

## АНОТАЦІЯ

*Захаревич Г.Є.* Оптимізація діагностики розвитку та прогресування мікросудинних порушень при діабетичній ретинопатії за наявності цукрового діабету 2 типу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина» (22 «Охорона здоров'я»). – Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, Львів, 2021.

Дисертація присвячена вирішенню актуального завдання сучасної офтальмології – оптимізації діагностики розвитку та прогресування мікросудинних порушень при діабетичній ретинопатії за наявності цукрового діабету 2 типу на підставі комплексного вивчення клініко-лабораторних даних, даних офтальмологічного дослідження та поліморфізму гена васкулоендотеліального фактора росту (VEGF), судин у хворих на цукровий діабет 2 типу з української популяції.

Внаслідок епідемії цукрового діабету (ЦД) одним із пріоритетів в офтальмології є проблема діабетичної ретинопатії (ДР). Впродовж перших десяти років захворювання на ЦД частота розвитку ДР збільшується з 20 % до майже 50 %. За даними статистичних досліджень на непроліферативну ДР (НПДР) страждає близько 93 млн. хворих на ЦД, на проліферативну ДР (ПДР) майже 17 мільйонів, а на діабетичний макулярний набряк – 21 мільйон. Серед ускладнень ЦД ДР – одне з найбільш несприятливих, оскільки призводить до сліпоти та інвалідизації хворих. Факторами ризику розвитку ДР є гіперглікемія, гіпертензія, гіперліпідемія. Сучасними дослідженнями показано, що розвиток ДР залежить не тільки від рівня та тривалості гіперглікемії, але й від генетичних чинників, оскільки навіть при строгому глікемічному контролі спостерігаються ретинальні пошкодження у певної частини пацієнтів з ЦД 2 типу. При ДР порушення мікроциркуляції сітківки

призводить до її ішемії, і на фоні викиду васкулоендотеліального фактору росту (VEGF), спричиняє неоваскуляризацію сітківки та перехід НПДР у ПДР, крововиливи з новоутворених судин в порожнину склоподібного тіла і сітківку, що у свою чергу призводить до раптової втрати зору і відшарування сітківки. До індукторів утворення VEGF відносять гіпоксію, гіперглікемію, окислювальний стрес.

Отже, в патогенезі ДР на рівні VEGF замикається замкнуте коло мікроциркуляторних порушень, що пояснює неефективність лише глікемічного контролю для попередження порушень зору. Низкою сучасних досліджень показано етнічні відмінності в поліморфізмі гену VEGF, що може обумовлювати різні результати генетичних досліджень в різних популяціях, а також низьку ефективність застосування блокаторів неоангіогенезу. В Україні подібні дослідження не були проведені, тому доцільно визначити поліморфізм гену VEGF у хворих на ДР з української популяції та визначити зв'язок розвитку та прогресування ДР з поліморфізмом гену васкулоендотеліального фактора росту судин (*VEGFA*; *rs2010963* і *rs699947*).

Завдання дослідження:

1. Провести аналіз клініко-лабораторних та офтальмологічних показників в залежності від стадії ДР (ЦД2Т без ретинопатії, НПДР та ПДР).
2. Визначити за допомогою регресійного аналізу наявність впливу вмісту *VEGFA* у ВОР на клініко-лабораторні та офтальмологічні показники у хворих на ДР.
3. Встановити наявність зв'язку поліморфізму *rs2010963* гену *VEGFA* на розвиток ДР та при стратифікації за стадіями.
4. Встановити наявність зв'язку поліморфізму *rs699947* гену *VEGFA* на розвиток ДР та при стратифікації за стадіями.
5. Визначити вплив поліморфізмів *rs2010963* і *rs699947* гену *VEGFA* на клініко-лабораторні показники при ДР.
6. Визначити зв'язок генетичних та алельних гаплотипів *rs2010963* та *rs699947* з ДР.

