

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця  
Міністерство охорони здоров'я України  
Національний медичний університет імені О. О. Богомольця  
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Прокопенко Юлія Валеріївна**

УДК 617.735-02:616.379-008.64:577.1

## **ДИСЕРТАЦІЯ**

# **ПАТОГЕНЕТИЧНА ТА ДІАГНОСТИЧНА ЗНАЧИМІСТЬ ГЕНЕТИЧНОГО ДЕФЦИТУ ФОЛАТНОГО ЦИКЛУ В РОЗВИТКУ ДІАБЕТИЧНОЇ РЕТИНОПАТІЇ У ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 2 ТИПУ**

22 – Охорона здоров'я

222 – Медицина

Подається на здобуття ступеню доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ Ю. В. Прокопенко  
(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник: Риков Сергій Олександрович член-кореспондент НАМН  
України, доктор медичних наук, професор

Київ – 2024

## АНОТАЦІЯ

*Прокопенко Ю. В.* Патогенетична та діагностична значимість генетичного дефіциту фолатного циклу в розвитку діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет 2 типу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 – Медицина в галузі знань 22 – Охорона здоров'я. – Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, 2024.

Дисертація присвячена вирішенню актуального наукового завдання сучасної офтальмології – формуванню концепції персоніфікації ведення пацієнтів з діабетичною ретинопатією (ДР) на тлі цукровий діабет 2-го типу (ЦД2) та нових діагностичних підходів на основі вивчення асоціацій варіантів генів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR* з клінічними стадіями розвитку ДР, різною тривалістю ЦД2, метаболітами та компонентами фолатного обміну. У дослідженні вивчені особливості зв'язку генетично детермінованого дефіциту ферментів фолатного циклу та ознак фенотипу, як факторів ризику розвитку ДР, які мають стати основою клінічних рекомендацій персоніфікованого ведення пацієнтів та спрямування таргетної терапії на конкретні патогенетичні ланки для підвищення ефективності лікування хворих.

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Діабетична ретинопатія (ДР) – це ускладнення цукрового діабету, що зустрічається найбільш часто і залишається провідною причиною втрати зору (Zheng Y, et al. 2012; Wong TY, et al. 2016; Zhang G, et al. 2022).

Етіологія і патофізіологія ДР інтенсивно вивчаються, але досі бракує ефективних терапевтичних схем успішної корекції патологічного стану та запобігання його погіршення та прогресування (Cheung N, et al. 2010). Переважна більшість пацієнтів з діабетичними ураженнями сітківки – це хворі на ЦД2. Дослідження щодо особливостей мікросудинних ускладнень у хворих на ЦД2 (Mogilevskyy SYu, et al. 2017) показали, що у більшості (2/3) хворих із ЦД2 мала місце ДР. Серед хворих із ДР частота непроліферативної ДР (НПДР)

та проліферативної ДР (ПДР) співвідносилася як 1:1. Зростання тривалості ЦД2 у групах хворих вказувало на послідовність розвитку патологічного процесу.

У патогенезі ДР та інших судинних ускладнень, що виникають на тлі гіперглікемії, дисфункція судинного ендотелію розглядається, як важливий фактор ушкодження. Ендотеліальна дисфункція добре відома у пацієнтів з гіперхолестеринемією, а перекисне окислення ліпідів у судинній стінці призводить до локальної продукції активних форм радикалів, які опосередковують рекрутування макрофагів, клітинну активацію та проліферацію, а також хімічну модифікацію судинних білків за рахунок кінцевих продуктів ліпоксидзації (Houde M, et al. 2016). Таким чином гіперліпідемія за рахунок ендотеліальної дисфункції може сприяти розвитку ДР, макулярному набряку і порушенню гематоретинального бар'єру крові, що призводить до ексудації ліпідів і ліпопротеїдів сироватки (Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС. 2019; Venarous R, et al. 2011).

Генетичний дефіцит фолатного циклу відноситься до найпоширенішої в людській популяції генетичної патології. Встановлено, що носієм хоча б одного відомого поліморфізму генів циклу фолієвої кислоти є принаймні 30% сучасних людей. Комбінації несприятливих поліморфізмів внаслідок кумулятивного ефекту приводять до клінічно значимого порушення обміну речовин, в основі якого лежить феномен гіпергомоцистеїнемії (Elmasry K, et al. 2018; Ganapathy PS, et al. 2011; Elsherbiny NM, et al. 2020; Gu J, et al. 2023). Гомоцистеїн, що накопичується в надмірній кількості, чинить токсичний ефект на ендотелій судин, нервові клітини та клітини імунної системи (Kundi H, et al. 2016; Liu Z, et al. 2019; Liu ZJ, et al. 2019; Koklesova L, et al. 2021). Крім того, внаслідок порушення механізмів метилювання ДНК погіршуються клінічні прояви іншої генетичної патології, що міститься в геномі людини (Friso S, et al. 2002).

Цикл фолієвої кислоти реалізується завдяки діяльності трьох ключових ферментів: метілентетрагідрофолатредуктази (MTHFR), метіонінсинтази-редуктази (MTRR) і метіонінсинтази (MTR). На даний момент описані два основних поліморфізми гену *MTHFR*, пов'язані із заміною цитозину на тимін в

кодони 677 (677 C>T; *rs1801133*) і аденіну на цитозин в кодони 1298 (1298 A>C; *rs1801131*). Нещодавно заявили про клінічну значущість додаткового поліморфізму *MTHFR G1793A (rs2274976)*. У генах *MTRR* і *MTR* відомі поліморфізми, обумовлені заміною аденіну на гуанозин (A>G) в кодонах 66 і 2756 відповідно. Нещодавно заявили про клінічну значущість додаткової алелі *MTRR C524T*. Згідно з сучасними уявленнями поліморфізм генів пов'язують з дефіцитом ферментів циклу фолієвої кислоти, що призводить до гіпергомоцистеїнемії та таких ускладнень як, атеросклероз, серцево- і нейросудинні катастрофи (Mello AL, et al. 2012; Fotiou P, et al. 2014; Fu Y, et al. 2017; Kowluru RA, et al. 2020; Dai SH, et al. 2021; Gu J, et al. 2023).

Дефіцит вітамінів групи В і фолієвої кислоти зазвичай пов'язаний з високим рівнем циркулюючого гомоцистеїну. Дослідники вивчають різні напрямки дієти, які б сприяли підвищенню рівню фолатів та вітамінів (John WR, et al. 1983; Stover PJ. 2004; Cai D, et al. 2023).

Отже, вивчення взаємозв'язку ушкодження сітківки та генетичного дефіциту фолатного циклу дозволить впроваджувати інноваційні стратегії із застосуванням препаратів, що патогенетично пов'язані з компенсацією дефіциту фолатного циклу, що може призвести до прогресивного покращення ведення хворих на ДР, попередження прогресування ретинопатії та сформувані рекомендації для профілактики мікросудинних ускладнень у хворих на ЦД2.

**Мета дослідження.** Вивчити патогенетичну та діагностичну значимість генетичного дефіциту фолатного циклу в розвитку діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет 2 типу.

Відповідно до мети дослідження будуть вирішуватися такі **завдання**:

1. Вивчити асоціацію поліморфних варіантів генів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR* з клінічними стадіями розвитку ДР та рівнем гомоцистеїну у пацієнтів із ЦД2.
2. Проаналізувати вміст аргінази-1 та ендотеліну-1 в сироватці крові у пацієнтів на ДР із різною тривалістю ЦД2 в залежності від поліморфних варіантів генів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR*, як можливого чинника розвитку ендотеліальної дисфункції.

3. Дослідити патерн біохімічних порушень, зумовлених генетичним дефіцитом фолатного циклу у пацієнтів із різними стадіями ДР на тлі ЦД2

4. Вивчити особливості порушення обміну фолатів та вітамінів групи В, зумовлених генетичним дефіцитом фолатного циклу у пацієнтів із ДР та різною тривалістю ЦД2.

5. Розробити рекомендації щодо прогнозування перебігу ДР та засоби профілактики прогресування ендотеліальної дисфункції з урахуванням поліморфних варіантів генів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR* та особливостей метаболізму хворих на ЦД2.

На першому етапі ми вивчили розподіл частоти зустрічаємості генотипів основних генів фолатного циклу *MTHFR C677T (rs1801133)*; *MTHFR A1298C (rs1801131)*; *MTR A2756G (rs1805087)* в дослідних групах із визначенням показника співвідношення шансів. Виявили, відсутність асоціації поліморфізмів вказаних генів із розвитком ДР; вказали, які генотипи переважають у групах і які виявлені лише у пацієнтів із ДР. Вивчення вмісту L-гомоцистеїну показало збільшення його у пацієнтів в 2 рази ( $p < 0,05$ ) порівняно із контрольною групою; вивчення вмісту L-гомоцистеїну виявило суттєву різницю гіпергомоцистеїнемії в залежності від генотипів.

Наступним етапом дослідили вміст ендотеліну-1, аргінази-1 в плазмі крові та патерн біохімічних порушень у пацієнтів з ДР в залежності від поліморфізмів генів фолатного циклу. Потенційними факторами ризику розвитку ДР на тлі ЦД2 можна вважати генотип CC гену *rs1801133*, генотип GG гену *rs1805087*, поліморфізм AC та генотип CC гену *rs1801131*. Можна вважати факторами утримання розвитку ДР наявність поліморфізму CT гену *rs1801133* та генотипу AA *rs1801131*. Ми не виявили асоціацій вмісту аргінази-1 в плазмі крові із різними генотипами вказаних генів та показниками глюкози, глікованого гемоглобіну, холестерину, ЛПНЩ, ЛПВЩ, тригліцеридів, АЛТ, АСТ у пацієнтів з ДР на тлі ЦД2.

Третім етапом нашої роботи було вивчення асоціації поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу із вмістом вітамінів групи В у пацієнтів із ДР на тлі

ЦД2. Вміст фолатів в крові досліджуваних осіб розрізнявся у залежності від генотипу і був максимальним у здорових носіїв генотипу ТТ гену *rs1801133*, носіїв генотипу АГ гену *rs1805087* та носіїв генотипу СС гену *rs1801131*. Найбільший дефіцит вітаміну В12 спостерігали у носіїв генотипу СТ гену *rs1801133*, генотипу АГ гену *rs1805087*. Найбільш протективним виявився генотип АС гену *rs1801131*. Вміст вітаміну В6 розрізнявся у здорових осіб в залежності від поліморфізмів гену *rs1801131*: найбільшим він був у носіїв генотипу АА і на тлі розвитку ретинопатії знижувався на 36% не залежно від стадії. Аналогічно знижувався рівень вітаміну В6 у носіїв генотипу АС на 30% відносно КГ, а у носіїв генотипу СС при розвитку НІДР спостерігали зниження вітаміну В6 в 1,8 разів. Отже, фолатний статус може відігравати роль у розвитку та прогресуванні ДР.

На заключному етапі нашої роботи ми розробили рекомендації прогнозування перебігу ДР та засоби профілактики прогресування ендотеліальної дисфункції з урахуванням поліморфних варіантів генів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR* та особливостей метаболізму хворих на ЦД2.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Доповнено наукові дані щодо розподілу алелей основних генів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR*, що забезпечують фолатний цикл у хворих на ЦД2 та асоціації поліморфних варіантів вказаних генів із клінічними стадіями розвитку ДР та стажем ЦД2. Досліджено вміст гомоцистеїну у пацієнтів при всіх стадіях ДР, різним стажем ЦД2 та варіантами генотипів генів фолатного циклу, а також аргінази-1, як метаболіту нітрозативного обміну, який впливає на стан ендотелію судин. Був вивчений зв'язок аргінази-1 із стадією ДР при різних варіантах генотипів генів фолатного циклу.

Розширені наукові дані про асоціацію генотипів із вмістом ендотеліну-1, як важливого чинника ендотеліальної дисфункції у пацієнтів з різними стадіями ДР та різним стажем ЦД2.

Вперше у пацієнтів з різною стадією ДР вивчений вміст вітамінів групи В, як субстратної основи фолатного циклу, та визначена роль основних генів

*MTHFR*, *MTRR* і *MTR*, що забезпечують синтез ферментів фолатного обміну.

Вперше проведено дослідження патерну біохімічних показників ліпідного та вуглеводного обміну, зумовлених генетичним дефіцитом фолатного циклу у пацієнтів із різними стадіями ДР на тлі ЦД2.

**Практичне значення отриманих результатів.** Розроблені та обґрунтовані рекомендації прогнозування перебігу ДР та засоби профілактики прогресування ендотеліальної дисфункції з урахуванням поліморфних варіантів генів та особливостей метаболізму хворих на ЦД2 на основі аналізу внеску кожного фактору фенотипу: розвиток та прогресування стадії ДР, тривалість ЦД2, вміст гомоцистеїну, ET-1, аргінази-1, дефіцит фолатів, дефіцит вітамінів В12 та В6 у носіїв відповідного варіанту генів фолатного циклу *MTHFR C677T (rs1801133)*, *MTR 2756A/G (rs1805087)*, *MTHFR A1298C (rs1801131)*.

Фахівцям, що лікують ЦД2 та ДР слід враховувати, що найбільш розповсюджений поліморфний варіант СТ гену *MTHFR C677T (rs1801133)* не пов'язаний із високим ризиком розвитку ДР на тлі ЦД2. У носіїв дикого варіанту СС цього гену є тенденція до підвищення виникнення ДР на тлі ЦД2, проте фактором ризику є не тривалість діабету, а механізми оксидативно-нітрозативного стресу, які викликають накопичення ET-1 і призводять до ендотеліальної дисфункції. У носіїв мінорного варіанту ТТ гену *MTHFR C677T* найменший ризик розвитку ДР на тлі ЦД2, і механізми виникнення ушкодження ґрунтуються на дефіциті вітамінів групи В.

У пацієнтів з ЦД2, які є носіями мажорного генотипу АА та поліморфізму АG гену *MTR 2756A/G (rs1805087)* ризик розвитку ДР є невисоким. Єдиним фактором ризику можна вважати дефіцит вітамінів групи В. Певну загрозу розвитку ДР мають пацієнти з ЦД2 які є носіями мінорного генотипу GG гену *MTR 2756A/G (rs1805087)*. У них виникнення мікросудинного ускладнення буде базуватися на багатьох механізмах, зокрема підвищення гомоцистеїну, ET-1, аргінази-1, та дефіциту фолатів. Єдиним компенсаторним механізмом на тлі генетичного дефіциту ферменту MTR для них буде відсутність дефіциту

вітамінів В6 та В12.

Для носіїв поліморфізму АС гену *MTHFR A1298C (rs1801131)*, яких є більшість серед населення, рекомендації мають полягати у тому, що на тлі ЦД2 ДР може виникнути через підвищення ET-1 та індукцію оксидативно-нітрозативного стресу. У носіїв дикого генотипу АА ризики виникнення ДР на тлі ЦД є не високими, але фактором ризику може бути дефіцит вітамінів групи В. У носіїв мінорного генотипу СС до факторів ризику розвитку ДР можна віднести тривалість ЦД, та накопичення гомоцистеїну через дефіцит фолатів.

Запропонована основа для клінічних рекомендацій персоніфікованого ведення пацієнтів та спрямованої таргетної терапії на конкретні патогенетичні ланки ДР на підставі встановлених нами даних зв'язку генетичних особливостей у вигляді дефіциту ферментів фолатного циклу та ознак фенотипу, що суттєво підвищить ефективність лікування хворих.

**Ключові слова:** патогенетична значимість, цукровий діабет, ретинопатія, прогресування, математичне моделювання, сітківка, гіпоксія, морфофункціональні показники, профілактика, комплексне лікування, поліморфізми генів, генетичний дефіцит ферментного циклу, гіпергомоцистеїнемія, ендотелін, аргіназа, фолати, вітаміни групи В.



## Список публікацій здобувача за темою дисертації.

Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:

1. Прокопенко ЮВ. Асоціації поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу із вмістом вітамінів групи В у пацієнтів із діабетичною ретинопатією та цукровим діабетом 2 типу. Архів офтальмології України. 2022;10(2):23-30. doi: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.10.2.2022.298>.

2. Риков СО, Прокопенко ЮВ, Натрус ЛВ, Панченко ЮА. Роль поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу у прогресуванні діабетичної ретинопатії пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. Офтальмологічний журнал (Україна). 2022;5:3-11. doi <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh20225311>.

3. Риков С.О, Прокопенко Ю.В. Вміст ендотеліну-1 в плазмі крові пацієнтів з діабетичною ретинопатією на тлі цукрового діабету 2 типу в залежності від поліморфних варіантів генів MTHFR, MTRR I MTR. Медична наука України. 2023;19(3):37-47. doi: <https://doi.org/10.32345/2664-4738.3.2023.06>.

Наукові праці які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

4. Прокопенко ЮВ, Риков СО. Оцінка асоціацій поліморфізмів генів MTHFR C677T, MTR A2756G, MTHFR A1298C із розвитком діабетичної ретинопатії у пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. Grail of Science. 2022;17: 458–459. doi: <https://doi.org/10.36074/grail-of-science.22.07.2022.079>.

5. Прокопенко ЮВ. Оцінка асоціацій поліморфізмів генів MTHFR C677T, MTR A2756G, MTHFR A1298C із розвитком діабетичної ретинопатії у пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. В: Риков С.О (ред.) СВОЄ ДИТИНСТВО ТРЕБА БАЧИТИ`22: науково-практична конференція дитячих офтальмологів та оптометристів України з міжнародною участю 11 червня 2022 року: збірник праць. Київ; 2022, с. 44-45. doi: <http://ir.nuozu.edu.ua:8080/handle/lib/4513>.

6. Прокопенко ЮВ, Риков СО, Натрус ЛВ. Вплив гомоцистеїнемії на прогресування діабетичної ретинопатії у пацієнтів на цукровий діабет 2 типу із різними варіантами поліморфізмів генів фолатного циклу. В: Promising ways of

improving science and scientific solutions: Abstracts of XXV International Scientific and Practical Conference, Warsaw, Poland (June 26 – 28, 2023). Warsaw, Poland; 2023, с. 101-102. Доступно з: <https://eu-conf.com/wp-content/uploads/2023/05/promising-ways-of-improving-science-and-scientific-solutions.pdf>.

## ABSTRACT

*Prokopenko Y. V.* Pathogenetic and diagnostic significance of genetic deficiency of folate cycle in the development of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. – Qualification scientific work on the rights of manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 222 - Medicine. Field of knowledge 22 Health care. – Bogomolets National Medical University, Kyiv, 2024.

The dissertation is devoted to solving the urgent scientific problem of modern ophthalmology - the formation of the concept of personalization of the management of patients with diabetic retinopathy (DR) in the setting of type 2 diabetes mellitus (T2DM) and new diagnostic approaches based on the study of associations of MTHFR, MTRR and MTR gene variants with clinical stages of DR development, different duration of T2DM, metabolites and components of folate metabolism. The study investigated the peculiarities of the relationship between genetically determined deficiency of folate cycle enzymes and phenotype signs as risk factors for the development of DR, which should form the basis of clinical recommendations for personalized patient management and targeted therapy to specific pathogenic links to improve the effectiveness of treatment of patients.

**Rationale for choosing the research topic.** Diabetic retinopathy (DR) is the most common complication of diabetes mellitus and remains the leading cause of vision loss [146, 154, 157].

The etiology and pathophysiology of DR are being intensively studied, but there is still a lack of effective therapeutic regimens for the successful correction of the pathological condition and prevention of its deterioration and progression[30]. The vast majority of patients with diabetic retinal lesions are patients with T2DM. Studies on the characteristics of microvascular complications in patients with T2DM[99] showed that the majority (2/3) of patients with T2DM had DR. Among patients with DR, the frequency of nonproliferative DR (NPDR) and proliferative DR (PD) correlated as 1:1.

The increase in the duration of T2DM in the groups of patients indicated the sequence of development of the pathological process. In the pathogenesis of DR and other vascular complications that occur in the setting of hyperglycemia, vascular endothelial dysfunction is considered an important factor of damage. Endothelial dysfunction is well known in patients with hypercholesterolemia, and lipid peroxidation in the vascular wall leads to local production of reactive radicals that mediate macrophage recruitment, cell activation and proliferation, as well as chemical modification of vascular proteins due to lipoxidation end products [66]. Thus, hyperlipidemia due to endothelial dysfunction can contribute to the development of DR, macular edema and blood-brain barrier disruption, which leads to the exudation of serum lipids and lipoproteins [14, 21]. Genetic deficiency of the folate cycle is one of the most common genetic pathologies in the human population. It has been established that at least 30% of modern people are carriers of at least one known polymorphism of the folic acid cycle genes. Combinations of unfavorable polymorphisms due to the cumulative effect lead to clinically significant metabolic disorders, which are based on the phenomenon of hyperhomocysteinemia[40, 53, 44, 57]. Homocysteine accumulated in excessive amounts has a toxic effect on the vascular endothelium, nerve cells, and cells of the immune system [81,86 ,87,78]. In addition, due to the disruption of DNA methylation mechanisms, the clinical manifestations of other genetic pathologies contained in the human genome worsen [49].

The folic acid cycle is realized through the activity of three key enzymes: methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), methylenetetrahydrofolate reductase (MTRR), and methionine synthase (MTR). Currently, two major polymorphisms of the MTHFR gene have been described, associated with the replacement of cytosine with thymine at codon 677 (677 C>T; rs1801133) and adenine with cytosine at codon 1298 (1298 A>C; rs1801131). Recently, the clinical significance of the additional MTHFR polymorphism G1793A (rs2274976) has been reported. In the MTRR and MTR genes, polymorphisms are known to be caused by the substitution of adenine for guanosine (A>G) in codons 66 and 2756, respectively. Recently, the clinical

significance of the additional MTRR allele C524T has been reported. According to current knowledge, gene polymorphism is associated with deficiency of folic acid cycle enzymes, which leads to hyperhomocysteinemia and complications such as atherosclerosis, cardiovascular and neurovascular accidents [97,46,52,79,35,57]. Deficiency of B vitamins and folic acid is usually associated with high circulating homocysteine levels. Researchers are studying different areas of the diet that would increase the level of folate and vitamins [72,124]. Thus, the study of the relationship between retinal damage and genetic folate cycle deficiency will allow the implementation of innovative strategies using drugs that are pathogenetically related to the compensation of folate cycle deficiency, which can lead to a progressive improvement in the management of patients with DR, prevent the progression of retinopathy and formulate recommendations for the prevention of microvascular complications in patients with T2DM.

**Objective of the study.** To study the pathogenetic and diagnostic significance of genetic deficiency of the folate cycle in the development of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus.

In accordance with the aim of the study, the following **tasks** will be solved:

1. To study the association of polymorphic variants of the MTHFR, MTRR and MTR genes with clinical stages of DR and homocysteine levels in patients with T2DM.
2. To analyze the content of arginase-1 and endothelin-1 in the blood serum of patients with DR with different duration of T2DM depending on the polymorphic variants of the MTHFR, MTRR and MTR genes as a possible factor in the development of endothelial dysfunction.
3. To investigate the pattern of biochemical disorders caused by genetic deficiency of the folate cycle in patients with different stages of DR in the setting of T2DM
4. To study the peculiarities of folate and B vitamin metabolism disorders caused by genetic deficiency of the folate cycle in patients with DR and different duration of T2DM.

5. To develop recommendations for predicting the course of DR and means of preventing the progression of endothelial dysfunction, taking into account polymorphic variants of the MTHFR, MTRR and MTR genes and metabolic characteristics of patients with T2DM.

At the first stage, we studied the distribution of the frequency of genotypes of the main folate cycle genes MTHFR C677T (rs1801133); MTHFR A1298C (rs1801131); MTR A2756G (rs1805087) in the study groups with the determination of the odds ratio. We found that there was no association of polymorphisms of these genes with the development of DR; we indicated which genotypes predominated in the groups and which were found only in patients with DR. The study of L-homocysteine content showed a 2-fold increase in patients ( $p < 0.05$ ) compared with the control group; the study of L-homocysteine content revealed a significant difference in hyperhomocysteinemia depending on genotypes.

The next step was to investigate the content of endothelin-1, arginase-1 in blood plasma and the pattern of biochemical disorders in patients with DR depending on the polymorphisms of folate cycle genes. The SS genotype of the rs1801133 gene, the GG genotype of the rs1805087 gene, the AS polymorphism, and the SS genotype of the rs1801131 gene can be considered potential risk factors for the development of DR in the setting of T2DM. The presence of the CT polymorphism of the rs1801133 gene and the AA genotype of the rs1801131 gene can be considered as factors in the retention of DR development. We did not find associations of plasma arginase-1 content with different genotypes of these genes and indicators of glucose, glycosylated hemoglobin, cholesterol, LDL, HDL, triglycerides, ALT, AST in patients with DR in the setting of T2DM.

The third stage of our work was to study the association of folate cycle enzyme gene polymorphisms with B vitamins in patients with DR with T2DM. The folate content in the blood of the subjects differed depending on the genotype and was maximal in healthy carriers of the TT genotype of the rs1801133 gene, carriers of the AG genotype of the rs1805087 gene, and carriers of the CC genotype of the rs1801131 gene. The highest deficiency of vitamin B12 was observed in carriers of

the CT genotype of the rs1801133 gene and the AG genotype of the rs1805087 gene. The most protective was the AC genotype of the rs1801131 gene. The vitamin B6 content differed in healthy individuals depending on the polymorphisms of the rs1801131 gene: it was highest in AA genotype carriers and decreased by 36% in the setting of retinopathy, regardless of the stage. Similarly, the level of vitamin B6 decreased in carriers of the AC genotype by 30% compared to the CG, and in carriers of the SS genotype, a 1.8-fold decrease in vitamin B6 was observed in the development of NPDR. Thus, folate status may play a role in the development and progression of DR.

At the final stage of our work, we developed recommendations for predicting the course of DR and means of preventing the progression of endothelial dysfunction, taking into account polymorphic variants of the MTHFR, MTRR and MTR genes and the metabolic characteristics of patients with T2DM.

**Scientific novelty of the results.** The scientific data on the distribution of alleles of the main genes MTHFR, MTRR and MTR, which provide the folate cycle in patients with T2DM, and the association of polymorphic variants of these genes with clinical stages of DR and T2DM duration have been supplemented. The homocysteine content in patients with all stages of DR, different duration of T2D and genotypes of folate cycle genes, as well as arginase-1 as a metabolite of nitrosative metabolism that affects the state of the vascular endothelium were investigated. The association of arginase-1 with the stage of DR in different genotypes of folate cycle genes was studied. The scientific data on the association of genotypes with endothelin-1 content as an important factor of endothelial dysfunction in patients with different stages of DR and different duration of T2DM have been expanded.

For the first time, the content of B vitamins as a substrate basis of the folate cycle was studied in patients with different stages of DR, and the role of the main genes MTHFR, MTRR and MTR, which ensure the synthesis of folate metabolism enzymes, was determined.

For the first time, a study of the pattern of biochemical parameters of lipid and carbohydrate metabolism caused by genetic deficiency of the folate cycle in patients

with different stages of DR against the background of T2DM was conducted.

**Practical significance of the results.** Recommendations for predicting the course of DR and means of preventing the progression of endothelial dysfunction, taking into account polymorphic gene variants and metabolic characteristics of patients with T2DM, based on the analysis of the contribution of each phenotype factor, have been developed and substantiated: development and progression of the DR stage, duration of T2DM, homocysteine, ET-1, arginase-1, folate deficiency, vitamin B12 and B6 deficiency in carriers of the corresponding variant of the folate cycle genes MTHFR C677T (rs1801133), MTR 2756A/G (rs1805087), MTHFR A1298C (rs1801131).

Specialists treating T2DM and DR should take into account that the most common polymorphic variant of the MTHFR C677T gene (rs1801133) is not associated with a high risk of developing DR in the setting of T2DM. Carriers of the wild-type CC variant of this gene have a tendency to increase the occurrence of DR in the setting of T2DM, but the risk factor is not the duration of diabetes, but the mechanisms of oxidative-nitrosative stress, which cause the accumulation of ET-1 and lead to endothelial dysfunction. Carriers of the minor TT variant of the MTHFR C677T gene have the lowest risk of developing DR in the setting of T2DM, and the mechanisms of damage are based on B vitamin deficiency.

In patients with T2DM who carry the AA major genotype and the AG polymorphism of the MTR 2756A/G gene (rs1805087), the risk of developing DR is low. The only risk factor can be considered a deficiency of B vitamins. Patients with T2DM who are carriers of the minor GG genotype of the MTR 2756A/G (rs1805087) gene are at a certain risk of developing DR. In them, the occurrence of microvascular complications will be based on many mechanisms, including increased homocysteine, ET-1, arginase-1, and folate deficiency. The only compensatory mechanism for them against the background of genetic deficiency of the MTR enzyme will be the absence of vitamin B6 and B12 deficiency.

For carriers of the AC polymorphism of the MTHFR gene A1298C (rs1801131), who are the majority of the population, the recommendations should be that DR in



the setting of T2DM may occur due to an increase in ET-1 and the induction of oxidative-nitrosative stress. In carriers of the wild-type AA genotype, the risk of DR in the setting of T2DM is not high, but a risk factor may be a deficiency of B vitamins. In carriers of the minor SS genotype, the risk factors for the development of DR include the duration of diabetes mellitus and homocysteine accumulation due to folate deficiency.

We propose a basis for clinical recommendations for personalized patient management and targeted therapy for specific pathogenetic links of DR based on the data of the relationship between genetic features in the form of folate cycle enzyme deficiency and phenotype signs, which will significantly increase the effectiveness of treatment of patients.

***Key words:** pathogenetic significance, diabetes, retinopathy, progression, mathematical modeling, retina, hypoxia, morphofunctional indicators, prevention, complex treatment, gene polymorphisms, genetic deficiency of the enzyme cycle, hyperhomocysteinemia, endothelin, arginase, folates, B vitamins.*

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....</b>	<b>20</b>
<b>ВСТУП.....</b>	<b>22</b>
<b>РОЗДІЛ 1 ВИВЧЕННЯ СУЧАСНИХ МАРКЕРІВ АСОЦІЙОВАНИХ ІЗ РОЗВИТКОМ ДІАБЕТИЧНОЇ РЕТИНОПАТІЇ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2 ТИПУ ДЛЯ РОЗРОБКИ ЕФЕКТИВНИХ КЛІНІЧНИХ РЕКОМЕНДАЦІЙ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....</b>	<b>33</b>
1.1 Актуальність вивчення патогенезу діабетичної ретинопатії.....	33
1.2 Гомоцистеїн, як потенційний біомаркер і терапевтична мішень для діабетичної ретинопатії .....	35
1.3 Роль обміну фолатів у патогенезі ретинопатії .....	37
1.4 Вплив генетично детермінованого дефіциту ферментів фолатного циклу на розвиток судинних ускладнень ЦД2 .....	40
1.5 Пошуки ефективних біомаркерів діагностики ускладнень діабету.....	42
1.6 Метаболоміка як сучасний підхід до дослідження діагностичних біомаркерів (аргіназа-1).....	46
1.7 Ендотелін-1, як один із провідних факторів розвитку діабетичної ретинопатії .....	48
Резюме до розділу 1 .....	52
<b>РОЗДІЛ 2 ДИЗАЙН ДОСЛІДЖЕННЯ. МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ.....</b>	<b>53</b>
2.1 Загальний дизайн дослідження і опис критеріїв визначення груп, що досліджуються.....	53
2.2 Офтальмологічний статус .....	57
2.3 Молекулярно-генетичні дослідження у пацієнтів з ДР та ЦД2 .....	58
2.4 Біохімічні дослідження у пацієнтів з ДР та ЦД2 .....	59
2.5 Методи статистичних досліджень.....	60
<b>РОЗДІЛ 3 АСОЦІАЦІЇ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ MTHFR, MTRR І MTR З КЛІНІЧНИМИ СТАДІЯМИ РОЗВИТКУ ДР ТА РІВНЕМ ГОМОЦИСТЕЇНУ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЦД2 .....</b>	<b>62</b>
3.1 Аналіз розподілу частоти зустрічаємості алелей і генотипів генів	

<i>rs1801133, rs1805087, rs1801131</i> в дослідних групах .....	62
3.2 Вивчення рівню L-гомоцистеїну у крові учасників дослідження .....	67
3.3 Аналіз тривалості діабету у пацієнтів різних груп.....	72
Резюме до розділу 3 .....	75
<b>РОЗДІЛ 4 ВМІСТ ЕНДОТЕЛІНУ-1 І АРГІНАЗИ-1 В ПЛАЗМІ КРОВІ ТА ПАТЕРН БІОХІМІЧНИХ ПОРУШЕНЬ У ПАЦІЄНТІВ НА ДР В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ ФОЛАТНОГО ЦИКЛУ .....</b>	<b>77</b>
Резюме до розділу 4 .....	90
<b>РОЗДІЛ 5 АСОЦІАЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ ФЕРМЕНТІВ ФОЛАТНОГО ЦИКЛУ ІЗ ВМІСТОМ ВІТАМІНІВ ГРУПИ В У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ДР НА ТЛІ ЦД2 .....</b>	<b>93</b>
Резюме до розділу 5 .....	104
<b>РОЗДІЛ 6 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ .....</b>	<b>105</b>
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>119</b>
<b>ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ .....</b>	<b>122</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>	<b>124</b>
<b>ДОДАТКИ.....</b>	<b>146</b>
Додаток А. Акти впровадження результатів роботи в науковий обіг та практичну діяльність .....	146
Додаток Б. Список публікацій здобувача за темою дисертації.....	158
Додаток В. Апробації дисертації .....	160

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

СКОРОЧЕННЯ	РОЗШИФРОВКА СКОРОЧЕННЯ
AG	– гетерозиготний генотип
ALT	– алатамінотрансфераза
AST	– аспартатамінотрансфераза
DR	– diabetic retinopathy
EC	– ендотеліальні клітин
ER	– ендоплазматичний ретикулум
ETDRS	– шкала оцінки ретинопатії
FABP	– fatty acid binding protein
GG	– гомозиготні генотипи
IBM SPSS Statistics	– програма статистичного обрахунку
MedStat	– програма статистичного обрахунку
MTHFR	– метілентетрагідрофолатредуктаза
MTR	– метіонінсинтаза
MTRR	– метіонінсинтаза-редуктаза
NMU	– National Medical University
NOS	– синтаза оксиду азоту
SNP	– single nucleotide polymorphism
TT	– гомозиготний генотип
VEGF	– васкулоендотеліальний ростовий фактор
AA	– гомозиготний генотип
АЛТ	– алатамінотрансфераза
АС	– гетерозиготний генотип
АСТ	– аспартатамінотрансфераза
ВШ (OR)	– відношення шансів
ГГТ	– гамаглутаматтрансфераза
ГДФЦ	– генетичний дефіцит фолатного циклу
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота

ДР	– діабетична ретинопатія
ЕТ-1	– ендотелін-1
ЖК	– жирні кислоти
ІМТ	– індекс маси тіла
ІФА	– імуноферментний аналіз
КГ	– контрольна група
КК	– креатинкіназа
ЛДГ	– лактатдегідрогеназа
ЛПВЩ	– ліпопротеїди високої щільності
ЛПНЩ	– ліпопротеїди низької щільності
НДІ ЕКМ	– Науково-дослідний інститут експериментальної та клінічної медицини
НЖК	– насичені жирні кислоти
ННЖК	– ненасичені жирні кислоти
НПДР	– непроліферативна діабетична ретинопатія
ПДР	– проліферативна діабетична ретинопатія
ПЛР-аналіз	– аналіз шляхом полімеразно-ланцюгової реакції
ПНЖК	– поліненасичені жирні кислоти
РНК	– рибонуклеїнова кислота
СРБ	– С-реактивний білок
СС	– гомозиготний генотип
СТ	– гетерозиготний генотип
ТГ	– тригліцериди
ТТ	– гомозиготний генотип
ХС	– холестерин
ЦД	– цукровий діабет
ЦД1	– цукровий діабет 1-го типу
ЦД2	– цукровий діабет 2-го типу
ЦНС	– центральна нервова система

## ВСТУП

### Обґрунтування вибору теми дослідження

Діабетична ретинопатія (ДР) залишається основною причиною втрати зору у дорослих працездатного віку і проблема не втрачає актуальності [154, 155]. Пацієнти з цукровим діабетом 2 типу (ЦД2) зазвичай мають фонову ретинопатію на момент постановки діагнозу діабету, але більш ніж у 60% розвинеться та чи інша форма ретинопатії протягом 20 років [145]. За даними Міжнародної діабетичної федерації [69], в даний час на діабет страждають майже 285 мільйонів людей у всьому світі, і очікується, що до 2030 року це число сягне 438 мільйонів [16, 154, 155]. Отже проблема розвитку ДР та профілактики прогресування ускладнення не зменшує своєї актуальності.

Активно вивчаються усі патогенетичні ланки мікросудинних ускладнень цукрового діабету 2 типу (ЦД2): від системного впливу факторів харчування, способу життя, генетичної схильності, порушення молекулярних механізмів, що забезпечують стан ліпідного обміну тощо, які викликають зміни метаболізму і призводять до прогресування ЦД2 [6, 7, 19, 103, 104, 118], до вивчення молекулярних механізмів біохімічного впливу гіперглікемії, окислювального стресу, порушення гомеостазу, зміни транскрипції генів, пов'язаних з окислювальним стресом, прискоренням апоптозу ендотелію, ролі мітохондріальної дисфункції [79, 80]. Але незважаючи на активний пошук і дослідження в цій галузі, молекулярний механізм цього багатofакторного захворювання досі не зрозумілий [79, 80].

Експериментальні та клінічні дослідження довели, що пацієнти з ЦД2 і моделі на експериментальних тваринах мають підвищений рівень гомоцистеїну, як того що циркулює в крові, так і того що накопичується в тканинах [78, 89, 90, 111]. Високі рівні гомоцистеїну є доволі небезпечним фактором і призводить до розвитку ендотеліальної дисфункції, мікросудинних ускладнень, (ретинопатію, нефропатію, кардіоміопатію та нейропатію), оскільки гомоцистеїн викликає порушення структури ендотеліальних клітин,

гематоенцефалічного бар'єру, призводить до ішемії та неоваскуляризації сітківки, підвищення рівня фактора росту ендотелію судин (VEGF), активацію стресу ендоплазматичного ретикулуму та окисного стресу. Сьогодні гомоцистеїн розглядається, як маркер ушкодження сітківки і потенціальна мішень для терапії ДР [128].

Гіпергомоцистеїнемія часто пов'язана з віковими та фізіологічними особливостями, а також індивідуальними генетичними, епігенетичними, харчовими факторами ризику. Однак, провідна причина накопичення гомоцистеїну полягає в недостатній кількості та/або дисфункції ферментів і кофакторів (водорозчинних вітамінів В2, В6, В9 і В12), пов'язаних з метаболізмом гомоцистеїну, особливо у людей похилого віку [78, 111]. Саме тому, активно вивчається асоціація поліморфізмів основних генів, які кодують синтез ферментів фолатного циклу *MTHFR* (англ., functional methylenetetrahydrofolate reductase) C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* (англ., methionine synthase) A2756G, як потенційних тригерних механізмів гіпергомоцистеїнемії. Описані порушення нервової системи, в тому числі стан нейрозапалення мозкової тканини, що призводить розвитку хвороби Альцгеймера, Паркінсона і аутизму у дітей, в основі яких лежить генетично детермінований дефіцит ферментів фолатного циклу, визначений поліморфізмами генів. [91, 92, 93, 106].

Водночас, немає єдиної думки щодо наявності асоціації поліморфізмів вказаних генів із розвитком ДР на тлі ЦД2. Є дані про зв'язок гену поліморфізму гена *MTHFR* (677C/T) і розвитком ДР, але на популяції азіатських пацієнтів [88, 106, 148]. І також є спірним питання чи пов'язані ці поліморфізми із розвитком ЦД2 та його ускладнень [111, 112, 158].

Фолат є водорозчинним вітаміном В, критично важливим для здоров'я, як кофактор у безлічі біохімічних реакцій і головне - необхідним для біосинтезу нуклеотидів та метіоніну [124]. Фолієва кислота має важливу роль донора L-вуглецю для метилювання та синтезу ДНК-РНК, і її дефіцит може впливати на стабільність та цілісність ДНК, а також підсилювати метилювання, що є

ризиком розвитку діабетичної ретинопатії [124].

Дефіцит вітамінів групи В і фолієвої кислоти зазвичай пов'язаний з високим рівнем циркулюючого гомоцистеїну. Фолієва кислота і вітаміни групи В надходять до організму з їжею, особливо з фруктами та овочами. Дослідники вивчають різні напрямки дієти, які б сприяли підвищенню рівню фолатів та вітамінів. Planells E. та співавт (2003), проведена оцінка харчування за вітамінами В6, В12 та фолієвою кислотою серед дорослого населення Середземномор'я, щоб визначити варіанти харчування, групи ризику щодо їх дефіциту та фактори, які можуть впливати на цей ризик [109]. Польські дослідники через епідеміологічне дослідження прийшли висновку, що у населення було звичайним явищем недостатнє споживання фолієвої кислоти (дефіцит відзначений майже у 80-90% населення), і більшість суб'єктів не виконували рекомендації щодо споживання вітамінів В6 та В12 [140].

В попередніх дослідженнях нашої наукової школи ми аналізували за допомогою анкетування харчові звички та раціон харчування у пацієнтів із різною стадією ретинопатії у порівнянні із здоровим населенням [11, 115]. В групах здорових осіб та пацієнтів із ЦД2 була виявлена відмінність звички вживання фруктів в щоденному раціоні. І також була доведена відмінність вживання фруктів в групах пацієнтів із різною стадією ДР. Звичка збагачувати фруктами свій раціон зменшувалася прямо пропорційно від здорових осіб до групи з найтяжкою формою ДР. Отримані дані надали нам підставу сформулювати рекомендацію для пацієнтів з ДР на тлі ЦД2 у вигляді збагачення раціону харчування фруктами та овочами і розглядати цю пораду, як профілактичні засоби розвитку захворювання [11, 115]. Однак, не має достатньо даних про те, що призначення препарату фолієвої кислоти, а також вітамінів цієї групи пацієнтам із ЦД2 ефективно знижує у них рівень гомоцистеїну. Водночас є дані про тісну асоціацію біохімічних порушень у вигляді гіпергомоцистеїнемії, дефіциту вітамінів В12, В6, фолієвої кислоти, вітаміну D3, гіперкреатинінемії, підвищення сироваткової концентрації лактатдегідрогенази та креатинфосфокінази із патогенними поліморфними замінами нуклеотидів в



генах ензимів фолатного циклу [72, 91, 92, 93, 126].

Патофізіологія ДР обумовлена тривалою гіперглікемією, що виникає через недостатній глікемічний контроль. Підвищений рівень глюкози в крові викликає аберантну регуляцію низки біохімічних шляхів, що в кінцевому підсумку призводить до вироблення супероксиду та активації окислювального стресу в тканинах сітківки. Мітохондріальна дисфункція, запалення і секреція судинного ендотеліального фактора росту VEGF призводять до нейронального апоптозу та неоваскуляризації [144]. Сьогодні існує безліч доказів, що саме ендотеліальна дисфункція, яка визначається як дисбаланс ендотеліальних судино звужувальних та судинно розширювальних речовин, відіграє вирішальну роль у патогенезі та прогресуванні перелічених вище судинних ускладнень. Вказані механізми щільно пов'язані з гіперекспресією ендотелінів та їхньою активністю [5, 73, 74, 121, 127].

Також, є доведеним факт про підвищення у пацієнтів з ЦД2 рівню гомоцистеїну, як того що циркулює в крові, так і того що накопичується в тканинах. Високий рівень гомоцистеїну є доволі небезпечним фактором і призводить до розвитку, або посиленню ендотеліальної дисфункції, мікросудинних ускладнень. Гомоцистеїн викликає порушення структури ендотеліальних клітин, гематоенцефалічного бар'єру, призводить до ішемії та неоваскуляризації сітківки, підвищення рівня VEGF, активації стресу ендоплазматичного ретикулуму та окисного стресу [128].

Роль ET-1 в розвитку ендотеліальної дисфункції та ушкодження сітківки сьогодні вже чітко визначена, оскільки доведено, що ET-1 є сильним судинозвужувальним засобом з мітогенними, прооксидантними та прозапальними властивостями, які мають велике значення в регуляції судинної функції, особливо в патофізіології діабетичної васкулопатії [123]. Відомо, що надекспресія ET-1 обґрунтовує посилені ефекти, які визначають основні ушкодження судин при ЦД. Величезна кількість джерел присвячена пошуку асоціацій поліморфізмів генів з розвитком ЦД та ДР [98, 139]. В тому числі доведена роль поліморфізмів генів ендотелінових рецепторів, які мають зв'язок

з розвитком ЦД2: для *rs6842241* гена *EDNRA* підвищення ризику було асоційовано з мінорною алеллю А; для *rs5351* гена *EDNRB* – з мажорним варіантом алеллю С. Наявність цих алелей сприяло достеменно більш високому вмісту у крові ET1 та більшій вираженості ендотеліальної дисфункції [3].

Вивчення генетичних варіантів, що впливають на рівень циркулюючих вітамінів групи В, може бути підґрунтям для розуміння взаємозв'язку дієти, генетики та здоров'я людини. На сьогодні є найбільш вивченим поліморфізм *C677T* гену *rs1801133* (*MTHFR*). Вважають, носії алелю Т мають більш високі концентрації гомоцистеїну і нижчий рівень метилювання геномної ДНК [49]. Однак, дані про генетичні варіації в інших генах, які вивчали у асоціації з концентрацією вітамінів В, фолієвої кислоти, гомоцистеїну є суперечливими [72, 84, 89, 90, 126].

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дисертаційна робота була виконана на кафедрі офтальмології та оптометрії післядипломної освіти Національного медичного університету імені О.О. Богомольця і є фрагментом ініціативно-пошукової НДР «Теоретичні та практичні аспекти удосконалення клінічних та експериментальних методів діагностики, лікування та профілактики захворювань та травм органу зору і їх ускладнень» (номер державної реєстрації 0123U104207, 2023-2026 рр.), в якій дисертант була співвиконавцем.

**Мета дослідження:** вивчити патогенетичну та діагностичну значимість генетичного дефіциту фолатного циклу в розвитку діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет 2 типу.

Відповідно до мети дослідження будуть вирішуватися такі **завдання:**

1. Вивчити асоціацію поліморфних варіантів генів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR* з клінічними стадіями розвитку ДР та рівнем гомоцистеїну у пацієнтів із ЦД2.
2. Проаналізувати вміст аргінази-1 та ендотеліну-1 в сироватці крові у пацієнтів на ДР із різною тривалістю ЦД2 в залежності від поліморфних варіантів генів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR*, як можливого чинника розвитку

ендотеліальної дисфункції.

