećoj formuli:

$$\text{ITM (kg/m}^2\text{)} = \text{telesna masa (kg)} / \text{telesna visina (m}^2\text{)}$$

Takođe je svim pacijentima izmeren i arterijski pritisak, nakon deset minuta odmora, u tri navrata s tim što je uzeta srednja vrednost za aktuelnu. Arterijski pritisak je meren sfigmomanometrom na brahijalnoj arteriji na obe ruke i ona ruka na kojoj je bio izmeren veći pritisak je uzimana za dominantnu na kojoj su zatim rađena druga dva merenja.

3.3.2 Laboratorijska ispitivanja

Svim pacijentima je u jutarnjim časovima, između 08 i 09h, nakon 12h od poslednjeg obroka uzeta krv za standardne laboratorijske analize. Od metaboličkih varijabli praćene su sledeće: (u zagradama su merne jedinice, tj. odredjen nivo datog parametra): glikemija našte (mmol/l), ukupni holesterol (mmol/l), HDL holesterol (mmol/l), LDL holesterol (mmol/l), trigliceridi (mmol/l), kreatinin (umol/l), urea (mmol/l), određivanje albuminurije u 24h urinu Sve ove analize su urađene standardnim laboratorijskim tehnikama na Cobas 501 (Rosche Diagnostics) analizatoru.

Analiza glikoziliranog hemoglobina (HbA1c) kao parametra retrogradne metaboličke kontrole DM je rađena fotometrijskom metodom nakon inhibicije lateks aglutinacije na Cobas 501 (Rosche Diagnostics) analizatoru

3.4 Procena prisustva mikrovaskularnih komplikacija diabetes mellitusa

Procena prisustva mikrovaskularnih komplikacija i to dijabetesne retinopatije, nefropatije i polineuropatije je vršena kod svih ispitanika sa T2DM. Kod pacijenata koji su već imali potvrđeno prisustvo neke od ovih komplikacija (na osnovu postojeće medicinske dokumentacije: specijalističkih odn. subspecijalističkih izveštaja i otpusnih lista iz referentnih ustanova) vršena je reevaluacija postojanja date komplikacije a za pacijente koji nisu imali potvrđenu ni jednu od navedenih komplikacija pristupilo se detaljnim pregledima radi potvrđivanja prisustva ili odsustva iste. Detaljan oftalmološki pregled sa fundoskopijom nadležnih oftalmologa naše ustanove je rađen kod svih pacijenata i na osnovu promena na očnom dnu pacijenti su bili svrstani u tri kategorije: 1. pacijenti bez promena na očnom dnu 2. pacijenti sa neproliferativnom dijabetesnom retinopatijom 3. pacijenti sa proliferativnom retinopatijom.

Dijabetesna nefropatija je potvrđena povećanom ekskrecijom albumina u urinu (cut off vrednost je bila 30 mg/24h) kod osoba sa arterijskom hipertenzijom i dijabetesnom retinopatijom.

Detaljnim pregledom nefrologa i ispitivanjem senzacija za bol (pin prick test), dodir (test monofilamentom), refleksa uz postojanje tipičnih simptoma za dijabetesnu neuropatiju postavljena je dijagnoza iste.

3.5 Genetičke analize- Genotipizacija polimorfizama za MMP-2 i MMP-9

Sve genetske analize su rađene na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Svim pacijentima je zajedno sa vađenjem krvi za ostale laboratorijske analize uzeto i 5 ml pune krvi (uz antikoagulans EDTA), koja je čuvana na temperaturi od -20 C a zatim je korišćena za izolaciju genomske DNK metodom izolovanja kojom se ekstrahuju ćelijski proteini, RNK i drugi makromolekuli nakon čega se DNK taloži u apsolutnom alkoholu.

Za detekciju MMP-2 i MMP-9 genskih varijanti korišćena je PCR-RFLP metoda. Promotorski region gena MMP-2 koji sadrži polimorfizam odn gensku varijantu -1306C>T umnožen je koristeći prajmera: napred 5'-CTTCCTAGGCTGGTCCTTACTGA-3' i unazad 5'-CTGAGACCTGAAGAGCTAAAGAGCT-3'. Promotorski region gena MMP-9 koji sadrži gensku varijantu -1506C>T je umnožen koristeći prajmer: napred 5'-GCCTGGCACATAGTAGGCC-3' i unazad 5'-CTTCCTAGCCAGCCGGCATC-3'.

Amplifikacija oba regiona je rađena metodom PCR (metoda lančane reakcije polimerizacije-DNK) po sledećem programu: denaturacija PCR reakcione smeše i to 3 ciklusa na 98°C u trajanju od 5 minuta, zatim 5 minuta na 55°C, 5 minuta na 95°C, 35 ciklusa od 30 sekundi na 95°C, 45 sekundi na 58°C, 45 sekundi na 72°C i završnim produžetkom od 10 minuta na 72°C.

PCR produkti umnožavanjem regiona MMP-2 gena (193 bp) su zatim podvrgnut inkubaciji sa restrikcionom endonukleazom -BfaI(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) preko noći na 37°C. Digerirani produkt je zatim podvrgnut gel elektroforezi (2% agarozni gel) i vizuelizovan bojenjem

sa etidium bromidom. Ukoliko nije prisutno restrikciono mesto za BfaI, na gelu se uočava fragment dužine 193bp, što označava prisustvo -1306C alela. Ukoliko je prisutan -1306T alel, na gelu se uočavaju dva fragmenta dužina 164 bp i 29 bp.

PCR produkti dobijeni umnožavanjem regiona MMP-9 gena (436bp) inkubiraju se restrikcionom endonukleazom SphI (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) preko noći na 37°C. Produkti su podvrgnuti gel elektroforezi (2% agarozni gel) i vizelizovani bojenjem sa etidium bromidom. Ukoliko nije prisutno restrikciono mesto za SphI, na gelu se uočava fragment dužine 436bp, što označava prisustvo -1562C alela. Ukoliko je prisutan -1562T alel, na gelu se uočavaju dva fragmenta 194bp i 242 bp.

3.6. Statistička analiza

U ovoj studiji korišćene su deskriptivne i analitičke statističke metode.

Od deskriptivnih korišćeni su:

- apsolutni i relativni brojevi (n, %)
- mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana)
- mere disperzije (standardna devijacija, percentili)

Od analitičkih statističkih metoda korišćeni su testovi razlike:

- parametarski (t test)
- neparametarski (Pirsonov hi-kvadrat test, Fišerov test tačne verovatnoće).

Za analizu povezanosti zavisne binarne varijable i nezavisnih korišćena je logistička regresiona analiza, univarijantna i multivarijantna. Zbog malog broja pacijenata u pojedinim analizama, korišćena je egzaktna logistička regresija.

Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

Svi podaci obrađeni su u SPSS 20.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp) softverskom paketu i R 4.2.0 (R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.).

4. Rezultati

4.1. Deskripcija ispitivane populacije

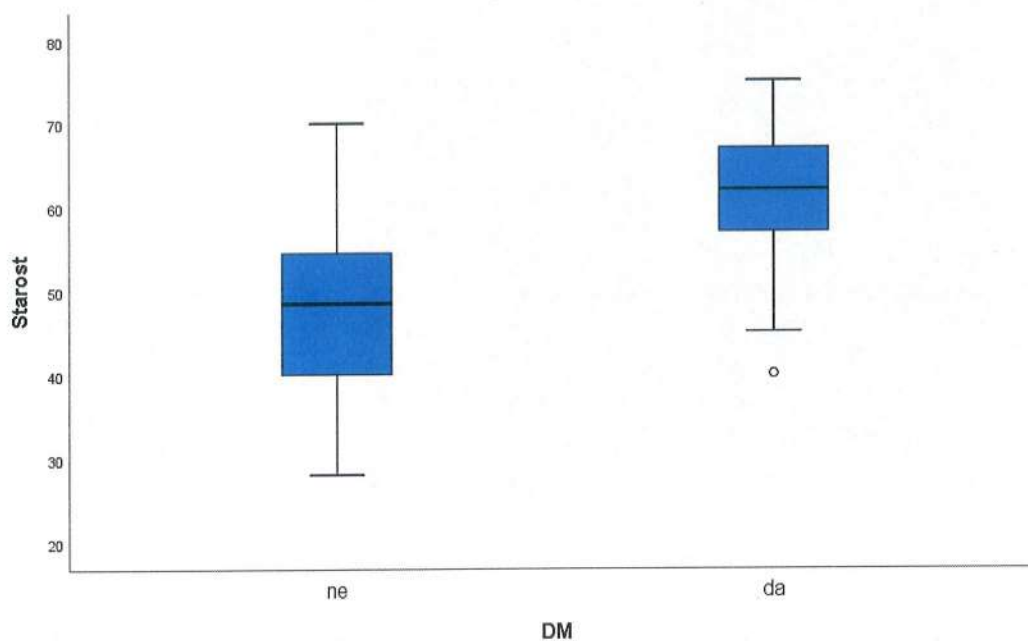
Studija je obuhvatila ukupno 153 ispitanika, od kojih 97 sa diabetes mellitus tip 2 (63.4%) i 56 pacijenata bez diabetes mellitus tip 2, zdravih kontrola (36.3%).

4.1.1 Životna dob ispitanika

Prosečna životna dob ispitanika sa T2DM je iznosila 61.2 ± 7.4 godina, a u kontrolnoj grupi ispitanika, bez T2DM prosečna životna dob je bila 47.1 ± 9.5 godina.

Tabela 1. Životna dob u odnosu na ispitivane grupe

DM	N	AS	SD	Median	Minimum	Maksimum
ne	56	47.1	9.5	48.5	28	70
da	97	61.2	7.4	62.0	40	75
Ukupno	153	56.0	10.7	58.0	28	75



Grafikon 1. Distribucija ispitanika u odnosu na životnu dob.

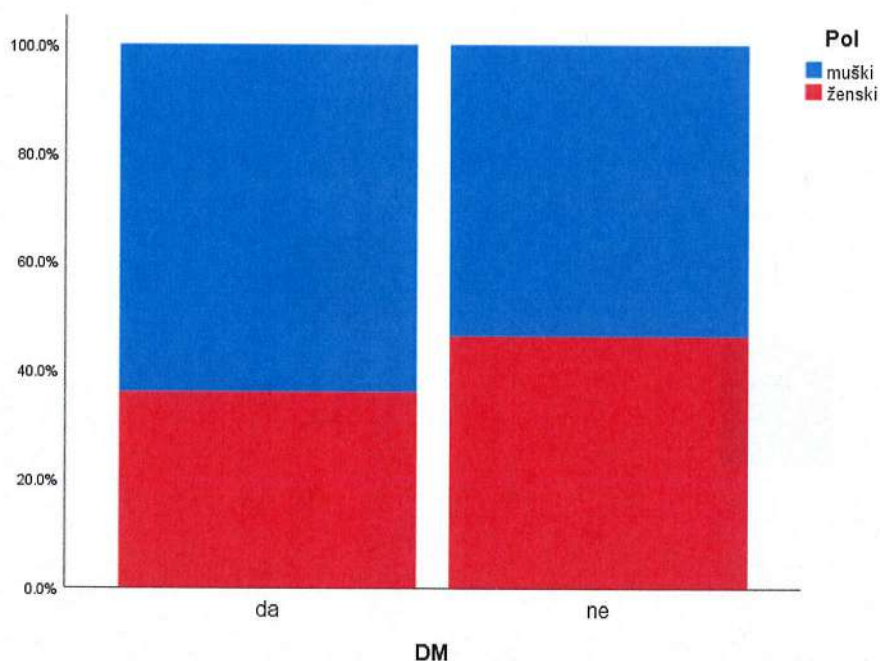
4.1.2 Polna struktura ispitanika

Distribucija ispitanika po grupama u odnosu na pol je prikazana u tabeli br.2.

Tabela 2. Distribucija ispitanika po grupama u odnosu na pol.

		Pol		Ukupno
		muški	ženski	
DM	ne	N 30	26	56
		% 53.6%	46.4%	100.0%
	da	N 62	35	97
		% 63.9%	36.1%	100.0%
Ukupno		N 92	61	153
		% 60.1%	39.9%	100.0%

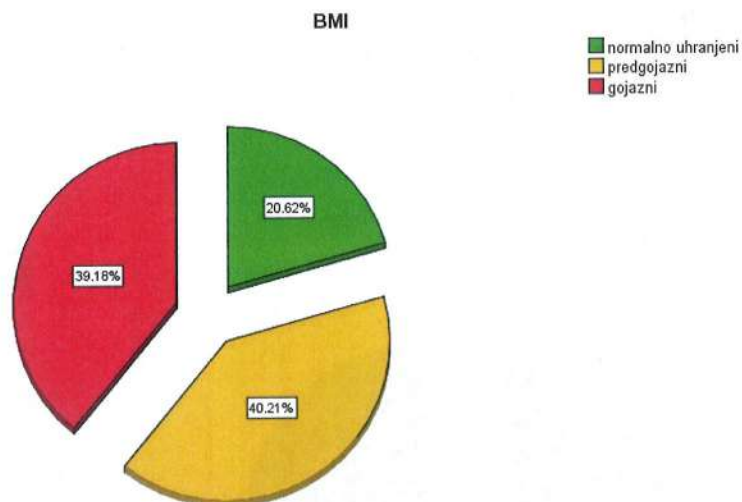
Na osnovu distribucije pacijenata, jasno se vidi da je procenat muškaraca nešto veći u grupi pacijenata sa DM, dok je pola distribucija u kontrolnoj grupi više izbalansirana. Ipak, statističkom analizom, hi kvadrat testom nije potvrđena statistički značajna razlika između grupa po polu ($\chi^2=1,585$; $p=0,208$).



Grafikon 2. Distribucija ispitanika po ispitivanim grupama u odnosu na pol.

4.1.3. Stepen uhranjenosti pacijenata sa T2DM

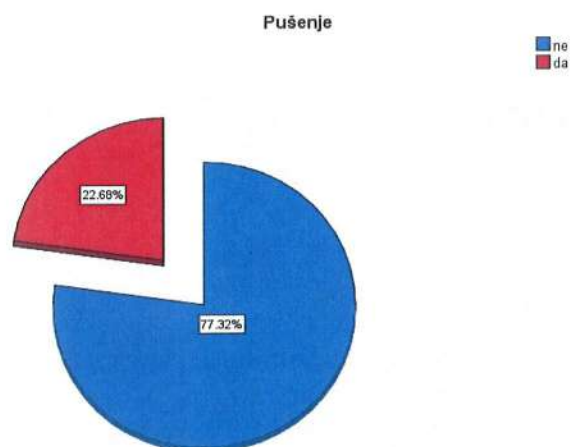
Prosečan BMI ovih pacijenata je $28,8 \pm 4,8$, minimum, je 19 a maksimum 44 kg/m^2 . Normalno uhranjenih je 20 (20,61%, predgojaznih 39 (40,21%) a gojaznih 38 (39,18%).



Grafikon 3. Distribucija pacijenata sa DM prema stepenu uhranjenosti.

4.1.4. Navike u pušenju pacijenata sa T2DM

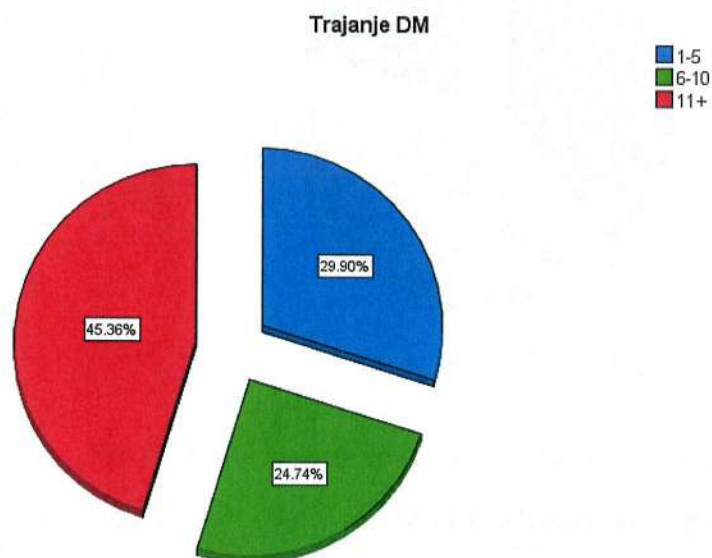
Od ukupnog broja pacijenata sa T2DM, njih 22 (22,7%) su pušači, dok je 75 (77,3%) nepušača.



Grafikon 4. Distribucija pacijenata sa T2DM prema navikama u pušenju.

4.1.5. Dužina trajanja T2DM

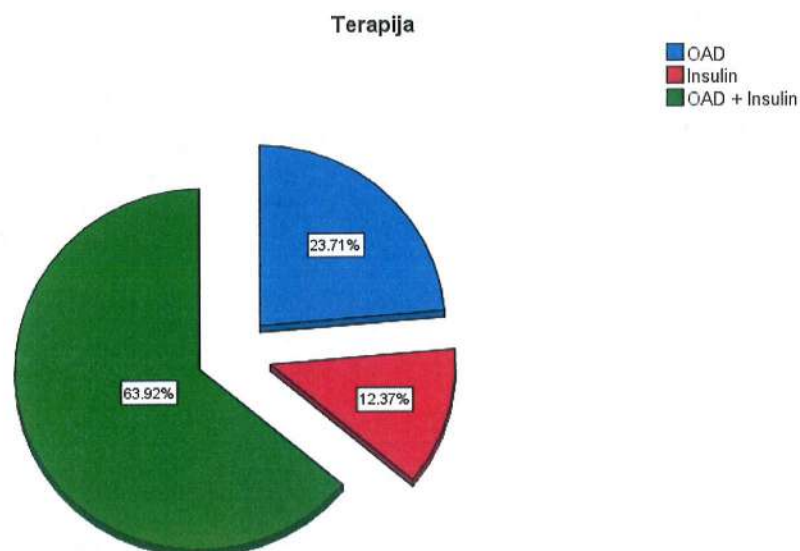
Trajanje T2DM kod ovih pacijenata iznosi $10,1 \pm 5,8$ godina, medijana trajanja je 10 godina, najmanje jednu godinu, a najviše 24 godine. Ukupno 29 pacijenata (29.9%) imalo je trajanje dijabetesa između 1-5 godina, 24 pacijenta (24.7%) imalo je trajanje dijabetesa između 6-10 godina, a 44 pacijenta (45.4%) imalo je trajanje dijabetesa više od 10 godina. Distribucija pacijenata prema trajanju T2DM prikazana je i grafički (Grafikon 5).



Grafikon 5. Dužina trajanja T2DM.

4.1.6. Terapijski režimi pacijenata sa T2DM

U odnosu na terapiju, pacijenti su podjeljeni u tri grupe, oni koji su bili samo na OAD i to njih 23 (23,7%), samo na insulinu njih 12 (12,4%) i oni koji su bili na kombinovanoj terapiji, njih 62 (63,9%). Distribucija pacijenata u odnosu na terapiju je i grafički prikazana (grafikon 6.)



OAD- oralni antidiabetesni lekovi

Grafikon 6. Distribucija pacijenata u odnosu na vrstu terapije za T2DM

4.1.7. Parametri metaboličke kontrole T2DM

Prosečna vrednost glikemije našte je kod ispitanika sa T2DM bila 6.86 ± 1.91 mmol/l što je predstavljalo zadovoljavajuću vrednost ali je prosečna vrednost glikoziliranog hemoglobina (HbA1c) iznosila 9.37 ± 2.18 % što je ovu populaciju činilo populacijom sa lošom metaboličkom kontrolom šećerne bolesti.

Tabela 3. Parametri glikoregulacije (Glikemija našte i HbA1c) kod pacijenata sa T2DM.

	Glikemija	HbA1c
Aritmet. sredina	6.86	9.37
SD	1.91	2.18
Median	6.25	9.10
Minimum	3.4	5.2
Maksimum	12.4	14.3

SD-standardna devijacija

4.1.8. Lipidogram kod pacijenata sa T2DM

Vrednosti ukupnog holesterola, LDL holesterola, HDL holesterola i triglicerida ,su date u tabeli. Prosečna vrednost ukupnog holesterola iznosila je 5.16 ± 1.36 mmol/l , LDL holesterola 3.11 ± 1.03 mmol/l. HDL holesterola 1.16 ± 0.29 mmol/l što je ispitivanu populaciju činilo populacijom sa dobrim lipidnim statusom.

Vrednosti triglicerida su bile blago povišene i prosečna vrednost je iznosila 2.17 ± 1.05 mmol/l

Tabela 4. Lipidni status pacijenata sa T2DM.

	AS	SD	Median	Minimum	Maksimum
Holesterol	5.16	1.36	5.20	2.10	9.69
LDL	3.11	1.03	3.10	1.10	6.40
HDL	1.16	0.29	1.20	.50	2.10
Tg	2.17	1.05	1.90	.70	5.20

4.1.9. Parametri bubrežne funkcije kod pacijenata sa T2DM

Mikroalbuminurija je bila prisutna kod 19/96 pacijenata (19,8%). Prosečna vrednost mikroalbuminurije iznosila je $0,1634 \pm 0,1366$, medijana je 0,1100, minimum 0,03, a maksimum 0,06.

Manifestnu proteinuriju je imalo 8 od 97 pacijenata sa T2DM (7.8 %). Prosečna vrednost proteinurije iznosila je $2,11 \pm 2,04$, medijana je 1,30, minimum 0,20, a maksimum 5,43.

Vrednosti kreatinina u urinu i serumu su date u tabeli 5.

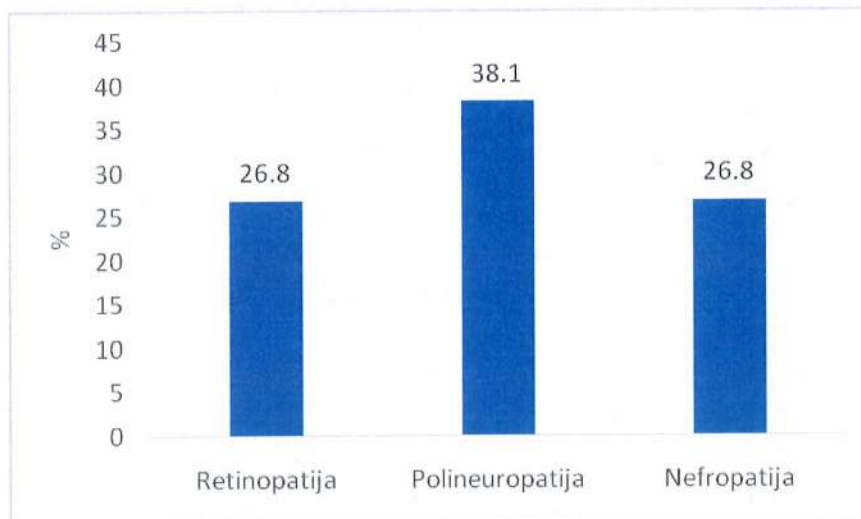
Tabela 5. Vrednosti kreatinina u urinu i serumu kod pacijenata s T2DM.

	Kreatinin u serumu	Kreatinin u urinu
AS	11.609	84.84
SD	2.7714	31.490
Median	12.300	81.00
Minimum	3.4	8
Maksimum	16.8	297

4.2. Prisustvo mikrovaskularnih komplikacija kod pacijenata sa T2DM

Od ukupnog broja pacijenata sa T2DM, njih 26 (26,8%) imalo je retinopatiju, 37 (38,1%) ima polineuropatiju, a nefropatiju 26 (26,8%).

Distribucija pacijenata u odnosu na komplikacije je prikazana i grafički (grafikon7).



Grafikon 7. Zastupljenost mikrovaskularnih komplikacija kod pacijenata sa T2DM.

4.2.1. Korelacija karakteristika pacijenata sa T2DM i komplikacija T2DM

4.2.1.1. Korelacija karakteristika pacijenata sa T2DM i prisustva retinopatije

Distribucija pacijenata prema starosti, polu, trajanju T2DM, terapiji, uhranjenosti i pušenju u odnosu na retinopatiju je prikazana u Tabeli 6.

Na osnovu distribucije pacijenata vidi se da je retinopatija nešto češća kod muškaraca, da trajanje T2DM značajno utiče na učestalost ove komplikacije a da pacijenti na insulinu imaju daleko veći procenat retinopatije od ostalih. Uhranjenost nije pokazala statistički značajnu povezanost sa retinopatijom, dok je pušenje na samoj granici konvencionalnog nivoa značajnosti.

Tabela 6. Karakteristike pacijenata sa T2 DM i retinopatija

		Retinopatija				p vrednost
		ne		da		
		N	%	N	%	
Starost > 60 god.	ne	30	75.0%	10	25.0%	0.737 ^a
	da	41	71.9%	16	28.1%	
Pol	muški	42	67.7%	20	32.3%	0.107 ^a
	ženski	29	82.9%	6	17.1%	
Trajanje DM	1-5	28	96.6%	1	3.4%	0.003 ^a
	6-10	16	66.7%	8	33.3%	
	11+	27	61.4%	17	38.6%	
Terapija	OAD	19	82.6%	4	17.4%	0.113 ^a
	Insulin	6	50.0%	6	50.0%	
	OAD + Insulin	46	74.2%	16	25.8%	
BMI	normalno uhranjeni	12	60.0%	8	40.0%	0.277 ^a
	predgojazni	31	79.5%	8	20.5%	
	gojazni	28	73.7%	10	26.3%	
Pušenje	ne	58	77.3%	17	22.7%	0.089 ^a
	da	13	59.1%	9	40.9%	

^aPirsonov hi kvadrat test

4.2.1.2. Korelacija karakteristika pacijenata sa T2DM i prisustva nefropatije

Distribucija pacijenata prema starosti, polu, trajanju T2DM, terapiji, uhranjenosti i pušenju u odnosu na nefropatiju je prikazana u Tabeli 8.

Za razliku od retinopatije i polineuropatije, nefropatija nema nijedan značajan prediktor u karakteristikama pacijenata sa T2DM. Naime, procentualne razlike su male, a veličina uzorka takva da nije moguće dobiti značajnost.

Tabela 7. Karakteristike pacijenata sa T2DM i nefropatija

		Nefropatija				p vrednost
		ne		da		
		N	%	N	%	
Starost > 60 god.	ne	31	77.5%	9	22.5%	0.423 ^a
	da	40	70.2%	17	29.8%	
Pol	muški	43	69.4%	19	30.6%	0.256 ^a
	ženski	28	80.0%	7	20.0%	
Trajanje DM	1-5	24	82.8%	5	17.2%	0.147 ^a
	6-10	19	79.2%	5	20.8%	
	11+	28	63.6%	16	36.4%	
Terapija	OAD	20	87.0%	3	13.0%	0.155 ^a
	Insulin	7	58.3%	5	41.7%	
	OAD + Insulin	44	71.0%	18	29.0%	
BMI	normalno uhranjeni	13	65.0%	7	35.0%	0.308 ^a
	predgojazni	27	69.2%	12	30.8%	
	gojazni	31	81.6%	7	18.4%	
Pušenje	ne	56	74.7%	19	25.3%	0.546 ^a

4.2.1.3. Korelacija karakteristika pacijenata sa T2DM i prisustva polineuropatije

Distribucija pacijenata prema starosti, polu, trajanju DM, terapiji, uhranjenosti i pušenju u odnosu na polineuropatiju je prikazana u Tabeli 7.

Kao i u slučaju retinopatije, polineuropatija nije značajno povezana sa starošću i polom, mada je procenat ove komplikacije nešto veći u ženskoj populaciji. Trajanje T2DM i vrsta terapije su statistički značajno povezani sa pojavom polineuropatije. Uhranjenost i pušenje ne pokazuju statistički značajnu vezu sa polineuropatijom. Pušači u ovom uzorku čak imaju i manji procenat polineuropatije u odnosu na nepušače.

