

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Ганюк Вероніка Миколаївна

УДК: 616.379-008.65-06:617.735-036.67-039.71

ДИСЕРТАЦІЯ

**ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОФІЛАКТИКИ ПРОГРЕСУВАННЯ ДІАБЕТИЧНОЇ
РЕТИНОПАТІЇ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ 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

_____ В. М. Ганюк
(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник: Петренко Оксана Василівна, доктор медичних наук,
професор

Київ – 2024

АНОТАЦІЯ

Ганюк В. М. Оптимізація профілактики прогресування діабетичної ретинопатії при цукровому діабеті 2 типу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 – «Медицина», 22 – «Охорона здоров'я». – Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України, Київ, 2024.

Дисертація присвячена вирішенню актуального наукового завдання сучасної офтальмології – оптимізації профілактики прогресування діабетичної ретинопатії при цукровому діабеті 2 типу на підставі вивчення комплексу несудинних механізмів: активації нитрозативного стресу, порушення функції глюкозних мембранних транспортерів, регуляції обміну жирних кислот, структурно-функціональних змін клітинних мембран, які поглиблюють стан гіпоксії і сприяють виникненню проліферативних процесів сітківки.

Обґрунтування вибору теми дослідження. Цукровий діабет є глобальною епідемією з високими показниками захворюваності та смертності. За прогнозами, до 2045 року кількість людей з діабетом у всьому світі досягне 629 мільйонів, що становитиме 10% світового населення (Cho NH, 2018). Діабетична ретинопатія (ДР), основне мікросудинне ускладнення діабету, є основною причиною сліпоти у дорослих працездатного віку. Об'єднаний аналіз 35 популяційних досліджень у всьому світі (22 896 учасників) показав загальну поширеність 34,6% ДР (Yau JW, 2023), включаючи важку непроліферативну ДР (НДР), проліферативну ДР (ПДР) та клінічно значущий діабетичний макулярний набряк (ДМО). Раннє виявлення та успішне лікування ПДР можуть запобігти до 98% випадків втрати зору, спричиненої діабетичними ускладненнями. Отже, вивчення факторів розвитку, поглиблення ДР може допомогти ранньому виявленню ускладнення та запобігти його поглибленню у пацієнтів із найбільшим

ризиком (Yan J, 2023).

Дослідження особливостей протікання ДР при цукровому діабеті 2 типу (ЦД2) в залежності від тривалості основного захворювання показують на те, що ризик розвитку ДР не пов'язаний лінійно з впливом тих чи інших факторів. Проте, виникає багато доказів, що дія факторів може бути кумулятивною. Отже, ймовірність виникнення ДР може збільшуватися після активації ряду механізмів, які несуть загрозу порушенню зору (Hsieh YT, 2018). Показано, що у 20,8% людей ЦД2 ДР спостерігається вже при початковому діагнозі діабету протягом перших 4-7 років. Таким чином, перший пік проблем із зором, спричинених ретинопатією, може виникнути протягом перших трьох років після встановлення діагнозу ЦД2 (Yan J, 2023).

Дослідження механізмів розвитку ДР які призводять до ушкодження сітківки залишаються важливими питаннями сучасної офтальмології, ендокринології, діабетології тощо (Bhatti JS, 2022). Як правило, більшість уваги приділяється вивченню механізмів проліферації – стадії ДР, коли виникають масивні крововиливи в сітківку, склоподібне тіло, неоваскуляризація диска та/або периферичних ділянок сітківки, фіброзна тканина з зони преретинальних крововиливів тощо.

При цьому, недостатньо вивчені несудинні механізми, які формують умови гіпоксії тканини, призводять до накопичення шкідливих метаболітів визначають ступінь обмінних порушень. Комплекс не судинних, а точніше, не локальних змін і призводить до виникнення мікро- та макросудинних ускладнень, які є візитівкою цукрового діабету. Звісно, що і ЦД1 і ЦД2 мають такі прояви у вигляді нефропатії, нейропатії, ретинопатії тощо. Але ж у пацієнтів ЦД2 можна більш детально спостерігати розвиток цих механізмів за рахунок їх повільного розвитку.

Вважаємо актуальним у пацієнтів з ПДР на тлі ЦД2 вивчити схильність до підвищення активності ферментів, активаторів нітрозативно-оксидативного стресу, особливості глюкозного трансмембранного переносу, впливу регуляторів ліпідного обміну та дисбалансу жирних кислот, які у

свою чергу визначають зміни структури і функції мембран еритроцитів за умов гіпоксії і гіперглікемії. Вказані несудинні механізми відіграють далеко не другорядну роль у розвитку та поглибленню ПДР і повинні розглядатися як потенційні цілі фармакологічної корекції у пацієнтів з ЦД2.

Мета дослідження. Оптимізувати профілактику прогресування діабетичної ретинопатії при цукровому діабеті 2 типу шляхом вивчення умов нітрозативного стресу, глюкозних транспортерів, регуляції обміну жирних кислот, структурно-функціональних змін клітинних мембран, які поглиблюють стан гіпоксії і сприяють виникненню проліферативних процесів сітківки.

Відповідно до мети дослідження були вирішені наступні **завдання**:

1. Проаналізувати вміст аргінази-1 в сироватці крові у пацієнтів на ПДР із різною тривалістю ЦД2 в залежності від генотипу CYP2E1.
2. Вивчити вміст транспортерів сімейства GLUT-1 та фактору, індукованого гіпоксією (HIF-1 α) в крові пацієнтів на ПДР із різною тривалістю ЦД2.
3. Дослідити стан ліпідного метаболізму за вмістом ЖК в клітинних мембранах пацієнтів на ПДР із різною тривалістю ЦД2, у співставленні із рівнем регуляторного внутрішньоклітинного шаперону L-FABP в сироватці крові.
4. Вивчити морфо-функціональні характеристики та структурні властивості еритроцитів за допомогою оцінки осмотичної та механічної резистентності клітин у пацієнтів на ПДР із різною тривалістю ЦД2.
5. Розробити рекомендації щодо прогнозування перебігу захворювання та засоби профілактики прогресування гіпоксії сітківки з урахуванням активації несудинних механізмів розвитку ДР у пацієнтів із різною тривалістю ЦД2.

Першим етапом дослідження був аналіз вмісту аргінази-1 у сироватці крові пацієнтів для з'ясування ролі даного метаболіту нітрозативного обміну при поглибленні ПДР та зв'язку із тривалістю ЦД2. Враховуючи переконливі

дані про наявність у пацієнтів з ПДР на тлі ЦД2 оксидативно-нітрозативного стресу, нашою нульовою гіпотезою було підвищення аргінази-1 у пацієнтів. Було встановлено підвищення вмісту аргінази-1 у пацієнтів з ПДР на тлі ЦД2 тривалістю понад 20 років. Вивчення вмісту аргінази-1 у пацієнтів з різним ступенем ушкодження сітківки виявилось не лінійним. Також ми намагалися пов'язати вміст ферменту із поліморфізмом гену CYP2E1, який бере участь у процесах виведення метаболітів нітрозативного складу. Отже, достовірне підвищення аргінази-1 ми спостерігали лише при початковому розвитку ПДР і у носіїв алелю G гену CYP2E1. Подальше поглиблення стадії ПДР не приводило до підвищення ферменту, а навпаки, ми спостерігали його зниження у пацієнтів із тяжкою ПДР. Ймовірно, при виникненні ПДР з непродуктивної ДР, коли захворювання переходить у стадію проліферації і активуються судинні механізми ушкодження сітківки, відбувається критичний вплив надекспресії аргінази, як компоненту оксидативно-нітрозативного стресу.

Наступним етапом було дослідження шляхів забезпечення рівня глюкози в клітині через транспортерів сімейства GLUT, а також ефект реакції клітин на гіпоксію через вимірювання в плазмі фактору, індукованого гіпоксією (HIF-1 α). Встановлено підвищення вмісту GLUT3 у пацієнтів з ПДР, яке не залежало від ступеня ушкодження сітківки, тривалості ЦД2 і концентрації глюкози. Було припущено, що цей механізм транспорту до клітини є основною патогенетичною ланкою глюкозотоксичності в нейронах на тлі хронічної гіперглікемії. Ми не виявили достовірного коливання вмісту транспортерів GLUT1 та GLUT4 у плазмі пацієнтів із різною стадією ПДР та тривалістю ЦД2 і осіб контрольної групи. Ми висловили думку про генетично детерміновані механізми, спрямовані для базової підтримки гомеостазу і не залученими до виникнення мікросудинних ускладнень на тлі ЦД2. Вміст HIF-1 α у пацієнтів був вище на 25%, проте не відрізнявся в залежності від стадії поглиблення ПДР та тривалості ЦД2.

Наступний етап був спрямований на дослідження порушення ліпідного

обміну, який ми оцінювали шляхом вимірювання спектру жирних кислот (ЖК) у мембранах клітин. Моделлю клітинної мембрани були еритроцити крові. Спектр основних ЖК в мембранах еритроцитів пацієнтів з ПДР не змінювався достовірно у залежності від тривалості ЦД2 і стадії ПДР. Проте ми виявили достовірне підвищення вмісту насиченої пальмітинової ЖК, і зниження вмісту ненасичених лінолевої і арахідонової ЖК відносно показників КГ. Аналіз харчового раціону пацієнтів і вживання ними продуктів (зокрема олій), що є джерелом дефіцитних ЖК виявилось не ефективним для встановлення балансу ЖК. Тому, ми припустили існування іншого ендogenousного механізму регуляції ліпідного обміну. Дослідження в плазмі важливого регуляторного шаперону L-FABP показала його участь у процесах регуляції. У пацієнтів на ПДР вміст протеїну був більше, ніж в групі здорових осіб і чітко корелювала із тривалістю захворювання на ЦД2, що підтвердило нашу гіпотезу.

Вивчення ролі зміни властивостей еритроцитів у пацієнтів з ПДР ми провели по показникам гемограми та шляхом вимірювання осмотичної і механічної резистентності. Виявили тенденцію до зменшення кількості еритроцитів у пацієнтів з ПДР. Ми припустили, що це пов'язане із скороченням перебування клітин в кровотоці через передчасне руйнування мембрани. Оскільки осмотичний гемоліз еритроцитів у пацієнтів з ПДР був вище, ніж у осіб КГ, хоча його ступінь не відрізняється в залежності від тривалості ЦД2. Також ми виявили підвищення механічного гемолізу еритроцитів у пацієнтів з ПДР, що є свідченням зменшення структурної стійкості клітин і втрати властивостей до механізмів ефективної перфузії, що неминуче поглиблює порушення мікроциркуляції.

Таким чином, ми показали, що несудинні механізми розвитку ПДР, які сприяють порушенню мікроциркуляції, мають значний вклад у патогенез захворювання і мають розглядатися як мішені для терапевтичних схем при веденні пацієнтів із ЦД2. Надекспресія аргінази-1 у носіїв алелю G гену CYP2E1 визначає ланку оксидативно-нітрозативного стресу, підвищення

вмісту транспортера глюкози GLUT3 обґрунтовує глюкотоксичність в нейронах, підвищення шаперону L-FABP в сироватці крові призводить до відсутності ефективної регуляції ліпідного обміну й дисбалансу ЖК через дієтичні та харчові рекомендації, підвищена хімічна та механічна ламкість еритроцитарних мембран створює умови гіпоксії та поглиблення мікроциркуляції. Вказані патогенетичні ланки необхідно враховувати для прогнозування перебігу захворювання і розробці засобів профілактики прогресування ДР у пацієнтів із різною тривалістю ЦД2.

Наукова новизна одержаних результатів. Доповнені наукові дані щодо комплексу несудинних механізмів розвитку ендотеліальної дисфункції та поглибленню проліферативної ДР у пацієнтів із ЦД2. Вперше у пацієнтів із різною тривалістю ЦД2 (до та більше 20 років) було вивчено вміст аргінази-1, ферменту, що експресується в ендотелії і сприяє накопиченню оксидантів. Було доведено, що вміст ферменту підвищений у пацієнтів із ПДР, і достовірно коливається в залежності від стадії ПДР у пацієнтів із різним генотипом гену CYP2E1 (rs2070676), який кодує фермент, що бере участь у метаболізмі ліків, інактивації N-нітрозамінів, поліциклічних вуглеводів тощо.

Розширені наукові дані про рівні глюкозних транспортерів сімейства GLUT у пацієнтів з ПДР та ЦД2. Вперше було показано роль GLUT3 як основної патогенетичної ланки глюкотоксичності в нейронах на тлі хронічної гіперглікемії, і доведена не причетність GLUT1 та GLUT4 до прогресування ДР.

Встановлені коливання спектру ЖК у пацієнтів з ПДР, які не залежали від екзогенного надходження харчових продуктів із аналогічним складом ЖК. Такий дисбаланс ЖК в мембранах клітин виникав через порушення транспорту ЖК і впливу шаперону L-FABP, як механізму регуляції ліпідного обміну.

Доповнені наукові дані щодо морфо-функціональних властивостей еритроцитів та їх гематологічних характеристик, як важливий елемент

забезпечення тканинного дихання, механізмів ефективної перфузії та гіпоксії тканин при ПДР та ЦД2.

Практичне значення отриманих результатів. Встановлено, що у пацієнтів на стадії помірної ПДР спостерігається критичний вплив надекспресії аргінази-1, який є шкідливим для ендотеліальних клітин. Носії поліморфного варіанту CYP2E1 зокрема алелю G але мали підвищену схильність до експресії аргінази-1 та її коливанням при розвитку ПДР. При спостереженні такого контингенту хворих варто враховувати підвищені ризики до ушкоджень тканин ока через оксидативно-нітрозативний стрес і призначати відповідну терапію.

Доведено, що спроба вплинути на ліпідний обмін і компенсувати дисбаланс основних ЖК в мембранах клітин через харчові рекомендації вживання олій із певними компонентами ЖК, не є ефективною у пацієнтів з ПДР на тлі ЦД2. При лікуванні таких пацієнтів варто враховувати глибокі внутрішньоклітинні механізми регуляції ліпідного обміну, зокрема шляхом впливу на регуляторні шляхи шаперону L-FABP.

Виявлені знижені показники осмотичної та механічної резистентності еритроцитів у пацієнтів з ПДР, що варто враховувати при оцінці гематологічних параметрів, характеристиці анемічного синдрому та лікуванні пацієнтів з ДР та ЦД2.

На основі отриманих фактів та вивчених закономірностей охарактеризовані несудинні механізми розвитку ПДР, які мають значний вклад у патогенез захворювання і мають розглядатися як мішені для терапевтичних схем при веденні пацієнтів із ЦД2. Вказані патогенетичні ланки необхідно враховувати для прогнозування перебігу захворювання і розробці засобів профілактики прогресування ДР у пацієнтів із різною тривалістю ЦД2.

Ключові слова: цукровий діабет 2 типу, діабетична ретинопатія, профілактика, прогресування, ліпідний обмін, поліморфізм генів, аргіназа-1, GLUT1, GLUT3, GLUT4, HIF-1 α , жирні кислоти, L-FABP, еритроцити.

Список публікацій здобувача за темою дисертації.

Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:

1. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Вивчення факторів впливу на обмін жирних кислот у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету. Архів офтальмології України. 2020; 8(1):25-32. doi: 10.22141/2309-8147.8.1.2020.200733

2. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ, Прусак ОІ. Морфофункціональні та структурні зміни еритроцитів пацієнтів із проліферативною діабетичною ретинопатією та різною тривалістю цукрового діабету 2 типу. Офтальмологічний журнал. 2021; 5:21-7. doi: <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh202152127>

3. Ганюк ВМ. Вміст аргінази-1 у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію з різною тривалістю цукрового діабету залежно від генотипу CYP2E1. Архів офтальмології України. 2023; 11(1):6-11. doi: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.11.1.2023.311>

4. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Глюкозні транспортери сімейства GLUT у патогенезі проліферативної діабетичної ретинопатії у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу. Фізіологічний журнал. 2023; 69(3):31-8. doi: <https://doi.org/10.15407/fz69.03.031>

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

5. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ, Іванюта ЕП. Регуляція ліпідного метаболізму у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету. Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні питання офтальмології»; Вер 23-24 2020; телеміст Одеса-Тернопіль; 2020, 49-51.

6. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Сироватковий вміст аргінази-1 у пацієнтів на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету в залежності від генотипу CYP2E1. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Рефракційний пленер`20»,

Жовт 15-17 2020; Київ; 2020, 47-9.

7. Hanyuk V, Petrenko O, Natrus L. Analysis of erythrocytes' parameters in patients with varying degrees of diabetic retinopathy. Tbilisi International Ophthalmology Conference - TIOC 2020, abstract book, Dec 19-20 2020; Tbilisi, Georgia; 2020, 46-7.

8. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Вивчення осмотичної резистентності еритроцитів хворих з проліферативною діабетичною ретинопатією та різною тривалістю цукрового діабету. IX Науково-практична конференція дитячих офтальмологів та оптометристів України з міжнародною участю «Своє дитинство треба бачити`2021» Чер 10-12 2021, збірник праць / під редакцією професора С. О. Рикова. Бугаз Одеської області; 2021, 98-9.

9. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ, Зелінська МВ. Зв'язок рівня L-FABP у сироватці крові хворих з проліферативною діабетичною ретинопатією з різною тривалістю цукрового діабету в залежності від генотипу CYP2E1. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Філатовські читання-2021». Трав 20-21 2021. Одеса, "Чорномор'я".

10. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Вплив гіперглікемії на резистентність еритроцитів пацієнтів із проліферативною діабетичною ретинопатією на тлі цукрового діабету 2 типу. «Рефракційний пленер`21»: науково-практична конференція з міжнародною участю, Жовт 29-30 2021, збірник праць / під редакцією член-кореспондента НАМН України, професора С. О. Рикова. Київ; 2021.

11. Петренко ОВ, Прусак ОІ, Ганюк ВМ. Профілактика антибіотикорезистентності при лікуванні кон'юнктивітів в умовах пандемії COVID-19. Матеріали XVIII з'їзду всеукраїнського лікарського товариства та історико-термінологічної конференції ВУЛТ. Лист 5-6 2021. Українські Медичні Вісті. 2022; 14(1-2(90-91)):63-4.

12. Петренко ОВ, Прусак ОІ, Ганюк ВМ. Дитяча травма ока воєнного

часу. «Своє дитинство треба бачити`22»: науково-практична конференція дитячих офтальмологів та оптометристів України з міжнародною участю Чер 11 2022, збірник праць / під редакцією професора С. О. Рикова. Київ; 2022,

13. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Вивчення вмісту глюкозних транспортерів у пацієнтів із проліферативною діабетичною ретинопатією на тлі цукрового діабету 2 типу. «Рефракційний пленер`2022»: науково-практична конференція з міжнародною участю, Жов 20-21 2022, збірник праць / за редакцією член-кореспондента НАМН України, професора С. О. Рикова. Київ; 2022, 102.

14. Риков СО, Петренко ОВ, Ганюк ВМ, Натрус ЛВ. Вміст аргінази-1 у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету в залежності від генотипу CYP2E1. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Філатовські читання-2023». Трав 24-26 2023. Одеса; 2023, 90-1.

ANNOTATION

Haniuk V. M. Optimization of the prevention of diabetic retinopathy progression in type 2 diabetes. Qualifying research paper as a manuscript.

The thesis for the Degree of Doctor of Philosophy in specialty 222 – Medicine. Branch of knowledge 22 Health care. – Bogomolets National Medical University, Kyiv, 2024.

The thesis focuses on addressing a contemporary scientific challenge in modernophthalmology: enhancing the prevention of diabetic retinopathy progression in type 2 diabetes mellitus by examining a range of non-vascular mechanisms: activation of nitrosative stress, impaired function of glucose membrane transporters, regulation of fatty acid metabolism, structural and functional changes in cell membranes that worsen hypoxia condition and contribute to the emergence of retinal proliferative processes.