3. Дослідити патерн біохімічних порушень, зумовлених генетичним дефіцитом фолатного циклу у пацієнтів із різними стадіями ДР на тлі ЦД2

4. Вивчити особливості порушення обміну фолатів та вітамінів групи В, зумовлених генетичним дефіцитом фолатного циклу у пацієнтів із ДР та різною тривалістю ЦД2.

5. Розробити рекомендації щодо прогнозування перебігу ДР та засоби профілактики прогресування ендотеліальної дисфункції з урахуванням поліморфних варіантів генів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR* та особливостей метаболізму хворих на ЦД2.

**Об'єкт дослідження:** діабетична ретинопатія (МКХ-10 Н36.0).

**Предмет дослідження:** фолатний цикл; механізми прогресування діабетичної ретинопатії у хворих на ЦД2 (показники ліпідограми, вміст гомоцистеїну, аргінази-1 в сироватці крові, вітамінів групи В, розподіл частоти алелей і генотипів генів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR* в групах пацієнтів, стать, вік, ІМТ, асоціації поліморфізмів із рівнем метаболітів, що вивчаються).

**Методи дослідження:** загальноклінічні (огляд, збір анамнезу, біоморфометрія), офтальмологічні (візіометрія, периметрія, тонометрія, рефрактометрія, біомікроскопія, гоніоскопія, офтальмоскопія, оптична когерентна томографія з функцією ангиографії, при необхідності – фундускопія з фотографуванням очного дна); біохімічні (спектрометричні для визначення показників ліпідограми; глюкозооксидазний – для глюкози крові, іонно-обмінної температурно незалежної хроматографії-спектрофотометрії для глікозильованого гемоглобіну); ПЛР-аналіз для вивчення SNP-поліморфізму гену; імуноферментний аналіз для вимірювання вмісту метаболітів. Статистичний аналіз даних проводився за допомогою пакету IBM SPSS Statistics 23 та програми MedStat.

**Наукова новизна одержаних результатів**

Доповнено наукові дані щодо розподілу алелей основних генів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR*, що забезпечують фолатний цикл у хворих на ЦД2 та асоціації

поліморфних варіантів вказаних генів із клінічними стадіями розвитку ДР та стажем ЦД2. Досліджено вміст гомоцистеїну у пацієнтів при всіх стадіях ДР, різним стажем ЦД2 та варіантами генотипів генів фолатного циклу, а також аргінази-1, як метаболіту нітрозативного обміну, який впливає на стан ендотелію судин. Був вивчений зв'язок аргінази-1 із стадією ДР при різних варіантах генотипів генів фолатного циклу.

Розширені наукові дані про асоціацію генотипів із вмістом ендотеліну-1, як важливого чинника ендотеліальної дисфункції у пацієнтів з різними стадіями ДР та різним стажем ЦД2.

Вперше у пацієнтів з різною стадією ДР вивчений вміст вітамінів групи В, як субстратної основи фолатного циклу, та визначена роль основних генів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR*, що забезпечують синтез ферментів фолатного обміну.

Вперше проведено дослідження патерну біохімічних показників ліпідного та вуглеводного обміну, зумовлених генетичним дефіцитом фолатного циклу у пацієнтів із різними стадіями ДР на тлі ЦД2.

### **Практичне значення отриманих результатів**

Розроблені та обґрунтовані рекомендації прогнозування перебігу ДР та засоби профілактики прогресування ендотеліальної дисфункції з урахуванням поліморфних варіантів генів та особливостей метаболізму хворих на ЦД2 на основі аналізу внеску кожного фактору фенотипу: розвиток та прогресування стадії ДР, тривалість ЦД2, вміст гомоцистеїну, ET-1, аргінази-1, дефіцит фолатів, дефіцит вітамінів В12 та В6 у носіїв відповідного варіанту генів фолатного циклу *MTHFR C677T (rs1801133)*, *MTR 2756A/G (rs1805087)*, *MTHFR A1298C (rs1801131)*.

Фахівцям, що лікують ЦД2 та ДР слід враховувати, що найбільш розповсюджений поліморфний варіант СТ гену *MTHFR C677T (rs1801133)* не пов'язаний із високим ризиком розвитку ДР на тлі ЦД2. У носіїв дикого варіанту СС цього гену є тенденція до підвищення виникнення ДР на тлі ЦД2, проте фактором ризику є не тривалість діабету, а механізми оксидативно-нітрозативного стресу, які викликають накопичення ET-1 і призводять до

ендотеліальної дисфункції. У носіїв мінорного варіанту ТТ гену *MTHFR C677T* найменший ризик розвитку ДР на тлі ЦД2, і механізми виникнення ушкодження ґрунтуються на дефіциті вітамінів групи В.

У пацієнтів з ЦД2, які є носіями мажорного генотипу АА та поліморфізму АG гену *MTR 2756A/G (rs1805087)* ризик розвитку ДР є невисоким. Єдиним фактором ризику можна вважати дефіцит вітамінів групи В. Певну загрозу розвитку ДР мають пацієнти з ЦД2 які є носіями мінорного генотипу GG гену *MTR 2756A/G (rs1805087)*. У них виникнення мікросудинного ускладнення буде базуватися на багатьох механізмах, зокрема підвищення гомоцистеїну, ET-1, аргінази-1, та дефіциту фолатів. Єдиним компенсаторним механізмом на тлі генетичного дефіциту ферменту MTR для них буде відсутність дефіциту вітамінів В6 та В12.

Для носіїв поліморфізму АС гену *MTHFR A1298C (rs1801131)*, яких є більшість серед населення, рекомендації мають полягати у тому, що на тлі ЦД2 ДР може виникнути через підвищення ET-1 та індукцію оксидативно-нітрозативного стресу. У носіїв дикого генотипу АА ризики виникнення ДР на тлі ЦД є не високими, але фактором ризику може бути дефіцит вітамінів групи В. У носіїв мінорного генотипу СС до факторів ризику розвитку ДР можна віднести тривалість ЦД, та накопичення гомоцистеїну через дефіцит фолатів.

Запропонована основа для клінічних рекомендацій персоніфікованого ведення пацієнтів та спрямованої таргетної терапії на конкретні патогенетичні ланки ДР на підставі встановлених нами даних зв'язку генетичних особливостей у вигляді дефіциту ферментів фолатного циклу та ознак фенотипу, що суттєво підвищить ефективність лікування хворих.

### **Впровадження**

Наукові положення дисертації були впроваджені в навчальний процес на кафедрах: офтальмології і офтальмології та оптометрії післядипломної освіти Інституту післядипломної освіти Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України, офтальмології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця МОЗ України, офтальмології

ФПДО Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького МОЗ України, офтальмології Дніпровського державного національного медичного університету, оториноларингології та офтальмології Полтавського державного медичного університету, дитячої хірургії, оториноларингології та офтальмології Буковинського державного медичного університету.

Впровадження в практичну діяльність отриманих результатів здійснювалося в ТОВ «Медичний центр «Очі клінік» (м. Київ), медичному центрі «ЛАЗЕР Плюс» (ПП «Львів Сапфір», м. Львів), Медичному центрі ТОВ ОКТАР «Центр медичної реабілітації ОКТАР» (м. Полтава), Національній дитячій спеціалізованій лікарні МОЗ України «ОХМАТДИТ» (м. Київ) та медичному центрі ПП «Світ Здоров'я» (м. Мукачево).

### **Особовий внесок здобувача**

Напрямок дослідження і основна ідея роботи була визначена науковим керівником членом-кореспондентом НАМН України, доктором медичних наук, професором Риковим Сергієм Олександровичем сумісно із здобувачем.

Клінічну частину ведення пацієнтів, їх відбір до групи дослідження, опис клінічної картини, визначення критеріїв включення та виключення було зроблено власно здобувачем.

Також здобувач самостійно проводила збір біологічного матеріалу для дослідження в лабораторіях.

Усі консультації щодо особливостей переданалітичного етапу, відбору плазми та матеріалу для ДНК досліджень, та методичних особливостей лабораторної частини, здобувач отримала у Науково-дослідному інституті експериментальної та клінічної медицини (науковий консультант проф. Л.В. Натрус). Співробітники НДІ ЕКМ надавали всебічну допомогу при виконанні роботи. Співпраця відбувалася на основі договору та за умов

співавторства. Усі витрати на придбання реактивів були організовані за рахунок дослідника.

Опис отриманих результатів дослідник робила самостійно. Також, власноруч виконувала статистичну обробку даних.

Дослідником самостійно написані усі розділи роботи, зроблений огляд літератури. Обговорення результатів, висновки та рекомендації дослідник робила із допомогою наукового керівника.

У наукових працях, опублікованих за матеріалами дисертації, здобувачу належала провідна роль у формулюванні мети, завдань, методології дослідження, статистичній обробці та аналізі результатів.

### **Апробація результатів**

Результати були оприлюднені на форумах та у публікаціях з відкритим доступом наступних науково-практичних заходів: науково-практичній конференції дитячих офтальмологів та оптометристів України з міжнародною участю «Своє дитинство треба бачити`22» (2022, Київ); III Correspondence International Scientific and Practical Conference «Science of post-industrial society: globalization and transformation processes», international scientific journal «Grail of Science» (2022, Vinnytsia (Ukraine) – Vienna (Austria)); XXV International Scientific and Practical Conference (2023, Warsaw, Poland).

### **Публікації**

Основні результати дисертації опубліковані у 6 наукових працях, які відповідають вимогам Постанови Кабінету міністрів України № 44 від 12.01.2022 р. «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», зокрема 3 статті в журналах з «Переліку наукових фахових видань України, дозволених для публікації результатів дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора наук, кандидата наук та ступеня доктора філософії», у тому числі одна, що входить до наукометричної бази

SCOPUS; 3 роботи – тези у матеріалах науково-практичних конференцій, з'їздів, симпозіумів, у тому числі іноземних, де засвідчена апробація матеріалів дисертації.

### **Структура та обсяг дисертації**

Дисертація викладена українською мовою, на 123 сторінках друкарського тексту, складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 3-х розділів власних досліджень, розділу обговорення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій та списку використаних джерел. Робота ілюстрована 5 таблицями і 22 рисунками. Список літератури займає 22 сторінки та включає 161 джерело.



## РОЗДІЛ 1

# ВИВЧЕННЯ СУЧАСНИХ МАРКЕРІВ АСОЦІЙОВАНИХ ІЗ РОЗВИТКОМ ДІАБЕТИЧНОЇ РЕТИНОПАТІЇ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2 ТИПУ ДЛЯ РОЗРОБКИ ЕФЕКТИВНИХ КЛІНІЧНИХ РЕКОМЕНДАЦІЙ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

### 1.1 Актуальність вивчення патогенезу діабетичної ретинопатії

Цукровий діабет 2 типу (ЦД2) – все більш поширене хронічне захворювання, яке характеризується інсулінорезистентністю, гіперглікемією, дисліпідемією та нейросудинними ушкодженнями. Його ускладнення можуть торкнутися кожної системи організму пацієнтів, погіршити якість їхнього життя та стати тягарем для населення та економіки. Діабетична ретинопатія (ДР) є частим ускладненням при діабеті 1 та 2 типу і є найбільш поширеною причиною сліпоти у дорослих працездатного віку. За оцінками, нинішня глобальна поширеність діабетичної ретинопатії становить 126 мільйонів із 382 мільйонів людей із діабетом. Тридцять сім мільйонів людей у всьому світі мають діабетичну ретинопатію, яка загрожує зору [1, 2, 69, 70, 156, 157]. Ризик втрати зору у людини з діабетом у 25 разів вищий, ніж у людей без діабету.

У людей з ЦД2 ДР може виявлятися безпосередньо під час встановлення діагнозу діабету; але також це може бути наслідком не діагностованого діабету тривалі роки. У 60% пацієнтів із тривалістю ЦД2 понад 20 років завжди є певний рівень ДР [58].

Протікання ЦД2 патогенетично пов'язано з метаболічними ускладненнями, зокрема гіперглікемією, гіпоглікемією, порушення водно-електролітного обміну. Нерідко виникає уповільнене загоєння ран і підвищений ризик сепсису. Хронічні ускладнення ЦД2 переважно пов'язані з судинним пошкодженням мікроциркуляторного русла в сітківці та нирках, серцево-судинним захворюванням та пошкодженням нервової системи, включаючи периферичну та вегетативну нейропатію. ДР має як судинний, так і нервовий

компоненти; отже, біомаркери, що стосуються як судинної, так і нервової тканин сітківки, потенційно важливі [56, 122].

Згідно даним Guidelines for Diabetic Retinopathy Management (2008) існують різні стадії ДР. Визначення відповідної стадії залежить від відсутності або наявності клінічних біомаркерів судинних уражень сітківки, таких як мікроаневризми, крововиливи, м'які та тверді ексудати, набряк і неоваскуляризація. Стадії ДР визначають як легку, помірну або важку непроліферативну ДР, далі проліферативну ДР (ПДР), яка включає підкласи, такі як ретинопатія, що загрожує зору (високого ризику), та розвинута ретинопатія, наприклад відшарування сітківки. Діабетичний макулярний набряк ДР може виникнути на будь-якій стадії непроліферативної або проліферативної ДР та може бути підрозділений на вогнищеву/центральною, дифузну/нецентральною, ішемічну та клінічно значущу його форму [58].

За даними потужного мета-аналізу (проведеного у 2012 році за даними 35 країн світу) виявили майже 23 000 людей з діабетом. У них поширеність будь якої стадії ДР становила 35%. Поширеність ПДР була 7%, діабетичного макулярного набряку – 7%, а діабетичної ретинопатії, що загрожує зору, – 10%. Основними факторами діабетичної ретинопатії в цьому дослідженні були тривалість діабету, тип діабету (тип 1 більше, ніж діабет 2 типу), рівень глікемічного контролю та артеріальний тиск [149].

Скринінг на ДР рекомендується для полегшення раннього виявлення та лікування. Сьогодні в клінічній практиці біомаркери ДР та її ризику пов'язані з вивченням стану судинної стінки сітківки, показниками глікемії, ліпідів, артеріального тиску, маси тіла, куріння та стану вагітності. Дослідження нових біомаркерів та медіаторів ДР, які асоційовані із запаленням та ангіогенезом, продовжує залишатися актуальним, як шлях розробки додаткових терапевтичних засобів. Існує низка методів лікування ДР (включаючи лазерну фотокоагуляцію, внутрішньоочні стероїди та препарати анти-VEGF, пероральний фенофібрат, гіполіпідемічний агоніст PPAR-альфа тощо). Зокрема для пізніх стадіях ретинопатії розглядаються внутрішньоочні кортикостероїди

та інгібітори інтравітреального фактора росту ендотелію судин («анти-VEGFs») [70]. Це дуже перспективні напрямки і багато пацієнтів з ДР успішно корегують свій стан. Проте є значна когорта хворих, які погано реагують на поточні терапевтичні засоби. Тому пошук нових маркерів продовжується оскільки необхідні більш ефективні методи лікування діабетичної ретинопатії.

## **1.2 Гомоцистеїн, як потенційний біомаркер і терапевтична мішень для діабетичної ретинопатії**

Експериментальні та клінічні дослідження продемонстрували, що пацієнти з ЦД2 та тваринні моделі мають підвищений циркулюючий рівень гомоцистеїну, сірковмісних амінокислот [89, 90]. Дослідження з використанням генетично модифікованих мишей, які накопичували гомоцистеїн, продемонстрували його роль в розвитку ДР через те що у тварин була порушена зорова функція та пошкоджений гематогенний бар'єр сітківки [40, 41, 100]. Також були отримані докази того, що високий рівень гомоцистеїну в плазмі у хворих на ЦД2 сприяє розвитку ускладнень зокрема нефропатію, кардіоміопатію та нейропатію, патогенез яких ґрунтується на ендотеліальній дисфункції [81, 94, 135]. Було показано, що гомоцистеїн викликає мітохондріальну дисфункцію, а в гангліозних клітинах сітківки він бере участь у дисрегуляції мітохондріального дихання [53].

Гомоцистеїн – це небілкова амінокислота, яка біосинтезується з метіоніну S-аденозил-метіонінсинтетазою, утворюючи S-аденозилметіонін. Утворений гомоцистеїн може бути реметильований назад до L-метіоніну або до L-цистеїну, а цистеїн є важливою амінокислотою для біосинтезу глутатіону (GSH). Ферментативно метилентетрагідрофолатредуктаза (MTHFR) перетворює гомоцистеїн на метіонін, а цистатіонін-β-синтаза (CBS) каталізує конденсацію гомоцистеїну з серином з утворенням цистатіоніну, який можна далі перетворити на L-цистеїн [128, 141]. Окрім того, що цистеїн є субстратом для біосинтезу глутатіону, він також служить субстратом для CBS і цистатіонін-

$\gamma$ -ліази (CSE) для отримання сірководню ( $H_2S$ ) через реакцію десульфурації[141].  $H_2S$  зараз вважається третім газотрансмітером, який відіграє важливу роль у зниженні окислювального стресу та запалення, а також регулює апоптоз [38]. У патогенезі ДР підвищується окислювальний стрес і запалення сітківки, а рівень GSH знижується [79, 80]. Однак, що відбувається з гомоцистеїном і механізмом його метаболізму в сітківці пацієнтів з діабетичною ретинопатією, неясно.

Нещодавно дослідницька група зосередилася на ролі гомоцистеїну в розвитку порушення зору людини, особливо в ДР. Вони виявили, що гіпергомоцистеїнемія сприяє руйнації внутрішнього та зовнішнього гематоенцефалічного бар'єру, індукує ішемію сітківки та неоваскуляризацію, активує окислювальний та ER стреси та індукує епігенетичні модифікації [44]. Автори виявили, що основним механізмом цих патологій, викликаних гіпергомоцистеїнемією, є запалення, яке опосередковується активацією NF- $\kappa$ B і регуляцією пов'язаних із запаленням цитокінів [44]. Таким чином, вони припустили, що гомоцистеїн може бути потенційним біологічним маркером і терапевтичною мішенню для ДР [128, 154, 155].

Дослідження Kowluru RA та співавт. (2020), вивчали рівні гомоцистеїну та  $H_2S$  в сітківці, а також CBS, CSE та MTHFR у мікроциркуляторному руслі сітківки пацієнтів в ЦД2, переконливо доводять, що механізм регуляції рівня гомоцистеїну в сітківці, порушується у пацієнтів з ДР і це призводить до його підвищення [79, 80].

Ферменти, які задіяні у транссульфурації та реметилюванні зменшуються і, через це, перетворення гомоцистеїну як у цистатіонін, так і в метіонін порушується. Це дуже шкідливо для сітківки. Рівні  $H_2S$  і GSH знижуються, і мітохондрії сітківки пошкоджуються. Таким чином, регуляція рівня гомоцистеїну у хворих на ЦД має запобігти збільшенню пошкодження сітківки, і шляхом регулювання статусу метилювання ДНК ферментів, відповідальних за видалення гомоцистеїну, має зменшити подальше накопичення цієї шкідливої сірковмісної небілкової амінокислоти [79, 80].

Механістичне розуміння зниження активності функціонування ферментів обміну гомоцистеїну свідчать про критичну роль будь яких генетичних і епігенетичних зрушень, які призводять до зниження експресії генів ферментів фолатного циклу. Це виводить на арену актуальності вивчення поліморфізмів генів фолатного циклу – як важливого механізму розвитку та прогресування гіпергомоцистеїнемії. Тепер важливим виявляється з'ясування асоціацій поліморфізмів основних генів що забезпечують фолатний цикл із розвитком та прогресуванням ДР. І можлива персоніфікація медичної допомоги пацієнтам із генетично детермінованим дефіцитом ферментів обміну фолатів та гомоцистеїну.

### **1.3 Роль обміну фолатів у патогенезі ретинопатії**

Фолієва кислота і вітамін В12 тісно пов'язані з підтримкою метаболізму гомоцистеїну [52]. Оскільки причиною гіпергомоцистеїнемії вважається порушення метаболізму фолатів виникає доцільність вивчення вмісту фолатів та вітамінів групи В у пацієнтів із ДР. Це відкриває потенційну можливість використання фолієвої кислоти/вітаміну В12 для профілактики/уповільнення розвитку ДР у пацієнтів з ЦД2 і зменшення ризику втрати зору [133].

Фолієва кислота, загальний термін для сімейства водорозчинних вітамінів (вітамін В9), відіграє важливу роль у одновуглецевому метаболізмі, який головним чином включає метаболізм ключових амінокислот і нуклеїнових кислот. Фолієву кислоту можна отримати лише з дієтичних джерел і харчових добавок [57]. Дефіцит фолієвої кислоти часто спричинений неадекватним дієтичним споживанням, що може призвести до ряду серйозних розладів, таких як мегалобластна анемія, дефекти нервової трубки у ембріонів, а також серцево-судинних захворювань, деяких типів раку та когнітивних захворювань [108]. Фолієва кислота, як кофактор, відіграє важливу роль у метаболізмі одного вуглецю, який необхідний у багатьох біологічних процесах, включаючи синтез ДНК, репарацію ДНК та виробництво метіоніну шляхом метилювання

гомоцистеїну [57, 147].

Концентрація гомоцистеїну в плазмі завжди пов'язана зі статусом вітамінів групи В. Автори дослідження проаналізували дані пацієнтів з діабетом з Національного дослідження здоров'я та харчування США з 2003 по 2018 рік і виявило, що споживання фолієвої кислоти з їжею може знизити ризик ДР [154]. Проте, тривале споживання добавок фолієвої кислоти є суперечливим [57].

У систематичному огляді повідомляється, що додавання фолієвої кислоти може покращити функцію ендотелію шляхом збільшення дилатації, і збільшення рівня кровотоку. Внутрішній механізм впливу фолієвої кислоти пов'язують із покращенням біодоступності оксиду азоту та її дії як прямий поглинач активних форм кисню. Обидва механізми опосередковуються незалежно від його ефекту зниження гомоцистеїну [153].

Багато досліджень виявили, що низькі рівні фолієвої кислоти в плазмі крові та підвищені рівні гомоцистеїну є незалежними факторами ризику деяких судинних захворювань сітківки, включаючи оклюзію центральної вени сітківки (CRVO) і діабетичну ретинопатію (DR) [46, 57, 147].

Фотіу Р. та ін. (2014) виявили, що пацієнти з ДР мали значно нижчий рівень фолієвої кислоти в сироватці крові ( $P < 0,001$ ), ніж у пацієнтів без ДР на тлі ЦД2, а рівні фолату та вітаміну В12 у плазмі крові, як детермінанти концентрації гомоцистеїну в сироватці крові, також можуть впливати на ризик ДР [46]. Крім того, вони припустили, що моніторинг рівня фолієвої кислоти в плазмі може бути використаний як індикатор для оцінки ризику ДР. Дослідження показало, що пацієнти з ЦД2 з проліферативною та непроліферативною ДР мали значно низький рівень фолієвої кислоти [89, 90]. Фолієва кислота може відігравати певну роль у розвитку та прогресуванні ДР. Було виявлено, що фолієва кислота захищає ендотеліальні клітини судин сітківки від ушкодження, спричиненого високим вмістом глюкози. Є докази того, що фолієва кислота може регулювати метаболізм метилювання ДНК, свого роду епігенетичні зміни, в клітинах мікросудин сітківки проти високого рівня глюкози [85]. Ці експериментальні дані ілюструють можливий механізм захисного ефекту фолієвої кислоти при

ДР.

Результати Mottaghi T. та співавт. (2019), показали, що прийом 1 мг фолієвої кислоти на день протягом 16 тижнів у пацієнтів з діабетичною периферичною нейропатією (ДПН) значно підвищив рівень фолієвої кислоти в сироватці крові та знизив гомоцистеїн у пацієнтів з поліморфізмом *MTHFR C677T*. Крім того, 16-тижневє втручання з додаванням фолієвої кислоти збільшило розвиток ускладнення серед пацієнтів з генотипом *CC*, але не генотипом *CT+TT*. Пікова латентність, амплітуда сенсорного литкового нерва, амплітуда моторного малогомілкового нерва та змінні моторного великогомілкового нерва значно змінювалися у пацієнтів із генотипами *MTHFR C677T* [102].

Дефіцит фолієвої кислоти пов'язаний із збільшенням судин головного мозку та нейродегенеративними захворюваннями, а додавання фолієвої кислоти пов'язане з прискореним розвитком нервової системи та покращує неврологічні захворювання, включаючи інсульт, хворобу Паркінсона, Альцгеймера, депресію, психоз та спинний мозок [97]. Серед вітамінів фолієва кислота може зменшити запалення, окисне пошкодження та резистентність до інсуліну у пацієнтів з діабетом. Пов'язаним механізмом є покращення експресії фактора росту нервів (фактор росту нервів є надзвичайно важливим для виживання та диференціації нейронів у центральній нервовій системі), зниження рівня малонового діальдегіду та вільних радикалів. Додавання фолієвої кислоти, як важливого антиоксиданту призводить до зниження вільних радикалів і перекисного окислення ліпідів. Однак механізм патофізіологічної участі в ДПН невідомий. Ймовірним механізмом є підвищення рівня гомоцистеїну або окисного стресу для розвитку ДПН [151].

Також, ще потрібно провести додаткові дослідження, щоб підтвердити зв'язок між фолієвою кислотою та ДР та ефектом прийому добавок фолієвої кислоти.

#### 1.4 Вплив генетично детермінованого дефіциту ферментів фолатного циклу на розвиток судинних ускладнень ЦД2

У деяких випадках оклюзійне захворювання судин (ОЗС) сітківки виникає у молодих дорослих без інших системних захворювань або супутніх захворювань, але з високим статусом гомоцистеїну [86, 87, 152]. Повідомляється про випадки ОЗС що виникали у молодих пацієнтів з гомозиготним генетичним генотипом *MTHFR* [119]. В іншій роботі описаний випадок про 12-річну дівчинку з ОЗС, і наявність гомозиготного поліморфізму *C677T MTHFR* виявилася в неоваскуляризації сітківки через дванадцять років після першого лікування. Дефіцит фолієвої кислоти з наявністю генетичного дефекту *MTHFR* може спричинити гіпергомоцистеїнемію, а потім прискорити атеросклероз або тромбоз і навіть неоваскуляризацію [68]. Вважають, що для пацієнтів із генетичними дефектами *MTHFR*, які супроводжуються дефіцитом фолієвої кислоти, слід розглянути доцільність прийому фолатів. Оскільки фолієва кислота необхідна для виживання та росту клітин і має кілька сприятливих ефектів на судинні ендотеліальні клітини. А також впливає на зменшення індукованих гомоцистеїном токсичних ефектів шляхом зниження рівня гомоцистеїну в плазмі [27, 30, 96, 134].

Фермент метилентетрагідрофолатредуктаза (*MTHFR*) метилує гомоцистеїн з утворенням метіоніну [142, 143, 158], і його дисфункція може призвести до гіпергомоцистеїнемії. Численні дослідження показували, чи є знижена активність *MTHFR* фактором ризику ЦД2. Однонуклеотидний поліморфізм (SNP) *rs1801133 (677C→T)* призводить до заміни Ala222Val в N-кінцевому каталітичному домені ферменту. Ця мутація знижує активність ферменту, так що активність в осіб з генотипами СТ і ТТ становить приблизно 65% і 35% відповідно в порівнянні з особами з генотипом СС дикого типу [102, 158]. Як наслідок, особи з генотипом ТТ мають значно вищі рівні гомоцистеїну, ніж особи з генотипами СТ та СС (Brattstrom). Більш пізні дослідження загальногеномних асоціацій (GWAS) підтвердили зв'язок між генотипом



*rs1801133* і рівнями гомоцистеїну в здорових популяціях [82].

Численні дослідження в усьому світі перевіряли, чи існує зв'язок між SNP *677C→T* і ризиком ЦД2. Ці дослідження прийшли до різних висновків, причому одні припускають значний зв'язок, а інші – ні. Ця розбіжність, безсумнівно, частково пов'язана з широкою варіацією частот генотипу в локусі *rs1801133*. Генотип ТТ, наприклад, присутній у 9-13% бразильців, 15-17% північних індійців, 18-20% китайців і 20-30% турків [112, 158]. Це робить особливо важливим систематичне оцінювання зв'язку між цим поліморфізмом і ризиком ЦД2 в різних етнічних групах [35, 96, 134].

Систематичний огляд Zhong JH зі співавт. (2013) мав на меті оцінити докази зв'язку між поліморфізмом *rs1801133* у гені *MTHFR* та ризиком ЦД2 [158]. Авторам не вдалося знайти чітких, послідовних доказів такого зв'язку в усіх 39 дослідженнях, проведених у 15 країнах. Крім того, не було знайдено переконливих доказів зв'язку конкретно для африканського, азіатського чи кавказького населення, або конкретно для населення з ЦД 2 типу за наявності або відсутності серйозних ускладнень, пов'язаних із ЦД.

Проте ці дані суперечать дослідженням, які припускають, що цей поліморфізм пов'язаний з певними серйозними ускладненнями ЦД2. Мета-аналіз 29 досліджень виявив, що генотип ТТ асоціюється з помірно підвищеним ризиком розвитку діабетичної ретинопатії [106].

Окремі дослідження показали, що алель Т асоціюється з діабетичною нефропатією [33, 35, 134] і діабетичною макроангіопатією, але не з цукровим діабетом 2 типу. Ці висновки підкреслюють необхідність проведення ретельних, широкомасштабних проспективних досліджень, які відокремлюють генетичний ризик виникнення захворювання від генетичного ризику ускладнень.

Повідомлялося, що інший SNP у гені *MTHFR*, *1298A→C* (Glu429Ala), знижує активність ферменту на основі досліджень ендогенного ферменту в екстрактах лімфоцитів [35, 102, 142, 143, 158], що підвищує ймовірність того, що це може бути фактором ризику для гіпергомоцистеїнемії просто як *677C→T*

SNP. Проте  $1298A \rightarrow C$  SNP знижує активність MTHFR значно менше, ніж  $677C \rightarrow T$ . Крім того, відсутні переконливі докази того, що SNP  $1298A \rightarrow C$  асоціюється з гіпергомоцистеїнемією [102]. Отже, немає переконливих доказів зв'язку між поліморфізмом *MTHFR rs1801133* і ризиком ЦД 2 типу, незалежно від етнічної приналежності пацієнта чи наявності серйозних ускладнень, пов'язаних із ЦД і це залишається предметом обговорення.

### 1.5 Пошуки ефективних біомаркерів діагностики ускладнень діабету

Глікозильований гемоглобін A1c (HbA1c) є основним фактором для кількісної оцінки ризику ускладнень у пацієнтів з діабетом і для моніторингу глікемії. Вимірювання HbA1c залишається золотим стандартом для оцінки глікемічного контролю у пацієнтів із ЦД 2 типу

Дисліпідемія характеризується підвищенням концентрації тригліцеридів, підвищенням концентрації холестерину ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ) у крові та зниженням концентрації холестерину ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) у пацієнтів із ЦД [19, 20, 22]. Ліпаза – це фермент, що виділяється підшлунковою залозою і каталізує розщеплення тригліцеридів (ТГ) на вільні жирні кислоти (ЖК) і гліцерин. Профілі ліпідів тісно пов'язані з серцево-судинними ризиками. Однак незрозуміло, чи пов'язані вільні жирні кислоти та ліпаза з різною тривалістю діабету або діабетичною ретинопатією. У дослідженні Huang EJ зі співавт. (2006) у 204 здорових суб'єктів і 257 пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу, останні з яких були додатково класифіковані за різною тривалістю діабету з або без ретинопатії вивчали концентрації HbA1c, ліпідного профілю (холестерину, тригліцеридів, холестерину ЛПВЩ, ХС ЛПНЩ, ХС/ХС ЛПВЩ, ліпази та ЖК), білірубину, сечової кислоти, ЛДГ, КК, СРБ і гомоцистеїну у пацієнтів з ЦД2 і для з'ясування пов'язаних ролей у хворих на цукровий діабет з різною тривалістю діабету або діабетичною ретинопатією [67]. У результаті автори прийшли висновку, що підвищення рівня тригліцеридів, ліпази, вільних жирних кислот,

співвідношення креатиніну альбуміну, лактатдегідрогенази та гомоцистеїну, а також зниження рівня холестерину ліпопротеїнів високої щільності та антиоксидантного білірубину у пацієнтів із ЦД слід розглядати їх як ризик посилення ускладнень ЦД. Гомоцистеїн може бути пов'язаний із більшою тривалістю діабету та мікросудинним ускладненням ретинопатії при діабеті[67].

У роботі Vykhovets M. (2019) показано, що у пацієнтів із ЦД2, ускладненим ДР показники загального холестерину та ЛПНЩ, ЛПВЩ та тригліцеридів не мали достовірної різниці у порівнянні із здоровими особами. Основною відмінністю ліпідного обміну пацієнтів з ускладненим тривалим ЦД2 та здорових осіб була суттєва різниця перерозподілу вмісту ЖК в мембранах еритроцитів у вигляді підвищення «насиченості». Вміст насичених ЖК (НЖК) у пацієнтів з ДР був вище ніж в КГ: пальмітинової (С:16) в 1,5 рази, мірістинової (С:14), пентадеканової (С:15) та маргаринової (С:17) в 2 рази ( $P < 0,05$ ). Вміст насиченої стеаринової (С:18) ЖК достовірно не змінювався. Вміст ненасичених ЖК (ННЖК) змінювався різнонаправлено: зменшувався вміст лінолевої (С18:2) та арахідонової (С20:4) відповідно в 1,5-1,7 разів. Вміст ліноленової (С18:3) підвищувався в 2 рази, а ЖК, вміст олеїнової (С18:1) достовірно не змінювався.

Також, дослідження ендогенних та екзогенних факторів регуляторного впливу на стан ліпідного метаболізму у пацієнтів без діабету та з ускладненим ЦД2 показали, що основною відмінністю стану ліпідного обміну пацієнтів з ускладненим тривалим ЦД2 та осіб без діабету виявлена суттєва різниця перерозподілу вмісту ЖК у мембранах еритроцитів у вигляді достовірного підвищення в 1,5 рази вмісту НЖК і відповідне зниження ННЖК за рахунок ПНЖК [6]. Вживання в їжу продуктів-джерел вказаних типів ЖК за розрахованим показником «раціональності споживання продуктів», отриманим на основі аналізу анкет харчування, не відрізнялося в групах осіб без діабету та з ЦД2 [6]. У пацієнтів з ЦД2 виявили підвищення вмісту сироваткового протеїну L-FABP (білка, що зв'язує ЖК – (FABP, англ., fatty acid binding protein), в 1,5 рази відносно значень здорових осіб, що може бути маркером порушень

ендогенного регуляторного механізму ліпідного обміну.

У осіб без діабету, але з підвищеним вмістом глюкози крові та/або холестерину, виявили зменшене значення ІМТ, незначне підвищення вмісту ПНЖК у мембранах еритроцитів та сироваткового L-FABP в 1,2 рази менше ніж у здорових осіб і в 2 рази ніж у пацієнтів з ЦД2. Можна припустити, при наявності метаболічних зсувів, саме зменшення експресії L-FABP на тлі підвищення вмісту ПНЖК в клітинах запобігає розвитку ожиріння і діабету.

Автори припустили протекторну роль протеїну L-FABP, який регулює обмін ЖК у клітинах, забезпечує зв'язок ендогенної регуляції та екзогенних впливів, як важливих факторів, що впливають на метаболізм ліпідів організму.

Отже, пошуки дієвих біохімічних/метаболічних маркерів розвитку ускладнення ЦД2 продовжуються.

Генетичний дефіцит фолатного циклу (ГДФЦ), як вважають, призводить до розвитку мікроциркуляторних ушкоджень принаймні трьома шляхами – біохімічним за рахунок індукції гіпергомоцистеїнемії та інших пов'язаних проявів оксидативного стресу, генорегуляторним. Цей вплив на експресію багатьох патогенних і нормальних генів призводить до порушення універсального механізму генного контролю виникнення мутацій. В основному для цього використовується шлях метилювання ДНК. Завдяки цьому механізму метилювання білків та ліпідів, відбувається впливає на функціональну активність певних ділянок генів. Встановлено, що приєднання метильних груп до патологічного гену зменшує його експресію, і навпаки, деметилювання здорових генів сприяє ефективній реалізації нормальних метаболічних процесів в організмі людини [137]. Розрізняють випадки функціональних станів гіпометилювання при переважному ураженні MTHFR, коли відзначається множинна активація експресії небажаних генів, які мають бути в нормі репресовані, та гіперметилювання при переважному ураженні MTRR та MTR, коли виявляються помилково вимкненими ряд нормальних функціонально важливих генів, без участі яких неможлива належна реалізація ключових біохімічних процесів в організмі людини [137].

Висловлена фолат-центрична концепція виникнення порушень на тлі ГДФЦ який є структурною основою виникнення біохімічних розладів, що призводять до гіпергомоцистеїнемії, і додатково погіршує стан метаболізму [93].

ГДФЦ-індуковані біохімічні порушення, ймовірно, створюють ініціальний патологічний стимул, який в подальшому багато разів трансформується під впливом інших генів, експресія яких виявляється патологічно зміненою через порушення їх метилювання, а також – внаслідок множинних епігенетичних розладів. Ці моделюючі впливи з боку інших генів можна поділити за локалізацією сигналу від гену в ймовірному ланцюгу патологічних подій при розвитку хвороби на проксимальні, медіальні та дистальні. Додаткові мутації у суміжних до фолатного циклу біохімічних шляхах (цикл метіоніну, шлях тіолової транссульфурації, пуриновий обмін, біоптерин-неоптериновий шлях, мітохондріальна дисфункція та ін.) [20, 22], створюють проксимальні, або біохімічні моделюючі впливи, послаблюючи чи посилюючи ініціальні ГДФЦ-індуковані метаболічні порушення одразу ж після їх зародження. Комплекс біохімічних розладів, сформованих на даному етапі патогенезу, формує так званий біохімічний шлях ураження ЦНС [93].

Функціонування патологічної системи генів призводить до формування множинних метаболічних аномалій, які стосуються зокрема ЦНС. Загалом різнопланові біохімічні порушення в циклі фолієвої кислоти і функціонально пов'язаних метаболічних шляхах (цикл метіоніну, шлях тіолової транссульфурації, пуриновий обмін, біоптерин-неоптериновий шлях, мітохондріальна дисфункція та ін.) [20, 22] в контексті фолат-центричної концепції патогенезу хвороби можна охарактеризувати як стан персистуючого оксидативного стресу [93] Дані мета-аналізів [27, 50] надають клінічній практиці низку інформативних лабораторних біомаркерів для оцінки індивідуального патерну біохімічних порушень і пов'язаного з цим оксидативного стресу.

## **1.6 Метаболоміка як сучасний підхід до дослідження діагностичних біомаркерів (аргіназа-1)**

З удосконаленням аналітичних методів метаболоміки може одночасно високопродуктивно ідентифікувати та кількісно оцінювати кілька біомаркерів, а ефективні біомаркери можуть значно підвищити ефективність діабету та його ускладнень [25]. Надаючи інформацію про потенційні метаболічні шляхи, метаболоміка може далі визначити механізми, що лежать в основі прогресування діабету та його ускладнень, допомогти визначити потенційні терапевтичні цілі та покращити профілактику та лікування СД2 та його ускладнень. Застосування метаболоміки амінокислот в епідеміологічних дослідженнях виявило нові біомаркери цукрового діабету (ЦД) та його ускладнень, такі як амінокислоти з розгалуженим ланцюгом, метаболіти фенілаланіну та аргініну [25].

Надмірна активність ферменту аргінази циклу сечовини нещодавно виявилася критичним гравцем у розвитку численних захворювань судин, пов'язаних зі зниженою біодоступністю NO та ендотеліальною дисфункцією, включаючи діабет, старіння, ішемію/реперфузійне пошкодження та гіпертензію [107]. Діабет викликає підвищення активності аргінази сітківки, яке пов'язане з порушенням залежної від ендотеліальних клітин (ЕС) вазодилатації та збільшенням утворення біомаркеру пероксинітриту нітротирозину. Блокада аргінази нормалізує реакцію вазодилатації та зменшує утворення нітротирозину, що свідчить про те, що гіперактивна аргіназа сприяє розвитку діабетичної ретинопатії шляхом зниження NO та збільшення окисного стресу [107].

Накопичуються докази того, що спричинена діабетом судинна дисфункція сітківки пов'язана з індукованим гіперглікемією збільшенням утворення супероксиду та пероксинітриту [131]. Дослідження показали, що підвищення окисного та нітрозативного стресу, спричинене діабетом та гіперглікемією, супроводжується підвищенням експресії та активності як ендотеліальної

синтази оксиду азоту (eNOS), так і індуцибельної синтази оксиду азоту (iNOS), і що інгібування активності NOS знижує окислювальний і нітрозативний стрес і запобігає раннім ознакам діабетичної ретинопатії [156, 157].

NO відіграє вирішальну роль у підтримці належного кровотоку та перфузії тканин, блокуючи активацію тромбоцитів і адгезію лейкоцитів, запобігаючи проліферації гладком'язових клітин і збільшуючи виживання ендотеліальних клітин. NO утворюється NO-синтазою (NOS) із свого субстрату l-аргініну. Було показано, що гостре введення l-аргініну збільшує синтез NO та відновлює залежну від ендотелію вазодилатацію при кількох захворюваннях, що характеризуються судинною дисфункцією, включаючи діабет, гіпертензію та серцеву недостатність [17], що свідчить про те, що зниження доступності l-аргініну має ключове значення до їх патогенезу [42].

Дослідження на тваринних моделях зниження утворення NO у діабетичних сітківках. Зниження NO супроводжується підвищенням O<sub>2</sub> та посилення адгезії лейкоцитів на стінках судин сітківки. Видалення гена аргінази (в експерименті на нокаутних мишах) посилює утворення NO, зменшує O<sub>2</sub> і запобігає лейкостазу в діабетичній сітківці. Лікування інгібіторами аргінази усуває ефекти окислювальний стрес. Отже, блокада аргіназного шляху запобігає цим змінам, що свідчить про основну роль аргінази в патофізіологічному процесі [107].

Аргіназа, фермент циклу сечовини, використовує l-аргінін як субстрат для виробництва сечовини та орнітину. Дослідження показали, що надмірна активність аргінази обмежує надходження l-аргініну, необхідного для належної функції NOS, що призведе до роз'єднання димеру NOS. Незв'язаний NOS використовуватиме більше молекулярного кисню для виробництва супероксиду замість NO. Супероксид швидко реагує з будь-яким доступним NO, утворюючи високотоксичний і прозапальний окисник пероксинітрит. Цей механізм був пов'язаний із судинною дисфункцією при багатьох захворюваннях, включаючи діабет [48, 114].

Попередньо було показано, що аргіназа-1 відіграє ключову роль у фазі

відновлення загоєння ран, тоді як аргіназа 2 бере участь у хронічних запальних захворюваннях [26]. Проте обидві ізоформи також беруть участь у пошкодженні та відновленні сітківки.

Fouda AY та співавт. (2021, 2022) у чудовій експериментальній роботі охарактеризували специфічні ефекти лікування агріназою-1 патологічної неоваскуляризації сітківки, відновлення судин і функцію нейронів на мишачих моделях киснево-індукованої ретинопатії і дослідили механізми, що лежать в основі успішного лікування. Дослідження показало, що лікування агріназою-1 значно зменшило дефекти судинної звивистості на пізній стадії та покращило гостроту зору у мишей, яких досліджували після досягнення ними дорослого віку. Навпаки, делеція агрінази-1 значно погіршила звивистість судин і посилила витончення сітківки, спричинене киснево-індукованою ретинопатією, що вказує на стійкі шкідливі ефекти гемізіготної делеції гена агрінази-1. Отже використання аргіназа-1 розглядається як безпечний і добре переносимий препарат, що робить цей шлях багатообіцяючою мішенню для різних захворювань [47, 48].

### **1.7 Ендотелін-1, як один із провідних факторів розвитку діабетичної ретинопатії**

Неоваскуляризація сітківки та макулярний набряк, характерні ознаки ДР, пов'язані зі зниженою перфузією сітківки та підвищеною фільтрацією капілярної рідини, спричиненою мікросудинною дисфункцією [146]. Однак точні механізми, пов'язані з дисрегуляцією кровообігу при діабеті, залишаються неясними [18, 130, 146].

Накопичення даних вказує на те, що рівень ендотеліну-1 (ЕТ-1) у склоподібному тілі та плазмі крові підвищується при діабеті, особливо у пацієнтів з діабетичною ретинопатією [28, 29, 113, 116]. Пептид ЕТ-1 є потужним вазоконстриктором, і його надмірне виробництво може сприяти розвитку серцево-судинних розладів, включаючи ремоделювання, запалення



тканин, проліферацію клітин і вазомоторну дисфункцію [28, 29, 64, 66, 116]. Хоча припускають, що підвищені рівні ET-1 впливають на патофізіологію сітківки, клінічний вплив ET-1 на мікросудинну функцію сітківки не повністю зрозумілий [76, 132].

Вважається, що зміни в активності ендотелінової системи лежать в основі розвитку структурних і функціональних уражень, пов'язаних із ЦД2. Рівні ендотелінів у плазмі крові, які виробляються та секретуються переважно епітеліальними клітинами, змінюються протягом ЦД 2 типу. Такі варіації, як правило, пояснюються підвищенням ET-1, який пов'язаний із серйозністю пошкодження ендотеліальних клітин [73, 74, 125].

За нормальних фізіологічних умов ET-1 є вирішальним білком для ненеурональної ауторегуляції кровотоку сітківки. Це не тільки спричиняє звуження та підвищення тонуусу кровоносних судин, але також посилює ендотеліальне вироблення таких вазодилаторів, як оксид азоту та простагліцині. Крім того, ET-1 бере участь у стимуляції проліферації та міграції ендотеліальних клітин і має потенційну мітогенну активність щодо гладком'язових клітин [159].

У мікроциркуляції сітківки артеріоли відіграють важливу роль у регулюванні розподілу кровотоку сітківки та перфузії через зміни їх місцевого вазомоторного тонуусу та загального опору відповідно [76]. На ранній стадії діабету нещодавно було продемонстровано зниження артеріолярної ендотелій-залежної вазодилаторної функції без явних структурних змін сітківки. У сегменті венул сітківки зміни їх опору, тобто діаметра, впливають на гідростатичний тиск і гомеостаз рідини у верхніх капілярах [61, 62, 110]. Звуження венозних судин сітківки призводить до підвищення венозного тиску сітківки, що згодом може зменшити перфузію сітківки та сприяти фільтрації капілярної рідини (тобто набряку), коли компенсаторні або захисні механізми виснажені на ранніх стадіях діабету до розвитку ретинопатії.