Tabela 8. Karakteristike pacijenata sa t2DM i polineuropatija

		Polineuropatija				p vrednost
		ne		da		
		N	%	N	%	
Starost > 60 god.	ne	25	62.5%	15	37.5%	0.913 ^a
	da	35	61.4%	22	38.6%	
Pol	muški	40	64.5%	22	35.5%	0.473 ^a
	ženski	20	57.1%	15	42.9%	
Trajanje DM	1-5	27	93.1%	2	6.9%	<0.001 ^a
	6-10	13	54.2%	11	45.8%	
	11+	20	45.5%	24	54.5%	
Terapija	OAD	21	91.3%	2	8.7%	0.004 ^a
	Insulin	6	50.0%	6	50.0%	
	OAD + Insulin	33	53.2%	29	46.8%	
BMI	normalno uhranjeni	14	70.0%	6	30.0%	0.665 ^a
	predgojazni	24	61.5%	15	38.5%	
	gojazni	22	57.9%	16	42.1%	
Pušenje	ne	44	58.7%	31	41.3%	0.233 ^a
	da	16	72.7%	6	27.3%	

^aPirsonov hi kvadrat test

4.3. Genski polimorfizmi za MMP-2 (-1306C>T) i MMP-9 (-1562C>T)

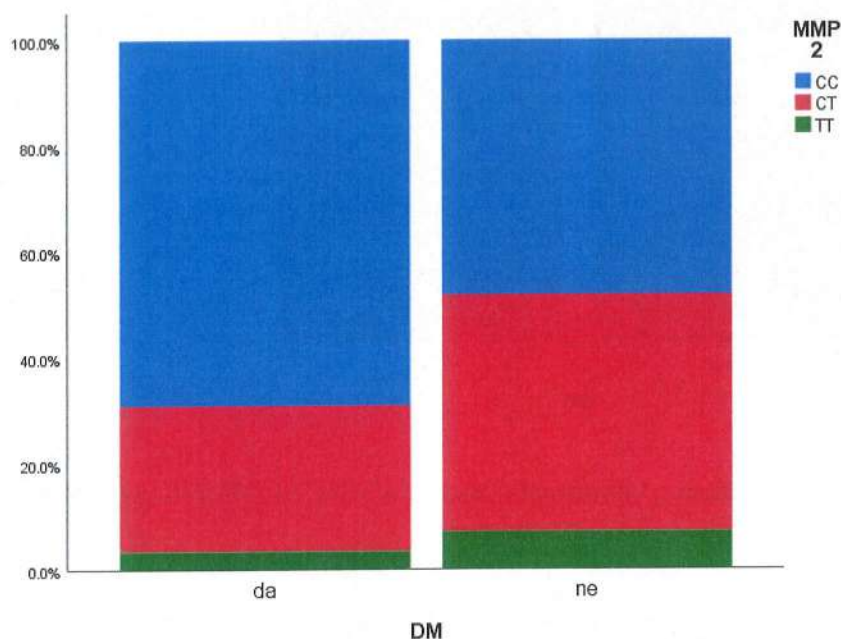
4.3.1. Učestalost genske varijante MMP-2 -1306C>T kod pacijenata sa T2DM

Distribucija genotipova za gensku varijantu MMP-2-1306C>T kod pacijenata sa tipom 2 DM i kod zdravih kontrola data je u tabeli 9.

Tabela 9. Distribucija genotipova za -1306C>T MMP-2 genski polimorfizam

		T2DM		Ukupno	
		da	ne		
MMP 2	CC	N	60	27	87
		%	69.0%	48.2%	60.8%
CT	N	24	25	49	
	%	27.6%	44.6%	34.3%	
TT	N	3	4	7	
	%	3.4%	7.1%	4.9%	
Ukupno	N	87	56	143	
	%	100.0%	100.0%	100.0%	

Naime, CC genotip je za 20% učestaliji kod T2DM pacijenata nego u kontrolnoj grupi, dok je CT genotip za isti procenat ređi kod T2DM pacijenata. Statističkom analizom, Fišerovim testom tačne verovatnoće je utvrđeno da postoji značajna razlika u distribuciji genotipova po ispitivanim grupama ($p=0,042$). Distribucija pacijenata po ispitivanim grupama u odnosu na MMP2 genotip je prikazana i grafički (Grafikon 8).



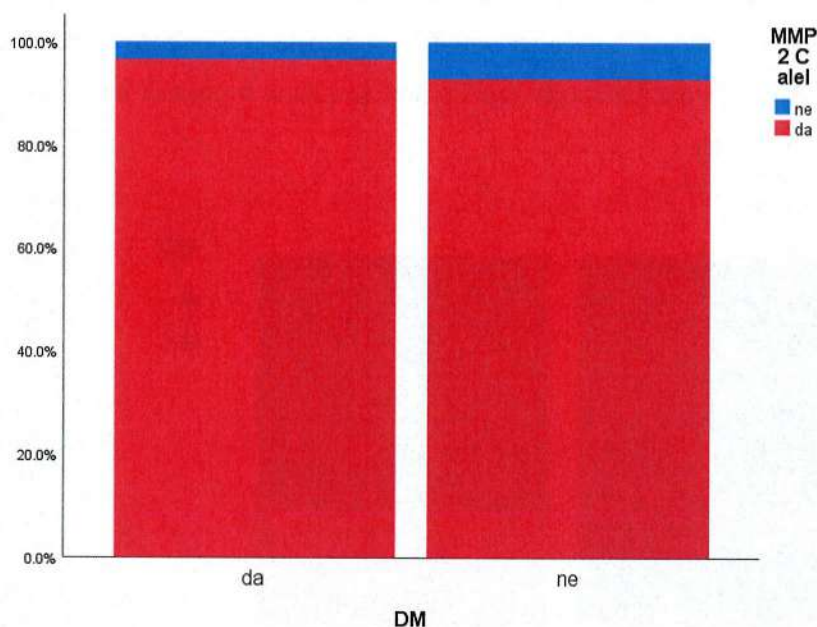
Grafikon8. Distribucija ispitanika po genotipovima za -1306C>T MMP-2 genski polimorfizam

Distribucija ispitanika po ispitivanim grupama u odnosu na MMP2-1306 C alel je prikazana u Tabeli 10.

Tabela 10. Distribucija MMP2-1306 C alela kod ispitanika

		T2DM		Ukupno	
		da	ne		
MMP 2 C alel	ne	N	3	4	7
		%	3.4%	7.1%	4.9%
	da	N	84	52	136
		%	96.6%	92.9%	95.1%
Ukupno		N	87	56	143
		%	100.0%	100.0%	100.0%

Kod MMP2-1306C>T genskog polimorfizma, gotovo svi ispitanici u ovom istraživanju imaju MMP2 C alel. Naime, samo kod 7 pacijenata nemaju ovaj alel nije prisutan. Statističkom analizom, Fišerovim testom tačne verovatnoće je utvrđeno da nema značajne razlike u distribuciji ovih pacijenata ($p=0,433$). Distribucija pacijenata po ispitivanim grupama u odnosu na MMP2 C alel je prikazana i grafički (Grafikon 9).



Grafikon 9. Distribucija pacijenata u odnosu na C alel za -1306C>T MMP-2 genski polimorfizam

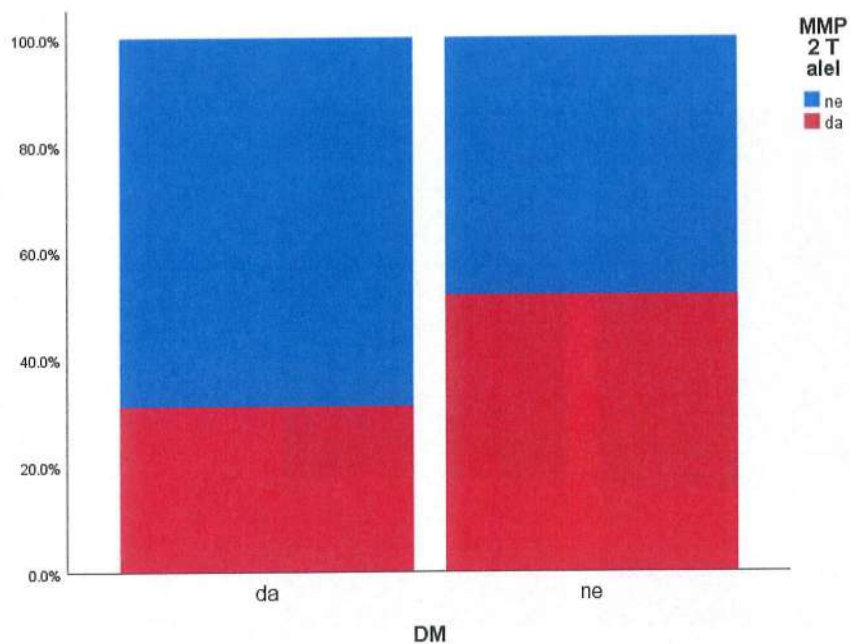
Distribucija ispitanika po ispitivanim grupama u odnosu na MMP2 -1306 T alel je prikazana u Tabeli 11.

Tabela 11. Distribucija MMP2-1306 T alela kod ispitanika

		T2DM		Ukupno	
		da	ne		
MMP 2 T alel	ne	N	60	27	87
		%	69.0%	48.2%	60.8%
	da	N	27	29	56
		%	31.0%	51.8%	39.2%
Ukupno		N	87	56	143
		%	100.0%	100.0%	100.0%

Distribucija T alela se značajno razlikuje u ispitivanim grupa ($\chi^2=6,158$; $p=0,013$). Naime, T alel MMP2 genotipa je za 20% češći kod zdravih kontrola. Verovatnoća da osoba koja ima MMP2 T alel ima T2DM je 51.9%, dok je verovatnoća da osoba koja nema T alel ima T2DM 69%. Logističkom regresionom analizom je utvrđeno da je šansa da osoba koja nema T alel 2.058 (95% IP 1.013-4.180) puta veća da ima T2DM u odnosu na osobe koje imaju T alel.

Distribucija pacijenata po ispitivanim grupama u odnosu na MMP2-1306T alel je prikazana i grafički (Grafikon 10).



Grafikon 10. Distribucija pacijenata u odnosu na T alel za -1306C>T MMP-2 genski polimorfizam

4.3.2. Učestalost genske varijante MMP-9 -1562C>T kod pacijenata sa T2DM

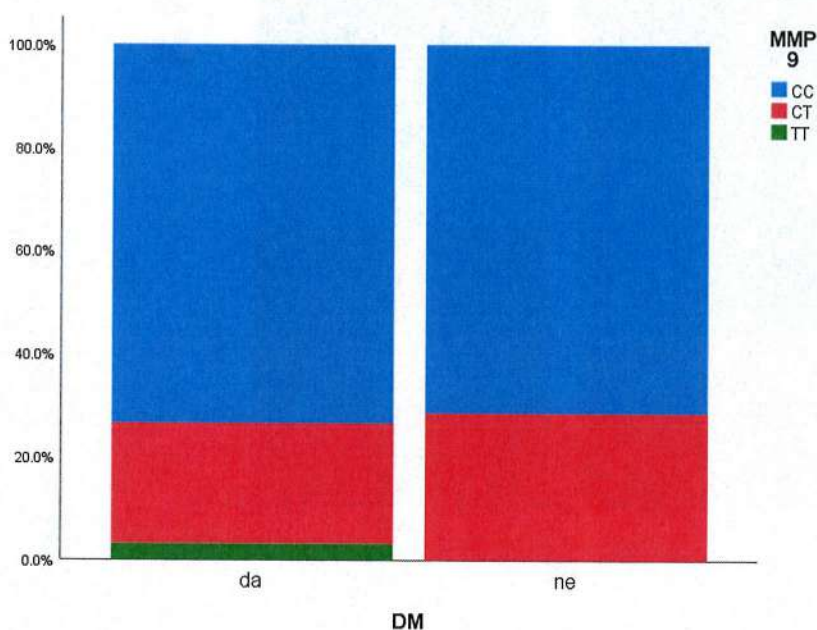
Distribucija genotipova po ispitivanim grupama u odnosu na gensku varijantu MMP9 -1562C>T kod pacijenata sa T2DM i kod zdravih kontrola je prikazana u tabeli 12.

Tabela 12. Distribucija genotipova za MMP-9-genski polimorfizam(-1562C>T)

			T2DM		
			da	ne	Ukupno
MMP 9	CC	N	69	40	109
		%	73.4%	71.4%	72.7%
	CT	N	22	16	38
		%	23.4%	28.6%	25.3%
	TT	N	3	0	3
		%	3.2%	0.0%	2.0%
Ukupno		N	94	56	150
		%	100.0%	100.0%	100.0%

Analizirajući distribuciju ispitanika po ispitivanim grupama, nije uočena značajna razlika po genotipu. Naime, procenat CC, TT i TT genotipova je vrlo sličan i kod pacijenata sa T2DM i kod zdravih kontrola. Statističkom analizom, Fišerovim testom tačne verovatnoće je utvrđeno da nema značajne razlike u distribuciji ovih pacijenata ($p=0,412$).

Distribucija pacijenata po ispitivanim grupama u odnosu na MMP9 genotip je prikazana i grafički (Grafikon 11).



Grafikon 11. Distribucija ispitanika po genotipovima za-1562C>T MMP-9 genski polimorfizam

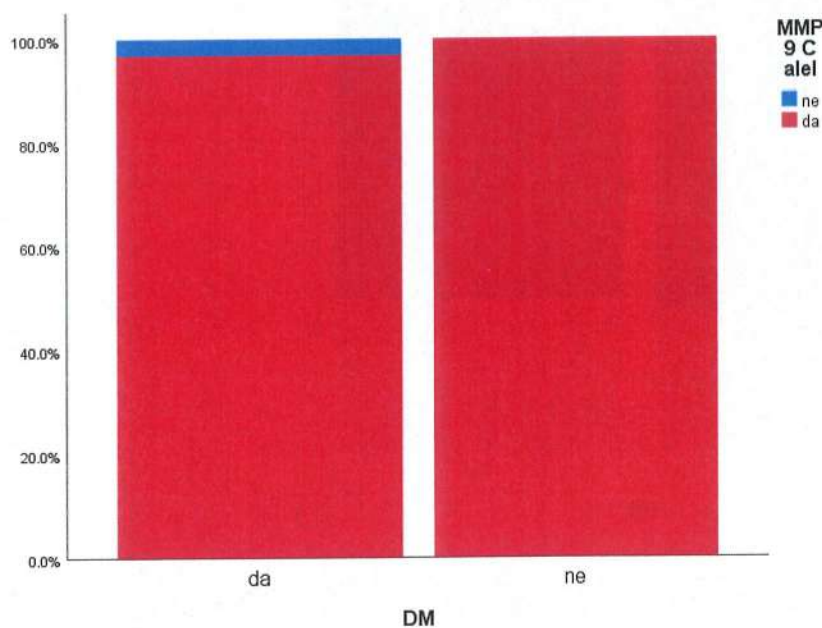
Distribucija ispitanika u odnosu na MMP-9 C alel je prikazana u Tabeli 13.

Tabela 13. Distribucija MMP9-1562C alela kod ispitanika

		T2DM		Ukupno	
		da	ne		
MMP 9 C alel	ne	N	3	0	3
		%	3.2%	0.0%	2.0%
	da	N	91	56	147
		%	96.8%	100.0%	98.0%
Ukupno		N	94	56	150
		%	100.0%	100.0%	100.0%

Na osnovu distribucije prikazane u tabeli, evidentno je da gotovo svi ispitanici u ovom istraživanju imaju MMP9 -1562C alel. Naime, samo kod 3 pacijenta nije prisutan ovaj alel. Statističkom analizom, Fišerovim testom tačne verovatnoće je utvrđeno da nema značajne razlike u distribuciji ovih pacijenata ($p=0,293$).

Distribucija pacijenata po ispitivanim grupama u odnosu na MMP9 C alel je prikazana i grafički (Grafikon 12).



Grafikon 12. Distribucija ispitanika u odnosu na C alel za-1562C>T MMP-9 genski polimorfizam

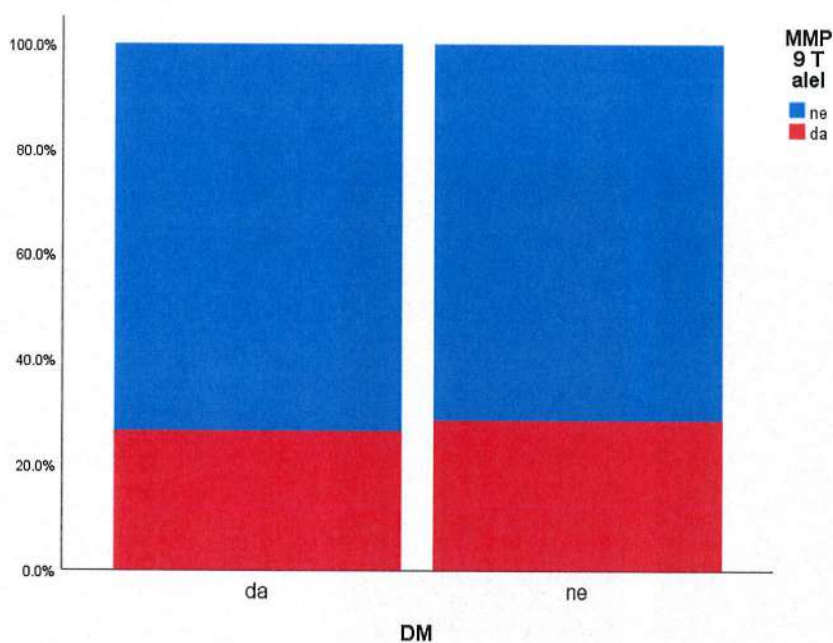
Distribucija ispitanika u odnosu na MMP-9 T alel je prikazana u Tabeli 14..

Tabela 14. Distribucija MMP-9 1562T alela kod ispitanika

		T2DM		Ukupno	
		da	ne		
MMP 9 T alel	ne	N	69	40	109
		%	73.4%	71.4%	72.7%
	da	N	25	16	41
		%	26.6%	28.6%	27.3%
Ukupno		N	94	56	150
		%	100.0%	100.0%	100.0%

Analizirajući distribuciju ispitanika po ispitivanim grupama, nije uočena značajna razlika za MMP9 1562 T alel. Naime, procenat onih koji imaju T alel je vrlo sličan i kod pacijenata sa T2DM i kod zdravih kontrola. Statističkom analizom, hi kvadrat testom je utvrđeno da nema značajne razlike u distribuciji ovih pacijenata ($\chi^2=0,069$; $p=0,793$).

Distribucija pacijenata po ispitivanim grupama u odnosu na MMP9-1562 T alel je prikazana i grafički (Grafikon 13).



Grafikon 13. Distribucija ispitanika u odnosu na T alel za -1562C>T MMP-9 genski polimorfizam

4.4. Povezanost genskih polimorfizama za MMP-2(-1306C>T) i MMP-9 (-1562C>T) sa mikrovaskularnim komplikacijama DM

4.4.1. Povezanost genskih polimorfizama za MMP-2 i MMP-9 sa retinopatijom

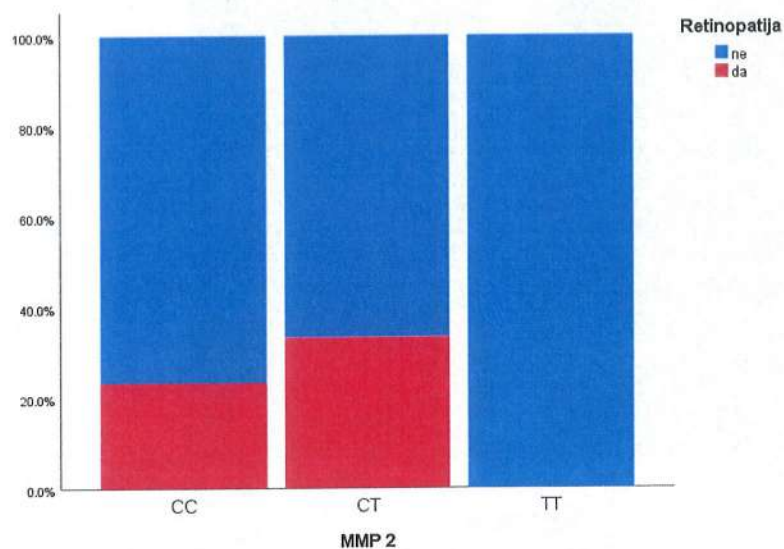
Distribucija pacijenata u odnosu na MMP2 genotip prema prisustvu dijabetesne retinopatije je prikazana u Tabeli 15.

Tabela 15. MMP-2 genotipovi i dijabetesna retinopatija

			Retinopatija		Ukupno
			ne	da	
MMP 2	CC	N	46	14	60
		%	76.7%	23.3%	100.0%
	CT	N	16	8	24
		%	66.7%	33.3%	100.0%
	TT	N	3	0	3
		%	100.0%	0.0%	100.0%
Ukupno		N	65	22	87
		%	74.7%	25.3%	100.0%

Na osnovu distribucije se vidi da pacijenti sa CT genotipom imaju veću učestlost retinopatije. Samo 3 pacijenta imaju TT genotip, pa je procenat pacijenata sa retinopatijom u ovoj grupi neadekvatan za tumačenje zbog malog broja pacijenata. Statističkom analizom, Fišerovim testom tačne verovatnoće utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između MMP genotipova i retinopatije ($p=0,500$).

Distribucija pacijenata po MMP2 genotipu u odnosu na retinopatiju je prikazana i grafički (Grafikon 14).



Grafikon14. MMP-2 genotipovi kod pacijenata sa i bez dijabetesne retinopatije.

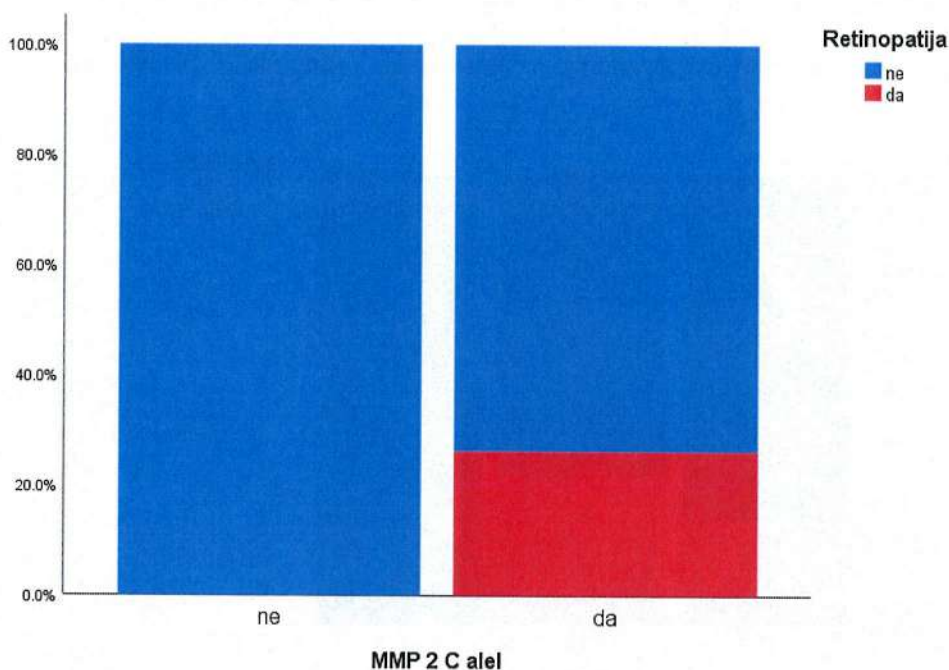
Distribucija pacijenata u odnosu na MMP2-1306C alel prema prisustvu retinopatije je prikazana u Tabeli 16.

Tabela 16. MMP2-1306C alel i retinopatija

		Retinopatija		Ukupno	
		ne	da		
MMP 2 C alel	ne	N	3	0	3
		%	100.0%	0.0%	100.0%
	da	N	62	22	84
		%	73.8%	26.2%	100.0%
Ukupno		N	65	22	87
		%	74.7%	25.3%	100.0%

Na osnovu distribucije pacijenata se vidi da samo 3 pacijenta nemaju C alel, što jasno ukazuje da se radi o malom uzorku za donošenje zaključaka u ovoj analizi. Statističkom analizom, Fišerovim testom tačne verovatnoće utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između prisutva C alela u na poziciji -1306 u MMP2 genu u grupi sa retinopatijom i bez nje. ($p=0,568$).

Distribucija pacijenata po MMP2 C alelu u odnosu na retinopatiju je prikazana i grafički (Grafikon 15).



Grafikon 15. Distribucija pacijenata sa MMP2-1306 C alelom i dijabetesnom retinopatijom.

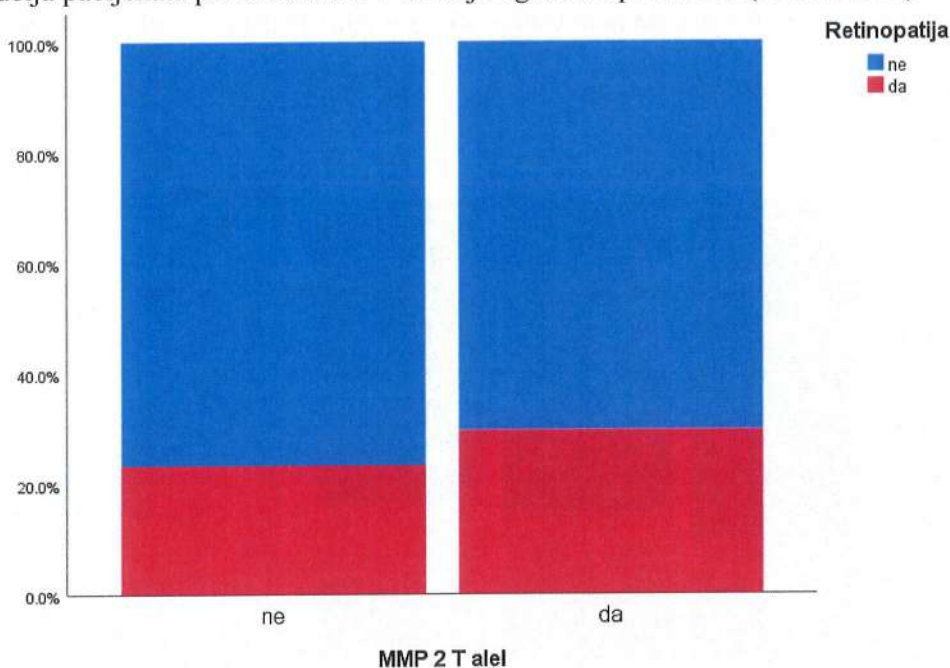
Distribucija pacijenata u odnosu na MMP2-1306 T alel prema prisustvu retinopatije je prikazana u Tabeli 17.

Tabela 17. MMP2-1306 T alel i retinopatija

		Retinopatija		Ukupno	
		ne	da		
MMP 2 T alel	ne	N	46	14	60
		%	76.7%	23.3%	100.0%
	da	N	19	8	27
		%	70.4%	29.6%	100.0%
Ukupno		N	65	22	87
		%	74.7%	25.3%	100.0%

Za razliku od C alela, T alel je dosta prisutniji, odnosno, distribucija pacijenata koji imaju i nemaju ovaj alel je u boljem odnosu nego što je to slučaj sa C alelom. Na osnovu rezultata iz tabele se vidi da je procenat retinopatije sličan u obe ispitivane grupe, s tim što je malo veća učestalost u grupi koja ima prisutan T alel. Statističkom analizom, hi kvadrat testom je utvrđeno da nema značajne razlike između grupa po retinopatiji ($\chi^2=0,391$; $p=0,532$).

Distribucija pacijenata prema MMP2 T alelu je i grafički prikazana (Grafikon 16).



Grafikon 16. Distribucija pacijenata sa MMP2-1306 T alelom i dijabetesnom retinopatijom.