Research topicality. Diabetes mellitus is a global epidemic with high rates of

morbidity and mortality. By the year 2045, it is estimated that diabetic population worldwide will grow to approximately 629 million individuals, accounting for 10% of the global population (Cho NH, 2018). Diabetic retinopathy (DR), a major microvascular complication of diabetes, is the leading cause of blindness in working-age adults.

A pooled analysis of 35 population-based studies worldwide (22 896 participants) showed an overall prevalence of 34.6% of DR (Yau JW, 2023), including severe non-proliferative DR (NPDR), proliferative DR (PDR), and clinically significant diabetic macular oedema (DMO). Early detection and successful treatment of PDR can prevent up to 98% cases of vision loss caused by diabetic complications.

Therefore, studying the factors which contribute to the progression of diabetic retinopathy (DR) can aid in its early detection and mitigate its advancement among high-risk patients (Yan J, 2023). Research examining how diabetic retinopathy (DR) progresses in individuals with type 2 diabetes mellitus (T2DM) depending on the duration of the underlying disease shows that the risk of developing DR is not linearly related to the influence of certain factors. However, substantial evidence suggests that the impacts of these factors can be cumulative. Therefore, the probability of the occurrence of DR may increase after the activation of certain mechanisms that threaten visual impairment (Hsieh YT, 2018). It has been shown that in 20.8% of individuals with T2DM, DR is observed already during the initial diagnosis of diabetes in the first 4-7 years. Thus, the first peak of visual problems caused by retinopathy may occur within the first three years after diagnosis of T2DM (Yan J, 2023).

Investigating the mechanisms of DR development that result in retinal damage remains an important issue of modern ophthalmology, endocrinology, diabetology, etc. (Bhatti, 2022). As a rule, the main focus is directed towards the study of proliferation mechanisms – the stage of DR, when massive hemorrhages in the retina and vitreous body occur, neovascularization of the disc and/or peripheral areas of the retina, fibrous tissue from the area of preretinal

hemorrhages, etc.

At the same time, insufficiently studied non-vascular mechanisms that form tissue hypoxia conditions and lead to the accumulation of harmful metabolites, determine the degree of metabolic disorders. The complex of non-vascular, and more precisely, non-local changes results in the occurrence of micro- and macrovascular complications, which are the hallmark of diabetes mellitus.

Certainly, both type 1 diabetes (T1DM) and type 2 diabetes (T2DM) exhibit such manifestations, including nephropathy, neuropathy, and retinopathy, etc. However, in patients with T2DM, the development of these mechanisms can be observed in more detail due to their slow development. We consider it pertinent to investigate the inclination towards increased enzyme activity, activators of nitrosative and oxidative stress, the peculiarities of glucose transmembrane transport, the influence of lipid metabolism regulators and fatty acid imbalance, which in turn determine changes in the structure and function of erythrocyte membranes under conditions of hypoxia and hyperglycemia in patients with PDR and T2DM. The indicated non-vascular mechanisms play a far from secondary role in the development and worsening of PDR and should be considered as potential targets for pharmacological correction in patients with T2DM.

The aim of the research. To optimize the prevention of aggravation of proliferative diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus by investigating the conditions of nitrosative stress, glucose transporters, regulation of fatty acid metabolism, structural and functional changes of cell membranes that worsen hypoxia condition and promote the occurrence of proliferative processes in the retina.

According to the aim of the research, the following *objectives* have been achieved:

1. To analyze the content of arginase-1 in the blood serum of patients with PDR with different duration of T2DM depending on the CYP2E1 genotype.
2. To study the content of transporters of the GLUT-1 family and hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) in the blood of patients with PDR with different

duration of T2DM.

3. To investigate lipid metabolism state by the content of fatty acids in the cell membranes of patients with PDR with different duration of T2DM, in comparison with the level of the regulatory intracellular chaperone L-FABP in blood serum.
4. To study the morphological and functional characteristics as well as structural properties of erythrocytes by assessing osmotic and mechanical resistance of cells in patients with PDR with different duration of T2DM.
5. To elaborate recommendations for predicting the disease course and means of preventing the progression of retinal hypoxia, taking into account the activation of non-vascular mechanisms of DR development in patients with different duration of T2DM.

At the first stage of the study, we analyzed the levels of arginase-1 in the blood serum of patients to investigate its involvement in the progression of PDR and its correlation with the duration of type 2 diabetes (T2DM). Considering the compelling evidence of oxidative and nitrosative stress among patients with PDR and T2DM, our null hypothesis was an elevation of arginase-1 in patients. A rise in the levels of arginase-1 was established in patients diagnosed with PDR and T2DM lasting over 20 years. The study of arginase-1 content in patients with different degrees of retinal damage was not linear. We also tried to associate the content of the enzyme with the polymorphism of the CYP2E1 gene involved in the processes of excretion of nitrosative metabolites. However, the study of arginase-1 content in patients with different degrees of retinal damage was not linear. Therefore, we observed a significant increase in arginase-1 only at the initial development of PDR and in carriers of the G allele of the CYP2E1 gene. Further worsening of the PDR stage did not lead to an increase in the enzyme, on the contrary, we observed its decrease in patients with severe PDR. Likely, during the transition from non-proliferative diabetic retinopathy (DR) to proliferative diabetic retinopathy (PDR), when the disease progresses to the proliferation stage and vascular mechanisms of

retinal damage become activated, the overexpression of arginase, as a part of oxidative and nitrosative stress, plays a crucial role.

Further, we explored the mechanisms for regulating cellular glucose levels, focusing on transporters of the GLUT family, and examined how cells respond to hypoxia by measuring hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) in plasma. An increase in GLUT3 content was revealed in patients with PDR, which did not depend on the degree of retinal damage, duration of T2DM and glucose concentration. It was hypothesized that this cellular transport mechanism serves as the primary pathogenetic connection for glucose toxicity in neurons in the context of chronic hyperglycemia. We did not detect a significant variation in the content of GLUT1 and GLUT4 transporters in the plasma of patients with different stages of PDR and duration of T2DM and individuals of the control group. We expressed an opinion about genetically determined mechanisms aimed at the basic maintenance of homeostasis and which are not involved in the occurrence of microvascular complications in the context of T2DM. The content of HIF-1 α in patients was higher by 25%, but did not differ depending on the stage of PDR worsening and duration of T2DM.

The next step was aimed at investigating the result of lipid metabolism disturbance, which we evaluated by measuring the spectrum of fatty acids (FA) in cell membranes. Blood erythrocytes were the model of the cell membrane. The spectrum of essential fatty acids in the erythrocyte membranes of patients with PDR did not change significantly depending on the duration of T2DM and the stage of PDR. However, we found a significant increase in the content of saturated palmitic fatty acid, and a decrease in the content of unsaturated linoleic and arachidonic fatty acids compared to CG indicators. Analysis of the patients' diets and their consumption of products (in particular, oils), which are a source of deficient FAs, turned out to be ineffective in establishing the balance of FAs.

Therefore, we assumed the existence of another endogenous mechanism of regulating lipid metabolism. The study of the important regulatory chaperone L-FABP in plasma showed its involvement in regulatory processes. In patients with

PDR, the protein content was higher than in the group of healthy individuals and was distinctly correlated with the duration of the T2DM disease, which confirmed our hypothesis.

We studied the role of changes in the properties of erythrocytes in patients with PDR based on hemogram indicators and by measuring osmotic and mechanical resistance. It was observed that patients with PDR exhibited a tendency to decreased erythrocyte count. We hypothesized that this could be attributed to a decline in the duration of cell presence in the bloodstream caused by premature membrane destruction, since osmotic hemolysis of erythrocytes in patients with PDR was higher than in CG individuals, although its degree did not differ depending on the duration of T2DM. Additionally, we observed elevated mechanical hemolysis of erythrocytes in patients with PDR, indicating a reduction in cellular structural stability and diminished effectiveness in perfusion mechanisms. This inevitably exacerbates microcirculation disorders.

Thus, our findings demonstrate that non-vascular mechanisms implicated in PDR development significantly contribute to microcirculation disorders, play a significant role in the pathogenesis of the disease and should be considered as targets for therapeutic regimens in the management of patients with T2DM.

Overexpression of arginase-1 in carriers of the G allele of the CYP2E1 gene determines the link of oxidative and nitrosative stress, an increase in the content of the glucose transporter GLUT3 substantiates glucotoxicity in neurons, an increase in the L-FABP chaperone in blood serum leads to the lack of effective regulation of lipid metabolism and FA imbalance due to dietary and nutritional recommendations. Increased chemical and mechanical fragility of erythrocyte membranes creates conditions of hypoxia and worsening of microcirculation. The indicated pathogenetic links must be taken into account for predicting the disease course and developing measures to prevent the progression of DR in patients with different duration of T2DM.

The scientific novelty of the obtained results: For the first time, a complex of non-vascular mechanisms contributing to the development of endothelial

dysfunction and the worsening of proliferative DR was studied in patients with T2DM. For the first time, the content of arginase-1, an enzyme expressed in the endothelium that contributes to the accumulation of oxidants, was studied in patients with different duration of T2DM (up to and over 20 years). For the first time, it was proved that the enzyme content is increased in patients with PDR, and it varies significantly depending on the stage of PDR in patients with a different genotype of the CYP2E1 gene (rs2070676), which encodes an enzyme involved in drug metabolism, inactivation of N-nitrosamines, polycyclic carbohydrates etc. Scientific data about the levels of glucose transporters of the GLUT family in patients with PDR in the context of T2DM were extended. For the first time, the role of GLUT3 as the main pathogenetic link of glucose toxicity in neurons under conditions of chronic hyperglycemia was shown, and it was proved that GLUT1 and GLUT4 are not involved in retinopathy progression.

For the first time, fluctuations of the FA spectrum in patients with PDR, which do not depend on the exogenous intake of food products with a similar FA composition, were established. Such an imbalance of fatty acids in cell membranes occurs due to a violation of fatty acid transport and the influence of the L-FABP chaperone as an important mechanism of lipid metabolism regulation.

The morphological and functional properties of erythrocytes and their hematological characteristics, as an important element of ensuring tissue respiration, mechanisms of effective perfusion and tissue hypoxia, were complemented in patients with PDR.

The practical value of the obtained results: For the first time, it was established that in patients with moderate PDR, a critical effect of arginase-1 overexpression which is harmful to endothelial cells, is observed. Carriers of the CYP2E1 polymorphic variant, in particular the G allele, had an increased tendency to arginase-1 expression and its fluctuations during the development of PDR. When managing such a patient group, it is imperative to consider the heightened risks of damage to the eye tissues resulting from oxidative and nitrosative stress and to administer proper treatment.

It was proven that an attempt to influence lipid metabolism and compensate for the imbalance of the main fatty acids in cell membranes through dietary recommendations on the use of oils with certain fatty acid components is ineffective in patients with PDR in the context of T2DM. When managing such patients, it is necessary to take into account the deep intracellular mechanisms of lipid metabolism regulation, in particular by influencing the regulatory pathways of the L-FABP chaperone.

Reduced indicators of osmotic and mechanical resistance of erythrocytes in patients with PDR were found, which should be taken into consideration during evaluation of hematological parameters, characteristics of anemic syndrome, and management of patients with DR and T2DM.

Based on the obtained facts and the studied regularities, non-vascular mechanisms of PDR development were characterized, which significantly contribute to the pathogenesis of the disease and should be considered as targets for therapeutic schemes in the management of patients with T2DM. The indicated pathogenetic links must be taken into account for predicting the course of the disease and developing measures to prevent the progression of DR in patients with different duration of T2DM.

Key words: type 2 diabetes mellitus, diabetic retinopathy, regulation of lipid metabolism, gene polymorphism, arginase-1, glucose transporters GLUT1, GLUT3, GLUT4, hypoxia-inducible factor HIF-1 α , fatty acids, L-FABP, erythrocytes, mechanical resistance, prophylaxis, progression.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	21
ВСТУП	22
РОЗДІЛ 1	
РОЛЬ НЕСУДИННИХ МЕХАНІЗМІВ У РОЗВИТКУ ТА ПРОГРЕСУВАННІ ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ РЕТИНОПАТІЇ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2 ТИПУ	33
1.1 Актуальність вивчення механізмів розвитку та прогресування проліферативної діабетичної ретинопатії	33
1.2 Порушення метаболізму ферментів нітрозативного обміну	38
1.3 Роль глюкозних транспортерів у забезпеченні вуглеводного обміну на тлі хронічної гіпоксії	40
1.4 Жирні кислоти – важливі параметри оцінки ліпідного обміну у пацієнтів з ЦД2	42
1.5 Роль ЖК в забезпеченні структури еритроцитів	45
1.6 Вивчення властивостей мембран еритроцитів у пацієнтів з ЦД2	47
Резюме до розділу 1	52
РОЗДІЛ 2	
МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	53
2.1 Дизайн дослідження і клінічна характеристика пацієнтів	53
2.2 Офтальмологічні дослідження	55
2.3 Дослідження поліморфізмів генів	60
2.4 Дослідження вмісту протеїнів	61
2.5 Дослідження складу жирних кислот	62
2.6 Оцінка властивостей еритроцитів, гематологічні тести	64
2.7 Статистичний аналіз	65
РОЗДІЛ 3	
ВМІСТ АРГІНАЗИ-1 У ПАЦІЄНТІВ НА ПРОЛІФЕРАТИВНУ ДІАБЕТИЧНУ РЕТИНОПАТІЮ ІЗ РІЗНОЮ ТРИВАЛІСТЮ	67

ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ ТА В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ГЕНОТИПУ *CYP2E1*

Резюме до розділу 3 72

РОЗДІЛ 4

ВМІСТ ТРАНСПОРТЕРІВ СІМЕЙСТВА GLUT-1 В СИРОВАТЦІ
КРОВІ ПАЦІЄНТІВ НА ПДР ІЗ РІЗНОЮ ТРИВАЛІСТЮ ЦД2, ЯК
ФАКТОРУ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ГЛЮКОЗОЮ КЛІТИН ОРГАНІЗМУ 74

Резюме до розділу 4 78

РОЗДІЛ 5

ВИВЧЕННЯ ФАКТОРІВ ВПЛИВУ НА ОБМІН ЖИРНИХ КИСЛОТ
У ПАЦІЄНТІВ НА ПРОЛІФЕРАТИВНУ ДІАБЕТИЧНУ
РЕТИНОПАТІЮ З РІЗНОЮ ТРИВАЛІСТЮ ЦУКРОВОГО
ДІАБЕТУ 80

Резюме до розділу 5 89

РОЗДІЛ 6

МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ТА СТРУКТУРНІ ЗМІНИ
ЕРИТРОЦИТІВ ПАЦІЄНТІВ ІЗ ПРОЛІФЕРАТИВНОЮ
ДІАБЕТИЧНОЮ РЕТИНОПАТІЄЮ ТА РІЗНОЮ ТРИВАЛІСТЮ
ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ 91

Резюме до розділу 6 100

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ 102

ВИСНОВКИ 115

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ 118

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 119

ДОДАТКИ 138

Додаток № 1. Акти впровадження результатів роботи в науковий
обіг та практичну діяльність 138

Додаток № 2. Список публікацій здобувача за темою дисертації 150

Додаток № 3 Апробації дисертації 153

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ЦД2	– цукровий діабет 2 типу
ДР	– діабетична ретинопатія
ПДР	– проліферативна діабетична ретинопатія
Allox	– аллоксан
ARK	– аркуатне ядро гіпоталамусу
ATF6	– трансмембранний протеїн (англ., activating transcription factor 6)
BAX	– регуляторний протеїн
Bim, Bik, Bak	– сімейство регуляторних протеїнів з доменом BH
Bcl _{xl}	– регуляторний протеїн
Becclin-1	– регуляторний протеїн
BiP/GRP78	– шаперон ER
Caspase-3	– Каспаза-3 регуляторний протеїн

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Діабетична ретинопатія (ДР) – найчастіше ускладнення цукрового діабету (ЦД), залишається провідною причиною втрати зору та інвалідизації [52]. Найбільш загрозливою формою вважається проліферативна ДР (ПДР) на тлі ЦД 2 типу (ЦД2), як найбільш розповсюдженої форми діабету.

Сьогодні увага дослідників прикута переважно до механізмів проліферації судин на тлі гіпоксії, ушкодження ендотелію, вмісту факторів активації проліферації судин і виникнення ушкодження сітківки через нейрозапалення. Проте бракує даних про несудинні механізми, які неминуче активуються у пацієнтів з ЦД2, і також створюють умови для реалізації ПДР.

Аргіназа-1 розглядається як фермент, що виробляється у печінці та причетний до синтезу оксиду азоту. Ген *CYP2E1* (*rs2070676*) кодує фермент, який бере участь у метаболізмі ліків, відповідає за метаболічну інактивацію N-нітрозамінів, поліциклічних вуглеводів та інших низькомолекулярних сполук. Визначена роль оксидативного стресу, якій є неминучим при стійкій гіперглікемії, погіршує стан тканини, і антиоксиданти сьогодні активно залучають до лікування ЦД та профілактики розвитку ДР [51, 128]. Вивчення вмісту аргінази-1 в залежності від поліморфізму гену *CYP2E1* дає підставу обговорювати вплив оксидативно-нітрозативного стресу який є однією із ключових ланок ендотеліальної дисфункції.

Гіперхолестеринемії розглядається як важливий фактор ушкодження сітківки за рахунок ліпотоксичності і хімічної модифікації судинних білків. Перекисне окислення ліпідів у судинній стінці призводить до локальної продукції активних форм кисню, вільних радикалів, які опосередковують рекрутування макрофагів, клітинну активацію та проліферацію. Таким чином гіперліпідемія може сприяти розвитку ДР, макулярному набряку і порушенню гематоретинального бар'єру крові [33, 51, 150].

Порушення ліпідного обміну неминуче асоціюється із обміном та експресією в клітині FABPs (англ., fatty acid binding protein), внутрішньоклітинних білків, що зв'язують жирні кислоти (ЖК). Ліпідні шаперони FABP розглядаються, як еволюційно глибокий механізм захисту клітини від надмірної кількості ЖК [55]. Вони можуть активно полегшувати транспортування ЖК в цитоплазмі до конкретних відділень у клітині, наприклад: до ліпідної краплі для зберігання; в ендоплазматичний ретикулум для сигналізації; обміну та синтезу мембран; до мітохондрій або пероксисом для окислення; до ядра для регуляції ліпідів транскрипції; або навіть поза клітини, щоб подавати сигнал аутокринним або паракринним способом [70]. Вважається, що печінкова (liver) форма протеїну L-FABP є коактиватором регуляції генів, опосередкованих PPAR (англ., peroxisome proliferator-activated receptor) – ядерного транскрипційного фактору. PPAR γ , фізично взаємодіють із FABPs і викликає у дослідників найбільший інтерес, як приваблива терапевтична мішень для впливу на захворювання, важливим патогенетичним фактором яких є дисліпідемія, інсулінорезистентність (ІР), метаболічний синдром, ЦД II, ожиріння тощо [79, 135]. Нещодавно, дослідники з'ясували різницю в реалізації патогенетичних механізмів мікроциркуляторних ускладнень, на прикладі поглиблення діабетичної ретинопатії у хворих на ЦД2 [144]. За думкою авторів на тлі гіперглікемії підвищується надходження ЖК до клітини, але, у якості компенсаторного механізму зменшується експресія протеїну L-FABP. Класичний шлях транскрипції генів PPAR та продукція білків-маркерів запалення пригнічується. Водночас, відбувається перетворення підвищеної кількості ЖК в інших органелах клітини. Таким чином зменшення вмісту L-FABP відіграє протекторну роль і запалення не виникає.

Два великих багатоцентрових глобальних дослідження з діабету, Diabetes Control and Complications Trial (2000) та UK Prospective Diabetes Study, (1998) показали, що тривалий високий рівень глюкози в крові є вирішальним фактором для розвитку ДР, і прогресування захворювання

можна полегшити, обмежуючи перенесення глюкози в сітківку, тим самим зменшуючи місцевий вміст глюкози [59, 160]. Натомість надходження глюкози опосередковується специфічним, полегшеним транспортним процесом за участю членів сімейства натрійнезалежних переносників глюкози – GLUT.