Сітківка здатна синтезувати та вивільняти ET-1 за допомогою ферменту, що перетворює ендотелін, який нещодавно виявив функціональну експресію в

мікроциркуляції сітківки. [28, 110]. Розумно припустити, що ET-1 може сприяти ускладненню діабету на сітківці, оскільки багато є клінічних доказів повідомляти про підвищення рівнів ET-1 у плазмі і склоподібному тілі та зниження кровотоку сітківки у пацієнтів з діабетом [113, 116, 117].

Гіперглікемія, як *in vitro*, так і *in vivo*, посилює звуження великих венул сітківки загальними вазоконстрикторами, такими як норадреналін і аналог тромбоксану, з найбільш вираженим впливом на ET-1 [28]. Ймовірно підвищені рівні ET-1 у склоподібному тілі при цукровому діабеті можуть справляти локальний вплив не лише на венули, але також на артеріоли та капіляри, що містять перичити, у мікроциркуляції сітківки [28].

Деякі експериментальні дослідження показали, що інтравітреально або інтракон'юнктивально введений ET-1 може викликати вазоконстрикцію і навіть повну обструкцію судин сітківки

Результати Strzalka-Mrozik В. (2010), свідчать про взаємозв'язок між експресією ET-1 і такими факторами, як тривалість клінічного перебігу захворювання, інсулінотерапія, прийом препаратів сульфонілсечовини або інгібіторів АПФ і рівні креатиніну в сироватці крові. Тривала тривалість СД призводить до підвищення рівня мРНК ET-1 з подальшим збільшенням гіперглікемічних інцидентів, які призводять до підвищення активності протеїну кінази С, продукції нерозчинних полімерів (так званих прогресуючих кінцевих продуктів глікації), а також посилений синтез діацилогліцерину [125]. Усе вище зазначене призводить до посиленого утворення вільних радикалів, які, у свою чергу, активують проліферативні зміни та індукують пов'язане з гіперглікемією пошкодження тканин, кровоносних судин та ендотелію [125].

Таким чином ми навели ряд доказів того, що патогенез ДР на тлі ЦД2 має ряд механізмів. Фактори ризику розвитку ускладнень хронічної гіперглікемії включають в себе багато компонентів і впливів, починаючи із біохімічних коливань через порушення ліпідного та вуглеводного обміну, ряду метаболічних перетворень, зокрема, синтез вазоконстрикторного пептиду ET-1 та аргінази-1, як ферменту нітрозативно-оксидативного стресу.

Проте, ми вважаємо, що фолат-центрична теорія виникнення багатьох біохімічних розладів та накопичення гомоцистеїну має в своїй основі генетичну варіацію (або мутацію) – дефіцит ферментів фолатного циклу. Саме такий фон порушення ферментів ряду біохімічних реакцій, зокрема фолатів та вітамінів групи В і є матрицею для подальшого впливу метаболітів на стан нервової системи, зокрема сітківку. І цей механізм біохімічного ушкодження сітківки і є одним із найважливішим у патогенезі ДР.

Вивчення різноманітних впливів, які розвиваються на основі генетично визначеної мутації мають бути виявлені у пацієнта та стати пацієнт-орієнтованою тактикою лікування. Відсутність такої персоналізації і призводить до низько ефективного лікування ДР на тлі тривалого і тяжкого ЦД2. Тому, метою нашої роботи стало вивчення патогенетичної та діагностичної значимості генетичного дефіциту фолатного циклу в розвитку діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет 2 типу.

Першим кроком дослідження ми провели аналіз асоціацій поліморфних варіантів генів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR* з клінічними стадіями розвитку ДР у пацієнтів із ЦД2. Визначили найбільш розповсюджені генетичні варіанти поліморфізмів із рівнем гомоцистеїну в крові. Проаналізувати вміст аргінази-1 та ендотеліну-1 в сироватці крові у пацієнтів на ДР в залежності від поліморфних варіантів генів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR*, як можливого чинника розвитку нітрозативно оксидативного стресу та ендотеліальної дисфункції. Дослідити патерн біохімічних порушень, та рівень показників фолатного обміну зумовлених генетичним дефіцитом фолатного циклу у пацієнтів із різними стадіями ДР на тлі ЦД2. Отримані дані дали підставу розробити алгоритм прогнозування перебігу ДР та засоби профілактики прогресування ендотеліальної дисфункції з урахуванням поліморфних варіантів генів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR* та особливостей метаболізму хворих на ЦД2.

## Резюме до розділу 1

Отже в результаті проведеного нами аналітичного аналізу сучасної літератури с досліджуваної теми було встановлено, що за даними Міжнародної діабетичної федерації, в даний час на діабет страждають майже 285 мільйонів людей у всьому світі, і очікується, що до 2030 року це число сягне 438 мільйонів. Пацієнти з цукровим діабетом 2 типу зазвичай мають фонову ретинопатію на момент постановки діагнозу діабету, але більш ніж у 60% розвинеться та чи інша форма ретинопатії протягом 20 років. Діабетична ретинопатія залишається основною причиною втрати зору у дорослих працездатного віку і проблема не втрачає актуальності. Отже дослідження нових етіологічних та патогенетичних чинників розвитку ДР на підставі вивчення генетичного дефіциту фолатного циклу є актуальною задачею сучасної офтальмології.

## РОЗДІЛ 2

### ДИЗАЙН ДОСЛІДЖЕННЯ. МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ.

#### **2.1 Загальний дизайн дослідження і опис критеріїв визначення груп, що досліджуються**

Дослідження включало 83 хворого (83 око) із ЦД2, у яких за результатами офтальмологічного обстеження виявлено різні стадії ДР. Усі пацієнти знаходилися на лікуванні та спостереженні в Консультативно-діагностичному центрі Солом'янського району міста Києва. Обстеження пацієнтів проводили спеціалісти різного напрямку, включаючи ендокринологів, офтальмологів, невропатологів тощо.

Якщо у пацієнтів визначалася декомпенсована стадія коморбідної патології, його, як правило, виключали з дослідження.

Отже, критеріями виключення були: ЦД 1 типу, наявність ендокринної патології, в тому числі гіпер-та гіпотиреоїдні стани, спадкові порушення обміну речовин, онкологічні стани, та перенесенні онкозахворювання, інфекційні стани, розлади психіки, та стани, за якими показаний прийом психотропних препаратів, антидепресантів, нейролептиків тощо, препаратів, які можуть вплинути на акомодацию та зниження гостроти зору, а також пацієнтів з глаукомою та очними інфекціями.

Для виявлення вказаних вище станів, дослідником був зібраний ретельний анамнез, усім пацієнтам були виконані дослідження біохімічного спектру, гормони та організовані консультації суміжних спеціалістів.

Для залучення у дослідження ми відбирали пацієнтів, у яких на тлі тривалого перебігу ЦД 2 типу виникла діабетична ретинопатія чи прогресувала до ПДР.

Стадії ДР визначали за шкалою ETDRS (табл. 2.1). Опис етапів та особливостей офтальмологічного дослідження буде наведений нижче. (підрозділ 2.2). Це дало нам змогу визначити дві групи спостереження, які

відрізнялися ступенем ушкодження: НПДР група (43 хворих, 43 ока) до якої включили пацієнтів із початковою, помірною та тяжкою непроліферативною ДР, ПДР група (40 хворих, 40 очей), яку склали пацієнти із - початковою, помірною та тяжкою та прогресуючою проліферативною ДР.

Таблиця 2.1

**Характеристика тяжкості ретинопатій у пацієнтів відповідно до шкали прогресування ДР, визначеними за рівнями ETDRS level**

ETDRS level рівень ретинопатії	Тяжкість ретинопатії	Кількість пацієнтів	Позначення в дослідженні
35	М'яка непроліферативна	12	Pre_NPDR
43	Помірна непроліферативна		
47	Помірно тяжка непроліферативна	21	NPDR
53 a-d	Тяжка непроліферативна		
53-e	Дуже тяжка непроліферативна		
61	М'яка проліферативна	18	PDR
65	Помірна проліферативна		
71-75	Високого ризику проліферативна	12	High_risk_PDR
81,85	Розвинена проліферативна	20	Advans_PDR

Серед пацієнтів було 48 жінок (58%) середній вік (Me [Q1-Q3]) складав 64 (56-68) роки.

Контрольну групу (КГ) 35 осіб без ЦД становили пацієнти, які не мали діагностованих порушень метаболізму і звернулися з метою профілактичного огляду в клініко-діагностичну лабораторію Університетської клініки НМУ імені О.О. Богомольця. Серед них жінок було 20 осіб (57%). Середній вік КГ (Me [Q1-Q3]) складав 62 (55-67) роки. Таким чином при розрахунку

відмінностей обох груп за віком за допомогою критерію Крускала-Уолліса ( $p > 0,05$ ), а також при порівнянні складу груп за віком в таблиці спряженості «к\*т» де використовували критерій  $\chi^2$   $p = 0,35$  достовірної різниці не виявлено. Отже, групи відібрані для аналізу були співставні.

В ході роботи та опису результатів в розділах ми використовували поділення на групи порівняння за наявністю проліферації, і тоді аналізували групи НДР, ПДР. Також по ряду показників ми проводили порівняння в групах із різною стадією ДР. Тоді ми описували групи: Pre\_NPDR+Moderate NPDR, level до 43 (м'яка НПДР) (n=12), NPDR, level до 53 (важка НПДР) (n=21), Moderate PDR, level 61-65, High\_risk\_PDR, level 71-75 (Високого ризику ПДР) (n=20) та Advans\_PDR level 81-85 (Розвинена ПДР) (n=20). (рис. 2.1)

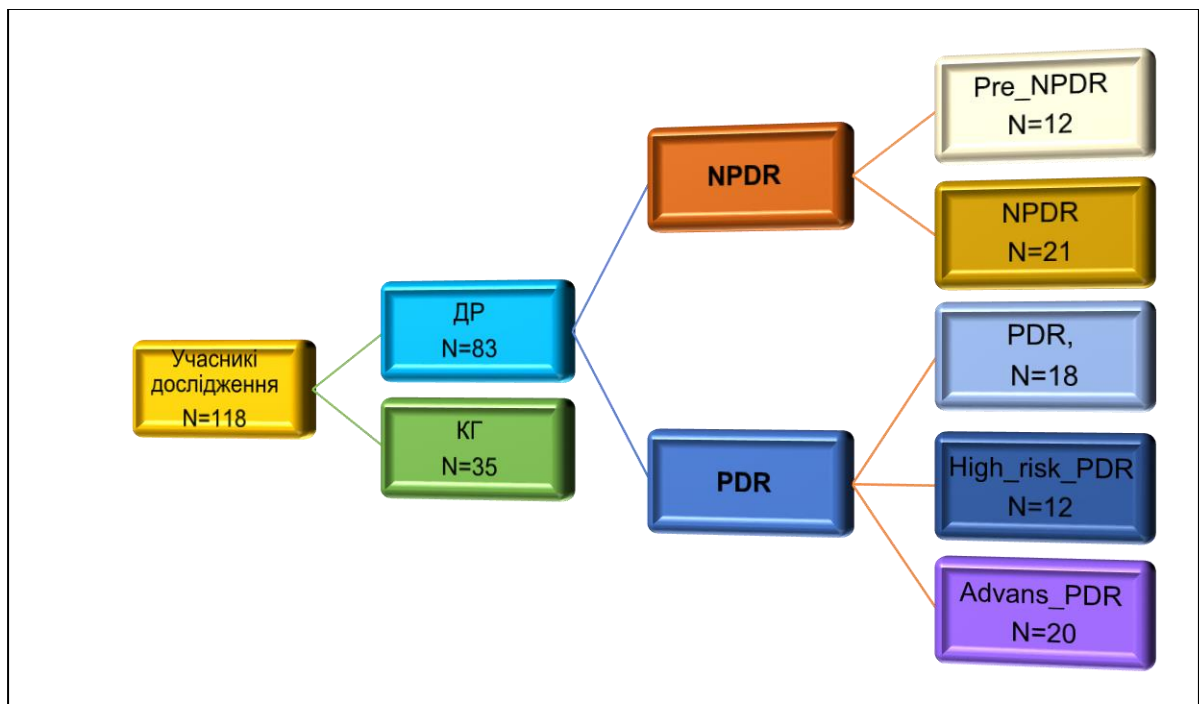


Рис. 2.1 Схематичне зображення розподілу груп пацієнтів за стадією ДР, які використовували у роботі

В розділах ми враховували тривалість ЦД2 як важливого критерію дослідження і вмісту метаболітів. За тривалістю діабету ми виділили 2 групи пацієнтів: 1 група 47 осіб 57% – тривалість ЦД до 15 років, 2 група 36 осіб 43% –

понад 15 років.

### **Етичні аспекти роботи**

Участь у нашому дослідженні була добровільною. При веденні та лікуванні пацієнтів у клініці ми відбирали (за критеріями включення) потенційних учасників та пропонували їм увійти в дослідну групу. При цьому, кожному пацієнту ми пояснювали повну відсутність ризиків для його стану та подальшого лікування, а також повну відсутність будь яких дій додаткових інтервенцій та інших впливів. Ми пояснювали, що у разі погодження до участі у дослідженні, пацієнти дають свою згоду на взяття їхнього біологічного матеріалу (венозна кров та сироватка), що залишилися після проведення усіх запланованих діагностичних досліджень за планом перебування у стаціонарі. Ці залишки підлягають утилізації в лабораторії. Додаткового взяття крові у пацієнтів не передбачено.

Також, пацієнтам пояснювали, що ні за якої умови не будуть використані їхні персональні дані. Усі матеріали будуть маркіровані кодами, де буде зашифрована інформація про анамнез захворювання та офтальмологічний діагноз. Біологічні проби будуть передані для роботи в науковій лабораторії. Отримані додаткові дані про наявність аналітів ніяк не вплине на їх лікування, а буде використана виключно у наукових цілях для статистичної обробки, аналізу та отримання наукової новизни. Усі подальші дослідження параметрів в наукових лабораторіях будуть виконуватися виключно силами дослідника та за рахунок його. На пацієнта не буде здійснено ніякого фінансового навантаження.

Після повного детального роз'яснення пацієнтам усіх умов участі у дослідженні, та у разі їхнього погодження, їм пропонували заповнити форму інформованої згоди, яка попередньо була розроблена дисертантом та затверджена на засіданні кафедри офтальмології і оптометрії післядипломної освіти Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Пацієнти



заповнювали форму і підписували її.

## 2.2 Офтальмологічний статус

*Дослідження гостроти зору та суб'єктивної рефракції.*

Усім хворим проводили візіометрію стандартизованими методами за допомогою проектору знаків та таблиць Головіна-Сівцева. Також в процесі візіометрії використовували адаптовану таблицю ETDRS [166].

Дослідження суб'єктивної рефракції ока проводили за допомогою набору офтальмологічних пробних очкових лінз «Біомед» комплектом із 266 лінз та автоматичного керато-рефрактометра.

*Дослідження внутрішньоочного тиску та полів зору.*

Визначення внутрішньоочного тиску проводили за допомогою автоматичного пневмотонометра, за показаннями норми при цьому брали ВОТ 16-21 мм рт. ст. Для перевірки і більш точного визначення внутрішньоочного тиску використовували тонометрію по Маклакову, для якої норма ВОТ складала 18-24 мм рт. ст.

Для визначення полів зору виконували статичну периметрію Humphrey.

*Біомікроскопія.*

Дослідження передньо відрізку ока та оптичних середовищ виконували за допомогою щілинної лампи ЩЛ-2Б.

*Гоніоскопія.*

Огляд кута передньої камери ока виконували за допомогою трьохдзеркальної лінзи Гольдмана за показами.

*Офтальмоскопія.*

Огляд очного дна виконували під місцевою анестезією контактним методом за допомогою трьохдзеркальної лінзи Гольдмана.

*Оптична когерентна томографія.*

ОКТ виконували в режимі macula.

*Фундускопія. Флюоресцентна ангіографія.*

При необхідності виконували обстеження сітківки фундус-камерою з фотографуванням очного дна у 7 перехресних полях згідно з протоколом Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS).

Відповідно до шкали ETDRS, у пацієнтів визначали наступні стадії ДР: помірну (PDR), тяжку (High-risk PDR) та прогресуючу ПДР (Advans PDR)

### **2.3 Молекулярно-генетичні дослідження у пацієнтів з ДР та ЦД2**

Для організації дослідження поліморфізмів генів ми склали договір про співпрацю із Науково-дослідним інститутом експериментальної та клінічної медицини НМУ імені О.О. Богомольця. Згідно до технічного завдання, ми доставляли в лабораторію біологічний матеріал наших пацієнтів, із дотриманням вимог переданалітичного етапу та температурного режиму. Попередні консультації щодо відбору проб для дослідження проводили співробітники лабораторії імунології та молекулярної біології.

Для цього в умовах маніпуляційного кабінету Консультативно-діагностичного центру Солом'янського району міста Києва ми відбирали кров пацієнтів для виконання загального аналізу крові у пробірку із фіолетовою кришкою, яка містила наповнювач (EDTA, K3) – антикоагулянт: калієва сіль EDTA (етилендіамінтетраацетат). Після виконання аналізу вміст пробірки замість утилізації центрифугували. Після цього відбирали із пробірки плазму для подальшого дослідження в окрему пробірку типу Епендорф. Маркірували її і разом із матричною пробіркою в якій залишалися клітини – пакували в окремий пакет із маркуванням та заморожували при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Дослідження поліморфізмів генів проводили шляхом вивчення SNP однонуклеотидних поліморфізмів (англ. Single nucleotide polymorphism,). Попередньо проводили виділення геномної ДНК за допомогою PureLink® Genomic DNA Kits For purification of genomic DNA, виробник INVITROGEN (США). Спочатку проводили інкубацію клітин з Digestion Buffer та протеїназою K, потім центрифугували для відділення осаду – продуктів лізису

мембран, денатурації зайвих протеїнів тощо. Для попередження контамінації додатково інкубували із РНКазою. Аналіз локусів ДНК проводили за допомогою тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology (США). Для цього використовували поліморфізми наступної локалізації: *MTHFR C677T (rs1801133)*; *MTHFR A1298C (rs1801131)*; *MTR A2756G (rs1805087)*.

Далі проводили інкубацію із праймерами, які апліфікували певні ділянки генів і дозволяли виявляти типи геному. Це виконували у присутності ДНК-полімерази в ампліфікаторі Gene Amp® PCR System 7500 (Applied Biosystems, США). Обробляли дані за допомогою синхронізованої з ампліфікатором програми RealTime\_PCR.

## 2.4 Біохімічні дослідження у пацієнтів з ДР та ЦД2

Рівень протеїнів у пацієнтів з ДР та ЦД2 проводили в середовищах плазми або сироватки, у залежності від рекомендацій в наборі реагентів. Об'єм сироватки також відбирали в окрему пробірку клініко-діагностичній лабораторії, як залишки після дослідження біохімічних параметрів із сироватки венозної крові, отриманої попередньо за стандартним протоколом шляхом центрифугування. Матеріал заморожували при  $-20^{\circ}\text{C}$  та доставляли в наукову лабораторію.

Вміст L-гомоцистеїну визначали в плазмі крові методом твердофазного імуно-ферментного аналізу (ІФА) на напівавтоматичному аналізаторі RT2100С (RAYTO) (Китай) із використанням інкубатора-шейкеру для мікропланшетів PST-60HL-4 (BioSun) (Латвія) та автоматичного планшетного промивача-вошеру Bio-Rad PW40 за допомогою набору Axis-Shield (FHCU100, Lot 902943161) (Великобританія).

Вміст фолатів та вітамінів В12, В6 визначали в плазмі крові методом твердофазного імуно-ферментного аналізу (ІФА, ELISA) за допомогою наборів: тест-системи Фолати AccuBind® ІФА (Monobind, США, код набору 7525-300, чутливість 0,52 нг/мл); тест-системи Вітамін В12 AccuBind® ІФА (Monobind,

США, код набору 7625-300, чутливість 70,13 пг/мл); тест-системи VB6 (Vitamin B6) ELISA Kit (Elabscience, США, Catalog No: E-EL-0008 чутливість 0,94 нг/мл).

Вміст ендотеліну-1 визначали в плазмі крові за допомогою набору: тест-система Human ET-1 (Endothelin 1) ELISA Kit (Elabscience, США, Catalog No: E-EL-H0064 чутливість 0,75 пг/мл, межі вимірювання 1,25-80 пг/мл). Вміст аргінази-1 у сироватці крові вимірювали із використанням наборів реактивів: Elabscience (Human Arginase «Hycult Biotech»). Обробка даних здійснювалася за допомогою програмного забезпечення QuantAssay 0.8.2.6.

## 2.5 Методи статистичних досліджень

Для оцінки результатів проведеного дослідження (асоціацій між досліджуваними показниками вивчаємих груп пацієнтів) виконували розрахунок співвідношення шансів (odds ratio, OR) зі стандартною похибкою відношення шансів (S) і пов'язаного з ним 95% довірчого інтервалу (95% confidence interval, 95% CI). Формула розрахунку показника співвідношення шансів (OR) мала наступний вигляд (2.1):

$$OR = \frac{A \cdot D}{B \cdot C} \quad (2.1)$$

Де, А – кількість випадків, коли є і фактор ризику;

В – кількість випадків, коли є фактор ризику, однак немає наслідку;

С – кількість випадків, коли немає фактору ризику, однак є наслідок;

Д – кількість випадків, коли немає ні фактору ризику, ні наслідку.

Ми враховували, що OR, яке перевищує 1, означає: шанси виявити фактор ризику більше у групі з наявним результатом. В такому випадку фактор мав прямий зв'язок із ймовірністю настання результату. Показник OR показував, у скільки разів шанси певного результату в досліджуваній групі вищі, ніж у групі

контролю. Для статистичного аналізу отриманих результатів застосовували онлайн калькулятор підрахунку ВШ та програму Microsoft Excel [95].

Статистичний аналіз даних проводився за допомогою пакету IBM SPSS Statistics 23 та програми MedStat. Перевірку розподілу кількісних показників по всій вибірці даних на відповідність закону Гауса проводили за допомогою одновибіркового критерію Шапіро-Уїлка. Більшість параметрів не відображали нормальний розподіл, тому використовували непараметричні критерії. Дані у групах порівнювали за допомогою рангового однофакторного аналізу за критерієм Крускала-Уолліса, для попарного порівняння використовували критерій Данна або Манна-Уїтні з урахуванням поправки Бонфероні. Відмінності у групах вказували у вигляді  $p$  із зазначенням рівня значущості. Вважали, що дані відрізняються за  $p < 0,05$ . Для опису даних у групах наводили значення медіани (Me) та центилей 25-й (P25) та 75-й (P75), які визначали в таблицях [QI÷QIII]. Діаграми надавали у вигляді стовпчиків із вказанням довірчого інтервалу (ДІ 95%), або у вигляді стовпчиків із вказанням (ДІ 95%) або Box-and-Whisker plot де центральна коробка являє собою значення від нижнього до верхнього квартиля (від 25 до 75 центилей). Середня лінія представляє медіану. Рядок простягається від мінімального до максимального значення, виключаючи значення «назовні» і «далеко», які відображаються як окремі точки.

Якщо наводили дані, що відповідають нормальному розподілу, використовували середнє значення, стандартну похибку або показник дисперсії.

## РОЗДІЛ 3

### АСОЦІАЦІЇ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ *MTHFR*, *MTRR* І *MTR* З КЛІНІЧНИМИ СТАДІЯМИ РОЗВИТКУ ДР ТА РІВНЕМ ГОМОЦИСТЕЇНУ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЦД2

Гіпергомоцистеїнемія часто пов'язана з віковими та фізіологічними особливостями, а також індивідуальними генетичними, епігенетичними, харчовими факторами ризику. Тому, активно вивчається асоціація поліморфізмів основних генів, які кодують синтез ферментів фолатного циклу *MTHFR* (англ., functional methylenetetrahydrofolate reductase) C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* (англ., methionine synthase) A2756G, як потенційних тригерних механізмів гіпергомоцистеїнемії.

Немає єдиної думки щодо наявності асоціації поліморфізмів вказаних генів із розвитком ДР на тлі ЦД2. Є дані про зв'язок гену поліморфізму гена *MTHFR* (677C/T) і розвитком ДР, але на популяції азіатських пацієнтів [88, 106, 148]. І також є спірним питання чи пов'язані ці поліморфізми із розвитком ЦД2 та його ускладнень [111, 112, 158].

#### **3.1 Аналіз розподілу частоти зустрічаємості алелей і генотипів генів *rs1801133*, *rs1805087*, *rs1801131* в дослідних групах**

Для визначення ролі поліморфізмів генів фолатного циклу у розвитку діабетичної ретинопатії на тлі ЦД2 ми провели аналіз розподілу частоти зустрічаємості алелей і генотипів генів *rs1801133*, *rs1805087*, *rs1801131* в дослідних групах із визначенням показника співвідношення шансів.

Дані щодо гену *rs1801133* наведені в рис. 3.1 та табл. 3.1.

Виявлено, що в КГ переважають особи із поліморфізмом гену і наявністю гетерогенного генотипу СТ (58%), доля носіїв генотипу СС складає 25%, а ТТ – 17%. Серед контингенту пацієнтів зберігається перевага носіїв генотипу

СТ (49%), але їх частина зменшена відносно КГ за рахунок збільшення осіб із генотипом СС (45%), і суттєво зменшена доля носіїв генотипу ТТ – 6%. Отже, наявність захворювання більше асоційована із генотипом СС гену *rs1801133* і в меншому ступеню із генотипом ТТ.

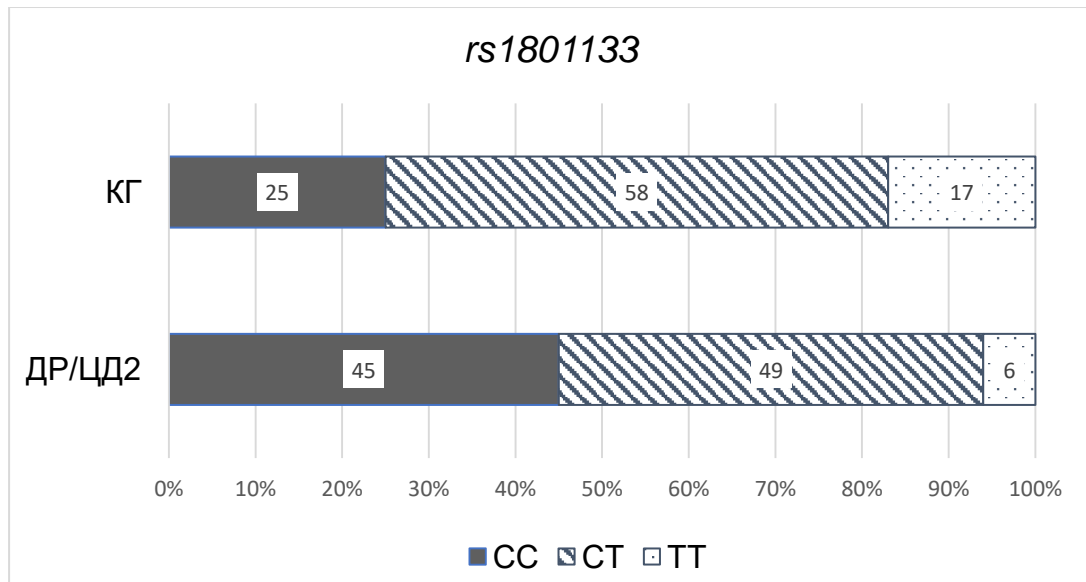


Рис. 3.1 Аналіз розподілу (%) частоти зустрічаємості алелей і генотипів генів *rs1801133* у пацієнтів з ДР та осіб КГ

Таблиця 3.1

**Результати розрахунку оцінки асоціацій між носіями різних генотипів гену *rs1801133* в групі пацієнтів ДР/ЦД2 та осіб КГ, через визначення OR та ДІ**

*rs1801133*

	ДР/ЦД2, n=83	%	КГ, N=35	%	ВШ(OR)	ДІ
CC	37	45	9	25	2,32	0,971-5,562
CT	40	49	20	58	0,698	0,315-1,546
TT	6	6	6	17	0,143	0,039-0,522
	83	100	35	100		
C	114	69	38	54	1,846	1,041-3,275
T	52	31	32	46	0,542	0,305-0,961
	166	100	70	100		

Для визначення оцінки асоціацій між досліджуваними показниками провели розрахунок співвідношення шансів (odds ratio, OR) зі стандартною похибкою відношення шансів (S) і пов'язаного з ним 95% довірчого інтервалу (ДІ) (табл.3.1).

Виявили, що OR для СС складає 2,32 (95% ДІ 0,971-5,562  $P > 0,05$ ) для СТ 0,698 (95% ДІ 0,315-1,546  $P > 0,05$ ), для ТТ 0,143 (95% ДІ 0,039-0,522  $P > 0,05$ ). Для пацієнтів є притаманним наявність алеля С (69%), який зустрічається у 2 рази частіше, ніж Т. А у осіб КГ алелі С та Т зустрічаються в рівному ступені (54% та 46%), із незначною перевагою С. При цьому OR для С складає 1,846 (95% ДІ 1,041-3,275  $P > 0,05$ ), а для Т складає 0,542 (95% ДІ 0,305-0,961  $P > 0,05$ ).

Отже, не виявлено доказів асоціації поліморфізмів гену *rs1801133* із розвитком ДР на тлі ЦД2 у порівнянні із особами без діабету [9,11].

За результатами аналізу асоціації поліморфізмів *rs1805087* із розвитком ДР, виявлено (рис. 3.2, табл. 3.2), що у осіб КГ зустрічався лише мажорний генотип АА у 70%, та у 30% гетерогенний генотип АГ.

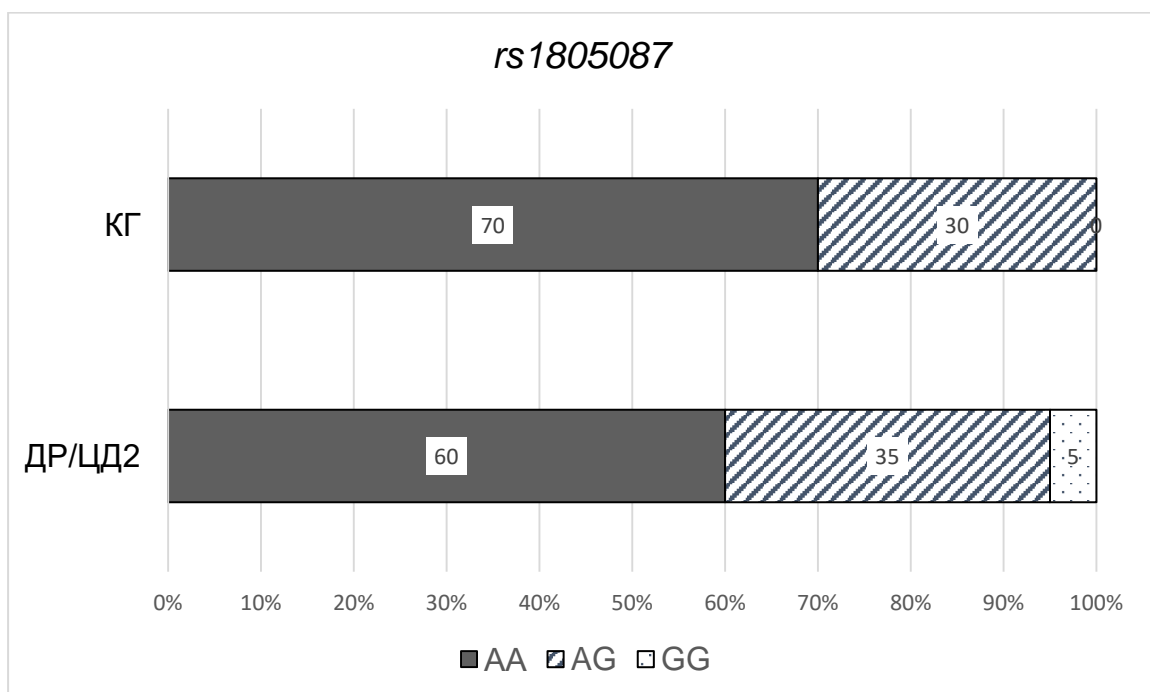


Рис. 3.2 Аналіз розподілу (%) частоти зустрічаємості алелей і генотипів гену *rs1805087* у пацієнтів з ДР та осіб КГ



Таблиця 3.2

**Результати розрахунку оцінки асоціацій між носіями різних генотипів  
гену *rs1805087* в групі пацієнтів ДР/ЦД2 та осіб КГ,  
через визначення OR та ДІ**

*rs1805087*

	<b>ДР/ЦД2, n=83</b>	<b>%</b>	<b>КГ, N=35</b>	<b>%</b>	<b>ВШ(OR)</b>	<b>ДІ</b>
AA	<b>50</b>	60	<b>25</b>	70	0,606	0,258-1,425
AG	<b>29</b>	35	<b>10</b>	30	1,343	0,568-3,176
GG	<b>4</b>	5	<b>0</b>	0		
	<b>83</b>	100	<b>35</b>	100		
A	<b>129</b>	78	<b>60</b>	85	0,581	0,271-1,246
G	<b>37</b>	22	<b>10</b>	15	1,721	0,803-3,69
	<b>166</b>	100	<b>70</b>	100		

Для пацієнтів також було притаманне переважання генотипу AA (60%), 35% осіб спостерігали генотип AG, але у 5% хворих на ДР був виявлений генотип GG.

У порівнянні частоти зустрічаємості поліморфізмів у пацієнтів та осіб КГ OR для AA складає 0,606 (95% ДІ 0,258-1,425  $P>0,05$ ), для AG 1,343 (95% ДІ 0,568-3,176  $P>0,05$ ). В обох групах переважають особи із алелем А. В групі пацієнтів алель А зустрічається практично в 3,5 рази частіше, ніж алель G, а в групі контролю алель А зустрічається частіше в 5,6 разів. OR для А складає 0,581 (95% ДІ 0,271-1,246  $P>0,05$ ), а для G 1,721 (95% ДІ 0,803-3,69  $P>0,05$ ). Таким чином, немає доказів асоціації гену *rs1805087* із розвитком ДР на тлі ЦД2[9,11].

Аналіз асоціації поліморфізмів гену *rs1801131* наведений у рис. 3.3, та табл. 3.3. Виявлено, що у осіб КГ переважним є генотип AC, який мають 50%, що були досліджені. Генотип AA зустрічався у 45% осіб, а генотип CC у 5%. Розподіл частоти зустрічаємості цих генотипів у пацієнтів був схожий, і переважали особи із генотипом AC (53%). Генотип AA спостерігали у 34% хворих на ДР, і 13% мали генотип CC.

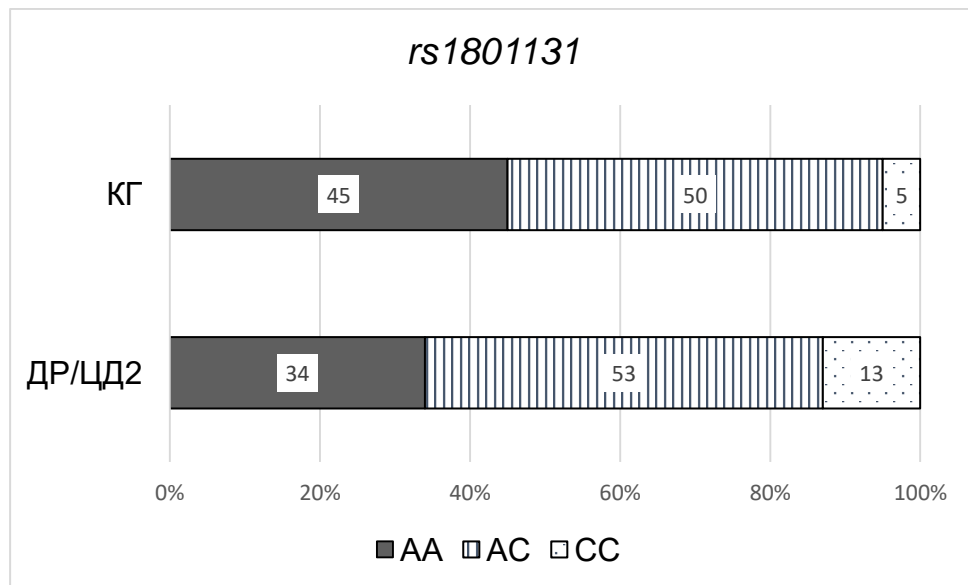


Рис. 3.3 Аналіз розподілу (%) частоти зустрічаємості алелей і генотипів гену *rs1801131* у пацієнтів з ДР та осіб КГ

Таблиця 3.3

**Результати розрахунку оцінки асоціацій між носіями різних генотипів гену *rs1801131* в групі пацієнтів ДР/ЦД2 та осіб КГ, через визначення OR та ДІ**

*rs1801131*

	ДР/ЦД2, n=83	%	КГ, N=35	%	ВШ(OR)	ДІ
AA	28	34	16	45	0,605	0,27-1,353
AC	44	53	17	50	1,195	0,542-2,634
CC	11	13	2	5	2,521	0,529-12,02
	83	100	35	100		
A	100	60	50	70	0,667	0,37-1,203
C	66	40	22	30	1,5	0,832-2,706
	166	100	72	100		

Отже, OR для AA складає 0,605 (95% ДІ 0,27-1,353  $P>0,05$ ), для AC OR складає 1,195 (95% ДІ 0,542-2,634  $P>0,05$ ), для CC - 2,521 (95% ДІ 0,529-12,02  $P>0,05$ ). В обох групах переважає алель А, у КГ зустрічається в 1,5 рази частіше,

в групі пацієнтів в 2,3 рази. OR для А складає 0,667 (95% ДІ 0,37-1,203  $P>0,05$ ), а для С 1,5 (95% ДІ 0,832-2,706  $P>0,05$ ) [9,11].

Таким чином, за результатами наших спостережень, не виявлений зв'язок поліморфізмів основних генів *rs1801133*, *rs1805087*, *rs1801131*, що кодують ферменти фолатного циклу із розвитком ДР на тлі ЦД2 у порівнянні із особами без діабету.

### 3.2 Вивчення рівню L-гомоцистеїну у крові учасників дослідження

Враховуючи потенційний вплив високої концентрації L-гомоцистеїну на розвиток судинних дисфункцій, властивості та стан ендотелію, і, відповідно, розвиток мікросудинних ускладнень, в тому числі і на тлі гіперглікемії, ми визначали рівень речовини в сироватці крові пацієнтів з ДГ та осіб КГ, який порівнювали за значенням медіани ( $Me \pm \sigma$ ). Виявили, що рівень L-гомоцистеїну у крові пацієнтів був в 2 рази вище ( $p<0,05$ ) і складав  $21,12 \pm 7,1$  мкмоль/л, порівняно із КГ  $11,85 \pm 5,4$  мкмоль/л.

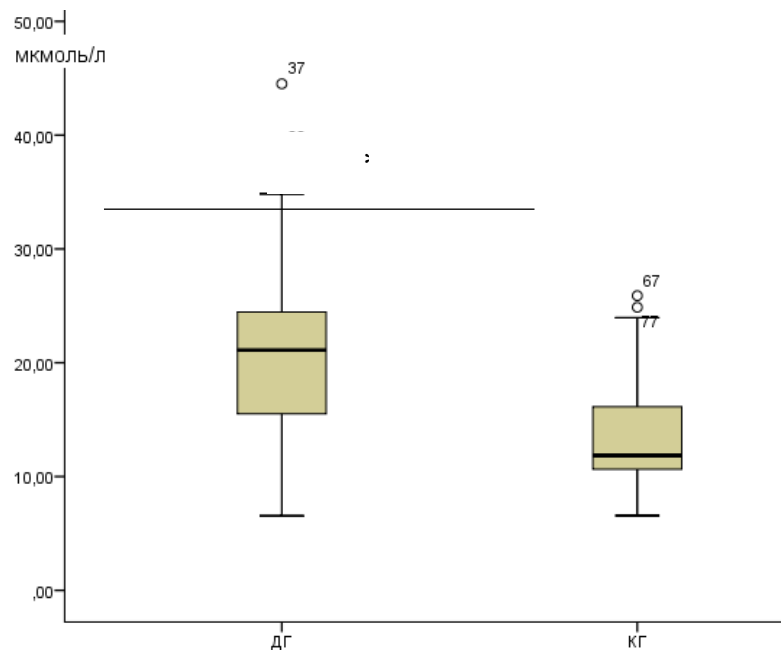


Рис. 3.4 Box-plot \_діаграма рівню L-гомоцистеїну (мкмоль/л) в сироватці крові пацієнтів дослідної групи (ДГ) у яких виявлена ДР на тлі ЦД2 та осіб контрольної групи (КГ), \* – відмінність від КГ ( $p<0,05$ )

В розрізі груп порівняння пацієнтів з НПДР і ПДР різниці показника L-гомоцистеїну практично не було (рис. 3.5). У хворих із НПДР рівень складав  $20,86 \pm 7,93$  мкмоль/л, а у пацієнтів із ПДР  $21,68 \pm 5,42$  мкмоль/л. Однак, ми у вказаних групах визначили підгрупи пацієнтів, відповідно до стадії ретинопатії (рис. 3.6, пояснення в Розділі 2) і порівняли показник L-гомоцистеїну із інтенсивністю ушкодження сітківки на тлі ЦД2 у групах (рис. 3.7).

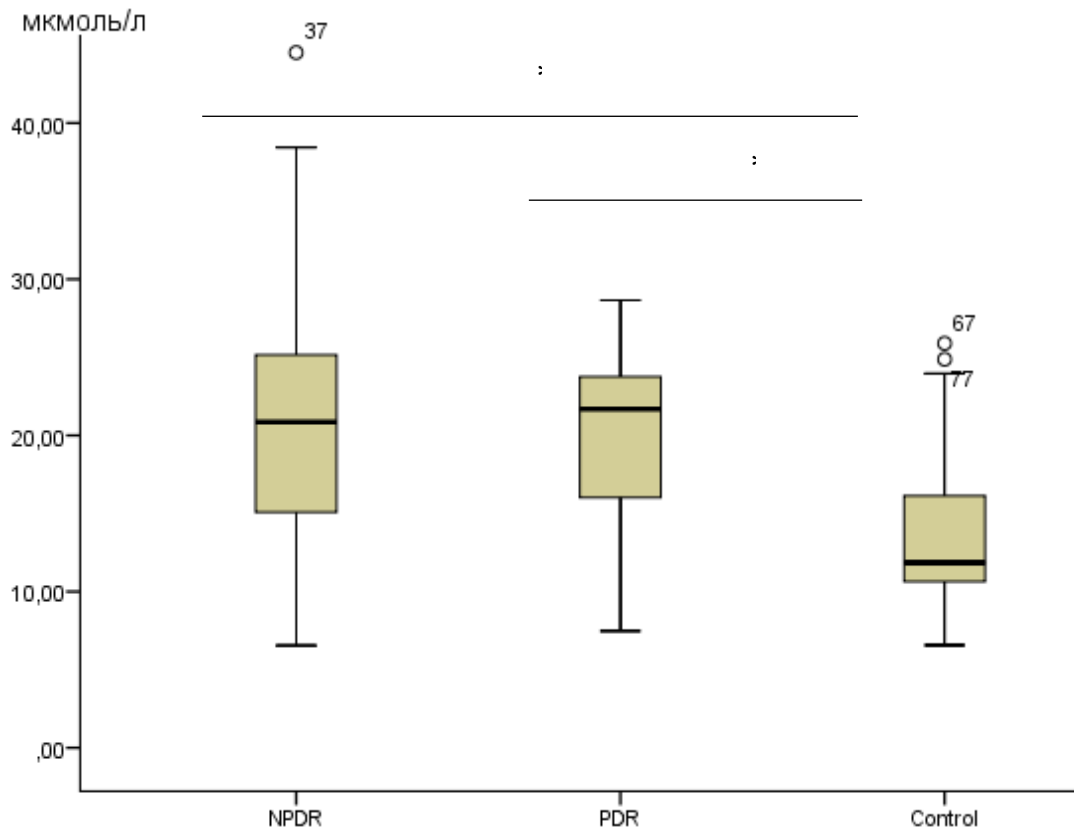


Рис. 3.5 Box-plot\_діаграма рівню L-гомоцистеїну (мкмоль/л) в сироватці крові пацієнтів із непроліферативною та проліферативною ДР на тлі ЦД2 та осіб контрольної групи (КГ), \* – відмінність від КГ ( $p < 0,05$ )

Виявили, що під час розвитку ДР рівень L-гомоцистеїну підвищується вже на початку захворювання і розвитку НПДР. В групі із Pre\_NPDR медіана вмісту речовини складала  $Me \pm \sigma$ ;  $11,0 \pm 6,8$  мкмоль/л, що близько до значення КГ  $11,85 \pm 5,45$  мкмоль/л. Прогресування ретинопатії із дуже м'якої до важкої НПДР супроводжувалося збільшенням речовини практично вдвічі і сягало значення

21,57±7,6 мкмоль/л. У групах із проліферативною ретинопатією значення L-гомоцистеїну практично не відрізнялося і складало у групі ПДР 22,14±4,57 мкмоль/л у групі високого ризику ПДР 22,95±6,7 мкмоль/л, і у групі розвинутої ПДР 22,72±5,23 мкмоль/л. Усі показники мали достовірну відмінність у порівнянні із показником КГ [9,11].