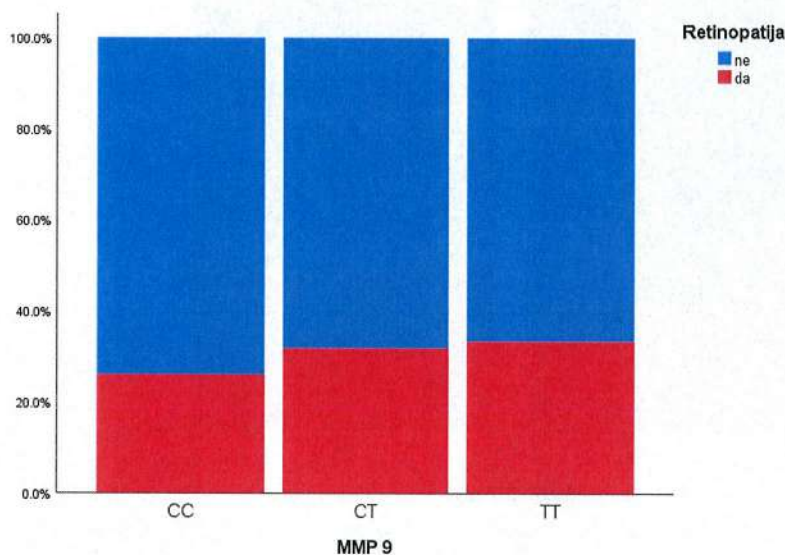
Distribucija pacijenata u odnosu na MMP-9 genotip prema prisustvu retinopatije je prikazana u Tabeli 18.

Tabela 18. MMP-9 genotipovi i dijabetesna retinopatija

			Retinopatija		Ukupno
			ne	da	
MMP 9	CC	N	51	18	69
		%	73.9%	26.1%	100.0%
	CT	N	15	7	22
		%	68.2%	31.8%	100.0%
	TT	N	2	1	3
		%	66.7%	33.3%	100.0%
Ukupno		N	68	26	94
		%	72.3%	27.7%	100.0%

Na osnovu distribucije se vidi da pacijenti sa CT genotipom imaju nešto veću učestalost retinopatije. Samo 3 pacijenta imaju TT genotip, pa je procenat pacijenata sa retinopatijom u ovoj grupi neadekvatan za tumačenje zbog malog broja pacijenata. Statističkom analizom, Fišerovim testom tačne verovatnoće utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između MMP genotipova i retinopatije ($p=0,821$).

Distribucija pacijenata po MMP9 genotipu u odnosu na retinopatiju je prikazana i grafički (Grafikon 17).



Grafikon 17. MMP-9 genotipovi kod pacijenata sa i bez dijabetesne retinopatije.

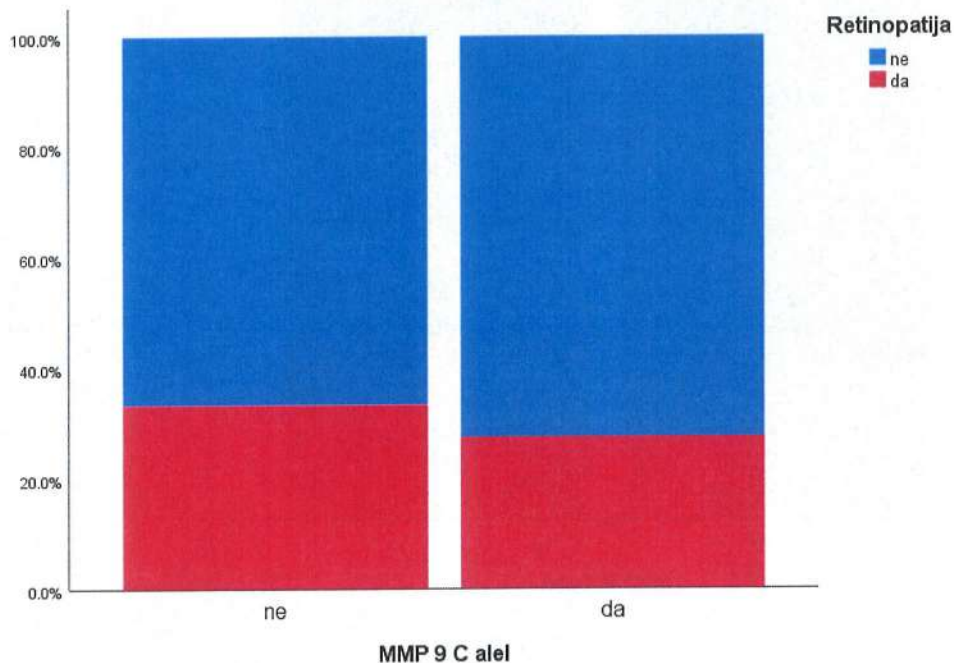
Distribucija pacijenata u odnosu na MMP9-1562 C alel prema prisustvu retinopatije je prikazana u Tabeli 19.

Tabela 19. MMP9-1562 C alel i dijabetesna retinopatija

		Retinopatija		Ukupno	
		ne	da		
MMP 9 C alel	ne	N	2	1	3
		%	66.7%	33.3%	100.0%
	da	N	66	25	91
		%	72.5%	27.5%	100.0%
Ukupno		N	68	26	94
		%	72.3%	27.7%	100.0%

Na osnovu distribucije pacijenata se vidi da samo 3 pacijenta nemaju C alel, što jasno ukazuje da se radi o malom uzorku za donošenje zaključaka u ovoj analizi. Statističkom analizom, Fišerovim testom tačne verovatnoće utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između MMP genotipova i retinopatije ($p=1,000$).

Distribucija pacijenata po MMP9-1562 C alelu u odnosu na retinopatiju je prikazana i grafički (Grafikon 18).



Grafikon 18. Distribucija pacijenata sa MMP9-1562 C alelom i dijabetesnom retinopatijom.

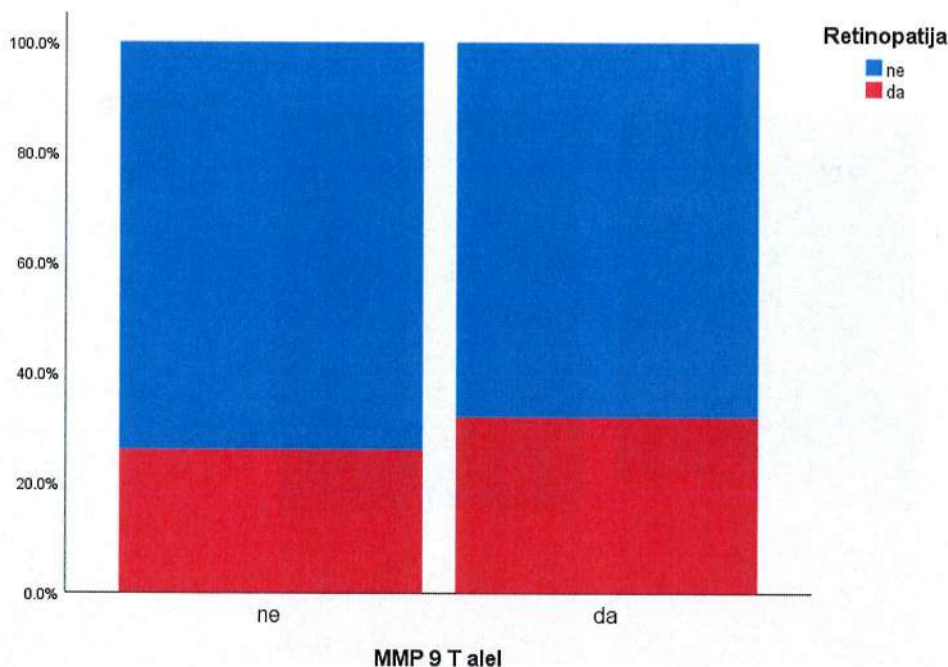
Distribucija pacijenata u odnosu na MMP9-1562 T alel prema prisustvu retinopatije je prikazana u Tabeli 20..

Tabela 20. MMP9-1562 TT alel i dijabetesna retinopatija

		Retinopatija		Ukupno	
		ne	da		
MMP 9 T alel	ne	N	51	18	69
		%	73.9%	26.1%	100.0%
	da	N	17	8	25
		%	68.0%	32.0%	100.0%
Ukupno		N	68	26	94
		%	72.3%	27.7%	100.0%

Kao i kod MMP2, T alel je dosta prisutniji (u odnosu na C alel), odnosno, distribucija pacijenata koji imaju i nemaju ovaj alel je u boljem odnosu nego što je to slučaj sa C alelom. Zastupljenost retinopatije slična je u obe ispitivane grupe, s tim što je malo veća učestalost u grupi koja ima prisutan T alel. Statističkom analizom, hi kvadrat testom je utvrđeno da nema značajne razlike između grupa po retinopatiji ($\chi^2=0,321$; $p=0,571$).

Distribucija pacijenata prema MMP9-1562 T alelu je i grafički prikazana (Grafikon 19).



Grafikon 19. Distribucija pacijenata sa MMP9-1562 T alelom i dijabetesnom retinopatijom.

4.4.2. Povezanost genskih polimorfizama za MMP-2 i MMP-9 sa dijabetesnom nefropatijom.

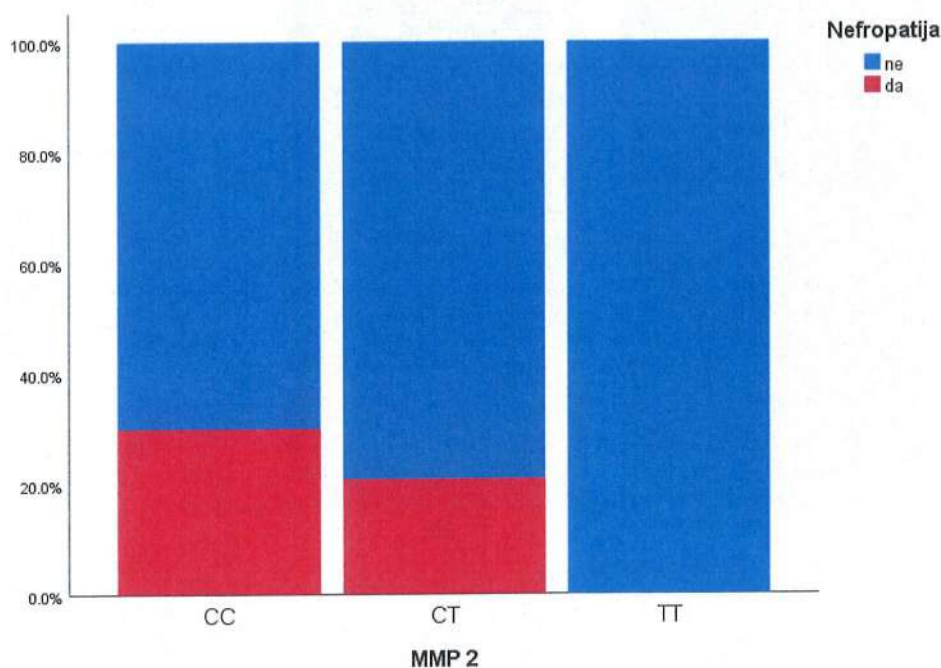
Distribucija pacijenata u odnosu na MMP-2 genotip prema prisustvu dijabetesne nefropatije je prikazana u Tabeli 21.

Tabela 21. MMP-2 genotipovi i dijabetesna nefropatija

			Nefropatija		Ukupno
			ne	da	
MMP 2	CC	N	42	18	60
		%	70.0%	30.0%	100.0%
	CT	N	19	5	24
		%	79.2%	20.8%	100.0%
	TT	N	3	0	3
		%	100.0%	0.0%	100.0%
Ukupno		N	64	23	87
		%	73.6%	26.4%	100.0%

Na osnovu distribucije pacijenata vidi se da je najveći procenat nefropatije u grupi pacijenata sa CC genotipom, zatim sa CT, a samo 3 pacijenta imaju TT genotip. Statističkom analizom, Fišerovim testom tačne verovatnoće je utvrđeno da nema značajne razlike između grupa po nefropatiji ($p=0,581$).

Distribucija pacijenata prema MMP2 genotipu u odnosu na nefropatiju je prikazana i grafički (Grafikon 20).



Grafikon 20. MMP-2 genotipovi kod pacijenata sa i bez dijabetesne nefropatije.

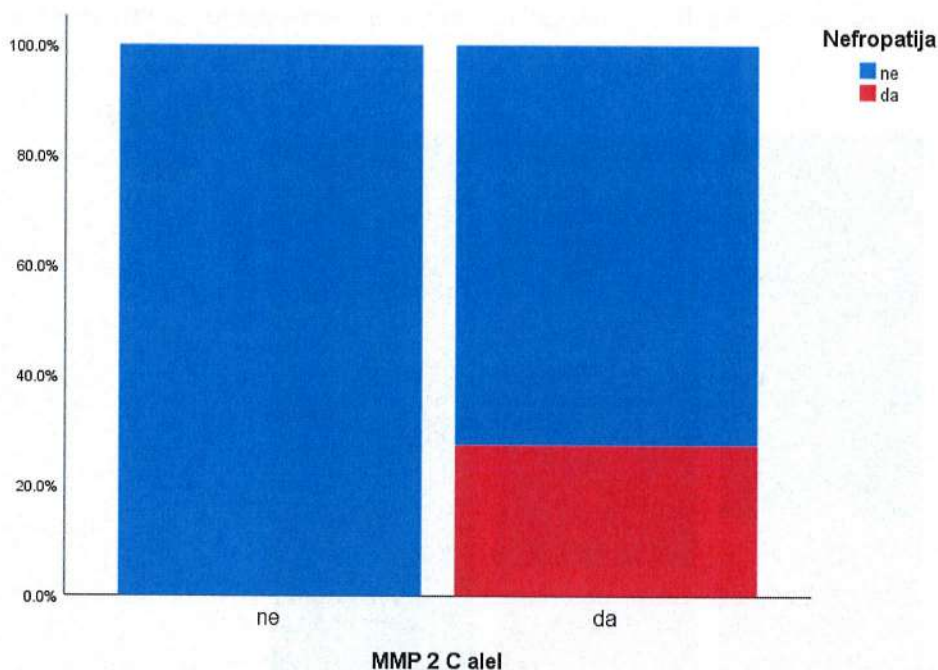
Distribucija pacijenata u odnosu na MMP2-1306 C alel prema prisustvu nefropatije je prikazana u Tabeli 22.

Tabela 22. MMP2-1306 C alel i dijabetesna nefropatija

		Nefropatija		Ukupno	
		ne	da		
MMP 2 C alel	ne	N	3	0	3
		%	100.0%	0.0%	100.0%
	da	N	61	23	84
		%	72.6%	27.4%	100.0%
Ukupno		N	64	23	87
		%	73.6%	26.4%	100.0%

Na osnovu distribucije u tabeli se jasno vidi da je procenat nefropatije daleko veći u grupi pacijenata koji nemaju C alel. Ali, ograničenje ove analize je mali broj pacijenata koji nemaju C alel. Statističkom analizom, Fišerovim testom je utvrđeno da nema značajne razlike između grupa po nefropatiji ($p=0,563$).

Distribucija pacijenata prema MMP2-1306 C alelu u odnosu na nefropatiju je prikazana i grafički (Grafikon 21).



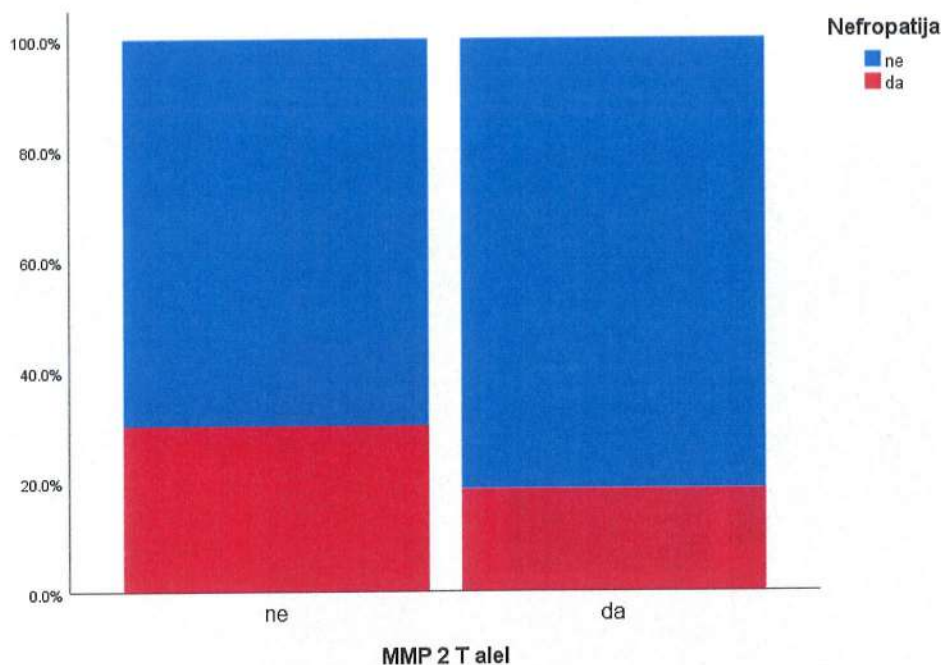
Grafikon 21. Distribucija pacijenata sa MMP2-1306 C alelom i dijabetesnom nefropatijom.

Distribucija pacijenata u odnosu na MMP2-1306 T alel prema prisustvu dijabetesne nefropatije je prikazana u Tabeli 23.

Tabela 23. MMP2-1306T alel i dijabetesna nefropatija

		Nefropatija		Ukupno	
		ne	da		
MMP 2 T alel	ne	N	42	18	60
		%	70.0%	30.0%	100.0%
	da	N	22	5	27
		%	81.5%	18.5%	100.0%
Ukupno		N	64	23	87
		%	73.6%	26.4%	100.0%

Distribucija pacijenata sa nefropatijom po ispitivanim grupama ukazuje da je veći procenat nefropatije kod pacijenata koji nemaju T alel, za nešto više od 10%. Statističkom analizom, Fišerovim testom je utvrđeno da nema značajne razlike između grupa po nefropatiji ($p=0,305$). Distribucija pacijenata prema MMP2 T alelu u odnosu na nefropatiju je prikazana i grafički (Grafikon 22).



Grafikon 22. Distribucija pacijenata sa MMP2-1306 T alelom i dijabetesnom nefropatijom.

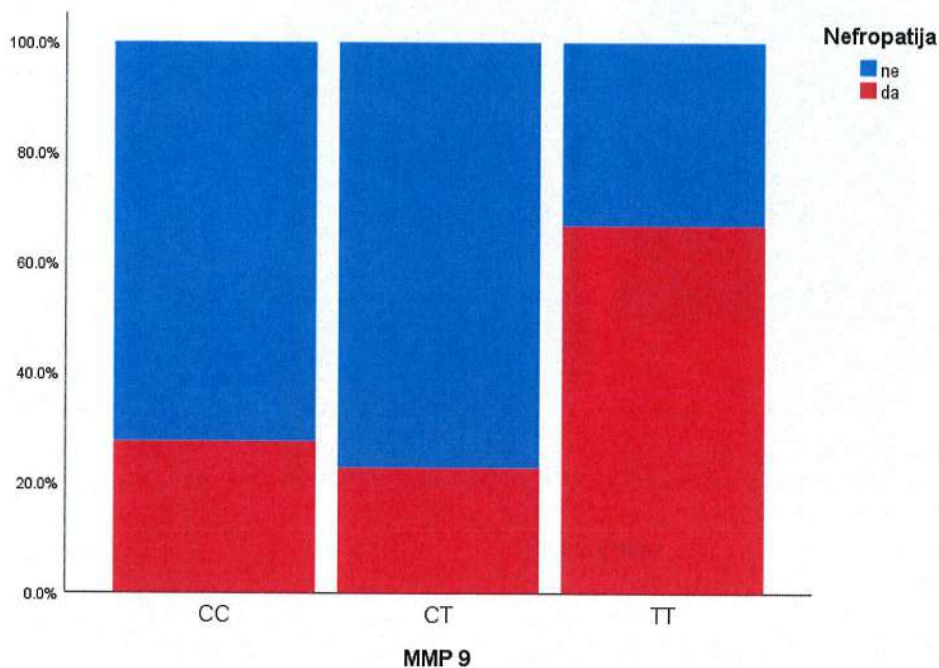
Distribucija pacijenata u odnosu na MMP-9 genotip prema prisustvu nefropatije je prikazana u Tabeli 24.

Tabela 24. MMP-9 genotipovi i dijabetesna nefropatija

		Nefropatija		Ukupno	
		ne	da		
MMP 9	CC	N	50	19	69
		%	72.5%	27.5%	100.0%
	CT	N	17	5	22
		%	77.3%	22.7%	100.0%
	TT	N	1	2	3
		%	33.3%	66.7%	100.0%
Ukupno		N	68	26	94
		%	72.3%	27.7%	100.0%

Na osnovu distribucije pacijenata vidi se da je procenat pacijenata sa nefropatijom sličan u grupi sa CC genotipom i CT genotipom, dok samo 3 pacijenta imaju TT genotip. Statističkom analizom, Fišerovim testom tačne verovatnoće je utvrđeno da nema značajne razlike između grupa po nefropatiji ($p=0,290$).

Distribucija pacijenata prema MMP9 genotipu u odnosu na nefropatiju je prikazana i grafički (Grafikon 23).



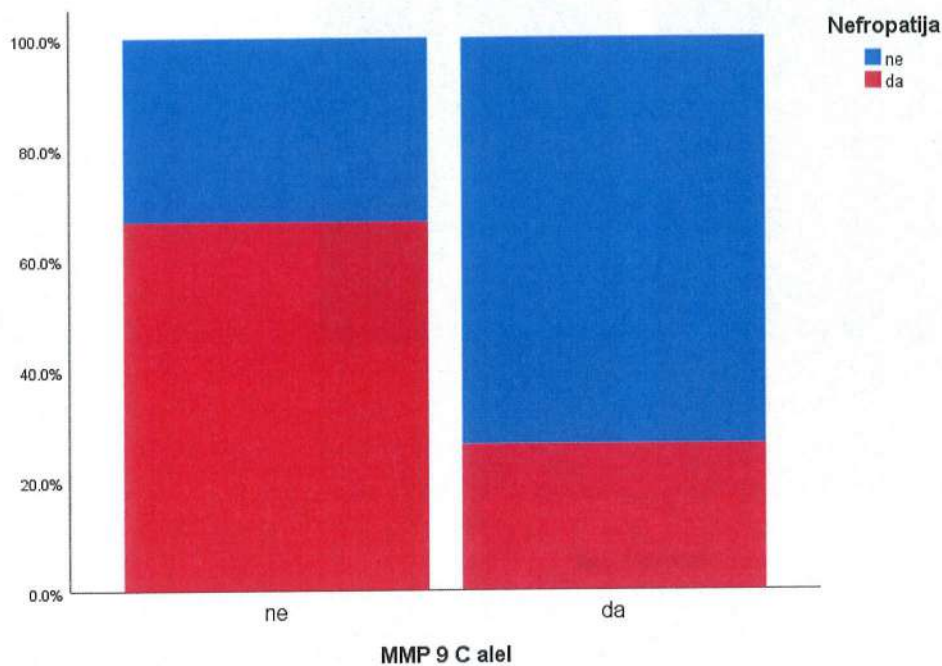
Grafikon 23. MMP-9 genotipovi kod pacijenata sa i bez dijabetesne nefropatije.

Distribucija pacijenata u odnosu na MMP9-1562 C alel prema prisustvu nefropatije je prikazana u Tabeli 25.

Tabela 25. MMP9-1562 C alel i dijabetesna nefropatija

				Nefropatija		Ukupno
				ne	da	
MMP 9 C alel	ne	N	1	2	3	
		%	33.3%	66.7%	100.0%	
	da	N	67	24	91	
		%	73.6%	26.4%	100.0%	
Ukupno		N	68	26	94	
		%	72.3%	27.7%	100.0%	

Kao i u prethodnim analizama, broj pacijenata koji nemaju C alel je suviše mali da bi se doneo adekvatan zaključak, a procenat se ne može koristiti za donošenje zaključka. Naime, iako je procenat pacijenata sa nefropatijom značajno veći u grupi pacijenata koji nemaju C alel, treba imati u vidu da su to samo dva od tri pacijenta. Statističkom analizom, Fišerovim testom tačne verovatnoće je utvrđeno da nema značajne razlike između grupa po nefropatiji ($p=0,184$). Distribucija pacijenata prema MMP9-1562 C alel u odnosu na nefropatiju je prikazana i grafički (Grafikon 24).



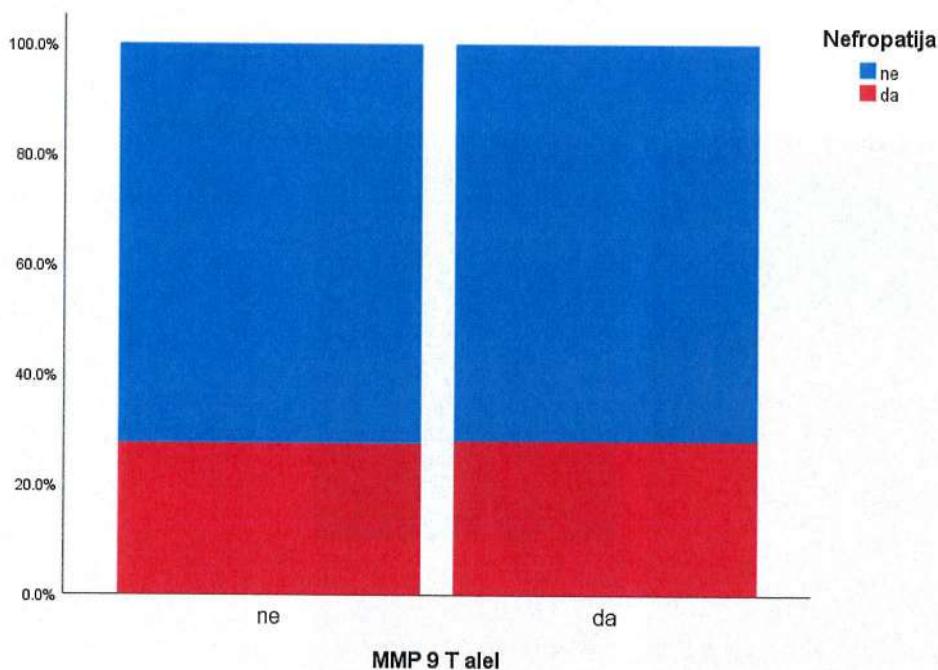
Grafikon 24. Distribucija pacijenata sa MMP9-1562 C alelom i dijabetesnom nefropatijom.

Distribucija pacijenata u odnosu na MMP9-1562 T alel prema prisustvu dijabetesne nefropatije je prikazana u Tabeli 26.

Tabela 26. MMP9-1562 T alel i dijabetesna nefropatija

		Nefropatija		Ukupno	
		ne	da		
MMP 9 T alel	ne	N	50	9	69
		%	72.5%	27.5%	100.0%
	da	N	18	7	25
		%	72.0%	28.0%	100.0%
Ukupno		N	68	26	94
		%	72.3%	27.7%	100.0%

Na osnovu distribucije pacijenata iz tabele, evidentno je da se radi o veoma sličnom procentu prisustva nefropatije u ispitivanim grupama. Statističkom analizom, hi kvadrat testom je utvrđeno da nema značajne razlike između grupa po prisustvu nefropatije ($\chi^2=0,002$; $p=0,965$). Distribucija pacijenata prema MMP9-1562 T alel u odnosu na nefropatiju je prikazana i grafički (Grafikon 25).



Grafikon 25. Distribucija pacijenata sa MMP9-1562 T alelom i dijabetesnom nefropatijom.