Завдяки GLUT1 глюкоза з крові проникає в цитоплазму ендотеліальних клітин послідовно проходячи через мембрани: люменальну та аблюменальну. Доведений асиметричний вміст транспортерів в ендотелії на різних мембранах 1:4, що має виконувати регуляторну роль [131]. Через астроцитарну ізоформу GLUT1 глюкоза потрапляє в нейроглию і лише потім через GLUT3 вона заходить у цитозоль нейрональних клітин. Нині у людей ідентифіковано 14 різних GLUT. В умовах основного обміну більшість цих транспортерів, особливо GLUT4, значною мірою залучені до інсулінозалежних механізмів та відіграють важливу роль у поглинанні глюкози адипоцитами, клітинами серця та скелетних м'язів, а також відіграють важливу роль у гомеостазі глюкози у всьому організмі [109].

Гіпоксія є універсальним патологічним процесом. Метаболічні зрушення в умовах нестачі кисню пов'язані з розвитком енергодефіциту, посиленням генерації активних форм кисню, яка згодом призводить до надлишкової ліпопероксидації, окиснювальної модифікації клітинних білків, мембранодеструкції, пошкодження цитоскелету, деградації мембранних фосфоліпідів [13, 120].

Завдяки найвищій реактивності, кров, як рідка сполучна тканина організму, сама безпосередньо реагує на дефіцит кисню. Ключова роль у формуванні реологічних параметрів крові належить, перш за все еритроцитам, які складають 98% від загального обсягу клітинної популяції і, згідно з експериментальними даними, визначають плинність крові на рівні мікросудин, саме там де здійснюється газообмін [16]. В свою чергу, зміни структури еритроцитів викликають їх функціональні обмеження, що призводить до посилення гіпоксії. Тому вивчення еритроцитів людини

набуває особливу важливість при дослідженні патогенетичних механізмів, пейсмейкером яких є зменшення тканинного дихання і газообміну.

В експерименті на щурах за умов гострої гіпоксії описані зміни кількості еритроцитів, гемоглобіну, еритроцитарних індексів, що обумовлені мембранодеструктивними процесами в клітинах, зменшенням їх абсолютного числа внаслідок гемолізу, а також змінами гематокриту за рахунок перерозподілу крові [16]. В той час підкреслено, що реакція еритроцитів на гіпоксію достатньо не вивчена.

Спроможність еритроцитів до деформації та еластичність їх мембрани вважається одним з важливих факторів, що обумовлюють їх функціональні властивості і забезпечують проходження через капіляри мікроциркуляторного русла та ефективного газообміну [148]. Досліджена здатність еритроцитів до деформації в умовах гіпоксії у щурів в залежності від віку тварин.

На структуру і фізичні властивості мембран істотний вплив мають жирні кислоти (ЖК). Основні насичені ЖК: стеаринова, пальмітинова, маргарінова визначають щільність і міцність структури, а ненасичені: олеїнова, лінолева, ліноленова, які мають особливу конформацію молекули – надають мембрані гнучкість, що визначає пластичність апікального краю клітини, або клітини в цілому [57]. Взагалі, роль ЖК в організмі неможливо переоцінити. Вони модулюють активність ферментів, транспортерів та мембранних рецепторів (рецепторів ЛПНЩ, інсуліну, антитіл, нейромедіаторів, рецептори для лікарських засобів і т.д.) [68, 87, 89]. Ліпідний склад еритроцита представлений: фосфоліпідами – 36,3%; сфінгомієлінами – 29,6%; холестерином – 22,2%; гліколіпідами – 11,9%.

Проведено дослідження ліпідного обміну при цукровому діабеті з урахуванням змін в складі крові ліпопротеїдів та ЖК і показано, що зміни ліпідного обміну мають атеросклеротичну спрямованність. Порівняльна характеристика складу ЖК при ЦД 2 показала відсутність прямої кореляції в плазмі крові і в еритроцитах [17]. Автори підкреслюють, що існує кореляція

між змінами властивостей мембран еритроцитів і клітинних мембран внутрішніх органів, що дає підставу використовувати еритроцитарні мембрани, як природну модель для дослідження загальних характеристик усіх біомембран та загальних характеристик метаболізму мембранних ліпідів [17].

Отже, недостатньо досліджена ціла ланка несудинних механізмів у вигляді схильності до підвищення ферментів, активаторів нітрозативно-оксидативного стресу, особливостям глюкозного транспорту завдяки переносника, впливу ферментів ліпідного обміну та дисбалансу жирних кислот, які визначають зміни структури і функції мембран еритроцитів за умов гіпоксії і гіперглікемії. Проте вказані несудинні механізми відіграють далеко не другорядну роль у розвитку та поглибленню ПДР і повинні розглядатися як потенційні цілі фармакологічної корекції у пацієнтів з ЦД2.

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 МОЗ України, 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. Оптимізувати профілактику прогресування діабетичної ретинопатії при цукровому діабеті 2 типу шляхом вивчення умов нітрозативного стресу, глюкозних транспортерів, регуляції обміну жирних кислот, структурно-функціональних змін клітинних мембран, які поглиблюють стан гіпоксії і сприяють виникненню проліферативних процесів сітківки.

Відповідно до мети дослідження були вирішені наступні **завдання**:

1. Проаналізувати вміст аргінази-1 в сироватці крові у пацієнтів на

ПДР із різною тривалістю ЦД2 в залежності від генотипу CYP2E1.

2. Вивчити вміст транспортерів сімейства GLUT-1 та фактору, індукованого гіпоксією (HIF-1 α) в крові пацієнтів на ПДР із різною тривалістю ЦД2.

3. Дослідити стан ліпідного метаболізму за вмістом ЖК в клітинних мембранах пацієнтів на ПДР із різною тривалістю ЦД2, у співставленні із рівнем регуляторного внутрішньоклітинного шаперону L-FABP в сироватці крові.

4. Вивчити морфо-функціональні характеристики та структурні властивості еритроцитів за допомогою оцінки осмотичної та механічної резистентності клітин у пацієнтів на ПДР із різною тривалістю ЦД2.

5. Розробити рекомендації щодо прогнозування перебігу захворювання та засоби профілактики прогресування гіпоксії сітківки з урахуванням активації несудинних механізмів розвитку ДР у пацієнтів із різною тривалістю ЦД2.

Об'єкт дослідження: діабетична ретинопатія (МКХ-10:Н36.0; E10-E14+ з загальним четвертим знаком.3).

Предмет дослідження: профілактика прогресування діабетичної ретинопатії при цукровому діабеті 2 типу; офтальмологічний статус; судинні та несудинні механізми прогресування діабетичної ретинопатії у пацієнтів із ЦД2 (показники ліпідограми, сироватковий рівень L-FABP, вміст аргінази-1 в сироватці крові, розподіл частоти алелей і генотипів гену CYP2E1 в групах пацієнтів, вміст транспортерів GLUT-1, GLUT-3, GLUT-4 в сироватці, HIF - 1-альфа, морфо-функціональні характеристики еритроцитів за даними гемограми, осмотична та механічна резистентність еритроцитів, стать, вік, ІМТ).

Методи дослідження: загальноклінічні (огляд, збір анамнезу, біоморфометрія), офтальмологічні (візометрія, периметрія, тонометрія, рефрактометрія, біомікроскопія, гоніоскопія, офтальмоскопія, оптична когерентна томографія з функцією ангиографії, фундусскопія); біохімічні

(спектрометричні для визначення показників ліпідограми; глюкозооксидазний – для глюкози крові, іонно-обмінної температурно незалежної хроматографії-спектрофотометрії для глікозильованого гемоглобіну); метод газорідинної хроматографії для вивчення ЖК; ПЛР-аналіз для вивчення SNP-поліморфізму гену; імуноферментний аналіз для визначення сироваткового рівню L-FABP, аргінази-1, транспортерів GLUT, статистичні – критерій Шапиро-Уилка для визначення відповідності закону Гауса, критерій χ^2 для порівняння даних у таблиці спряженості «k*m», непараметричний критерій Крускала-Уолліса для порівняння незалежних вибірок.

Наукова новизна одержаних результатів. Доповнені наукові дані щодо комплексу несудинних механізмів розвитку ендотеліальної дисфункції та поглибленню проліферативної ДР у пацієнтів із ЦД2. Вперше у пацієнтів із різною тривалістю ЦД2 (до та більше 20 років) було вивчено вміст аргінази-1, ферменту, що експресується в ендотелії і сприяє накопиченню оксидантів. Було доведено, що вміст ферменту підвищений у пацієнтів із ПДР, і достовірно коливається в залежності від стадії ПДР у пацієнтів із різним генотипом гену *CYP2E1* (*rs2070676*), який кодує фермент, що бере участь у метаболізмі ліків, інактивації N-нітрозамінів, поліциклічних вуглеводів тощо.

Розширені наукові дані про рівні глюкозних транспортерів сімейства GLUT у пацієнтів з ПДР та ЦД2. Вперше було показано роль GLUT3 як основної патогенетичної ланки глюкозотоксичності в нейронах на тлі хронічної гіперглікемії, і доведена не причетність GLUT1 та GLUT4 до прогресування ДР.

Встановлені коливання спектру ЖК у пацієнтів з ПДР, які не залежали від екзогенного надходження харчових продуктів із аналогічним складом ЖК. Такий дисбаланс ЖК в мембранах клітин виникав через порушення транспорту ЖК і впливу шаперону L-FABP, як механізму регуляції ліпідного обміну.

Доповнені наукові дані щодо морфо-функціональних властивостей еритроцитів та їх гематологічних характеристик, як важливий елемент забезпечення тканинного дихання, механізмів ефективної перфузії та гіпоксії тканин при ПДР та ЦД2.

Практичне значення отриманих результатів. Встановлено, що у пацієнтів на стадії помірної ПДР спостерігається критичний вплив надекспресії аргінази-1, який є шкідливим для ендотеліальних клітин. Носії поліморфного варіанту CYP2E1 зокрема алелю G але мали підвищену схильність до експресії аргінази-1 та її коливанню при розвитку ПДР. При спостереженні такого контингенту хворих варто враховувати підвищені ризики до ушкоджень тканин ока через оксидативно-нітрозативний стрес і призначати відповідну терапію.

Доведено, що спроба вплинути на ліпідний обмін і компенсувати дисбаланс основних ЖК в мембранах клітин через харчові рекомендації вживання олій із певними компонентами ЖК, не є ефективною у пацієнтів з ПДР на тлі ЦД2. При лікуванні таких пацієнтів варто враховувати глибокі внутрішньоклітинні механізми регуляції ліпідного обміну, зокрема шляхом впливу на регуляторні шляхи шаперону L-FABP.

Виявлені знижені показники осмотичної та механічної резистентності еритроцитів у пацієнтів з ПДР, що варто враховувати при оцінці гематологічних параметрів, характеристиці анемічного синдрому та лікуванні пацієнтів з ДР та ЦД2.

На основі отриманих фактів та вивчених закономірностей охарактеризовані несудинні механізми розвитку ПДР, які мають значний вклад у патогенез захворювання і мають розглядатися як мішені для терапевтичних схем при веденні пацієнтів із ЦД2. Вказані патогенетичні ланки необхідно враховувати для прогнозування перебігу захворювання і розробці засобів профілактики прогресування ДР у пацієнтів із різною тривалістю ЦД2.

Впровадження. Наукові положення дисертації були впроваджені в

навчальний процес кафедри офтальмології і офтальмології та оптометрії післядипломної освіти Інституту післядипломної освіти Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України, кафедри оториноларингології з офтальмологією Полтавського державного медичного університету, кафедри дитячої хірургії, отоларингології та офтальмології Буковинського державного медичного університету, кафедри офтальмології ФПДО Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького МОЗ України, кафедри офтальмології Дніпровського національного медичного університету, кафедри офтальмології Національного університету охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика МОЗ України.

Практичні результати роботи були впроваджені в офтальмологічному відділенні КНП КОР «Київська обласна клінічна лікарня» (м. Київ), відділенні мікрохірургії ока КНП СОР «Сумська обласна клінічна лікарня» (м. Суми), Медичному центрі ТОВ ОКТАР «Центр оптичної реабілітації ОКТАР» (м. Полтава), Національній дитячій спеціалізованій лікарні МОЗ України «ОХМАТДИТ» (м. Київ) та медичному центрі ПП «Світ Здоров'я» (м. Мукачеве).

Особовий внесок здобувача. Ідея роботи, напрямок дослідження і основні етапи були визначені здобувачем разом із науковим керівником д.мед.н., професором О. В. Петренко.

Офтальмологічні обстеження та відбір пацієнтів були виконані власно дослідником. Лікарі суміжних спеціальностей були залучені для консультування пацієнтів при їх спостереженні у стаціонарі.

Дизайн досліджень і методи були сформовані дослідником у співпраці із співробітниками Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини (науковий консультант проф. Л.В. Натрус), які суттєво допомагали у проведенні досліджень, постановці експериментальних та лабораторних методик. Співпраця відбувалася на основі Договору про співпрацю на умовах співавторства.

Описання результатів, статистична обробка даних виконувалась

дослідником. Усі висновки, заключення та рекомендації були зроблені дослідником із консультативною допомогою наукового керівника.

Усі розділи дисертації були написані власно дослідником.

У наукових працях, опублікованих за матеріалами роботи, здобувачці належала провідна роль у написанні статті, статистичній обробці, аналізі та узагальненні результатів, формулюванні висновків.

Апробація результатів. Матеріали дисертаційної роботи були представлені та заслухані на Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання офтальмології» (2020, телеміст Одеса-Тернопіль); на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Рефракційний пленер`20/21/22» (2020, 2021, 2022, Київ); на Тбіліській міжнародній офтальмологічній конференції «Tbilisi International Ophthalmology Conference – ТІОС 2020» (2020, Тбілісі, Грузія); на ІХ Науково-практичній конференції дитячих офтальмологів та оптометристів України з міжнародною участю «Своє дитинство треба бачити`2021/22» (2021, Бугаз; 2022, Київ); на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Філатовські читання-2021/23» (2021, 2023, Одеса); на XVIII З'їзді всеукраїнського лікарського товариства та історико-термінологічної конференції ВУЛТ (2021, он лайн формат).

Публікації. Основні результати дисертації опубліковані у 14 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 4 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», з них 2 статті – у виданнях, які входять до наукометричної бази SCOPUS; 10 робіт – тези у матеріалах науково-практичних конференцій, з'їздів, симпозіумів, у тому числі 1 іноземні, де засвідчена апробація матеріалів дисертації.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена українською мовою, на 118 сторінках друкарського тексту, складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 5-ти розділів власних досліджень, в т.ч. розділу обговорення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, додатків. Робота ілюстрована 5 таблицями і 19 рисунками. Список літератури займає 19 сторінок та включає 180 джерел.

РОЗДІЛ 1

РОЛЬ НЕСУДИННИХ МЕХАНІЗМІВ У РОЗВИТКУ ТА ПРОГРЕСУВАННІ ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ РЕТИНОПАТІЇ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2 ТИПУ

1.1 Актуальність вивчення механізмів розвитку та прогресування проліферативної діабетичної ретинопатії

Хронічна гіперглікемія, що розвивається при ЦД, супроводжується розвитком ускладнень з боку багатьох органів та систем, в тому числі і органу зору. За даними ВООЗ діабетична ретинопатія у хворих на ЦД 2 типу розвивається, в середньому, через 5-7 років від початку захворювання і залишається одним з найбільш частих прогностично несприятливих проявів універсальної діабетичної мікроангіопатії, що в 75% випадків призводить до сліпоти [52, 173].

Таким чином, діабетична ретинопатія (ДР) є одним з основних мікросудинних ускладнень ЦД, що призводить до втрати зору та інвалідизації. Оприлюднені звіти про розповсюдженість ДР в Україні за даними однієї із областей [18], і на їх основі розроблені практичні рекомендації. Одне з них складається в тому, що лікування ДР розглядається як невід'ємна частина лікування пацієнта в цілому і ґрунтується на таких принципах:

- 1) виявлення ураження сітківки і послідовне динамічне спостереження за її станом;
- 2) оптимальна компенсація вуглеводного та ліпідного обмінів, контроль артеріального тиску, протизапальна терапія при інтеркурентних захворюваннях, вагітності тощо;
- 3) лікування уражень сітчастої оболонки ока.

Окрім суворой компенсації діабету, проводять також додаткову терапію залежно від стадії ДР. У пацієнтів із непроліферативною ДР при підвищенні вмісту ліпідів у крові здійснюють терапію гіполіпідемічними та антиоксидантними препаратами, препаратами низькомолекулярного гепарину (сулодексид), однак основним засобом стабілізації ретинопатії, а внаслідок цього і профілактики сліпоты, є лазерна коагуляція у вигляді фокальної, локальної чи панретинальної коагуляції [18].

Також вивчена динаміка поширеності ДР у дорослих пацієнтів із ЦД, враховуючи тип і тривалість захворювання, стать і вік хворих, місце їх проживання (місто, село), ступінь компенсації вуглеводного обміну, а також прогнозований абсолютний і відносний ризик розвитку ДР. Було виявлено, що поширеність усіх стадій ДР вірогідно вища при ЦД 1-го типу, ніж при ЦД 2-го типу. Поширеність ДР зростає зі збільшенням тривалості ЦД, досягаючи максимального значення (90 %) за наявності ЦД 1-го типу понад 20 років і 67% за наявності ЦД 2-го типу протягом 15-20 років [21].

В той же час необхідно враховувати значну поширеність ЦД 2 типу. Саме тому, переважна більшість пацієнтів з діабетичними ураженнями сітківки – це пацієнти із ЦД 2 типу. Спостерігається різниця в поширеності ДР в осіб із ЦД 2 типу, яким призначають різні види терапії. Якщо на ранніх термінах ЦД (до 5 років) ДР виникає у 30% пацієнтів, які отримують таблетовані цукрознижувальні препарати, і у 35,5% пацієнтів, які знаходяться на інсулінотерапії, то помірі збільшення тривалості захворювання частота ДР зростає, досягаючи максимуму в період 11-20 років від початку хвороби (38 і 74% відповідно).

При вивченні ризику розвитку ДР у дорослих пацієнтів із ЦД статистично значуща позитивна кореляція ДР отримана з тривалістю діабету, віком хворих, рівнями HbA1c, систолічного та діастолічного артеріального тиску, наявністю мікроальбумінурії. Статистично значуща позитивна асоціація ступеня ДР встановлена з тяжкістю діабетичної нефропатії. Отже, незважаючи на підвищення ефективності лікувально-діагностичної допомоги

хворим, залишається низка проблем у своєчасній і якісній діагностиці мікросудинних ускладнень та застосування профілактичних заходів, спрямованих на запобігання їх прогресуванню [21].

Існує декілька класифікацій та характеристик протікання ДР. За уявленням ВООЗ, у перебігу ДР розрізняють три послідовні стадії: непроліферативна, препроліферативна та проліферативна. Швидкість перебігу та переходу з однієї стадії в іншу залежить від багатьох факторів – зокрема, від типу діабету, генетичної схильності. Важливу роль грає ступінь стабілізації цукрового діабету.

Основною причиною зниження зору у пацієнтів з непроліферативною діабетичною ретинопатією є набряк центральної ділянки сітківки (макулярний набряк, діабетична макулопатія) [23]. За даними статистичних звітів ця патологія спостерігається в 10-15% пацієнтів із цукровим діабетом. Місцем виходу рідкої частини крові в тканини сітківки є змінені власні судини сітківки. Тривалий, багаторічний набряк викликає незворотну втрату нервових елементів сітківки, приводить до зниження зору.