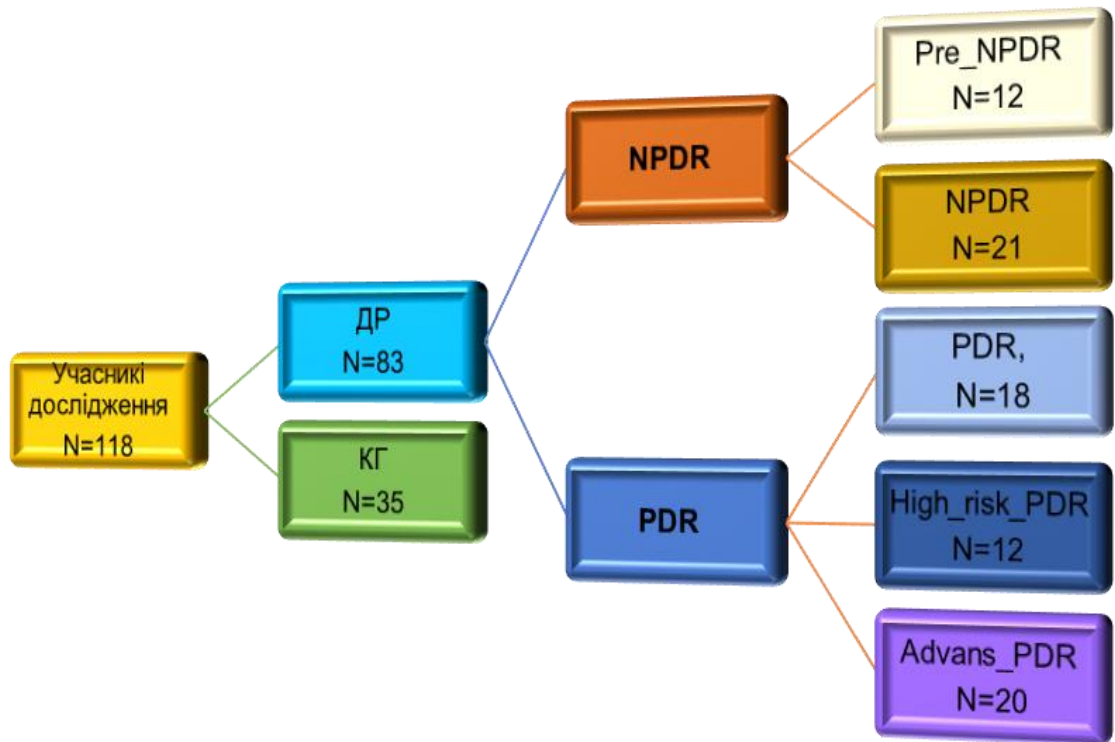


Рис. 3.6 Розподіл підгруп учасників дослідження у залежності від стадії ретинопатії

Отже, не зважаючи на те, що ми не виявили асоціації генетично детермінованого дефіциту ферментів фолатного циклу із ризиком розвитку ДР на тлі ЦД, рівень L-гомоцистеїну можна вважати доволі суттєвим маркером розвитку мікросудинних ускладнень ЦД2, зокрема ДР. Тому, ми вважаємо актуальним подальший пошук факторів, які стають тригерними, для структурного ушкодження сітківки і прогресування стадії ретинопатії у пацієнтів із ЦД2.

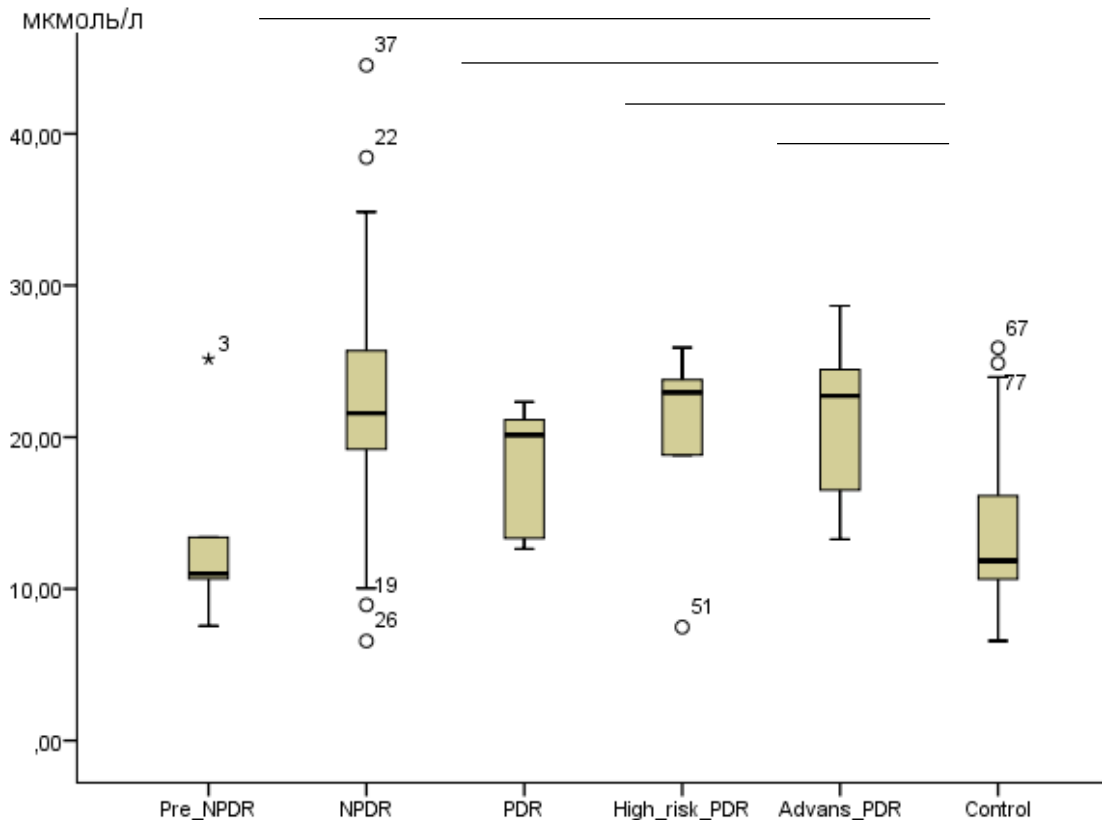


Рис. 3.7 Box-plot\_діаграма рівню L-гомоцистеїну (мкмоль/л) в сироватці крові пацієнтів із різною стадією ДР та осіб контрольної групи (КГ),

\* – відмінність від КГ ( $p < 0,05$ )

Аналіз рівня L-гомоцистеїну у пацієнтів ДР/ЦД2 в залежності від генетично детермінованих поліморфізмів генів *rs1801133*, *rs1805087*, *rs1801131* наведений на рис. 3.8, де ми порівнювали вміст речовини у сироватці пацієнтів з НПДР та ПДР. У всіх носіїв різних поліморфізмів гену *rs1801133* рівень L-гомоцистеїну відображав загальну картину підвищення його у пацієнтів в 2 рази ( $p < 0,05$ ) і рівень L-гомоцистеїну практично не відрізнявся в залежності від ступеня ушкодження сітківки.

Для носіїв найбільш розповсюджених варіантів гену *rs1805087* AA і AG також зберігалася залежність, яка була притаманна усій групі, що досліджувалася – у пацієнтів із НПДР та ПДР рівень L-гомоцистеїну перевищував в 2 рази ( $p < 0,05$ ) показник контролю і між групами хворих не відрізнявся [9,11].

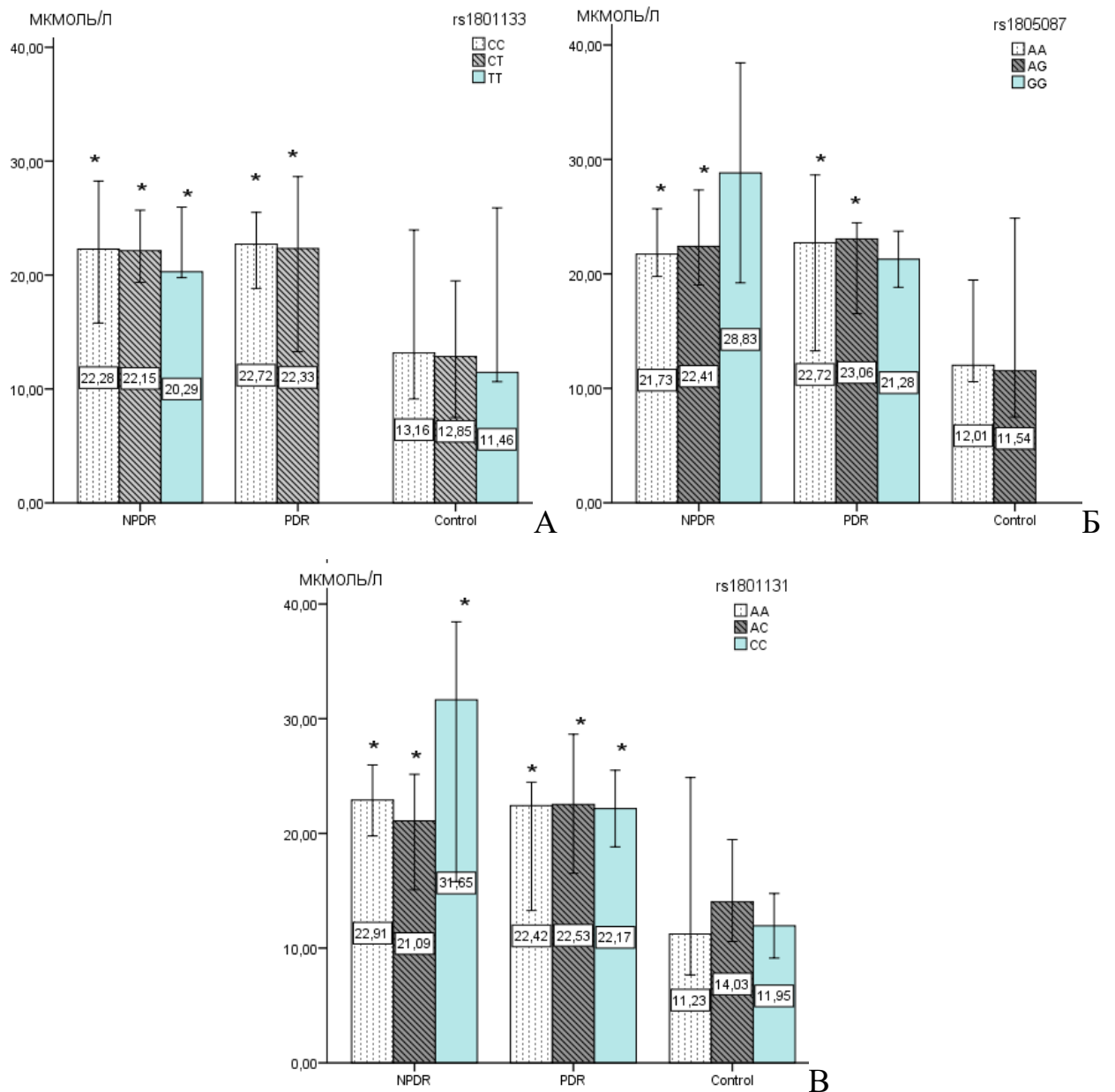


Рис. 3.8 Рівень L-гомоцистеїну (мкмоль/л) в плазмі крові пацієнтів з НПДР/NPDR та ПДР/PDR на тлі ЦД2 та осіб контрольної групи (Control), вказаний відповідно до генотипів генів *rs1801133*, *rs1805087*, *rs1801131*, що кодують ферменти фолатного циклу. Значення медіани та ДІ 95%.

\* – відмінність від КГ ( $p < 0,05$ )

Однак, у носіїв мінорного генотипу GG ми виявили цікаву особливість: на стадії захворювання НПДР рівень L-гомоцистеїну був в 1,3 рази вище, ніж у носіїв інших генотипів, і відповідно в 2,4 рази вище, ніж середній в контролі,

однак у носіїв цього генотипу хворих на ПДР, рівень L-гомоцистеїну достовірно не відрізнявся від аналогічних показників у групі. Враховуючи, що GG генотип у осіб КГ ми не виявили, можна думати, що цей генотип може бути претендентом на тригерні чинники розвитку ДР на тлі ЦД2 [9,11].

Аналогічна картина спостерігалася і серед носіїв поліморфізмів гену *rs1801131*. Серед носіїв найбільш розповсюджених генотипів AA і AC зберігалася залежність підвищення рівню L-гомоцистеїну у пацієнтів в 2 рази у порівнянні із КГ. А серед носіїв мінорного генотипу CC, які мали НПДР рівень L-гомоцистеїну був в 3 рази вище ніж в КГ, та в 1,4 рази, вище, ніж у носіїв інших генотипів. Така особливість, щодо високого рівня L-гомоцистеїну у носіїв генотипів GG гену *rs1805087*, та CC гену *rs1801131* на початку розвитку захворювання може обговорюватися, як механізм ініціації виникнення ушкодження сітківки, але для цих припущень ми, в даному дослідженні, маємо суттєві обмеження, оскільки кількість пацієнтів, що є носіями цих генотипів доволі мала і не дає підставу стверджувати про наші знахідки, як закономірність, і потребують подальших досліджень і спостережень.

### 3.3 Аналіз тривалості діабету у пацієнтів різних груп

Для подальшого пошуку чинників прогресування ДР на тлі ЦД2 ми аналізували залежність тривалості діабету у пацієнтів різних груп, та із різними варіантами генетично детермінованого дефіциту фолатного циклу (рис. 3.9).

В групі НПДР середня тривалість основного захворювання була ( $M \pm SD$ )  $13,6 \pm 6,51$  років, а в групі ПДР складала  $16,8 \pm 6,47$  років і достовірно не відрізнялося між групами [9,11].

Відсутність достовірної різниці між групами НПДР та ПДР щодо середньої тривалості діабету та прогресуванням ретинопатії в даному дослідженні дає підставу шукати інші механізми, які призводять до підвищення ступеню ушкодження сітківки.

Отже, більш детальний аналіз залежності тривалості ЦД2 та генетичного



дефіциту фолатного циклу показав, що у носіїв найбільш розповсюджених генотипів CC та CT (а вірогідно алелі C) гену *rs1801133* тривалість ЦД2 є важливим фактором прогресування ретинопатії, оскільки середня тривалість діабету достовірно розрівнялася у хворих із НПДР та ПДР (рис. 3.9).

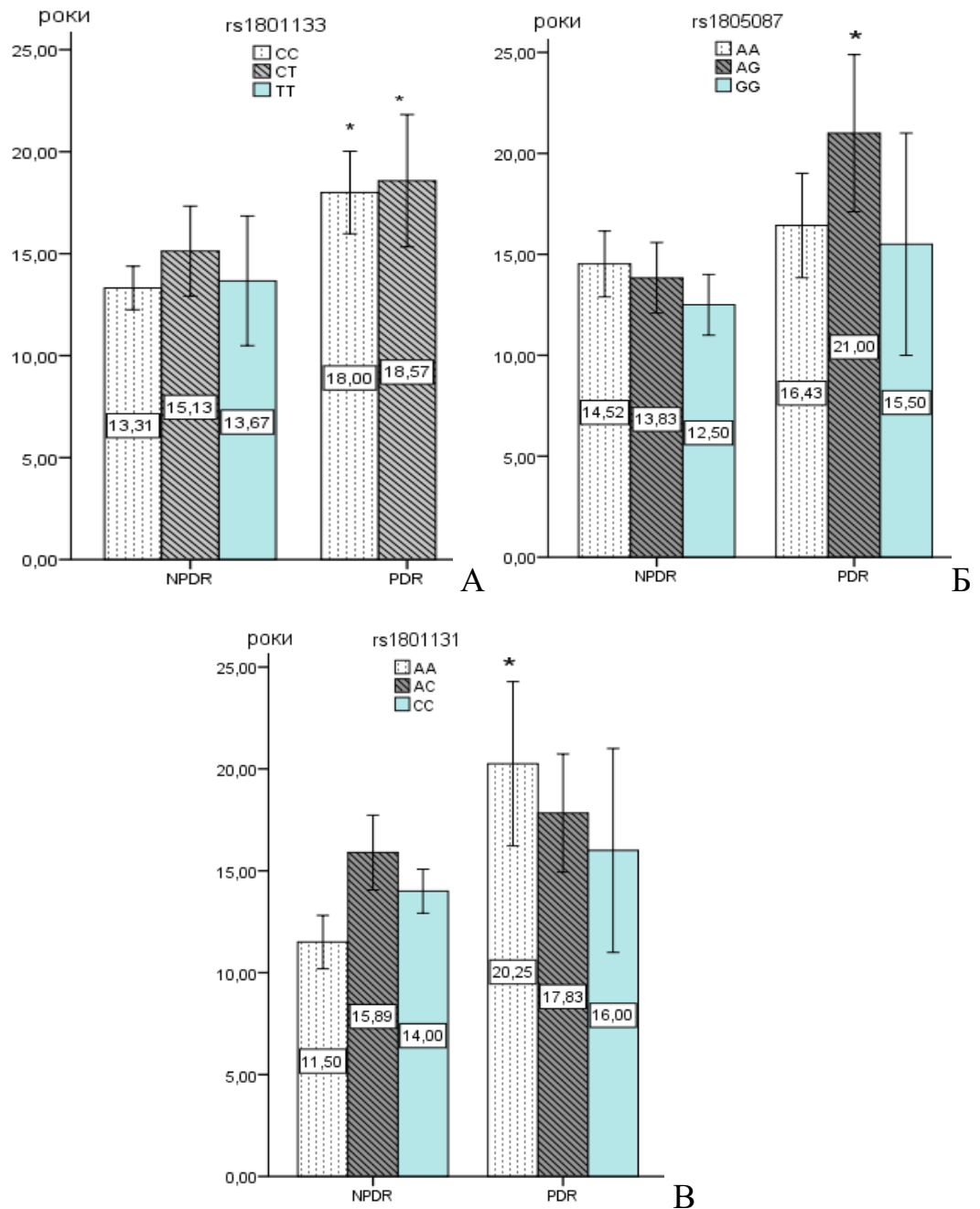


Рис. 3.9 Середня тривалість ЦД2 (роки) у хворих на НПДР/NPDR та ПДР/PDR в залежності від генотипу генів *rs1801133* (А), *rs1805087* (Б), *rs1801131* (В), що кодують ферменти фолатного циклу. Відображено середні значення  $\pm$  SD.

\* – відмінність із аналогічним показником між групами ( $p < 0,05$ )

Також тривалість ЦД2 впливала на прогресування ретинопатії у пацієнтів із генотипом AG гену *rs1805087*, і генотипом AA гену *rs1801131*, у яких достовірно відрізнявся в 1,5 рази ( $p < 0,05$ ) та в 1,7 разів ( $p < 0,05$ ) відповідно середній термін основного захворювання в групах із НПДР та ПДР і прогресування ретинопатії спостерігалася на тлі більшої тривалості ЦД2.

У носіїв інших генотипів генів *rs1801133*, *rs1805087*, *rs1801131*, що визначають дефіцит ферментів фолатного циклу спостерігалася тенденція прогресування ретинопатії із збільшенням тривалості ЦД2, але цей фактор не був провідним у патогенезі прогресування ускладнення.

Отже, аналіз розподілу генотипів та алелей основних генів *rs1801133*, *rs1805087*, *rs1801131*, що кодують ферменти фолатного циклу в наших групах пацієнтів на ДР/ЦД2 показав, що для гену *MTHFR* (677C/T, *rs1801133*) мажорним є гетерозиготний поліморфізм СТ, який визначається в контролі у 58% осіб. Розвиток ДР супроводжувався іншим співвідношенням: в контингенті пацієнтів спостерігали зменшення частки носіїв СТ і збільшення осіб із генотипом СС. Частка осіб із генотипом СС в КГ була в 1,8 разів менше ніж серед пацієнтів. Можна припустити, що наявність генотипу СТ є фактором утримання розвитку ЦД2. Також ми показали, що у носіїв найбільш розповсюджених генотипів СС та СТ (а вірогідно алелі С) гену *rs1801133* більш важливим фактором прогресування ретинопатії є тривалість ЦД2 [9,11].

За нашими спостереженнями частка носіїв генотипу ТТ в КГ була більше в 2,8 разів ніж серед пацієнтів і шанс розвитку ДР у них був невисоким. Але, ми зауважували на те, що наші дані мають суттєві обмеження, щоб висловлюватися про популяційне носійство генотипів, які асоційовані із розвитком ДР, через дуже малу кількість спостережень.

Аналіз генотипів гену *MTR 2756A/G* (*rs1805087*) показав, що мажорним є гомозиготний генотип АА, який зустрічався у 70% осіб КГ та 60% пацієнтів. У носіїв генотипу АG провідним фактором прогресування ДР була тривалість ЦД2. Гомозиготний генотип GG у осіб КГ взагалі не був виявлений, і зустрічався лише у пацієнтів, що можна вважати фактором ризику розвитку ДР.

Саме із цим генотипом ми зв'язали неочікувану знахідку – достовірне підвищення в 1,3 рази L-гомоцистеїну на стадії НПДР у порівнянні із носіями інших генотипів, що відносно рівню КГ було вище в 2,4 рази.

Аналіз гену *MTHFR 1298 A/C (rs1801131)* показав, що половині усіх осіб що досліджували (КГ та пацієнтів), був притаманний гетерозиготний генотип АС, який не був пов'язаний із з розвитком захворювання. Для носіїв гомозиготного генотипу АА важливим фактором прогресування ДР виявили тривалість ЦД2. Мінорний генотип СС був в 2,6 рази більше поширений у пацієнтів, ніж в КГ і з ним також було асоційоване на стадії НПДР підвищення в 1,4 рази рівню L-гомоцистеїну у порівнянні із носіями інших генотипів, і гіпергомоцистеїнемія в 3 рази вища ніж в КГ.

### **Резюме до розділу 3**

Таким чином, на підставі проведених досліджень нами не був виявлений зв'язок поліморфізмів основних генів *rs1801133*, *rs1805087*, *rs1801131*, що кодують ферменти фолатного циклу із розвитком ДР на тлі ЦД2 у порівнянні із особами без діабету.

У носіїв мінорних гомозиготних генотипів: GG гену *MTR 2756A/G* і генотипу СС гену *MTHFR 1298 A/C* виявлене суттєве підвищення рівня гоцистеїну в крові на початку розвитку ДР, що потребує подальшого з'ясування ролі гіпергомоцистеїнемії як чинника прогресування ускладнення, або маркера ступеню ушкодження тканин.

У носіїв найбільш розповсюджених генотипів СС та СТ гену *rs1801133* генотипу АС гену *rs1805087*, і генотипу АА гену *rs1801131* більш важливим фактором прогресування ретинопатії є тривалість ЦД2.

### **Матеріали даного розділу висвітлено у публікаціях:**

1. Прокопенко ЮВ. Асоціації поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу із вмістом вітамінів групи В у пацієнтів із діабетичною ретинопатією та

цукровим діабетом 2 типу. Архів офтальмології України. 2022;10(2):23-30. doi: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.10.2.2022.298>. [9].

2. Риков СО, Прокопенко ЮВ, Натрус ЛВ, Панченко Ю.А. Роль поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу у прогресуванні діабетичної ретинопатії пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. Офтальмологічний журнал (Україна). 2022;5:3-11. doi <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh20225311>. [11].

3. Прокопенко ЮВ, Риков СО. Оцінка асоціацій поліморфізмів генів MTHFR C677T, MTR A2756G, MTHFR A1298C із розвитком діабетичної ретинопатії у пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. Grail of Science. 2022;17: 458–459. doi: <https://doi.org/10.36074/grail-of-science.22.07.2022.079>.

4. Прокопенко ЮВ. Оцінка асоціацій поліморфізмів генів MTHFR C677T, MTR A2756G, MTHFR A1298C із розвитком діабетичної ретинопатії у пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. В: Риков СО (ред). СВОЄ ДИТИНСТВО ТРЕБА БАЧИТИ`21: науково-практична конференція дитячих офтальмологів та оптометристів України з міжнародною участю 11 червня 2022 року: збірник праць. Київ; 2022, с. 44-45. doi: <http://ir.nuozu.edu.ua:8080/handle/lib/4513>.

## РОЗДІЛ 4

### ВМІСТ ЕНДОТЕЛІНУ-1 І АРГІНАЗИ-1 В ПЛАЗМІ КРОВІ ТА ПАТЕРН БІОХІМІЧНИХ ПОРУШЕНЬ У ПАЦІЄНТІВ НА ДР В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ ФОЛАТНОГО ЦИКЛУ

Специфічним метаболітом оксидативно-нітрозативного стресу, який виникає через накопиченню оксидантів та продуктів окису оксиду азоту є аргіназа-1 фермент, що експресується в ендотелії і може сприяти і виникненню судинної дисфункції. Є дані про вплив надекспресії аргінази-1 у пацієнтів з діабетичною ретинопатією на активацію проліферації і перехід непроліферативної стадії діабетичної ретинопатії в проліферативну [2].

Доведена роль підвищення ендотеліну-1 (ЕТ-1) – потужного судинозвужуючого пептиду у крові хворих на ДР, оскільки, судинна і позасудинна мікроциркуляція ока є багатим джерелом ендотеліну-1, що може сприяти аномальній гемодинаміці сітківки при діабетичній ретинопатії. Підвищення рівня ендотеліну-1 може сприяти ендотеліальній дисфункції через гальмівну дію на продукцію оксиду азоту. Отже, порушення продукції ендотеліну-1 та аргінази-1 у структурах ока можна розглядати як метаболіти двох взаємодіючих механізмів і маркерами патологічних змін вже на ранніх стадіях діабетичної ретинопатії [8]. Тому, нашою задачею було проаналізувати вміст аргінази-1 та ендотеліну-1 в сироватці крові у пацієнтів на діабетичну ретинопатію із різною тривалістю ЦД2 в залежності від поліморфних варіантів генів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR*, як можливого чинника розвитку ендотеліальної дисфункції. А також для з'ясування ступеню специфічності коливань маркерів діабетичної ретинопатії, дослідити патерн біохімічних порушень, зумовлених генетичним дефіцитом фолатного циклу у пацієнтів із різними стадіями діабетичної ретинопатії на тлі цукрового діабету 2 типу.

Аналіз вмісту ЕТ-1 в плазмі досліджуваних осіб показав очікуване підвищення протеїну в групі пацієнтів. Його вміст складав  $16,07 \pm 2,02$  пг/мл, що було у 8 разів вище ніж у контролі  $2,18 \pm 1,4$  пг/мл (рис. 4.1, А). Вміст ЕТ-1

достовірно не розрізнявся в групах пацієнтів із різною стадією ДР. У пацієнтів з НПДР  $16,6 \pm 2,02$  пг/мл, а у осіб із ПДР  $14,35 \pm 2,2$  пг/мл (рис. 4.1, Б).

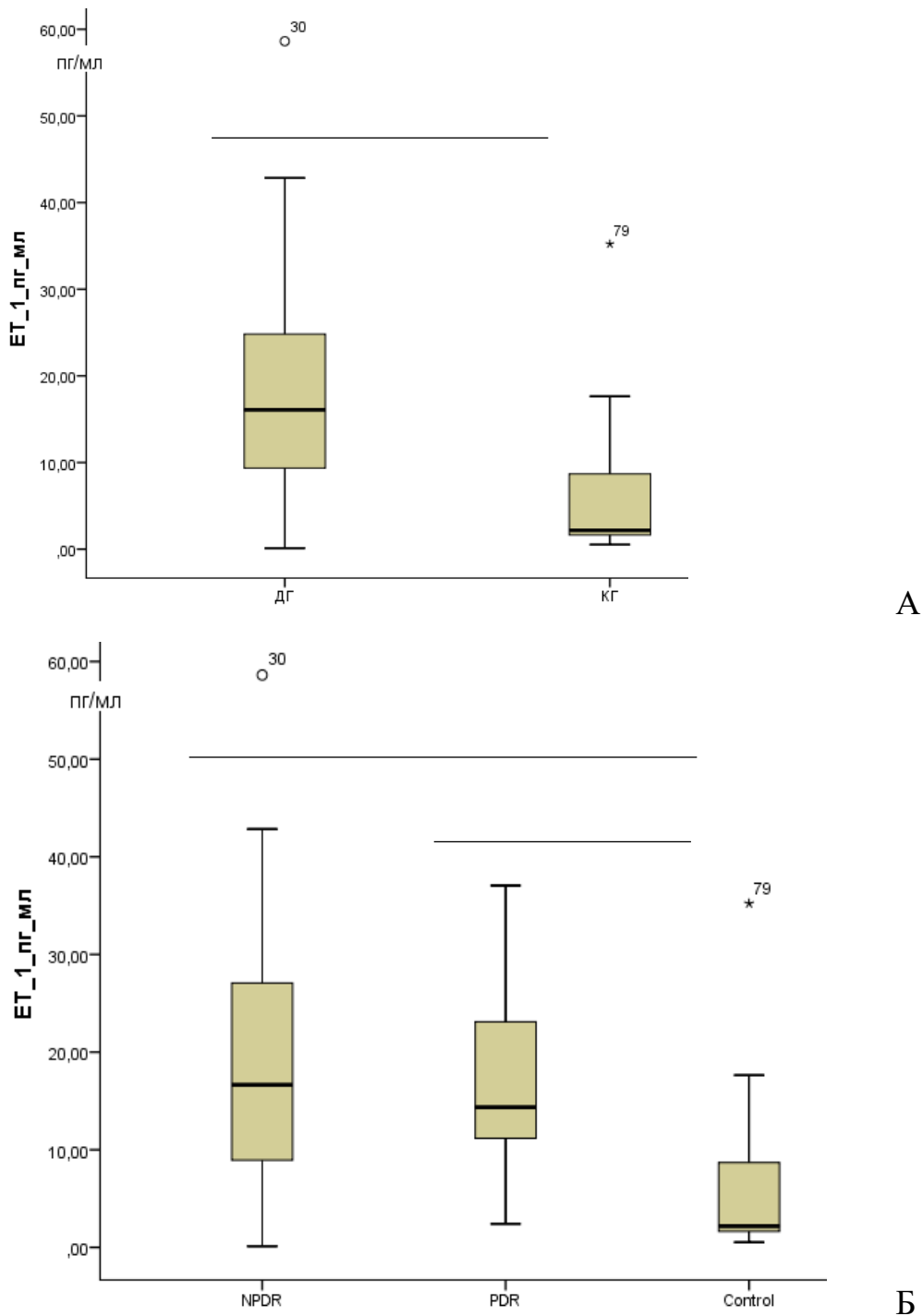


Рис. 4.1 Бокс-плот діаграма вмісту ендотеліну-1 у плазмі крові досліджуваних осіб: А – порівняння ДГ та КГ, Б – в залежності від основних стадій ДР: НПДР та ПДР. \* – відмінність у порівнянні із значенням контрольної групи  $<0,05$

Однак, для розгляду механізмів патогенезу ми визначили доречним вивчити вміст протеїну у пацієнтів на різних стадіях ДР. Виявили, що максимальна експресія  $23,68 \pm 4,9$  пг/мл ET-1 спостерігалася у пацієнтів із Pre\_NPDR, тобто на самому початку захворювання, практично ще до виявлення ознак ретинопатії. У порівнянні з КГ це була надекспресія підвищення в 10 разів ( $p < 0,05$ ).

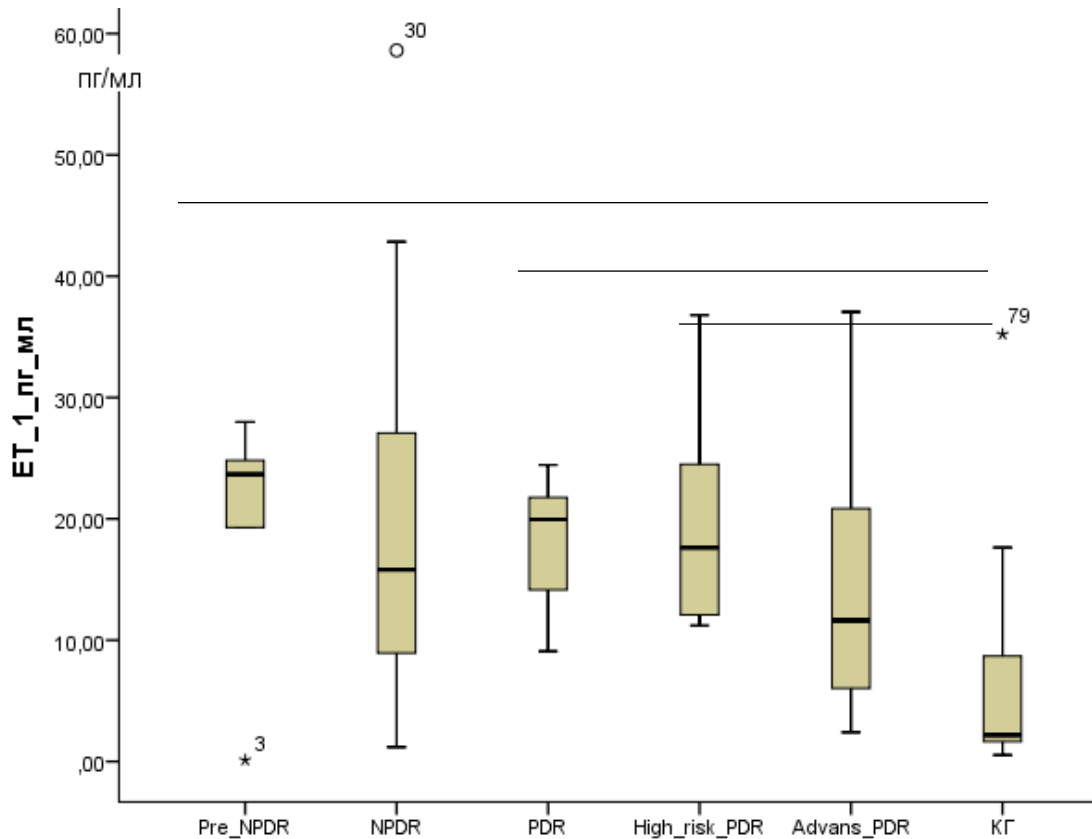
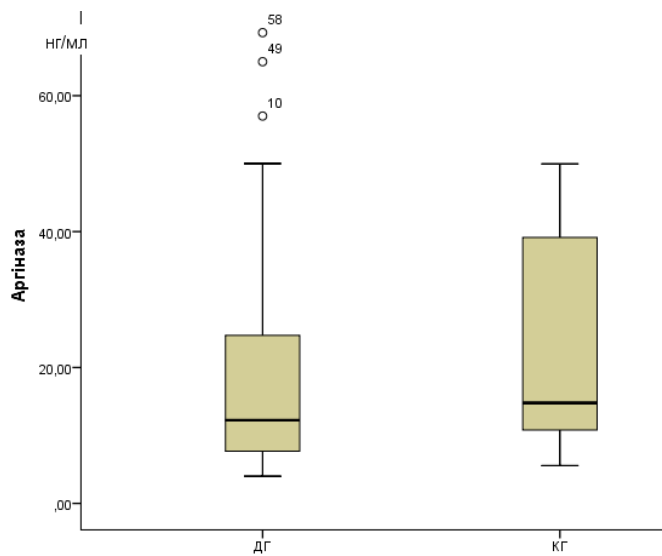


Рис. 4.2 Box-plot \_діаграма рівню ендотеліну-1 (пг/мл) в плазмі крові пацієнтів із різною стадією ДР та осіб контрольної групи (КГ).

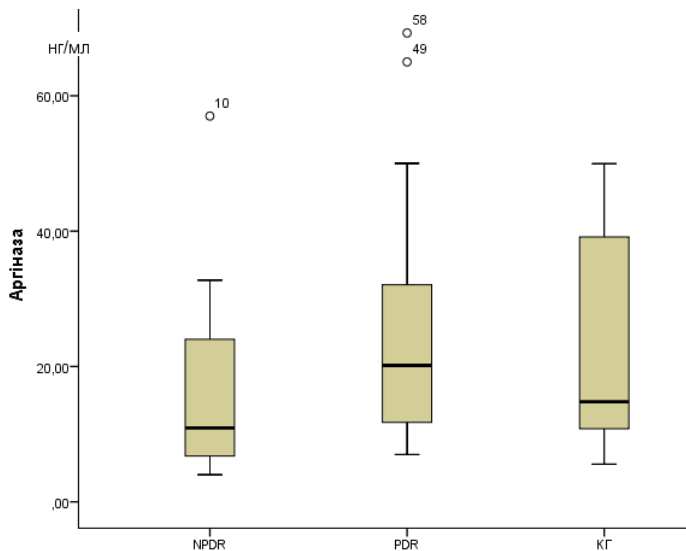
\* – відмінність від КГ ( $p < 0,05$ )

Навіть на наступній стадії ДР – непроліферативній – показник складав  $15,8 \pm 2,2$  пг/мл. У пацієнтів з ПДР вміст ET-1 був знову високий  $19,96 \pm 2,77$  пг/мл, але на стадії ПДР високого ризику та розвинутій ПДР вміст ET-1 був  $17,6 \pm 4,02$  пг/мл. Та  $11,63 \pm 4,1$  пг/мл. Тобто ми спостерігали певну адаптацію організму і показник згодом дещо зменшувався.

При порівнянні вмісту аргінази у пацієнтів з ДР та осіб КГ ми не виявили достовірної різниці (рис. 4.3, А). У хворих на ДР вміст метаболіту складав  $12,26 \pm 2,13$  нг/мл, а у здорових осіб  $14,8 \pm 3,09$  нг/мл. При цьому, в розрізі стадій ДР (рис. 4.3, Б) ми спостерігали суттєве підвищення в групі ПДР –  $20,1 \pm 1,47$  нг/мл. Вміст аргінази-1 в групі НДР був менше навіть ніж у контролі –  $10,9 \pm 2,06$  нг/мл. Тому, вивчення вмісту аргінази-1 у осіб з різною стадією ПДР було дуже актуальним (рис. 4.4).



А



Б

Рис. 4.3 Бокс-плот діаграма вмісту аргінази-1 (нг/мл) у плазмі крові досліджуваних осіб: А – порівняння ДГ та КГ, Б – в залежності від основних стадій ДР: НПДР та ПДР.

\* – відмінність у порівнянні із значенням контрольної групи  $<0,05$



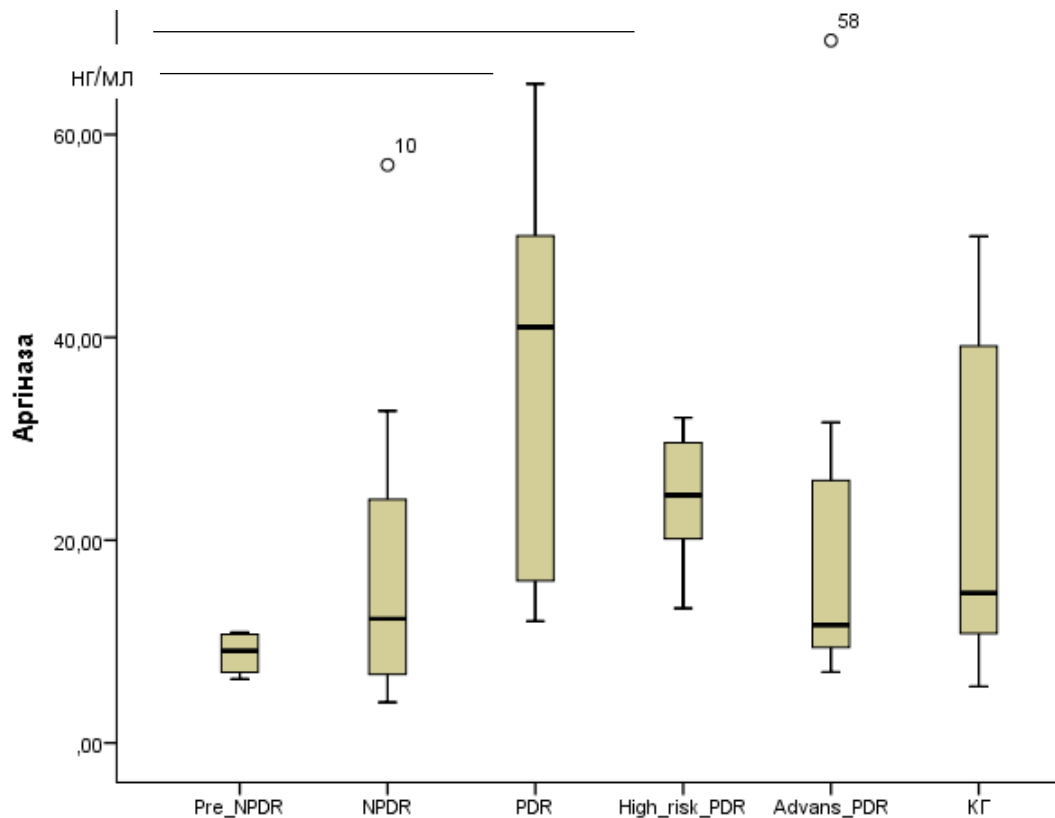


Рис. 4.4 Box-plot\_діаграма рівню аргінази-1 (нг/мл) в плазмі крові пацієнтів із різною стадією ДР та осіб контрольної групи (КГ).

\* – відмінність між групами ( $p < 0,05$ )

Ми виявили, що розвиток ДР не супроводжується критичним підвищенням аргінази-1. На стадії Pre\_NPDR у пацієнтів вміст ферменту був навіть менше, ніж у КГ і складав  $9,08 \pm 1,1$  нг/мл. Виникнення НПДР призводило до підвищення показника, але це було на рівні КГ –  $12,2 \pm 2,29$  нг/мл. Однак, максимальне значення – навіть надекспресію аргінази-1 до  $41,0 \pm 10$  нг/мл ми спостерігали на стадії ПДР. Тобто вміст ферменту був в 2,5 рази вище ніж у КГ, або у пацієнтів без ознак проліферації. Прогресування ПДР до стадії високого ризику, а також до розвинутої ПДР не супроводжувалося підвищенням аргінази-1, а навпаки, ми виявили зменшення вмісту до  $24,4 \pm 3,3$  нг/мл та  $11,63 \pm 7,4$  нг/мл. Отже, достовірну різницю ми виявили при порівнянні показника в групі ПДР із показником групи Pre\_NPDR, та між групою Pre\_NPDR і ПДР високого ризику.

Для вивчення асоціації вмісту ET-1 та Аргінази-1 із різними варіантами

поліморфізмів генів фолатного циклу ми досліджували вказані метаболіти у групах пацієнтів та КГ в залежності від генотипів генів *rs1801133*, *rs1805087*, *rs1801131*.

Вміст ЕТ-1 суттєво і достовірно розрізнявся в осіб із різними генотипами генів фолатного циклу, а також мав суттєві відмінності в осіб із однаковим генотипом але у групах пацієнтів та контрольній (рис. 4.5).

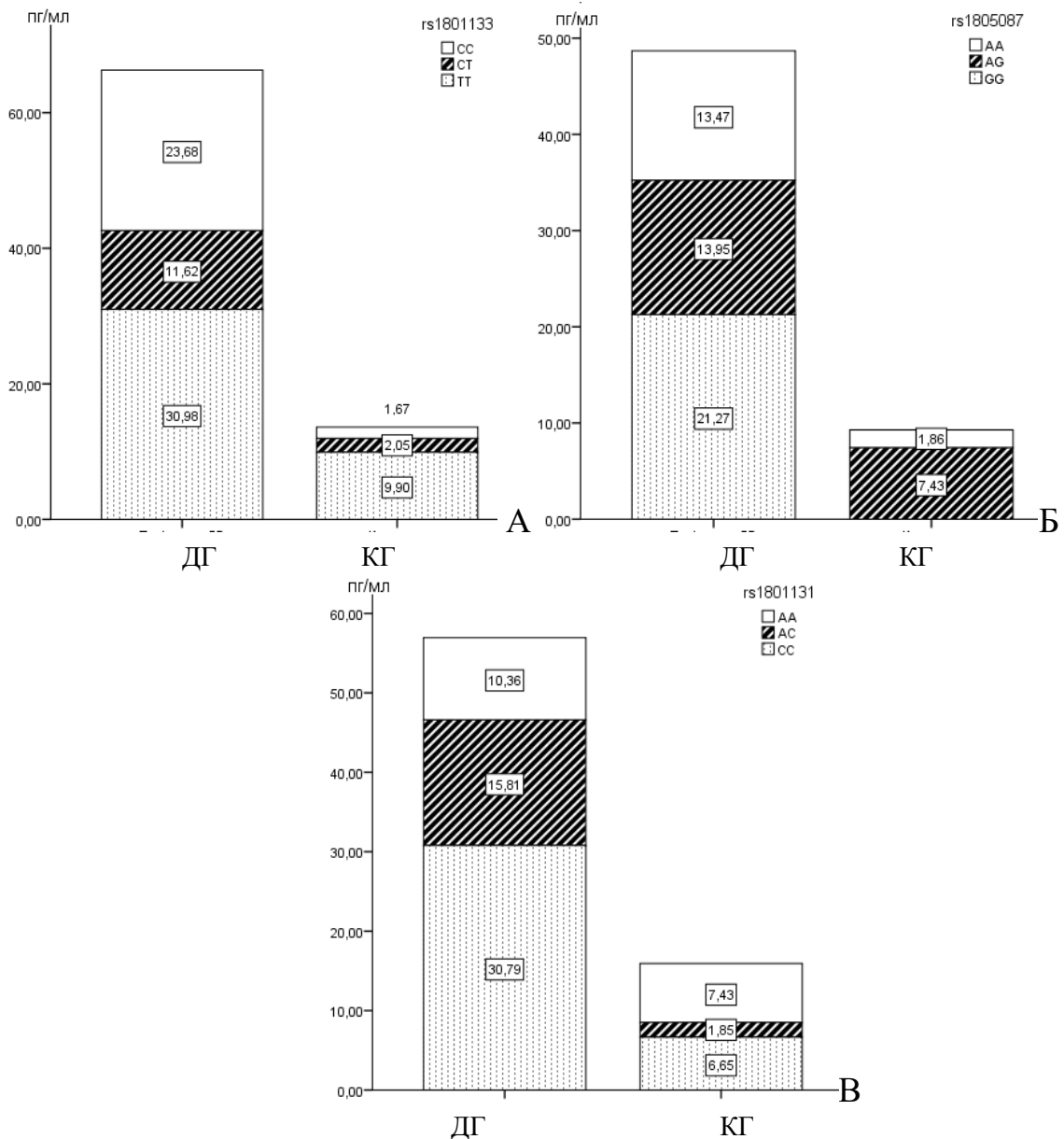


Рис. 4.5 Рівень ендотеліну-1 (пг/мл) в плазмі крові пацієнтів з ДР на тлі ЦД2 та осіб контрольної групи, вказаний відповідно до генотипів генів А – *rs1801133*, Б – *rs1805087*, В – *rs1801131*, що кодують ферменти фолатного циклу. Вказане значення медіани

Серед представників різних варіантів поліморфізму гену *MTHFR C677T (rs1801133)* максимальний вміст ЕТ-1 зустрічається у осіб із мінорним генотипом ТТ. В контрольній групі показник складав  $9,90 \pm 1,65$  пг/мл, що було в 5-6 разів ( $p < 0,05$ ) більше ніж у носіїв інших генотипів, СТ –  $2,05 \pm 0,6$  та СС –  $1,67 \pm 0,5$  пг/мл.

У групі пацієнтів представники цього генотипу ТТ також демонстрували найбільший вміст ЕТ-1, і він сягав  $30,98 \pm 2,36$  пг/мл. Достовірно показник розрізнявся із таким лише у носіїв гетерозиготного генотипу СТ, у яких він був менше у 2,6 рази ( $p < 0,05$ ) –  $11,62 \pm 2,2$  пг/мл. При порівнянні вмісту ЕТ-1 серед здорових осіб та пацієнтів ми виявили, що у осіб із найбільш розповсюдженим генотипом СТ показник розрізняється в 5 разів ( $p < 0,05$ ). У носіїв мінорного генотипу ТТ різниця вмісту ЕТ-1 була в 3 рази ( $p < 0,05$ ). У носіїв генотипу СС, який серед пацієнтів зустрічався майже у 2 рази частіше, вміст ЕТ-1 був у 14 разів вище ( $p < 0,05$ ).