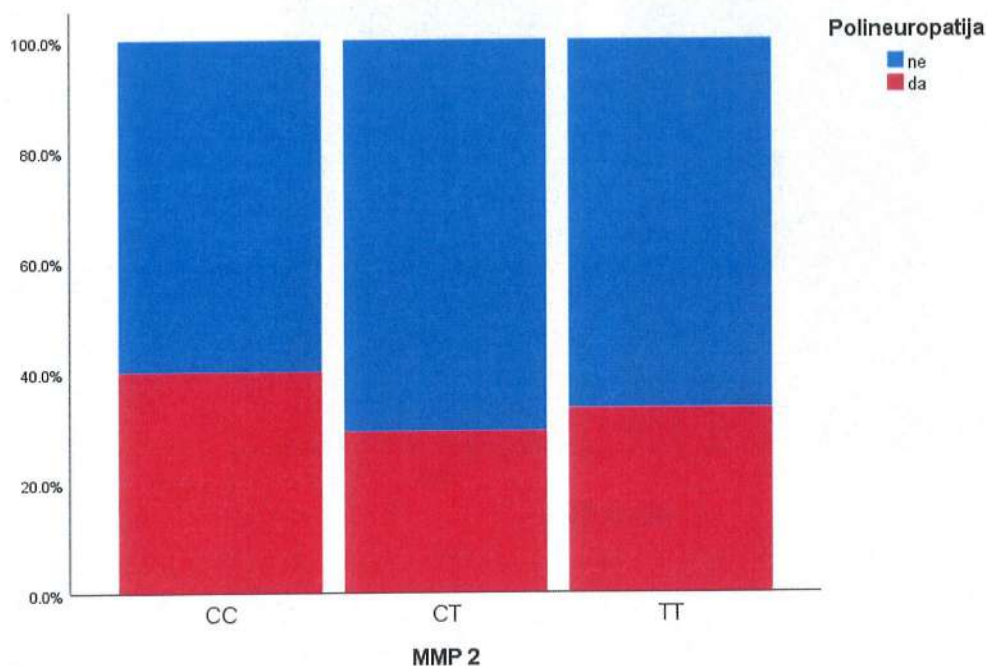
4.4.3. Povezanost genskih polimorfizama za MMP-2 i MMP-9 sa dijabetesnom polineuropatijom

Distribucija pacijenata u odnosu na MMP2 genotip prema prisustvu polineuropatije je prikazana u Tabeli 27.

Tabela 27. MMP-2 genotipovi i dijabetesna polineuropatija

			Polineuropatija		Ukupno
			ne	da	
MMP 2	CC	N	36	24	60
		%	65.5%	75%	70%
	CT	N	17	7	24
		%	30.9%	21.9 %	27.6%
	TT	N	2	1	3
		%	3.6 %	3.1%	3.4%
Ukupno		N	55	32	87
		%	100%	100%	100.0%

U distribuciji genotipova MMP-2 dominiraju CC i CT genotip, dok je TT daleko redi. Ipak, procenat neuropatije je evidentno najveća kod pacijenata sa CC genotipom. Statističkom analizom, Fišerovim testom tačne verovatnoće je pokazano da ova razlika nije statistički značajna ($p=0,756$). Distribucija pacijenata prema MMP-2 genotipu u odnosu na polineuropatiju je prikazana i grafički (Grafikon 26).



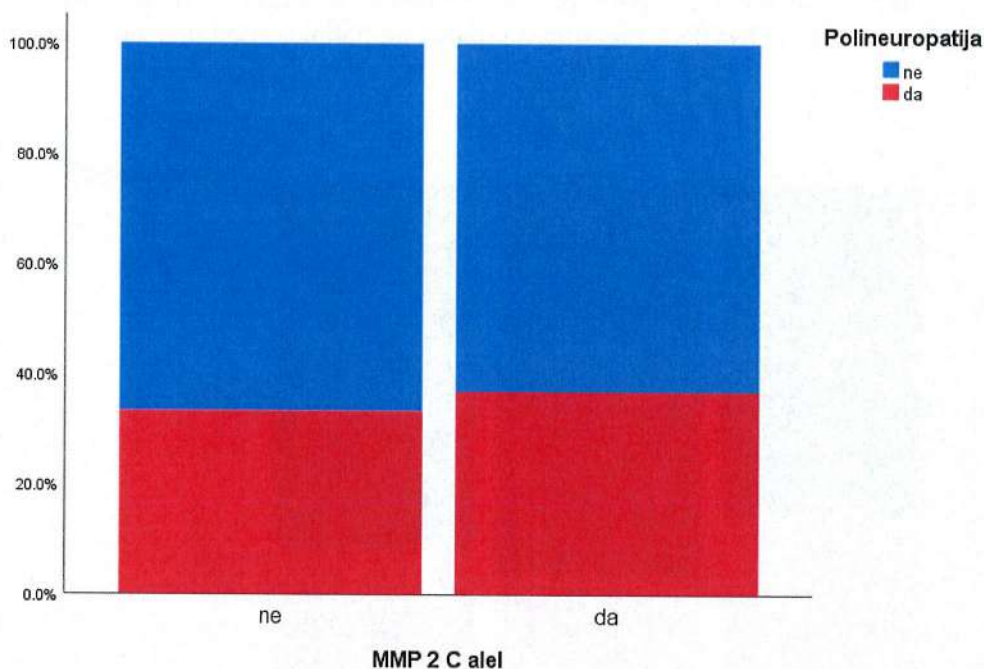
Grafikon 26. MMP-2 genotipovi kod pacijenata sa i bez dijabetesne polineuropatije.

Distribucija pacijenata u odnosu na MMP2-1306C alel prema prisustvu dijabetesne polineuropatije je prikazana u Tabeli 28.

Tabela 28. MMP2-1306C alel i dijabetesna polineuropatija

				Polineuropatija		Ukupno
				ne	da	
MMP 2 C alel	ne	N	2	1	3	
		%	66.7%	33.3%	100.0%	
	da	N	53	31	84	
		%	63.1%	36.9%	100.0%	
Ukupno		N	55	32	87	
		%	63.2%	36.8%	100.0%	

Na osnovu distribucije u tabeli se jasno vidi da je procenat polineuropatije gotovo identičan. Ali, ograničenje ove analize je mali broj pacijenata koji nemaju C alel. Statističkom analizom, Fišerovim testom je utvrđeno da nema značajne razlike između grupa po polineuropatiji ($p=1,000$). Distribucija pacijenata prema MMP2 C alelu u odnosu na polineuropatiju je prikazana i grafički (Grafikon 27).



Grafikon 27. Distribucija pacijenata sa MMP2-1306 C alelom i dijabetesnom polineuropatijom.

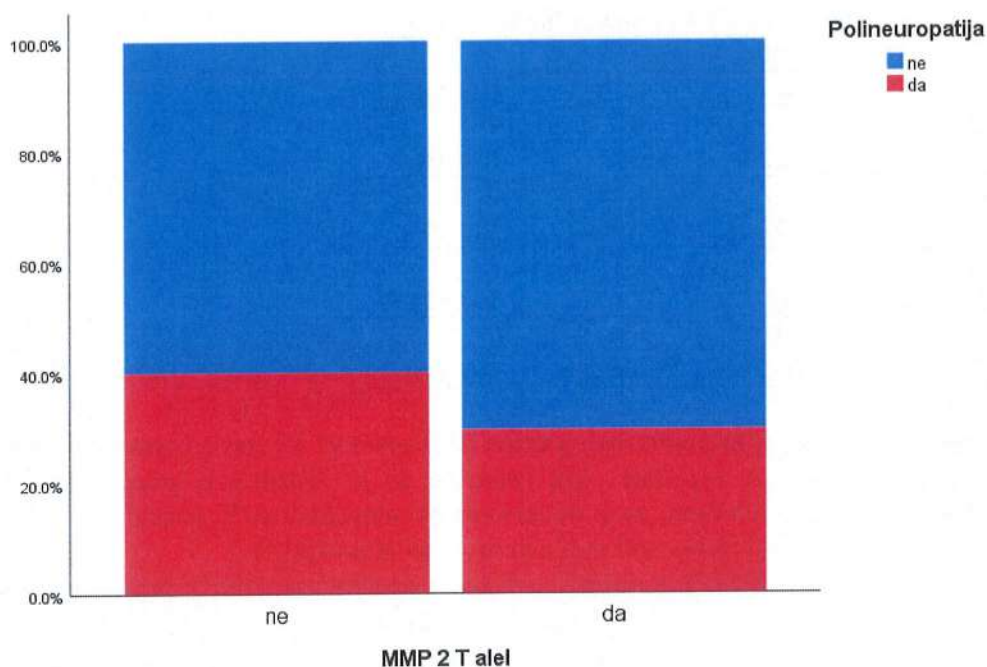
Distribucija pacijenata u odnosu na MMP2-1306 T alel prema prisustvu dijabetesne polineuropatije je prikazana u Tabeli 29.

Tabela 29. MMP2-1306 T alel i dijabetesna polineuropatija

		Polineuropatija		Ukupno	
		ne	da		
MMP 2 T alel	ne	N	36	24	60
		%	60.0%	40.0%	100.0%
	da	N	19	8	27
		%	70.4%	29.6%	100.0%
Ukupno		N	55	32	87
		%	63.2%	36.8%	100.0%

Procentualna zastupljenost polineuropatije je veća za više od 10% u grupi pacijenata koji nemaju T alel, ali statističkom analizom, hi kvadrat testom je utvrđeno da nema statistički značajne razlike između grupa ($\chi^2=0,861$; $p=0,353$).

Distribucija pacijenata prema MMP2 T alelu u odnosu na polineuropatiju je prikazana i grafički (Grafikon 28).



Grafikon 28. Distribucija pacijenata sa MMP2-1306 T alelom i dijabetesnom polineuropatijom.

Korelacija MMP2-1306 T alela kod pacijenata sa dijabetesnom polineuropatijom i zdravih kontrola je prikazana u tabeli 30.

Tabela 30. Korelacija MMP2 T alela i dijabetesne neuropatije kod pacijenata sa DM i kontrola

Genotip	Pacijenti	Kontrola	OR (95% IP)	p vrednost
CC	24 (75%)	27 (48.2%)	0.310 (0.119-	0.017
CT i TT	8 (25%)	29 (51.8%)	0.808)	

Šansa da dođe do razvoja polineuropatije je 3.2 puta manja (1/0.310) ukoliko pacijent ima T alel, odnosno CT ili TT genotip. Ova šansa je statistički značajna.

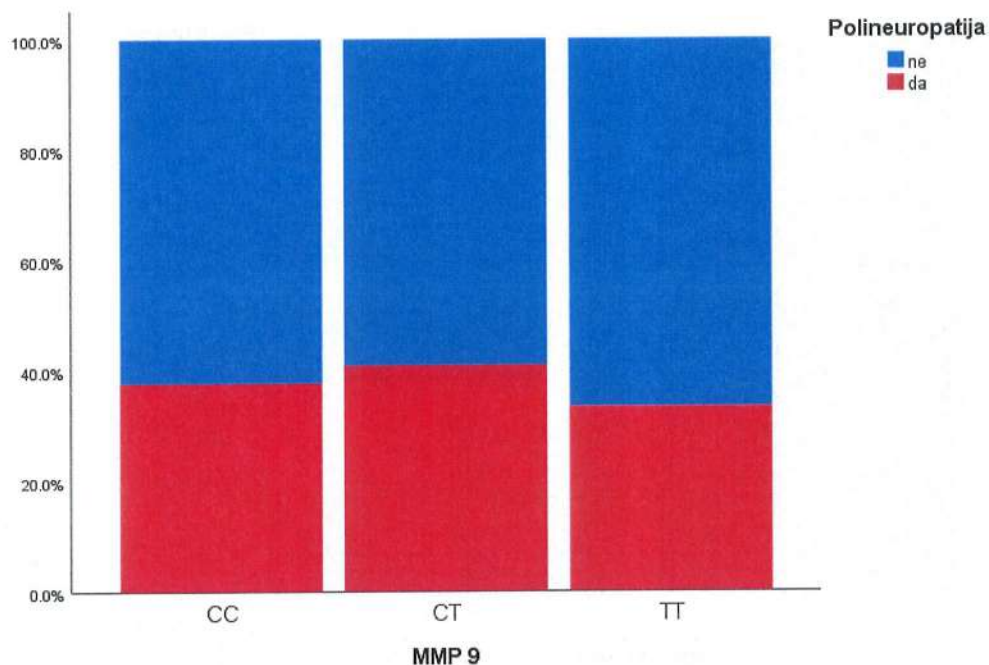
Distribucija pacijenata u odnosu na MMP-9 genotip prema prisustvu dijabetesne polineuropatije je prikazana u Tabeli 31..

Tabela 31. MMP9 genotipovi i dijabetesna polineuropatija

			Polineuropatija		Ukupno
			ne	da	
MMP 9	CC	N	43	26	69
		%	62.3%	37.7%	100.0%
	CT	N	13	9	22
		%	59.1%	40.9%	100.0%
	TT	N	2	1	3
		%	66.7%	33.3%	100.0%
Ukupno	N	58	36	94	
	%	61.7%	38.3%	100.0%	

Kao i u prethodnim analizama, problem malog broja pacijenata sa TT genotipom pravi problem pri statističkoj analizi i tumačenju rezultata. Ali, jasno je da je distribucija pacijenata koji imaju polineuropatiju slična u genotipovima, pa je očekivano da nema statistički značajne razlike između genotipova po polineuropatiji (Fišerov test tačne verovatnoće, $p=0,914$).

Distribucija pacijenata prema MMP9 genotipu u odnosu na polineuropatiju je prikazana i grafički (Grafikon 29)..



Grafikon 29. MMP-9 genotipovi kod pacijenata sa i bez dijabetesne polineuropatije

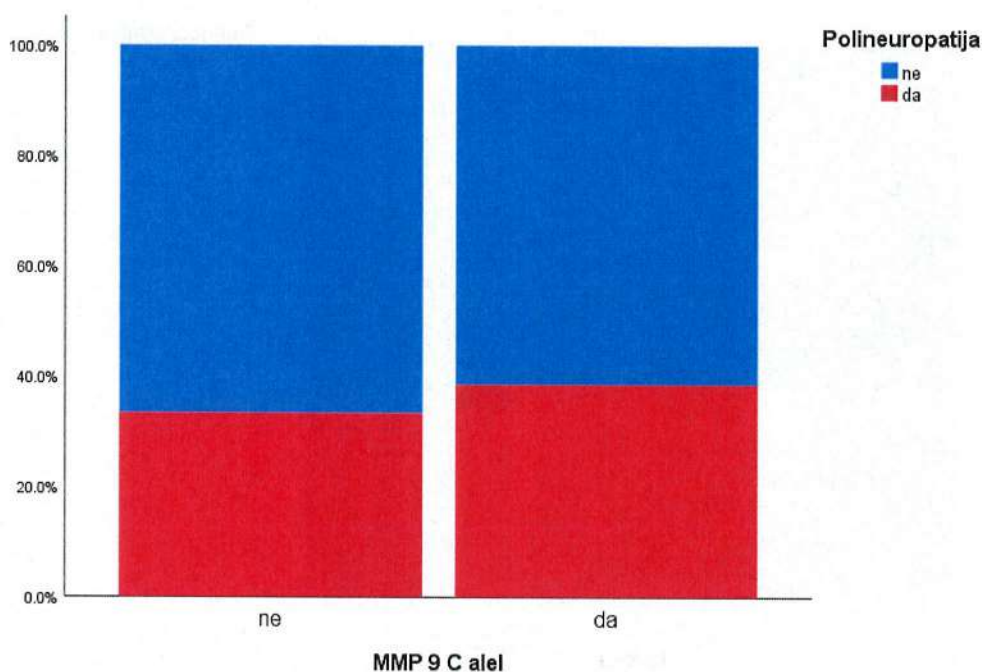
Distribucija pacijenata u odnosu na MMP9-1562 C alel prema prisustvu dijabetesne polineuropatije je prikazana u Tabeli 32.

Tabela 32. MMP9-1562 C alel i dijabetesna polineuropatija

		Polineuropatija		Ukupno
		ne	da	
MMP 9 C alel	ne	N 2	1	3
		% 66.7%	33.3%	100.0%
	da	N 56	35	91
		% 61.5%	38.5%	100.0%
Ukupno		N 58	36	94
		% 61.7%	38.3%	100.0%

Kao što je to do sada bio slučaj, samo 3 pacijenta nemaju C alel pa je rezultat analize diskutabilan. Ipak, činjenica je da je procentualna zastupljenost polineuropatije vrlo slična u ispitivanim grupama. Fišerovim testom tačne verovatnoće je utvrđeno da nema značajne razlike između ispitivanih grupa po polineuropatiji ($p=1,000$).

Distribucija pacijenata prema MMP-9 C alelu u odnosu na polineuropatiju je prikazana i grafički (Grafikon 30).



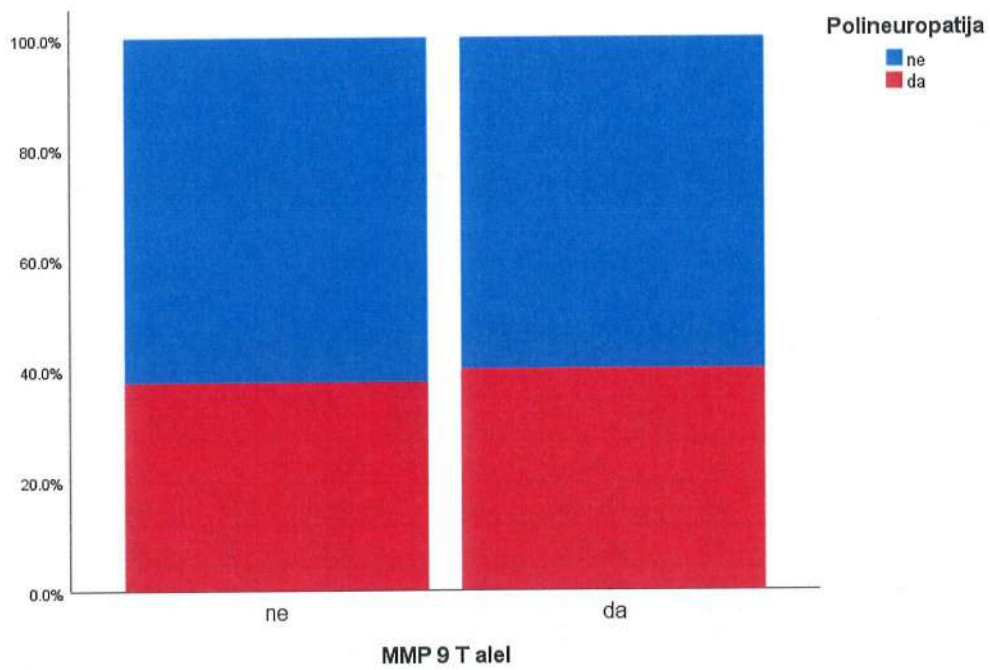
Grafikon 30. Distribucija pacijenata sa MMP9-1562 C alelom i dijabetesnom polineuropatijom

Distribucija pacijenata u odnosu na MMP9-1562 T alel prema prisustvu dijabetesne polineuropatije je prikazana u Tabeli 33. .

Tabela 33. MMP9-1562 T alel i dijabetesna polineuropatija

		Polineuropatija		Ukupno	
		ne	da		
MMP 9 T alel	ne	N	43	26	69
		%	62.3%	37.7%	100.0%
	da	N	15	10	25
		%	60.0%	40.0%	100.0%
Ukupno		N	58	36	94
		%	61.7%	38.3%	100.0%

Za razliku od C alela, T alel je dosta prisutniji, pa su i analize validnije, što je i u ovom slučaju. Naime, procentualna zastupljenost polineuropatije je vrlo slična u obe ispitivane grupe, pa je i očekivano da nema statistički značajne razlike između grupa ($\chi^2=0,042$; $p=0,838$). Distribucija pacijenata prema MMP9-1562 T alelu u odnosu na polineuropatiju je prikazana i grafički (Grafikon 31).



Grafikon 31. Distribucija pacijenata sa MMP--15629 T alelom i dijabetesnom polineuropatijom

4.5. Genotip pacijenata sa T2DM i karakteristike pacijenata

Da bi se utvrdilo da li su određene karakteristike pacijenata češće kod određenih genotipova, ispitana je distribucija pacijenata po genotipovima, a sve u odnosu na sledeće karakteristike pacijenata: starost, pol, trajanje bolesti, terapija i uhranjenost.

Distribucija pacijenata prema MMP9 genotipu u odnosu na karakteristike pacijenata je prikazana u Tabeli 34.

Tabela 34. Distribucija pacijenata prema MMP9 genotipu u odnosu na karakteristike pacijenata

		MMP 9						p vrednost
		CC		CT		TT		
		N	%	N	%	N	%	
Starost > 60 god.	ne	26	37.7%	10	45.5%	3	100.0%	0.114 ^b
	da	43	62.3%	12	54.5%	0	0.0%	
Pol	muški	46	66.7%	14	63.6%	1	33.3%	0.538 ^b
	ženski	23	33.3%	8	36.4%	2	66.7%	
Trajanje DM	1-5	23	33.3%	3	13.6%	2	66.7%	0.230 ^b
	6-10	16	23.2%	7	31.8%	0	0.0%	
	11+	30	43.5%	12	54.5%	1	33.3%	
Terapija	OAD	16	23.2%	3	13.6%	2	66.7%	0.073 ^b
	Insulin	7	10.1%	4	18.2%	1	33.3%	
	OAD + Insulin	46	66.7%	15	68.2%	0	0.0%	
BMI	normalno	12	17.4%	5	22.7%	2	66.7%	0.182 ^b
	uhranjeni							
	predgojazni	27	39.1%	11	50.0%	1	33.3%	
	gojazni	30	43.5%	6	27.3%	0	0.0%	
Pušenje	ne	53	76.8%	18	81.8%	2	66.7%	0.620 ^b
	da	16	23.2%	4	18.2%	1	33.3%	

^bFišerov test tačne verovatnoće

Pacijenata sa TT genotipom je jako malo, samo 3 pacijenta, pa su analize sa tim pacijentima upitne. Distribucija pacijenata sa CC i CT genotipovima je slična po starosti, polu, nešto je drugačija po trajanju DM, slična po terapiji, stepenu uhranjenosti i pušenju.

Distribucija pacijenata prema MMP9-1562C alelu u odnosu na karakteristike pacijenata je prikazana u Tabeli 35.

Tabela 35. Distribucija pacijenata prema MMP9-1562C alelu u odnosu na karakteristike pacijenata

		MMP 9-1562 C alel				p vrednost
		ne		da		
		N	%	N	%	
Starost > 60 god.	ne	3	100.0%	36	39.6%	0.068 ^b
	da	0	0.0%	55	60.4%	
Pol	muški	1	33.3%	60	65.9%	0.281 ^b
	ženski	2	66.7%	31	34.1%	
Trajanje DM	1-5	2	66.7%	26	28.6%	0.450 ^b
	6-10	0	0.0%	23	25.3%	
	11+	1	33.3%	42	46.2%	
Terapija	OAD	2	66.7%	19	20.9%	0.041 ^b
	Insulin	1	33.3%	11	12.1%	
	OAD + Insulin	0	0.0%	61	67.0%	
BMI	normalno uhranjeni	2	66.7%	17	18.7%	0.103 ^b
	predgojazni	1	33.3%	38	41.8%	
	gojazni	0	0.0%	36	39.6%	
Pušenje	ne	2	66.7%	71	78.0%	0.536 ^b
	da	1	33.3%	20	22.0%	

^bFišerov test tačne verovatnoće

Kao što je ranije navedeno, broj pacijenata koji nemaju C alel, odnosno pacijenata sa TT alelom je malo, pa su rezultati statističkih testova bez moći da otkriju značajnost tamo gde je možda i ima. Ipak, statističkom analizom, Fišerovim testom tačne verovatnoće je utvrđeno da postoji razlika po terapiji, a blizu konvencionalnog nivoa značajnosti je razlika po starosti.

Distribucija pacijenata prema MMP9-1562 T alelu u odnosu na karakteristike pacijenata je prikazana u Tabeli 36.

Tabela 36. Distribucija pacijenata prema MMP9-1562 T alelu u odnosu na karakteristike pacijenata

		MMP9-1562 T alel				p vrednost
		ne		da		
		N	%	N	%	
Starost > 60 god.	ne	26	37.7%	13	52.0%	0.213 ^a
	da	43	62.3%	12	48.0%	
Pol	muški	46	66.7%	15	60.0%	0.550 ^a
	ženski	23	33.3%	10	40.0%	
Trajanje DM	1-5	23	33.3%	5	20.0%	0.458 ^a
	6-10	16	23.2%	7	28.0%	
	11+	30	43.5%	13	52.0%	
Terapija	OAD	16	23.2%	5	20.0%	0.448 ^a
	Insulin	7	10.1%	5	20.0%	
	OAD + Insulin	46	66.7%	15	60.0%	
BMI	normalno uhranjeni	12	17.4%	7	28.0%	0.203 ^a
	predgojazni	27	39.1%	12	48.0%	
	gojazni	30	43.5%	6	24.0%	
Pušenje	ne	53	76.8%	20	80.0%	0.743 ^a
	da	16	23.2%	5	20.0%	

^aPirsonov hi kvadrat test

Iako je pacijenata sa T alelom u većem broju (CT i TT), nije dobijena statistička značajnost u distribuciji prisustva alela i karakteristika pacijenata, što ukazuje da se radi o pacijentima sličnih karakteristika (osim genotipa). Naime, slična je distribucija po starosti, polu, trajanju bolesti, terapiji, uhranjenosti i pušenju u ove dve ispitivane grupe.

Distribucija pacijenata prema MMP2- genotipu u odnosu na karakteristike pacijenata je prikazana u Tabeli 37.

Tabela 37. Distribucija pacijenata prema MMP2 genotipu u odnosu na karakteristike pacijenata

		MMP 2						p vrednost
		CC		CT		TT		
		N	%	N	%	N	%	
Starost > 60 god.	ne	22	36.7%	13	54.2%	2	66.7%	0.221 ^b
	da	38	63.3%	11	45.8%	1	33.3%	
Pol	muški	36	60.0%	18	75.0%	3	100.0%	0.204 ^b
	ženski	24	40.0%	6	25.0%	0	0.0%	
Trajanje DM	1-5	18	30.0%	6	25.0%	1	33.3%	0.607 ^b
	6-10	13	21.7%	9	37.5%	1	33.3%	
	11+	29	48.3%	9	37.5%	1	33.3%	
Terapija	OAD	12	20.0%	8	33.3%	1	33.3%	0.455 ^b
	Insulin	7	11.7%	4	16.7%	0	0.0%	
	OAD + Insulin	41	68.3%	12	50.0%	2	66.7%	
BMI	normalno uhranjeni	13	21.7%	6	25.0%	0	0.0%	0.597 ^b
	predgojazni	23	38.3%	12	50.0%	1	33.3%	
	gojazni	24	40.0%	6	25.0%	2	66.7%	
Pušenje	ne	51	85.0%	14	58.3%	2	66.7%	0.027 ^b
	da	9	15.0%	10	41.7%	1	33.3%	

^bFišerov test tačne verovatnoće

Na osnovu distribucije pacijenata, prikazane u tabeli, vidi se da u najstariji pacijenti sa CC genotipom. Trajanje T2DM je takođe naduže u ovoj grupi, ali nema statističke značajnosti u ovim analizama, prevashodno zbog malog broja pacijenata u TT genotip grupi. CC genotip grupa ima statistički značajno manje pušača, kao jedinu razliku koja je i statistički značajna.

Distribucija pacijenata prema MMP2-1306C alelu u odnosu na karakteristike pacijenata je prikazana u Tabeli 38.

Tabela 38. Distribucija pacijenata prema MMP2-1306C alelu u odnosu na karakteristike pacijenata

		MMP2-1306 C alel				p vrednost
		ne		da		
		N	%	N	%	
Starost > 60 god.	ne	2	66.7%	35	41.7%	0.572 ^b
	da	1	33.3%	49	58.3%	
Pol	muški	3	100.0%	54	64.3%	0.548 ^b
	ženski	0	0.0%	30	35.7%	
Trajanje DM	1-5	1	33.3%	24	28.6%	1.000 ^b
	6-10	1	33.3%	22	26.2%	
	11+	1	33.3%	38	45.2%	
Terapija	OAD	1	33.3%	20	23.8%	1.000 ^b
	Insulin	0	0.0%	11	13.1%	
	OAD + Insulin	2	66.7%	53	63.1%	
BMI	normalno uhranjeni	0	0.0%	19	22.6%	0.603 ^b
	predgojazni	1	33.3%	35	41.7%	
	gojazni	2	66.7%	30	35.7%	
Pušenje	ne	2	66.7%	65	77.4%	0.548 ^b
	da	1	33.3%	19	22.6%	

^bFišerov test tačne verovatnoće

Zbog veoma malog broja pacijenata u grupi koja nema C alel, očekivano je da nema statističke značajnosti.

Distribucija pacijenata prema MMP2-1306T alelu u odnosu na karakteristike pacijenata je prikazana u Tabeli 39.