При прогресуванні судинних змін настає препроліферативна стадія, яка характеризується появою «ватоподібних вогнищ», що свідчать про грубі метаболічні та транспортні порушення у шарі нервових волокон. Найбільш важкою стадією діабетичної ретинопатії є проліферативна фаза процесу. Діагноз проліферативної діабетичної ретинопатії ставиться з появою новоутворених судин. Ці судини аномальні як по своєму розташуванню, так і по будові – стінка в них тонка, тендітна. Такі судини є потенційними джерелами великих крововиливів навіть на тлі нормального артеріального тиску, без якихось фізичних навантажень, при компенсації цукрового діабету. Наступним етапом проліферативної стадії процесу є ріст «рубцевої» (фіброзної) тканини. Ця тканина має виражену здатність до скорочення. Прикріплюючись до сітківки, у процесі скорочення, вона тягне її, та приводить до відшарування сітківки. Так виникає характерне для цукрового діабету відшарування сітківки – найбільш важка патологія в плані

хірургічного лікування й прогнозу. Розвиток проліферативної стадії по цьому сценарію може відбуватися з різною швидкістю – від 3-4 місяців до декількох років. Як правило, патологічні зміни йдуть паралельно в обох очах, одне око лише трохи випереджає інше по клінічних проявах [122].

За сучасним уявленням ДР характеризується геморагіями, мікроаневризми, нерівномірністю калібру судин сітківки, набряком сітківки, твердим ексудатом, м'яким ексудатом («ватяні» осередки), ішемічними зонами, неоваскуляризацією сітківки, неоваскулярною глаукомою, гемофтальмом, розростанням сполучної тканини, відшаруванням сітківки.

Традиційно ДР розглядається як судинна патологія, в основі розвитку якої лежить ураження сітківки, дуже чутливої до гіпоксії. Детально описані зміни стінки капілярів сітківки, порушення гематотканинного бар'єру, порушення складу екстрацелюлярного матрикса [16]. В останні роки інтенсивно вивчаються механізми розвитку ДР при підвищенні вмісту ліпідів та глікованих білків у крові, що підкреслює роль метаболічних змін у розвитку ушкодження сітківки [16].

Розглядається роль порушень ліпідного обміну при розвитку ДР. Твердий ексудат є результатом екстравазального виходу ліпідів і відображає порушення ліпідного обміну у хворого. Накопичуються ліпіди в зовнішньому плексиформному шарі. При великому обсязі ліпіди можуть стоншувати над собою сітківку і створюється враження, що вони знаходяться у внутрішніх шарах сітківки. Нормалізація ліпідного обміну сприяє знищенню цього ексудату [16]. Тому при компенсації ЦД важливим є не тільки досягнення належного рівня глікемії, але і нормалізація ліпідного обміну, артеріального тиску, зниження маси тіла у хворих. Таким чином, повинні бути ліквідовані або мінімізовані всі фактори ризику розвитку мікро- і макроангіопатії при ЦД [17].

Відомо, що серед біохімічних параметрів контролю ступеня компенсації і характеру перебігу ЦД найбільш точним, інтегральним і прогностично цінним показником є рівень глікозильованого гемоглобіну

крові – HbA1 і кількість його найбільшої фракції - HbA1c [1]. Характерною особливістю HbA1c є підвищена спорідненість до кисню (міцність зв'язку), що призводить до утруднення віддачі кисню тканинам. Тому відомо, що патологічно високий рівень HbA1c визначається одним із самостійних чинників розвитку гіпоксії, як основної ланки патогенезу діабетичної ангіопатії, офтальмопатії і нефропатії [14].

Визначена роль оксидативного стресу, якій є неминучим при стійкій гіперглікемії, погіршує стан тканини, тому антиоксиданти сьогодні активно використовують при лікуванні ЦД та профілактики розвитку ДР [58, 114]. Увагу дослідників привертають зміни структури мікроциркуляторного русла, калібру судин сітківки, збільшення мікроаневризм, петехіальних крововиливів, поряд із іонним складом крові, порушенням осмотичного гомеостазу.

Ішемічні зони сітківки виділяють фактори, що викликають ангіогенез, що ніякою компенсацією ЦД вже не зупинити. Одним з головних ініціаторів ангіогенезу є фактор росту ендотелію судин, хоча в цьому беруть участь і інші ростові фактори [23]. Останнім часом стало відомо про цілий ряд прозапальних агентів, що викликають неоваскуляризацію, таких як: компоненти альтернативного шляху комплементу (фактори H і B); моноцитарний хемотаксичний протеїн-1 – MCP-1; молекула міжклітинної адгезії 1 – ICAM-1; інтерлейкіни IL12p40, IL1a2, IL3, IL6, IL8, IL17, IL22; металлопротеїнази-9; індукований інтерфероном гамма монокін. Ці фактори обов'язково слід брати до уваги, оскільки прозапальний (аутоімунний) компонент присутній при будь-якому процесі, що протікає з порушенням гемоофтальмічного бар'єру. Порушення гематоофтальмічного бар'єру «розкриває» аутоантигени сітківки, до яких немає імунної толерантності, оскільки бар'єр утворюється раніше, ніж формується центральна толерантність в тімусі [16].

Актуальність вивчення усіх аспектів патогенезу ЦД2, як найбільш розповсюдженої форми хронічної тривалої гіперглікемії, не викликає

сумнівів. По-перше діабетичні мікросудинні ускладнення, такі як ретинопатія нефропатія та невропатія, є важливою причиною захворюваності та смертності у пацієнтів ЦД2. А по-друге, глобальна поширеність діабету серед дорослого населення в 2019 році складала біля 9% населення світу (463 мільйони) і, за прогнозами, підвищиться до 2045 року до 11 % (700 мільйонів). У кожного третього пацієнта з ЦД2 діагностуються ураження мікросудин, системні захворювання: інсульт, ішемічна хвороба серця, серцева недостатність, які різко підвищують ризик небезпечності життя [52].

Вивчення причин виникнення ЦД2 тривають у багатьох напрямках, через розуміння безлічі генетичних та екологічних факторів ризику виникнення захворювання. На часі активне вивчення генів, їхніх поліморфних варіантів та зв'язку цих мутацій із фенотипічними ознаками, які саме і спричиняють погіршення стану метаболізму та обмінних процесів. Без сумнівів, саме такий шлях може надати інструменти для розширення знань про складний патогенез діабету, його судинних ускладнень, що призведе до покращення профілактики, діагностики та лікування [161].

1.2 Порушення метаболізму ферментів нітрозативного обміну

Аргіназа, важливий фермент циклу сечовини, використовує L-аргінін як субстрат для виробництва сечовини та орнітину. Він експресується у кількох типах клітин, включаючи ендотеліальні клітини, макрофаги та гладком'язові клітини судин. Дослідження показали, що підвищена активність аргінази порушує функцію синтази оксиду азоту (NOS), викликаючи роз'єднання димеру NOS. Незв'язана молекула NOS замість оксиду азоту (NO) виробляє супероксид, який призводить до вироблення прозапального оксиданту пероксинітриту. Залишкове накопичення оксидантів в ендотелії є основним механізмом судинної дисфункції при низці мікроциркуляторних захворювань, включаючи діабетичну ретинопатію (ДР)

[142, 164, 165, 166].

Вивчення у людей поліморфних варіантів гену аргінази підтвердили зв'язок мінорного алелю SNP *rs2781666* у локусі *ARG1* із ризиком ретинопатії на 740 неспоріднених пацієнтах із ЦД2 університетської лікарні Люблінського медичного університету [39]. Виявлено, що мінорний алель Т і генотип ТТ підвищували ризик розвитку ЦД2 в 1,4 і 2,2 разу відповідно. Частоти алелі Т і генотипу ТТ були достовірно вищими у групі пацієнтів із ЦД2 з ДР, ніж без ДР. Ризик розвитку ДР був у 1,7 раза вищим для алелю Т і в 2,4 разу вищим для гомозиготного генотипу ТТ.

У моделях на мишах і щурах було показано, що індуковане діабетом порушення ендотелійзалежних вазодилатаційних відповідей у судинах сітківки пов'язане з активацією аргінази через збільшення її продукції. Цього можна було уникнути шляхом делеції однієї копії гена аргінази у мишей [65]. Однак, механізм, за допомогою якого ген *ARG1* забезпечує схильність до ДР, не зрозумілий і вимагає вивчення. Більшість досліджень присвячено розподілу ферментів, що беруть участь у метаболізмі аргініну та структурах ока [126].

Взаємозв'язок між метаболізмом аргініну і патогенезом ПДР складний. Аргінін є ключовою молекулою в декількох шляхах, що інтегруються (перетинаються) з численними метаболічними шляхами в організмі. У циклі сечовини аргінін розщеплюється аргіназою з утворенням орнітину та сечовини. Орнітин потім перетворюється назад на аргінін через проміжний цитрулін, завершуючи цикл. Альтернативно, орнітин також може метаболізуватися до проліну через проміжний глютаміновий γ -напівальдегід. Підвищені рівні проліну, орнітину, цитруліну та аргініну були виявлені у склоподібному тілі пацієнтів з ПДР, а підвищення рівня аргініну в сироватці було виявлено у пацієнтів з тяжкою ДР [153].

Численні дослідження продемонстрували значення генетичних поліморфізмів цитохромів P450 (CYP) у патогенезі ЦД2 [178]. Цитохром P450 2E1 (що кодується геном *CYP2E1*) відповідає за метаболічну активацію

багатьох низькомолекулярних сполук, включаючи етанол, бензол, вінілхлорид та N-нітрозаміни [26]. Надекспресований *CYP2E1* демонструє високу здатність продукувати вільні радикали, які, ймовірно, викликають перекисне окислення ліпідів у пацієнтів з ожирінням ЦД2, у яких показана підвищена активність *CYP2E1* [168]. Отже, залишається не з'ясованим роль поліморфізму гену *CYP2E1* в розвитку ендотеліальної дисфункції та активації нітрозативно-оксидативних механізмів в патогенезі ДР [26].

1.3 Роль глюкозних транспортерів у забезпеченні вуглеводного обміну на тлі хронічної гіпоксії

Гомеостаз глюкози в крові має фундаментальне значення для підтримки фізіологічних функцій та здоров'я. Гіпоглікемія, що може виникнути під час голодування та під час лікування діабету інсуліном, збіднює нейрони на енергію, яка вкрай потрібна для забезпечення синапатичної передачі, а хронічний її перебіг викликає мікросудинні ускладнення, такі як ретинопатія та макросудинні захворювання, включаючи інфаркт та інсульт [108].

Сітківка одна з найбільш метаболічно активних тканин в організм. Глюкозу вона через два бар'єри: ретинальні капілярні ендотеліальні клітини і ретинальний пігментний епітелій, шар епітеліальних клітин, з'єднаних щільними контактами, який розташований між елементами фоторецепторів і судинної оболонкою. Наявність цих бар'єрів у нервовій тканині запобігає пасивній дифузії глюкози та інших речовин в інтерстиціальний простір, що оточує нервові клітини. Натомість надходження глюкози опосередковується специфічним, полегшеним транспортним процесом за участю членів сімейства натрійнезалежних переносників глюкози – GLUT. Глюкозні транспортери ідентифіковані понад 25 років, активно вивчаються, але й досі механізм регуляції транспорту через них залишається предметом дискусії

[50, 101, 102, 151, 179].

Завдяки GLUT1 глюкоза з крові проникає в цитоплазму ендотеліальних клітин послідовно проходячи через мембрани: люменальну та аблюменальну. Доведений асиметричний вміст транспортерів в ендотелії на різних мембранах 1:4, що має виконувати регуляторну роль [131]. Через астроцитарну ізоформу GLUT1 глюкоза потрапляє в нейроглю і лише потім через GLUT3 вона заходить у цитозоль нейрональних клітин. Нині у людей ідентифіковано 14 різних GLUT. В умовах основного обміну більшість цих транспортерів, особливо GLUT4, значною мірою залучені до інсулінозалежних механізмів та відіграють важливу роль у поглинанні глюкози адипоцитами, клітинами серця та скелетних м'язів, а також відіграють важливу роль у гомеостазі глюкози у всьому організмі [109].

Транспортер глюкози-1 (GLUT1) є єдиним відомим в даний час носієм глюкози через гематоенцефалічний бар'єр, а також відповідає за розподіл глюкози в гангліозних клітинах, клітинах фоторецепторів та клітинах Мюллера в сітківці. GLUT1 в основному експресується в судинних ендотеліальних клітинах внутрішнього кров'яно-сітківкового бар'єру та пігментних епітеліальних клітинах сітківки зовнішнього кров'яно-сітківкового бар'єру, і цей транспортер було визначено як перспективну мішень для вивчення патогенезу діабетичної ретинопатії.

Дослідження щодо експресії GLUT1 при високому рівні глюкози в даний час є суперечливі. Kumagai A.K. (1996) досліджував експресію GLUT1 в очних яблуках хворих на діабет (без або з легкою ретинопатією) із застосуванням імуноцитохімії та виявив, що активність GLUT1 у сітківці більш ніж половині очних яблук була в 18 разів вищою, ніж в очних яблуках нормальної контрольної групи [102]. Fernandes R. (2003, 2004) із співавт., за допомогою імуного фарбування золотом встановили, що не було компенсаційного зниження регуляції GLUT1 у діабетичних щурів [72, 73]. Пізніше, Fernandes R. також повідомляли, що експресія GLUT1 знижена у кроликів із діабетом, індукованим алоксаном. Badr G.A. із співавт.

припустив, що стан діабету знижує регуляцію експресії GLUT1 в сітківці та її мікросудинах [30]. За даними інших авторів нокдаун GLUT1 шляхом внутрішньоочних ін'єкцій пулу siRNAs, спрямованих проти мРНК гену SLC2A1, що, кодує GLUT1, суттєво знижує середній рівень глюкози в сітківці мишей з діабетом [115, 176].

Дослідження показали, що фактор, індукований гіпоксією (HIF-1 α) може відігравати ключову роль в умовах гіпоксії, а його гени-мішені сприяють неоваскуляризації сітківки [113]. Його експресія корелює з прогресуванням захворювання при ранній ДР, ангиогенез сітківки тісно пов'язаний із підвищенням цього показника через посилення експресії фактора зростання ендотелію судин (VEGF) [177, 179]. За даними імуногістохімічних досліджень, інгібування HIF-1 α пригнічувало експресію VEGF та гальмувало ангиогенез. Проте залишається нез'ясованою можливість використання цього шаперону для оцінки тканинної гіпоксії у пацієнтів із розвинутою ретинопатією.

1.4 Жирні кислоти – важливі параметри оцінки ліпідного обміну у пацієнтів з ЦД2

Тривала циркуляція в плазмі крові вільних жирних кислот (ЖК) є одним з важливих впливів на розвиток інсулінорезистентності (ІР) [37, 81, 127]. Водночас, механізми, які б чітко поясняли зв'язок харчових надходжень продуктів-джерел ЖК, їх концентрації у вигляді вільних ЖК плазми залишаються невідомими та продовжують вивчатися. Також доведено не високу інформативність вмісту загального холестерину та його фракцій – ліпопротеїдів для оцінки порушень ліпідного обміну. Актуальним є вивчення мембрани клітин, до складу яких входять ЖК, рецепторного апарату мембран клітин, завдяки чому поглинаються жири, внутрішньоклітинних регуляторів, що забезпечують використання молекул ЖК та/або їх депонування.

Одним з потенційних механізмів впливу на розвиток діабету є це зміна ЖК складу мембран клітин: адипоцитів, гепатоцитів, клітин скелетних м'язів, і еритроцитів і відповідно зміна їх функцій. Вважається, що дієта з високим вмістом насичених ЖК погіршує текучість мембрани, проникність іонів, зв'язування та спорідненість рецепторів інсуліну. Однак нез'ясовно, який часовий період, необхідний для споживання жирної кислоти, щоб викликати певні зміни ЖК вмісту плазми або еритроцитів, що визначить шлях, який веде до ЦД2 [132]. Склад ЖК можна об'єктивно виміряти в різних тканинах і ліпідних пулах крові, таких як жирова тканина, еритроцити, фосфоліпіди плазми та сироватки крові, ефіри холестерину або фракції тригліцеридів. Однак питання про те, який ліпідний басейн найкраще відображає споживання жирних кислот, залишається невирішеним. Жирова тканина вважається найкращою тканиною для вимірювання ЖК, оскільки саме вона формується при харчуванні і відображає тривалий час обміну речовин [84]. Однак метод вимірювання через біопсію жиру, мінімізує корисність методу у великих епідеміологічних дослідженнях. На відміну від цього, ЖК, виміряні в мембранній фракції еритроцитів, відображають більш короткі часові рамки раціону харчування в порядку 120 діб, але фракція плазми представляє ще коротший термін споживання за останні кілька днів [132]. Є дані про не високу інформативність плазмових маркерів у порівнянні із оцінкою структурних компонентів через вимірювання мембранних ЖК еритроцитів [41, 127]. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. Автори також заявляють про те, що екзогенні харчові ЖК сильніше асоціюються з ЖК, виміряними в мембрані еритроцитів, ніж у плазмі [75, 154, 155].

В роботах Mahendran Y. (2014) підкреслено, що мембрани еритроцитів є найбільш показовою моделлю, яка відображує тривалість циркуляції ЖК внаслідок харчового надходження жирів. Склад ЖК в організмі формується переважно за рахунок дієтичного раціону та ендогенного синтезу, а мембрани еритроцитів не здійснюють синтез та модифікацію ЖК *de novo* і, окрім тривалого харчового навантаження, їх мембранний склад ЖК

генетично детермінований [116].

Погляди вчених не є одноставними: дехто вважає зв'язок між ЖК складом раціону та розвитком діабету непереконливими, інші повідомляють про відсутність асоціації між споживанням різних ЖК і ризиком виникнення діабету. Є дослідження про зворотній зв'язок між більшим споживанням рослинного жиру та ризиком діабету [132]. Однак існує поширене твердження, що НЖК асоціюються з ризиком діабету, при цьому окремі жирні кислоти, такі як НЖК з непарними номерами (C15:0, пентадеканова кислота; C17:0 гептадеканова кислота), є обернено асоційованими з ризиком діабету, а з парними НЖК (C14:0 міристинова; C16:0, пальмітинова кислота) позитивно пов'язана з виникненням захворювання.

Hodge A.M. та співавтори (2007) провели широке когортне дослідження протягом 4 років спостерігали за понад 40 тис. пацієнтів і виявили позитивні асоціації між захворюваністю на діабет та НЖК в та дієті. Ліноленова кислота в складі плазмових фосфоліпідів була зворотно, а харчова ліноленова кислота позитивно, пов'язана з ризиком діабету [83]. Зменшення вмісту лінолевої ЖК у фосфоліпіді плазми хворих на ЦД2 у порівнянні із здоровими особами говорить про те, що збільшення споживання лінолевої кислоти може зменшити ризик діабету. Однак проведені спостереження в цьому напрямку не підтверджують корисного впливу дієтичних добавок [83, 132]. Вірогідно, на стадії предіабетичного стану, виникають якісь відмінності у складі ЖК плазми, і специфічних регуляторних протеїнів, що потребують дослідження біомаркерів діабету та ретельного тлумачення результатів [127, 132].

Зовсім нові дослідження виводять на арену головних регуляторів накопичення жиру в адипоцитах білок EHD2 (англ., Eps15-homology domain containing protein 2), який регулює стабільність мембрани під час поглинання краплі жиру через ендоцитоз і заперечує утворенню великих каверл із жиром (ендосом). Водночас, генетична відсутність експресії EHD2, або його зниження концентрації сприяє розвитку ожиріння через швидке наповнення клітини жиром. Але цей протеїн тільки починає вивчатися і досліди

проходять на тваринах і культурі клітини [119].

Більш поширеним біомаркером, що регулює зв'язує жирні кислоти (ЖК) в клітині забезпечує внутрішньоклітинну систему регуляції ліпідного обміну вважається L-FABP (англ., Liver-type fatty acid binding protein) [28, 55].