Аналіз поліморфізмів гену *MTR A2756G (rs1805087)* показав, що мажорним є варіант АА генотипу, що зустрічався у 70% осіб. Серед пацієнтів, носіїв АА генотипу було 60%, але у 5% з'являвся мінорний варіант GG. Носіїв AG поліморфізму була однакова частка серед пацієнтів та здорових осіб. Вміст ЕТ-1 у здорових осіб суттєво розрізнявся в залежності від генотипу, і у носіїв AG був в 4 рази більше ніж у носіїв АА генотипу. У пацієнтів навпаки, не було різниці вмісту ЕТ-1 серед носіїв АА та AG генотипу, а у осіб із мінорним варіантом GG вміст ЕТ-1 був дуже високим і складав  $21,27 \pm 5,6$  пг/мл, що було в 1,5 рази більше ніж у представників інших генотипів цього гену. Різниця ЕТ-1 у пацієнтів та здорових осіб серед носіїв АА-генотипу складала 7 разів ( $p < 0,05$ ), серед носіїв AG генотипу 2 рази ( $p < 0,05$ ).

Аналіз поліморфізмів гену *MTHFR A1298C (rs1801131)* у порівнянні із вмістом ЕТ-1 виявив, що здорових представників мажорного гетерозиготного варіанту АС вміст ЕТ-1 був найменшим і складав  $1,85 \pm 0,21$  пг/мл, що 3,5-4 рази менше ніж у осіб із іншими варіантами гену: АА –  $7,43 \pm 2,03$  пг/мл та СС –  $6,65 \pm 0,25$  пг/мл.

Серед пацієнтів найменший рівень ЕТ-1 мали представники АА варіанту, він був  $10,36 \pm 1,23$  нг/мл. Це було в 1,5 рази менше ( $p < 0,05$ ) ніж у носіїв АС поліморфізму, та в 3 рази меншим ( $p < 0,05$ ) ніж у носіїв генотипу СС.

Між пацієнтами та здоровими особами виявили найменшу різницю у носіїв АА варіанту, яка складала 1,4 рази ( $p < 0,05$ ). У носіїв АС генотипу різниця складала 8 разів ( $p < 0,05$ ), у носіїв СС генотипу – 5 разів ( $p < 0,05$ ).

Далі ми провели аналогічне дослідження вмісту аргінази-1 в крові пацієнтів та КГ в залежності від поліморфізмів генів (рис. 4.6)

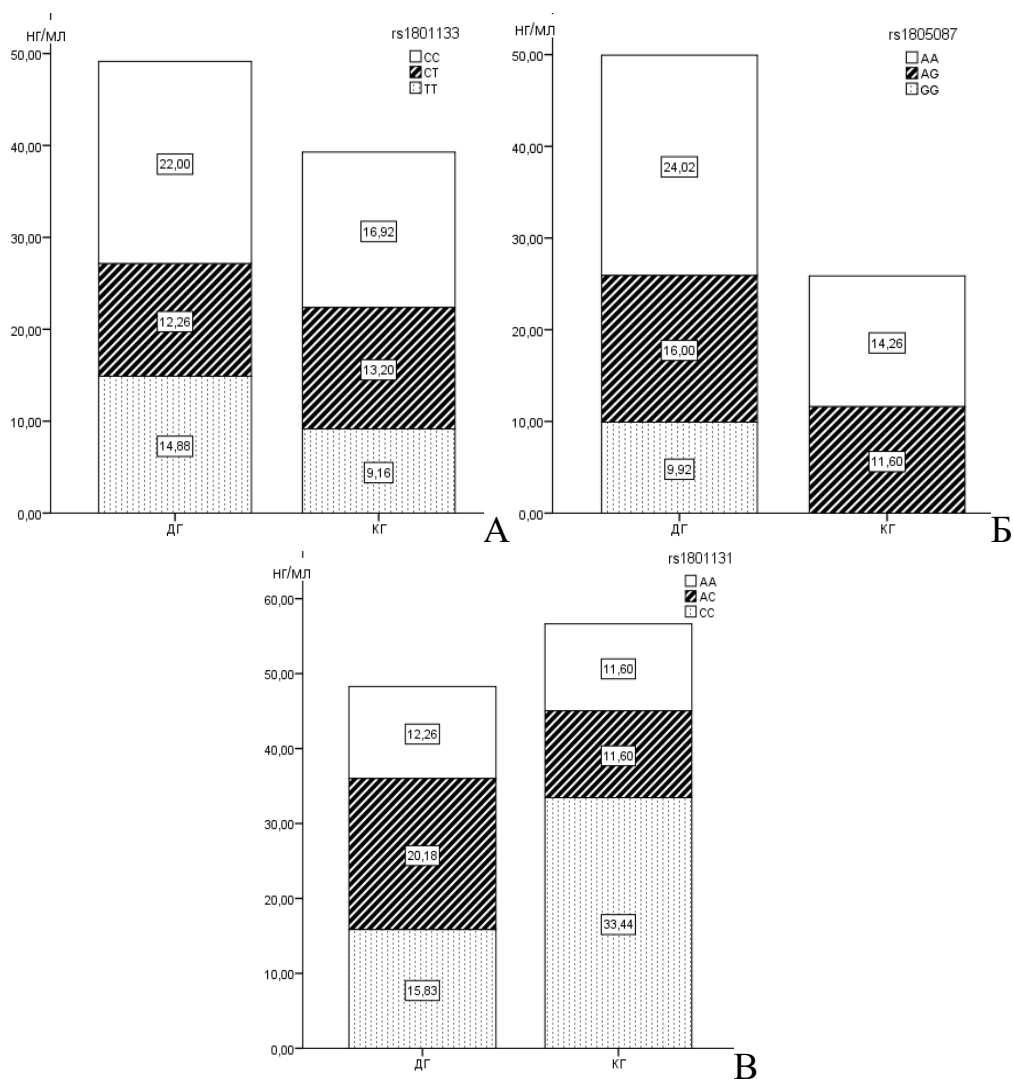


Рис. 4.6 Рівень аргінази-1 (нг/мл) в плазмі крові пацієнтів з ДР на тлі ЦД2 та осіб контрольної групи, вказаний відповідно до генотипів генів А – *rs1801133*, Б – *rs1805087*, В – *rs1801131*, що кодують ферменти фолатного циклу. Вказане значення медіани

Як ми виявили, максимальна кількість аргінази-1  $22,0 \pm 0,23$  нг/мл та  $16,92 \pm 3,4$  нг/мл, була притаманна носіям генотипу СС поліморфізмів гену *MTHFR C677T (rs1801133)*. Проте, враховуючи, що у пацієнтів, генотип СС був домінуючим, (як ми описали у розділі 3), а вміст аргінази-1 розцінюється як фактор що сприяє проліферації, то можна припустити, що генотип СС є фактором ризику розвитку проліферації за рахунок накопичення продуктів оксиду азоту і підвищення аргінази-1. Підвищення вмісту аргінази-1 у пацієнтів до  $14,8 \pm 2,5$  нг/мл у порівнянні із КГ  $9,16 \pm 1,5$  нг/мл у носіїв генотипу ТТ, не можна розглядати, як фактор ризику, оскільки серед пацієнтів з ДР носіїв генотипу ТТ було менше. Також для носіїв гетерогенного генотипу СТ ризик проліферації через накопичення аргінази-1 невисокий, оскільки ми виявили однаковий рівень ферменту в групах порівняння.

У пацієнтів ми виявили максимальну кількість аргінази  $24,02 \pm 3,6$  нг/мл у носіїв мажорного генотипу АА гену *MTR A2756G (rs1805087)*, що майже у 2 рази більше, ніж у осіб із таким генотипом серед здорових. Проте, за нашими даними, у носіїв ризик розвитку ДР був меншим. Генотип АG серед пацієнтів та здорових зустрічався майже однаково, тому незначне підвищення аргінази-1 у пацієнтів до  $16,0 \pm 2,3$  нг/мл у порівнянні із КГ  $11,6 \pm 3,6$  нг/мл навряд чи можна вважати фактором ризику.

За нашими даними, генотип GG гену *MTR A2756G* може розглядатися як фактор ризику. Однак, вміст аргінази у представників цього генотипу був невисокий і складав  $9,92 \pm 3,5$  нг/мл.

Аналіз аргінази-1 у носіїв поліморфних варіантів гену *MTHFR A1298C (rs1801131)* показав що максимальне значення ферменту ми виявили у носіїв генотипу СС в КГ  $33,4 \pm 3,2$  нг/мл. А у носіїв цього генотипу серед пацієнтів вміст ферменту був у 2 рази меншим –  $15,83 \pm 3,5$  нг/мл. Однак, попередні наші дані показали, що ризик виникнення ДР у носіїв генотипу СС є вище, хоча і не достовірно. Отже, ймовірно, механізми розвитку проліферації за рахунок оксидативно-нітрозативного стресу у пацієнтів з ЦД2, носіїв генотипу СС гену *MTHFR A1298C*, не є провідними. Проте максимальне значення аргінази ми

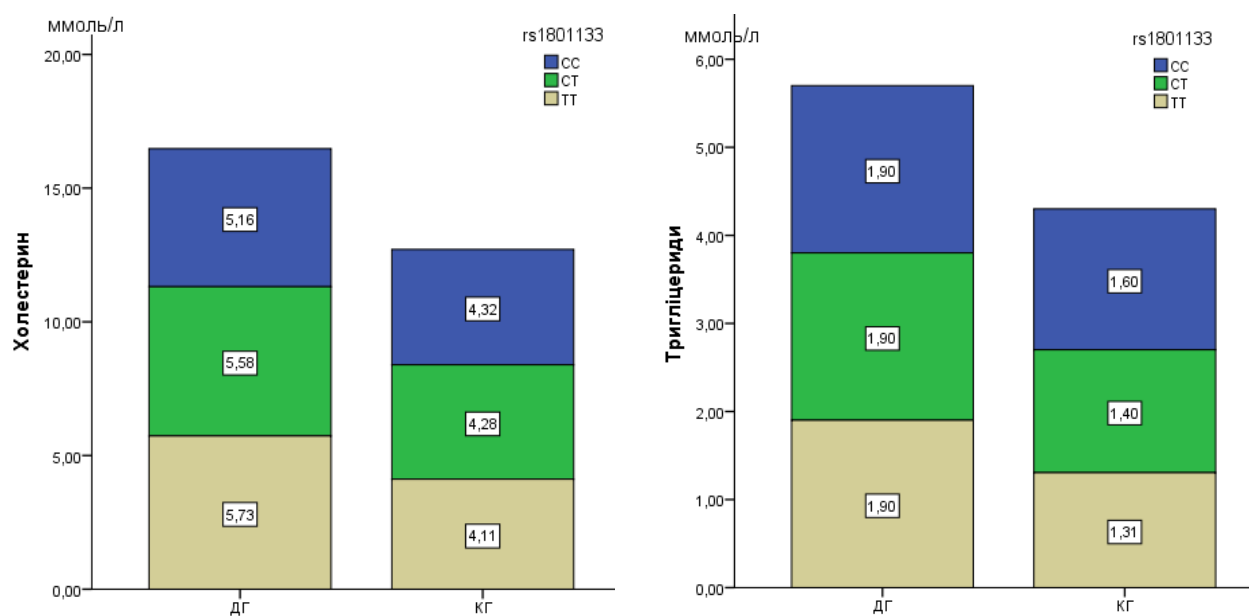
спостерігали у пацієнтів-носіїв поліморфізму АС. Однак, їх доля серед пацієнтів та осіб КГ майже однакова за нашими попередніми спостереженнями.

За нашими спостереженнями при даному обсязі дослідження можна зробити висновок, що механізми, які обумовлені накопиченням ЕТ-1 в крові більш пов'язані із генетичною гетерогенністю генів, що кодують ферменти фолатного циклу. Аргіназа-1, як метаболічний фермент, визначає певні механізми ушкодження сітківки і є результатом накопичення продуктів білкового обміну, що створюють загрозу розвитку гіпоксії, порушенню мікроциркуляції тощо, проте цей обмін в меншій мірі асоціюється із генетичним дефіцитом ферментів фолатного циклу.

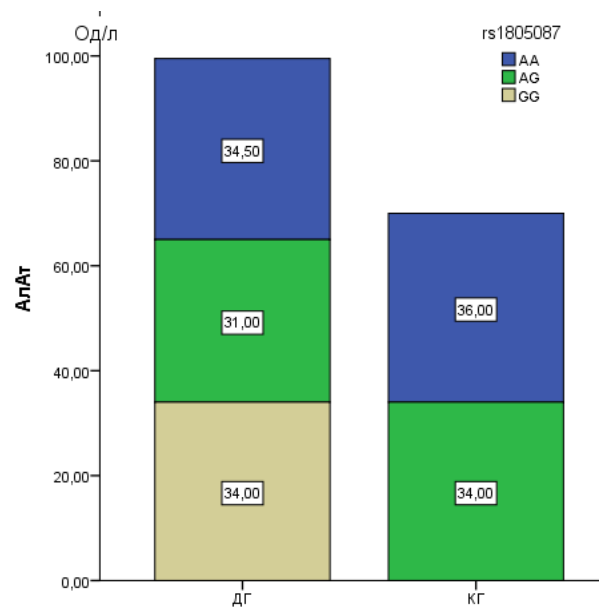
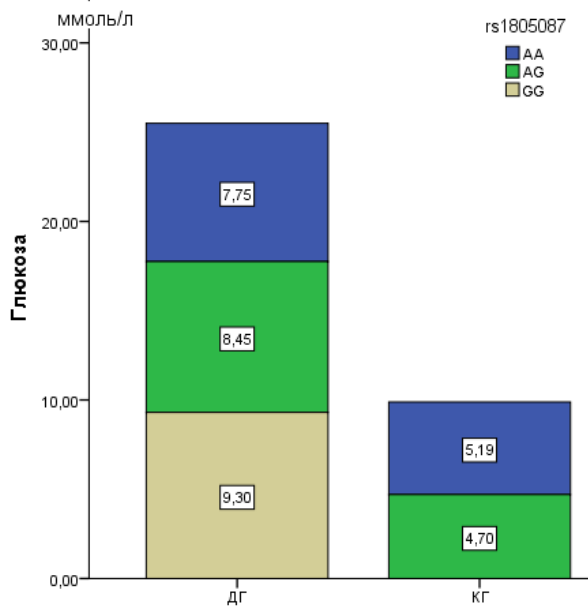
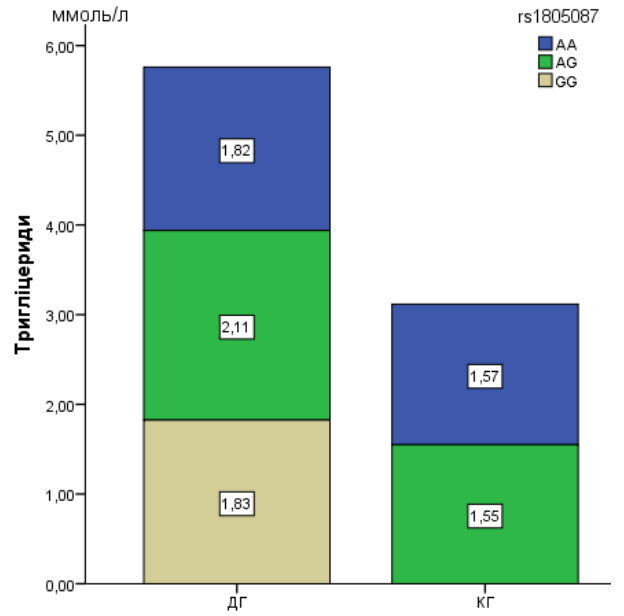
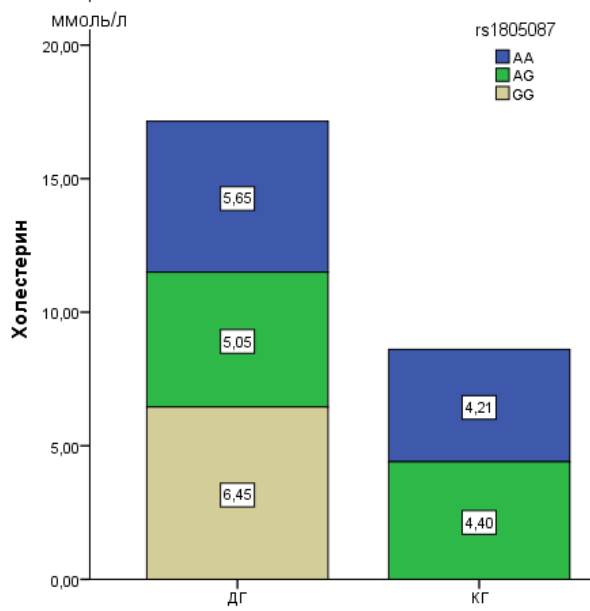
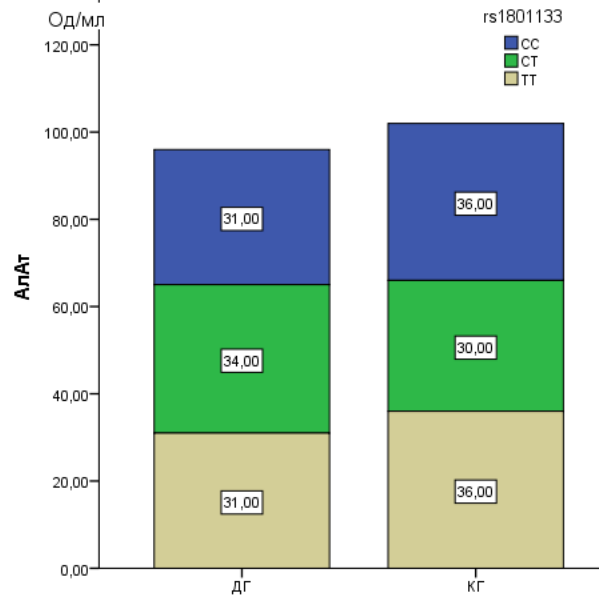
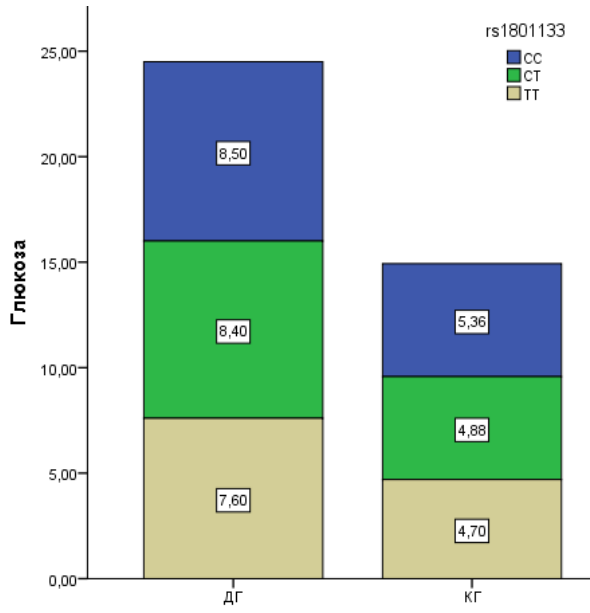
Таким чином, ми виявили що генетично детермінована регуляція фолатного циклу впливає на ЕТ-1, і не впливає на цикл обміну аргінази-1. Проте обидва метаболіти задіяні у механізмах ендотеліальної дисфункції.

Далі, для того, щоб з'ясувати специфічність виявлених раніш закономірностей і залежності зміни метаболітів від генетичної схильності організму регулювати фолатний цикл, ми вивчали зміни біохімічних показників ліпідного та вуглеводного обміну у осіб, що досліджували (рис. 4.7).

початок рис. 4.7



продовження рис. 4.7



продовження рис. 4.7

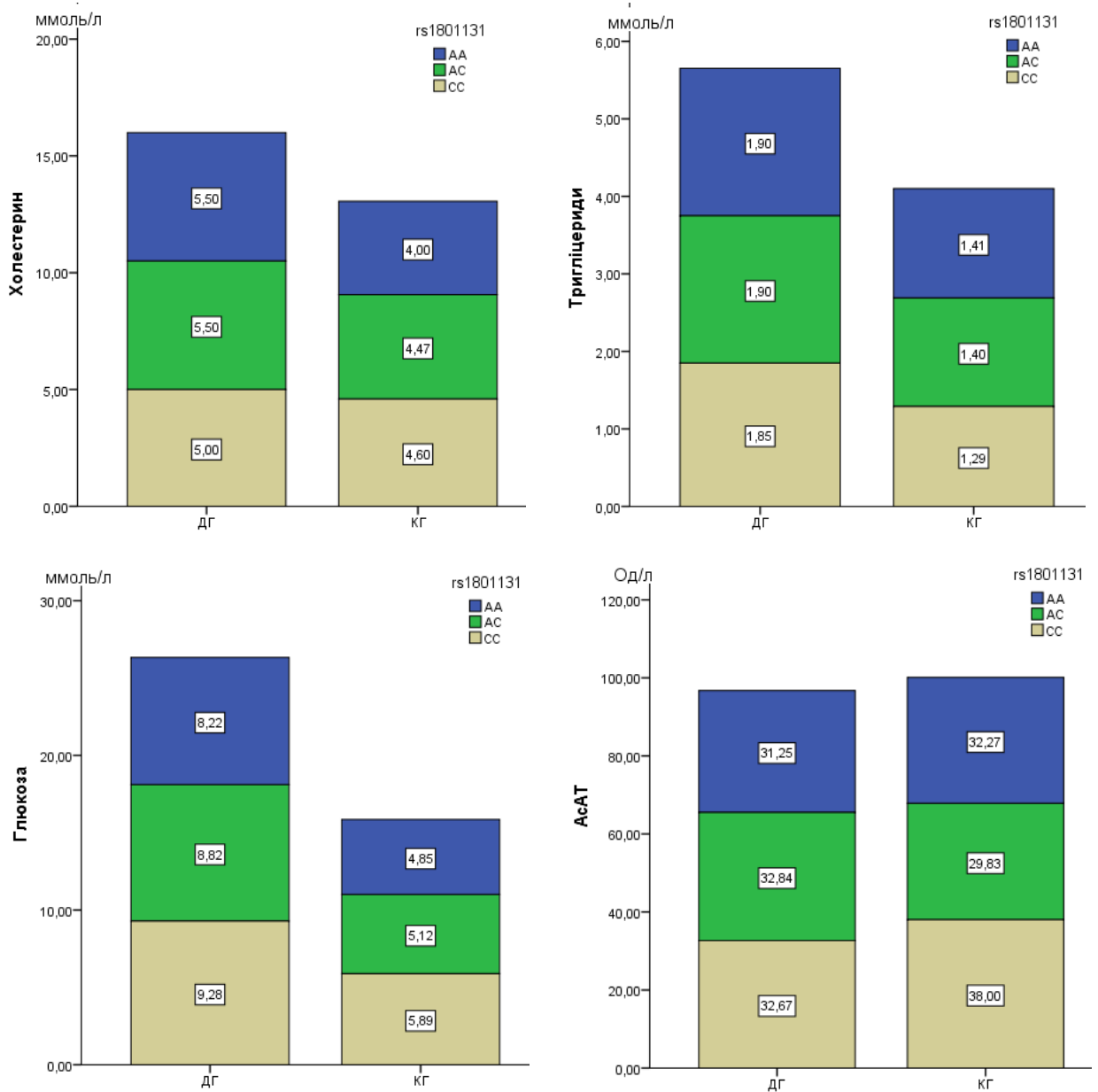


Рис. 4.7 Рівень біохімічних показників холестерину, тригліцеридів, глюкози, АсАТ, в сироватці крові пацієнтів з ДР на тлі ЦД2 та осіб контрольної групи, вказаний відповідно до генотипів генів *rs1801133*, *rs1805087*, *rs1801131*, що кодують ферменти фолатного циклу. Вказане значення медіани

При вивченні асоціацій основних біохімічних показників вуглеводного та ліпідного обмінів із поліморфними варіантами генів фолатного циклу ми не виявили асоціацій із різними генотипами генів та показниками глюкози, глікованого гемоглобіну, холестерину, ЛПНЩ, ЛПВЩ, тригліцеридів, АЛТ, АСТ.



Як ми і очікували у групах пацієнтів були вище показники тригліцеридів та холестерину, проте вони не відрізнялися достовірно від аналогічних показників КГ. Також важливо – що вони були у межах референтних значень. Навіть, коли ми виявили тенденцію до підвищення показнику загального холестерину у носіїв генотипу ТТ гену *rs1801133*, та GG гену *rs1805087*, ми не визначили це як фактор ризику, саме через те, що показник холестерину у осіб цієї вікової групи припускається до 7,5-7,85 ммоль/л.

Значення тригліцеридів також коливалося у незначних межах, і не мало достовірну різницю у пацієнтів та осіб КГ. Хоча деяке підвищення ми спостерігали у хворих.

Показник глюкози у пацієнтів був очікувано вище, і мав достовірну відмінність від аналогічного в групі здорових осіб. Суттєвого коливання глюкози крові у залежності від носійства поліморфізмів генів фолатного циклу ми не виявили. Однак, можна припустити, що носійство генотипу GG гену *rs1805087* є фактором ризику низької ефективності корекції глюкози. Оскільки, за нашими критеріями включення, усі пацієнти із ДР на тлі ЦД2 отримували традиційну терапію основного захворювання і спостерігалися у ендокринолога для контролю рівня глюкози. А цей генотип ми виявили лише в когорті пацієнтів.

Активність ферментів АлАТ, АсАТ, ГГТ ми оцінювали для вивчення зв'язку активності трансаміназ і степеню цитолізу гепатоцитів із спроможністю забезпечення фолатного обміну. За вказаними показниками ми не знайшли зв'язок ані із наявністю ДР, ані з генетичною схильністю забезпечити обмін фолатного циклу.

Отже, через те що стимулами для утворення і секреції ET-1 є гіпоксія, ангіотензин II (АТ II), тромбін, гіперхолестеринемія, ліпопротеїди низької щільності, гіперглікемія, кортизол [8]. Наша нульова гіпотеза полягала в тому, що генетично обумовлений дефіцит ферментів фолатного циклу призводить не лише до гіпергомоцистеїнемії, а й ряду біохімічних порушень, і підвищення ET-1. Вивчення асоціації вмісту ET-1 у осіб з поліморфізмами генів ферментів

фолатного циклу може визначити цей пептид не лише маркером ендотеліального запалення, а й підґрунтям персоніфікованого таргетного патогенетичного лікування ДР та її профілактики.

Враховуючи, що гетерозиготний поліморфізм СТ гену *MTHFR* (677C/T, *rs1801133*) є мажорним, який визначається в контролі у 58% осіб. Розвиток ДР супроводжувався перерозподілом носіїв генотипів: у пацієнтів ми спостерігали зменшення частки носіїв СТ і збільшення в 1,8 разів осіб із генотипом СС відносно контролю. Отже, ми припустили, що наявність поліморфізму СТ є фактором утримання розвитку ЦД2. А генотип СС можна розглядати як фактор ризику розвитку ДР. Отримані в наведеній роботі дані підтверджують це припущення, оскільки у носіїв СТ поліморфізму ми спостерігали найменший вміст ЕТ-1, а у носіїв генотипу СС розвиток ДР супроводжувався максимальним 14-ти кратним збільшенням ЕТ-1.

Мінорний генотип GG гену *MTR* A2756G (*rs1805087*) ми виявили лише у пацієнтів на ДР, але в них був максимальний вміст гомоцистеїну. У цих осіб зареєстрована надекспресія ЕТ-1, що також визначає вказаний генотип як можливий фактор ризику ДР.

Максимальний вміст гомоцистеїну ми виявили у носіїв поліморфізму АС гену *MTHFR* A1298C (*rs1801131*). В цих осіб також було 8-и кратне збільшення ЕТ-1 при розвитку ДР. Генотип АА визначили як протекторний, оскільки у пацієнтів він зустрічався в 1,3 рази рідше і вміст ЕТ-1 у цих осіб був найменшим і при розвитку ДР практично не змінювався. Проте мінорний генотип СС у пацієнтів зустрічався у двічі частіше, а вміст ЕТ-1 зростав в 5 разів.

#### **Резюме до розділу 4**

Отже, проведені спостереження у більшості підтвердили наші попередні припущення про можливу роль різних генотипів вказаних генів на розвиток ДР як через механізм накопичення гомоцистеїну, так і на вміст ЕТ-1, як важливих

факторів розвитку ДР на тлі ЦД2. Однак, висловлюватися про прямий зв'язок генотипів із вказаними ознаками фенотипу ми будемо із обережністю, через досить малу кількість та вибірку пацієнтів, що є суттєвим обмеженням. Вважаємо доцільним продовжити аналізувати можливі зв'язки факторів ризику ДР, оскільки це відкриває нові горизонти у поглядах на ланки патогенезу ретинопатії на тлі ЦД2.

Таким чином, потенційними факторами ризику розвитку ДР на тлі ЦД 2 можна вважати генотип СС гену *rs1801133*, генотип GG гену *rs1805087*, поліморфізм АС та генотип СС гену *rs1801131*.

Генотип СС гену *rs1801133* супроводжувався максимальним 14-ти кратним збільшенням ЕТ-1 у пацієнтів з ДР. Мінорний генотип GG гену *rs1805087* зустрічався тільки у пацієнтів з ДР, і характеризувався максимальним вмістом ЕТ-1. У носіїв поліморфізму АС гену *rs1801131* виявили 8-и кратне збільшення ЕТ-1 при розвитку ДР. Мінорний генотип СС цього гену у пацієнтів зустрічався у двічі частіше, і вміст ЕТ-1 із розвитком ДР зростав в 5 разів.

Можна вважати факторами утримання розвитку ДР наявність поліморфізму СТ гену *rs1801133* та генотипу АА *rs1801131*. Поліморфізм СТ гену *rs1801133* супроводжувався найменшим вмістом ЕТ-1. Генотип АА гену *rs1801131* зустрічався в 1,3 рази рідше, вміст ЕТ-1 у цих осіб був найменшим і при розвитку ДР практично не змінювався.

Аргіназа-1, як метаболічний фермент, визначає певні механізми ушкодження сітківки і є результатом накопичення продуктів білкового обміну, що створюють загрозу розвитку гіпоксії, порушенню мікроциркуляції тощо, проте цей обмін в меншій мірі асоціюється із генетичним дефіцитом ферментів фолатного циклу.

Ми не виявили асоціацій із різними генотипами вказаних генів та показниками глюкози, глікованого гемоглобіну, холестерину, ЛПНЩ, ЛПВЩ, тригліцеридів, АЛТ, АСТ у пацієнтів з ДР на тлі ЦД2.

**Матеріали даного розділу висвітлено у публікаціях:**

1. Прокопенко ЮВ, Риков СО, Натрус ЛВ. Вплив гомоцистеїнемії на прогресування діабетичної ретинопатії у пацієнтів на цукровий діабет 2 типу із різними варіантами поліморфізмів генів фолатного циклу. В: Promising ways of improving science and scientific solutions: Abstracts of XXV International Scientific and Practical Conference, Warsaw, Poland (June 26 – 28, 2023). Warsaw, Poland; 2023, с. 101-102. Доступно з: <https://eu-conf.com/wp-content/uploads/2023/05/promising-ways-of-improving-science-and-scientific-solutions.pdf>.

## РОЗДІЛ 5

### АСОЦІАЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ ФЕРМЕНТІВ ФОЛАТНОГО ЦИКЛУ ІЗ ВМІСТОМ ВІТАМІНІВ ГРУПИ В У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ДР НА ТЛІ ЦД2

Фолієва кислота і вітаміни групи В надходять до організму з їжею, особливо з фруктами та овочами. Дефіцит вітамінів групи В і фолієвої кислоти зазвичай пов'язаний з високим рівнем циркулюючого гомоцистеїну. Дослідники вивчають різні напрямки дієти, які б сприяли підвищенню рівню фолатів та вітамінів. Також рекомендації клініцистів спрямовані на замісну фармакотерапію дефіциту фолатів. Однак, не має достатньо даних про те, що призначення препарату фолієвої кислоти, а також вітамінів цієї групи пацієнтам із ЦД2 ефективно знижує у них рівень гомоцистеїну. Водночас є дані про тісну асоціацію біохімічних порушень у вигляді гіпергомоцистеїнемії, дефіциту вітамінів В12, В6, фолієвої кислоти, вітаміну D3, гіперкреатинінемії, підвищення сироваткової концентрації лактатдегідрогенази та креатинфосфокінази із патогенними поліморфними замінами нуклеотидів в генах ензимів фолатного циклу.

В нашій роботі ми провели вивчення вивчити асоціацій поліморфізмів генів, що кодують ферменти фолатного циклу *MTHFR C677T (rs1801133)*; *MTHFR A1298C (rs1801131)*; *MTR A2756G (rs1805087)* із вмістом в плазмі крові вітамінів групи В.

Аналіз вмісту вітамінів групи В у крові досліджуваних осіб виявив достовірне зниження у пацієнтів із ДР/ЦД2 фолатів в 1,4 рази ( $p < 0,05$ ), вітаміну В12 у 1,6 разів ( $p < 0,05$ ), вітаміну В6 в 1,6 разів ( $p < 0,05$ ) відносно відповідних показників КГ. Значення вказаних показників наведені в табл. 5.1, де також вказані значення в групах пацієнтів, які розрізнялися за ступенем ушкодження сітківки від дуже м'якої НПДР до розвинутої ПДР. Як видно із таблиці, практично за усіма показниками ми спостерігали тенденцію збільшення

дефіциту вітамінів по мірі погіршення стану і розвитку ДР. Аналіз показників фолатів в крові пацієнтів показав зниження на 30% ( $p < 0,05$ ) в групі ПДР високого ризику, і на 36% ( $p < 0,05$ ) в групі розвинутої ПДР у порівнянні із КГ. Вміст вітаміну В12 був достовірно зменшеним у порівнянні із контролем в усіх групах пацієнтів. За даними вмісту вітаміну В6, достовірні відмінності на 50% ( $p < 0,05$ ) спостерігали в групі дуже м'якої НПДР.

Таблиця 5.1

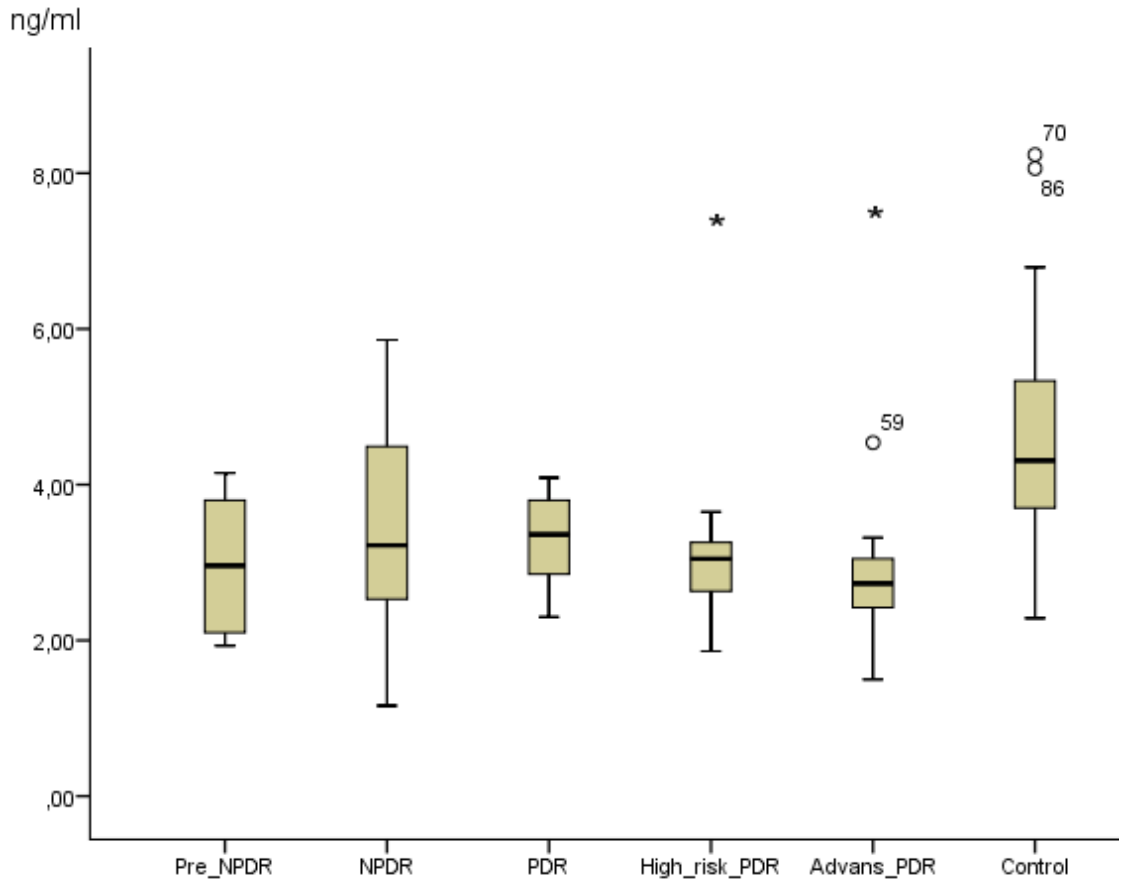
**Порівняння вмісту вітамінів групи В у плазмі крові досліджуваних осіб,  
( $Me \pm \sigma$ )**

Група дослідження	Фолати, нг/мл	Вітамін В12, нг/мл	Вітамін В6, нг/мл
Контрольна група n = 35	4,3±1,51	186,5±20,91	28,5±5,36
Усі пацієнти з ДР/ЦД2 n = 83	3,03±1,18*	119,0±64,69*	19,0±7,96*
Серед них, в залежності від ступеню ретинопатії:			
Pre_NPDR (дуже м'яка НПДР), n = 12	3,17±0,89	136,1±22,7*	14,04±2,96*
NPDR (помірно важка НПДР), n = 21	3,22±1,24	126,0±73,1*	20,0±8,51
PDR (ПДР), n = 18	3,36±0,72	109,38±16,36*	19,7±1,41*
High_risk_PDR (Високого ризику ПДР), n = 12	3,05±0,61*	108,61±22,25*	19,37±10,83
Advans_PDR (Розвинена ПДР), n = 20	2,73±0,82*	101,0±20,38*	19,0±7,32

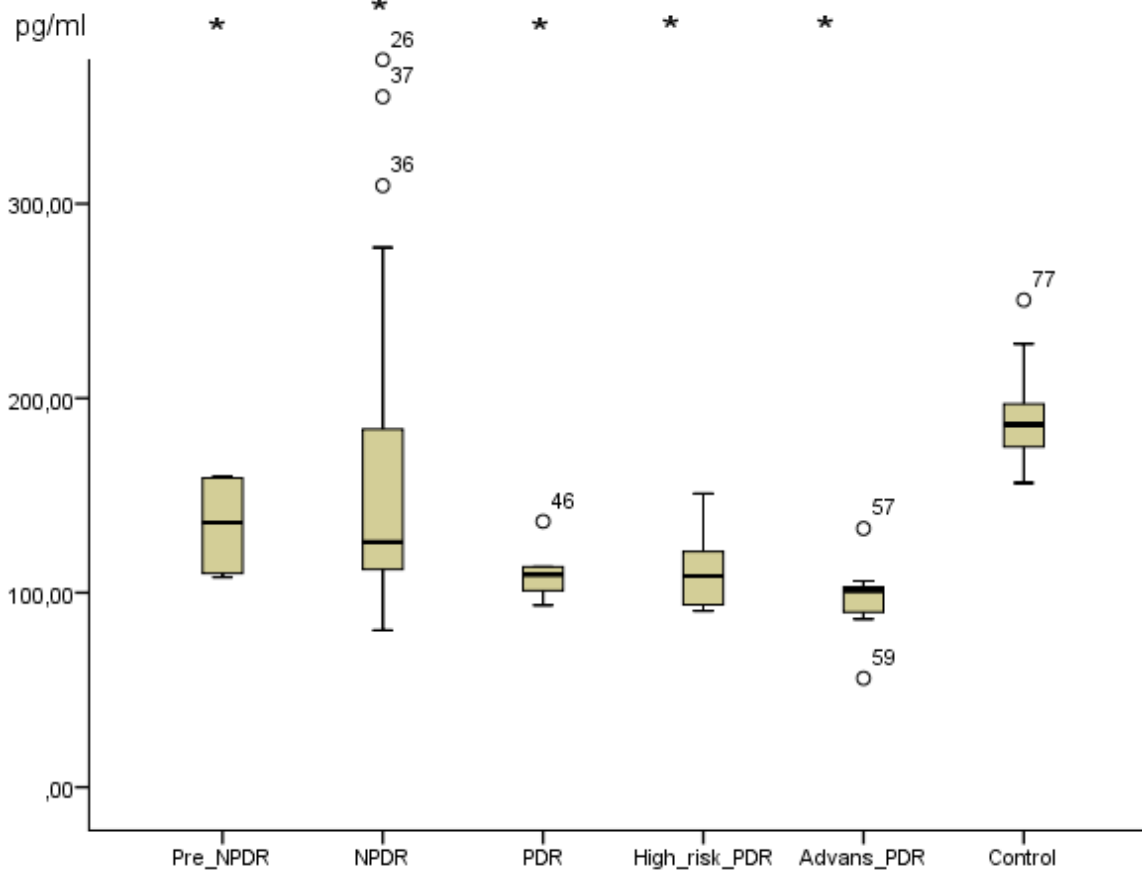
Примітка: \* – відмінність у порівнянні із значенням контрольної групи  $< 0,05$ .

Слід зазначити, що варіаційний ряд в кожній групі мав високу дисперсію, особливо в групі НПДР, що наочно відображають діаграми (рис. 5.1).

початок рис. 5.1



A



Б

продовження рис. 5.1

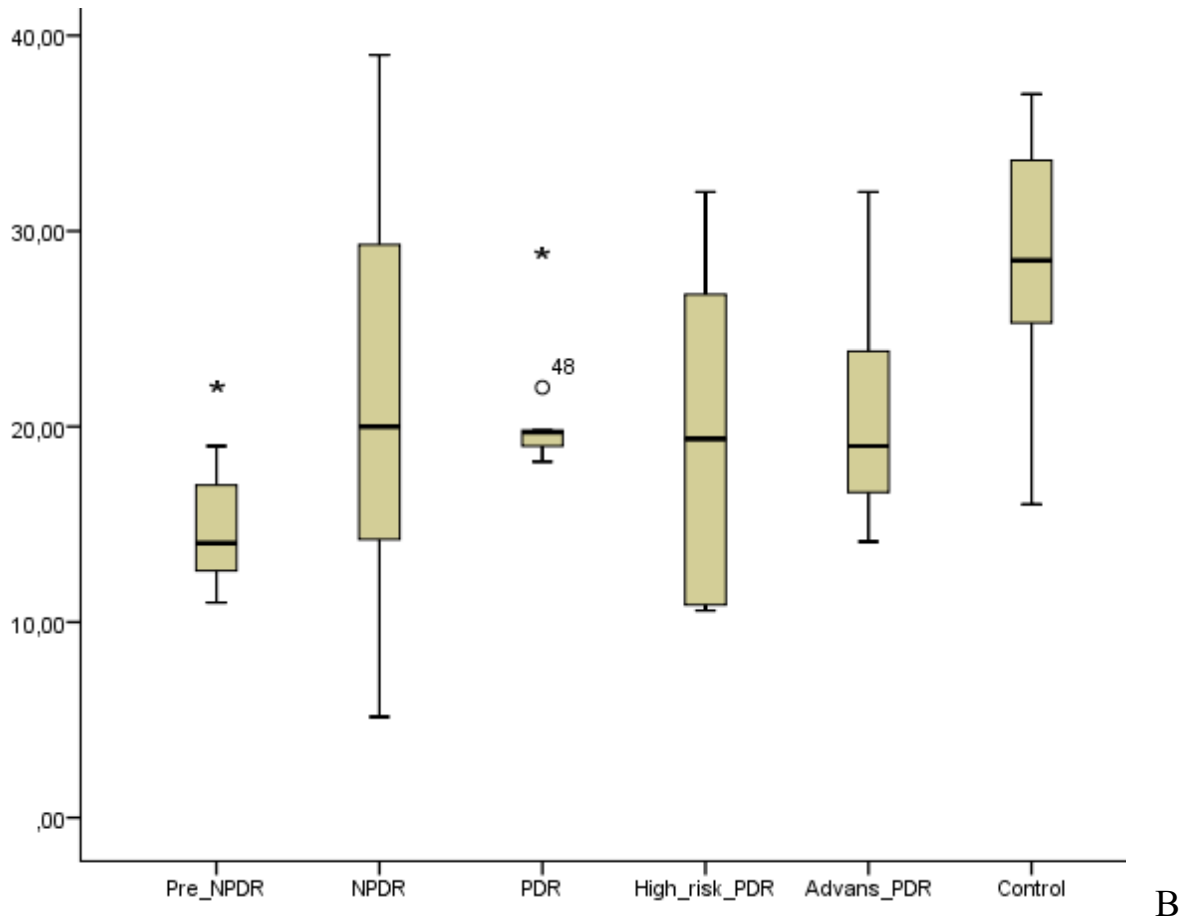


Рис. 5.1 Вох-plot-діаграми дисперсії значень вмісту вітамінів групи В у плазмі крові осіб досліджуваних груп: А- фолатів, Б – вітаміну В12, В – вітаміну В6. Розподіл груп хворих з ДР/ЦД2 за стадіями ретинопатії Pre\_NPDR – дуже м'яка НПДР, NPDR – помірно важка НПДР, PDR – ПДР High\_risk\_PDR – високого ризику ПДР, та Advans\_PDR – розвинена ПДР. Control – група контролю. \* – відмінність у порівнянні із значенням контрольної групи  $<0,05$

Отже, на тлі ЦД2 у пацієнтів із ретинопатією виявлений дефіцит вітамінів групи В. Вміст фолатів більшою мірою знижувався на більш тяжких стадіях захворювання і розвитку ПДР. Зменшення вмісту вітаміну В12 виникало на усіх стадіях захворювання, а В6 достовірно зменшувалося вже на початкових стадіях ретинопатії [10].

Розуміння того, що саме генетично детермінований дефіцит основних ферментів фолатного циклу може бути тісно пов'язаний із вмістом вітамінів



групи В, ми вивчали асоціації різних генотипів генів фолатного циклу із вмістом вказаних речовин у пацієнтів із НПДР, ПДР у порівнянні з контрольною групою (рис. 5.2).