7. Визначити методом математичного моделювання ймовірність розвитку та прогресування ДР на основі визначення показників перебігу захворювання та поліморфізму *rs2010963* і *rs699947* гена *VEGFA*. Розробити математичну модель діагностики та прогнозування ДР та ПДР.

Наукова новизна отриманих результатів. За результатами дослідження набули подальшого уточнення дані про перебіг ДР. Показано, що хворі з ПДР були молодшими за інших пацієнтів з ДР на 5-9 років, діабет тривав у них найдовше (8-15 років), а його перебіг майже у всіх був некомпенсованим (93,4% хворих). Найнижча гострота зору також була відмічена у хворих за наявності ПДР (у контролі медіана МГЗК склала 1,0 од., при НПДР 0,7 од., а при ПДР 0,2 од.). Максимальне значення медіани ВОТ (18 мм рт.ст.) було відмічено при ПДР. Медіани показників ОКТ при ПДР були збільшені максимальною та приблизно однаковою мірою (ЦТС – у 1,3 рази, ЦОС – у 1,4 рази;  $p < 0,01$ ). У кожного хворого з ПДР була наявна неоваскуляризація, в окремих випадках з гемофтальмом; у майже половини хворих виявлено макулярний набряк.

Вперше показано, що рівень VEGF у ВОР перевищував контрольний у 1-й групі у 5,5 разів, у другій – у 6,0 разів і у 3-й – у 9,5 разів ( $p < 0,01$  у всіх випадках). Багаторазове (у 5-6 разів) збільшення рівню VEGF у ВОР є предикторним патогенетичним фактором розвитку НПДР, а його подальше збільшення обумовлює розвиток ПДР.

Вперше показана наявність прямого і значущого впливу величини вмісту *VEGFA* у ВОР і тривалість діабету на стадію ДР при первинному огляді ( $p = 2,27E-08$  і  $p = 6,15E-05$ , відповідно), а також – значущий вплив збільшення вмісту *VEGFA* у ВОР на ймовірність розвитку неоваскуляризації тканин ока, а також – гемофтальму і ПДР ( $p < 0,05$ ).

Вперше встановлено, що підвищення ймовірності розвитку неоваскуляризації диску зорового нерву відбувається одночасно з підвищенням вмісту *VEGFA* у ВОР більш 992 пг/мл; неоваскуляризації деінде – більше 923 пг/мл; гемофтальму – більше 1005 пг/мл; ріст фіброваскулярної тканини

впродовж задньої гіалоїдної мембрани скловидного тіла – більше 1022 пг/мл; ПДР – більше 926 пг/мл.

Вперше для хворих з української популяції показано, що поліморфізм *rs2010963* гена *VEGFA* мав зв'язок з ДР ( $\chi^2=6,34$ ;  $p_{(\chi^2)}=0,04$ ). При цьому гетерозигота *G/C* збільшувала у 1,6 рази шанси розвитку ДР (OR=1,56; 95% ВІ 0,94-2,57), мінорна гомозигота – у 1,9 рази (OR=1,85; 95% ВІ 0,73-4,73), тоді як предкова гомозигота *G/G* зменшувала шанси розвитку ДР у 1,8 рази (OR=0,54; 95% ВІ 0,33-0,89). Стратифікація за стадіями ДР показала, що статистичне значення розподілу генотипів і алелей *rs2010963* мала тільки для хворих з ПДР (для генотипів  $\chi^2=16,55$ ;  $p_{\chi^2}=2,5E-0,4$ ; для алелей  $\chi^2=15,60$ ;  $p_{\chi^2}=1,0E-04$ ). Поліморфізм *rs699947* мав зв'язок з ДР ( $\chi^2=9,53$ ;  $p_{(\chi^2)}=0,01$ ); предкова гомозигота *C/C* збільшувала у 2,2 рази шанси розвитку ДР (OR=2,21; 95% ВІ 1,11-4,38), тоді як гетерозигота та мінорна гомозигота такі шанси зменшували, відповідно, у 1,5 та у 5,6 рази (OR=0,65; 95% ВІ 0,35-1,19 та OR=0,18; 95% ВІ 0,04-0,97). Стратифікація за стадіями ДР встановила, що більша частота предкової гомозиготи *C/C rs699947* мала статистичне значення тільки при ПДР ( $p=0,001$ ). Гомозигота *C/C rs699947* мала асоціацію з ПДР та у 3,8 рази підвищувала ризик її розвитку (OR=3,75; 95% ВІ 1,70-8,31) у порівнянні з іншими генотипами.