Tabela 39. Distribucija pacijenata prema MMP2-1306T alelu u odnosu na karakteristike pacijenata

		MMP 2-1306 T alel				p vrednost
		ne		da		
		N	%	N	%	
Starost > 60 god.	ne	22	36.7%	15	55.6%	0.099 ^a
	da	38	63.3%	12	44.4%	
Pol	muški	36	60.0%	21	77.8%	0.107 ^a
	ženski	24	40.0%	6	22.2%	
Trajanje DM	1-5	18	30.0%	7	25.9%	0.316 ^a
	6-10	13	21.7%	10	37.0%	
	11+	29	48.3%	10	37.0%	
Terapija	OAD	12	20.0%	9	33.3%	0.314 ^a
	Insulin	7	11.7%	4	14.8%	
	OAD + Insulin	41	68.3%	14	51.9%	
BMI	normalno uhranjeni	13	21.7%	6	22.2%	0.612 ^a
	predgojazni	23	38.3%	13	48.1%	
	gojazni	24	40.0%	8	29.6%	
Pušenje	ne	51	85.0%	16	59.3%	0.008 ^a
	da	9	15.0%	11	40.7%	

^aPirsonov hi kvadrat test

Pacijenti koji ne nose T alel u većem procentu su stariji, više ima žena, sa dužim trajanjem T2DM i u većem procentu gojazniji, ali sve bez statističke značajnosti. Jedina značajna razlika je u distribuciji pušača, odnosno u većem procentu pušača u slučaju prisustva T alela.

4.6. Regresioni modeli sa komplikacijama T2DM kao zavisnim varijablama

Na kraju, urađena je regresiona analiza uticaja genotipa na pojavu komplikacija bolesti, bilo u vidu univarijabilne analize, bilo kao multivarijabilna analiza, prilagođena za starost, pol i trajanje dijabetesa.

Regresioni modeli sa retinopatijom su prikazani u Tabeli 40.

Tabela 40. Regresioni modeli sa retinopatijom

	Univarijabilna analiza		Multivarijabilna analiza ^{adj}	
	OR (95% IP)	p vrednost	OR (95% IP)	p vrednost
MMP 9				
CC	1		1	
CT	1.322 (0.456-3.762)	0.601	1.075 (0.338-3.419)	0.903
TT	1.417 (0.121-16.580)	0.781	1.961 (0.089-43.331)	0.670
MMP 9 C alel	0.758 (0.066-8.728)	0.824	0.518 (0.024-11.370)	0.677
MMP 9 T alel	1.333 (0.492-3.615)	0.572	1.138 (0.375-3.458)	0.819
MMP 2				
CC	1		1	
CT	1.642 (0.496-5.157)*	0.498	2.015 (0.524-7.895) *	0.376
TT	0.889 (0-8.689)*	0.928	0.351 (0-4.758) *	0.447
MMP 2 C alel	1.326 (0.138- +inf)*	0.824	3.555 (0.346- +inf) *	0.346
MMP 2 T alel	1.383 (0.499-3.836)	0.533	1.490 (0.470-4.726)	0.499

*egzaktna logistička regresija ^{adj}Analiza prilagođena za starost, pol i trajanje bolesti

Rezultati univarijabilne regresione analize pokazuju da nema statistički značajne povezanosti MMP9 i MMP 2 genotipova (kao i njihovih alela) sa retinopatijom. Multivarijabilnom logističkom regresionom analizom, sa prilagođavanjem za pol, starost i trajanje dijabetesa, nije dobijena statistička značajnost navedenih prediktora. Zbog 0 frekvencija u pojedinim analizama, egzaktna logistička regresija je urađena.

Regresioni modeli sa nefropatijom su prikazani u Tabeli 41.

Regresioni modeli sa nefropatijom	Univarijabilna analiza		Multivarijabilna analiza	
	OR (95% IP)	p vrednost	OR (95% IP)	p vrednost
Tabela 41.				
MMP 9				
CC	1		1	
CT	0.774 (0.250-2.392)	0.655	0.683 (0.211-2.204)	0.523
TT	5.263 (0.451-61.474)	0.185	15.380 (0.929-254.7)	0.056
MMP 9 C alel	0.179 (0.016-2.066)	0.168	0.060 (0.004-0.986)	0.049
MMP 9 T alel	1.023 (0.369-2.839)	0.965	0.995 (0.347-2.855)	0.993
MMP 2				
CC	1		1	
CT	0.617 (0.156-2.078) *	0.571	0.577 (0.141-2.023)	0.511
			*	
TT	0.630 (0-6.117)*	0.715	0.364 (0-4.553) *	0.535
MMP 2 C alel	1.409 (0.147- +inf)*	0.786	1.854 (0.192- +inf)*	0.619
MMP 2 T alel	0.530 (0.174-1.620)	0.266	0.466 (0.146-1.493)	0.199

*egzaktna logistička regresija ^{adj}Analiza prilagođena za starost, pol i trajanje bolesti

Na osnovu rezultata univarijabilne regresione analize se vidi da nema statistički značajne povezanosti MMP9 i MMP 2 genotipova (kao i njihovih alela) sa nefropatijom. U multivarijantnom modelu MMP9 C alel, kada se prilagodi za starost, pol i trajanje bolesti postaje značajan na nivou značajnosti 0.05, dok TT genotip takođe postaje značajan, odnosno ima p vrednost na samoj granici konvencionalnog nivoa značajnosti (ali sa izuzetno širokim intervalom poverenja, pa je rezultat diskutabilan).

Regresioni modeli sa polineuropatijom kao zavisnom su prikazani u Tabeli 42.

Tabela 42. Regresioni modeli sa polineuropatijom kao zavisnom

	Univarijabilna analiza		Multivarijabilna analiza	
	OR (95% IP)	p vrednost	OR (95% IP)	p vrednost
MMP 9				
CC	1		1	
CT	1.145 (0.430-3.049)	0.786	0.897 (0.305-2.633)	0.842
TT	0.827 (0.071-9.576)	0.879	0.489 (0.017-14.264)	0.678
MMP 9 C alel	1.250 (0.109-14.303)	0.858	1.998 (0.070-57.316)	0.686
MMP 9 T alel	1.103 (0.432-2.813)	0.838	0.854 (0.301-2.421)	0.766
MMP 2				
CC	1		1	
CT	0.618 (0.223-1.714)	0.355	0.738 (0.243-2.237)	0.591
TT	0.750 (0.064-8.738)	0.818	0.573 (0.033-10.073)	0.703
MMP 2 C alel	1.170 (0.102-13.435)	0.900	1.586 (0.091-27.539)	0.752
MMP 2 T alel	0.632 (0.238-1.673)	0.355	0.719 (0.246-2.101)	0.547

Na osnovu rezultata univarijabilne regresione analize se vidi da nema statistički značajne povezanosti MMP9 i MMP 2 genotipova (kao i njihovih alela) sa polineuropatijom. Multivarijabilnom regresionom analizom, sa prilagođavanjem za starost, pol i trajanje bolesti, nije došlo do značajne promene koeficijenata, niti je dobijena statistička značajnost u nekom od modela.

5. Diskusija

Hronične komplikacije dijabetesa, pre svega vaskularne, su glavni razlog visokog morbiditeta i mortaliteta pacijenata sa diabetes mellitusom. Kako je DM danas ogroman medicinski, socijalni i ekonomski problem, a kako se smatra da će se broj obolelih značajno povećati i da će do 2045. godine porasti na 783 miliona jasno je koliki je značaj prevencije, ranog otkrivanja i prevencije nastanka dijabetesnih komplikacija. Incidenca i prevalenca dijabetesnih komplikacija takođe raste i značajno utiče na smanjen kvalitet života pacijenata sa dijabetesom kao i na povećan morbiditet i značajno smanjen životni vek ovih pacijenata.

Velike studije su pokazale i kod T1DM i T2DM, da dobra metabolička kontrola šećerne bolesti značajno smanjuje rizik za nastanak mikrovaskularnih komplikacija. Tako je u UKPDS studiji, najvećoj do sada studiji sa novootkrivenim pacijentima sa T2DM koji su praćeni više od deset godina pokazano da je smanjenje HbA1c za samo 1% dovelo do redukcije nastanka mikrovaskularnih komplikacija čak za 31 % (10). Danas, bez obzira na savremenu terapiju i nove terapijske agense skoro 50 % pacijenata ne dostiže ciljne vrednosti parametara metaboličke kontrole koje bi isle u prilog dobro regulisanom DM (345). Pokazalo se da je pogotovu značajno što pre, već pri postavljanju dijagnoze DM ići sa intenziviranom terapijom kako bi se postigla adekvatna glikoregulacija. Međutim, bez obzira na dobro održavanu glikemijsku kontrolu pokazano je postojanje pa čak i intenziviranje dijabetesnih komplikacija što je uvelo jedan novi pojam u fokus koji se označava kao metabolička memorija. Ovaj koncept metaboličke memorije je praktično nastao kao rezultat velikih kliničkih studija u kojima je pokazano da rana i intenzivirana glikemijska intervencija rezultira u prevenciji dijabetesnih komplikacija i značajno smanjenom morbiditetu od kardiovaskularnih oboljenja (346,347).

Međutim, pokazano je da kod pacijenata sa DM, bez obzira na dobru glikoregulaciju kao i dobru kontrolu ostalih faktora rizika, može doći do razvoja mikrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti što stavlja genetsku predispoziciju u prvi plan (27). Genetska predispozicija za razvoj samog DM je takođe poznata godinama unazad. Tako je pokazano da je predispozicija za nastanak T2DM kod jednojajčanih blizanaca 3-4 puta veća nego u opštoj populaciji (348). Pokazano je i da je rizik za nastanak T2DM kod osoba čiji jedan roditelj ima dijabetes za 30-40 % veći a kod osoba kod kojih oba roditelja imaju dijabetes rizik je veći za 70 % (349).

Takođe je poznato da je genetska predispozicija jako bitna i u nastanku vaskularnih komplikacija DM. Pokazano je da je ona ima ulogu i u nastanku mikro- ali i makrovaskularnih komplikacija. Tako se zna da je osetljivost za razvoj dijabetesne nefropatije, dijabetesne retinopatije, pa čak i nekih kardiovaskularnih oboljenja značajno veća kod pacijenata sa DM koji imaju neke genetske rizike (38, 40, 41,350,351,352).

Zbog toga je veoma značajno, zbog boljeg poznavanja nastanka ali i progresije vaskularnih komplikacija dijabetesa, usresrediti se na genetski aspekt ovih komplikacija, na prepoznavanje gena kandidata koji imaju ulogu u nastanku ovih komplikacija, proučavanje genskih polimorfizama koji nam mogu dati najbolje rezultate o genetičkoj suseptibilnosti tj. osetljivosti za razvoj komplikacija DM.

U poslednje vreme su sve više u fokusu novi patogenetski mehanizmi koji leže u osnovi šećerne bolesti tj. njenih vaskularnih komplikacija i u njima sve značajnije mesto zauzimaju matriksne metaloproteinaze. Matriksne metaloproteinaze su grupa enzima koja, pre svega, ima ulogu u remodelovanju ekstracelularnog matriksa. Pokazano je da kod osoba sa DM postoji poremećena ekspresija gena za MMP kao i poremećena aktivnost ovih enzima od kojih su u dijabetesu najviše proučavana dva i to: MMP-2 i MMP-9. Hiperglikemija različitim mehanizmima dovodi do poremećene sinteze i aktivnosti MMP. Hronična izloženost hiperglikemiji vodi povećanoj sintezi i latentnih i aktivnih oblika kako MMP-2 tako i MMP-9 (259).

Uloga MMP u nastanku vaskularnih komplikacija DM, kako makro- tako i mikrovaskularnih je sve više predmet proučavanja.

Cilj našeg istraživanja je bio da se utvrdi da li polimorfizam gena tj. dve najčešće genetske varijante za MMP-2 i MMP-9 ima ulogu u nastanku mikrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti i to: dijabetesne retinopatije, nefropatije i polineuropatije. Sve dosadašnje studije su ispitivale neki od polimorfizama MMP sa nastankom samo jedne od ove tri mikrovaskularne komplikacije DM, tako da je ovo prva studija koja uzima u obzir polimorfizam ovih gena i sve tri komplikacije.

U našu studiju, koja je bila dizajnirana kao studija preseka, je bilo uključeno 153 ispitanika, od čega je 97 njih bilo sa dijagnozom T2DM, a zdravu kontrolnu grupu je činilo 56 ispitanika, bez DM, koji se nisu razlikovali po životnoj dobi, i po polnoj zastupljenosti od pacijenata sa DM. Nešto manji broj zdravih kontrola u odnosu na pacijente sa DM ustvari nije bio značajan jer je praktično kohorta pacijenata sa DM bila zastupljena u tri grupe u odnosu na svaku od mikrovaskularnih komplikacija DM tako da nije bilo značajne razlike u odnosu na broj pacijenata po grupama. Svi pacijenti su bili hospitalizovani ili u dnevnoj bolnici KO za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KBC Zvezdara ili na stacionaru odeljenja, jer su pored predviđenih laboratorijskih ispitivanja (i naknadnih genetičkih) bili neophodni i konsultativni pregledi neurologa i oftalmologa naše ustanove u cilju postavljanja dijagnoze dijabetesne polineuropatije tj. retinopatije ili evaluacije već postojeće.

Ispitivana populacija pacijenata sa DM je bila relativno tipična za T2DM: prosečna životna dob je iznosila $61,2 \pm 7,4$ godine, prosečnog trajanja bolesti $10,1 \pm 5,8$ godina. Jedna trećina pacijenata je imala trajanje DM do 5 godina, jedna četvrtina od 5-10 godina a 45% je imalo trajanje DM preko 10 godina. Ovakva distribucija nam je bila važna jer je dužina trajanja bolesti jedan od standardnih, tradicionalnih faktora rizika za nastanak mikrovaskularnih komplikacija pa smo na taj način izbegli mogućnost manje zastupljenosti neke od komplikacija kod pacijenata sa DM.

Obzirom na dužinu trajanja dijabetesa i terapijski režimi na kojima su bili pacijenti su bili očekivani. Skoro jedna četvrtina pacijenata je bila samo na oralnim antidijabeticima, na kombinovanoj terapiji insulinoma i OAD je bilo najviše pacijenata (63.9 %) a najmanje je bilo samo na insulinskoj terapiji i to 12.4 %. Ovako veliki broj pacijenata na insulinskoj terapiji je očekivan jer je dužina trajanja DM takva da se i očekivalo da je veliki broj već prešao na insulinski režim. Pacijenti sa DM nisu bili dobro regulisani, prosečna vrednost HbA1c koji nam je najznačajniji parameter metaboličke kontrole je bio u nezadovoljavajućem opsegu (prosečna vrednost $9.37 \pm 2.18\%$) i govorio za lošu kontrolu. Vrednost glikemije naše je bila zadovoljavajuća i iznosila je 6.86 ± 1.91 mmol/l. Lipidni status pacijenata je bio zadovoljavajući.

Prvi cilj našeg istraživanja je bio da se proceni kolika je zastupljenost genskih polimorfizama za MMP-2 i MMP-9 u populaciji pacijenata sa T2DM, a kolika u zdravoj populaciji ispitanika i da li postoji eventualna razlika u njihovoj zastupljenosti između pacijenata sa T2DM i zdravih kontrola. Ispitivana je učestalost dve najčešće genske varijante i to MMP-2 -1306C>T i MMP-9-1562C>T.

Što se tiče genske varijante MMP-2 -1306C>T naši rezultati su pokazali da postoji statistički značajna razlika u distribuciji genotipova u ispitivanim grupama. U grupi pacijenata sa T2DM distribucija genotipova je bila sledeća: CC:CT:TT- 69%:27.6%:3.4% a u kontrolnoj grupi 48.2%:44.7%:7.1%. Pokazano je da je CC genotip za 20 % češći kod osoba sa T2DM a da je CT genotip takođe za 20 % ređi kod T2DM nego u zdravoj grupi ispitanika. Što se tiče distribucije alela, pokazano je da je 96.6% pacijenata sa T2DM imalo C alel kao i 92.6% pacijenata iz kontrolne frupe imalo T alel i ta razlika nije bila statistički značajna. Međutim, logističkom regresionom analizom je pokazano da osoba koja nema T alel ima 2,1 puta veću šansu da dobije T2DM nego osobe koje imaju T alel, što znači da T alel pruža zaštitu u odnosu na nastanak T2DM.

Rezultati naše studije se poklapaju sa rezultatima Sarray et al (353) , koji je u retrospektivnoj studiji iz 2021. god, na 310 normoglikemičnih zdravih kontrola i 791 pacijentom sa T2DM takođe pokazao da je genska varijanta-1306C>T u genu za MMP-2 povezana sa većim rizikom za nastanak T2DM, tj. da prisustvo T alela ima zaštitnu ulogu u nastanku DM.

Pacijenti sa različitim genotipovima su imali i različite kliničke karakteristike, Tako se vidi da su najstariji pacijenti bili pacijenti sa CC genotipom (njih 63 % je bilo životne dobi preko 60 godina) a kod ovih pacijenata je očekivano bilo i najduže trajanje šećerne bolesti .Međutim ove razlike nisu bile statistički značajne.

Ali ono što je imalo statističku značajnost je manji broj pušača kod pacijenata sa ovim genotipom. 85 % pacijenata sa CC genotipom su bili nepušači a svega 15 % pušači (p=0.027). Kada je distribucija pacijenata po različitim alelima u pitanju, vidi se da su pacijenti koji nemaju T alel u većem procentu stariji, više ima žena, sa dužim trajanjem DM i u većem procentu gojazniji, ali sve bez statističke značajnosti. Jedina značajna razlika je u distribuciji pušača, odnosno u većem procentu pušača u slučaju prisustva T alela.

Kada je u pitanju genska varijanta MMP-9-1562C>T u našoj studiji nije nađena značajna razlika ni u distribuciji genotipova ni alela između pacijenata sa T2DM i zdravih kontrola. Distribucija genotipova za ovu gensku varijantu je bila CC: CT: TT -73.4%:23.4%:3.2% kod pacijenata sa T2DM a u kontrolnoj grupi taj odnos je bio 71.4%:28.6%:0%. Što se tiče distribucije alela 96.8 % u grupi pacijenata sa T2DM je imalo C alel, dok su u kontrolnoj grupi svi ispitanici imali ovaj alel. Distribucija pacijenata sa CC i CT genotipovima je slična po starosti, polu, nešto je drugačija po trajanju DM (bez statističke značajnosti), slična po terapiji, uhranjenosti i pušenju. Prisustvo C alela je bilo značajno veće kod pacijenata koji su bili na insulinskoj terapiji, dok je prisustvo T alela bilo podjednako u odnosu na ove kliničke karakteristike pacijenata i dužinu trajanja DM.

Ovakvi rezultati se poklapaju sa rezultatima studije Wang et al. (354) koja je radjena na 360 pacijenata sa T2DM i 160 zdravih kontrola i gde je distribucija genotipova kako u zdravoj tako i u grupi pacijenata sa T2DM i bez makroangiopatskih komplikacija bila slična kao u našoj studiji (CC: CT: TT -76.3%:21.3%:2.5% u grupi sa DM).

Sledeći ciljevi naše studije su bili da se ispita da li postoji povezanost između navedenih polimorfizama u genu za MMP-2 i MMP-9 i prisutva mikrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti.

Dijabetesna retinopatija je mikrovaskularna komplikacija šećerne bolesti koja se javlja kod jedne trećine pacijenata sa DM i koja je najčešći razlog gubitka vida kod radno sposobne populacije. Patogenetski mehanizmi koji leže u osnovi ove dijabetesne komplikacije, kao i drugih, su brojni. Smatra se da je uloga MMP-2 i MMP-9 u nastanku dijabetesne retinopatije veoma značajna i to ne samo u nastanku, već i u progresiji. Mehanizmi kojima MMP dovode do promena na retini su brojni a zasnivaju se pre svega na njihovoj ulozi u apoptozi pericita, proinflamatornom i proangiogenom delovanju. MMP-2 i MMP-9 dovode do disfunkcije mitohondrija što je osnova apoptoze ćelija koja je dokazana u DR (265).

U našoj ispitivanoj grupi od 97 pacijenata sa T2DM, njih 26 je imalo dijabetesnu retinopatiju što je činilo 26.8 % (od toga 6 pacijenata sa proliferativnom retinopatijom i 20 sa neproliferativnom ali su svi pacijenti statistički obrađivani kao jedan uzorak pacijenata sa promenama na retini, zbog malog broja u grupi sa proliferativnom retinopatijom). Retinopatija je bila nešto češća kod muškaraca, ali ta razlika nije bila statistički značajna. Ono što je značajno uticalo na nastanak DR jeste bilo trajanje T2DM i pokazano je da je kod pacijenata koji su imali trajanje šećerne bolesti između 5-10 godina njih trećina (33.3%) je imalo ovu komplikaciju, a skoro 40 % pacijenata koje je imalo DR je imalo trajanje T2DM duže od deset godina. Ovo je u skladu sa ranijim saznanjima da dužina trajanja DM utiče na nastanak DR (26,27). Pacijenti koji su bili na insulinskoj terapiji (samo na insulinu ili na kombinaciji insulina i oralnih antidijabetika) su takođe statistički značajno imali više dijabetesnu retinopatiju, što se opet povezuje sa dužim trajanjem bolesti.

Rezultati naše studije nisu pokazali da postoji povezanost između 1306C>T varijante u MMP-2 genu i postojanja dijabetesne retinopatije. Nije pokazana značajna razlika u distribuciji genotipova između pacijenata sa DR i onih bez nje. U grupi pacijenata sa T2DM koji su imali DR distribucija genotipova je bila sledeća: CC:CT:TT - 63.6 %:36.4%:0%. U grupi pacijenata sa T2DM ali bez DR distribucija genotipova je bila > CC:CT:TT – 70.8%:24.6%:4.6%. Ova razlika nije bila statistički značajna.

Nije bilo značajne razlike ni u distribuciji C i T alela. Distribucija C alela je praktično bila istovetna u grupi pacijenata sa DR i bez nje, jer samo tri pacijenta iz grupe koja nije imala DR nije imalo C alel, dok su svi ostali ispitanici i sa DR i bez nje imali C alel. Ovo na neki način limitira rezultate vezane za ovu gensku varijantu i nastanak dijabetesne retinopatije što ukazuje i na nedovoljno veliki uzorak pacijenata sa DR. Što se tiče distribucije T alela u grupi pacijenata koji imaju DR 36,4% je imalo T alel a u grupi pacijenata bez DR T alel je imalo 29.2 % . Ova razlika u distribuciji T alela takođe nije bila statistički značajna.

Kada je u pitanju genska varijanta MMP-9-1562C>T u našoj studiji nije nađena značajna razlika ni u distribuciji genotipova ni alela između pacijenata sa dijabetesnom retinopatijom i bez nje. Distribucija genotipova za ovu gensku varijantu kod pacijenata koji su imali DR je bila sledeća: CC:CT:TT -69.2%:26.9%:3.9% dok je u grupi pacijenata sa t2DM ali bez DR taj odnos bio 75%:22%:3%. Nije bilo statistički značajne razlike ni u distribuciji C i T alela. C alel je bio dominantan i u grupi pacijenata sa DR i bez nje.

Na osnovu rezultata univarijabilne regresione analize se vidi da nema statistički značajne povezanosti MMP-9 i MMP -2 genotipova (kao i njihovih alela) sa retinopatijom, dok korekcijom datih vrednosti za pol, starost i dužinu trajanja dijabetesa (metodom multivarijabilne logističke regresione analize) takođe nije dobijena statistička značajnost navedenih prediktora.

Do sada je urađeno samo nekoliko studija koje su ispitivale navedene genske varijante za MMP-2 i MMP-9 i pojavu dijabetesne retinopatije ali su dobijeni kontradiktorni rezultati.

U studiji Yang et al (337) koja je rađena na 301 pacijentu (151 pacijent sa DR i 150 zdravih pacijenata) ispitivana je povezanost dve genske varijante za MMP-2, između ostalog i 1306C>T MMP-2 i nastanka dijabetesne retinopatije. Studija je pokazala da nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji genotipova i alela za ovaj SNP između pacijenata sa DR i zdravih kontrola što se poklapa sa rezultatima naše studije. Ono što je pokazano u ovoj studiji, je da nosioci CC genotipa imaju dva puta veći rizik za nastanak DR što mi nismo dobili kao rezultat, verovatno usled manjeg uzorka pacijenata sa DR..

U studiji Beraneka et al (338) pokazano je da su koncentracije MMP-2 u plazmi bile statistički značajno više kod pacijenata sa proliferativnom retinopatijom i to onih koji su bili nosioci CC ili CT genotipa za 1306C>T MMP-2 gensku varijantu. U ovoj studiji nije pokazana razlika u distribuciji genotipova i alela između ispitivanih grupa (pacijenata sa DR i zdravih kontrola) što se poklapa sa rezultatima naše studije.

U studiji Singh et al (339) koja je rađena na 645 pacijenata (325 zdravih kontrola, 149 pacijenata sa DM ali bez DR, 98 pacijenata sa neproliferativnom retinopatijom i 73 pacijenta sa proliferativnom retinopatijom) ispitivana je povezanost MMP-9-1562C>T genske varijante i nastanka proliferativne retinopatije. Potvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipova i alela za ovaj SNP i to između zdrave, kontrolne grupe i pacijenata sa proliferativnom retinopatijom i potvrđeno da visoka ekspresija T alela vodi angiogenezi retine i progresiji DR. Naša studija nije dala ovakve rezultate.

Dijabetesna nefropatija, kao jedna od najtežih komplikacija DM, je najčešći razlog nastanka terminalne bubrežne insuficijencije i značajan razlog velikog morbiditeta i mortaliteta pacijenata sa DM. Kakva je uloga matriksnih metaloproteinaza u razvoju dijabetesne nefropatije još uvek nije dovoljno razjašnjeno ali je poznato da one imaju ulogu u raznim procesima u razvoju DN od proliferacije mezangijuma, preko aktivacije brojnih faktora rasta dovodeći do proliferacije ćelija tubularnog epitela i na kraju fibroze bubrega. Uloga MMP-2 i MMP-9 u nastanku DN je nesumnjiva ali su rezultati dobijeni iz studija kontradiktorni. Neke studije su pokazale povećanu ekspresiju gena za MMP-2 kao i njenu povećanu enzimsku aktivnost, pre svega u fazi proliferacije mezangijuma (286,287). Neke studije, su, pak, pokazale smanjenu ekspresiju gena za MMP-2 i njenu smanjenu enzimsku aktivnost nakon početne, povećane ekspresije (283, 284), dok su neke pokazale smanjenu ekspresiju gena za MMP-2 u kasnijim fazama DN (285). Ekspresija gena za MMP-9 takođe može biti povećana (289), ili naizmenično povećana pa smanjena u zavisnosti od dužine trajanja DM(290).

Neke studije (pre svega na eksperimentalnom modelima), nisu pokazale značajne razlike u ekspresiji gena za MMP-2 i MMP-9 kod eksperimentalnih životinja sa DN i zdravih kontrola.

U našoj studiji 26 pacijenata je imalo dijabetesnu nefropatiju što je činilo 26.8 % pacijenata sa T2DM. Naši pacijenti sa dijabetesnom nefropatijom su bili starije životne dobi, više muškog pola, dužeg trajanja šećerne bolesti i više na insulinskoj terapiji, ali nijedan od ovih parametara se nije statistički značajno razlikovao u odnosu na pacijente sa T2DM koji nisu imali dijabetesnu nefropatiju.

I kod pacijenata sa dijabetesnom nefropatijom smo ispitivala povezanost dva SNP i to za MMP-2 (1306C>T) i MMP-9 (-1562C>T) sa nastankom dijabetesne nefropatije.

U našoj studiji nije nađena povezanost između genske varijante MMP-2 -1306C>T i postojanja dijabetesne nefropatije niti je nađena razlika u distribuciji genotipova i alela za ovu gensku varijantu. U grupi pacijenata sa T2DM koji su imali DN distribucija genotipova je bila sledeća: CC:CT:TT – 78.3%:21.7%:0% a kod pacijenata bez DM distribucija je bila sledeća: CC:CT:TT – 65.6%:29.7%:4.7%. U grupi pacijenata sa T2DM ali bez DR distribucija genotipova je bila: CC:CT:TT – 70.8%:24.6%:4.6%. Ova razlika nije bila statistički značajna. Nije nađena ni statistički značajna razlika u distribuciji C i T alela u obe ispitivane grupe.