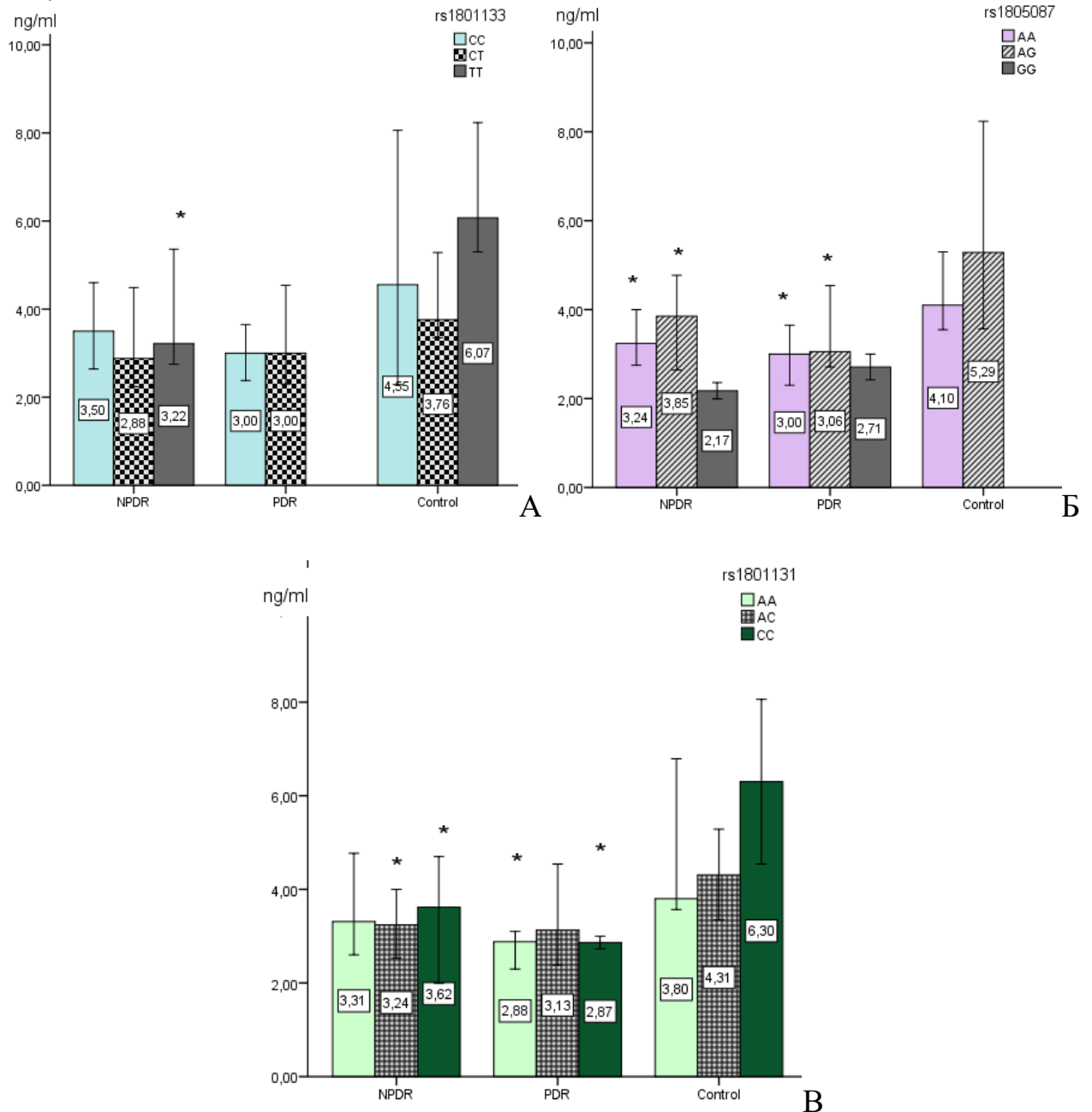


Рис. 5.2 Рівень фолатів (нг/мл) в плазмі крові пацієнтів з НПДР/NPDR, ПДР/PDR на тлі ЦД2 та осіб контрольної групи (Control) відповідно до генотипів генів А – *rs1801133*, Б – *rs1805087*, В – *rs1801131*, що кодують ферменти фолатного циклу. Значення медіани та ДІ 95%.

\* – відмінність від КГ ( $p < 0,05$ )

Для носіїв максимально розповсюдженого гетерогенного генотипу СТ гену *rs1801133* у яких розвивалася ДР на тлі ЦД2 було притаманно незначне зниження фолатів крові на 20% (рис. 5.2, А). У носіїв генотипу СС, якій в групі пацієнтів зустрічався частіше, ніж в КГ, рівень фолатів був нижче контролю на 20% на стадії НПДР і на 30% при прогресуванні ДР. Суттєва відмінність спостерігалася у носіїв генотипу ТТ, яких в 2 рази було менше в групі хворих. У здорових носіїв генотипу ТТ спостерігався найвищий рівень фолатів  $6,07 \pm 1,75$  нг/мл, а на стадії НПДР був нижче в 2 рази ( $p < 0,05$ ). Отже, виникнення ДР/ЦД2 у носіїв генотипу ТТ виникає в 2 рази рідше і супроводжується достовірним зниженням фолатів кров [10]і.

У носіїв мажорного генотипу АА гену *rs1805087* рівень фолатів крові достовірно знижувався на 20-26% ( $p < 0,05$ ) у групі пацієнтів. Аналогічна картина спостерігалася у носіїв гетерогенного генотипу АG, у яких в КГ рівень фолатів був максимальним  $5,29 \pm 2,8$  нг/мл і достовірно знижувався у пацієнтів. Серед хворих на ДР/ЦД2 зустрічалися носії генотипу GG, у яких ми виявили дефіцит фолатів в крові  $2,17 \pm 0,3$  та  $2,71 \pm 0,6$  нг/мл на тлі розвитку ретинопатії.

У пацієнтів носіїв найпоширеніших генотипів гену *rs1801131* АА та АС ми виявили зниження фолатів в крові на 25% ( $p < 0,05$ ) та 27% при прогресуванні ретинопатії. Для носіїв рідкого генотипу СС було характерним максимальне значення фолатів у крові здорових осіб  $6,3 \pm 1,7$  нг/мл. Із розвитком ретинопатії вміст фолатів знижувався у 1,7-2,3 рази ( $p < 0,05$ ) [10].

Вміст фолатів в крові досліджуваних осіб розрізнявся у залежності від генотипу і був максимальним у здорових носіїв генотипу ТТ гену *rs1801133*, носіїв генотипу АG гену *rs1805087* та носіїв генотипу СС гену *rs1801131*, у яких медіана в групі перевищувала значення у популяції в 1,4-1,5 рази [10].

За нашими даними (рис. 5.3), вміст вітаміну В12 у здорових осіб не залежав від генотипу основних генів ферментів фолатного циклу. Розвиток ретинопатії супроводжувався поступовим зниженням вітаміну В12 у пацієнтів в групах НПДР та ПДР: у носіїв генотипу СС гену *rs1801133* на 27% ( $p < 0,05$ ) і 45% ( $p < 0,05$ ), у носіїв генотипу СТ на 30% ( $p < 0,05$ ), на 50% ( $p < 0,05$ ), у носіїв

генотипу ТТ на 42% ( $p < 0,05$ ). У носіїв генотипів АА гену *rs1805087* вміст вітаміну В12 аналогічно знижувався у пацієнтів на 25% та 45% ( $p < 0,05$ ) та у носіїв генотипу АГ на 32% ( $p < 0,05$ ) і 50% ( $p < 0,05$ ). У пацієнтів був виявлений генотип GG із практично однаковим вмістом вітаміну В12 в плазмі пацієнтів, меншим у 1,3 рази ніж середній в КГ [10].

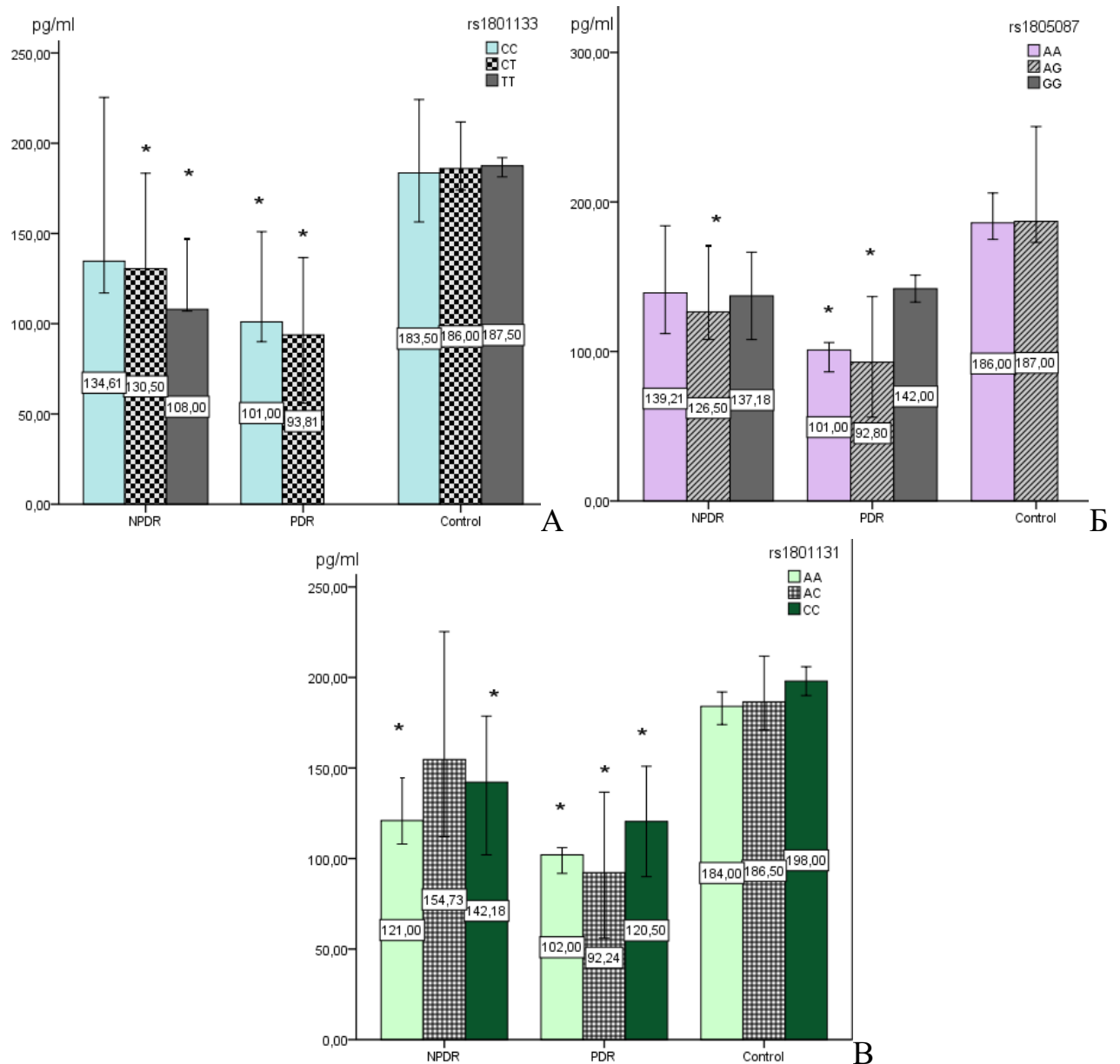


Рис. 5.3 Рівень вітаміну В12 (пг/мл) в плазмі крові пацієнтів з НПДР/NPDR, ПДР/PDR на тлі ЦД2 та осіб контрольної групи (Control) відповідно до генотипів генів А – *rs1801133*, Б – *rs1805087*, В – *rs1801131*, що кодують ферменти фолатного циклу. Значення медіани та ДІ 95%.

\* – відмінність від КГ ( $p < 0,05$ )

Рівень вітаміну В12 в плазмі осіб КГ також не залежав від поліморфізмів гену *rs1801131*. У пацієнтів носіїв генотипу АА гену *rs1801131* при розвитку ретинопатії дефіцит вітаміну складав 34% ( $p<0,05$ ) та 44% ( $p<0,05$ ). У носіїв генотипу АС зменшення у пацієнтів із НПДР складало 17%, що було найменшим, а у пацієнтів із ПДР 50% ( $p<0,05$ ). У носіїв генотипу СС зменшення складало 28% ( $p<0,05$ ) та 40% ( $p<0,05$ ).

Отже, найбільший дефіцит вітаміну В12 спостерігали у носіїв генотипу СТ гену *rs1801133*, генотипу АG гену *rs1805087* у яких на тлі ПДР вміст вітаміну зменшувався в 50%, а найбільш протективним виявився генотип АС гену *rs1801131* де зниження вітаміну на тлі розвитку ДР складало 17%.

Вміст вітаміну В6 був максимальним у носіїв генотипу ТТ гену *rs1801133*, що у 1,2 рази більше середнього значення в групі здорових осіб (рис. 5.4). Розвиток НПДР супроводжувалося зниженням на 38%. У носіїв СС та СТ спостерігали недостовірне зниження вмісту В6 в плазмі крові у середньому на 27-30% [10].

У здорових носіїв генотипу АА гену *rs1805087* спостерігали рівень вітаміну В6 більше, ніж середній в КГ. Розвиток ДР супроводжувався зниженням вітаміну В6 на 37%. У носіїв генотипу АG зниження вмісту вітаміну на стадії НПДР складало 1,8 разів ( $p=0,056$ ), прогресування до ПДР знижувало на 27% відносно КГ. У носіїв GG, серед яких були лише пацієнти, ми виявили неочікуваним високий рівень вітаміну В6, якій дорівнював середнім значенням КГ.

Вміст вітаміну В6 розрізнявся у здорових осіб в залежності від поліморфізмів гену *rs1801131*: найбільшим він був у носіїв генотипу АА і на тлі розвитку ретинопатії знижувався на 36% не залежно від стадії. Аналогічно знижувався рівень вітаміну у носіїв генотипу АС на 30% відносно значень КГ. А у носіїв генотипу СС зниження вітаміну спостерігали при розвитку НПДР в 1,8 разів, водночас у пацієнтів з ПДР концентрація вітаміну дорівнювала значенню КГ.

Ми розуміємо, що наші дослідження в цьому напрямку мають певні обмеження, оскільки за рахунок значної дисперсії значень вказані відмінності не були підтверджені статистичними критеріями. Тому ми можемо говорити

лише про тенденції зміни, а для підтвердження спостережень необхідно збільшувати групи осіб із різними варіантами поліморфізмів вказаних генів.

Однак, ми виявили, що вміст вітамінів групи В у крові досліджуваних осіб має значні коливання в залежності від поліморфізмів генів, які кодують ферменти фолатного циклу.

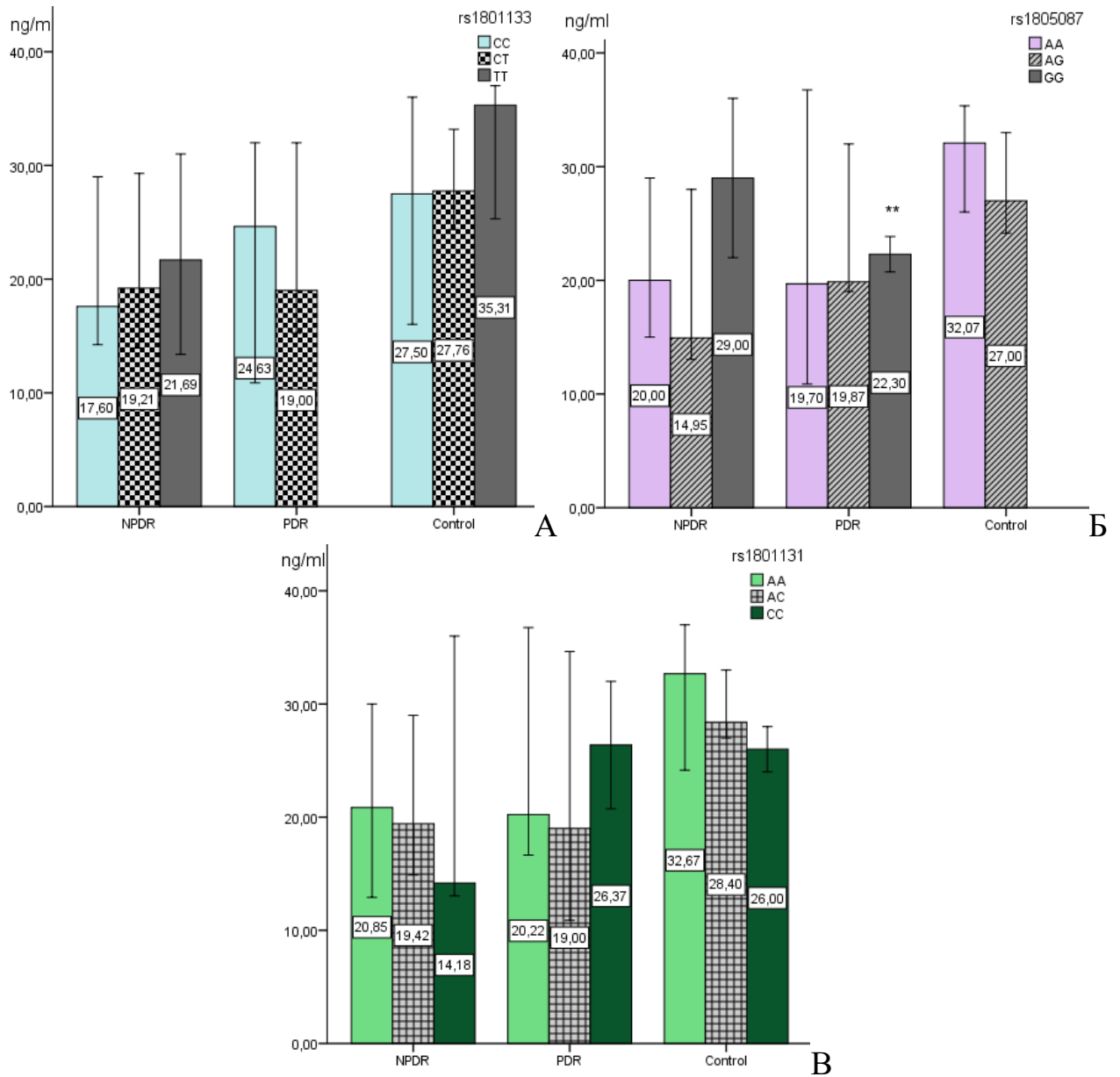


Рис. 5.4 Рівень вітаміну В6 (нг/мл) в плазмі крові пацієнтів з НПДР/NPDR, ПДР/PDR на тлі ЦД2 та осіб контрольної групи (Control) відповідно до генотипів генів А – *rs1801133*, Б – *rs1805087*, В – *rs1801131*, що кодують ферменти фолатного циклу. Значення медіани та ДІ 95%. \* – відмінність від КГ ( $p < 0,05$ ). \*\* – відмінність у порівнянні між групами НПДР та ПДР  $p < 0,05$

Відмінності спостерігаються як правило і в групі здорових осіб, хоча вказана варіабельність знаходиться в популяційних референтних межах. Розвиток ЦД2, як і виникнення судинних ускладнень у вигляді ДР із різним ступенем пошкодження сітківки, супроводжується дефіцитом вказаних вітамінів.

Таким чином, з нашими даними, у крові пацієнтів із ДР/ЦД2 достовірно знижується вміст фолатів в 1,4 рази ( $p < 0,05$ ), вітаміну В12 у 1,6 разів ( $p < 0,05$ ), вітаміну В6 в 1,6 разів ( $p < 0,05$ ) відносно відповідних показників здорових осіб. Це співпадає із даними Malaguarnera G. та співав. (2014, 2015), які також виявили значний дефіцит фолієвої кислоти у плазмі крові та в еритроцитах у пацієнтів з ПДР та НПДР на тлі діабету у порівнянні зі здоровими особами та пацієнтами з діабетом без ретинопатії [89, 90].

У більшості спостережень ми виявили пряму залежність дефіциту вітамінів із прогресуванням стадії ретинопатії, що може пояснювати погіршення загального стану пацієнтів, біохімічних, метаболічних реакцій, в яких беруть участь вказані вітаміни із процесами в сітківці та мікросудинах. Але в ряді випадків ми виявили різні ступені недостатності вітамінів плазми в залежності від поліморфізмів. Враховуючи дуже широку розповсюдженість варіацій вказаних генів, вивчення ступеню дефіциту вітамінів із стадією ретинопатії може бути корисним як для розуміння патогенетичних ланцюгів пошкодження сітківки на тлі генетичного дефіциту ферментів фолатного циклу, так і для розуміння ефективного ведення пацієнтів із ДР/ЦД2 та варіантів терапевтичної тактики. Як відомо дефіцит вітамінів та ферментів, які задіяні у метаболізмі фолієвої кислоти в організмі визначають порушення багатьох процесів, починаючи із дисбалансу імунологічної ланки, специфічного та неспецифічного антибактеріального захисту, схильності до інфекцій, та розвитку нейрозапалення низького ступеню тощо.

З'являється все більше даних про підвищення загального циркулюючого гомоцистеїну, який індукує підвищення проліферації клітин, що може призвести до виснаження фолієвої кислоти та інактивації реметилювання.

Гальмування репарації ДНК зазвичай призводить до підвищеної частоти мутацій та хромосомної нестабільності, що може ініціювати та прискорювати проліферативний процес. Високий рівень гомоцистеїну в плазмі є токсичним для ендотелію за рахунок утворення вільних радикалів і викликає ушкодження судин. Основними патогенетичними механізмами є активація тромбоцитів та окислювальна модифікація ліпопротеїнів низької щільності.

Дослідження потенційного зв'язку між мікросудинними змінами, що виникають при діабетичній ретинопатії, і дефіцитом фолієвої кислоти може бути корисним як предиктор ретинопатії. ДР на ранніх стадіях може не виявлятися клінічними проявами та скаргами. Але контроль цих ускладнень залежить від належного лікування та моніторингу стану сітківки та рівня глюкози в крові після раннього виявлення ретинопатії.

Отже, за нашими даними, вміст фолатів в крові досліджуваних осіб розрізнявся у залежності від генотипу і був максимальним у здорових носіїв генотипу ТТ гену *rs1801133*, носіїв генотипу АГ гену *rs1805087* та носіїв генотипу СС гену *rs1801131*, у яких медіана в групі перевищувала значення у популяції в 1,4-1,5 рази.

Найбільший дефіцит вітаміну В12 спостерігали у носіїв генотипу СТ гену *rs1801133*, генотипу АГ гену *rs1805087* у яких на тлі ПДР вміст вітаміну зменшувався в 50%. Найбільш протективним виявився генотип АС гену *rs1801131* де зниження вітаміну В12 складало 17%.

Вміст вітаміну В6 розрізнявся у здорових осіб в залежності від поліморфізмів гену *rs1801131*: найбільшим він був у носіїв генотипу АА і на тлі розвитку ретинопатії знижувався на 36% не залежно від стадії. Аналогічно знижувався рівень вітаміну В6 у носіїв генотипу АС на 30% відносно КГ, а у носіїв генотипу СС при розвитку НПДР спостерігали зниження вітаміну В6 в 1,8 разів.

## **Резюме до розділу 5**

Таким чином, фолатний статус може відігравати роль у розвитку та прогресуванні діабетичної ретинопатії. Розуміння та характеристика епігенетичних регуляторів та їх ролі в патогенезі діабетичної ретинопатії надає підставу визначити нові мішені для боротьби з захворюванням, яке є основною причиною сліпоти у дорослих.

### **Матеріали даного розділу висвітлено у публікаціях:**

1. Риков СО, Прокопенко ЮВ. Вміст ендотеліну-1 в плазмі крові пацієнтів з діабетичною ретинопатією на тлі цукрового діабету 2 типу в залежності від поліморфних варіантів генів MTHFR, MTRR і MTR. Медична наука України. 2023;19(3):37-47. doi: <https://doi.org/10.32345/2664-4738.3.2023.06>. [10]



## РОЗДІЛ 6

### АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Доцільність вивчення асоціації поліморфізмів основних генів фолатного циклу MTHFR (англ., functional methylenetetrahydrofolate reductase) C677T, MTHFR A1298C, MTR (англ., methionine synthase) A2756G, як потенційних тригерних механізмів гіпергомоцистеїнемії є дуже обґрунтованою. Перш за все через високу поширеність цих поліморфізмів в популяції населення, вважається що кожний третій мешканець планети має поліморфні варіанти цих генів. Багато клінічних досліджень доводять що саме генетично детермінований дефіцит ферментів фолатного циклу є причиною багатьох метаболічних (точніше обмінних) зсувів та змін біохімічних реакцій. Дуже активно вивчається віддзеркалення дефіциту ферментів на стані нервової системи і розвитку захворювань, в основі яких лежить низько інтенсивне запалення нервової тканини, зокрема мозкових структур, це хвороба Альцгеймера, Паркінсона, розсіяний склероз тощо. Провідне місце у таких дослідженнях має розгляд впливу недостатності ферментів на стан мозку дитини і виникнення ознак аутизму. Багато робіт присвячено опису комплексу змін, асоційованих із поліморфізмом генів і комплексом симптомів, що притаманні дитині із розладами аутичного спектру [50, 51, 59, 65, 91, 92, 93].

Підсумовуючі ці роботи можна виділити декілька провідних механізмів, які включаються при розвитку патогенних впливів недостатності ферментів фолатного циклу. Оскільки фолатний цикл функціонує у нерозривній єдності з іншими біохімічними циклами, такими як цикл метіоніну, редокс-система, пуриновий обмін, цикл жирних кислот та шлях метаболізму, пов'язаний з 4-тетрагідронеоптерином, тому порушення в суміжних біохімічних процесах можуть призводити до подібних клінічних наслідків.

Отже і головним є метаболічний шлях ушкоджень, який заснований на надлишковому накопиченні гомоцистеїну в крові, що стає згодом тригером

оксидативного стресу. Вільні радикали вражають перш за все нервову тканину. І сітківка в цьому колі уражень також є однією із перших.

Високі рівні гомоцистеїну є доволі небезпечним фактором і призводить до розвитку ендотеліальної дисфункції, мікросудинних ускладнень, (ретинопатію, нефропатію, кардіоміопатію та нейропатію), оскільки гомоцистеїн викликає порушення структури ендотеліальних клітин, гематоенцефалічного бар'єру, призводить до ішемії та неоваскуляризації сітківки, підвищення рівня фактора росту ендотелію судин (VEGF), активацію стресу ендоплазматичного ретикулуму та окисного стресу [128]. Сьогодні гомоцистеїн розглядається як маркер ушкодження сітківки і потенціальна мішень для терапії ДР [128].

Другим шляхом, який включається в патогенетичні прояви є підсилення мутацій генів, які виникають у ході метилування ДНК. Цей процес виникає ймовірно у ході генорегуляторного опосередкованого аномальною дерепресією інших патогенних мутацій/поліморфізмів в геномі. Таким чином, наступні мутації замикають хибне коло ушкоджень ДНК. І таким чином, система ушкоджень мала б повністю знищити продуктивні до транскрипції ділянки геному. Проте, носійство поліморфізмів генів фолатного циклу, хоча і носить ушкоджуючий характер, проте не призводить до повної загибелі нейронів. Скоріш за все ряд механізмів носять адаптаційний характер, а деякі взагалі мають проєктивну роль. Такі взаємовідносини між реалізацією поліморфізмів і виникненням захворювань спонукають вчених вивчати не лише асоціації генетичних варіацій із захворюванням, а й асоціації із певними медіаторами, метаболітами, регуляторними протеїнами, лігандами, рецепторами тощо, які напряду або опосередковано причетні до різних патогенетичних або адаптивних станів.

Так, за результатами наших спостережень, не виявлений зв'язок поліморфізмів основних генів *rs1801133*, *rs1805087*, *rs1801131*, що кодують ферменти фолатного циклу із розвитком ДР на тлі ЦД2 у порівнянні із особами без діабету. За нашими даними в КГ переважають особи із поліморфізмом гену *MTHFR C677T (rs1801133)* і гетерогенним генотипом СТ (58%), доля носіїв

генотипу СС складає 25%, а ТТ – 17%. В групі пацієнтів зберігається перевага носіїв гетерогенного генотипу СТ (49%), але їх частина зменшена відносно КГ за рахунок збільшення осіб із генотипом СС (45%), і суттєво зменшена доля носіїв генотипу ТТ – 6%. У осіб КГ зустрічався лише мажорний генотип гену *MTR A2756G (rs1805087)* – АА у 70%, та у 30% гетерогенний генотип АГ. Для пацієнтів також було притаманне переважання генотипу АА (60%), 35% осіб мали генотип АГ, але у 5% хворих на ДР/ЦД2 був виявлений генотип GG. У осіб КГ переважним генотипом гену *MTHFR A1298C (rs1801131)* є гетерогенний генотип АС, який мають 50% осіб. Генотип АА зустрічався у 45% осіб, а генотип СС у 5%. У пацієнтів розподіл був схожий, і переважали особи із генотипом АС (53%). Генотип АА спостерігали у 34% хворих на ДР і 13% мали генотип СС.

Варто підкреслити, що відсутність прямого зв'язку генетично детермінованого дефіциту ферментів фолатного циклу із ризиком розвитку ДР, яку ми не виявили в нашому спостереженні не говорить про обмеження, наприклад, через незначну вибірку із генеральної сукупності. Оскільки є багато крупних за кількістю пацієнтів досліджень, які також не виявили кореляції із виникненням ДР, проте вони не приходять до висновку, що генетичний дефіцит ферментів і ушкоджуюча дія гіпергомоцистеїну та оксидативного стресу на сітківку відсутні [148].

На даний момент опубліковано три мета-аналізи щодо поліморфізму *MTHFR C677T* і ризику ДР [88, 106, 161]. І усі висновки та результати були непереконливими і суперечливими. Обмеження в цих трьох мета-аналізах показали, що необхідні подальші дослідження з більшою популяцією та більш ретельний дизайн. Окремі дослідження можуть дати різні результати через регіональні та індивідуальні відмінності серед популяцій, а також через обмежену кількість випадків у кожному дослідженні. Унікальний спосіб життя різних етнічних груп може по-різному взаємодіяти з певними генетичними рисами [75].

Мета-аналіз Ху WH зі співавт. (2020) включав вісім досліджень із 600

випадками ДР, 363 здоровими особами контролю та 646 контрольними особами НДР. Результати цього аналізу показали позитивний зв'язок між поліморфізмом *MTHFR C677T* і ризиком ДР у загальних аналізах пацієнтів з ДР порівняно зі здоровими особами контролю або контрольною групою НДР. Щоб контролювати вплив географічного походження на ці результати, автори провели аналіз підгруп щодо географічних територій; і продемонстрували позитивний зв'язок між поліморфізмом *MTHFR C677T* і ризиком розвитку ДР у пацієнтів у різних регіонах порівняно зі здоровими особами контролю або контрольною групою НДР. Автори все ж таки роблять висновок про те, що дослідження виявило позитивний зв'язок між поліморфізмом *MTHFR C677T* і ризиком DR серед китайського населення. Однак через деякі обмеження в цьому мета-аналізі необхідні подальші дослідження з різними екологічними фонами для подальшого вивчення впливу ген-ген і ген-середовище на поліморфізм *MTHFR C677T* і ризик ДР [148].

У якості подальших обмежень називають розмір вибірки, аналіз підгруп, наприклад ті, що стосуються віку, тривалості впливу або звички куріння, через обмежені дані в оригінальних документах, низку факторів, як екологічних, так і генетичних, які також варто враховувати через їх значущість на розвиток такого поліетіологічного ускладнення як ДР [45].

Отже, не зважаючи на те, що ми не виявили асоціації генетично детермінованого дефіциту ферментів фолатного циклу із ризиком розвитку ДР на тлі ЦД, нашим наступним кроком було вивчення рівню L-гомоцистеїну – можна вважати доволі суттєвим маркером розвитку мікросудинних ускладнень ЦД2, зокрема ДР, а також тривалості основного захворювання.

Відсутність достовірної різниці між групами НПДР та ПДР щодо середньої тривалості діабету та прогресуванням ретинопатії в даному дослідженні дає підставу шукати інші механізми, які призводять до підвищення ступеню ушкодження сітківки. Отже, більш детальний аналіз залежності тривалості ЦД2 та генетичного дефіциту фолатного циклу показав, що у носіїв найбільш розповсюджених генотипів CC та CT (а вірогідно алелі C) гену *rs1801133*

тривалість ЦД2 є важливим фактором прогресування ретинопатії, оскільки середня тривалість діабету достовірно розрівнялася у хворих із НПДР та ПДР. Також тривалість ЦД2 впливала на прогресування ретинопатії у пацієнтів із генотипом АG гену *rs1805087*, і генотипом АА гену *rs1801131*, у яких достовірно відрізнявся в 1,5 рази ( $p < 0,05$ ) та в 1,7 разів ( $p < 0,05$ ) відповідно середній термін основного захворювання в групах із НПДР та ПДР і прогресування ретинопатії спостерігалось на тлі більшої тривалості ЦД2. У носіїв інших генотипів генів *rs1801133*, *rs1805087*, *rs1801131*, що визначають дефіцит ферментів фолатного циклу спостерігалася тенденція прогресування ретинопатії із збільшенням тривалості ЦД2, але цей фактор не був провідним у патогенезі прогресування ускладнення.

Отже, аналіз розподілу генотипів та алелей основних генів *rs1801133*, *rs1805087*, *rs1801131*, що кодують ферменти фолатного циклу в наших групах пацієнтів на ДР/ЦД2 показав, що для гену *MTHFR* (677C/T, *rs1801133*) мажорним є гетерозиготний поліморфізм СТ, який визначається в контролі у 58% осіб. Розвиток ДР супроводжувався іншим співвідношенням: в контингенті пацієнтів спостерігали зменшення частки носіїв СТ і збільшення осіб із генотипом СС. Частка осіб із генотипом СС в КГ була в 1,8 разів менше ніж серед пацієнтів. Можна припустити, що наявність генотипу СТ є фактором утримання розвитку ЦД2. Також ми показали, що у носіїв найбільш розповсюджених генотипів СС та СТ (а вірогідно алелі С) гену *rs1801133* більш важливим фактором прогресування ретинопатії є тривалість ЦД2.

Для обговорення ми наводимо результати, щодо гену *MTHFR* (677C/T). В роботі Raza Raza ST зі співавт. (2012) із залученням 175 осіб населення Північної Індії, у тому числі 87 хворих на ЦД2 та 88 осіб контролю не виявлено зв'язку гена *MTHFR* з випадками ЦД2, оскільки отримані частоти генотипу СС, СТ, ТТ становили 40%, 43% і 17% у випадках цукрового діабету 2 типу і 56%, 29% і 15% у здорових осіб контролю відповідно. OR для СС становило 0,54 (95% ДІ 0,29-0,98,  $P=0,041$ ), для СТ 1,76 (95% ДІ 0,94-3,30,  $P=0,07$ ), і для ТТ 1,2 (95% ДІ 0,53-2,70,  $P=0,66$ ) [112]. Автори пропонують продовжити подальше

дослідження з більшими групами, але вважають рекомендувати, СС генотип розглядати у якості маркером для раннього виявлення групи ризику ЦД2 [112].

Дослідження Niu W, Qi Y (2012), що вивчали зв'язок поліморфізму цього гена з ДР шляхом проведення мета-аналізу, який підсумовував загалом дані 1599 осіб, що були наведені у 8 дослідженнях присвячених діабетичній ретинопатії. Результати демонструють, що генотип гена *MTHFR 677TT* може надавати помірно підвищений ризик діабетичної ретинопатії в західних азіатів та африканців. Носійство генотипу *677TT* за показником (відношення шансів [OR] встановило в 1,86 (95% ДІ: 1,21–2,86; P= 0,004) рази більше шансів у пацієнтів з ЦД2 на розвиток ретинопатії, ніж відсутності цього ускладнення [106]. Аналогічна думка і у дослідників із Китаю [148].

За нашими спостереженням частка носіїв генотипу ТТ в КГ була більше в 2,8 разів ніж серед пацієнтів і шанс розвитку ДР у них був невисоким. Але, ми зауважували на те, що наші дані мають суттєві обмеження, щоб висловлюватися про популяційне носійство генотипів, які асоційовані із розвитком ДР, через дуже малу кількість спостережень.

Аналіз генотипів гену *MTR 2756A/G (rs1805087)* показав, що мажорним є гомозиготний генотип АА, який зустрічався у 70% осіб КГ та 60% пацієнтів. У носіїв генотипу АГ провідним фактором прогресування ДР була тривалість ЦД2. Гомозиготний генотип GG у осіб КГ взагалі не був виявлений, і зустрічався лише у пацієнтів, що можна вважати фактором ризику розвитку ДР. Саме із цим генотипом ми зв'язали неочікувану знахідку – достовірне підвищення в 1,3 рази L-гомоцистеїну на стадії НПДР у порівнянні із носіями інших генотипів, що відносно рівню КГ було вище в 2,4 рази.

Аналіз гену *MTHFR 1298 A/C (rs1801131)* показав, що половині усіх осіб що досліджували (КГ та пацієнтів), був притаманний гетерозиготний генотип АС, який не був пов'язаний із з розвитком захворювання. Для носіїв гомозиготного генотипу АА важливим фактором прогресування ДР виявили тривалість ЦД2. Мінорний генотип СС був в 2,6 рази більше поширений у пацієнтів, ніж в КГ і з ним також було асоційоване на стадії НПДР підвищення

в 1,4 рази рівню L-гомоцистеїну у порівнянні із носіями інших генотипів, і гіпергомоцистеїнемія в 3 рази вища ніж в КГ.

Таким чином, ми довели, що у носіїв мінорних гомозиготних генотипів: GG гену *MTR 2756A/G* і генотипу CC гену *MTHFR 1298 A/C* виявлене суттєве підвищення рівня гомоцистеїну в крові на початку розвитку ДР, що потребує подальшого з'ясування ролі гіпергомоцистеїнемії як чинника прогресування ускладнення, або маркера ступеню ушкодження тканин. У носіїв найбільш розповсюджених генотипів CC та CT гену *rs1801133* генотипу AG гену *rs1805087*, і генотипу AA гену *rs1801131* більш важливим фактором прогресування ретинопатії є тривалість ЦД2.

Знижена активність ферменту MTHFR призводить до підвищення рівня гомоцистеїну в плазмі крові та зниження рівня фолієвої кислоти [31, 136]. За даними дослідників особи з поліморфізмом *C677T* в гені *MTHFR* порівняно з поліморфізмом *A1298C*, мали більше зниження активності *MTHFR* і нижчі рівні фолієвої кислоти в плазмі і підвищення рівня гомоцистеїну в плазмі [142, 143].

Результати Mottaghi T зі співавт (2019), щодо впливу добавок фолієвої кислоти на рівні гомоцистеїну, фолієвої кислоти в сироватці крові і зміна нервової провідності може бути наслідком впливу поліморфізму *MTHFR*, який може змінити відповідь на прийом фолієвої кислоти [102]. Автори також оцінили вплив добавок фолієвої кислоти на основі розподілу генотипу поліморфізму *MTHFR C677T*. Рівні фолієвої кислоти та гомоцистеїну в сироватці мали істотну різницю між поліморфізмом *MTHFR C677T*. На додаток до ефекту добавки фолієвої кислоти, генотип пацієнтів з поліморфізмом *MTHFR C677T* може бути ефективним щодо варіацій нервової провідності.

За нашими даними, найбільший дефіцит вітаміну B12 спостерігали у носіїв генотипу CT гену *rs1801133*, генотипу AG гену *rs1805087* у яких на тлі ПДР вміст вітаміну зменшувався в 50%, а найбільш протективним виявився генотип AC гену *rs1801131* де зниження вітаміну на тлі розвитку ДР складало 17%.

Однак, ми виявили, що вміст вітамінів групи B у крові досліджуваних осіб має значні коливання в залежності від поліморфізмів генів, які кодують

ферменти фолатного циклу. Відмінності спостерігаються як правило і в групі здорових осіб, хоча вказана варіабельність знаходиться в популяційних референтних межах. Розвиток ЦД2, як і виникнення судинних ускладнень у вигляді ДР із різним ступенем пошкодження сітківки, супроводжується дефіцитом вказаних вітамінів

Таким чином, з нашими даними, у крові пацієнтів із ДР/ЦД2 достовірно знижується вміст фолатів в 1,4 рази ( $p < 0,05$ ), вітаміну В12 у 1,6 разів ( $p < 0,05$ ), вітаміну В6 в 1,6 разів ( $p < 0,05$ ) відносно відповідних показників здорових осіб. Це співпадає із даними Malaguarnera G. та співав. (2014, 2015), які також виявили значний дефіцит фолієвої кислоти у плазмі крові та в еритроцитах у пацієнтів з ПДР та НПДР на тлі діабету у порівнянні зі здоровими особами та пацієнтами з діабетом без ретинопатії [89, 90].

У більшості спостережень ми виявили пряму залежність дефіциту вітамінів із прогресуванням стадії ретинопатії, що може пояснювати погіршення загального стану пацієнтів, біохімічних, метаболічних реакцій, в яких приймають участь вказані вітаміни із процесами в сітківці та мікросудинах. Але в ряді випадків ми виявили різні ступені недостатності вітамінів плазми в залежності від поліморфізмів. Враховуючи дуже широку розповсюдженість варіацій вказаних генів, вивчення ступеню дефіциту вітамінів із стадією ретинопатії може бути корисним як для розуміння патогенетичних ланцюгів пошкодження сітківки на тлі генетичного дефіциту ферментів фолатного циклу, так і для розуміння ефективного ведення пацієнтів із ДР/ЦД2 та варіантів терапевтичної тактики. Як відомо дефіцит вітамінів та ферментів, які задіяні у метаболізмі фолієвої кислоти в організмі визначають порушення багатьох процесів, починаючи із дисбалансу імунологічної ланки, специфічного та неспецифічного антибактеріального захисту, схильності до інфекцій, та розвитку нейрозапалення низького ступеню тощо.

З'являється все більше даних про підвищення загального циркулюючого



гомоцистеїну, який індукує підвищення проліферації клітин, що може призвести до виснаження фолієвої кислоти та інактивації реметилування. Гальмування репарації ДНК зазвичай призводить до підвищеної частоти мутацій та хромосомної нестабільності, що може ініціювати та прискорювати проліферативний процес. Високий рівень гомоцистеїну в плазмі є токсичним для ендотелію за рахунок утворення вільних радикалів і викликає ушкодження судин. Основними патогенетичними механізмами є активація тромбоцитів та окислювальна модифікація ліпопротеїнів низької щільності.

Виходячи з результатів Malaguarnera G. та співав. (2014, 2015), метформін був найбільш постійним фактором ризику дефіциту фолієвої кислоти. Автори зауважують, що є необхідним великомасштабне дослідження, вивчення поширеності та факторів, що сприяють дефіциту фолієвої кислоти. Згідно гіпотезою дослідників, одужання або відстрочення діабетичної ретинопатії може відбуватися при лікуванні добавками фолієвої кислоти [89, 90].

Дослідження потенційного зв'язку між мікросудинними змінами, що виникають при діабетичній ретинопатії, і дефіцитом фолієвої кислоти може бути корисним як предиктор ретинопатії. ДР на ранніх стадіях може не виявлятися клінічними проявами та скаргами. Але контроль цих ускладнень залежить від належного лікування та моніторингу стану сітківки та рівня глюкози в крові після раннього виявлення ретинопатії. Таким чином, фолатний статус може відігравати роль у розвитку та прогресуванні діабетичної ретинопатії. Розуміння та характеристика епігенетичних регуляторів та їх ролі в патогенезі діабетичної ретинопатії надає підставу визначити нові мішені для боротьби з захворюванням, яке є основною причиною сліпоти у дорослих.

Отже, за нашими даними, виявлена різниця концентрації фолатів, вітамінів B6, B12 в крові досліджуваних осіб в залежності від варіантів поліморфізмів генів основних ферментів фолатного циклу.

Вміст фолатів в крові досліджуваних осіб розрізнявся у залежності від

генотипу і був максимальним у здорових носіїв генотипу ТТ гену *rs1801133*, носіїв генотипу АG гену *rs1805087* та носіїв генотипу СС гену *rs1801131*, у яких медіана в групі перевищувала значення у популяції в 1,4-1,5 рази.

Найбільший дефіцит вітаміну В12 спостерігали у носіїв генотипу СТ гену *rs1801133*, генотипу АG гену *rs1805087* у яких на тлі ПДР вміст вітаміну зменшувався в 50%. Найбільш протективним виявився генотип АС гену *rs1801131* де зниження вітаміну складало 17%.

Вміст вітаміну В6 розрізнявся у здорових осіб в залежності від поліморфізмів гену *rs1801131*: найбільшим він був у носіїв генотипу АА і на тлі розвитку ретинопатії знижувався на 36% не залежно від стадії. Аналогічно знижувався на 30%. рівень вітаміну В6 у носіїв генотипу АС відносно КГ. А у носіїв генотипу СС при розвитку НПДР спостерігали зниження вітаміну В6 в 1,8 разів.

Роль ET-1 в розвитку ендотеліальної дисфункції та ушкодження сітківки сьогодні вже чітко визначена, оскільки доведено, що ET-1 є сильним судинозвужувальним засобом з мітогенними, прооксидантними та прозапальними властивостями, які мають велике значення в регуляції судинної функції, особливо в патофізіології діабетичної васкулопатії [123]. Відомо, що надекспресія ET-1 обґрунтовує посилені ефекти, які визначають основні ушкодження судин при ЦД. Величезна кількість джерел присвячена пошуку асоціацій поліморфізмів генів з розвитком ЦД та ДР [98, 99, 138, 139]. В тому числі доведена роль поліморфізмів генів ендотелінових рецепторів, які мають зв'язок з розвитком ЦД2: для *rs6842241* гена *EDNRA* підвищення ризику було асоційовано з мінорною алелю А; для *rs5351* гена *EDNRB* – з предковою алелю С. Наявність цих алелей сприяло достеменно більш високому вмісту у крові ET1 та більший вираженості ендотеліальної дисфункції [3].

Стимулами для утворення і секреції ET-1 є гіпоксія, ангіотензин II (АТ II), тромбін, гіперхолестеринемія, ліпопротеїди низької щільності, гіперглікемія,

кортизол [8]. Наша нульова гіпотеза полягала в тому, що генетично обумовлений дефіцит ферментів фолатного циклу призводить не лише до гіпергомоцистеїнемії та ряду біохімічних порушень, а й підвищення ET-1. Вивчення асоціації вмісту ET-1 у осіб з поліморфізмами генів ферментів фолатного циклу може визначити цей пептид не лише маркером ендотеліального запалення, а й підґрунтям персоніфікованого таргетного патогенетичного лікування ДР та її профілактики.