Нашими колегами проводилося вивчення впливу експресії L-FABP та жирнокислотного складу їжі на стан ліпідного метаболізму хворих із різним ступенем діабетичної ретинопатії та цукрового діабету 2 типу [19, 41]. Автори висловили думку, що вірогідно, за певних умов, при наявності метаболічних зсувів, саме зменшення експресії L-FABP запобігає розвитку ожиріння і діабету. Відносно досліджуваних груп пацієнтів з ДР, також можна припустити, що зменшення експресії L-FABP є стримуючим фактором на розвиток і прогресування ДР. Дослідники показали, що, у пацієнтів із тяжкою прогресуючою формою ДР рівень L-FABP підвищується, що є підтвердженням токсичного впливу нестефікованих довголанцюгових ЖК, які пов'язані з діабетом, і багатьох інших метаболітів ЖК: продуктів окиснення, простагландинів, ліпоксигеназ, ретиноїдів тощо [16]. Однак, ці припущення потребують доказів, тому внутрішньоклітинні механізми регуляції L-FABP за умов діабету ще не з'ясовані і продовжують активно вивчатися.

1.5 Роль ЖК в забезпеченні структури еритроцитів

Ліпідний склад еритроцита представлений: фосфоліпідами – 36,3%; сфінгомієлінами – 29,6%; холестеринном – 22,2%; гліколіпідами – 11,9%. На структуру і фізичні властивості мембран істотний вплив мають жирні кислоти. Взагалі, роль ЖК в організмі неможливо переоцінити. Вони модулюють активність ферментів, транспортерів та мембранних рецепторів (рецепторів ЛПНЩ, інсуліну, антитіл, нейромедіаторів, рецептори для

лікарських засобів тощо [87, 89]. Основні насичені ЖК: стеаринова, пальмітинова, маргарінова визначають щільність і міцність структури, а ненасичені: олеїнова, ліолева, ліоленова, які мають особливу конформацію молекули – надають мембрані гнучкість, що визначає пластичність апікального краю клітини, або клітини в цілому [57].

При гіперглікемії склад ЖК в тканинах змінюється, оскільки в клітинах припиняється синтез вищих ЖК і включається їх окислення. ЖК стають для клітин основним енергетичним «паливом» [63, 114]. В умовах інтенсифікації утворення ВР, мембрани клітин перетворюються у мішені високореактивних радикалів кисню, а першими об'єктами дезорганізації стають їх ліпіди – жирні кислоти [68].

На моделі щурів з ЦД 1 типу досліджувалися зміни складу ЖК в життєважливих органах (міокард, печінка, еритроцити), доведено, що гіперглікемія викликає суттєвий перерозподіл насичених і ненасичених ЖК в мембранах клітин, що відображається на їх функції [15].

Висловлено припущення, що збільшена жорсткість мембрани в результаті зниження індексу ненасиченості гальмує інтеграцію інсулін-залежних рецепторів глюкози GLUT4 в плазматичну мембрану, тим самим знижуючи ефективність транспорту глюкози, що призводить до збільшення секреції інсуліну. Це було підтверджено Workman M. і ін. (1993), який описав кореляцію між концентраціями ДЛ-ПНЖК в мембранних фосфоліпідів скелетних м'язових клітин і чутливості до інсуліну [39]. Також автори підкреслюють, що багато чого не з'ясовано у цьому напрямку і головне відсутні оцінка та аналіз харчового раціону хворих на ЦД із врахуванням ПНЖК [98]. Отже, бракує даних про один з важливіших моментів життя пацієнтів із ДР – їх дієти та особливих рекомендацій до харчування, які були б невід'ємною складовою медикаментозного лікування і способу життя. В той же час склад харчових продуктів, визначення їх поживної цінності і вплив на склад біохімічних показників організму що відображають обмінні метаболічні процеси, є дуже значним. Особливо це відноситься до обміну

ЖК. Найбільш адекватним субстратом для оцінки спектру ЖК які циркулюють в організмі є мембрани еритроцитів, властивості яких також залежать від вмісту ЖК.

Біохімічною основою мембрани еритроцита є міцний біполярний шар фосфоліпідів, які чітко структуровані завдяки своїй гідрофобності і визначають міцність структури. При цьому, основну «жорсткість конструкції» фосфоліпиду надає насичена ЖК, яка входить до його складу, а гнучкість і здібність до деформації визначається присутністю у складі фосфоліпиду ненасиченої ЖК, яка має особливу конформаційну лабільність. Тому, є зрозумілим інтерес до вивчення механічних, фізичних та функціональних особливостей мембран еритроцитів з врахуванням спектру ЖК, які визначаються особливостями ліпідного обміну організму, але залежать від характеру харчування, загального метаболізму та інших факторів.

1.6 Вивчення властивостей мембран еритроцитів у пацієнтів з ЦД2

Еритроцити у пацієнтів з діабетом стикаються з безліччю ризиків, таких як гіперглікемія, гіперосмолярність, окислювальний стрес, запалення і порушення ліпідного обміну, що призводить до посилення агрегації, зниження деформованості клітин і зниження плинності мембран. Ці зміни в еритроцитах в кінцевому підсумку призводять до порушення мікроциркуляції і діабетичних ускладнень[167].

Як важливий компонент кровообігу, еритроцити є чутливим індикатором стану здоров'я організму. Деякі показники параметрів еритроцитів, такі як концентрація гемоглобіну, гематокрит і швидкість осідання еритроцитів, можна виміряти безпосередньо по крові, тоді як деякі параметри, такі як середній обсяг клітин (MCV), середній рівень гемоглобіну в клітинах або середня концентрація гемоглобіну в клітинах можна

розрахувати тільки на основі декількох вимірюваних показників за допомогою гематологічного аналізатору. Ці параметри відображають стан еритроцитів з різних сторін і можуть бути використані в першу чергу для оцінки морфології, структури, функції і продукції еритроцитів для подальшої діагностики деяких захворювань [74].

Доведено, що у пацієнтів з ЦД2 еритроцити втрачають нормальну гнучкість мембрани та деформабільність [49], що ще більше збільшує ризик діабетичних ускладнень. Спостерігаючи за змінами морфології і структури еритроцитів у діабетиків, можна краще зрозуміти прогресування ПДР [130].

Гіперглікемія змінює мембранні властивості еритроцитів, що призводить до підвищеної осмотичної крихкості еритроцитів. Суттєво знижуються рівні Na^+/K^+ АТФази, що може спричинити порушення внутрішньоклітинного балансу іонів збільшення розміру клітин, осмотичної крихкості, прискорити клітинне старіння, що сприяє порушенню мікросудинної циркуляції [103, 143].

Вивчення властивостей мембрани еритроцитів приваблювало увагу багатьох дослідників. Але на всіх етапах залишалися невирішеними методичні труднощі для вивчення *in vivo* можливості клітини проходити через мікрокапіляр, який має діаметр в 2-3 рази менший за еритроцит [16, 157].

Значно більший успіх мали закордонні вчені, для яких технічні обмеження не були головною перешкодою в вивченні функціональних властивостей еритроцитів для забезпечення тканинного дихання.

Так дослідниками отримані дані про капілярний кровотоку в різних зонах мозку лабораторних щурів, вивчених за допомогою відеокамери, закріпленої до маленьких отворів на поверхні черепа. Оцінювалася здатність еритроцитів проходити через капіляри і вимірювалася швидкість проходження еритроцитів по капіляру *in vivo*. Автори підкреслюють, що вивчення деформаційних властивостей еритроцитів є важливим етапом розуміння патогенезу багатьох захворювань і мають затребуваність в клініці.

Особливо при порушенні тканинної перфузії [95].

Musielak M. (2009) надає огляд сучасних технічних рішень, що імітують дію сили, яка додається до еритроцита в процесі макро- і мікроциркуляції [125]. При цьому автор визначає, що характеристика клітинної деформованості включає в себе загальний вимір дуже складних відносин між біологічними властивостями клітини і фізичними силами, яким піддається клітина в капілярі. Для вивчення цих взаємодій сконструйований лазерний (оптичний) пінцет [124].

Квантові сили, що виникають при деформації еритроцита можна оцінити за допомогою ектацитометра. Метод ще не має широкого розповсюдження в клініці, але є високоточним і має високу відтворюваність [96]. Інші високотехнологічні вимірювання проводилися авторами для вимірювання механічних властивостей клітини за допомогою сенсорів в мікроканалах і вимірювання механічних властивостей клітин в суспензії з мікрофлюїдальним пристроєм [106, 158].

Особливе значення зміна деформаційних властивостей еритроцитів має при захворюваннях, що визначають пойкилоцитоз еритроцитів, наприклад – серповидноклітинна анемія. На патогенетичні механізми цього захворювання впливають як біомеханічні властивості еритроцитів і їх гемодинамічні властивості в мікросудинах. Саме для цього автори використовують оптичні прилади вимірювання [42]. Дослідники виявили, що висока цитоплазматична в'язкість значно зменшила динамічні коливання мембрани в еритроцитах з серповидноклітинною анемією, і що механічні властивості мембран цих клітин значно відрізняються від незмінених еритроцитів.

Інші дослідники пропонують враховувати той факт, що вивчення еритроцитарної біомеханіки були в основному зосереджені на здібності до деформації клітини і реології, вимірюної в основному в статичному або квазі-статичному стані з використанням класичних біомеханічних методів, такі як оптичні пінцети і аспірація мікропіпеткою. В той же час, еритроцити повинні відчувати серйозні перешкоди, щоб пройти через вузькі капіляри і субмікронні

пори селезінку протягом їх нормального життя декілька сот тисяч раз. Динамічна поведінка еритроцитів при кровообігу практично не вивчалася. Приблизно через 200 циклічних проходів по кровотоку і після великої кількості деформацій у незначній долі еритроцитів мембрана стає незворотною. Модель до зниження деформації демонструють АТФ-збіднені клітини. Результати показують значення концепції нової техніки вивчення «мікрофлюїдіки» і динамічного аналізу еритроцитів людини [136]. Ми також вважаємо, що особливо це стосується захворювань, в яких енергетичний потенціал еритроцитів зменшується за рахунок порушення вуглеводного обміну і АТФ продукції.

Гемодинамічні характеристики еритроцитів вивчаються і для того, щоб краще порівняти якість свіжої та консервованої крові [179]. Результати показали, що після консервації еритроцити мали гіршу деформованість, ніж свіжі еритроцити, але заморожені еритроцити мають менше пошкоджень при зберіганні, ніж ті, що зберігаються в низьких температурах. Ця система оцінки властивостей еритроцитів може служити платформою для прямого спостереження за морфологічними і механічними властивостями клітин в умовах фізіологічного середовища [179].

Таким чином, еритроцити сьогодні є досить популярним об'єктом вивчення механізмів, що визначають розвиток патогенетичних ланок в основі яких лежить гіпоксія. При цьому не важливо які були пускові механізми і була гіпоксія ендогенною або екзогенною. Метаболічні зсуви і процеси ушкодження тканин в умовах нестачі кисню стереотипні.

Виникнення енергодефіциту в тканині призводить до підсиленої генерації вільних радикалів (ВР) які в нормі також виникають, але їх кількість обмежена і дія контролюються антиоксидантною системою. Підвищення кількості ВР призводить до мембранної деструкції, підвищенню ліпідного окиснення, модифікації білків і апоптозу. Найбільшу руйнівальну силу в цьому процесі має пошкодження цитоскелету, деградація мембранних фосфоліпідів. Особливо це відображується на тканинах які чутливі до

підвищеного анаеробного гліколізу: мозок, сітківка, ендотелій судин, міокард, нирки тощо. Кров, як рідинне середовище і тканина також відчуває ці зміни і сама реагує на гіпоксію. Клітини крові суттєво розрізняються за функціями і в тому числі за характером обмінних процесів, ступеню та потребою до енергозабезпечення [16].

Серед усіх клітин крові еритроцити займають окреме положення. Вони не мають ДНК і не синтезують білки, але перебувають в крові найдовший час – більше 120 діб. Вони не використовують кисень для власного енергозабезпечення оскільки не мають мітохондрій та ендоплазматичного ретикулума, а отримують АТФ шляхом анаеробного гліколізу. В той же час, ці клітини постійно контактують з киснем, а це означає що в них проходить аутоокиснення із створенням супероксидрадикалів та інших ВР. Вважається, що еритроцити мають міцну систему антипероксидазного та антирадикального захисту, але реакція еритроцитів на гіпоксію, як ми вже казали залишається не вивченою [16].

Дослідження морфофункціональних властивостей еритроцитів у людей різних вікових груп виявило якісні та кількісні відмінності мембран еритроцитів і їх здатності до деформації, показників, що характеризують ліпідний і білковий компонент мембран [17]. Встановлено, що у осіб старше 50 років в мембранах еритроцитів зростає процентний вміст спектрину, який збільшує природну «жорсткість» червоних клітин крові. Доведений взаємозв'язок між станом мембран еритроцитів і параметрами регіонарного кровотоку. Встановлено, що гіпоксія і зміна температури впливають на стан мембран еритроцитів і характеристики регіонарного кровотоку в залежності від віку [17]. Більш того, плинність мембрани еритроцитів, їх здібність до деформації грає ключову роль в мікроциркуляції крові та забезпечені киснем усіх клітин і процесу тканинного дихання.

Тому, ми визначили актуальним вивчення умов нітрозативного стресу, глюкозних транспортерів, регуляції обміну жирних кислот, структурно-функціональних змін клітинних мембран у хворих на цукровий діабет 2 типу

для оптимізації профілактики поглиблення діабетичної ретинопатії.

Для цього етапами нашої роботи було: оцінка вмісту аргінази-1 в сироватці крові у пацієнтів на ПДР із різною тривалістю ЦД2 в залежності від генотипу *CYP2E1*, як можливого чинника розвитку ендотеліальної дисфункції на тлі метаболічних ушкоджень печінки. Вивчення вмісту транспортерів сімейства GLUT-1 в сироватці крові пацієнтів на ПДР із різною тривалістю ЦД2, як фактору забезпечення глюкозою клітин організму. Дослідження стану ліпідного метаболізму за вмістом ЖК в клітинних мембранах пацієнтів на ПДР із різною тривалістю ЦД2, у співставленні із рівнем регуляторного внутрішньоклітинного шаперону L-FABP в сироватці крові. Вивчення морфо-функціональних характеристик та структурних властивостей еритроцитів за допомогою оцінки осмотичної та механічної резистентності клітин у пацієнтів на ПДР із різною тривалістю ЦД2.

Резюме до розділу 1

Таким чином на підставі аналізу сучасної літератури з досліджуваної проблеми було встановлено, що цукровий діабет є глобальною епідемією з високими показниками захворюваності та смертності. За прогнозами, до 2045 року кількість людей з діабетом у всьому світі досягне 629 мільйонів, що становитиме 10% світового населення. ДР – основне мікросудинне ускладнення діабету, є основною причиною сліпоти у дорослих працездатного віку. Об'єднаний аналіз 35 популяційних досліджень у всьому світі (22 896 учасників) показав загальну поширеність ДР – 34,6%, включаючи важку непроліферативну ДР (НДР), проліферативну ДР (ПДР) та клінічно значущий діабетичний макулярний набряк (ДМО). Дослідження нових патогенетичних чинників розвитку та прогресування ДР, а також на підставі цього розробка нових напрямків профілактики залишаються важливими питаннями сучасної офтальмології.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Дизайн дослідження і клінічна характеристика пацієнтів

До обстеження були залучені 106 пацієнтів (106 очей), які спостерігалися у офтальмолога. в спеціалізованому офтальмологічному відділенні Львівської обласної клінічної лікарні, де за результатами офтальмологічного обстеження виявлено різний ступень ушкодження сітківки у вигляді ПДР. Загальними критеріями включення до дослідних груп було наявність ПДР різної стадії розвитку на тлі тривалого ЦД2.

Обстеження і ведення пацієнтів виконувалося мультидисциплінарною групою лікарів для характеристики стану, основного захворювання, коморбідності і виявлення факторів, які могли вкладатися у критерії невиключення: наявність ендокринної патології та ендокринопатії, зокрема спадкові, ЦД 1 типу, гострі інфекційні захворювання, онкологічні захворювання (в т.ч. в анамнезі), декомпенсація коморбідної патології, психічні розлади, прийом нейролептиків, антидепресантів, наявність протеїнурії, клінічно значущої макулопатії, пошкодження зорового нерву, глаукоми.

Усі пацієнти проходили ендокринологічне обстеження (тести вмісту тиреотропного гормону та гормону щитоподібної залози T4), лабораторний моніторинг, детальний аналіз гіперглікемії і моніторування рівня глюкози крові. Також отримували стандартне лікування ЦД2, визначене відповідними протоколами.

Для участі у нашому дослідженні ми залучали пацієнтів із діагнозом ПДР і різною тривалістю ЦД2. За цим критерієм ми визначили 2 групи: Дослідна група 1 (ДГ-1) та дослідна група 2 (ДГ-2).

У пацієнтів ДГ-1 (n=46, жінок 56%) середній вік (Me [Q1-Q3]) складав 62 [57-66] роки, тривалість ЦД2 визначалася до 20 років. У пацієнтів ДГ-2 (n=60, жінок 53%) із середнім віком 65 [60-68,25] років діабет тривав понад 20 років.

Групу порівняння (контрольну – КГ) склали добровольці (n=43, жінок 56%), без ознак цукрового діабету та ретинопатії, які звернулися з метою профілактичного огляду в клініко-діагностичну лабораторію Університетської клініки НМУ імені О.О. Богомольця і були співставні за віком із пацієнтами з ПДР. Дані порівняння характеристик груп вказані в таблиці 2.1, де визначено, що групи порівняння були співставні за усіма параметрами.

Таблиця 2.1

Характеристика параметрів у групах дослідження

Показники	КГ n = 43	ДГ-1 n = 46	ДГ-2 n = 60	Значущість відмінностей
Вік, роки Me; [Q1÷Q3] (максимум- мінімум)	64 [57-69] (42-72)	62 [57-66] (45-69)	65 [60-68,25] (58-74)	$p_{\text{КГ-ДГ-1}} > 0,05$ $p_{\text{ДГ-1-ДГ-2}} > 0,05$ $p_{\text{КГ-ДГ-2}} > 0,05$
Стать, жінки, % доля в групі	56% 24(43)	56% 26(46)	53% 31 (60)	χ^2 $p=0,36$

Примітки:

1. Визначення статистичної значимості відмінностей проводили за допомогою критерію Крускала-Уолліса.

2. Параметр «стать» порівнювали в таблиці спряженості «k*m», використовуючи критерій χ^2 .

Пацієнтам пропонували узяти участь у дослідженні і пояснювали, що ніяких додаткових впливів на них не буде здійснено. Усі процедури обстеження та лабораторні тести будуть виконані для діагностики стану. Ніякі персональні дані пацієнтів використані не будуть, а для аналізу і статистичної обробки будуть узяті параметри, вказані в амбулаторній карті. Також, із пацієнтами було погоджено узяття залишків біологічного матеріалу (цільна кров, сироватка та плазма) в лабораторії, де досліджується їх кров для

діагностичних тестів. Ці залишки підлягають утилізації, проте вони будуть використані дослідником для проведення додаткових тестів і отримання інформації для наукового аналізу.

Пацієнтам було роз'яснено, що усі додаткові дослідження, що виконуються для наукового аналізу будуть виконуватися силами дослідника та за його кошти. Ніякого додаткового фінансового навантаження на пацієнта не буде здійснено.

Оскільки одним із етапів дослідження передбачено оцінка особливості харчування та дієтичних переваг, пацієнтів просили заповнити нескладну анкету. Якщо виникали труднощі із читанням тексту анкети (через низьку гостроту зору), дослідник власно прочитував пацієнту питання та фіксував варіанти відповіді. Анкетування займало орієнтовно до 7 хвилин і не було обтяжливим для пацієнта.

Отже, усі особливості активностей учасників дослідження були прописані в Інформованій згоді, яка була попередньо розроблена для даного дослідження та затверджена на засіданні кафедри офтальмології НУОЗ України імені П.Л.Шупика (протокол №1 від 28.01.2021).