Вперше показано, що поліморфізм *rs2010963* впливав на рівень у ВОР *VEGFA* (максимальний рівень мав генотип ризику *C/C*), та мав зв'язок зі статтю (частіше зустрічався у чоловіків, ніж у жінок: 3:1), наявністю ПДР та неоваскуляризацією диску зорового нерву ( $p<0,05$ ). Поліморфізм *rs699947* впливав на МГЗК (мінімальна при генотипі *C/C*), ЦТС (максимальна при генотипі *C/C*), рівень у ВОР *VEGFA* (максимальний рівень – при генотипі *C/C*), а також наявність ПДР та гемофтальму ( $p<0,05$ ).

Вперше показано, що гаплотип *G/C-C/C* у три рази збільшував шанси розвитку ДР при ЦД2Т у порівнянні з контрольною групою. У хворих на ЦД2Т наявність гаплотипу *G/G-C/A* у 2-3 рази зменшувало шанси розвитку ПДР, тоді як наявність гаплотипу *G/C-C/C* у 4-10 разів такий ризик

збільшувало; гаплотип *C/C -C/A* виявився маркером ПДР ( $p < 0,05$ ). Було відмічено зниження коефіцієнту нерівноважного зчеплення алелей LD у хворих на ПДР ( $D' = 0,42$ ) у порівнянні з контрольною групою ( $D' = 0,71$ ) та іншими хворими з ЦД2Т ( $D' = 1,00$ ).

Вперше показано, що показники «Тривалість діабету», «Стать» та «*rs2010963*» мали прямий, а «Вік» і «*rs699947*» – зворотний зв'язок із ймовірністю розвитку як ДР, так і ПДР ( $p < 0,001$ ). Для значення  $R_{\text{ДР}} = 0,402$  безпомилкове прогнозування розвитку ДР складало 79,8%. Для значення  $R_{\text{ПДР}} = 0,315$  безпомилкове прогнозування розвитку ПДР складало 78,9%. Показана залежність прогресування ДР від генотипів *rs2010963* і *rs699947*: найшвидший розвиток ДР був притаманний гаплотипам *C/C -C/C* та *G/C -C/C*, а найповільніший – гаплотипам *G/C -A/A* і *G/G -A/A*. Розрахована регресійна модель, яка характеризує залежність швидкості прогресування ДР від поліморфізмів *rs2010963* і *rs699947* гена *VEGFA* та має високу прогностичну здатність:  $R = 0,714$ ;  $R^2 = 0,514$ ;  $F = 93,9$ ;  $p < 0,001$ .

Предковий генотип *G/G rs2010963* є протекторним для розвитку ДР: носії цього генотипу мають у 1,8 рази знижений ризик у порівнянні з пацієнтами без ЦД2Т. Для хворих з ЦД2Т носіїв предкового генотипу *G/G rs2010963* ризик розвитку ПДР знижений у 3,3 рази, тоді як для носіїв гетерозиготи *G/C* та гомозиготи *C/C* – збільшений у 2,5 рази та 1,8 рази, відповідно ( $p = 5,6 \times 10^{-3}$ ). Алель *C rs2010963* у 2,6 рази збільшує ризик розвитку ПДР у порівнянні з контрольною групою (OR=2,61; 95% ВІ 1,61-4,23). Для хворих з ЦД2Т носіїв предкового генотипу *C/C rs699947* ризик розвитку ПДР збільшений у 3,8 рази (OR=3,75; 95% ВІ 1,70-8,31) у порівнянні з контролем. У хворих з ЦД2Т ризик виникнення ПДР більше за наявності предкової гомозиготи *C/C rs699947* (у 2,8 рази; OR=2,83; 95% ВІ 1,21-6,61). У носіїв гетерозиготи *C/A* у порівнянні з контролем знижений ризик ПДР у 2,5 рази (OR=0,40; 95% ВІ 0,19-0,84), а у хворих на ЦД2Т – у 2,9 рази (OR=0,35; 95% ВІ 0,15-0,83). Наявність мінорного гомозиготного генотипу *A/A* попереджувало розвиток ДР у хворих на ЦД2Т. У хворих з ДР