Na našem uzorku nismo našli povezanost genske varijante MMP-9-1562C>T sa nastankom dijabetesne nefropatije, kao ni značajnu razliku u distribuciji genotipova i alela između pacijenata sa dijabetesnom nefropatijom i bez nje. Distribucija genotipova za ovu gensku varijantu kod pacijenata sa DN je bila sledeća: CC:CT:TT – 73.1%:19.2%:7.7%, a kod pacijenata bez DN CC:CT:TT – 73.5%:25%:1.5%. Nije bilo razlike ni u distribuciji T i C alela u obe grupe ispitanika.

Malo studija je urađeno koje su ispitivale polimorfizam gena za MMP-2 i MMP-9 i nastanak dijabetesne nefropatije.

U studiji Gantala et al (340) koja je rađena na 310 pacijenata sa dijabetesnom nefropatijom i 310 zdravih kontrola ispitivan je polimorfizam više gena i to MMP-1, MMP-2 i MMP-3 i povezanost ovih polimorfizama sa nastankom dijabetesne nefropatije. Za gensku varijantu MMP-2 -1306C>T pokazano je da je značajno povezana sa nastankom dijabetesne nefropatije i da su nosioci C alela značajno bili osetljiviji za nastanak i progresiju dijabetesne nefropatije. Naša studija nije dala ovakve rezultate, verovatno zbog malog uzorka pacijenata sa t2DM i DN.

Dve studije su radene sa ispitivanjem povezanosti genske varijante MMP-9-1562C>T i nastanka dijabetesne nefropatije. Jedna studija urađena od strane Fenga et al (341) uključila je 310 pacijenata sa T2DM koji su bili podeljeni u dve grupe: pacijente sa dijabetesnom nefropatijom (njih 168) i bez nje a sa T2DM (njih 142), dok su kontrolnu grupu činili zdravi dobrovoljci kojih je bilo 100. Rezultat studije je bio da je ovaj SNP povezan sa nastankom dijabetesne nefropatije s tim što je T alel protektivan a nosioci C alela imaju značajno veću šansu za razvoj dijabetesne nefropatije.

Još jedna studija je ispitivala značaj MMP-9-1562C>T genskog polimorfizma u nastanku DN. Shalaby et al (342) su na manjem uzorku egipatske populacije takođe zaključili da nije bilo razlike u distribuciji genotipova i alela između ispitivane grupe pacijenata sa DN i zdravih kontrola. Iste rezultate smo dobili i u našoj studiji. Međutim pokazano je da je učestalost T alela u grupi pacijenata sa DN bila značajno niža te da T alel ima protektivnu ulogu što se tiče nastanka DN. To se objašnjava time da je ustvari transkripcija suprimirana što vodi povećanoj ekspresiji MMP-9 što opet za rezultat ima povećanu degradaciju ekstracelularnog matriksa, zakasnelu intersticijalnu fibrozu i glomerulsku sklerozu i na taj način odloženu progresiju DN (342).

Dijabetesna polineuropatija predstavlja najčešću mikrovaskularnu komplikaciju šećerne bolesti koja u nekom trenutku života pogađa čak 50 % pacijenata sa DM (140,141). Patogenetski mehanizmi koji leže u osnovi polineuropatije su takođe brojni. O ulozi MMP u nastanku dijabetesne polineuropatije se najmanje zna ali se dosta zna o usporenom zarastanju rana kod pacijenata sa DM gde MMP imaju veoma važnu ulogu. Naime, MMP u ovom procesu zarastanja rana imaju ulogu u otklanjanju devitaliziranog tkiva a zatim učestvuju i procesima reparacije koji su značajno usporeni povećanom aktivnošću inflamatornih citokina i smanjenom aktivnošću faktora rasta. Od citokina najznačajniji je IL-1 β koji vodi povećanoj sekreciji i aktivnosti MMP-2 i MMP-9 koji remodelujući ekstracelularni matriks dovode do neadekvatnog procesa reparacije rane (324).

U našoj ispitivanoj grupi od 97 pacijenata sa T2DM njih 37 je imalo dijabetesnu polineuropatiju što je činilo 38.1 % ispitivanog uzorka. Nastanak dijabetesne polineuropatije u našem uzorku nije bio u vezi sa godinama života, kao ni sa polom mada je prisustvo polineuropatije bilo nešto češće kod osoba ženskog pola. Međutim ova razlika nije bila statistički značajna. Ono što je bilo značajno povezano sa nastankom DP je dužina trajanja DM pa je više od 50 % pacijenata sa polineuropatijom imalo trajanje šećerne bolesti duže od deset godina. Takođe je i vrsta terapijskog režima bila u značajnoj korelaciji sa nastankom DN. Više od 90 % pacijenata sa DN bilo na insulinskoj terapiji (bilo samo insulin ili u kombinaciji sa OAD) što je očekivano jer duže trajanje bolesti sa sobom nosi i veći procenat pacijenata na insulinskoj terapiji.

U našoj studiji smo ispitivali povezanost obe genske varijante -1306C>T (MMP-2) i -1562C>T (MMP-9) sa nastankom dijabetesne polineuropatije.

Kod genske varijante MMP-2 -1306C>T nije nađena razlika u distribuciji genotipova i alela između pacijenata sa DPN i pacijenata sa T2DM ali bez dijabetesne polineuropatije. Kod pacijenata sa dijabetesnom polineuropatijom distribucija genotipova je bila CC:CT:TT-75%:21.9%:3.1% a kod pacijenata sa T2DM ali bez dijabetesne polineuropatije distribucija genotipova je bila 65.5%:30.9%:3.1%. Pacijenti sa T2DM bez obzira da li su imali dijabetesnu polineuropatiju ili ne, nisu imali razliku u distribuciji ni C alela ni T alela.

Ali ono što je pokazano, je da je MMP-2 varijanta -1306T ima negativnu korelaciju sa nastankom dijabetesne polineuropatije tj. da prisustvo C alela povećava verovatnoću za nastanak dijabetesne polineuropatije čak 3.2 puta dok prisustvo T alela ima protektivnu ulogu kada je razvoj dijabetesne polineuropatije u pitanju.

Kod genske varijante 1562C>T u genu za MMP-9 nije nađena razlika u distribuciji genotipova i alela između pacijenata sa DPN i pacijenata sa T2DM ali bez dijabetesne polineuropatije. . Kod pacijenata sa dijabetesnom polineuropatijom distribucija genotipova je bila CC:CT:TT- 72.2%:25%:2.8% a kod pacijenata bez DPN ta distribucija je bila CC:CT:TT- 74.1%:22.4%:3.5%. I ovde je jako mali broj pacijenata bio sa T alelom ali je jasno je da je distribucija pacijenata koji imaju polineuropatiju slična u genotipovima, pa je očekivano da nema statistički značajne razlike između ove dve grupe.

Samo jedna studija je rađena sa ispitivanjem SNP u MMP-9 genu u vezi sa nastankom dijabetesnog ulkusa. U studiji Singh et al (343) koja je rađena na 463 pacijenta sa DM i 267 zdravih kontrola pokazano je genska varijanta MMP-9-1562C>T bila povezana sa nastankom dijabetesnog ulkusa i to tako što je bila povezana sa povećanom produkcijom MMP-9 ukazujući na to da T alel značajno promoviše degradaciju ekstracelularnog matriksa.

Ovo je prvi put da se u našoj populaciji objavljuju podaci o učestalosti polimorfizama MMP-2 i MMP-9 u populaciji pacijenata sa diabetes mellitusom. Takođe, ovo je prva studija, po našem saznanju, ne samo kod nas, koja ispituje polimorfizme MMP-2 i MMP-9 i njihovu povezanost sa sve tri mikrovaskularne komplikacije DM tako da su u tom svetlu rezultati koje smo dobili značajni, iako pionirski. Povezanost polimorfizma MMP-2 (-1306C>T) i nastanka dijabetesne polineuropatije je rezultat koji je prvi put do sada objavljen a kako se o genetskoj predispoziciji za nastanak dijabetesne polineuropatije najmanje zna od svih ostalih mikrovaskularnih komplikacija onda to još više daje rezultatu na značaju. Na osnovu i naših rezultata, može se zaključiti da je MMP-2 bolji marker mikrovaskularnih oštećenja nego MMP-9 čija je uloga značajnija u nastanku ateroskleroze i razvoju makrovaskularnih komplikacija što su dosadašnje studije i pokazale (263,264).

Studije ispitivanja genskih polimorfizama sve više se koriste i u savremenoj diabetologiji jer je genetska osnova same bolesti ali i njenih komplikacija još uvek nedovoljno ispitana. Obzirom na to da se radi o najvećoj epidemiji hronične nezarazne bolesti koja sobom nosi veliki morbiditet i mortalitet, genetičke studije su sigurno ključ ka prevenciji komplikacija DM, naravno uz razvijanje novih terapijskih opcija koje će doprineti još boljoj glikoregulaciji i nefro i kardioprotekciji.

Ali, da bi rezultati tih genetičkih studija bili primenjiviji u kliničkoj praksi, neophodno je prevazići neke probleme koji pre svega leže u metodologiji ovih studija. Naime, neophodno je da ispitivani uzorci pacijenata budu veći, da se vodi računa o etničkim razlikama, što znači da bi za svaku etničku populaciju trebalo da postoji posebna baza podataka o najčešćim genetskim polimorfizmima koji su udruženi sa nastankom bolesti. Za pacijente sa DM, veoma je važno uzeti u obzir dužinu trajanja bolesti i praktično ne uključivati pacijente sa kraćim trajanjem koji mogu da dovedu do loše interpretacije rezultata već naprotiv pacijente sa dugim trajanjem DM i bez komplikacija uzeti kao kontrolnu grupu.

Samo sublimacijom rezultata iz kliničkih i genetičkih studija možemo definisati i nove markere za nastanak DM i njegovih vaskularnih komplikacija i na taj način otvoriti vrata individualizovanoj odn personalizovanoj terapiji DM koja je osnovni zahtev savremene diabetologije.

6. Zaključci

1. Polimorfizam gena za MMP-2 (-1306C>T) predstavlja značajan rizik za nastanak T2DM, tj. prisustvo C alela dvostruko povećava rizik za nastanak T2DM dok T alel pruža zaštitu u odnosu na nastanak T2DM.
2. Za genski polimorfizam za MMP-9 (-1562C>T) nije nađena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova, ni alela između pacijenata sa T2DM i zdravih kontrola
3. Nije nađena povezanost genske varijante MMP-9 (-1562C>T) sa nastankom dijabetesne retinopatije, dijabetesne nefropatije i dijabetesne polineuropatije.
4. Nije nađena povezanost genske varijante MMP-2 (-1306C>T) sa nastankom dijabetesne retinopatije i dijabetesne nefropatije
5. Genski polimorfizam za MMP-2 (-1306C>T) značajno korelira sa nastankom dijabetesne polineuropatije tj. prisustvo C alela povećava verovatnoću za nastanak dijabetesne polineuropatije čak 3.2 puta dok prisustvo T alela ima protektivnu ulogu kada je razvoj dijabetesne polineuropatije u pitanju.

7. Literatura

1. Classification of diabetes mellitus 2019. World Health Organization.
2. IDF Diabetes Atlas 10 th edition 2021.
3. Goh K, Tooke J. Abnormalities of the microvasculature. In: Wass J, Shalet S, Oxford textbook of endocrinology and diabetes. Oxford: Oxford University Press, 2002:1749
4. Pearce I, Simó R, Lövestam-Adrian M, Wong D.T, and Evans M. Association between diabetic eye disease and other complications of diabetes: Implications for care. A systematic review, Diabetes Obesity Metabolism, 2019; 21(3):467-478.
5. Crasto W, Patel V, Melanie J. Davies MJ, Khunti K. Prevention of Microvascular Complications of Diabetes. Endocrinol Metab Clin N Am. 2021;50(3): 431-455.
6. Lin, I. C. et al. Diabetic polyneuropathy and the risk of developing diabetic retinopathy: a nationwide, population-based study. Acta Ophthalmol. 93, 713–718 (2015).
7. Bell, D. S. et al. Microalbuminuria associated with diabetic neuropathy. Diabetes Care. 15, 528–531 (1992).
8. Brownrigg JRW, Hughes CO, Burleigh D, et al. Microvascular disease and risk of cardiovascular events among individuals with type 2 diabetes: A population-level cohort study. Lancet Diabetes Endocrinol 2016;4(7):553-555.
9. Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, Davis M, Rand L, Siebert C; Diabetes Control and Complications Trial Research Group . The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med. 1993;329(14):977–986
- 10 UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) Lancet. 1998;352:837–53.
- 11 Gabbay KH, Merola LO, Field RA: Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. Science 1966; 151:209-210.
12. Cumbie BC, Hermayer KL. Current concepts in targeted therapies for the pathophysiology of diabetic microvascular complications. Vasc Health Risk Manag. 2007;3(6):823-832.
13. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. Diabetes. 2005;54:1615–25.
14. Barrett EJ, Liu Z, Khamaisi M, et al. Diabetic Microvascular Disease: An Endocrine Society Scientific Statement. J Clin Endocrinol Metab. 2017;102(12):4343-4410.
15. Doria A. Genetics of Diabetes Complications. Curr Diab Rep. 2010; 10(6): 467–475.
16. Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. Diabetic retinopathy. N Engl J Med Overseas Ed 2012; 366:1227-39.

17. Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2012; 35: 556–564.
18. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*. 2013; 93(1):137-88.
19. Hirai FE, Tielsch JM, Klein BE, Klein R. Ten-year change in vision-related quality of life in type 1 diabetes: Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 2011;118: 353–358.
20. Roy MS, Klein R, O'Colmain BJ, Klein BE, Moss SE, Kempen JH. The prevalence of diabetic retinopathy among adult type 1 diabetic persons in the United States. *Arch Ophthalmol*:2004 122: 546–551.
21. Kempen JH, O'Colmain BJ, Leske MC, Haffner SM, Klein R, Moss SE, Taylor HR, Hamman RF. The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. *Arch Ophthalmol*.2004; 122: 552–563,.
22. Jerneld B, Algvere P. Relationship of duration and onset of diabetes to prevalence of diabetic retinopathy. *Am. J. Ophtalmol*. 1986; 102: 431–437.
23. Lee R., Wong T.Y., Sabanayagam C. Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss. *Eye Vis*. 2015;2:17.
24. Modjtahedi BS, Wu J, Luong TQ, et al. . Severity of diabetic retinopathy and the risk of future cerebrovascular disease, cardiovascular disease, and all-cause mortality. *Ophthalmology* 2021;128;1169–79.
25. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes*. 1995; 44: 968–983.
26. Matthews DR, Stratton IM, Aldington SJ, Holman RR, Kohner EM. Risks of progression of retinopathy and vision loss related to tight blood pressure control in type 2 diabetes mellitus UKPDS 69. *Arch. Ophthalmol*. 2004; 122(11): 1631–1640.
- 27 Liu Y, Yang J, Tao L, Lv H, Jiang X, Zhang M, et al. Risk factors of diabetic retinopathy and sight-threatening diabetic retinopathy: a cross-sectional study of 13 473 patients with type 2 diabetes mellitus in mainland China. *BMJ Open*. 2017 Sep;7(9).
28. S. Zoungas, H. Arima, H.C. Gerstein, *et al*. Effects of intensive glucose control on microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis of individual participant data from randomised controlled trials *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5(6):431-437.
29. Simó-Servat O, Hernández C, Simó R: Diabetic Retinopathy in the Context of Patients with Diabetes. *Ophthalmic Res* 2019;62:211-217.
30. Wong TY, Cheung CM, Larsen M, Sharma S, Simó R. Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 2:16012.
31. Zhou C, Wang K et al. relationship between dyslipidemia and diabetic retinopathy. A systematic review and meta-analysis *Medicine*. 2018; 97(36)-12283.

32. The diabetes control and complications trial research group . Effect of pregnancy on microvascular complications in the diabetes control and complications trial the diabetes control and complications trial research group . *Diabetes Care*.2000;23(8).
33. Nguyen T.T,Wang J.J, Wong T.Y.Retinal vascular changes in pre-diabetes and prehypertension. *Diabetes Care* 2007; 30 (10): 2708–2715.
34. Ponto K.A., Koenig J., Peto T., Lamparter J., Raum P., Wild P.S., Lackner K.J., Pfeiffer N., Mirshahi A. Prevalence of diabetic retinopathy in screening-detected diabetes mellitus: Results from the Gutenberg Health Study (GHS) *Diabetologia*. 2016;59:1913–1919.
35. American Diabetes Association; Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care*. 2022; 45 (1):5185-5188.
36. Arar NH, Freedman BI, Adler SG, Iyengar SK, Chew EY, Davis MD, et al.; Family Investigation of Nephropathy and Diabetes Research Group. Heritability of the severity of diabetic retinopathy: the FIND-Eye study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(9):3839–45.
37. Hietala K, Forsblom C, Summanen P, Groop PH; FinnDiane Study Group. Heritability of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2008 ;57(8):2176–80.
38. Leslie RD, Pyke DA. Diabetic retinopathy in identical twins. *Diabetes*. 1982 Jan;31(1):19–21.
39. Hallman DM, Huber JC Jr, Gonzalez VH, Klein BE, Klein R, Hanis CL. Familial aggregation of severity of diabetic retinopathy in Mexican Americans from Starr County, Texas. *Diabetes Care*. 2005 28(5):1163–8.
40. Monti MC, Lonsdale JT, Montomoli C, Montross R, Schlag E, Greenberg DA. Familial risk factors for microvascular complications and differential male-female risk in a large cohort of American families with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 ;92(12):4650–5.
41. Han J, Lando L, Skowronska-Krawczyk D, Chao DL. Genetics of Diabetic Retinopathy. *Current Diabetes Reports*. 2019;19:67.
42. Kuo JZ, Wong TY, Rotter JJ. Challenges in elucidating the genetics of diabetic retinopathy. *JAMA Ophthalmol*. 2014;132:96–107.
43. Das A, Stroud S, Mehta A, Rangasamy S. New treatments for diabetic retinopathy. *Diabetes,Obesity and Metabolism* 2015;17(3):219-230.
44. Lechner J, O'Leary O , Alan W. Stitt AW. The pathology associated with diabetic retinopathy. *Vision Research*. 2017;(139):7-14.
45. Klaassen I, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions *Progress in Retinal and Eye Research*,2013; 34:19-48.
46. Roy S, Ha J, Trudeau K, Beglova E. Vascular basement membrane thickening in diabetic retinopathy .*Current Eye Research*. 2010.;35(12): 1045-1056.
47. Kuwabara T, Cogan DG. Retinal vascular patterns. VI. Mural cells of the retinalcapillaries. *Arch Ophthalmol* 1963;69: 492–502.
48. Frank RN. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 2004;350: 48–58.

49. Rodríguez ML, Pérez S, Mena-Mollá S, Desco MC, Ortega ÁL. Oxidative Stress and Microvascular Alterations in Diabetic Retinopathy: Future Therapies. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;4940825.
50. Jousseaume A. M., Smyth N., Niessen C. Pathophysiology of diabetic macular edema. *Developments in Ophthalmology*. 2007;39:1–12.
51. Kowluru RA, Mishra M. Therapeutic targets for altering mitochondrial dysfunction associated with diabetic retinopathy. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(3):233-245.
52. Frank RN. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med*. 2004; 350(1):48-58.
53. Maier R, Weger M, Haller-Schober EM, El-Shabrawi Y, Wedrich A, Theisl A, et al. Multiplex bead analysis of vitreous and serum concentrations of inflammatory and proangiogenic factors in diabetic patients. *Mol Vis*. 2008;14:637–43.
54. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanism and clinical applications of angiogenesis. *Journal of Genetic J Genet*. 2009;88:495–515.
55. Kastelan S, Oreskovic I, Biscan F, Kastelan H, Gverovic Antunica A. Inflammatory and angiogenic biomarkers in diabetic retinopathy. *Biochem Med*. 2020;30(3):030502.
56. Wang W, Lo ACY. Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):1816.
57. Capitão M, Soares R. Angiogenesis and Inflammation Crosstalk in Diabetic Retinopathy. *J Cell Biochem*. 2016;117:2443–53.
58. Huang H., He J., Johnson D., Wei Y., Liu Y., Wang S., Luttj G.A., Duh E.J., Semba R.D. Deletion of placental growth factor prevents diabetic retinopathy and is associated with Akt activation and HIF1 α -VEGF pathway inhibition. *Diabetes*. 2015;64:200–212.
59. Simo R., Carrasco E., Garcia-Ramirez M., Hernandez C. Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr. Diabetes Rev*. 2006;2:71–98
60. Mrugacz M, Bryl A, Zorena K. Retinal Vascular Endothelial Cell Dysfunction and Neuroretinal Degeneration in Diabetic Patients. *J Clin Med*. 2021;10(3):458.
61. Myśliwiec M., Balcerska A., Zorena K., Myśliwska J., Lipowski P., Raczyńska K. The role of vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes Res. Clin. Pract*. 2008;79:141–146.
62. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9:669–76.
63. Rousseau S., Houle F., Landry J., Huot J. p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene*. 1997;15:2169–2177.

64. Ahuja S, Saxena S, Akduman L, Meyer CH, Kruzliak P, Khanna VK. Serum Vascular Endothelial Growth Factor Is a Biomolecular Biomarker of Severity of Diabetic Retinopathy. *Int J Retina Vitreous*. 2019;5:29.
65. Koleva-Georgieva DN, Sivkova NP, Terzieva D. Serum inflammatory cytokines IL-1beta, IL-6, TNF-alpha and VEGF have influence on the development of diabetic retinopathy. *Folia Med (Plovdiv)*. 2011;53:44–50.
66. Mitamura Y, Tashimo A, Nakamura Y, Tagawa H, Ohtsuka K, Mizue Y, et al. Vitreous levels of placenta growth factor and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2002;25:2352.
67. Zhou Z, Ju H, Sun M, Chen H. Serum Vascular Endothelial Growth Factor Levels Correlate with Severity of Retinopathy in Diabetic Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dis Markers*. 2019;9401628.
68. Whitehead M, Wickremasinghe S, Osborne A, Van Wijngaarden P, Martin KR. Diabetic retinopathy: a complex pathophysiology requiring novel therapeutic strategies. *Expert Opin Biol Ther*. 2018;18:1257–70.
69. Rüksam A, Parikh S, Fort PE. Role of Inflammation in Diabetic Retinopathy. *Int J Mol Sci*. 2018;19:942.
70. Patel J.I., Hykin P.G., Gregor Z.J., Boulton M., Cree I.A. Angiopoietin concentrations in diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmol*. 2005;89:480–483.
71. Rangasamy S., Srinivasan R., Maestas J., McGuire P.G., Das A. A potential role for angiopoietin 2 in the regulation of the blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2011;52:3784–3791.
72. Simó R, Stitt AW, Gardner TW. Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter?. *Diabetologia*. 2018;61(9):1902-1912
73. Sohn E.H., van Dijk H.W., Jiao C., Kok P.H., Jeong W., Demirkaya N., Garmager A., Wit F., Kucukevcilioglu M., van Velthoven M.E., et al. Retinal neurodegeneration may precede microvascular changes characteristic of diabetic retinopathy in diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016;113:E2655–E2664.
74. Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin Invest*. 1998;102:783–791.
75. Bringmann A, Wiedeman P. Müller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica*. 2012;227:1–19
76. Gouliopoulos NS, Kalogeropoulos C, Lavaris A, Rouvas A, Asproudis I, Garmpi A, et al. Association of serum inflammatory markers and diabetic retinopathy: a review of literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22:7113–28.
77. Semeraro F, Cancarini A, dell’Omo R, Rezzola S, Romano MR, Costagliola C. Diabetic Retinopathy: Vascular and Inflammatory Disease. *J Diabetes Res*. 2015;2015:582060.
78. Altmann C, Schmidt MHH. The Role of Microglia in Diabetic Retinopathy: Inflammation, Microvasculature Defects and Neurodegeneration. *Int J Mol Sci*. 2018;19:110.

79. Van Hecke MV, Dekker JM, Nijpels G, et al. Inflammation and endothelial dysfunction are associated with retinopathy: the Hoorn study. *Diabetologia*. 2005;48(7):1300–1306.
80. Kaštelan S, Orešković I, Bišćan F, Kaštelan H, Gverović Antunica A. Inflammatory and angiogenic biomarkers in diabetic retinopathy. *Biochem Med (Zagreb)*. 2020;30(3):030502.
81. Capitão M, Soares R. Angiogenesis and Inflammation Crosstalk in Diabetic Retinopathy. *J Cell Biochem*. 2016;117:2443–53.
82. Maier R, Weger M, Haller-Schober EM, El-Shabrawi Y, Wedrich A, Theisl A, et al. Multiplex bead analysis of vitreous and serum concentrations of inflammatory and proangiogenic factors in diabetic patients. *Mol Vis*. 2008;14:637–43.
83. Chibber R, Ben-Mahmud BM, Chibber S, Kohner EM. Leukocytes in diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev*. 2007;3:3–14.
84. Joussen AM, Poulaki V, Qin W, Kirchhof B, Mitsiades N, Wiegand SJ, et al. Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion in vivo. *Am J Pathol*. 2002;160:501–9.
85. Spencer BG, Estevez JJ, Liu E, Craig JE, Finnie JW. Pericytes, inflammation and diabetic retinopathy. *Inflammopharmacology*. 2020;28:697–709.
86. Preciado-Puga MC, Malacara JM, Fajardo-Araujo ME, Wröbel K, Wröbel K, Kornhauser-Araujo C, et al. Markers of the progression of complications in patients with type 2 diabetes: a one-year longitudinal study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014;122:484–90.
87. Tomić M, Ljubić S, Kaštelan S, Gverović Antunica A, Jazbec A, Poljičanin T. Inflammation, haemostatic disturbance, and obesity: possible link to pathogenesis of diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:818671.
88. Song J, Chen S, Liu X, Duan H, Kong J, Li Z. Relationship between C-Reactive Protein Level and Diabetic Retinopathy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(12):0144406.
89. Kocabora MS, Telli ME, Fazil K, Erdur SK, Ozsutcu M, Cekic O, et al. Serum and aqueous concentrations of inflammatory markers in diabetic macular edema. *Ocul Immunol Inflamm*. 2016;24:549–54.
90. Avelaira CA, Lin CM, Abcouwer SF, Ambrósio AF, Antonetti DA. TNF- α signals through PKC ζ /NF- κ B to alter the tight junction complex and increase retinal endothelial cell permeability. *Diabetes*. 2010;59:2872–82.
91. Doganay S, Evereklioglu C, Er H, Türköz Y, Sevinç A, Mehmet N, et al. Comparison of serum NO, TNF-alpha, IL-1beta, sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Eye (Lond)*. 2002;16:163–70.
92. Shimizu E, Funatsu H, Yamashita H, Yamashita T, Hori S. Plasma level of interleukin-6 is an indicator for predicting diabetic macular edema. *Jpn J Ophthalmol*. 2002;46:78–83.