Усі учасники дослідження власно знайомилися із формою документа і давали свою згоду шляхом його підписання. Усі біоетичні аспекти дослідження були розглянуті і затверджені комісією з біоетики Національного університету охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика (протокол №1 від 11.01.2021р.).

2.2 Офтальмологічні дослідження

Спеціалізовані офтальмологічні дослідження проводилося на базі офтальмологічного відділення Львівської обласної клінічної лікарні та «Клініки Зору Павлів».

Усім пацієнтам було проведено визначення гостроти зору -візометрію

за допомогою стандартних таблиць Головіна-Сівцева та таблиці ETDRS [65].

Рефракцію визначали за допомогою авторефрактометра Torcon RM-8800 (Японія) та набору офтальмологічних пробних коригувальних лінз «Біомед» (комплект з 266 лінз) виробництва Jiangsu Yuuyue Medical Equipment & Supply Co., Ltd (КНР).

Оцінку поля зору проводили пацієнтам п методом кінетичної периметрії за допомогою кінетичного периметра №10471704 та статичної периметрії Perimetr IFA- 960.

Тонометрія – метод визначення рівня внутрішньоочного тиску. Усім пацієнтам проводили дослідження двома методами:

- Контактний метод по Маклакову за допомогою тягарців по 10 г із фарбою. Нормою внутрішньоочного тиску вважали 18-26 мм рт. ст.
- безконтактний метод пневмотонометрії. Під дією поштовху повітря рогівка прогинається всередину і цьому прогинанню протидіє тиск. Дослідження виконували за допомогою пневмотонометра Crystalvue TonoVue-P (Тайвань), нормою внутрішньоочного тиску вважали 18-25 мм рт. ст.

Усім пацієнтам було проведено біомікроскопію – детальний огляд переднього відрізка очей за допомогою щілинної лампи Torcon SL-D7 (Японія).

Гоніоскопію проводили за допомогою щілинної лампи Torcon SL-D (Японія) та трьохдзеркальної лінзи Гольдмана. Обстежували кут передньої камери, у випадку підозри патологічних змін, наприклад неоваскуляризації.

Офтальмоскопію проводили усім пацієнтам для детального огляду сітківки, та її судин, зорового нерва, макулярної ділянки за допомогою щілинної лампи Torcon SL-D (Японія) та лінзи Volk 90D та (або) лінзи Volk 78D.

Усім пацієнтам було проведено оптичну когерентну томографію в режимі «macula». Метод дослідження дозволив нам оцінити стан сітківки шляхом візуалізації шарів сітківки у поперечному перерізі, оцінити

морфологічну будову. Дослідження проводилось за допомогою оптичного когерентного томографа REVO nx (Велика Британія).

За допомогою ОКТ ангіографії (точна цифрова мікроангіографія ока) досліджували зміни кровоносних судин сітківки за допомогою оптичного когерентного томографа REVO nx (Велика Британія).

Фотофіксація очного дна проводилась для об'єктивізації очного дна, що дозволило побачити стан сітківки та її судин, зорового нерва та макули і тим самим краще зрозуміти особливості захворювання. Дане дослідження проводили за допомогою апарату Topcon TRC-NW8F (plus) згідно з протоколом Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS).

Відповідно до шкали ETDRS, у пацієнтів визначали помірну (PDR), тяжку (High-risk PDR) та прогресуючу ПДР (Advans PDR) [65].

Таблиця 2.2

Класифікація та клінічні прояви ДР за шкалою ETDRS

Рівень балів ETDRS	Стадія діабетичної ретинопатії	Офтальмоскопічна картина
1	2	3
Непроліферативна діабетична ретинопатія		
10	Немає ретинопатії	Мікроаневризм та інших змін немає. Може відбутися розширення венул сітківки.
14-35	Початкова	Невелика кількість мікроаневризм та мікрогеморагії. Можна виявити «тверді» та «м'які» ексудати.
43	Помірна	Одна з ознак: - помірна кількість мікроаневризм та крововиливів; - помірно виражені інтравитреальні мікросудинні аномалії в одному квадранті.

1	2	3
47	Виражена	Обидві ознаки рівня 43 або одна з ознак: - множинні мікроаневризми та мікрогеморагії у двох-трьох квадрантах; - помірно оголені інtrarетинальні мікросудинні аномалії в одному-трьох квадрантах; - чіткість венул принаймні в одному квадранті.
53	Тяжка	Поєднання від двох до трьох ознак рівня 47 або однієї з ознак: - множинні мікроаневризми та мікрогеморагії у всіх квадрантах; - виражені інtrarетинальні мікросудинні аномалії щонайменше в одному квадранті; - чіткість венул у двох або більше квадрантах.
Проліферативна діабетична ретинопатія		
61	Початкова	Одна з ознак: - фіброз на диску зорового нерва або сітківці без неоваскуляризації; - неоваскуляризація сітківки менше половини площі диску зорового нерва (ДЗН).
65	Виражена	Одна з ознак: - неоваскуляризація сітківки більш ніж половини площі ДЗН; - неоваскуляризація ДЗН менше третини його області; - неоваскуляризація сітківки менше половини області ДЗН без неоваскуляризації ДЗН, але в присутності преретинальної чи вітрреальної геморагії площею менше 1,5 ДЗН.
71	Тяжка (високого ризику 1)	Одна з ознак: - преретинальний або вітреальний крововилив із площею понад 1,5 ДЗН; - преретинальний або вітреальний крововилив із площею менше 1,5 ДЗН в поєднанні з неоваскуляризацією сітківки більш ніж половини області ДЗН; - преретинальний або вітреальний крововилив із площею менше 1,5 ДЗН в поєднанні з неоваскуляризацією ДЗН менше третини його області; - неоваскуляризація ДЗН більше третини його області.

1	2	3
75	Тяжка (високого ризик 2)	Неоваскуляризація ДЗН більше третини його області т преретинальна або вітреальна геморагія площею понад 1,5 ДЗН.
81 - 85	Далеко зайдена	Одна і більше ознак: - неможливо оцінити область неоваскуляризації; - очне дно офтальмоскопічно частково або не офтальмоскопічно в задньому полюсі; - преретинальна або вітреоретинальна геморагія в задньому полюсі з площею понад 4 ДЗН; - ретіношизис в макулярній зоні.
90	Градація неможлива	Очне дно не офтальмоскопічно навіть фрагментарно.

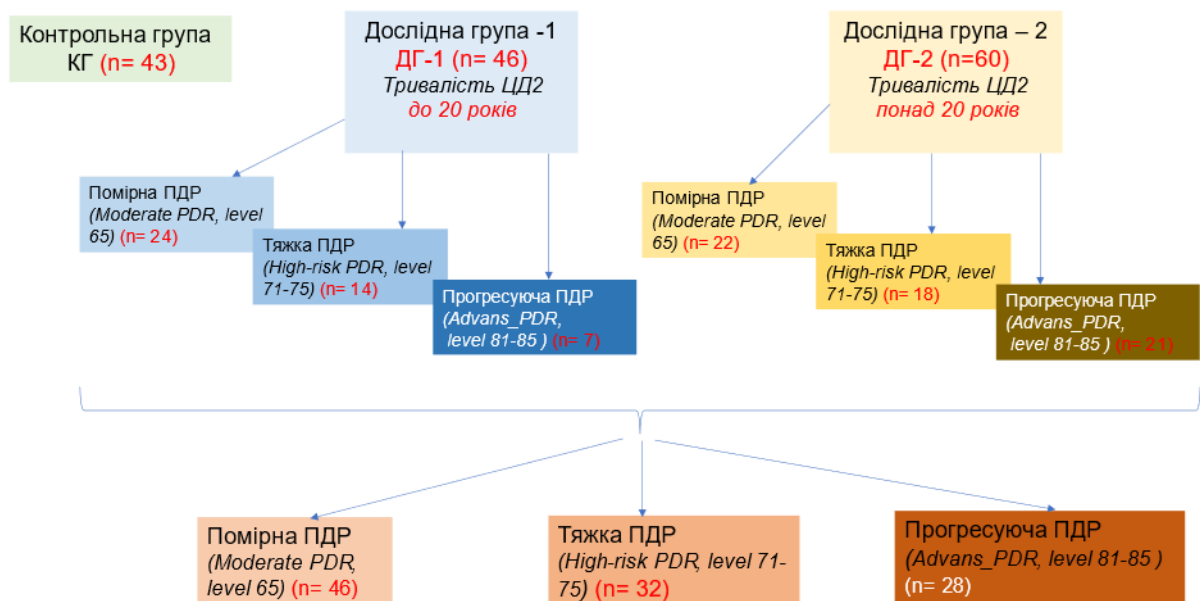


Рис. 2.1 Розподіл груп які досліджувались із характеристиками за тривалістю основного захворювання та стадією ПДР

Таким чином, основним критерієм за яким ми розрізняли групи пацієнтів з ПДР – це була тривалість основного захворювання, і ці характеристики ми визначали в групах ДГ-1 та ДГ-2, де ЦД2 був діагностований у період до 20 років та понад 20 років.

Однак, також ми порівнювали деякі показники в групах із різною стадією ПДР. Як ми вже описували, ці стадії ми визначали відповідно до шкали ETDRS, і загалом у 46 пацієнтів визначали помірну (Moderate PDR, level 65), у 32 тяжку (High-risk PDR, level 71-75) та у 28 прогресуючу ПДР (Advans PDR, level 81-85).

Більшість пацієнтів в дослідних групах мала помірну ПДР. В ДГ-1 таких пацієнтів було 24, в ДГ-2 - 22 осіб. Із діагнозом тяжкої ПДР ми спостерігали 32 особи, в ДГ-1 14 та в ДГ-2 -18 пацієнтів. Прогресуючу ПДР ми виявили у 28 осіб, проте в основному вони були в групі ДГ-2, тобто на фоні тривалого протікання ЦД2, а в групі ДГ-1, таких пацієнтів було 7.

За рахунок такого розподілу, ми не описували дані головних змінних, які обговорюються в розділах роботи в кожній підгрупі. Вважаючи, що це не репрезентативна вибірка. Тому, ми порівнювали між собою групи ДГ-1 та ДГ-2, а паралельно, усю когорту пацієнтів відповідної стадії, для того щоб виявити закономірності зміни показників або у залежності від тривалості діабету, або у залежності від стадії ПДР.

Як ми вже показували вище, ці групи були між собою співставні за віком, статтю, звичками та способу життя, оскільки за кількісними показниками статистичної різниці не було (табл. 2.1). Також в групу контролю ми підібрали пацієнтів для порівняння, які також були співставні за віком, статтю і рядом критеріїв із пацієнтами.

2.3 Дослідження поліморфізмів генів

Дослідження проводили шляхом виконання полімеразно-ланцюгової реакції в спеціально обладнаній лабораторії імунології та молекулярної біології Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини НМУ імені О.О. Богомольця, на умовах попередньо складеного договору та технічного завдання. У лабораторію дослідником були

доставлені проби централізовано із суворим дотриманням холодового ланцюга.

Для дослідження була використана цільна венозна кров. Забір проводили в умовах маніпуляційного кабінету у пробірки із фіолетовою кришкою об'ємом 4 мл, що містили (EDTA, K3) як антикоагулянт. Після центрифугування відбирали в окрему пробірку типу Епандорф плазму для дослідження ІФА, а осад (шар із клітинами) залишали для генетичних досліджень. Матеріал маркірували та заморожували при температурі -20°C.

В лабораторії для виділення геномної ДНК використовували набори PureLink® Genomic DNA Kits For purification of genomic DNA, виробник INVITROGEN (США). На першому етапі проводили інкубацію з Digestion Buffer та протеїназою K і шляхом центрифугування позбавлялись від продуктів денатурації та лізису, з метою попередження контамінації додатково інкубували з РНК-азою. Для аналізу поліморфних ДНК-локусів використовували уніфіковані тест-системи TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology (США). Досліджували поліморфізм *rs2070676* гену *CYP2E1*. Інкубацію досліджуваного матеріалу проводили з системою праймерів, які фланкують ділянки ДНК генів, що аналізуються, в присутності ДНК-полімерази в ампліфікаторі Gene Amp® PCR System 7500 (Applied Biosystems, США). За допомогою синхронізованої з ампліфікатором програми RealTime_PCR обробляли дані.

2.4 Дослідження вмісту протеїнів

Вміст аргінази-1, GLUT1, GLUT3, GLUT4, HIF-1-альфа, L-FABP визначали у плазмі крові методом твердофазного імуно-ферментного аналізу (ELISA) на напівавтоматичному аналізаторі на напівавтоматичному аналізаторі RT2100C (RAYTO) (Китай) із використанням інкубатора-шейкеру для мікропланшетів PST-60HL-4 (BioSun) (Латвія) та автоматичного

планшетного промивача-вошеру Bio-Rad PW40 у лабораторії імунології та молекулярної біології Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини НМУ імені О.О. Богомольця.

Вміст визначали у плазмі крові методом твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) на напівавтоматичному аналізаторі RT2100C («RAYTO»; Китай) із використанням наборів реактивів: Elabscience (Human Arginase «Hycult Biotech») Elabscience (Human CLUT1 # E-EL-H1822, Human CLUT3 # E-EL-H1824, Human CLUT4 # E-EL-H1825, Human HIF-1-а # E-EL-H1277) , Human L-FABP «Hycult Biotech» за стандартними методиками.

2.5 Дослідження складу жирних кислот

ЖК вимірювали в мембранах еритроцитів крові методом газорідинної хроматографії у лабораторії експериментальних досліджень Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини НМУ імені О.О. Богомольця.

Для дослідження використовували кров, яку брали із вени в умовах маніпуляційного кабінету у спеціальну пробірку із фіолетивою кришкою. Кров в об'ємі 4 мл шляхом обережної, швидкої ротації пробірки 8-10 разів на 180 град змішувалася із антикоагулянтом – EDTA, КЗ, і таким чином, клітини були відокремлені одна від одної.

В пробірку додавали 0,9% розчин NaCl, до верху, ще раз перемішували і центрифугували протягом 5 хвилин при швидкості обертання ротора 1500 об/хв. Відокремлювали над осадочну рідину і знову центрифугували при вказаному режимі. Таким чином отримували еритроцити, які потім досліджували.

Мембрана еритроцита вважається аналогічною мембраною будь якої біологічної клітини організму і може бути використана як модель для вивчення.

Рідину, в якій містилися еритроцити поміщали в пробірку об'ємом 10 мл із притертою пробкою та згідно до рекомендацій по методу Фолча заливали хлороформ-метаноловою сумішшю (у співвідношенні 2:1) і поміщали в холодильник на 30 хвилин.

Далі за допомогою дозатору відбирали нижню фазу і цей процес повторювали двічі, чим завершували етап екстракції. Далі проводила концентрацію шляхом випаровування усіх хлороформних екстрактів. Для цього при температурі 45 град С, на водній бані, під струменем азоту (у газоподібному стані) концентрували екстракти.

Додавали до отриманого сухого осаду 5 мл сірчаної кислоти H_2SO_4 , (концентрацією 1%) у метанолі та поміщали отриману суміш у скляну ампулу ємністю 15 мл. Ампулу запаювали для проведення гідролізу та метилування за методом Синяка. Гідроліз проводили у термостаті протягом 20 хв при температурі 85 град С. Отримані етильовані ЖК в об'ємі 5 мл екстрагували двічі гексан-ефірною сумішшю у співвідношенні 1:1. Для полегшення розподілу фаз у пробірку додавали дистильовану воду в об'ємі 1 мл. При цьому, верхню фазу відбирали дозатором. Екстракти, які об'єднали також випарювали під струменем азоту (у газоподібному стані) на водній бані, при температурі 45 град С. Дали додавали 40-50 мкл чистого гексану в сухий осад що отримали.

Цей склад у об'ємі 5 мкл вносили в апаратний відсік (випарювач) хроматографу. В апараті з полум'яно-іонізаційним детектором «Цвет-500» проводили аналіз в ізотермічному режимі: скляна колонка (розміром 3м* 0,3 см), заповнена фазою 5% поліетиленгліколю сукцинату на хроматоні N-AW-HMDS (зернистість – 0,125-0,160 мм), температура колонки +180°C, температура випарювача +250°C, витрати азоту та водню – 35 мл/хв, повітря- 300 мл/хв, швидкість діаграмної стрічки – 200 мм/год, чутливість шкали-10⁻⁹А, об'єм проби, яку вносили – 5мкл, тривалість аналізу – 20 хв.

На хроматограмі ідентифікували піки ЖК за певним часом утримання. Параметри піків, що отримали порівнювали із піками стандартних чистих

речовин з відомим якісним та кількісним складом. Для кількісної оцінки спектра ЖК проводили нормування площин піків ЖК та визначали їхній склад у відсотках – при цьому всю суму визначали як 100%. Вміст кожної ЖК визначали за розрахунком як долю від 1. У вибірку, що склала групу пацієнтів для даного дослідження були відібрані пацієнти, у яких похибка відхилення вмісту ЖК в субстратах не перевищувала $\pm 10\%$.

У спектрі ЖК ліпідів клітин крові було ідентифіковано 9 найінформативніших ЖК: з них міристинова C14:0, пентодеканова C15:0, пальмітинова C16:0, маргарінова C17:0, стеаринова C18:0, що складають суму насичених жирних кислот (НЖК), а також олеїнова C18:1, лінолева C18:2, ліноленова C18:3, арахідонова C20:4, що складають групу ненасичених жирних кислот (ННЖК). Лінолева C18:2, ліноленова C18:3, арахідонова C20:4 ЖК входять у суму поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) і визначаються як незамінні.

2.6 Оцінка властивостей еритроцитів, гематологічні тести

Гематологічні та загально-клінічні дослідження виконували в лабораторії експериментальних досліджень Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини НМУ імені О. О. Богомольця за стандартними методиками. Морфо-функціональні параметри еритроцитів досліджували за допомогою гематологічного аналізатора MicroCC-20 Plus (Китай). Кількісне визначення ступеня гемолізу (Г) еритроцитів в забуферених гіпотонічних розчинах NaCl проводили на напівавтоматичному біохімічному аналізаторі BS-3000 M з інтенсивністю поглинання світла при довжині хвилі 500-560 нм. У пробірки вносили по 5 мл розчину NaCl в концентраціях 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,35%; 0,4%; 0,45%; 0,5%; 1,0%; 0,9%. В кожну з них додавали по 0,02 мл венозної крові. Після інкубації при кімнатній температурі протягом 30 хв зразки центрифугували при 2000 об/хв

протягом 5 хв. Проводили фотоколориметричне вимірювання надосадової рідини (в кюветі товщиною 10 мм) проти холостої проби. Ступінь гемолізу (%) в кожній пробірці розраховували за формулою: $G = (E_x/E_1) \times 100\%$, де E_x – екстинкція надосадової рідини в досліджуваній пробі, E_1 – екстинкція надосадової рідини в пробірці з 0,1% розчином NaCl, яка приймалась за 100%. Для моделювання різного ступеню механічного гемолізу еритроцитів, венозну кров (1,5 мл) забирали у стерильні пробірки з попередньо внесеним гепарином, ресуспендували на центрифугі-вортекс «Мікроспін» FV-2400 2 хв та 4 хв. За 100% гемоліз приймали максимальні показання оптичної щільності суспензії еритроцитів з 0,1% розчином NaCl, а відсутність гемолізу – з 0,9% розчином NaCl.

2.7 Статистичний аналіз

Статистичну обробку даних проводили за допомогою ліцензованого (користувач – НМУ імені О.О. Богомольця) статистичного пакету IBM SPSS Statistics, версія 23.0 (SPSS Inc., США). Більшість параметрів не відображали нормальний розподіл, тому використовували непараметричні критерії. Дані були описані як медіана та середнє квадратичне відхилення ($Me \pm \sigma$). Для інтервальної оцінки медіани розраховували 95% довірчий інтервал, який вказували при наведенні графічного матеріалу у вигляді діаграм, або Box-plot-діаграм, 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.. 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 в групах вказували у вигляді P із вказанням рівня значущості. Вважали, що дані відрізняються за $P < 0,05$.