генотип за мажорною алеллю *C/C rs699947* мав асоціацію з ПДР та у 3,8 рази підвищував ризик її розвитку (OR=3,75; 95% ВІ 1,70-8,31) у порівнянні з іншими генотипами. Носії гаплотипу *G/C-C/C* мають у три рази збільшені шанси розвитку ДР при ЦД2Т у порівнянні з пацієнтами, які ЦД2Т не мали (контрольна група). У хворих на ЦД2Т наявність гаплотипу *G/G-C/A* у 2-3 рази зменшувало шанси розвитку ПДР, тоді як наявність гаплотипу *G/C-C/C* у 4-10 разів такий ризик збільшувало. Гаплотип *C/C -C/A* є маркером ПДР, оскільки зустрічався тільки за умов наявності цього стану ( $p<0,05$ ).

Публікації. Основні результати дисертації викладені в 16 наукових працях. З них 7 робіт – статті в журналах і збірниках, 5 з яких відповідно до «Переліку наукових фахових видань України, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук та ступеню доктора філософії», 1 стаття опублікована у виданні, що входить до наукової бази Scopus, 1 – у періодичному науковому виданні держави, яка входить до Європейського Союзу, з напрямку якого підготовлено дисертацію; 9 – тези у матеріалах науково-практичних конференцій, у тому числі з міжнародною участю, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації.

*Ключові слова: діабетична ретинопатія, цукровий діабет II типу, поліморфізм гена васкулоендотеліального фактора росту судин (VEGFA), rs2010963, rs699947, діагностика*

## **СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:**

**Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**

1. **Zakharevych GYe.** Influence of *VEGFA* gene polymorphisms *rs2010963* and *rs699947* on clinical and laboratory indicators in diabetic retinopathy among patients with type 2 diabetes mellitus. East European Scientific Journal. 2019;

12(52):36-42.

DOI:<https://eesa-journal.com/2020/01/09/influence-of-vegfa-gene-polymorphisms-rs2010963-and-rs699947-on-clinical-and-laboratory-indicators-in-diabetic-retinopathy-among-patients-with-type-2-diabetes-mellitus-36-42/>

2. Риков СО, Гудзь АС, **Захаревич ГЄ** . Поліморфні варіанти гена VEGF *rs 6921438* та *rs 2010963* при діабетичній ретинопатії, Архів офтальмології України. 2015. Т. 3 (№ ): 36–40.

DOI:[https://docs.wixstatic.com/ugd/680f24\\_18554822e8944589a1aef1acbb7be89c.pdf](https://docs.wixstatic.com/ugd/680f24_18554822e8944589a1aef1acbb7be89c.pdf) (*Особистий внесок – дисертантом проведено клініко-лабораторні та молекулярно – генетичні дослідження, статистичний аналіз, підготована стаття для друку*).

3. Гудзь АС, **Захаревич ГЄ**. Розподіл генотипів та асоціація поліморфізму гена VEGF (*RS2010963* та *RS69994*) з діабетичною ретинопатією і цукровим діабетом 2 типу. Архів офтальмології України. 2017; 5, (1 (7)): 16-20.