93. Funatsu H, Yamashita H, Ikeda T, Mimura T, Eguchi S, Hori S. Vitreous levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2003;110:1690–6.
94. Mesquida M, Drawnel F, Fauser S. The role of inflammation in diabetic eye disease. *Semin Immunopathol*. 2019;41:427–45.
95. Petrovic MG, Korosec P, Kosnik M, Hawlina M. Vitreous levels of interleukin-8 in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 2007;;143:175–6.
96. Adamiec-Mroczek J, Oficjalska-Młyńczak J, Misiuk-Hojło M. Roles of endothelin-1 and selected proinflammatory cytokines in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy: Analysis of vitreous samples. *Cytokine*. 2010;49:269–74.
97. Murata M, Noda K, Fukuhara J, Kanda A, Kase S, Saito W, et al. Soluble vascular adhesion protein-1 accumulates in proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:4055–62.
98. Du M, Otalora L, Martin AA, Moiseyev G, Vanlandingham P, Wang Q, et al. Transgenic Mice Overexpressing Serum Retinol-Binding Protein Develop Progressive Retinal Degeneration through a Retinoid-Independent Mechanism. *Mol Cell Biol*. 2015;35:2771–89.
99. Li JY, Chen XX, Lu XH, Zhang CB, Shi QP, Feng L. Elevated RBP4 plasma levels were associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Biosci Rep*. 2018;38:20181100.
100. Zorena K, Raczyńska D, Raczyńska K. Biomarkers in diabetic retinopathy and the therapeutic implications. *Mediators of Inflammation Mediators Inflamm*. 2013;2013:193604.
101. Kang Q, Yang C. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. *Redox Biol*. 2020;37:101799.
102. Idris I, Gray S., Donnelly R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia*. 2001;44:659–673.
103. Wu M.Y., Yiang G.T., Lai T.T., Li C.J. The oxidative stress and mitochondrial dysfunction during the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;34:20187. 2018.
104. Kaneto H., Xu G., Song K.H., Suzuma K., Bonner-Weir S., Sharma A., Weir G.C. Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta-cell function through the induction of oxidative stress. *J. Biol. Chem*. 2001;276:31099–31104
105. Valencia W. M., Florez H. How to prevent the microvascular complications of type 2 diabetes beyond glucose control. *BMJ*. 2017;356
106. Tuttle KR, Bakris GL, Bilous RW et al. Diabetic kidney disease: a report from an ADA Consensus Conference. *Diabetes care*. 2014; 37: 2864-2883.
107. United States Renal Data System. Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. Bethesda, MD, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. 2016.
108. Lim AKh. Diabetic nephropathy - complications and treatment. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2014;7:361–381.

109. Levey A.S., Eckardt K.U., Dorman N.M., Christiansen S.L., Hoorn E.J., Ingelfinger J.R., Inker L.A., Levin A., Mehrotra R., Palevsky P.M., et al. Nomenclature for kidney function and disease: Report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference. *Kidney Int.* 2020;97:1117–1129.
110. Krolewski AS. Progressive renal decline: the new paradigm of diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2015;38:954–962.
111. Macisaac RJ, Jerums G. Diabetic kidney disease with and without albuminuria. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2011;20:246–257.
112. Retnakaran R, Cull CA, Thorne KI, Adler AI, Holman RR. Risk factors for renal dysfunction in type 2 diabetes: U.K. Prospective Diabetes Study 74. *Diabetes.* 2006;55:1832–1839.
113. Gembillo G, Ingrasciotta Y, Crisafulli S, et al. Kidney Disease in Diabetic Patients: From Pathophysiology to Pharmacological Aspects with a Focus on Therapeutic Inertia. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9):4824.
114. Premaratne E, Verma S, Ekinci EI, Theverkalam G, Jerums G, MacIsaac RJ: The impact of hyperfiltration on the diabetic kidney. *Diabetes Metab.*2015; 41: 5–17.
115. Tuttle KR: Back to the future: Glomerular hyperfiltration and the diabetic kidney. *Diabetes.*2017; 66: 14–16.
116. Hung PH, Hsu YC, Chen TH, Lin CL. Recent Advances in Diabetic Kidney Diseases: From Kidney Injury to Kidney Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11857.
117. Gilbert RE, Cooper ME. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease. More than an aftermath of glomerular injury? *Kidney International* 1999;56:1627-1637.
118. Lin YC, Chang YH, Yang SY, Wu KD, Chu TS. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *J Formos Med Assoc.* 2018;117(8):662–75.
119. Duni A, Liakopoulos V, Roumeliotis S, Peschos D, Dounousi E. Oxidative Stress in the Pathogenesis and Evolution of Chronic Kidney Disease: Untangling Ariadne's Thread. *Int J Mol Sci.* 2019;20(15):3711.
120. Vaziri N.D. Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. *Semin Nephrol.* 2004;24:469–473.
121. Samsu N. Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Biomed Res Int.* 2021;2021:1497449.
122. Forbes J. M., Coughlan M. T., Cooper M. E. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes.* 2008;57:1446–1454.
123. Krishan P., Chakkarwar V. A. Diabetic nephropathy: aggressive involvement of oxidative stress. *Journal of Pharmaceutical Education & Research.* 2011;2:35–41.
124. Wennmann D. O., Hsu H.-H., Pavenstädt H. The renin-angiotensin-aldosterone system in podocytes. *Seminars in Nephrology.* 2012;32:377–384.
125. Campbell K., Yacoub R. Inhibition of RAS in diabetic nephropathy. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease.* 2015;8:29–40

126. Nishiyama A., Seth D. M., Navar L. G. Renal interstitial fluid concentrations of angiotensins I and II in anesthetized rats. *Hypertension*. 2002;39:129–134.
127. Gilbert R. E., Krum H., Wilkinson-Berka J., Kelly D. J. The renin-angiotensin system and the long-term complications of diabetes: pathophysiological and therapeutic considerations. *Diabetic Medicine*. 2003;20:607–621.
128. Navarro J. F., Mora C. Role of inflammation in diabetic complications. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2005;20:2601–2604.
129. Pickup J. C., Chusney G. D., Thomas S. M., Burt D. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor α and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sciences*. 2000;67(3):291–300.
130. Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nature Reviews Nephrology*. 2011;7:684–696.
131. Navarro-González J. F., Mora-Fernández C., Muros de Fuentes M., García-Pérez J. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nature Reviews Nephrology*. 2011;7:327–340.
132. Jiang T., Huang Z., Lin Y., Zhang Z., Fang D., Zhang D. D. The protective role of Nrf2 in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2010;59(4):850–860.
133. Tucker P. S., Scanlan A. T., Dalbo V. J. Chronic kidney disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015;2015
134. Singh R, Chandel S, Dey D, Ghosh A, Roy S, Ravichandiran V, Ghosh D. Epigenetic modification and therapeutic targets of diabetes mellitus. *Biosci Rep*. 2020;;30;40(9):BSR20202160
135. Lin Q, Banu K, Ni Z, Leventhal JS, Menon MC. Podocyte Autophagy in Homeostasis and Disease. *J Clin Med*. 2021;10(6):1184.
136. Tagawa A., Yasuda M., Kume S., Yamahara K., Nakazawa J., Chin-Kanasaki M., Araki H., Araki S., Koya D., Asanuma K., et al. Impaired Podocyte Autophagy Exacerbates Proteinuria in Diabetic Nephropathy. *Diabetes*. 2016;65:755–767.
137. J. Geng, D.J. Klionsky The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series *EMBO*. 2008; 9 (9): 859-864.
138. M. Laplante, D.M. Sabatini , mTOR signaling in growth control and disease *Cell*. 2012;149 (2):274-293.
139. K. Sharma. Mitochondrial hormesis and diabetic complications. *Diabetes*. 2015; 64 (3) : 663-672.
140. Boulton AJ. Diabetic neuropathy and foot complications. *Handb Clin Neurol*. 2014;126: 97–107.

141. Singh R, Kishore L, Kaur N: Diabetic peripheral neuropathy: current perspective and future directions. *Pharmacol Res.* 2014; 80: 21–35.
142. Pop-Busui R, Boulton AJ, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, et al. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2017;40(1):136–154.
143. Duckworth W, Abraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, et al. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2009;360(2):129–139.
144. Ismail-Beigi F, Craven T, Banerji MA, Basile J, Calles J, Cohen RM, et al. Effect of intensive treatment of hyperglycaemia on microvascular outcomes in type 2 diabetes: an analysis of the ACCORD randomised trial. *Lancet.* 2010;376(9739):419–430.
145. Pop-Busui R, Lu J, Lopes N, Jones TL, Investigators BD. Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and relation to glycemic control therapies at baseline in the BARI 2D cohort. *J Peripher Nerv Syst.* 2009;14(1):1–13.
146. Cabezas-Cerrato J The prevalence of clinical diabetic polyneuropathy in Spain: a study in primary care and hospital clinic groups. Neuropathy Spanish Study Group of the Spanish Diabetes Society (SDS). *Diabetologia.* 1998;41(11):1263–1269
147. Wiggin TD, Sullivan KA, Pop-Busui R, Amato A, Sima AA, Feldman EL. Elevated triglycerides correlate with progression of diabetic neuropathy. *Diabetes.* 2009;58(7):1634–1640.
148. Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton SE, Ward JD, Manes C, Ionescu-Tirgoviste C, et al. Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N Engl J Med.* 2005;352(4):341–350.
149. Daousi C, MacFarlane IA, Woodward A, Nurmikko TJ, Bundred PE, Benbow SJ. Chronic painful peripheral neuropathy in an urban community: a controlled comparison of people with and without diabetes. *Diabet Med.* 2004;21(9):976–982.
150. Hicks CW, Selvin E. Epidemiology of Peripheral Neuropathy and Lower Extremity Disease in Diabetes. *Curr Diab Rep.* 2019;19(10):86.
151. Zhang P, Lu J, Jing Y, Tang S, Zhu D, Bi Y. Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis (dagger). *Ann Med.* 2017;49(2):106–116.
152. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA.* 2005;293(2):217–228.
153. Kim H, Kim JJ, Yoon YS. Emerging therapy for diabetic neuropathy: cell therapy targeting vessels and nerves. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2012;12(2):168-178.
154. Giannini C, Dyck PJ. Basement membrane reduplication and pericyte degeneration precede development of diabetic polyneuropathy and are associated with its severity. *Ann Neurol.* 1995;37:498–504.
155. Horton WB, Barrett EJ. Microvascular Dysfunction in Diabetes Mellitus and Cardiometabolic Disease. *Endocr Rev.* 2021;42(1):29-55.
156. Zochodne DW, Ho LT. Normal blood flow but lower oxygen tension in diabetes of young rats: microenvironment and the influence of sympathectomy. *Can J Physiol Pharmacol* 1992; 70: 651–659.

157. Østergaard L, Finnerup NB, Terkelsen AJ, *et al* The effects of capillary dysfunction on oxygen and glucose extraction in diabetic neuropathy. *Diabetologia* 2015; 58: 666–677.
158. Kobayashi M, Chandrasekhar A, Cheng C, *et al* Diabetic polyneuropathy, sensory neurons, nuclear structure and spliceosome alterations: a role for CWC22. *Dis Model Mech* 2017; 10: 215–224.
159. Román-Pintos LM, Villegas-Rivera G, Rodríguez-Carrizalez AD, Miranda-Díaz AG, Cardona-Muñoz EG. Diabetic Polyneuropathy in Type 2 Diabetes Mellitus: Inflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Function. *J Diabetes Res.* 2016;2016:3425617.
160. Herder C., Lankisch M., Ziegler D., *et al.* Subclinical inflammation and diabetic polyneuropathy. *Diabetes Care.* 2009;32(4):680–682.
161. Vinik A., Ullal J., Parson H. K., Casellini C. M. Diabetic neuropathies: clinical manifestations and current treatment options. *Nature Reviews Endocrinology.* 2006;2(5):269–281.
162. Sifuentes-Franco S, Pacheco-Moisés FP, Rodríguez-Carrizalez AD, Miranda-Díaz AG. The Role of Oxidative Stress, Mitochondrial Function, and Autophagy in Diabetic Polyneuropathy. *J Diabetes Res.* 2017;2017:1673081.
163. Balaban RS, Nemoto S., Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 2005;120(4):483–495.
164. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, *et al.* The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(24).
165. Laronha H, Caldeira J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells.* 2020;9:1076.
166. Liu J, Khalil RA. Matrix Metalloproteinase Inhibitors as Investigational and Therapeutic Tools in Unrestrained Tissue Remodeling and Pathological Disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017; 148: 355–420.
167. Gersh I, Catchpole HR. The organization of ground substance and basement membrane and its significance in tissue injury disease and growth. *Am J Anat.* 1949 ; 85(3):457-521.
168. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci.* 1962; 48:1014-22.
169. Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids.* 2011; 41(2): 271–290
- 170.. Nagase H., Visse R., Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 2006; 69:562–573.
171. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017; 147: 1–73.
172. Wang X., Khalil R.A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Adv. Pharmacol.* 2018;81:241–330.

173. Maskos K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie*. 2005; 87(3-4):249-63.
- 174.. Rangasamy L, Geronimo BD, Ortín I, Coderch C, Zapico JM, Ramos A, de Pascual-Teresa B. Molecular Imaging Probes Based on Matrix Metalloproteinase Inhibitors (MMPis).. *Molecules*. 2019 ; 24(16).
- 175.. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003; 92(8):827-39.
- 176.. Maskos K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie*. 2005;87:249–263.
- 177.. Jacobsen J.A., Major Jourden J.L., Miller M.T., Cohen S.M. To bind zinc or not to bind zinc: An examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition. *Biochim. Biophys. Acta*. 2010;1803:72–94.
- 178.. Murphy G., Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol. Aspects Med*. 2008;29:290–308.
- 179.. Fischer T, Senn N, Riedl R. Design and Structural Evolution of Matrix Metalloproteinase Inhibitors. *Chemistry*. 2019 Jun ; 25(34):7960-7980.
- 180.. Cabral-Pacheco GA, et al. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24)
181. Amin M., Pushpakumar S., Muradashvili N., Kundu S., Tyagi S.C., Sen U. Regulation and involvement of matrix metalloproteinases in vascular diseases. *Front. Biosci*. 2016;21:89–118.
182. Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013():928315.
- 183.. Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res*. 2006;69(3):614–24.
184. Clancy P, Seto SW, Koblar SA, Golledge J. Role of the angiotensin converting enzyme I/angiotensin II/angiotensin receptor 1 axis in interstitial collagenase expression in human carotid atheroma. *Atherosclerosis*. 2013;229(2):331–7.
185. Austin KM, Covic L, Kuliopulos A. Matrix metalloproteases and PAR1 activation. *Blood*. 2013;121(3):431–9.
- 186.. Alsaigh T, Pocock ES, Bergan JJ, Schmid-Schonbein GW. Acute venous occlusion enhances matrix metalloprotease activity: Implications on endothelial dysfunction. *Microvasc Res*. 2011;81(1):108–16.
187. Ahmed AK, Haylor JL, El Nahas AM, Johnson TS. Localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental progressive kidney scarring. *Kidney Int*. 2007;71(8):755–763.

188. Lenz O, Elliot SJ, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in renal development and disease. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(3):574–81.
189. Gutiérrez-Fernández A, Inada M, Balbín M, Fueyo A, Pitiot AS, Astudillo A, Hirose K, Hirata M, Shapiro SD, Noël A, Werb Z, Krane SM, López-Otín C, Puente XS Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). *FASEB J*. 2007 Aug; 21(10):2580-91.
190. Visse R, Nagase H Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003 May 2; 92(8):827-39.
191. Murphy G, Nagase H . Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med*. 2008 Oct; 29(5):290-308.
192. Amălinei C, Căruntu ID, Bălan RA . Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol*. 2007; 48(4):323-34.
193. Pei D, Weiss SJ . Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature*. 1995 May 18; 375(6528):244-7.
194. Mannello F., Medda V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Prog. Histochem. Cytochem*. 2012;47:27–58.
195. Deryugina EI, Ratnikov B, Monosov E, Postnova TI, DiScipio R, Smith JW, Strongin AY. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin alphavbeta3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res*. 2001;263:209–223.
196. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Activated protein C directly activates human endothelial gelatinase A. *J Biol Chem*. 2000;275:9095–9098.
197. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33:960–970.
198. Shapiro S, Khodalev O, Bitterman H, Auslender R, Lahat N. Different activation forms of MMP-2 oppositely affect the fate of endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;298:C942–C951.
199. Crocker SJ, Pagenstecher A, Campbell IL. The TIMPs tango with MMPs and more in the central nervous system. *J Neurosci Res*. 2004;75:1–11.
200. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*. 2000;2:737–744.
201. Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res*. 2005;31:599–621.

202. Somiari SB, Somiari RI, Heckman CM, Olsen CH, Jordan RM, Russell SJ, Shriver CD. Circulating MMP2 and MMP9 in breast cancer—potential role in classification of patients into low risk, high risk, benign disease and breast cancer categories. *Int J Cancer*. 2006;119:1403–1411.
203. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem*. 2007;15(6):2223–2268.
204. Eguchi T, Kubota S, Kawata K, Mukudai Y, Uehara J, Ohgawara T, Ibaragi S, Sasaki A, Kuboki T, Takigawa M. Novel transcription-factor-like function of human matrix metalloproteinase 3 regulating the CTGF/CCN2 gene. *Mol Cell Biol*. 2008;28(7):2391–2413.
205. Ye S, Watts GF, Mandalia S, Humphries SE, Henney AM. Preliminary report: genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Br Heart J*. 1995;73(3):209–215.
206. Jiang YN, Yan HQ, Huang XB, Wang YN, Li Q, Gao FG. Interleukin 6 triggered ataxia-telangiectasia mutated activation facilitates lung cancer metastasis via MMP-3/MMP-13 up-regulation. *Oncotarget*. 2015;6(38):40719–40733.
207. Rohani MG, McMahan RS, Razumova MV, Hertz AL, Cieslewicz M, Pun SH, Regnier M, Wang Y, Birkland TP, Parks WC. MMP-10 Regulates Collagenolytic Activity of Alternatively Activated Resident Macrophages. *J Invest Dermatol*. 2015;135(10):2377–2384.
208. Martinez-Aguilar E, Gomez-Rodriguez V, Orbe J, Rodriguez JA, Fernandez-Alonso L, Roncal C, Paramo JA. Matrix metalloproteinase 10 is associated with disease severity and mortality in patients with peripheral arterial disease. *Journal of vascular surgery*. 2015;61(2):428–435.
209. Wang H, Zhang ZQ, Wang SZ, Lu JL, Wang XL, Zhang ZY. Association of matrix metalloproteinase-10 polymorphisms with susceptibility to pelvic organ prolapse. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 2015;41(12):1972–1981.
210. Hirakawa S, Kojima T, Obata K, Okabayashi T, Yokota S, Nomura K, Obonai T, Fuchimoto J, Himi T, Tsutsumi H, Sawada N. Marked induction of matrix metalloproteinase-10 by respiratory syncytial virus infection in human nasal epithelial cells. *J Med Virol*. 2013;85(12):2141–2150.
211. Sokai A, Handa T, Tanizawa K, Oga T, Uno K, Tsuruyama T, Kubo T, Ikezoe K, Nakatsuka Y, Tanimura K, Muro S, Hirai T, Nagai S, Chin K, Mishima M. Matrix metalloproteinase-10: a novel biomarker for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2015;16:120.
212. Zhang G, Miyake M, Lawton A, Goodison S, Rosser CJ. Matrix metalloproteinase-10 promotes tumor progression through regulation of angiogenic and apoptotic pathways in cervical tumors. *BMC Cancer*. 2014;14:310.
213. Garcia-Irigoyen O, Latasa MU, Carotti S, Uriarte I, Elizalde M, Urtasun R, Vespasiani-Gentilucci U, Morini S, Benito P, Ladero JM, Rodriguez JA, Prieto J, Orbe J, Paramo JA, Fernandez-Barrena MG, Berasain C, Avila MA. Matrix metalloproteinase 10 contributes to hepatocarcinogenesis in a novel crosstalk with the stromal derived factor 1/C-X-C chemokine receptor 4 axis. *Hepatology*. 2015;62(1):166–178.
214. Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhajcer OL, Chenard MP, Rio MC, Chambon P. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature*. 1990;348(6303):699–704

215. Li Z, Ding S, Zhong Q, Li G, Zhang Y, Huang XC. Significance of MMP11 and P14(ARF) expressions in clinical outcomes of patients with laryngeal cancer. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(9):15581–15590.
216. Lin CW, Yang SF, Chuang CY, Lin HP, Hsin CH. Association of matrix metalloproteinase-11 polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic characteristics for oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2015;37(10):1425–1431.
217. Jiang T, Xie P, Liu H. Circulating Anti-Matrix Metalloproteinase-7 Antibodies May Be a Potential Biomarker for Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2015;74(3):650–657.
218. Marchenko GN, Ratnikov BI, Rozanov DV, Godzik A, Deryugina EI, Strongin AY. Characterization of matrix metalloproteinase-26, a novel metalloproteinase widely expressed in cancer cells of epithelial origin. *Biochem J*. 2001;356(Pt 3):705–718.
219. Bister V, Skoog T, Virolainen S, Kiviluoto T, Puolakkainen P, Saarialho-Kere U. Increased expression of matrix metalloproteinases-21 and -26 and TIMP-4 in pancreatic adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2007;20(11):1128–1140.
220. Gutschalk CM, Yanamandra AK, Linde N, Meides A, Depner S, Mueller MM. GM-CSF enhances tumor invasion by elevated MMP-2, -9, and -26 expression. *Cancer Med*. 2013;2(2):117–129.
221. Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Robey PG, Poole AR, Pidoux I, Ward JM, Birkedal-Hansen H. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*. 1999;99(1):81–92.
222. Johnson JL, Jenkins NP, Huang WC, Di Gregoli K, Sala-Newby GB, Scholtes VP, Moll FL, Pasterkamp G, Newby AC. Relationship of MMP-14 and TIMP-3 expression with macrophage activation and human atherosclerotic plaque vulnerability. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:276457.
223. Imanishi Y, Fujii M, Tokumaru Y, Tomita T, Kanke M, Kanzaki J, Kameyama K, Otani Y, Sato H. Clinical significance of expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 in human head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2000;31(8):895–904.
224. Sena P, Mariani F, Marzona L, Benincasa M, Ponz de Leon M, Palumbo C, Roncucci L. Matrix metalloproteinases 15 and 19 are stromal regulators of colorectal cancer development from the early stages. *Int J Oncol*. 2012;41(1):260–266.
225. Liu J, van Mil A, Aguor EN, Siddiqi S, Vrijssen K, Jaksani S, Metz C, Zhao J, Strijkers GJ, Doevendans PA, Sluijter JP. MiR-155 inhibits cell migration of human cardiomyocyte progenitor cells (hCMPCs) via targeting of MMP-16. *J Cell Mol Med*. 2012;16(10):2379–2386.
226. Tatti O, Gucciardo E, Pekkonen P, Holopainen T, Louhimo R, Repo P, Maliniemi P, Lohi J, Rantanen V, Hautaniemi S, Alitalo K, Ranki A, Ojala PM, Keski-Oja J, Lehti K. MMP16 Mediates a Proteolytic Switch to Promote Cell-Cell Adhesion, Collagen Alignment, and Lymphatic Invasion in Melanoma. *Cancer Res*. 2015;75(10):2083–2094.

227. Puente XS, Pendas AM, Llano E, Velasco G, Lopez-Otin C. Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res.* 1996;56(5):944–949.
228. Llano E, Pendas AM, Freije JP, Nakano A, Knauper V, Murphy G, Lopez-Otin C. Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res.* 1999;59(11):2570–2576.
229. Folgueras AR, Valdes-Sanchez T, Llano E, Menendez L, Baamonde A, Denlinger BL, Belmonte C, Juarez L, Lastra A, Garcia-Suarez O, Astudillo A, Kirstein M, Pendas AM, Farinas I, Lopez-Otin C. Metalloproteinase MT5-MMP is an essential modulator of neuro-immune interactions in thermal pain stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(38):16451–16456.
230. Radichev IA, Remacle AG, Shiryaev SA, Purves AN, Johnson SL, Pellicchia M, Strongin AY. Biochemical characterization of the cellular glycosylphosphatidylinositol-linked membrane type-6 matrix metalloproteinase. *The Journal of biological chemistry.* 2010;285(21):16076–16086.
231. Sun Q, Weber CR, Sohail A, Bernardo MM, Toth M, Zhao H, Turner JR, Fridman R. MMP25 (MT6-MMP) is highly expressed in human colon cancer, promotes tumor growth, and exhibits unique biochemical properties. *The Journal of biological chemistry.* 2007;282(30):21998–22010.
232. Li W, Li J, Wu Y, Rancati F, Vallese S, Raveglia L, Wu J, Hotchandani R, Fuller N, Cunningham K, Morgan P, Fish S, Krykbaev R, Xu X, Tam S, Goldman SJ, Abraham W, Williams C, Sypek J, Mansour TS. Identification of an orally efficacious matrix metalloprotease 12 inhibitor for potential treatment of asthma. *J Med Chem.* 2009;52(17):5408–5419.
233. Chelluboina B, Klopfenstein JD, Pinson DM, Wang DZ, Vemuganti R, Veeravalli KK. Matrix Metalloproteinase-12 Induces Blood-Brain Barrier Damage After Focal Cerebral Ischemia. *Stroke.* 2015;46(12):3523–3531.
234. Jara P, Calyeca J, Romero Y, Placido L, Yu G, Kaminski N, Maldonado V, Cisneros J, Selman M, Pardo A. Matrix metalloproteinase (MMP)-19-deficient fibroblasts display a profibrotic phenotype. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.* 2015;308(6):L511–522.
235. Jirouskova M, Zbodakova O, Gregor M, Chalupsky K, Sarnova L, Hajduch M, Ehrmann J, Jirkovska M, Sedlacek R. Hepatoprotective effect of MMP-19 deficiency in a mouse model of chronic liver fibrosis. *PloS one.* 2012;7(10):e46271.
236. Stracke JO, Fosang AJ, Last K, Mercuri FA, Pendas AM, Llano E, Perris R, Di Cesare PE, Murphy G, Knauper V. Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) *FEBS Lett.* 2000;478(1–2):52–56.
237. Yu G, Herazo-Maya JD, Nukui T, Romkes M, Parwani A, Juan-Guardela BM, Robertson J, Gaudie J, Siegfried JM, Kaminski N, Kass DJ. Matrix metalloproteinase-19 promotes metastatic behavior in vitro and is associated with increased mortality in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(7):780–790.
238. Stracke JO, Fosang AJ, Last K, Mercuri FA, Pendas AM, Llano E, Perris R, Di Cesare PE, Murphy G, Knauper V. Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) *FEBS Lett.* 2000;478(1–2):52–56.