Для підвищення вірогідності отриманих результатів оцінки асоціацій між досліджуваними показниками КГ та ПДР, здійснювали розрахунок показників співвідношення шансів (odds ratio, OR) зі стандартною похибкою відношення шансів (S) і пов'язаного з ним 95% довірчого інтервалу (95% confidence interval, 95% CI). Значення показника OR розраховували за формулою:

$$OR = \frac{A \cdot D}{B \cdot C}$$

де А – кількість випадків, коли є і фактор ризику, і наслідок, В – кількість випадків, коли є фактор ризику, однак немає наслідку, С – кількість випадків, коли немає фактору ризику, однак є наслідок, а D - кількість випадків, коли немає ні фактору ризику, ні наслідку. Враховували, що значення OR, яке перевищує 1, означає, що шанси виявити фактор ризику більше у групі з наявністю результату. Це означає, що в такому випадку фактор має прямий зв'язок із ймовірністю настання результату. Отже, значення OR показує, у скільки разів шанси певного результату в ДГ вищі, ніж у КГ. Для розрахунків у ході проведення статистичного аналізу використовували он-лайн калькулятор (<https://mathcracker.com/>) підрахунку ВШ та програму Microsoft Excel.

РОЗДІЛ 3

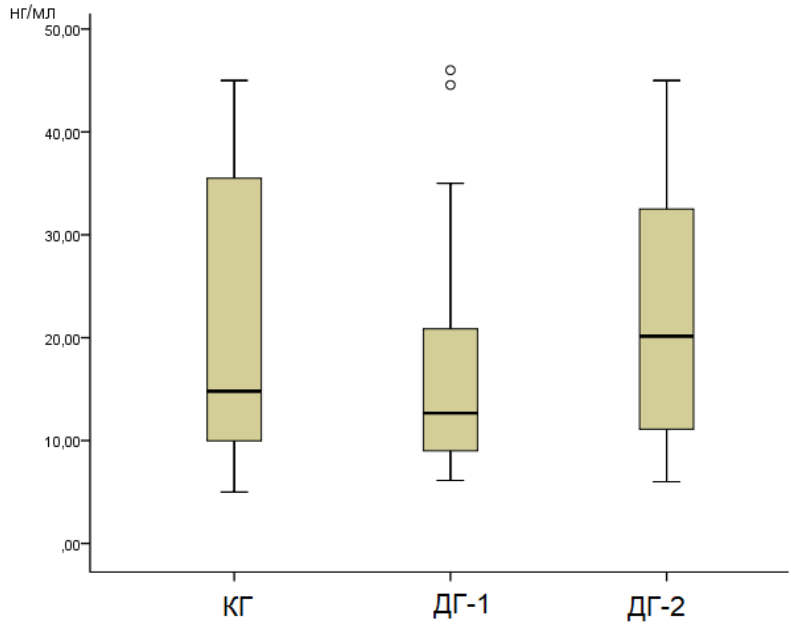
ВМІСТ АРГІНАЗИ-1 У ПАЦІЄНТІВ НА ПРОЛІФЕРАТИВНУ ДІАБЕТИЧНУ РЕТИНОПАТІЮ ІЗ РІЗНОЮ ТРИВАЛІСТЮ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ ТА В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ГЕНОТИПУ *CYP2E1*

Аргіназа-1 фермент, що експресується в ендотелії і може сприяти накопиченню оксидантів і виникненню судинної дисфункції. Ген *CYP2E1* (rs2070676) кодує фермент, який бере участь у метаболізмі ліків, інактивації N-нітрозамінів, поліциклічних вуглеводів та інших низькомолекулярних сполук. Першим етапом нашої роботи ми визначили вивчення вмісту аргінази-1 в сироватці крові у пацієнтів на проліферативну діабетичну ретинопатію (ПДР) із різною тривалістю цукрового діабету 2 типу (ЦД2) в залежності від генотипу *CYP2E1*, як можливого чинника розвитку ендотеліальної дисфункції.

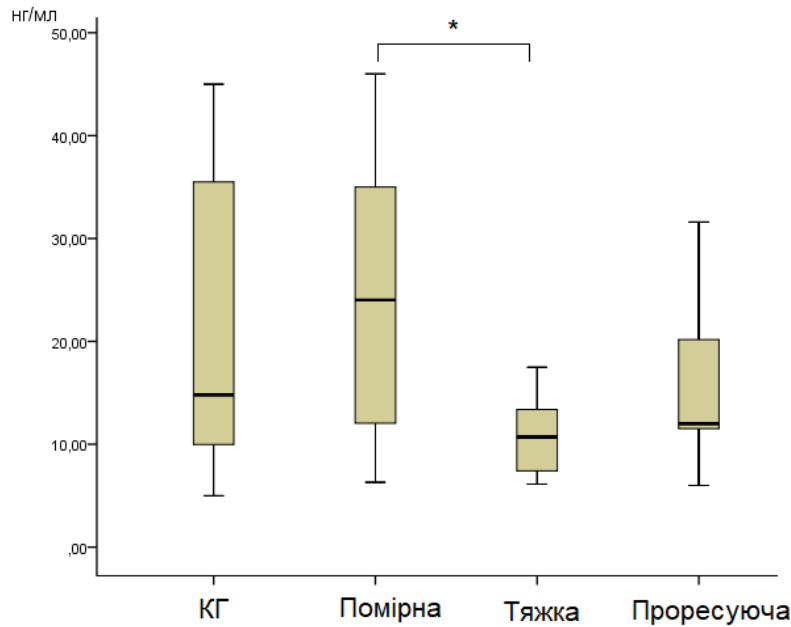
На цьому етапі дослідження ми залучили 106 пацієнтів із різною тривалістю ЦД2 та 43 добровольця без порушень ліпідного та вуглеводного обміну. За тривалістю ЦД2 пацієнтів поділили на 2 групи. У пацієнтів ДГ-1 (n=46, жінок 56%) середній вік (Me [Q1-Q3]) складав 62 [57-66] роки, тривалість ЦД2 визначалася до 20 років. У пацієнтів ДГ-2 (n=60, жінок 53%) із середнім віком 65 [60-68,25] років діабет тривав понад 20 років. Групу порівняння (контрольну – КГ) склали добровольці (n=43, жінок 56%), без ознак цукрового діабету та ретинопатії, які звернулися з метою профілактичного огляду в клініко-діагностичну лабораторію Університетської клініки НМУ імені О.О. Богомольця і були співставні за віком із пацієнтами з ПДР.

Вміст аргінази-1 у пацієнтів та осіб КГ достовірно не відрізнявся і мав суттєву варіабельність. У загальній групі пацієнтів складав $13,9 \pm 12,5$ нг/мл, в КГ $14,80 \pm 14,31$ нг/мл. В залежності від тривалості основного захворювання,

різниця була недостовірною, мала тенденцію до зменшення аргінази-1 у пацієнтів в перші 20 років ЦД2 і підвищення із роками (рис. 3.1). В групі ДГ-1 вміст аргінази-1 складав $12,66 \pm 11,81$ нг/мл, в групі ДГ-2 $17,57 \pm 12,97$ нг/мл. Вивчення вмісту аргінази-1 у залежності від стадії ПДР показало іншу тенденцію.



А



Б

Рис. 3.1 Вміст аргінази-1 у плазмі крові пацієнтів з ПДР із різною тривалістю ЦД2 (А): ПДР-1 до 20 років, ПДР-2 понад 20 років та осіб контрольної групи(КГ). (Б) в групах пацієнтів із різною стадією ПДР

* – $p < 0,05$

В групі помірної ПДР вміст протеїну складав $24,02 \pm 13,16$ нг/мл, в групі тяжкої ПДР – $10,7 \pm 7,24$ нг/мл, що достовірно в 2,4 рази відрізнялося від вмісту у пацієнтів із помірною ПДР ($p < 0,05$), і у пацієнтів із прогресуючої ПДР складало $13,24 \pm 11,93$ нг/мл.

Для визначення ролі поліморфізму гену *CYP2E1* у розвитку ПДР на тлі ЦД2 ми провели аналіз розподілу частоти зустрічаємості алелей і генотипів гену в дослідних групах із визначенням показника співвідношення шансів. Дані наведені в табл. 3.1.

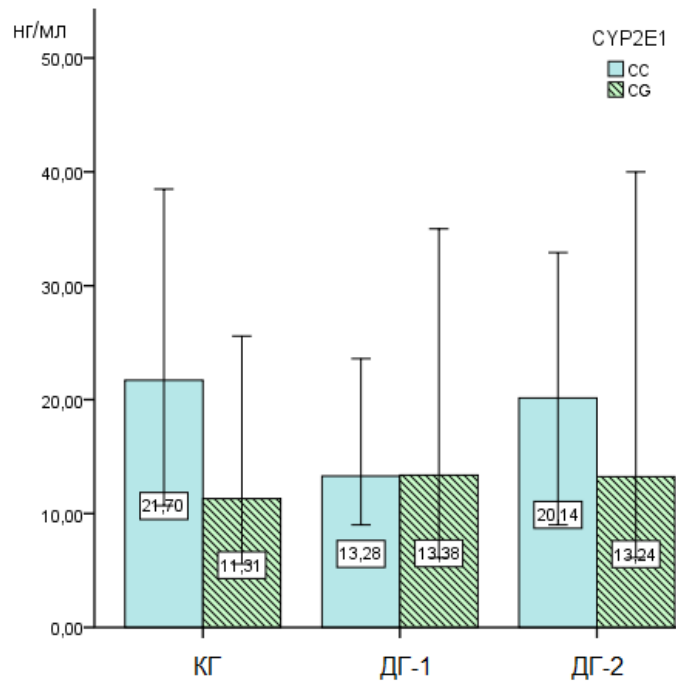
Таблиця 3.1

Результати розрахунку оцінки асоціацій між носіями різних генотипів гену *CYP2E1* в групі пацієнтів ПДР/ЦД2 та осіб КГ, через визначення OR та ДІ

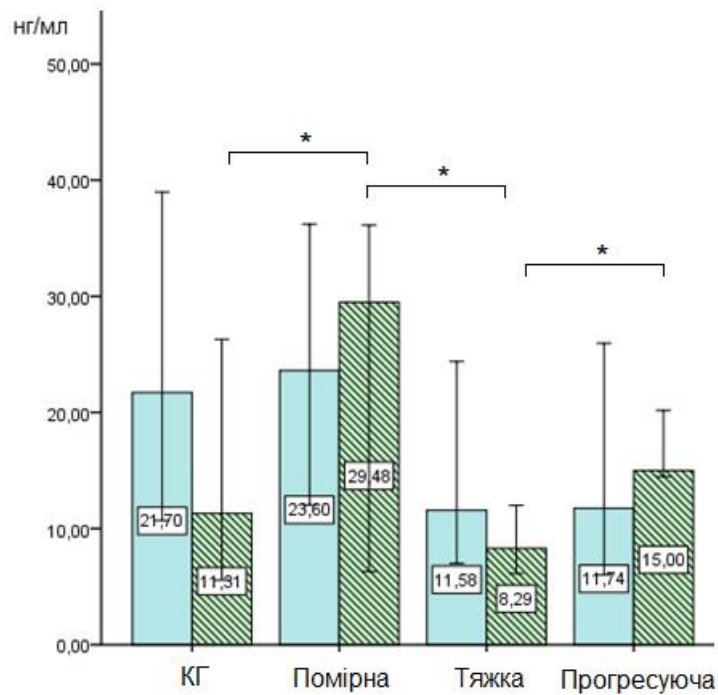
<i>rs2070676</i>						
	ПДР/ЦД2, n=106	%	КГ, N=43	%	ВШ(OR)	ДІ
CC	70	66	31	72	0,75	0,34-1,63
CG	36	34	12	28	1,32	0,61-2,89
GG	0		0			

C	176	83	74	86	0,79	0,39-1,6
G	36	17	12	14	1,26	0,62-2,55

Виявлено, що серед досліджених осіб переважають особи із мажорним генотипом CC, яких серед пацієнтів було 66%, а в КГ 72%, у решта контингенту ми виявили гетерозиготний поліморфізм CG. Мінорний генотип GG гену *CYP2E1* не був виявлений. Отже, носіїв алелю С серед усіх досліджуваних було переважна більшість 83% та 86%. Аналіз відношення шансів за нашими даними також показав відсутність асоціацій поліморфізму CG із розвитком ПДР на тлі ЦД2 [5,19].



А



Б

Рис. 3.2 Вміст аргінази-1 у плазмі крові осіб із різним генотипом гену *CYP2E1*: світлі стовпчики – носії мажорного генотипу CC, смугасті - носії поліморфізму CG. (А) – в групах пацієнтів із різною тривалістю ЦД2: ДГ-1 до 20 років, ДГ-2 понад 20 років та осіб контрольної групи(КГ). (Б) - в групах пацієнтів із різною стадією ПДР

* – $p < 0,05$

Аналіз вмісту аргінази-1 в плазмі крові КГ показав (рис. 3.2) як суттєву варіабельність у досліджуваних осіб так і значну різницю в залежності від генотипу гену *CYP2E1*. В групі ДГ-2 та КГ вміст протеїну мав схожу тенденцію і був в 1,5 рази вище у носіїв мажорного генотипу СС. Вміст аргінази-1 у пацієнтів з ДГ-1 не відрізнявся в залежності від генотипу. Якщо підвищення аргінази-1 в плазмі крові вважається фактором ризику для виникнення судинних ускладнень через ушкодження ендотелію, то наявність поліморфізму *CG* можна вважати протекторним у відношенні ендотеліальної дисфункції при початковій стадії ЦД2, яка не перевищує 20 років. Однак, ми не виявили статистичних відмінностей, тому ця думка висловлена як припущення [5,19].

Розвиток та поглиблення ПДР супроводжувалося підвищенням вмісту аргінази-1 в плазмі крові і поступовим зменшенням ферменту протягом прогресування захворювання. У носіїв мажорного генотипу різниця була менш значною, і вміст аргінази-1 на стадії поглиблення з помірної до тяжкої зменшувався в 2 рази. Враховуючи значну варіабельність показника, ми не отримали статистично достовірні відмінності. У носіїв поліморфного варіанта гену, вміст аргінази-1 був більше ніж в КГ в 2,6 разів ($p < 0,05$), на стадії поглиблення з помірної до тяжкої зменшувався в 3,5 рази ($p < 0,05$) і на стадії прогресуючої був вище у 1,8 рази ($p < 0,05$) у порівнянні з тяжкою ПДР.

Отже, наші дані про вміст аргінази у пацієнтів були вкрай несподіваними, оскільки нашою нульовою гіпотезою було підвищення аргінази-1 у пацієнтів із ПДР. Дослідження вмісту аргінази в залежності від тривалості ЦД2 та поглиблення ПДР показали підвищення аргінази у пацієнтів з ПДР на тлі ЦД2 понад 20 років. І максимальним виявлений фермент у пацієнтів із помірною ПДР, коли захворювання переходить саме у стадію проліферації і активуються судинні механізми ушкодження сітківки. Подальше поглиблення ретинопатії вже не супроводжується високою активністю аргінази-1. Це дає нам підставу вважати, що саме на стадії помірної ПДР відбувається критичний вплив надекспресії аргінази, який є

підґрунтям механізмів впливу оксидативно-нітрозативного стресу, що визначені як базові у патогенезі розвитку ендотеліальної дисфункції та виникнення мікросудинних аномалій ендотеліальних клітин.

За отриманими даними можна зробити висновок, що на стадії помірної ПДР відбувається критичний вплив надекспресії аргінази, який є шкідливим для ендотеліальних клітин. Носії поліморфного варіанту *CYP2E1* зокрема алелю G однаково були розповсюджені в популяції (14-17%), але мали підвищену схильність до експресії аргінази-1 при розвитку ПДР.

Резюме до розділу 3

Таким чином, в результаті проведених досліджень було встановлено підвищення вмісту аргінази-1 у пацієнтів з ПДР на тлі ЦД2 тривалістю понад 20 років. У носіїв алелю G гену *CYP2E1* спостерігали достовірне коливання ферменту в залежності від стадії ПДР. При помірній вміст аргінази-1 був вище в 2,6 разів ($p < 0,05$) ніж в КГ; на стадії поглиблення з помірної до тяжкої, експресія аргінази-1 зменшувалася, була в 1,3 рази менше КГ і в 3,5 рази ($p < 0,05$) менше відносно показника в групі помірної ПДР. У пацієнтів із прогресуючою знову підвищувалася і була у 1,8 рази ($p < 0,05$) більше у порівнянні з тяжкою ПДР. Ймовірно, на стадії помірної ПДР, коли захворювання переходить у стадію проліферації і активуються судинні механізми ушкодження сітківки, відбувається критичний вплив надекспресії аргінази, як компоненту оксидативно-нітрозативного стресу, одного із ключових механізмів розвитку ендотеліальної дисфункції.

Даний розділ висвітлено в наступних публікаціях:

1. Ганюк ВМ. Вміст аргінази-1 у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію з різною тривалістю цукрового діабету залежно від генотипу *CYP2E1*. Архів офтальмології України. 2023; 11(1):6-11. doi:

<https://doi.org/10.22141/2309-8147.11.1.2023.311> [5]

2. Риков СО, Петренко ОВ, Ганюк ВМ, Натрус ЛВ. Вміст аргінази-1 у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету в залежності від генотипу CYP2E1. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Філатовські читання-2023». Трав 24-26 2023. Одеса; 2023, 90-1. [19]

РОЗДІЛ 4

ВМІСТ ТРАНСПОРТЕРІВ СІМЕЙСТВА GLUT-1 В СИРОВАТЦІ КРОВІ ПАЦІЄНТІВ НА ПДР ІЗ РІЗНОЮ ТРИВАЛІСТЮ ЦД2, ЯК ФАКТОРУ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ГЛЮКОЗОЮ КЛІТИН ОРГАНІЗМУ

Надходження глюкози до нейронів мозку і сітківки опосередковується специфічним, полегшеним транспортом за участю натрійнезалежних переносників глюкози сімейства GLUT. Вивчення механізмів транспорту глюкози із подальшим фармакологічним або генетичним інгібування транспортерів розглядається як перспективний напрям зменшення глюкозотоксичного ушкодження сітківки для запобігання діабетичної ретинопатії. Вивчали вміст GLUT1, GLUT3, GLUT4, фактора, індукованого гіпоксією (HIF-1 α) у плазмі пацієнтів з різною стадією проліферативної діабетичної ретинопатії (ПДР), тривалістю цукрового діабету 2-го типу (ЦД2) до 20 та понад 20 років та осіб контрольної групи.

Тому, однією із задач нашої роботи було вивчення вмісту GLUT1, GLUT3, GLUT4, HIF-1 α у плазмі пацієнтів з різною стадією проліферативної ДР та тривалістю ЦД2 для з'ясування ролі регуляції глюкозного транспорту у патогенезі ДР.

Відповідно до шкали ETDRS усіх 106 пацієнтів ми поділили на групи в залежності від стадії ПДР: у 46 пацієнтів визначали помірну (Moderate PDR, level 65), у 32 тяжку (High-risk PDR, level 71-75) та у 28 прогресуючу ПДР (Advans PDR, level 81-85).

Вміст GLUT1 у плазмі пацієнтів з ПДР та осіб контрольної групи був практично однаковий і становив $11,46 \pm 0,06$ та $11,09 \pm 0,09$ нг/мл відповідно. Також не було відмінностей показника при різній тривалості ЦД2: у I групі він сягав $11,26 \pm 0,08$ нг/мл, а в II $11,62 \pm 0,08$ нг/мл. Поглиблення ПДР також не супроводжувалося зміною вмісту GLUT1 у плазмі крові (рис. 4.1.).