DOI:[https://docs.wixstatic.com/ugd/680f24\\_31575896d22a41879d406eb1629251cb.pdf](https://docs.wixstatic.com/ugd/680f24_31575896d22a41879d406eb1629251cb.pdf). (*Особистий внесок – дисертантом проведено клініко-лабораторні та молекулярно – генетичні дослідження, статистичний аналіз, підготована стаття для друку*).

4. Гудзь АС, **Захаревич ГЄ**. Фактори ризику прогресування діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет 2-го типу. Архів офтальмології України. 2017; 5 (2(8)): 22–27.

DOI:[https://docs.wixstatic.com/ugd/680f24\\_d58f34e463354a66ab5b769d0ced7402.pdf](https://docs.wixstatic.com/ugd/680f24_d58f34e463354a66ab5b769d0ced7402.pdf). (*Особистий внесок – дисертантом проведено клініко-лабораторні та молекулярно – генетичні дослідження, статистичний аналіз, підготована стаття для друку*).

5. Гудзь АС, **Захаревич ГЄ**, Петренко ОВ, Зяблицев СВ, Джоджуа ВС. Зв'язок васкуло-ендотеліального фактору росту (*VEGFA*) зі стадією діабетичної ретинопатії та тривалістю захворювання при цукровому діабеті II типу, Офтальмологічний журнал. 2018; (2): 11–16.

DOI: <http://www.ozhurnal.com/ru/archive/2018/2/3-abstract>

*(Особистий внесок – дисертантом проведено клініко-лабораторні та молекулярно – генетичні дослідження, статистичний аналіз, підготована стаття для друку).*

6. Гудзь АС, **Захаревич ГЄ**, Петренко ОВ, Луньова ГГ. Прогнозування розвитку та прогресування діабетичної ретинопатії при цукровому діабеті 2 типу. Архів офтальмології України. 2018; 6,(1(10)):23–30.

DOI:[https://docs.wixstatic.com/ugd/680f24\\_954978fb550341f983fc71325f9730e9.pdf](https://docs.wixstatic.com/ugd/680f24_954978fb550341f983fc71325f9730e9.pdf). *(Особистий внесок – дисертантом проведено клініко-лабораторні та молекулярно – генетичні дослідження, статистичний аналіз, підготована стаття для друку).*

#### **Наукові праці, які додатково відображають результати дисертації:**

7. Риков СО, Гудзь АС, **Захаревич ГЄ**. Зв'язок рівня васкулоендотеліального чинника росту судин (VEGF) з генотипом поліморфізму гена *VEGFA* у хворих на катаракту та діабетичну ретинопатію. Збірник наукових праць Національного військово-медичного клінічного центру «ГВКГ» МО України. Сучасні аспекти військової медицини. Київ; 2016 (23): 69-71. *(Особистий внесок – дисертантом проведено клініко-лабораторні та молекулярно – генетичні дослідження, статистичний аналіз, підготована стаття до друку).*

#### **Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

8. Рыков СА, Зяблицев СВ, **Захаревич ГЄ**. Связь полиморфизма - 634G>C rs2010963 гена VEGF и проявлений диабетической ретинопатии (предварительные данные). Матеріали наук.-практ. конф. офтальмологів Запорізької, Херсонської та Дніпропетровської областей України. Актуальні питання офтальмології; 2015 Жовт 7-8; Запоріжжя 2015, с.195–196. *(Особистий внесок – дисертантом проведено клініко-лабораторні та молекулярно – генетичні дослідження, статистичний аналіз, підготована стаття до друку).*



9. Риков СО, Гудзь АС, **Захаревич ГЄ**. Розподілення генотипів та алелей поліморфізму *rs2010963* гена *VEGFA* у хворих на діабетичну ретинопатію за умов цукрового діабету II типу. Матеріали наук.-практ. конф. з міжнародною участю, присвяченої 80-річчю з дня заснування Інституту очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України та XIV конгресу офтальмологічного товариства країн Причорномор'я, Філатовські читання; 2016 Травн 19–20; Одеса 2016, с. 143–144. *(Особистий внесок – дисертантом проведено клініко-лабораторні та молекулярно – генетичні дослідження, статистичний аналіз, підготований матеріал до друку).*