239. Ahokas K, Lohi J, Illman SA, Llano E, Elomaa O, Impola U, Karjalainen-Lindsberg ML, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinase-21 is expressed epithelially during development and in cancer and is up-regulated by transforming growth factor-beta1 in keratinocytes. *Lab Invest.* 2003;83(12):1887–1899.
240. Hegedus L, Cho H, Xie X, Eliceiri GL. Additional MDA-MB-231 breast cancer cell matrix metalloproteinases promote invasiveness. *Journal of cellular physiology.* 2008;216(2):480–485.
241. Cominelli A, Gaide Chevronnay HP, Lemoine P, Courtoy PJ, Marbaix E, Henriot P. Matrix metalloproteinase-27 is expressed in CD163+/CD206+ M2 macrophages in the cycling human endometrium and in superficial endometriotic lesions. *Molecular human reproduction.* 2014;20(8):767–775.
242. Kohrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer.* 2009;9:188.
243. Ma Y, Halade GV, Zhang J, Ramirez TA, Levin D, Voorhees A, Jin YF, Han HC, Manicone AM, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-28 deletion exacerbates cardiac dysfunction and rupture after myocardial infarction in mice by inhibiting M2 macrophage activation. *Circulation research.* 2013;112(4):675–688.
244. Bister VO, Salmela MT, Karjalainen-Lindsberg ML, Uria J, Lohi J, Puolakkainen P, Lopez-Otin C, Saarialho-Kere U. Differential expression of three matrix metalloproteinases, MMP-19, MMP-26, and MMP-28, in normal and inflamed intestine and colon cancer. *Dig Dis Sci.* 2004;49(4):653–661.
245. Kevorkian L, Young DA, Darrah C, Donell ST, Shepstone L, Porter S, Brockbank SM, Edwards DR, Parker AE, Clark IM. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis Rheum.* 2004;50(1):131–141.
246. Yan C, Boud D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol.* 2007;211(1): 19-26.
247. K.C. Liang K.C, Lee C.W, Lin W,N, Lin C.C, Wu C.B, Luo S,F et al. Interleukin-1beta induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK, and nuclear factor-kappaB signaling pathways in human tracheal smooth muscle cells *J Cell Physiol.* 2007;211 (3): 759-770.
248. Li Y, Samuvel D.J, Sundararaj K, Lopes-Virella M.F, Huang Y. IL-6 and high glucose synergistically upregulate MMP-1 expression by U937 mononuclear phagocytes via ERK1/2 and JNK pathways and c-Jun. *J Cell Biochem.* 2010; 110 (1): 248-259.
249. Nishikawa M, Yamaguchi Y, Yoshitake K, Saeki Y. Effects of TNF alpha and prostaglandin E2 on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2002;37 (3):167-176
250. Mao D, Zhang Y, Lu H, Zhang H. Molecular basis underlying inhibition of metastasis of gastric cancer by anti-VEGFa treatment. *Tumour Biol* 2014

251. Rao VH, Kansal V, Stoupa S, Agrawal DK. MMP-1 and MMP-9 regulate epidermal growth factor-dependent collagen loss in human carotid plaque smooth muscle cells. *Physiol Rep.* 2014;2:e00224.
252. Alfranca A, López-Oliva JM, Genís I, López-Maderuelo D, Mirones I, Salvado D, et al. PGE2 induces angiogenesis via MT1-MMP-mediated activation of the TGFbeta/Alk5 signaling pathway. *Blood.* 2008; 112 (4):1120-1128.
253. Ito H, Duxbury M, Benoit E, Clancy TE, Zinner MJ, Ashley SW, et al. Prostaglandin E2 enhances pancreatic cancer invasiveness through an Ets-1-dependent induction of matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res.* 2004; 64 (20): 7439-7446.
254. Vandenbroucke R.E., Libert C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2014;13:904–927.
255. Stuelten CH, DaCosta Byfield S, Arany PR, Karpova TS, Stetler-Stevenson WG, Roberts AB. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta. *J Cell Sci.* 2005; 118 (10): 2143-2153.
256. Hasebe Y, Egawa K, Shibanuma M, Nose K. Induction of matrix metalloproteinase gene expression in an endothelial cell line by direct interaction with malignant cells. *Cancer Sci.* 2007; 98 (1): 58-67.
257. Gaffney J, Solomonov I, Zehorai E, Sagi I. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. *Matrix biology.* 2015;44-46:190-199.
258. Death A, Fisher EJ, McGrath KCY, et al: High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: Potential impact on atherosclerosis in diabetes. *Atherosclerosis.* 2003;168:263-269.
259. Uemura S, Matsushita H, Li W, et al: Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity. Role of oxidative stress. *Circ Res.* 2001; 88:1291- 1298.
260. Lewandowski KC, Banach E, Bienkiewicz M, Lewiński A. Matrix metalloproteinases in type 2 diabetes and non-diabetic controls: effects of short-term and chronic hyperglycaemia. *Arch Med Sci.* 2011;7(2):294-303.
261. Derosa G, D'Angelo A, Tinelli C, Devangelio E, Consoli A, Miccoli R, Penno G, Del Prato S, Paniga S, Cicero AF. Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects. *Diabetes Metab.* 2007;33(2):129-34.
262. Garcia-Fernandez N., Jacobs-Cacha C., Mora-Gutierrez J.M., Vergara A., Orbe J., Soler M.J. Matrix Metalloproteinases in Diabetic Kidney Disease. *J. Clin. Med.* 2020;9:472.
263. Derosa G, Cicero AF, Scalise F, Avanzini MA, Tinelli C, Piccinni MN, Peros E, Geroldi D, Fogari E, D'Angelo A. Metalloproteinase-2 and -9 in diabetic and nondiabetic subjects during acute coronary syndromes. *Endothelium.* 2007;14(1):45-51.

264. Lopes J., Adiguzel E., Gu S., Liu S.L., Hou G., Heximer S., Assoian R.K., Bendeck M.P. Type VIII collagen mediates vessel wall remodeling after arterial injury and fibrous cap formation in atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* 2013;182:2241–2253.
265. Mohammad G, Siddiquei MM. Role of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the development of diabetic retinopathy. *J Ocul Biol Dis Infor.* 2012;5(1):1-8.
266. Yang R, Liu H, Williams I, Chaqour B. Matrix metalloproteinase-2 expression and apoptogenic activity in retinal pericytes: implications in diabetic retinopathy. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1103:196–201.
267. Kowluru RA, Mohammad G, Santos JM, Zhong Q. Abrogation of MMP-9 gene protects against the development of retinopathy in diabetic mice by preventing mitochondrial damage. *Diabetes.* 2011;60:3023–3033.
268. Mohammad G, Kowluru RA. Matrix metalloproteinase-2 in the development of diabetic retinopathy and mitochondrial dysfunction. *Lab Invest.* 2010;90:1365–1372.
269. Grant MB, Caballero S, Tarnuzzer RW, Bass KE, Ljubimov AV, Spoerri PE, et al. Matrix metalloproteinase expression in human retinal microvascular cells. *Diabetes.* 1998;47:1311–1317.
270. Giebel SJ, Menicucci G, McGuire PG, Das A. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. *Lab Invest.* 2005;85:567–607.
271. Kowluru RA, Kanwar M. Oxidative stress and the development of diabetic retinopathy: contributory role of matrix metalloproteinase-2. *Free Radic Biol Med.* 2009;46(12):1677-1685.
272. Mohammad G, Kowluru RA. Diabetic retinopathy and signaling mechanism for activation of matrix metalloproteinase-9. *J Cell Physiol.* 2012;227(3):1052-1061.
273. El-Asrar AM. Role of inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2012;19:70–74.
274. Bhatt LK, Addepalli V. Attenuation of diabetic retinopathy by enhanced inhibition of MMP-2 and MMP-9 using aspirin and minocycline in streptozotocin-diabetic rats. *Am J Transl Res.* 2010;2:181–189.
275. Alexander JS, Elrod JW. Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation. *J Anat.* 2002;200:561–574
276. Noda K, Ishida S, Inoue M, Obata K, Oguchi Y, Okada Y, et al. Production and activation of matrix metalloproteinase-2 in proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:2163–2170.
277. Ottino P, Finley J, Rojo E, Otlecz A, Lambrou GN, Bazan HEP, et al. Hypoxia activates matrix metalloproteinase expression and the VEGF system in monkey choroid-retinal endothelial cells: involvement of cytosolic phospholipase A(2) activity. *Mol Vis.* 2004;10:341–350.
278. Fowlkes JL, Thrailkill KM, Serra DM, Suzuki K, Nagase H. Progress in growth factor research. 1995;6(24):255–263.

279. Zhuang S, Kinsey GR, Rasbach K, Schnellmann RG. Heparin-binding epidermal growth factor and Src family kinases in proliferation of renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Mar;294(3):F459-68.
280. Fowlkes JL, Serra DM, Nagase H, Thrailkill KM. MMPs are IGFBP-degrading proteinases: implications for cell proliferation and tissue growth. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Jun 30;878:696-9.
281. Thrailkill KM, Clay Bunn R, Fowlkes JL. Matrix metalloproteinases: their potential role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Endocrine*. 2009;35(1):1-10.
282. Takamiya Y., Fukami K., Yamagishi S., Kaida Y., Nakayama Y., Obara N., Iwatani R., Ando R., Koike K., Matsui T., et al. Experimental diabetic nephropathy is accelerated in matrix metalloproteinase-2 knockout mice. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2013;28:55–62.
283. Zhang S.X., Wang J.J., Lu K., Mott R., Longeras R., Ma J.X. Therapeutic potential of angiostatin in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2006;17:475–486.
284. Han S.Y., Jee Y.H., Han K.H., Kang Y.S., Kim H.K., Han J.Y., Kim Y.S., Cha D.R. An imbalance between matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 contributes to the development of early diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2006;21:2406–2416.
285. Inada A., Nagai K., Arai H., Miyazaki J.I., Nomura K., Kanamori H., Toyokuni S., Yamada Y., Bonner-Weir S., Weir G.C., et al. Establishment of a diabetic mouse model with progressive diabetic nephropathy. *Am. J. Pathol*. 2005;167:327–336.
286. Furuichi K., Hisada Y., Shimizu M., Okumura T., Kitagawa K., Yoshimoto K., Iwata Y., Yokoyama H., Kaneko S., Wada T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and membrane-type 1 MMP (MT1-MMP) affect the remodeling of glomerulosclerosis in diabetic OLETF rats. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2011;26:3124–3131.
287. Fukami K., Yamagishi S.-I., Coughlan M.T., Harcourt B.E., Kantharidis P., Thallas-Bonke V., Okuda S., Cooper M.E., Forbes J.M. Ramipril inhibits AGE-RAGE-induced matrix metalloproteinase-2 activation in experimental diabetic nephropathy. *Diabetol. Metab. Syndr*. 2014;6:86.
288. Fornoni A., Striker L.J., Zheng F., Striker G.E. Reversibility of glucose-induced changes in mesangial cell extracellular matrix depends on the genetic background. *Diabetes*. 2002;51:499–505.
289. Qing-Hua G., Ju-Ming L., Chang-Yu P., Zhao-Hui L., Xiao-Man Z., Yi-Ming M. The kidney expression of matrix metalloproteinase-9 in the diabetic nephropathy of Kkay mice. *J. Diabetes Complications*. 2008;22:408–412.
290. Bai Y., Wang L., Li Y., Liu S., Li J., Wang H., Huang H. High ambient glucose levels modulates the production of MMP-9 and alpha5(IV) collagen by cultured podocytes. *Cell Physiol. Biochem*. 2006;17:57–68.

291. Dos Santos-Macedo F., Martins Gregorio B., Cardozo Paes-de-Almeida E., de Souza Mendonça L., de Souza Azevedo R., Fernandes-Santos C. Kidney osteoclast factors and matrix metalloproteinase expression in a mice model of diet-induced obesity and diabetes. *Pathol. Res. Pract.* 2019;215:152517.
292. McKittrick I.B., Bogaert Y., Nadeau K., Snell-Bergeon J., Hull A., Jiang T., Wang X., Levi M., Moulton K.S. Urinary matrix metalloproteinase activities: biomarkers for plaque angiogenesis and nephropathy in diabetes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2011;301
293. Yao X.M., Ye S.D., Zai Z., Chen Y., Li X.C., Yang G.W., Wang Y.X., Chen K. Simvastatin protects diabetic rats against kidney injury through the suppression of renal matrix metalloproteinase-9 expression. *J. Endocrinol. Invest.* 2010;33:292–296.
294. Marti H.P., Lee L., Kashgarian M., Lovett D.H. Transforming growth factor-beta 1 stimulates glomerular mesangial cell synthesis of the 72-kd type IV collagenase. *Am. J. Pathol.* 1994;144:82–94
295. Yao J., Morioka T., Li B., Oite T. Endothelin is a potent inhibitor of matrix metalloproteinase-2 secretion and activation in rat mesangial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2001;280.
296. Veron D., Bertuccio C.A., Marlier A., Reidy K., Garcia A.M., Jimenez J., Velazquez H., Kashgarian M., Moeckel G.W., Tufro A. Podocyte vascular endothelial growth factor (Vegf₁₆₄) overexpression causes severe nodular glomerulosclerosis in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2011;54:1227–1241
297. Hsu Y.-H., Li H.-H., Sung J.-M., Chen W.-Y., Hou Y.-C., Weng Y.-H., Lai W.-T., Wu C.-H., Chang M.-S. Interleukin-20 targets podocytes and is upregulated in experimental murine diabetic nephropathy. *Exp. Mol. Med.* 2017;49:e310.
298. Lauhio A., Sorsa T., Srinivas R., Stenman M., Tervahartiala T., Stenman U.H., Grönhagen-Riska C., Honkanen E. Urinary matrix metalloproteinase -8, -9, -14 and their regulators (TRY-1, TRY-2, TATI) in patients with diabetic nephropathy. *Ann. Med.* 2008;40:312–320
299. Diamant M., Hanemaaijer R., Verheijen J.H., Smit J.W.A., Radder J.K., Lemkes H.H. Elevated matrix metalloproteinase-2 and -9 in urine, but not in serum, are markers of type 1 diabetic nephropathy. *Diabet. Med.* 2001;18:423–424.
300. Thrailkill K.M., Bunn R.C., Moreau C.S., Cockrell G.E., Simpson P.M., Coleman H.N., Frindik J.P., Kemp S.F., Fowlkes J.L. Matrix metalloproteinase-2 dysregulation in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2007;30:2321–2326.
301. Ebihara I., Nakamura T., Shimada N., Koide H. Increased plasma metalloproteinase-9 concentrations precede development of microalbuminuria in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am. J. Kidney Dis.* 1998;32:544–550.
302. Rysz J, Banach M, Stolarek RA, Pasnik J, Cialkowska-Rysz A, Koktysz R, Piechota M, Baj Z. Serum matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and metalloproteinase tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in diabetic nephropathy. *Journal of nephrology.* 2007;20(4):444–452
303. Cheng S., Lovett D.H. Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation. *Am. J. Pathol.* 2003;162:1937–1949.

304. Del Prete D, Anglani F, Forino M, Ceol M, Fioretto P, Nosadini R, Baggio B, Gambaro G. Down-regulation of glomerular matrix metalloproteinase-2 gene in human NIDDM. *Diabetologia*. 1997;40(12):1449–1454.
305. Sekiuchi M, Kudo A, Nakabayashi K, Kanai-Azuma M, Akimoto Y, Kawakami H, Yamada A. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 2 and 1 in the glomeruli of human glomerular diseases: the results of studies using immunofluorescence, in situ hybridization, and immunoelectron microscopy. *Clin. Exp. Nephrol*. 2012;16(6):863–874.
306. Romanic A.M., Burns-Kurtis C.L., Ao Z., Arleth A.J., Ohlstein E.H. Upregulated expression of human membrane type-5 matrix metalloproteinase in kidneys from diabetic patients. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2001;281:F309–F317.
307. Del Prete D, Anglani F, Forino M, Ceol M, Fioretto P, Nosadini R, Baggio B, Gambaro G. Down-regulation of glomerular matrix metalloproteinase-2 gene in human NIDDM. *Diabetologia*. 1997;40(12):1449–1454.
308. Anderson SS, Wu K, Nagase H, Stettler-Stevenson WG, Kim Y, Tsilibary EC. Effect of matrix glycation on expression of type IV collagen, MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 by human mesangial cells. *Cell Adhes Commun*. 1996 Aug;4(2):89-101.
309. Li SY, Huang PH, Yang AH, Tarng DC, Yang WC, Lin CC, Chen JW, Schmid-Schonbein G, Lin SJ. Matrix metalloproteinase-9 deficiency attenuates diabetic nephropathy by modulation of podocyte functions and dedifferentiation. *Kidney Int*. 2014
309. Lauhio A, Sorsa T, Srinivas R, Stenman M, Tervahartiala T, Stenman UH, Gronhagen-Riska C, Honkanen E. Urinary matrix metalloproteinase -8, -9, -14 and their regulators (TRY-1, TRY-2, TATI) in patients with diabetic nephropathy. *Ann. Med*. 2008;40(4):312–320.
310. Tashiro K, Koyanagi I, Ohara I, Ito T, Saitoh A, Horikoshi S, Tomino Y. Levels of urinary matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy. *J. Clin. Lab. Anal*. 2004;18(3):206–210.
311. Ebihara I, Nakamura T, Shimada N, Koide H. Increased plasma metalloproteinase-9 concentrations precede development of microalbuminuria in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am. J. Kidney Dis*. 1998;32(4):544–550.
312. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, Koide H. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2000;15(9):1379–1383.
313. Xu X, Xiao L, Xiao P, et al. A glimpse of matrix metalloproteinases in diabetic nephropathy. *Curr Med Chem*. 2014;21(28):3244-3260.
314. Giannini C, Dyck PJ. Basement membrane reduplication and pericyte degeneration precede development of diabetic polyneuropathy and are associated with its severity. *Ann Neurol*. 1995; 37:498- 504.
315. Kennedy JM, Zochodne. Impaired peripheral nerve regeneration in diabetes mellitus. *J Peripher Nerv Syst*. 2005; 10:144-157.

316. Shubayev VI, Myers RR. Endoneurial remodeling by TNF α - and TNF α -releasing proteases. A spatial and temporal co-localization study in painful neuropathy. *J Peripher Nerv Syst.*2002; 7:28-36.
317. Kobayashi H, Chattopadhyay S, Kato K, Dolkas J, Kikuchi S, Myers RR, Shubayev VI. MMPs initiate Schwann cell-mediated MBP degradation and mechanical nociception after nerve damage. *Mol Cell Neurosci.*2008; 39:619-627.
318. Mantuano E, Inoue G, Li X, Takahashi K, Gaultier A, Gonias SL, Campana WM .The hemopexin domain of matrix metalloproteinase-9 activates cell signaling and promotes migration of schwann cells by binding to low-density lipoprotein receptor-related protein. *J Neurosci.*2008;28:11571- 11582.
319. Ali S., Driscoll H.E., Newton V.L., Gardiner N.J. Matrix metalloproteinase-2 is downregulated in sciatic nerve by streptozotocin induced diabetes and/or treatment with minocycline: Implications for nerve regeneration. *Experimenatl Neurology.*2014;261:654-665.
320. L.K. Bhatt, A. Veeranjanyulu .Minocycline with aspirin: a therapeutic approach in the treatment of diabetic neuropathy. *Neurol. Sci.*2010; 31: 705-716
321. Deng X, Ma P, Wu M, Liao H, Song XJ. Role of Matrix Metalloproteinases in Myelin Abnormalities and Mechanical Allodynia in Rodents with Diabetic Neuropathy. *Aging Dis.* 2021;12(7):1808-1820.
322. Kawasaki Y, Xu ZZ, Wang X, Park JY, Zhuang ZY, Tan PH, Gao YJ, Roy K, Corfas G, Lo EH, Ji RR. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. *Nat Med.* 2008 Mar;14(3):331-6.
323. Papadopoulou-Merktoou N, Whiss A, Eriksson A, Papassotiriou I, Wahlberg J. Olasma levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with type 1 diabetes mellitus associate with early diabetic neuropathy and nepropathy. *Diabetes & Vascular Disease.*2021;1-7.
324. Dai J, Shen J, Chai Y, Chen H. IL-1 β Impaired Diabetic Wound Healing by Regulating MMP-2 and MMP-9 through the p38 Pathway. *Mediators Inflamm.* 2021;2021:6645766.
325. Mirza RE, Fang MM, Ennis WJ, Koh TJ. Blocking interleukin-1 β induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2013;62(7):2579-2587.
326. Lobmann R., Ambrosch A., Schultz G., Waldmann K., Schiweck S., Lehnert H. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia.* 2002;45(7):1011-1016.
327. Kupczyk D, Bilski R, Studzińska R, Woźniak A. Assessment of the concentration of selected metalloproteinases (MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-13) in patients with ulcers as a complication of type 2 diabetes. *Postepy Dermatol Alergol.* 2022;39(1):59-65.

328. Nguyen T.T., Ding D., Wolter W.R., Pérez R.L., Champion M.M., Mahasenan K.V., Heseck D., Lee M., Schroeder V.A., Jones J.I., et al. Validation of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Novel Target for Treatment of Diabetic Foot Ulcers in Humans and Discovery of a Potent and Selective Small-Molecule MMP-9 Inhibitor That Accelerates Healing. *J. Med. Chem.* 2018;61:8825–8837.
329. Jones J.I., Nguyen T.T., Peng Z., Chang M. Targeting MMP-9 in Diabetic Foot Ulcers. *Pharmaceuticals.* 2019;12:79.
330. Gao M., Nguyen T.T., Suckow M.A., Wolter W.R., Gooyit M., Mobashery S., Chang M. Acceleration of diabetic wound healing using a novel protease-anti-protease combination therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015;112:15226–15231.
331. Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics.* 2015;8(1):1–7.
332. Frazer K, Murray S, Schor N, Topol E. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 241-251.
333. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res.* 1998; 8(12): 1229-31.
334. Chorley BN, Wang X, Campbell MR, Pittman GS, Nouredine MA, Bell DA. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: Current and developing technologies. *Mutat Res.* 2008;659(1-2):147-57.
335. Price SJ, Greaves DR, Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene. Role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 2001;276(10):7549–58.
336. Zhang B, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambien F, Hamsten A, Watkins H, Henney AM. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation severity of coronary atherosclerosis. *Circulation.* 1999;99:1788–94.
337. Yang J, Fan XH, Guan YQ, et al. MMP-2 gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol.* 2010;3(2):137-140.
338. Beránek M, Kolar P, Tschoplova S, Kankova K, Vasku A. Genetic variations and plasma levels of gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) and gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) in proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis.* 2008;14:1114-1121.
339. Singh K, Goyal P, Singh M, Deshmukh S, Upadhyay D, Kant S, Agrawal NK, Gupta SK, Singh K. Association of functional SNP-1562C>T in MMP9 promoter with proliferative diabetic retinopathy in north Indian type 2 diabetes mellitus patients. *J Diabetes Complications.* 2017;31(12):1648-1651.
340. Gantala SR, Kondapalli MS, Kummari R, Padala C, Tupurani MA, Kupsal K, Galimudi RK, Gundapaneni KK, Puranam K, Shyamala N, Guditi S, Rapur R, Hanumanth SR. Collagenase-1 (-1607 1G/2G), Gelatinase-A (-1306 C/T), Stromelysin-1 (-1171 5A/6A) functional promoter polymorphisms in risk prediction of type 2 diabetic nephropathy. *Gene.* 2018 Oct 5;673:22-31.

341. Feng S, Ye G, Bai S, Wei H, Liao X, Li L. Matrix Metalloproteinase-9 -1562C/T Gene Polymorphism Is Associated with Diabetic Nephropathy. *Biomed Res Int.* 2016;2016:1627143.
342. Shalaby, Kholoud & Bahriz, Rania & Mahsoub, Nancy & El-Arman, Mohammed & El-Said, Ghada.. Matrix metalloproteinase-9 gene polymorphism (-1562 C/T) and its correlation with diabetic nephropathy. *The Egyptian Journal of Internal Medicine* 2021;. 33.10.
343. Singh K, Agrawal NK, Gupta SK, Singh K. A functional single nucleotide polymorphism - 1562C>T in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with type 2 diabetes and diabetic foot ulcers. *Int J Low Extrem Wounds.* 2013 Sep;12(3):199-204.
344. Zhang Z, Wu X, Cai T, et al. Matrix Metalloproteinase 9 Gene Promoter (rs 3918242) Mutation Reduces the Risk of Diabetic Microvascular Complications. *Int J Environ Res Public Health.* 2015;12(7):8023-8033.
345. Hoerger TJ, Segel JE, Gregg EW, Saaddine JB. Is glycemic control improving in U.S. adults? *Diabetes Care.* 2008;31:81–86.
346. Holman R.R., Paul S.K., Bethel M.A., Matthews D.R., Neil H.A. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2008;359:1577–1589.
347. Gaede P.H., Jepsen P.V., Larsen J.N., Jensen G.V., Parving H.H., Pedersen O.B. The Steno-2 study. Intensive multifactorial intervention reduces the occurrence of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *Ugeskr. Laeger.* 2003;165:2658–2661.
348. Hemminki K, Li X, Sundquist K, Sundquist J. Familial risks for type 2 diabetes in Sweden. *Diabetes Care* 2010; 33: 293–297.
349. Meigs JB, Cupples LA, Wilson PW. Parental transmission of type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes* 2000; 49: 2201–2207.
350. Quinn M, Angelico MC, Warram JH, Krolewski AS. Familial factors determine the development of diabetic nephropathy in patients with IDDM. *Diabetologia.* 1996;39:940–945.
351. Lange LA, Bowden DW, Langefeld CD, et al. Heritability of carotid artery intima-medial thickness in type 2 diabetes. *Stroke.* 2002;33:1876–1881.
352. Wagenknecht LE, Bowden DW, Carr JJ, et al. Familial aggregation of coronary artery calcium in families with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2001;50:861–866.
353. Sarray S, Dallel M, Lamine LBj, Jairajpuri D, Sellami N et al. Association of matrix metalloproteinase-2 gene polymorphism with susceptibility to type 2 diabetes: A case control study. *J Diabetes Complications.* 2021 ; 35(6).
354. Wang Y, Su Y, Xu Y, Pan SH, Liu GD. Genetic polymorphism c.1562C>T of the MMP-9 is associated with macroangiopathy in type 2 diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jan 1;391(1):113-7.

Prilog 1. Spisak skraćenica korišćenih u tekstu

AGE- krajnji produkti glikacije (eng. Advanced glycation end products)

CRP- C reaktivni protein

CVI- cerebrovaskularni insult

DKD- dijabetesna bolest bubrega

DM- diabetes mellitus

DN- dijabetesna nefropatija

DPN-dijabetesna polineuropatija

DR- dijabetesna retinopatija

ECM- ekstracelularni matriks

ICAM-1- intracelularna adhezivna molekulula 1

IDF- Internacionalna federacija za dijabetes

ITM- indeks telesne mase

IGF-1- insulinu sličan faktor rasta

NOS- azot oksid sintetaza

IL1b- interleukin 1 beta

IL-6- interleukin 6

IL-12- interleukin 12

IL-18- interleukin 18

IRMA- intraretinalne mikrovaskularne anomalije

HbA1c- glikozilirani hemoglobin

LADA- latentni autoimuni dijabetes odraslih

LDL- lipoproteini male gustine

MAPK- mitogen aktivirajući protein

MMP- matriksne metaloproteinaze

NDPD- neproliferativna dijabetesna retinopatija

NVU- neurovaskularna jedinica

PDR- proliferativna dijabetesna retinopatija

PKC- protein kinaza C

SNP- polimorfizam pojedinačnog nukleotida (eng single nucleotide polymorphism)

TNF- α - tumorski nekrotišući factor (eng tumor necrosis factor alpha)

TV- telesna visina

VEGF- vaskularni endotelni factor rasta

VCAM-1- vaskularna adhezivna molekula

Biografija autora

Dr Marina Anđelić Jelić rođena je 04.11.1969 godine. Osnovnu školu i III beogradsku gimnaziju završila je u Beogradu i kao nosilac diploma diploma „Mihajlo Petrović- Alas“ i „Svetozar Marković“.

Medicinski fakultet u Beogradu upisala je školske 1988/1989 a diplomirala je juna 1994. god prosečnom ocenom 8.26 i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Specijalizaciju iz interne medicine je upisala 1995 godine a specijalistički ispit sa odličnom ocenom položila 15. decembra 1999. god.

Magistarsku tezu iz oblasti endokrinologije pod nazivom „ Postmenopauzna osteoporoza u žena sa dijabetesom“ čiji je mentor bio Prof.dr Nebojša Lalić odbranila je aprila 2000. god.

Doktorska disertacija pod naslovom, „ Značaj genetskog polimorfizma matriksnih metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9 u nastanku mikrovaskularnih komplikacija kod pacijenata sa tipom 2 šećerne bolesti“ je odobrena od strane Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu 2012. godine

Nakon završene specijalizacije iz interne medicine, od aprila 2000 god.do februara 2001 godine bila je na usavršavanju u Velikoj Britaniji. Od 2001.god radi na KO za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KBC Zvezdara gde je od 2013-2019 god bila i načelnik odeljenja.

Od 2013. god je stalno zaposlena na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu gde radi kao asistent na predmetu Interna medicina.

Autor je i koautor više od 60 radova na srpskom i engleskom jeziku, od čega 14 radova na Sci listi kao i tri poglavlja u knjizi – Interna medicina za student stomatologije.

Predavač na brojnim CME kursevima iz oblasti dijabetesa, endokrinologije i bolesti metabolizma.

Član je Srpskog lekarskog društva, Multidisciplinarnog udruženja za menopauzu i andropauzu Srbije (MUMIA), Evropskog udruženja za studiju dijabetesa (EASD), Evropskog udruženja endokrinologa (ECE)

Živi u Beogradu, udata je i ima dvoje dece.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Marina Andjelic Jelic

Број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Znacaj genetskog polimorfizma matriksnih metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9 u nastanku mikrovaskularnih komplikacija kod pacijenata sa tipom 2 secerne bolesti

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 13.07.2022

MaJelic

образац изјаве о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Marina Andjelic Jelic

Број индекса _____

Студијски програм _____

Наслов рада Znacaj genetskog polimorfizma matriksnih metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9 u nastanku mikrovaskularnih komplikacija kod pacijenata sa tipom 2 secerne bolesti

Ментор Akademic prof dr Nebojsa M Lalic

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 13.07.2022



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Znacaj genetskog polimorfizma matriksnih metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9 u nastanku

mikrovaskularnih komplikacija kod pacijenata sa tipom 2 secerne bolesti

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, _____ 13.07.2022

Потпис аутора