За нашими попередніми даними [10, 11, 115] для гену *MTHFR* (677C/T, *rs1801133*) мажорним є гетерозиготний поліморфізм СТ, який визначається в контролі у 58% осіб. Розвиток ДР супроводжувався перерозподілом носіїв генотипів: у пацієнтів ми спостерігали зменшення частки носіїв СТ і збільшення в 1,8 разів осіб із генотипом СС відносно контролю. Отже, ми припустили, що наявність поліморфізму СТ є фактором утримання розвитку ЦД2. А генотип СС можна розглядати як фактор ризику розвитку ДР. Отримані в наведеній роботі дані підтверджують це припущення, оскільки у носіїв СТ поліморфізму ми спостерігали найменший вміст ET-1, а у носіїв генотипу СС розвиток ДР супроводжувався максимальним 14-ти кратним збільшенням ET-1.

Мінорний генотип GG гену *MTR* A2756G (*rs1805087*) ми виявили лише у пацієнтів на ДР, але в них був максимальний вміст гомоцистеїну [10, 11, 115]. В даному дослідженні у цих осіб зареєстрований надекспресія ET-1, що також визначає вказаний генотип як можливий фактор ризику ДР. Максимальний вміст гомоцистеїну ми виявили у носіїв поліморфізму AC гену *MTHFR* A1298C (*rs1801131*) [14]. В цих осіб також було 8-и кратне збільшення ET-1 при розвитку ДР. Генотип AA визначили як протекторний, оскільки у пацієнтів він зустрічався в 1,3 рази рідше і вміст ET-1 у цих осіб був найменшим і при розвитку ДР практично не змінювався. Проте мінорний генотип СС у пацієнтів зустрічався у двічі частіше, а вміст ET-1 зростав в 5 разів.

Отже, проведені спостереження у більшості підтвердили наші попередні

припущення про можливу роль різних генотипів вказаних генів на розвиток ДР як через механізм накопичення гомоцистеїну, так і на вміст ЕТ-1, як важливих факторів розвитку ДР на тлі ЦД2. Однак, висловлюватися про прямий зв'язок генотипів із вказаними ознаками фенотипу ми будемо із обережністю, через досить малу кількість та вибірку пацієнтів, що є суттєвим обмеженням. Вважаємо доцільним продовжити аналізувати можливі зв'язки факторів ризику ДР, оскільки це відкриває нові горизонти у поглядах на ланки патогенезу ретинопатії на тлі ЦД2 [17].

Таким чином, Потенційними факторами ризику розвитку ДР на тлі ЦД 2 можна вважати генотип СС гену *rs1801133*, генотип GG гену *rs1805087*, поліморфізм АС та генотип СС гену *rs1801131*.

Генотип СС гену *rs1801133* супроводжувався максимальним 14-ти кратним збільшенням ЕТ-1 у пацієнтів з ДР. Мінорний генотип GG гену *rs1805087* зустрічався тільки у пацієнтів з ДР, і характеризувався максимальним вмістом ЕТ-1. У носіїв поліморфізму АС гену *rs1801131* виявили 8-и кратне збільшення ЕТ-1 при розвитку ДР. Мінорний генотип СС цього гену у пацієнтів зустрічався у двічі частіше, і вміст ЕТ-1 із розвитком ДР зростав в 5 разів. Можна вважати факторами утримання розвитку ДР наявність поліморфізму СТ гену *rs1801133* та генотипу АА *rs1801131*. Поліморфізм СТ гену *rs1801133* супроводжувався найменшим вмістом ЕТ-1. Генотип АА гену *rs1801131* зустрічався в 1,3 рази рідше, вміст ЕТ-1 у цих осіб був найменшим і при розвитку ДР практично не змінювався.

Для заключного етапу нашої роботи і розробки рекомендації прогнозування перебігу ДР та засоби профілактики прогресування ендотеліальної дисфункції з урахуванням поліморфних варіантів генів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR* та особливостей метаболізму хворих на ЦД2 ми навели отримані результати у схемі, яка відображала внесок кожної ознаки фенотипу або фактору який ми вивчали у пацієнтів із наявністю варіанту генотипу відповідного гену (рис. 6.1). Також ми градуємовали внесок параметра фенотипу у кольоровому критерії який відображує фактор як потенційно загрозливий

(червоний колір), не загрозливий (жовтий колір) та протективний (зелений колір). Додатково на схемі ми вказували середній цифровий показник, кратність відмінності у порівнянні із відповідними параметром КГ.

rs1801133										
КГ	ДГ	%	ДР	тривалість ЦД2	Гомоцист	ЕТ-1	Аргіназа-1	Фолати	В12	В6
25	СС	45			1,7	14	1,3	1,5	1,3	1,2
58	СТ	49			1,8	5			1,5	1,4
17	ТТ	6			1,8	3	1,5	2	1,8	1,7
		100								

rs1805087										
КГ	ДГ	%	ДР	тривалість ЦД2	Гомоцист	ЕТ-1	Аргіназа-1	Фолати	В12	В6
70	АА	60			1,8	6	1,5		1,3	1,6
30	АG	35			1,8	2	1,4	1,5	1,4	1,4
0	GG	5						2		
		100								

rs1801131										
КГ	ДГ	%	ДР	тривалість ЦД2	Гомоцист	ЕТ-1	Аргіназа-1	Фолати	В12	В6
45	АА	34			1,8	1,3			1,5	1,6
50	АC	53			1,5	8	1,8	1,3	1,3	1,4
5	CC	13			2,8	5	-2	2,2	1,3	
		100								

Рис. 6.1 Схема внеску фактору фенотипу: розвиток ДР, тривалість ЦД2, вміст гомоцистеїну, ЕТ-1, аргінази-1, дефіциту фолатів, дефіциту вітамінів В12 та В6 у носіїв відповідного варіанту генів фолатного циклу *MTHFR C677T* (*rs1801133*), *MTR 2756A/G* (*rs1805087*), *MTHFR A1298C* (*rs1801131*)

На тлі проведеного аналізу можна визначити, що найбільш розповсюджений у наших досліджених осіб поліморфний варіант СТ гену фолатного циклу *MTHFR C677T* (*rs1801133*) не пов'язаний із високим ризиком розвитку ДР на тлі ЦД2. У носіїв дикого варіанту СС цього гену є тенденція до підвищення виникнення ДР на тлі ЦД2, проте фактором ризику є не тривалість

діабету, а механізми оксидативно-нітрозативного стресу, які викликають накопичення ET-1 і призводять до ендотеліальної дисфункції. У носіїв мінорного варіанту TT гену *MTHFR C677T* найменший ризик розвитку ДР на тлі ЦД2, і механізми виникнення ушкодження ґрунтуються на дефіциті вітамінів групи В.

У пацієнтів з ЦД2, які є носіями мажорного генотипу AA та поліморфізму AG гену *MTR 2756A/G (rs1805087)* ризик розвитку ДР є не високим. Єдиним фактором ризику можна вважати дефіцит вітамінів групи В.

Певну загрозу розвитку ДР мають пацієнти з ЦД2 які є носіями мінорного генотипу GG гену *MTR 2756A/G (rs1805087)*. У них виникнення мікросудинного ускладнення буде базуватися на багатьох механізмах, зокрема підвищення гомоцистеїну, ET-1, аргінази-1, та дефіциту фолатів. Єдиним компенсаторним механізмом на тлі генетичного дефіциту ферменту MTR для них буде відсутність дефіциту вітамінів В6 та В12.

Для носіїв поліморфізму AC гену *MTHFR A1298C (rs1801131)*, яких є більшість серед населення, рекомендації мають полягати у тому, що на тлі ЦД2 ДР може виникнути через підвищення ET-1 та індукцію оксидативно-нітрозативного стресу. У носіїв дикого генотипу AA ризику виникнення ДР на тлі ЦД є не високими, але фактором ризику може бути дефіцит вітамінів групи В. У носіїв мінорного генотипу CC до факторів ризику розвитку ДР можна віднести тривалість ЦД, та накопичення гомоцистеїну через дефіцит фолатів.

Таким чином, ми провели аналіз факторів ризику, які напряду пов'язані із метаболічними зсувами, що виникають в організмі хворих на ЦД2 і спричиняють каскад реакцій, індукують патогенетичні механізми розвитку ДР. Вказані особливості зв'язку генетично детермінованого дефіциту ферментів фолатного циклу та ознак фенотипу, як факторів ризику розвитку ДР, що мають стати основою клінічних рекомендацій персоналізованого ведення пацієнтів та спрямування таргетної терапії на конкретні патогенетичні ланки, що суттєво підвищить ефективність лікування хворих.

## ВИСНОВКИ

1. За даними Міжнародної діабетичної федерації, в даний час на діабет страждають майже 285 мільйонів людей у всьому світі, і очікується, що до 2030 року це число сягне 438 мільйонів. Пацієнти з цукровим діабетом 2 типу зазвичай мають фонову ретинопатію на момент постановки діагнозу діабету, але більш ніж у 60% розвинеться та чи інша форма ретинопатії протягом 20 років. Діабетична ретинопатія залишається основною причиною втрати зору у дорослих працездатного віку і проблема не втрачає актуальності. Отже дослідження нових етіологічних та патогенетичних чинників розвитку ДР на підставі вивчення генетичного дефіциту фолатного циклу є актуальною задачею сучасної офтальмології.

2. Асоціації поліморфізмів основних генів *rs1801133*, *rs1805087*, *rs1801131*, що кодують ферменти фолатного циклу із розвитком ДР на тлі ЦД2 у порівнянні із особами без діабету за нашими даними не встановлені. Серед пацієнтів було у 1,8 разів більше носіїв генотипу CC гену *rs1801133* та у 2,6 разі більше носіїв генотипу CC гену *rs1801131*. Носії генотипу GG гену *rs1805087* були виявлені тільки серед пацієнтів. При однаковій тривалості ЦД2 ризик прогресування ДР до ПДР був більше у носіїв генотипу GG гену *rs1805087* та генотипу CC гену *rs1801131*.

3. Встановлено, що рівень L-гомоцистеїну у плазмі крові пацієнтів був в 2 рази вище ( $p < 0,05$ ) і не залежав від стадії ДР. Також не було різниці у рівні L-гомоцистеїну серед носіїв різних варіантів генів *rs1801133*, *rs1805087*. Виявлене у носіїв генотипу CC гену *rs1801131* поєднання чинників: підвищення в 2,8 разів ( $p < 0,05$ ) L-гомоцистеїну і збільшення пацієнтів-носіїв дає підставу вважати ці обставини потенційним фактором ризику ДР на тлі ЦД2.

4. Вміст ET-1 в плазмі пацієнтів був у 8 разів ( $p < 0,05$ ) вище ніж у контролі і не відрізнявся у залежності від стадії ДР. Ще більшу різницю у 14 разів, ( $p < 0,05$ ) виявили у носіїв генотипу CC гену *rs1801133*. Встановлена тенденція до підвищення рівня аргінази-1 у носіїв генотипу CC гену *rs1801133* та

поліморфізму АС *rs1801131*. Проте носії генотипу СС гену *rs1801131* мали у 2 рази менший рівень аргінази-1 ніж особи контрольної групи із таким генотипом.

5. При вивченні асоціацій основних біохімічних показників вуглеводного та ліпідного обмінів із поліморфними варіантами генів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR* ми не виявили асоціацій із різними генотипами генів та показниками глюкози, глікірованого гемоглобіну, холестерину, ЛПНЩ, ЛПВЩ, тригліцеридів, АЛТ, АСТ.

6. Аналіз вмісту вітамінів групи В у крові досліджуваних осіб виявив достовірне зниження у пацієнтів із ДР на тлі ЦД2 фолатів в 1,4 рази ( $p < 0,05$ ), вітаміну В12 у 1,6 разів ( $p < 0,05$ ), вітаміну В6 в 1,6 разів ( $p < 0,05$ ) відносно відповідних показників КГ. У залежності від стадії ДР виявлене зниження на 30% ( $p < 0,05$ ) в групі ПДР високого ризику і на 36% ( $p < 0,05$ ) – в групі розвинутої ПДР у порівнянні із КГ. Вміст вітаміну В12 був достовірно зменшеним у порівнянні із контролем в усіх групах пацієнтів. За даними вмісту вітаміну В6, достовірні відмінності на 50% ( $p < 0,05$ ) спостерігали в групі м'якої НПДР.

7. У залежності від генотипів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR* дефіцит фолатів та вітамінів В6, В12 носив характер тенденцій. Найбільшу різницю ми виявили у носіїв генотипу СС гену *rs1801133* у яких відмінність із контрольною групою складала 1,7-2 рази ( $p < 0,05$ ). У носіїв різних варіантів гену *rs1805087* відмінність у показниках фолатів та вітамінів групи В незначно коливалася у залежності від клінічної стадії ДР. При цьому у носіїв мінорного генотипу GG гену *rs1805087* рівень В12 та В6 був на рівні контролю. У носіїв різних генотипів гену *rs1801131* також показники не мали схильності до дефіциту, а у носіїв мінорного генотипу СС показники В12 та В6 були вище, ніж аналогічні в контролі.

8. Аналіз асоціації варіантів генів *MTHFR*, *MTRR* і *MTR* з клінічними стадіями розвитку ДР, різною тривалістю ЦД2, метаболітами та компонентами фолатного обміну створюють підґрунтя до формування концепції персоніфікації ведення пацієнтів та нових діагностичних підходів. Виявлення у пацієнтів генотипу СС гену *MTHFR* (*rs1801133*) та поліморфізму АС гену *MTR*



(*rs1801131*) дає підставу вважати провідним механізмом ендотеліальної дисфункції надекспресію ET-1 та аргінази-1, що активує механізми оксидативно-нітрозативного стресу і визначає ці патогенетичні ланки найважливішими для таргетної терапії. У пацієнтів із мінорним генотипом CC гену *MTR* (*rs1801131*) провідним механізмом ендотеліальної дисфункції слід вважати гіпергомоцистеїнемію. Носії мінорного генотипу GG гену *MTRR* (*rs1805087*) мають фактори ризику розвитку ПДР у вигляді підвищення гомоцистеїну, ET-1 і аргінази, проте такі пацієнти не потребують компенсації дефіциту вітамінів групи B.

9. Наукові здобутки дисертації впроваджені в навчальний процес на кафедрах: офтальмології і офтальмології та оптометрії післядипломної освіти Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України, офтальмології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України, офтальмології ФПДО Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького МОЗ України, офтальмології Дніпровського державного національного медичного університету, оториноларингології та офтальмології Полтавського державного медичного університету, кафедрі дитячої хірургії, оториноларингології та офтальмології Буковинського державного медичного університету. Впровадження в практичну діяльність отриманих результатів здійснювалося в ТОВ «Медичний центр «Очі клінік» (м. Київ), медичному центрі «ЛАЗЕР Плюс» (ПП «Львів Сапфір», м. Львів), медичному центрі ТОВ ОКТАР «Центр медичної реабілітації ОКТАР» (м. Полтава) та медичному центрі ПП «Світ Здоров'я» (м. Мукачєво).

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Фахівцям, що лікують ЦД2 та ДР слід враховувати, що найбільш розповсюджений поліморфний варіант СТ гену *MTHFR C677T (rs1801133)* не пов'язаний із високим ризиком розвитку ДР на тлі ЦД2. У носіїв дикого варіанту СС цього гену є тенденція до підвищення виникнення ДР на тлі ЦД2, проте фактором ризику є не тривалість діабету, а механізми оксидативно-нітрозативного стресу, які викликають накопичення ЕТ-1 і призводять до ендотеліальної дисфункції. У носіїв мінорного варіанту ТТ гену *MTHFR C677T* найменший ризик розвитку ДР на тлі ЦД2, і механізми виникнення ушкодження ґрунтуються на дефіциті вітамінів групи В.

У пацієнтів з ЦД2, які є носіями мажорного генотипу АА та поліморфізму АG гену *MTR 2756A/G (rs1805087)* ризик розвитку ДР є невисоким. Єдиним фактором ризику можна вважати дефіцит вітамінів групи В. Певну загрозу розвитку ДР мають пацієнти з ЦД2 які є носіями мінорного генотипу GG гену *MTR 2756A/G (rs1805087)*. У них виникнення мікросудинного ускладнення буде базуватися на багатьох механізмах, зокрема підвищення гомоцистеїну, ЕТ-1, аргінази-1, та дефіциту фолатів. Єдиним компенсаторним механізмом на тлі генетичного дефіциту ферменту МTR для них буде відсутність дефіциту вітамінів В6 та В12.

Для носіїв поліморфізму АС гену *MTHFR A1298C (rs1801131)*, яких є більшість серед населення, рекомендації мають полягати у тому, що на тлі ЦД2 ДР може виникнути через підвищення ЕТ-1 та індукцію оксидативно-нітрозативного стресу. У носіїв дикого генотипу АА ризику виникнення ДР на тлі ЦД є не високими, але фактором ризику може бути дефіцит вітамінів групи В. У носіїв мінорного генотипу СС до факторів ризику розвитку ДР можна віднести тривалість ЦД, та накопичення гомоцистеїну через дефіцит фолатів.

Для установ охорони здоров'я запропонована основа для розробки клінічних рекомендацій персоналізованого ведення пацієнтів та спрямованої таргетної терапії на конкретні патогенетичні ланки ДР на підставі встановлених

нами даних зв'язку генетичних особливостей у вигляді дефіциту ферментів фолатного циклу та ознак фенотипу, що суттєво підвищить ефективність лікування хворих.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Биховець М.Ю, Риков СО, Натрус ЛВ. Особливості способу життя як фактор ризику розвитку і прогресування діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет 2-го типу. Архів офтальмології України. 2019; 7(1):54-61. doi: <http://www.mif-ua.com/archive/article/47576>.
2. Ганюк ВМ. Вміст аргінази-1 у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію з різною тривалістю цукрового діабету залежно від генотипу СУР2Е1. Архів офтальмології України. 2023; 11(1):6-11. doi: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.11.1.2023.311>.
3. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП, Зяблицев ДС, Стародубська ОО, Абряхімова ЦБ. Патогенетична роль ендотеліну-1 та поліморфізму його рецепторів при цукровому діабеті 2-го типу. Фізіол. журн. 2019;65(2):22-30. doi: <https://doi.org/10.15407/fz65.02.022>.
4. Мальцев ДВ. Результати вивчення показників біохімічного профілю у дітей з розладами спектру аутизму, асоційованими з генетичним дефіцитом фолатного циклу. Імунологія та алергологія: наука і практика. 2021;1-2:19-28. doi: <https://doi.org/10.37321/immunology.2021.1-2-03>.
5. Могілевський СЮ, Панченко ЮО, Зяблицев СВ. Зв'язок ендотеліну-1 з розвитком рецидивів при хірургічному лікуванні діабетичної макулопатії у хворих на цукровий діабет 2 типу. Клін ендокрин та ендокринна хірургія. 2019;3:34-42. doi: <https://doi.org/10.30978/CEES-2019-3-34>.
6. Натрус ЛВ, Гайова ЛВ, Биховець МЮ, Осадчук ЮС, Коновалов СЕ. Значення регуляторних впливів на ліпідний метаболізм при ускладненому цукровому діабеті 2-го типу. Фізіол журн. 2020;66(1):25-34 doi: <https://doi.org/10.15407/fz66.01.025>.
7. Натрус ЛВ, Могілевський СЮ, Панова ТІ, Риков СО, Биховець МЮ. Нова концепція відмінностей патогенетичних механізмів прогресування діабетичної ретинопатії у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу і з різним PPAR $\gamma$  генотипом. Офтальмол журн. 2020;5:36-42. Доступно з:

<https://www.ozhurnal.com/sites/default/files/2020-5-ru6.pdf>.

8. Пенішкевич ЯІ, Кучук ОП, Кузьо ОО. Роль ендотеліну-1 у патогенезі розвитку діабетичної ретинопатії. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2016;15(2):114-116. Доступно з: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/kaoch\\_2016\\_15\\_2\\_32](http://nbuv.gov.ua/UJRN/kaoch_2016_15_2_32)

9. Прокопенко ЮВ. Асоціації поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу із вмістом вітамінів групи В у пацієнтів із діабетичною ретинопатією та цукровим діабетом 2 типу. Архів офтальмології України. 2022;10(2):23-30. doi: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.10.2.2022.298>.

10. Риков СО, Прокопенко ЮВ. Вміст ендотеліну-1 в плазмі крові пацієнтів з діабетичною ретинопатією на тлі цукрового діабету 2 типу в залежності від поліморфних варіантів генів MTHFR, MTRR і MTR. Медична наука України. 2023;19(3):37-47. doi: <https://doi.org/10.32345/2664-4738.3.2023.06>.

11. Риков СО, Прокопенко ЮВ, Натрус ЛВ, Панченко ЮА. Роль поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу у прогресуванні діабетичної ретинопатії пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. Офтальмологічний журнал (Україна). 2022;5:3-11. doi: <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh20225311>.

12. Стандарти лікування діабету: ретинопатія, нейропатія та догляд за стопою Рекомендації Американської діабетичної асоціації-2023. Здоров'я України. 2023;4:19-22. Доступно з: [https://health-ua.com/multimedia/userfiles/files/2023/Endo\\_4\\_2023/Endo4\\_2023\\_p\\_19.pdf](https://health-ua.com/multimedia/userfiles/files/2023/Endo_4_2023/Endo4_2023_p_19.pdf).

13. Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС. Значення фактору некрозу пухлин альфа в механізмах розвитку нефропатії при цукровому діабеті 2 типу. Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія. 2019;1(65):72-80. doi: <http://doi.org/10.30978/CEES-2019-1-72>.

14. Чернобривцев ОП, Зябліцев СВ, Панова ТІ, Панченко ЮО. Ендотеліальна дисфункція при цукровому діабеті 2го типу. Огляд. Medical science of Ukraine. 2019;15(1-2):80-86. Доступно з: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvnmu\\_2019\\_15\\_1-2\\_14](http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvnmu_2019_15_1-2_14).

15. Яремчук-Качмарчик А, Свінцицький АС, Гаєвські П (ред.). Внутрішні

хвороби : підручник заснований на принципах доказової медицини 2018/19.  
Краків : Практ. медицина; 2018. 1632 с.

16. American Diabetes Association: clinical practice recommendations 2000. Supplement 1. *Diabetes Care*. 2000; 23(1):1-116.

17. Amoaku WM, Ghanchi F, Bailey C, Banerjee S, Banerjee S, Downey L, Gale R, Hamilton R, Khunti K, Posner E, Quhill F, Robinson S, Setty R, Sim D, Varma D, Mehta H. Diabetic retinopathy and diabetic macular oedema pathways and management: UK Consensus Working Group. *Eye (Lond)*. 2020 Jun;34(Suppl 1):1-51. doi: 10.1038/s41433-020-0961-6. Erratum in: *Eye (Lond)*. 2020 Oct;34(10):1941-1942. PMID: 32504038; PMCID: PMC7337227.

18. Bandello F, Battaglia Parodi M, Lanzetta P, Loewenstein A, Massin P, Menchini F, Veritti D. Diabetic Macular Edema. *Dev Ophthalmol*. 2017;58:102-138. doi: 10.1159/000455277. Epub 2017 Mar 28. PMID: 28351052.

19. Barrett EJ, Liu Z, Khamaisi M, King GL, Klein R, Klein BEK, Hughes TM, Craft S, Freedman BI, Bowden DW, Vinik AI, Casellini CM. Diabetic Microvascular Disease: An Endocrine Society Scientific Statement. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017 Dec 1;102(12):4343-4410. doi: 10.1210/jc.2017-01922. PMID: 29126250; PMCID: PMC5718697.

20. Belardo A, Gevi F, Zolla L. The concomitant lower concentrations of vitamins B6, B9 and B12 may cause methylation deficiency in autistic children. *J Nutr Biochem*. 2019 Aug;70:38-46. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.04.004. Epub 2019 Apr 24. PMID: 31151052.

21. Benarous R, Sasongko MB, Qureshi S, Fenwick E, Dirani M, Wong TY, Lamoureux EL. Differential association of serum lipids with diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Sep 27;52(10):7464-9. doi: 10.1167/iovs.11-7598. PMID: 21862642.

22. Bjørklund G, Doşa MD, Maes M, Dadar M, Frye RE, Peana M, Chirumbolo S. The impact of glutathione metabolism in autism spectrum disorder. *Pharmacol Res*. 2021 Apr;166:105437. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105437. Epub 2021 Jan 22. PMID: 33493659.

23. Brattström L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation*. 1998 Dec 8;98(23):2520-6. doi: 10.1161/01.cir.98.23.2520. PMID: 9843457.
24. Bykhovets M. Information value of biochemical markers for evaluation of lipid dysmetabolism secondary to hyperglycaemia in patients with diabetic retinopathy and type 2 diabetes mellitus. *East Eur Sci J*, (Warsaw, Poland). 2019; 9((49)1): 19-25.
25. Cai D, Hou B, Xie SL. Amino acid analysis as a method of discovering biomarkers for diagnosis of diabetes and its complications. *Amino Acids*. 2023 May;55(5):563-578. doi: 10.1007/s00726-023-03255-8. Epub 2023 Apr 17. PMID: 37067568.
26. Caldwell RW, Rodriguez PC, Toque HA, Narayanan SP, Caldwell RB. Arginase: A Multifaceted Enzyme Important in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2018 Apr 1;98(2):641-665. doi: 10.1152/physrev.00037.2016. PMID: 29412048; PMCID: PMC5966718.
27. Chen L, Shi XJ, Liu H, Mao X, Gui LN, Wang H, Cheng Y. Oxidative stress marker aberrations in children with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis of 87 studies (N = 9109). *Transl Psychiatry*. 2021 Jan 5;11(1):15. doi: 10.1038/s41398-020-01135-3. PMID: 33414386; PMCID: PMC7791110.
28. Chen YL, Rosa RH Jr, Kuo L, Hein TW. Hyperglycemia Augments Endothelin-1-Induced Constriction of Human Retinal Venules. *Transl Vis Sci Technol*. 2020 Aug 3;9(9):1. doi: 10.1167/tvst.9.9.1. PMID: 32879758; PMCID: PMC7442874.
29. Chen YL, Xu W, Rosa RH Jr, Kuo L, Hein TW. Hyperglycemia Enhances Constriction of Retinal Venules via Activation of the Reverse-Mode Sodium-Calcium Exchanger. *Diabetes*. 2019 Aug;68(8):1624-1634. doi: 10.2337/db19-0069. Epub 2019 May 14. PMID: 31088854; PMCID: PMC6692814.
30. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet*. 2010 Jul 10;376(9735):124-36. doi: 10.1016/S0140-6736(09)62124-3. Epub 2010 Jun 26.

PMID: 20580421.

31. Cho HC. The Relationship among Homocysteine, Bilirubin, and Diabetic Retinopathy. *Diabetes Metab J*. 2011 Dec;35(6):595-601. doi: 10.4093/dmj.2011.35.6.595. Epub 2011 Dec 26. PMID: 22247902; PMCID: PMC3253970.

32. Coban-Karatas M, Erol I, Ozkale Y, Yazıcı N. Central retinal artery occlusion in a 13-year-old child as a presenting sign of hyperhomocysteinemia together with high lipoprotein(a) level. *Pediatr Neurol*. 2013 Aug;49(2):138-40. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2013.04.002. PMID: 23859863.

33. Cui WP, Du B, Jia Y, Zhou WH, Liu SM, Cui YC, Ma FZ, Luo P, Miao LN. Is C677T polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for diabetic nephropathy or diabetes mellitus in a Chinese population? *Arch Med Res*. 2012 Jan;43(1):42-50. doi: 10.1016/j.arcmed.2011.12.003. Epub 2011 Dec 30. PMID: 22209973.

34. Dai H, Yu Z. An association study of MTHFR and eNOS genes polymorphism with diabetic nephropathy. *Chinese Journal of Trauma and Disability Medicine*. 2012;20: 4–6. [Google Scholar]

35. Dai SH, Li YW, Hong QX, Su T, Xu SY. Exaggerated activities of TRPM7 underlie bupivacaine-induced neurotoxicity in the SH-SY5Y cells preconditioned with high glucose. *J Biochem Mol Toxicol*. 2021 Aug;35(8):e22826. doi: 10.1002/jbt.22826. Epub 2021 May 31. PMID: 34060177.

36. Devi TS, Yumnamcha T, Yao F, Somayajulu M, Kowluru RA, Singh LP. TXNIP mediates high glucose-induced mitophagic flux and lysosome enlargement in human retinal pigment epithelial cells. *Biol Open*. 2019 Apr 25;8(4):bio038521. doi: 10.1242/bio.038521. Erratum in: *Biol Open*. 2022 Aug 15;11(8): PMID: 31023645; PMCID: PMC6503994.

37. Diabetic retinopathy: management and monitoring: NICE guideline DRAFT FOR CONSULTATION (August 2023). Available at: <https://www.nice.org.uk/guidance/gid-ng10256/documents/draft-guideline>.

38. Du J, Jin H, Yang L. Role of Hydrogen Sulfide in Retinal Diseases. *Front*



Pharmacol. 2017 Aug 29;8:588. doi: 10.3389/fphar.2017.00588. PMID: 28900398; PMCID: PMC5581915.

39. Ejigu T, Tsegaw A. Prevalence of Diabetic Retinopathy and Risk Factors among Diabetic Patients at University of Gondar Tertiary Eye Care and Training Center, North-West Ethiopia. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2021 Sep 25;28(2):71-80. doi: 10.4103/meajo.meajo\_24\_21. PMID: 34759663; PMCID: PMC8547671.

40. Elmasry K, Ibrahim AS, Saleh H, Elsherbiny N, Elshafey S, Hussein KA, Al-Shabrawey M. Role of endoplasmic reticulum stress in 12/15-lipoxygenase-induced retinal microvascular dysfunction in a mouse model of diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 2018 May;61(5):1220-1232. doi: 10.1007/s00125-018-4560-z. Epub 2018 Feb 21. PMID: 29468369; PMCID: PMC5878142.

41. Elmasry K, Mohamed R, Sharma I, Elsherbiny NM, Liu Y, Al-Shabrawey M, Tawfik A. Epigenetic modifications in hyperhomocysteinemia: potential role in diabetic retinopathy and age-related macular degeneration. *Oncotarget*. 2018 Jan 29;9(16):12562-12590. doi: 10.18632/oncotarget.24333. PMID: 29560091; PMCID: PMC5849155.

42. Elms SC, Toque HA, Rojas M, Xu Z, Caldwell RW, Caldwell RB. The role of arginase I in diabetes-induced retinal vascular dysfunction in mouse and rat models of diabetes. *Diabetologia*. 2013 Mar;56(3):654-62. doi: 10.1007/s00125-012-2789-5. Epub 2012 Dec 12. PMID: 23232640; PMCID: PMC3565067.

43. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, Collins BS, Gibbons CH, Giurini JM, Hilliard ME, Isaacs D, Johnson EL, Kahan S, Khunti K, Leon J, Lyons SK, Perry ML, Prahalad P, Pratley RE, Seley JJ, Stanton RC, Sun JK, Gabbay RA, on behalf of the American Diabetes Association. 12. Retinopathy, Neuropathy, and Foot Care: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care*. 2023 Jan 1;46(Suppl 1):S203-S215. doi: 10.2337/dc23-S012. PMID: 36507636; PMCID: PMC9810462.

44. Elsherbiny NM, Sharma I, Kira D, Alhusban S, Samra YA, Jadeja R, Martin P, Al-Shabrawey M, Tawfik A. Homocysteine Induces Inflammation in Retina and Brain. *Biomolecules*. 2020 Mar 3;10(3):393. doi: 10.3390/biom10030393. PMID:

32138265; PMCID: PMC7175372.

45. Esteves J, Laranjeira AF, Roggia MF, Dalpizol M, Scocco C, Kramer CK, Azevedo MJ, Canani LH. Fatores de risco para retinopatia diabética [Diabetic retinopathy risk factors]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008 Apr;52(3):431-41. Portuguese. doi: 10.1590/s0004-27302008000300003. PMID: 18506268.

46. Fotiou P, Raptis A, Apergis G, Dimitriadis G, Vergados I, Theodossiadis P. Vitamin status as a determinant of serum homocysteine concentration in type 2 diabetic retinopathy. *J Diabetes Res*. 2014;2014:807209. doi: 10.1155/2014/807209. Epub 2014 Jun 10. PMID: 25006590; PMCID: PMC4071945.

47. Fouda AY, Eldahshan W, Xu Z, Lemtalsi T, Shosha E, Zaidi SA, Abdelrahman AA, Cheng PN, Narayanan SP, Caldwell RW, Caldwell RB. Preclinical investigation of Pegylated arginase 1 as a treatment for retina and brain injury. *Exp Neurol*. 2022 Feb;348:113923. doi: 10.1016/j.expneurol.2021.113923. Epub 2021 Nov 12. PMID: 34780773; PMCID: PMC9122100.

48. Fouda AY, Xu Z, Suwanpradid J, Rojas M, Shosha E, Lemtalsi T, Patel C, Xing J, Zaidi SA, Zhi W, Stansfield BK, Cheng PN, Narayanan SP, Caldwell RW, Caldwell RB. Targeting proliferative retinopathy: Arginase 1 limits vitreoretinal neovascularization and promotes angiogenic repair. *Cell Death Dis*. 2022 Aug 29;13(8):745. doi: 10.1038/s41419-022-05196-8. PMID: 36038541; PMCID: PMC9424300.

49. Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, Olivieri O, Jacques PF, Rosenberg IH, Corrocher R, Selhub J. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 16;99(8):5606-11. doi: 10.1073/pnas.062066299. Epub 2002 Apr 2. PMID: 11929966; PMCID: PMC122817.

50. Frustaci A, Neri M, Cesario A, Adams JB, Domenici E, Dalla Bernardina B, Bonassi S. Oxidative stress-related biomarkers in autism: systematic review and meta-analyses. *Free Radic Biol Med*. 2012 May 15;52(10):2128-41. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.011. Epub 2012 Apr 18. PMID: 22542447.

51. Frye RE, Sequeira JM, Quadros EV, James SJ, Rossignol DA. Cerebral folate receptor autoantibodies in autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry*. 2013 Mar;18(3):369-81. doi: 10.1038/mp.2011.175. Epub 2012 Jan 10. PMID: 22230883; PMCID: PMC3578948.

52. Fu Y, Wang X, Kong W. Hyperhomocysteinaemia and vascular injury: advances in mechanisms and drug targets. *Br J Pharmacol*. 2018 Apr;175(8):1173-1189. doi: 10.1111/bph.13988. Epub 2017 Sep 22. PMID: 28836260; PMCID: PMC5867019.

53. Ganapathy PS, Perry RL, Tawfik A, Smith RM, Perry E, Roon P, Bozard BR, Ha Y, Smith SB. Homocysteine-mediated modulation of mitochondrial dynamics in retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Jul 25;52(8):5551-8. doi: 10.1167/iovs.11-7256. PMID: 21642619; PMCID: PMC3176036.

54. GBD 2019 Blindness and Vision Impairment Collaborators; Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet Glob Health*. 2021 Feb;9(2):e144-e160. doi: 10.1016/S2214-109X(20)30489-7. Epub 2020 Dec 1. Erratum in: *Lancet Glob Health*. 2021 Apr;9(4):e408. PMID: 33275949; PMCID: PMC7820391.

55. Gilbert C, Gordon I, Mukherjee CR, Govindhari V. Guidelines for the prevention and management of diabetic retinopathy and diabetic eye disease in India: A synopsis. *Indian J Ophthalmol*. 2020 Feb;68(Suppl 1):S63-S66. doi: 10.4103/ijo.IJO\_1917\_19. PMID: 31937733; PMCID: PMC7001190.

56. Grunwald JE, Ying GS, Maguire M, Pistilli M, Daniel E, Alexander J, Whittock-Martin R, Parker C, Mohler E, Lo JC, Townsend R, Gadegbeku CA, Lash JP, Fink JC, Rahman M, Feldman H, Kusek JW, Xie D, Coleman M, Keane MG; Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study Group. Association between retinopathy and cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease (from the Chronic Renal Insufficiency Cohort [CRIC] Study). *Am J Cardiol*. 2012 Jul 15;110(2):246-53. doi: 10.1016/j.amjcard.2012.03.014. Epub 2012 Apr 18. PMID:

22516527; PMID: PMC3383900.

57. Gu J, Lei C, Zhang M. Folate and retinal vascular diseases. *BMC Ophthalmol.* 2023 Oct 13;23(1):413. doi: 10.1186/s12886-023-03149-z. PMID: 37833663; PMID: PMC10571445.

58. Guidelines for Diabetic Retinopathy Management. Australia: NHMRC; 2008. 183 p. Available at: [https://www.optometry.org.au/wp-content/uploads/Professional\\_support/Guidelines/nhmrc\\_diabetic\\_guidelines.pdf](https://www.optometry.org.au/wp-content/uploads/Professional_support/Guidelines/nhmrc_diabetic_guidelines.pdf)

59. Guo BQ, Li HB, Ding SB. Blood homocysteine levels in children with autism spectrum disorder: An updated systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Res.* 2020 Sep;291:113283. doi: 10.1016/j.psychres.2020.113283. Epub 2020 Jul 6. PMID: 32763544.

60. Hanson NQ, Aras O, Yang F, Tsai MY. C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease. *Clin Chem.* 2001 Apr;47(4):661-6. PMID: 11274015.

61. Hein TW, Potts LB, Xu W, Yuen JZ, Kuo L. Temporal development of retinal arteriolar endothelial dysfunction in porcine type 1 diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Dec 3;53(13):7943-9. doi: 10.1167/iovs.12-11005. PMID: 23139282; PMID: PMC3513275.

62. Hein TW, Xu W, Xu X, Kuo L. Acute and Chronic Hyperglycemia Elicit JIP1/JNK-Mediated Endothelial Vasodilator Dysfunction of Retinal Arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016 Aug 1;57(10):4333-40. doi: 10.1167/iovs.16-19990. PMID: 27556216; PMID: PMC5015966.

63. Hiraoka M, Kato K, Saito Y, Yasuda K, Kagawa Y. Gene-nutrient and gene-gene interactions of controlled folate intake by Japanese women. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Apr 16;316(4):1210-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.02.174. PMID: 15044114.

64. Horinouchi T, Terada K, Higashi T, Miwa S. Endothelin receptor signaling: new insight into its regulatory mechanisms. *J Pharmacol Sci.* 2013;123(2):85-101. doi: 10.1254/jphs.13r02cr. Epub 2013 Sep 27. PMID: 24077109.

65. Horiuchi F, Yoshino Y, Kumon H, Hosokawa R, Nakachi K, Kawabe K, Iga JI, Ueno SI. Identification of aberrant innate and adaptive immunity based on changes in global gene expression in the blood of adults with autism spectrum disorder. *J Neuroinflammation*. 2021 Apr 30;18(1):102. doi: 10.1186/s12974-021-02154-7. PMID: 33931079; PMCID: PMC8086363.

66. Houde M, Desbiens L, D'Orléans-Juste P. Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity. *Adv Pharmacol*. 2016;77:143-75. doi: 10.1016/bs.apha.2016.05.002. Epub 2016 Jun 21. PMID: 27451097.

67. Huang EJ, Kuo WW, Chen YJ, Chen TH, Chang MH, Lu MC, Tzang BS, Hsu HH, Huang CY, Lee SD. Homocysteine and other biochemical parameters in Type 2 diabetes mellitus with different diabetic duration or diabetic retinopathy. *Clin Chim Acta*. 2006 Apr;366(1-2):293-8. doi: 10.1016/j.cca.2005.10.025. Epub 2005 Dec 15. PMID: 16343469.

68. Hudson JL, Laura DM, Berrocal AM. Central retinal vein occlusion in 12-year-old girl with methylenetetrahydrofolate reductase mutation: a case report and review of the literature. *Retin Cases Brief Rep*. 2023 Nov 1;17(6):734-736. doi: 10.1097/ICB.0000000000001283. PMID: 35385432.

69. IDF diabetes atlas. 6 th edition. International Diabetes Federation; 2013. Available at: [https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2010/07/IDF\\_diabetes\\_atlas\\_sixth\\_edition\\_en.pdf](https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2010/07/IDF_diabetes_atlas_sixth_edition_en.pdf).

70. Jenkins AJ, Joglekar MV, Hardikar AA, Keech AC, O'Neal DN, Januszewski AS. Biomarkers in Diabetic Retinopathy. *Rev Diabet Stud*. 2015 Spring-Summer;12(1-2):159-95. doi: 10.1900/RDS.2015.12.159. Epub 2015 Aug 10. PMID: 26676667; PMCID: PMC5397989.

71. Jian HR, Niu WH, Xu ZS, Zhu JX, Pan X, Zhang YR, Lei P, Huang FQ, He Y. Establishment of FAP-overexpressing Cells for FAP-targeted Theranostics. *Curr Med Sci*. 2023 Jun;43(3):623-630. doi: 10.1007/s11596-023-2740-7. Epub 2023 May 24. PMID: 37222958.

72. John WR, Vallé-Jones JC. Treatment of otitis media in children. A comparison between cefaclor and amoxicillin. *Practitioner*. 1983

Dec;227(1386):1805-9. PMID: 6361721.

73. Kang HM, Hasanuzzaman M, Kim SW, Koh HJ, Lee SC. Elevated aqueous endothelin-1 concentrations in advanced diabetic retinopathy. *PLoS One*. 2022 May 11;17(5):e0268353. doi: 10.1371/journal.pone.0268353. PMID: 35544533; PMCID: PMC9094525.

74. Kang HM, Hasanuzzaman M, Kim SW, Koh HJ, Lee SC. Significant elevation of aqueous endothelin-1 in central retinal vein occlusion. *PLoS One*. 2021 Jun 2;16(6):e0252530. doi: 10.1371/journal.pone.0252530. PMID: 34077461; PMCID: PMC8171894.

75. Karter AJ, Ferrara A, Liu JY, Moffet HH, Ackerson LM, Selby JV. Ethnic disparities in diabetic complications in an insured population. *JAMA*. 2002 May 15;287(19):2519-27. doi: 10.1001/jama.287.19.2519. Erratum in: *JAMA* 2002 Jul 3;288(1):46. PMID: 12020332.

76. Khuu LA, Tayyari F, Sivak JM, Flanagan JG, Singer S, Brent MH, Huang D, Tan O, Hudson C. Aqueous humor endothelin-1 and total retinal blood flow in patients with non-proliferative diabetic retinopathy. *Eye (Lond)*. 2017 Oct;31(10):1443-1450. doi: 10.1038/eye.2017.74. Epub 2017 May 26. PMID: 28548649; PMCID: PMC5639192.

77. Kim CB, D'Amore PA, Connor KM. Revisiting the mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Eye Brain*. 2016;8:67-79. doi: 10.2147/EB.S94447. Epub 2016 May 20. PMID: 27499653; PMCID: PMC4975545.

78. Koklesova L, Mazurakova A, Samec M, Biringer K, Samuel SM, Büsselberg D, Kubatka P, Golubnitschaja O. Homocysteine metabolism as the target for predictive medical approach, disease prevention, prognosis, and treatments tailored to the person. *EPMA J*. 2021 Nov 11;12(4):477-505. doi: 10.1007/s13167-021-00263-0. PMID: 34786033; PMCID: PMC8581606.

79. Kowluru RA, Mohammad G, Sahajpal N. Faulty homocysteine recycling in diabetic retinopathy. *Eye Vis (Lond)*. 2020 Jan 10;7:4. doi: 10.1186/s40662-019-0167-9. Erratum in: *Eye Vis (Lond)*. 2020 Feb 28;7:11. PMID: 31938715; PMCID: PMC6953140.

80. Kowluru RA. Diabetic Retinopathy: Mitochondria Caught in a Muddle of Homocysteine. *J Clin Med*. 2020 Sep 19;9(9):3019. doi: 10.3390/jcm9093019. PMID: 32961662; PMCID: PMC7564979.

81. Kundi H, Kiziltunc E, Ates I, Cetin M, Barca AN, Ozkayar N, Ornek E. Association between plasma homocysteine levels and end-organ damage in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus patients. *Endocr Res*. 2017 Feb;42(1):36-41. doi: 10.3109/07435800.2016.1171235. Epub 2016 Apr 25. PMID: 27111290.

82. Lange LA, Croteau-Chonka DC, Marvelle AF, Qin L, Gaulton KJ, Kuzawa CW, McDade TW, Wang Y, Li Y, Levy S, Borja JB, Lange EM, Adair LS, Mohlke KL. Genome-wide association study of homocysteine levels in Filipinos provides evidence for CPS1 in women and a stronger MTHFR effect in young adults. *Hum Mol Genet*. 2010 May 15;19(10):2050-8. doi: 10.1093/hmg/ddq062. Epub 2010 Feb 13. PMID: 20154341; PMCID: PMC2860887.

83. Letz R, Gerr F. Covariates of human peripheral nerve function: I. Nerve conduction velocity and amplitude. *Neurotoxicol Teratol*. 1994 Jan-Feb;16(1):95-104. doi: 10.1016/0892-0362(94)90014-0. PMID: 8183195.

84. Lin X, Lu D, Gao Y, Tao S, Yang X, Feng J, Tan A, Zhang H, Hu Y, Qin X, Kim ST, Peng T, Li L, Mo L, Zhang S, Trent JM, Mo Z, Zheng SL, Xu J, Sun J. Genome-wide association study identifies novel loci associated with serum level of vitamin B12 in Chinese men. *Hum Mol Genet*. 2012 Jun 1;21(11):2610-7. doi: 10.1093/hmg/dds062. Epub 2012 Feb 24. PMID: 22367966.

85. Liu X, Cui H. The palliative effects of folic acid on retinal microvessels in diabetic retinopathy via regulating the metabolism of DNA methylation and hydroxymethylation. *Bioengineered*. 2021 Dec;12(2):10766-10774. doi: 10.1080/21655979.2021.2003924. PMID: 34874218; PMCID: PMC8809984.

86. Liu Z, Pan X, Jiang W, Bi H. Central retinal venous occlusion in a child with hyperhomocysteinemia: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Jun;98(23):e15813. doi: 10.1097/MD.00000000000015813. PMID: 31169682; PMCID: PMC6571382.

87. Liu ZJ, Zhao W, Lei HY, Xu HL, Lai LY, Xu R, Xu SY. High Glucose

Enhances Bupivacaine-Induced Neurotoxicity via MCU-Mediated Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Feb 18;2019:7192798. doi: 10.1155/2019/7192798. Retraction in: *Oxid Med Cell Longev*. 2024 Jan 9;2024:9814070. PMID: 30911349; PMCID: PMC6398017.

88. Luo S, Wang F, Shi C, Wu Z. A Meta-Analysis of Association between Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene (MTHFR) 677C/T Polymorphism and Diabetic Retinopathy. *Int J Environ Res Public Health*. 2016 Aug 10;13(8):806. doi: 10.3390/ijerph13080806. PMID: 27517946; PMCID: PMC4997492.