10. Риков СО, Гудзь АС, **Захаревич ГЄ**. Асоціація поліморфізмів гена VEGF *rs2010963* та *rs6921438* з діабетичною ретинопатією у хворих з катарактою. Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю. Сучасні методи діагностики і лікування вітреоретинальної патології; 2016 Черв 16-17; Львів, 2016 с.83-84. *(Особистий внесок – дисертантом проведено клініко-лабораторні та молекулярно – генетичні дослідження, статистичний аналіз, підготований матеріал до друку).*

11. Риков СО, Гудзь АС, **Захаревич ГЄ**. Поліморфізм гена VEGF при діабетичній ретинопатії – вплив на глікемію та рівень VEGF у внутрішньоочній рідині. Матеріали наук.-практ.конф. офтальмологів Полтавської, Кіровоградської, Сумської, Черкаської, Чернігівської, Харківської областей України. Актуальні питання офтальмології; 2016 Жовт 5–6; Полтава; 2016, с. 145–147. *(Особистий внесок – дисертантом проведено клініко-лабораторні та молекулярно – генетичні дослідження, статистичний аналіз, підготований матеріал до друку).*

12. Гудзь АС, **Захаревич ГЄ**. Вплив поліморфізмів гена *VEGFA* на рівень у внутрішньоочній рідині васкулоендотеліально-го фактору росту при діабетичній ретинопатії. Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю. Філатовські читання – 2017. 2017 Травн 25–26; Одеса; 2017, с.138–139. *(Особистий внесок – дисертантом проведено клініко-лабораторні та молекулярно – генетичні дослідження, статистичний аналіз, підготований*

*матеріал до друку).*

13. Гудзь АС, **Захаревич ГЄ**. Васкуло-ендотеліальний фактор росту (*VEGFA*) у внутрішньоочній рідині та прогресування діабетичної ретинопатії. Матеріали наук.-практ. конф. офтальмологів Чернівецької, Івано-Франківської, Тернопільської, Хмельницької областей України, Актуальні питання офтальмології, 2017 Вер 20-21; Чернівці, Одеса; 2017, с. 84–85. *(Особистий внесок – дисертантом проведено клініко-лабораторні та молекулярно – генетичні дослідження, статистичний аналіз, підготований матеріал до друку).*

14. Гудзь АС, **Захаревич ГЄ**. Клініко-лабораторна характеристика хворих з діабетичною ретинопатією. Збірник праць науково-практичної конференції офтальмологів і дитячих офтальмологів України з міжнародною участю міжнародною участю. Рефракційний пленер'17, 2017 Жов 20–21; Київ; 2017, с. 50–52. *(Особистий внесок – дисертантом проведено клініко-лабораторні та молекулярно – генетичні дослідження, статистичний аналіз, підготований матеріал до друку).*

15. Гудзь АС, **Захаревич ГЄ**. Математичне прогнозування діабетичної ретинопатії. Матеріали з'їзду. XIV з'їзд офтальмологів України; 2018 Трав 23–25; Одеса.; 2018, с. 167–168. *(Особистий внесок – дисертантом проведено клініко-лабораторні та молекулярно – генетичні дослідження, статистичний аналіз, підготований матеріал до друку).*

16. Гудзь АС, **Захаревич ГЄ**. Значення поліморфізмів *rs2010963* та *rs69994* гена *VEGFA* у розвитку діабетичній ретинопатії при цукровому діабеті 2 типу. Збірник праць науково-практичної конференції. Шевальовські читання-19; 2019 Черв 20-21; Запоріжжя; 2019, с.13–14. *(Особистий внесок – дисертантом проведено клініко-лабораторні та молекулярно – генетичні дослідження, статистичний аналіз, підготований матеріал до друку).*