89. Malaguarnera G, Gagliano C, Giordano M, Salomone S, Vacante M, Bucolo C, Caraci F, Reibaldi M, Drago F, Avitabile T, Motta M. Homocysteine serum levels in diabetic patients with non proliferative, proliferative and without retinopathy. *Biomed Res Int*. 2014;2014:191497. doi: 10.1155/2014/191497. Epub 2014 Apr 28. PMID: 24877066; PMCID: PMC4022262.

90. Malaguarnera G, Gagliano C, Salomone S, Giordano M, Bucolo C, Pappalardo A, Drago F, Caraci F, Avitabile T, Motta M. Folate status in type 2 diabetic patients with and without retinopathy. *Clin Ophthalmol*. 2015 Aug 7;9:1437-42. doi: 10.2147/OPHTH.S77538. PMID: 26300625; PMCID: PMC4536839.

91. Maltsev D. Features of folate cycle disorders in children with ASD. *Bangladesh J Med Sci*. 2020;19(4):737–742. doi: <https://doi.org/10.3329/bjms.v19i4.46634>.

92. Maltsev D. The effectiveness of infliximab in autism spectrum disorders in children associated with folate cycle genetic deficiency. *Immun. and Allerg.: Sci. and Pract*. 2020 Dec.24;3-4:16-28. doi: 10.34883/PI.2020.11.3.015.

93. Maltsev D. The folate-centric concept of pathogenesis and GBINC personalized multidisciplinary approach to the clinical management of children with neuropsychiatric syndromes. Review. *Ukr Neurol J*. 2022;3-4:5-24. doi: <https://doi.org/10.30978/UNJ2022-3-5>.

94. Mao S, Xiang W, Huang S, Zhang A. Association between homocysteine status and the risk of nephropathy in type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*. 2014;431:206–10.



95. Math Help Resources. Available at: <https://mathcracker.com>.
96. Mei QB, Chen P, LH Z. [Correlation study between gene polymorphism of methylene tetrahydrofolate reductase and type 2 diabetes]. *China Med Herald*. 2012;9: 162–163.
97. Mello AL, Cunha SF, Foss-Freitas MC, Vannucchi H. Evaluation of plasma homocysteine level according to the C677T and A1298C polymorphism of the enzyme MTHFR in type 2 diabetic adults. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2012 Oct;56(7):429-34. doi: 10.1590/s0004-27302012000700004. PMID: 23108747.
98. Mogilevskyy SIu, Panchenko IuO, Ziablitsev SV. New risk factors for post-surgical recurrent diabetic maculopathy in type 2 diabetes mellitus. *J.ophthalmol. (Ukraine)*. 2019;5:9-17. doi: <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh20195917>.
99. Mogilevskyy SYu, Korobova AV, Wassim H. Relationship of pro-inflammatory cytokines of intraocular fluid with the development of postoperative complications in patients with primary glaucoma in combination with cataracts. *Archives of Ophthalmology of Ukraine*. 2017;5(2):38-44. Available at: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/aroft\\_2017\\_5\\_2\\_9](http://nbuv.gov.ua/UJRN/aroft_2017_5_2_9).
100. Mohamed R, Sharma I, Ibrahim AS, Saleh H, Elsherbiny NM, Fulzele S, Elmasry K, Smith SB, Al-Shabrawey M, Tawfik A. Hyperhomocysteinemia Alters Retinal Endothelial Cells Barrier Function and Angiogenic Potential via Activation of Oxidative Stress. *Sci Rep*. 2017 Sep 20;7(1):11952. doi: 10.1038/s41598-017-09731-y. PMID: 28931831; PMCID: PMC5607263.
101. Moshal KS, Sen U, Tyagi N, Henderson B, Steed M, Ovechkin AV, Tyagi SC. Regulation of homocysteine-induced MMP-9 by ERK1/2 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 Mar;290(3):C883-91. doi: 10.1152/ajpcell.00359.2005. Epub 2005 Oct 26. PMID: 16251475.
102. Mottaghi T, Khorvash F, Kheirollahi M, Maracy M, Askari G. The MTHFR C677T polymorphism influences the efficacy of folic acid supplementation on the nerve conduction studies in patients with diabetic polyneuropathy; A randomized, double blind, placebo-controlled study. *J Res Med Sci*. 2019 Apr 26;24:36. doi: 10.4103/jrms.JRMS\_774\_18. PMID: 31143237; PMCID:

PMC6521607.

103. Natrus L, Osadchuk Y, Labudzynski D, Chaikovskiy Y, Smirnov A. The pathogenetic rationale the ways of experimental type 2 diabetes mellitus modeling. *Med. Sci. of Ukr.* 2019 Dec.26;15(3-4):10-8. doi:<https://doi.org/10.32345/2664-4738.3-4.2019.02>.

104. Natrus LV, Mogilevskyy SYu., Panova TI, Rykov SO, Bykhovets M. Iu. A novel concept of differences in pathogenetic mechanism of diabetic retinopathy progression between type 2 diabetes mellitus patients differing in the PPAR $\gamma$  genotype. *J.ophthalmol. (Ukraine)*. 2020;5:36-42. Available at: <https://www.ozhurnal.com/sites/default/files/2020-5-6.pdf>.

105. Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int Suppl.* 2000 Sep;77:S26-30. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.07705.x. PMID: 10997687.

106. Niu W, Qi Y. An updated meta-analysis of methylenetetrahydrofolate reductase gene 677C/T polymorphism with diabetic nephropathy and diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012 Jan;95(1):110-8. doi: 10.1016/j.diabres.2011.10.009. Epub 2011 Nov 5. PMID: 22056717.

107. Patel C, Rojas M, Narayanan SP, Zhang W, Xu Z, Lemtalsi T, Jittiporn K, Caldwell RW, Caldwell RB. Arginase as a mediator of diabetic retinopathy. *Front Immunol.* 2013 Jul 3;4:173. doi: 10.3389/fimmu.2013.00173. PMID: 23840196; PMCID: PMC3699717.

108. Pietrzik K, Bailey L, Shane B. Folic acid and L-5-methyltetrahydrofolate: comparison of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet.* 2010 Aug;49(8):535-48. doi: 10.2165/11532990-000000000-00000. PMID: 20608755.

109. Planells E, Sánchez C, Montellano MA, Mataix J, Llopis J. Vitamins B6 and B12 and folate status in an adult Mediterranean population. *Eur J Clin Nutr.* 2003 Jun;57(6):777-85. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601610. PMID: 12792662.

110. Potts LB, Bradley PD, Xu W, Kuo L, Hein TW. Role of endothelium in vasomotor responses to endothelin system and protein kinase C activation in porcine

retinal arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Nov 15;54(12):7587-94. doi: 10.1167/iovs13-13178. PMID: 24243985; PMCID: PMC3835269.

111. Raghubeer S, Matsha TE. Methylenetetrahydrofolate (MTHFR), the One-Carbon Cycle, and Cardiovascular Risks. *Nutrients.* 2021 Dec 20;13(12):4562. doi: 10.3390/nu13124562. PMID: 34960114; PMCID: PMC8703276.

112. Raza ST, Abbas S, Ahmed F, Fatima J, Zaidi ZH, Mahdi F. Association of MTHFR and PPAR $\gamma$ 2 gene polymorphisms in relation to type 2 diabetes mellitus cases among north Indian population. *Gene.* 2012 Dec 15;511(2):375-9. doi: 10.1016/j.gene.2012.09.072. Epub 2012 Oct 2. PMID: 23036708.

113. Roldán-Pallarés M, Rollín R, Mediero A, Martínez-Montero JC, Fernández-Cruz A, Bravo-Llata C, Fernández-Durango R. Immunoreactive ET-1 in the vitreous humor and epiretinal membranes of patients with proliferative vitreoretinopathy. *Mol Vis.* 2005 Jul 7;11:461-71. PMID: 16030497.

114. Romero MJ, Iddings JA, Platt DH, Ali MI, Cederbaum SD, Stepp DW, Caldwell RB, Caldwell RW. Diabetes-induced vascular dysfunction involves arginase I. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012 Jan 1;302(1):H159-66. doi: 10.1152/ajpheart.00774.2011. Epub 2011 Nov 4. PMID: 22058149; PMCID: PMC3334242.

115. Rykov SO, Prokopenko IuV, Natrus LV, Panchenko YuO. Role of polymorphisms of folate-cycle enzymes in diabetic retinopathy progression in patients with type 2 diabetic mellitus. *J ophthalmol (Ukraine).* 2022;5:3-11. doi: <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh20225311>

116. Salvatore S, Vingolo EM. Endothelin-1 role in human eye: a review. *J Ophthalmol.* 2010;2010:354645. doi: 10.1155/2010/354645. Epub 2011 Mar 3. PMID: 21461356; PMCID: PMC3065050.

117. Schneider JG, Tilly N, Hierl T, Sommer U, Hamann A, Dugi K, Leidig-Bruckner G, Kasperk C. Elevated plasma endothelin-1 levels in diabetes mellitus. *Am J Hypertens.* 2002 Nov;15(11):967-72. doi: 10.1016/s0895-7061(02)03060-1. PMID: 12441216.

118. Shi C, Wang P, Airen S, Brown C, Liu Z, Townsend JH, Wang J, Jiang H.

Nutritional and medical food therapies for diabetic retinopathy. *Eye Vis (Lond)*. 2020 Jun 18;7:33. doi: 10.1186/s40662-020-00199-y. PMID: 32582807; PMCID: PMC7310218.

119. Shute C. A case report of branch retinal artery occlusion in a teenager due to hyperhomocysteinaemia; the interplay of genetic and nutritional defects. *BMC Ophthalmol*. 2018 Sep 14;18(Suppl 1):220. doi: 10.1186/s12886-018-0859-2. PMID: 30255822; PMCID: PMC6156839.

120. Singh LP, Devi TS, Yumnamcha T. The Role of Txnip in Mitophagy Dysregulation and Inflammasome Activation in Diabetic Retinopathy: A New Perspective. *JOJ Ophthalmol*. 2017;4(4):10.19080/jojo.2017.04.555643. doi: 10.19080/jojo.2017.04.555643. Epub 2017 Sep 15. PMID: 29376145; PMCID: PMC5786434.

121. Sirman Y, Savvytskyi I, Preys N. Prediction model for severity of diabetic retinopathy derived from review of endothelial dysfunction and hypoxia markers. *Int J Endocrinol*. 2021;17(1):76-80. doi: <https://doi.org/10.22141/2224-0721.17.1.2021.226435>

122. Son JW, Jang EH, Kim MK, Kim IT, Roh YJ, Baek KH, Song KH, Yoon KH, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kwon HS. Diabetic retinopathy is associated with subclinical atherosclerosis in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 Feb;91(2):253-9. doi: 10.1016/j.diabres.2010.11.005. Epub 2010 Dec 3. PMID: 21129801.

123. Sorrentino FS, Matteini S, Bonifazzi C, Sebastiani A, Parmeggiani F. Diabetic retinopathy and endothelin system: microangiopathy versus endothelial dysfunction. *Eye (Lond)*. 2018 Jul;32(7):1157-1163. doi: 10.1038/s41433-018-0032-4. Epub 2018 Mar 9. PMID: 29520046; PMCID: PMC6043602.

124. Stover PJ. Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease. *Nutr Rev*. 2004 Jun;62(6 Pt 2):S3-12; discussion S13. doi: 10.1111/j.1753-4887.2004.tb00070.x. PMID: 15298442.

125. Strzalka-Mrozik B, Nowak A, Gola J, Kowalczyk M, Kapral M, Mazurek U. Factors associated with changes in endothelin-1 gene expression in patients with

diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus. *Mol Vis*. 2010 Jul 10;16:1272-9. PMID: 20664700; PMCID: PMC2903466.

126. Tanaka T, Scheet P, Giusti B, Bandinelli S, Piras MG, Usala G, Lai S, Mulas A, Corsi AM, Vestrini A, Sofi F, Gori AM, Abbate R, Guralnik J, Singleton A, Abecasis GR, Schlessinger D, Uda M, Ferrucci L. Genome-wide association study of vitamin B6, vitamin B12, folate, and homocysteine blood concentrations. *Am J Hum Genet*. 2009 Apr;84(4):477-82. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.02.011. Epub 2009 Mar 19. Erratum in: *Am J Hum Genet*. 2009 May;84(5):712. PMID: 19303062; PMCID: PMC2667971.

127. Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, Chibber R. Pathophysiology of diabetic retinopathy. *ISRN Ophthalmol*. 2013 Jan 15;2013:343560. doi: 10.1155/2013/343560. PMID: 24563789; PMCID: PMC3914226.

128. Tawfik A, Mohamed R, Elsherbiny NM, DeAngelis MM, Bartoli M, Al-Shabrawey M. Homocysteine: A Potential Biomarker for Diabetic Retinopathy. *J Clin Med*. 2019 Jan 19;8(1):121. doi: 10.3390/jcm8010121. PMID: 30669482; PMCID: PMC6352029.

129. Teo ZL, Tham YC, Yu M, Chee ML, Rim TH, Cheung N, Bikbov MM, Wang YX, Tang Y, Lu Y, Wong IY, Ting DSW, Tan GSW, Jonas JB, Sabanayagam C, Wong TY, Cheng CY. Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-analysis. *Ophthalmology*. 2021 Nov;128(11):1580-1591. doi: 10.1016/j.ophtha.2021.04.027. Epub 2021 May 1. PMID: 33940045.

130. Thengchaisri N, Hein TW, Ren Y, Kuo L. Endothelin-1 impairs coronary arteriolar dilation: Role of p38 kinase-mediated superoxide production from NADPH oxidase. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Sep;86:75-84. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.07.014. Epub 2015 Jul 23. PMID: 26211713; PMCID: PMC4558216.

131. Toda N, Nakanishi-Toda M. Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*. 2007 May;26(3):205-38. doi: 10.1016/j.preteyeres.2007.01.004. Epub 2007 Jan 20. PMID: 17337232.

132. Tsai SH, Lu G, Xu X, Ren Y, Hein TW, Kuo L. Enhanced endothelin-

1/Rho-kinase signalling and coronary microvascular dysfunction in hypertensive myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2017 Sep 1;113(11):1329-1337. doi: 10.1093/cvr/cvx103. PMID: 28575410; PMCID: PMC5852513.

133. Tuentner A, Bautista Nino PK, Vitezova A, Pantavos A, Bramer WM, Franco OH, Felix JF. Folate, vitamin B12, and homocysteine in smoking-exposed pregnant women: A systematic review. *Matern Child Nutr.* 2019 Jan;15(1):e12675. doi: 10.1111/mcn.12675. Epub 2018 Sep 4. PMID: 30182513; PMCID: PMC6585731.

134. Tutuncu NB, Erbas T, Alikasifoglu M, Tuncbilek E. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase enzyme genotype is frequent in type 2 diabetic patients with normal fasting homocysteine levels. *J Intern Med.* 2005 May;257(5):446-53. doi: 10.1111/j.1365-2796.2005.01480.x. PMID: 15836661.

135. Tyagi SC, Rodriguez W, Patel AM, Roberts AM, Falcone JC, Passmore JC, Fleming JT, Joshua IG. Hyperhomocysteinemic diabetic cardiomyopathy: oxidative stress, remodeling, and endothelial-myocyte uncoupling. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2005 Mar;10(1):1-10. doi: 10.1177/107424840501000101. PMID: 15821833.

136. Ukinc K, Ersoz HO, Karahan C, Erem C, Eminagaoglu S, Hacıhasanoglu AB, Yilmaz M, Kocak M. Methyltetrahydrofolate reductase C677T gene mutation and hyperhomocysteinemia as a novel risk factor for diabetic nephropathy. *Endocrine.* 2009 Oct;36(2):255-61. doi: 10.1007/s12020-009-9218-7. Epub 2009 Jul 14. PMID: 19598005.

137. Wan L, Li Y, Zhang Z, Sun Z, He Y, Li R. Methyltetrahydrofolate reductase and psychiatric diseases. *Transl Psychiatry.* 2018 Nov 5;8(1):242. doi: 10.1038/s41398-018-0276-6. PMID: 30397195; PMCID: PMC6218441.

138. Wang D, Zhang G, Yu Y, Zhang Z. Imaging of Sarcopenia in Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Interv Aging.* 2024 Jan 26;19:141-151. doi: 10.2147/CIA.S443572. PMID: 38292460; PMCID: PMC10826713.

139. Wang N, Ding L, Liu D, Zhang Q, Zheng G, Xia X, Xiong S. Molecular investigation of candidate genes for pyroptosis-induced inflammation in diabetic

retinopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Jul 25;13:918605. doi: 10.3389/fendo.2022.918605. PMID: 35957838; PMCID: PMC9357938.

140. Waśkiewicz A, Sygnowska E, Broda G. Dietary intake of vitamins B6, B12 and folate in relation to homocysteine serum concentration in the adult Polish population - WOBASZ Project. *Kardiol Pol*. 2010 Mar;68(3):275-82. PMID: 20411451.

141. Weber GJ, Pushpakumar S, Tyagi SC, Sen U. Homocysteine and hydrogen sulfide in epigenetic, metabolic and microbiota related renovascular hypertension. *Pharmacol Res*. 2016 Nov;113(Pt A):300-312. doi: 10.1016/j.phrs.2016.09.002. Epub 2016 Sep 4. PMID: 27602985; PMCID: PMC5107119.

142. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*. 1998 Jul;64(3):169-72. doi: 10.1006/mgme.1998.2714. PMID: 9719624.

143. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Curtis Ellison R, Eckfeldt JH, Rozen R. The 1298A-->C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis*. 2001 Jun;156(2):409-15. doi: 10.1016/s0021-9150(00)00671-7. PMID: 11395038.

144. 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 Dec;18(12):1257-1270. doi: 10.1080/14712598.2018.1545836. Epub 2018 Nov 14. PMID: 30408422; PMCID: PMC6299358.

145. Williams R, Airey M, Baxter H, Forrester J, Kennedy-Martin T, Girach A. Epidemiology of diabetic retinopathy and macular oedema: a systematic review. *Eye (Lond)*. 2004 Oct;18(10):963-83. doi: 10.1038/sj.eye.6701476. PMID: 15232600.

146. Wong TY, Cheung CM, Larsen M, Sharma S, Simó R. Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Mar 17;2:16012. doi: 10.1038/nrdp.2016.12. PMID: 27159554.

147. Wright AD, Martin N, Dodson PM. Homocysteine, folates, and the eye. *Eye (Lond)*. 2008 Aug;22(8):989-93. doi: 10.1038/sj.eye.6703061. Epub 2007 Dec 7. PMID: 18064053.

148. Xu WH, Zhuang Y, Han X, Yuan ZL. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and diabetic retinopathy risk: a meta-analysis of the Chinese population. *J Int Med Res*. 2020 Jan;48(1):300060518816834. doi: 10.1177/0300060518816834. Epub 2019 Jan 10. PMID: 30628508; PMCID: PMC7140216.

149. Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, Chen SJ, Dekker JM, Fletcher A, Grauslund J, Haffner S et al. ; Meta-Analysis for Eye Disease (META-EYE) Study Group. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2012 Mar;35(3):556-64. doi: 10.2337/dc11-1909. Epub 2012 Feb 1. PMID: 22301125; PMCID: PMC3322721.

150. Yigit S, Karakus N, Inanir A. Association of MTHFR gene C677T mutation with diabetic peripheral neuropathy and diabetic retinopathy. *Mol Vis*. 2013 Jul 25;19:1626-30. PMID: 23901246; PMCID: PMC3724957.

151. Yilmaz M, Aktug H, Oltulu F, Erbas O. Neuroprotective effects of folic acid on experimental diabetic peripheral neuropathy. *Toxicol Ind Health*. 2016;32:832-40.

152. Zahid S, Iqbal M, Ubaid A, Khan F. Homocystinuria in a 14-year old girl manifesting as central retinal artery occlusion: A case report. *J Pak Med Assoc*. 2020 Jul;70(7):1263-1265. doi: 10.5455/JPMA.23704. PMID: 32799285

153. Zamani M, Rezaiian F, Saadati S, Naseri K, Ashtary-Larky D, Yousefi M, Golalipour E, Clark CCT, Rastgoo S, Asbaghi O. The effects of folic acid supplementation on endothelial function in adults: a systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr J*. 2023 Feb 24;22(1):12. doi: 10.1186/s12937-023-00843-y. PMID: 36829207; PMCID: PMC9951414.

154. Zhang G, Sun X, Yuan T, Guo C, Zhou Z, Wang L, Dou G. Certain Dietary Nutrients Reduce the Risk of Eye Affliction/Retinopathy in Individuals with Diabetes: National Health and Nutrition Examination Survey, 2003-2018. *Int J Environ Res*



Public Health. 2022 Sep 26;19(19):12173. doi: 10.3390/ijerph191912173. PMID: 36231475; PMCID: PMC9566346.

155. Zhang W, Liu H, Al-Shabrawey M, Caldwell RW, Caldwell RB. Inflammation and diabetic retinal microvascular complications. *J Cardiovasc Dis Res*. 2011 Apr;2(2):96-103. doi: 10.4103/0975-3583.83035. PMID: 21814413; PMCID: PMC3144626.

156. Zheng L, Du Y, Miller C, Gubitosi-Klug RA, Kern TS, Ball S, Berkowitz BA. Critical role of inducible nitric oxide synthase in degeneration of retinal capillaries in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2007 Sep;50(9):1987-1996. doi: 10.1007/s00125-007-0734-9. Epub 2007 Jun 22. Erratum in: *Diabetologia*. 2007 Oct;50(10):2228. PMID: 17583794.

157. Zheng Y, He M, Congdon N. The worldwide epidemic of diabetic retinopathy. *Indian J Ophthalmol*. 2012 Sep-Oct;60(5):428-31. doi: 10.4103/0301-4738.100542. PMID: 22944754; PMCID: PMC3491270.

158. Zhong JH, Rodríguez AC, Yang NN, Li LQ. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and risk of type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*. 2013 Sep 4;8(9):e74521. doi: 10.1371/journal.pone.0074521. PMID: 24023947; PMCID: PMC3762795.

159. Zhu H, Shi CH. Analysis of the diagnostic value of plasma endothelin for diabetic retinopathy using the receiver operating characteristic curve. *Ophthalmic Res*. 2007;39(5):289-93. doi: 10.1159/000108123. Epub 2007 Sep 12. PMID: 17851270.

160. Zinck JW, de Groh M, MacFarlane AJ. Genetic modifiers of folate, vitamin B-12, and homocysteine status in a cross-sectional study of the Canadian population. *Am J Clin Nutr*. 2015 Jun;101(6):1295-304. doi: 10.3945/ajcn.115.107219. Epub 2015 May 6. PMID: 25948668.

161. Zintzaras E, Chatzoulis DZ, Karabatsas CH, Stefanidis I. The relationship between C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and retinopathy in type 2 diabetes: a meta-analysis. *J Hum Genet*. 2005;50(6):267-275. doi: 10.1007/s10038-005-0250-z. Epub 2005 May 18. PMID: 15902512.

## ДОДАТКИ

## Додаток А. Акти впровадження результатів роботи в науковий обіг та практичну діяльність

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор  
з наукової роботи та інновацій  
Національного медичного університету  
імені О. О. Богомольця МОЗ України  
д.мед.н., професор Сергій ЗЕМСКОВ



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

*Пропозиція для впровадження:* Патогенетична та діагностична значимість генетичного дефіциту фолатного циклу в розвитку діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет 2 типу.

*Установа – розробник, автор:* Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України (бульвар Тараса Шевченка, 13 м. Київ, 01601), автор – Прокопенко Юлія Валеріївна.

*Джерело інформації:* Прокопенко Ю.В. Асоціації поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу із вмістом вітамінів групи В у пацієнтів із діабетичною ретинопатією та цукровим діабетом 2 типу. Архів офтальмології України. 2022;10(2):23-30. doi: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.10.2.2022.298>

Риков С.О., Прокопенко Ю.В., Натрус Л.В., Панченко Ю.О.. Роль поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу у прогресуванні діабетичної ретинопатії пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. Офтальмологічний журнал (Україна). 2022;5:3-11. doi <http://doi.org/10.31288/ofthalmolzh20225311>

*Базова установа, яка проводить впровадження:* Національний медичний університет імені О.О. Богомольця.

*Форми впровадження:* матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри – лекційному курсі та при проведенні практичних занять та в лікувально-діагностичній роботі.

*Термін впровадження:* протягом 2023-2024 навчального року, Протокол №1 засідання кафедри офтальмології та оптометрії післядипломної освіти від 10.01.2024 року.

*Зуваження та пропозиції:* Отримані автором висновки дисертаційного дослідження рекомендовано до включення в програму лекцій підвищення кваліфікації лікарів та лікарів-інтернів.

Завідувач кафедри офтальмології  
та оптометрії післядипломної освіти  
член-кор. НАМН України,  
д.мед.н., професор

Сергій РИКОВ

## Продовження додатку А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи  
Дніпровського державного  
медичного університету  
д.мед.н., професор  
Олександр ГУДАР'ЯН



09 2024 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

*Пропозиція для впровадження:* Патогенетична та діагностична значимість генетичного дефіциту фолатного циклу в розвитку діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет 2 типу.

*Установа – розробник, автор:* Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України (бульвар Тараса Шевченка, 13 м. Київ, 01601), автор – Прокопенко Юлія Валеріївна.

*Джерело інформації:* Прокопенко Ю.В. Асоціації поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу із вмістом вітамінів групи В у пацієнтів із діабетичною ретинопатією та цукровим діабетом 2 типу. Архів офтальмології України. 2022;10(2):23-30. doi: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.10.2.2022.298>.

Риков С.О., Прокопенко Ю.В., Натрус Л.В., Панченко Ю.О. Роль поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу у прогресуванні діабетичної ретинопатії пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. Офтальмологічний журнал (Україна). 2022;5:3-11. doi <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh20225311>.

*Базова установа, яка проводить впровадження:* Дніпровський державний медичний університет.

*Форми впровадження:* матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри – лекційному курсі, при проведенні практичних занять та в лікувально-діагностичній роботі.

*Термін впровадження:* протягом 2022-2024 навчальних років, Протокол №11 засідання кафедри офтальмології від 17.01.2024 року.

*Зауваження та пропозиції:* Отримані автором висновки дисертаційного дослідження рекомендовано до включення в програму лекцій, семінарів та практичних занять підвищення кваліфікації лікарів, лікарів-інтернів та лікарів суміжних спеціальностей.

Відповідальний за впровадження:  
Асистент кафедри офтальмології  
Дніпровського державного  
медичного університету  
д.мед.н., професор

Василь САКОВИЧ



## Продовження додатку А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор  
з науково-педагогічної роботи  
та післядипломної освіти  
Національного медичного університету  
імені О.О. Богомольця МОЗ України  
член-кор. НАМН України, мед.н., професор



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

*Пропозиція для впровадження:* патогенетична та діагностична значимість генетичного дефіциту фолатного циклу в розвитку діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет 2 типу.

*Установа – розробник, автор:* Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України (бульвар Тараса Шевченка, 13 м. Київ, 01601), автор – Прокопенко Юлія Валеріївна.

*Джерело інформації:* Прокопенко Ю.В. Асоціації поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу із вмістом вітамінів групи В у пацієнтів із діабетичною ретинопатією та цукровим діабетом 2 типу. Архів офтальмології України. 2022;10(2):23-30. doi: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.10.2.2022.298>

Риков С.О., Прокопенко Ю.В., Натрус Л.В., Панченко Ю.О. Роль поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу у прогресуванні діабетичної ретинопатії пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. Офтальмологічний журнал (Україна). 2022;5:3-11. doi <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh20225311>

*Базова установа, яка проводить впровадження:* Національний медичний університет імені О.О. Богомольця.

*Форми впровадження:* матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри – лекційному курсі та при проведенні практичних занять, в лікувально-діагностичній роботі.

*Термін впровадження:* з 2022 навчального року.

*Зауваження та пропозиції:* Отримані автором висновки дисертаційного дослідження рекомендовано до включення в програму лекцій.

Завідувач кафедри офтальмології

д.мед.н., професор Жабоедов Д.Г.

## Продовження додатку А



ЗАТВЕРДЖУЮ  
В.о. ректора Львівського  
національного медичного університету  
імені Данила Галицького  
Орест ЧЕМЕРИС  
«    »    20    р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: Патогенетична та діагностична значимість генетичного дефіциту фолатного циклу в розвитку діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет 2 типу.
2. Установа-розробник, автор: Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України (бульвар Тараса Шевченка, 13 м. Київ, 01601), автор – Прокопенко Юлія Валеріївна.
3. Джерело інформації: Прокопенко ЮВ. Асоціації поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу із вмістом вітамінів групи В у пацієнтів із діабетичною ретинопатією та цукровим діабетом 2 типу. Архів офтальмології України. 2022;10(2):23-30.  
doi: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.10.2.2022.298>  
Риков СО, Прокопенко ЮВ, Натрус ЛВ, Панченко ЮО. Роль поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу у прогресуванні діабетичної ретинопатії пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. Офтальмологічний журнал (Україна). 2022;5:3-11. doi <http://doi.org/10.31288/ofthalmolzh20225311>
4. Базова установа, яка проводить впровадження: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра офтальмології ФПДО.
5. Форми впровадження: матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри – лекційному курсі та при проведенні практичних занять, в лікувально-діагностичній роботі.
6. Термін впровадження: з 2022 навчального року.
7. Зауваження та пропозиції: Отримані автором висновки дисертаційного дослідження рекомендовано до включення в програму лекцій підвищення кваліфікації лікарів, студентів і лікарів-інтернів.

Завідувач кафедри офтальмології ФПДО  
Львівського національного медичного університету  
імені Данила Галицького,  
д.мед.н., професор

Андрій ГУДЗЬ

## Продовження додатку А

ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший проректор закладу вищої освіти  
з науково-педагогічної роботи  
Полтавського державного медичногоуніверситету  
д.мед.н., професор Валентин ДВОРНИК

« 15 » \_\_\_\_\_ 2024 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**1.Пропозиція для впровадження:** Патогенетична та діагностична значимість генетичного дефіциту фолатного циклу в розвитку діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет 2 типу.

**2.Установа – розробник, автор:** Національний медичний університет імені О.О.Богомольця МОЗ України (бульвар Тараса Шевченка,13 м.Київ, 01601), автор – Прокопенко Юлія Валеріївна.

**3.Джерело інформації:** Прокопенко Ю.В. Асоціації поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу із вмістом вітамінів групи В у пацієнтів із діабетичною ретинопатією та цукровим діабетом 2 типу. Архів офтальмології України. 2022;10(2):23-30. doi: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.10.2.2022.298>.

Риков С.О., Прокопенко Ю.В., Натрус Л.В., Панченко Ю.О.. Роль поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу у прогресуванні діабетичної ретинопатії пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. Офтальмологічний журнал (Україна). 2022;5:3-11. doi <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh20225311>.

**4.Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра оториноларингології з офтальмологією Полтавський державний медичний університет.

**5.Форми впровадження:** матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри – лекційному курсі, при проведенні практичних занять та в лікувально-діагностичній роботі.

**6.Термін впровадження:** протягом 2022-2024 навчальних років.

**7.Зауваження та пропозиції:** Отримані автором висновки дисертаційного дослідження рекомендовано до включення в програму лекцій, семінарів та практичних занять підвищення кваліфікації лікарів, лікарів-інтернів та лікарів суміжних спеціальностей.

Протокол №10 засідання кафедри оториноларингології з офтальмологією від 11.01.2024 року.

Відповідальний за впровадження:

Професор закладу вищої освіти кафедри оториноларингології з офтальмологією д.мед.н., професор



Ірина БЕЗКОРОВАЙНА



## Продовження додатку А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної  
та лікувальної роботи  
Буковинського державного  
медичного університету  
д.мед.н., професор Ілашук Т.О.

« 15 » 01 2024 р.



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

*Пропозиція для впровадження:* Патогенетична та діагностична значимість генетичного дефіциту фолатного циклу в розвитку діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет 2 типу.

*Установа – розробник, автор:* Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України (бульвар Тараса Шевченка, 13 м. Київ, 01601), автор – Прокопенко Юлія Валеріївна.

*Джерело інформації:* Прокопенко Ю.В. Асоціації поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу із вмістом вітамінів групи В у пацієнтів із діабетичною ретинопатією та цукровим діабетом 2 типу. Архів офтальмології України. 2022;10(2):23-30. doi: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.10.2.2022.298>.

Риков С.О., Прокопенко Ю.В., Натрус Л.В., Панченко Ю.О. Роль поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу у прогресуванні діабетичної ретинопатії пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. Офтальмологічний журнал (Україна). 2022;5:3-11. doi <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh20225311>.

*Базова установа, яка проводить впровадження:* Буковинський державний медичний університет.

*Форми впровадження:* матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри – лекційному курсі, при проведенні практичних занять та в лікувально-діагностичній роботі.

*Термін впровадження:* протягом 2023-2024 навчального року, протокол №11 засідання кафедри дитячої хірургії, отоларингології та офтальмології від 26.01.2024 року.

*Зауваження та пропозиції:* Отримані автором висновки дисертаційного дослідження рекомендовано до включення в програму лекцій, семінарів та практичних занять підвищення кваліфікації лікарів, лікарів-інтернів та лікарів суміжних спеціальностей.

Відповідальний за впровадження:  
Професор кафедри дитячої хірургії,  
отоларингології та офтальмології  
Буковинського державного медичного  
університету,  
д.мед.н., доцент

М. А. Карлійчук

## Продовження додатку А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор Медичного центру ТОВ ОКТАР  
«Центр оптичної реабілітації ОКТАР»

І. І. Рассулова

« 21 » березня 2023 р.



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

*Пропозиція для впровадження:* Патогенетична та діагностична значимість генетичного дефіциту фолатного циклу в розвитку діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет 2 типу.

*Установа – розробник, автор:* Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України (бульвар Тараса Шевченка, 13 м. Київ, 01601), автор – Прокопенко Юлія Валеріївна.

*Джерело інформації:* Прокопенко Ю.В. Асоціації поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу із вмістом вітамінів групи В у пацієнтів із діабетичною ретинопатією та цукровим діабетом 2 типу. Архів офтальмології України. 2022;10(2):23-30. doi: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.10.2.2022.298>

Риков С.О., Прокопенко Ю.В., Натрус Л.В., Панченко Ю.О.. Роль поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу у прогресуванні діабетичної ретинопатії пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. Офтальмологічний журнал (Україна). 2022;5:3-11. doi <http://doi.org/10.31288/ofthalmolzh20225311>.

*Базова установа, яка проводить впровадження:* Медичний центр ТОВ ОКТАР «Центр оптичної реабілітації ОКТАР».

*Форми впровадження:* матеріали використовуються в лікувально-діагностичній роботі.

*Термін впровадження:* січень 2023 – березень 2024 року.

*Зауваження та пропозиції:* впровадження дозволить підвищити ефективність діагностики пацієнтів з діабетичною ретинопатією у хворих на цукровий діабет 2 типу, дозволить зробити обґрунтований вибір тактики лікування хворих на цукровий діабет 2 типу, ретинопатією, попередити ускладнення, підвищити результати лікування пацієнтів з діабетичною ретинопатією у хворих на цукровий діабет 2 типу та допомогти у виборі подальшої тактики диспансерного нагляду за пацієнтами з діабетичною ретинопатією.

Відповідальний за впровадження:

Лікар офтальмолог вищої  
кваліфікаційної категорії

 О. В. Крючко



## Продовження додатку А



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
**НАЦІОНАЛЬНА ДИТЯЧА СПЕЦІАЛІЗОВАНА ЛІКАРНЯ**  
**«ОХМАТДИТ»**  
 (НДСЛ «Охматдит» МОЗ України)  
 ЄДРПОУ 01994089

01135 м. Київ  
 вул. В. Чорновола 28/1

тел.: 236-69-42, факс: 236-61-65  
 e-mail: office@ohmatdyt.com.ua

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

*Пропозиція для впровадження:* Патогенетична та діагностична значимість генетичного дефіциту фолатного циклу в розвитку діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет 2 типу.

*Установа – розробник, автор:* Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України (бульвар Тараса Шевченка, 13 м. Київ, 01601), автор – Прокопенко Юлія Валеріївна.

*Джерело інформації:* Прокопенко Ю.В. Асоціації поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу із вмістом вітамінів групи В у пацієнтів із діабетичною ретинопатією та цукровим діабетом 2 типу. Архів офтальмології України. 2022;10(2):23-30. doi: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.10.2.2022.298>

Риков С.О., Прокопенко Ю.В., Натрус Л.В., Панченко Ю.О.. Роль поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу у прогресуванні діабетичної ретинопатії пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. Офтальмологічний журнал (Україна). 2022;5:3-11. doi <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh20225311>.

*Базова установа, яка проводить впровадження:* Національна дитяча спеціалізована лікарня МОЗ України «ОХМАТДИТ».

*Форми впровадження:* матеріали використовуються в лікувально-діагностичній роботі.

*Термін впровадження:* січень 2023 – березень 2024 року.

*Зауваження та пропозиції:* впровадження дозволить підвищити ефективність діагностики пацієнтів з діабетичної ретинопатією у хворих на цукровий діабет 2 типу, дозволить зробити обґрунтований вибір тактики лікування хворих на цукровий діабет 2 типу, ретинопатією, попередити ускладнення, підвищити результати лікування пацієнтів з діабетичної ретинопатією у хворих на цукровий діабет 2 типу та допомогти у виборі подальшої тактики диспансерного нагляду за пацієнтами з діабетичної ретинопатією.

**Продовження додатку А**

Відповідальний за впровадження:  
Завідувач відділення дитячої  
офтальмології та мікрохірургії ока  
Д.мед.н. професор

Юрій БАРИНОВ

Медичний директор

Сергій ЧЕРНИШУК



## Продовження додатку А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Директор ТОВ «Медичний центр  
«ОЧІ КЛІНІК» (м. Київ)

Жмурик Т.М.  
\_\_\_\_\_ 2024 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

*Пропозиція для впровадження.* Клінічні рекомендації індивідуального ведення пацієнтів із діабетичною ретинопатією при цукровому діабеті 2 типу з метою націленої терапії конкретних патогенетичних ланок встановлених генетичних особливостей у вигляді дефіциту ферментів фолатного циклу та ознак фенотипу.

*Установа-розробник, автор.* Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України (бульвар Тараса Шевченка, 13 м. Київ, 01601), автор – Прокопенко Юлія Валеріївна.

*Джерело інформації.* Прокопенко Ю.В. Асоціації поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу із вмістом вітамінів групи В у пацієнтів із діабетичною ретинопатією та цукровим діабетом 2 типу. Архів офтальмології України. 2022;10(2):23-30. doi: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.10.2.2022.298>

Риков СО, Прокопенко ЮВ, Натрус ЛВ, Панченко ЮО. Роль поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу у прогресуванні діабетичної ретинопатії пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. Офтальмологічний журнал (Україна). 2022;5:3-11. doi: <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh20225311>

*Базова установа, що впроваджує.* ТОВ «Медичний центр «ОЧІ КЛІНІК» (м. Київ).

*Форми впровадження.* Матеріали використовуються в лікувально-діагностичній роботі.

*Термін впровадження.* 2022-2024 роки.

*Ефективність впровадження.* Запропоновані автором рекомендації прогнозування розвитку ДР при ЦД2 дозволили в індивідуальному порядку поліпшити діагностику та обрання тактики лікування хворих на заставках особливостей зв'язку їх генетично детермінованого дефіциту ферментів фолатного циклу та ознак фенотипу.

*Зауваження та пропозиції.* Зауважень немає. Рекомендовано для застосування в клінічній практиці.

Відповідальний за впровадження:

головний лікар

ТОВ «Медичний центр «ОЧІ КЛІНІК»

д.мед.н.

Жмурик Д.В.



## Продовження додатку А


**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**  
 Директор медичного центру «ЛАЗЕР Плюс»  
 (ПТТ «Львів Сапфір», м. Львів)  
 Куцин І.М.  
 14.03.2024

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**Пропозиція для впровадження.** Рекомендації прогнозування перебігу ДР та засоби профілактики прогресування ендотеліальної дисфункції з урахуванням поліморфних варіантів генів та особливостей метаболізму хворих на ЦД2 на основі аналізу внеску кожного фактору фенотипу.

**Установа-розробник, автор.** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України (бульвар Тараса Шевченка, 13 м. Київ, 01601), автор – Прокопенко Юлія Валеріївна.

**Джерело інформації.** Прокопенко ЮВ. Асоціації поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу із вмістом вітамінів групи В у пацієнтів із діабетичною ретинопатією та цукровим діабетом 2 типу. Архів офтальмології України. 2022;10(2):23-30. doi: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.10.2.2022.298>

Риков СО, Прокопенко ЮВ, Натрус ЛВ, Панченко ЮА. Роль поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу у прогресуванні діабетичної ретинопатії пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. Офтальмологічний журнал (Україна). 2022;5:3-11. doi: <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh20225311>

**Базова установа, що впроваджує.** Медичний центр «ЛАЗЕР Плюс» (ПТТ «Львів Сапфір», м. Львів).

**Форми впровадження.** Матеріали роботи використовувались в клінічній практиці при діагностиці та виборі методу консервативного і хірургічного лікування та післяопераційного ведення пацієнтів з діабетичною ретинопатією при цукровому діабеті 2 типу.

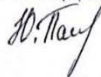
**Термін впровадження.** 2022-2023 рр.

**Ефективність впровадження.** Нові методи прогнозування перебігу ДР та засоби профілактики прогресування ендотеліальної дисфункції дозволили поліпшити спостереження та лікування пацієнтів із ДР та ЦД2.

**Зауваження та пропозиції.** Зауважень немає. Рекомендовано для застосування в клінічній практиці.

#### ВІДПОВІДАЛЬНИЙ ЗА ВПРОВАДЖЕННЯ:

Головний лікар



д.мед.н., доцент Панченко Ю.О.

## Продовження додатку А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ПП «Світ Здоров'я»

Дуфинець В.А.

«28» Березня 2024 р.



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

*Пропозиція для впровадження:* Патогенетична та діагностична значимість генетичного дефіциту фолатного циклу в розвитку діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет 2 типу.

*Установа – розробник, автор:* Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України (бульвар Тараса Шевченка, 13 м. Київ, 01601), автор – Прокопенко Юлія Валеріївна.

*Джерело інформації:* Прокопенко Ю.В. Асоціації поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу із вмістом вітамінів групи В у пацієнтів із діабетичною ретинопатією та цукровим діабетом 2 типу. Архів офтальмології України. 2022;10(2):23-30. doi: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.10.2.2022.298>

Риков С.О., Прокопенко Ю.В., Натрус Л.В., Панченко Ю.О.. Роль поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу у прогресуванні діабетичної ретинопатії пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. Офтальмологічний журнал (Україна). 2022;5:3-11. doi <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh20225311>.

*Базова установа, яка проводить впровадження:* ПП «Світ Здоров'я».

*Форми впровадження:* матеріали використовуються в лікувально-діагностичній роботі.

*Термін впровадження:* січень 2023 – березень 2024 року.

*Зуваження та пропозиції:* впровадження дозволить підвищити ефективність діагностики пацієнтів з діабетичною ретинопатією у хворих на цукровий діабет 2 типу, дозволить зробити обґрунтований вибір тактики лікування хворих на цукровий діабет 2 типу, ретинопатією, попередити ускладнення, підвищити результати лікування пацієнтів з діабетичною ретинопатією у хворих на цукровий діабет 2 типу та допомогти у виборі подальшої тактики диспансерного нагляду за пацієнтами з діабетичною ретинопатією.

Відповідальний за впровадження:

Лікар офтальмолог вищої кваліфікаційної категорії

В. В. Тихомирова

## Додаток Б. Список публікацій здобувача за темою дисертації

*Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації*

1. Прокопенко ЮВ. Асоціації поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу із вмістом вітамінів групи В у пацієнтів із діабетичною ретинопатією та цукровим діабетом 2 типу. Архів офтальмології України. 2022;10(2):23-30. doi: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.10.2.2022.298>.

2. Риков СО, Прокопенко ЮВ, Натрус ЛВ, Панченко ЮА. Роль поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу у прогресуванні діабетичної ретинопатії пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. Офтальмологічний журнал (Україна). 2022;5:3-11. doi <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh20225311>.

3. Риков СО, Прокопенко ЮВ. Вміст ендотеліну-1 в плазмі крові пацієнтів з діабетичною ретинопатією на тлі цукрового діабету 2 типу в залежності від поліморфних варіантів генів MTHFR, MTRR I MTR. Медична наука України. 2023;19(3):37-47. doi: <https://doi.org/10.32345/2664-4738.3.2023.06>.

*Наукові праці які засвідчують апробацію матеріалів дисертації*

4. Прокопенко ЮВ, Риков СО. Оцінка асоціацій поліморфізмів генів MTHFR C677T, MTR A2756G, MTHFR A1298C із розвитком діабетичної ретинопатії у пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. Grail of Science. 2022;17: 458–459. doi: <https://doi.org/10.36074/grail-of-science.22.07.2022.079> (форма участі: публікація тез, стендова доповідь).

5. Прокопенко ЮВ. Оцінка асоціацій поліморфізмів генів MTHFR C677T, MTR A2756G, MTHFR A1298C із розвитком діабетичної ретинопатії у пацієнтів на цукровий діабет 2 типу. В: Риков СО (ред). СВОЄ ДИТИНСТВО ТРЕБА БАЧИТИ`21: науково-практична конференція дитячих офтальмологів та оптометристів України з міжнародною участю 11 червня 2022 року: збірник праць. Київ; 2022, с. 44-45. doi: <http://ir.nuozu.edu.ua:8080/handle/lib/4513> (форма участі: публікація тез, усна доповідь).

6. Прокопенко ЮВ, Риков СО, Натрус ЛВ. Вплив гомоцистеїнемії на прогресування діабетичної ретинопатії у пацієнтів на цукровий діабет 2 типу із

різними варіантами поліморфізмів генів фолатного циклу. В: Promising ways of improving science and scientific solutions : Abstracts of XXV International Scientific and Practical Conference, Warsaw, Poland (June 26 – 28, 2023). Warsaw, Poland; 2023, с. 101-102. Доступно з: <https://eu-conf.com/wp-content/uploads/2023/05/PROMISING-WAYS-OF-IMPROVING-SCIENCE-AND-SCIENTIFIC-SOLUTIONS.pdf> (форма участі: публікація тез, стендова доповідь).

## **Додаток В. Апробації дисертації**

Основні положення дисертаційної роботи були викладені й обговорені на:

- науково-практичній конференції дитячих офтальмологів та оптометристів України з міжнародною участю «Своє дитинство треба бачити`22» (2022, Київ);
- III Correspondence International Scientific and Practical Conference «Science of post-industrial society: globalization and transformation processes» (2022, Vinnytsia (Ukraine) – Vienna (Austria));
- XXV International Scientific and Practical Conference (2023, Warsaw, Poland).