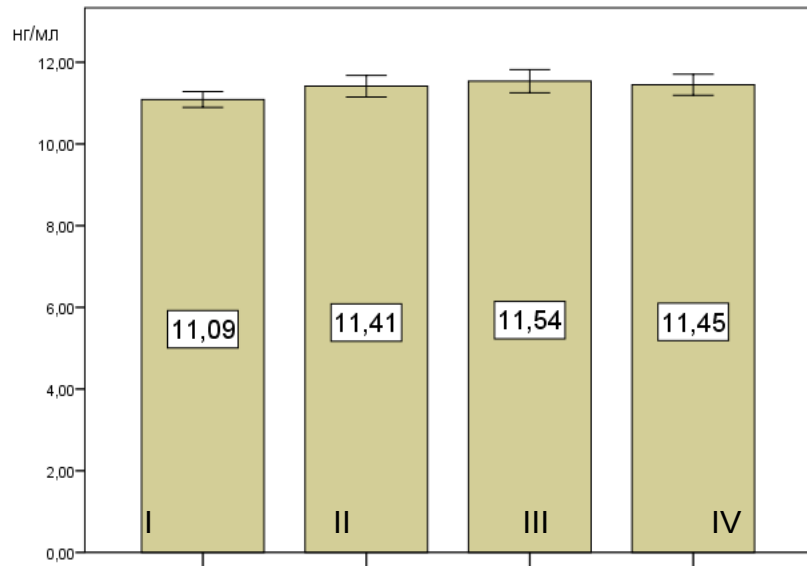


Рис. 4.1 Вміст транспортера GLUT1 у плазмі обстежених: I – контроль, II – пацієнти з помірною, III – тяжкою, IV – прогресуючою ПДР

* – $P < 0,05$ порівняно з контролем

Проте вміст GLUT3 (рис. 4.2) у пацієнтів та здорових осіб достовірно відрізнявся і був удвічі більше. При цьому тривалість ЦД2 не була пов'язана із вмістом GLUT3, У групах I та II вміст транспортера становив $11,11 \pm 0,21$ і $11,18 \pm 0,2$ нг/мл відповідно. Також на вміст GLUT3 не впливала ступінь ушкодження сітківки.

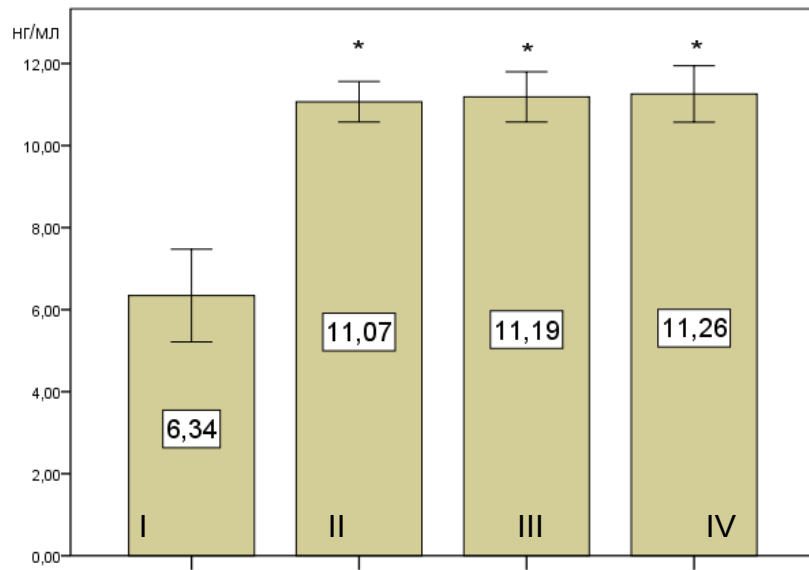


Рис. 4.2. Вміст транспортера GLUT3 у плазмі обстежених: I – контроль, II – пацієнти з помірною, III – тяжкою, IV – прогресуючою ПДР

* – $P < 0,05$ порівняно з контролем

Вміст GLUT4 також достовірно не відрізнявся (рис. 4.3). У плазмі пацієнтів сягав $34,45 \pm 0,42$ нг/мл, що на 9% вище ніж у здорових осіб. В групах I та II вміст GLUT4 становив $35,09 \pm 0,54$ та $33,93 \pm 0,61$ нг/мл відповідно. Поглиблення ПДР також суттєво не змінювало вміст транспортера.

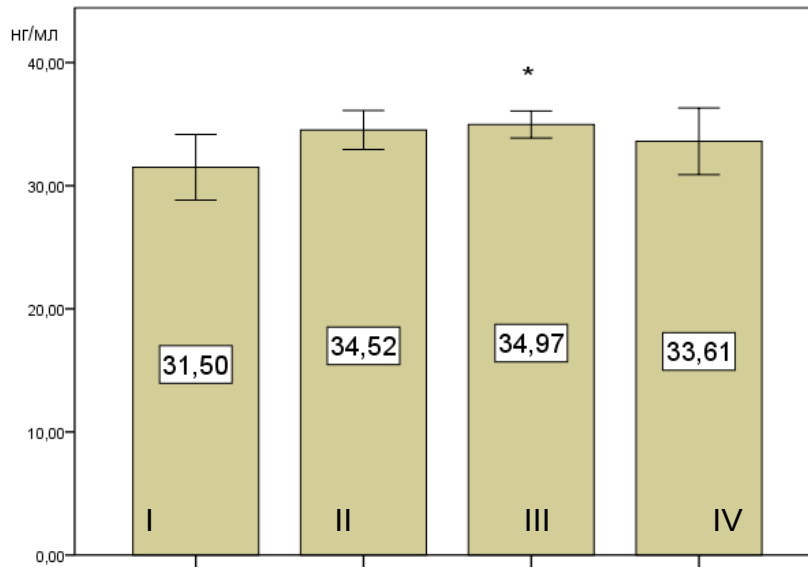


Рис. 4.3. Вміст транспортера GLUT4 у плазмі обстежених: I – контроль, II – пацієнти з помірною, III – тяжкою, IV – прогресуючою ПДР
* – $P < 0,05$ порівняно з контролем

Успішність корекції порушення вуглеводного обміну у пацієнтів оцінювали за показниками вмісту глюкози (рис. 4.4) та глікованого гемоглобіну (HbA1C) (рис 4.5). У середньому в групах пацієнтів вміст глюкози сягав $10,34 \pm 0,62$ ммоль/л, а HbA1C $7,74 \pm 0,34\%$. Значення суттєво не відрізнялися в залежності від ступеню поглиблення ПДР або тривалості ЦД2.

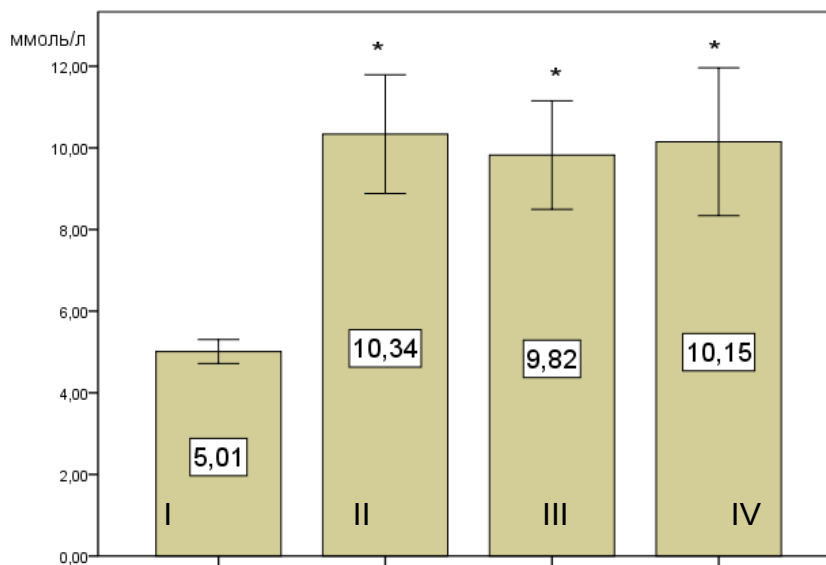


Рис. 4.4. Вміст глюкози у плазмі обстежених: I – контроль, II – пацієнти з помірною, III – тяжкою, IV – прогресуючою ПДР
* – $P < 0,05$ порівняно з контролем

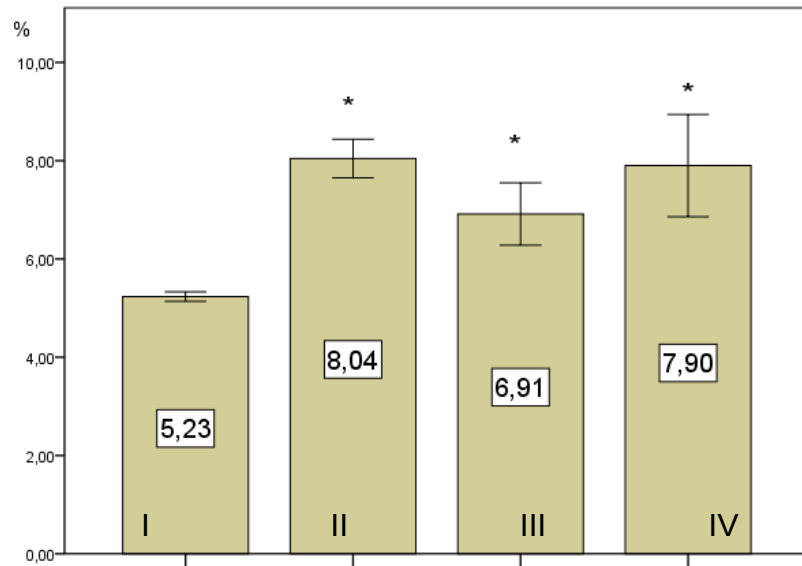


Рис. 4.5. Вміст глікованого гемоглобіну у плазмі обстежених:

I – контроль, II – пацієнти з помірною, III – тяжкою, IV – прогресуючою ПДР

* – $P < 0,05$ порівняно з контролем

Для оцінки стану гіпоксії в плазмі досліджуваних осіб було виміряне HIF-1 α (рис. 4.6). У здорових осіб його вміст становив $0,49 \pm 0,05$ нг/мл, що на 25% менше ніж у пацієнтів. Вміст HIF-1 α достовірно не відрізнявся в залежності від ступеню поглиблення ПДР та тривалості ЦД2.

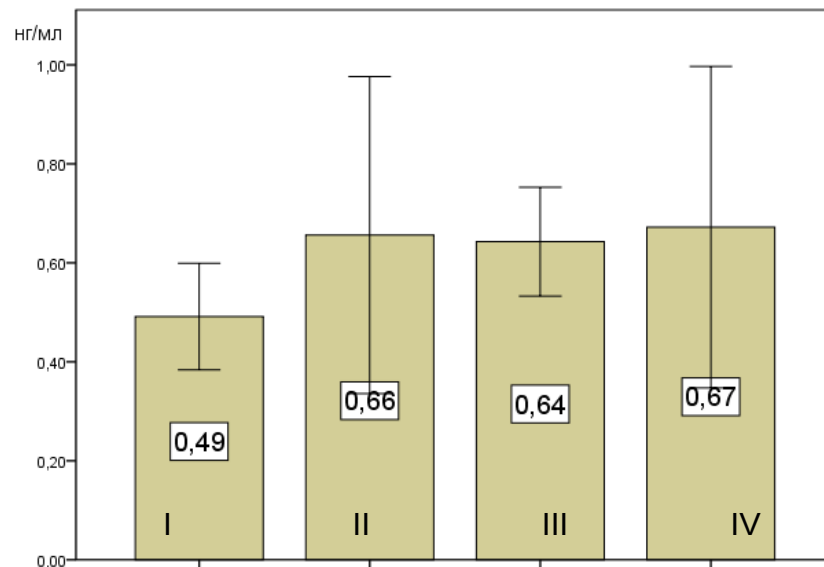


Рис. 4.6. Вміст фактора індукованого гіпоксією HIF-1 α у плазмі обстежених: I

– контроль, II – пацієнти з помірною, III – тяжкою,

IV – прогресуючою ПДР

* – $P < 0,05$ порівняно з контролем

Кореляційний аналіз виявив достовірну ($p < 0,01$), двобічну кореляцію вмісту GLUT3 та глюкози крові ($r = 0,581$), глікованого гемоглобіну ($r = 0,553$), GLUT1 ($r = 0,440$), GLUT4 ($r = 0,372$) [6,9].

Отже, ми виявили відсутність достовірного коливання вмісту GLUT1 в плазмі пацієнтів із різною стадією ПДР та тривалістю ЦД2 і осіб контрольної групи, що дає підставу вважати експресію протеїну генетично детермінованим явищем, синтез якого визначається генами підтримки гомеостазу («housekeeping genes»).

Підвищення удвічі в плазмі крові пацієнтів з ПДР вмісту транспортера GLUT3, яке не залежить від ступеня ретинопатії, тривалості ЦД2 і успішності корекції вмісту глюкози, визначає механізм посиленого транспорту глюкози до нейрону на тлі хронічної гіперглікемії як важливу патогенетичну ланку ретинопатії.

Відсутність достовірного коливання вмісту інсулінзалежного GLUT4 у плазмі пацієнтів із ПДР та осіб контрольної групи, визначає транспортер як не залучений до механізмів розвитку ретинопатії та її поглиблення.

Отримані дані дають підставу зробити висновок: консервативність вмісту GLUT1 у досліджених групах дає підставу вважати експресію протеїну генетично детермінованим для базової підтримки гомеостазу. Підвищення вмісту GLUT3 у пацієнтів з ПДР, яке не залежить від ступеня ушкодження сітківки, тривалості ЦД2 і концентрації глюкози, визначає цей механізм транспорту до клітини, як основну патогенетичну ланку глюкозотоксичності в нейронах на тлі хронічної гіперглікемії. Інсулінзалежний транспортер GLUT4, ймовірно, не залучений до виникнення ПДР на тлі ЦД2. Вміст HIF-1 α у пацієнтів був вище на 25%, проте не відрізнявся в залежності від ступеню поглиблення ПДР та тривалості ЦД2.

Резюме до розділу 4

Нами встановлено, що у пацієнтів з ПДР на тлі ЦД2 виявлено двобічну кореляцію вмісту GLUT3 та глюкози крові ($r = 0,581$), глікованого гемоглобіну

($r=0,553$), GLUT1 ($r=0,440$), GLUT4 ($r=0,372$). Проте, підвищення вмісту GLUT3 у пацієнтів з ПДР не залежить від ступеня ушкодження сітківки, тривалості ЦД2 і концентрації глюкози, що визначає цей механізм транспорту до клітини, як основну патогенетичну ланку глюкозотоксичності в нейронах на тлі хронічної гіперглікемії. Відсутність достовірного коливання вмісту транспортерів GLUT1 та GLUT4 у плазмі пацієнтів із різною стадією ПДР та тривалістю ЦД2 і осіб контрольної групи свідчить про генетично детерміновані механізми, спрямовані для базової підтримки гомеостазу і не залученими до виникнення мікросудинних ускладнень на тлі ЦД2. Вміст HIF-1 α у пацієнтів був вище на 25%., проте не відрізнявся в залежності від ступеню поглиблення ПДР та тривалості ЦД2.

Даний розділ висвітлено в наступних публікаціях:

1. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Глюкозні транспортери сімейства GLUT у патогенезі проліферативної діабетичної ретинопатії у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу. Фізіологічний журнал. 2023; 69(3):31-8. doi: <https://doi.org/10.15407/fz69.03.031> [6]
2. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Вивчення вмісту глюкозних транспортерів у пацієнтів із проліферативною діабетичною ретинопатією на тлі цукрового діабету 2 типу. «Рефракційний пленер`2022»: науково-практична конференція з міжнародною участю, Жов 20-21 2022, збірник праць / за редакцією член-кореспондента НАМН України, професора С. О. Рикова. Київ; 2022, 102. [9]

РОЗДІЛ 5

ВИВЧЕННЯ ФАКТОРІВ ВПЛИВУ НА ОБМІН ЖИРНИХ КИСЛОТ У ПАЦІЄНТІВ НА ПРОЛІФЕРАТИВНУ ДІАБЕТИЧНУ РЕТИНОПАТІЮ З РІЗНОЮ ТРИВАЛІСТЮ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

Один з потенційних механізмів впливу на розвиток діабету – це зміна ЖК складу мембран клітин: адипоцитів, гепатоцитів, клітин скелетних м'язів, і еритроцитів і відповідно зміна їх функцій. Вважається, що дієта з високим вмістом насичених ЖК погіршує текучість мембрани, проникність іонів, зв'язування та спорідненість рецепторів інсуліну. Однак нез'ясовно, який часовий період, необхідний для споживання жирної кислоти, щоб викликати певні зміни ЖК вмісту плазми або еритроцитів, що визначить шлях, який веде до ЦД2 [132]. Склад ЖК можна об'єктивно виміряти в різних тканинах і ліпідних пулах крові, таких як жирова тканина, еритроцити, фосфоліпіди плазми та сироватки крові, ефіри холестерину або фракції тригліцеридів. Однак питання про те, який ліпідний басейн найкраще відображає споживання жирних кислот, залишається невирішеним. Жирова тканина вважається найкращою тканиною для вимірювання ЖК, оскільки саме вона формується при харчуванні і відображає тривалий час обміну речовин [84]. Однак метод вимірювання через біопсію жиру, мінімізує корисність методу у великих епідеміологічних дослідженнях. На відміну від цього, ЖК, виміряні в мембранній фракції еритроцитів, відображають більш короткі часові рамки раціону харчування в порядку 120 діб, але фракція плазми представляє ще коротший термін споживання за останні кілька днів [132]. Є дані про не високу інформативність плазмових маркерів у порівнянні із оцінкою структурних компонентів через вимірювання мембранних ЖК еритроцитів [41, 127]. Автори також заявляють про те, що екзогенні харчові ЖК сильніше асоціюються з ЖК, виміряними в мембрані еритроцитів, ніж у

плазмі [75, 154].

Отже, сучасні дослідження виводять на арену головних регуляторів накопичення жиру в адипоцитах білок EHD2 (англ., Eps15-homology domain containing protein 2), який регулює стабільність мембрани під час поглинання краплі жиру через ендоцитоз і заперечує утворенню великих каверл із жиром (ендосом). Водночас, генетична відсутність експресії EHD2, або його зниження концентрації сприяє розвитку ожиріння через швидке наповнення клітини жиром. Але цей протеїн тільки починає вивчатися і досліді проходять на тваринах і культурі клітини [119].

Більш поширеним біомаркером, що регулює зв'язує жирні кислоти (ЖК) в клітині забезпечує внутрішньоклітинну систему регуляції ліпідного обміну вважається L-FABP (англ., Liver-type fatty acid binding protein) [28, 55].

Тому, нашою наступною задачею було вивчення впливу харчових звичок приготування їжі та вживання олій на жирнокислотний склад еритроцитарних мембран пацієнтів на ПДР із різною тривалістю ЦД2, у співставленні із рівнем регуляторного шаперону L-FABP в сироватці крові.

Дослідження ЖК спектру мембран еритроцитів показало суттєву різницю вмісту ЖК у пацієнтів та осіб КГ. Схожі зміни були описані в роботі [132], де наведено, що у пацієнтів с ДР склад мембран суттєво відрізняється підвищенням насичених ЖК і зменшенням ненасичених: лінолевої, ліноленової та арахідонової. В роботі [98] автори відмічають різнонаправлені коливання вмісту ЖК у групах пацієнтів з різним ступенем ДР, але головною ознакою є зменшення вмісту арахідонової ЖК і загальне підвищення їх «насиченості».

Роль «мінорних» ЖК в складі клітинної мембрани не можна припинювати і вона є значною. Більш того, для відтворення міжклітинної кооперації, або реагування у вигляді рецепторної акцепції ліганда, цитокіну, гормону – основну роль відіграють саме мінорні ЖК (пентадеканова, міристинова, ліноленова тощо), які забезпечують властивості рецептору. Але, в нашому дослідженні ми акцентуємо увагу на основних («мажорних») ЖК,

які представлені у складі мембран в значному об'ємі і, вірогідно, їх вміст залежить від екзогенного надходження ЖК у складі харчових жирів.

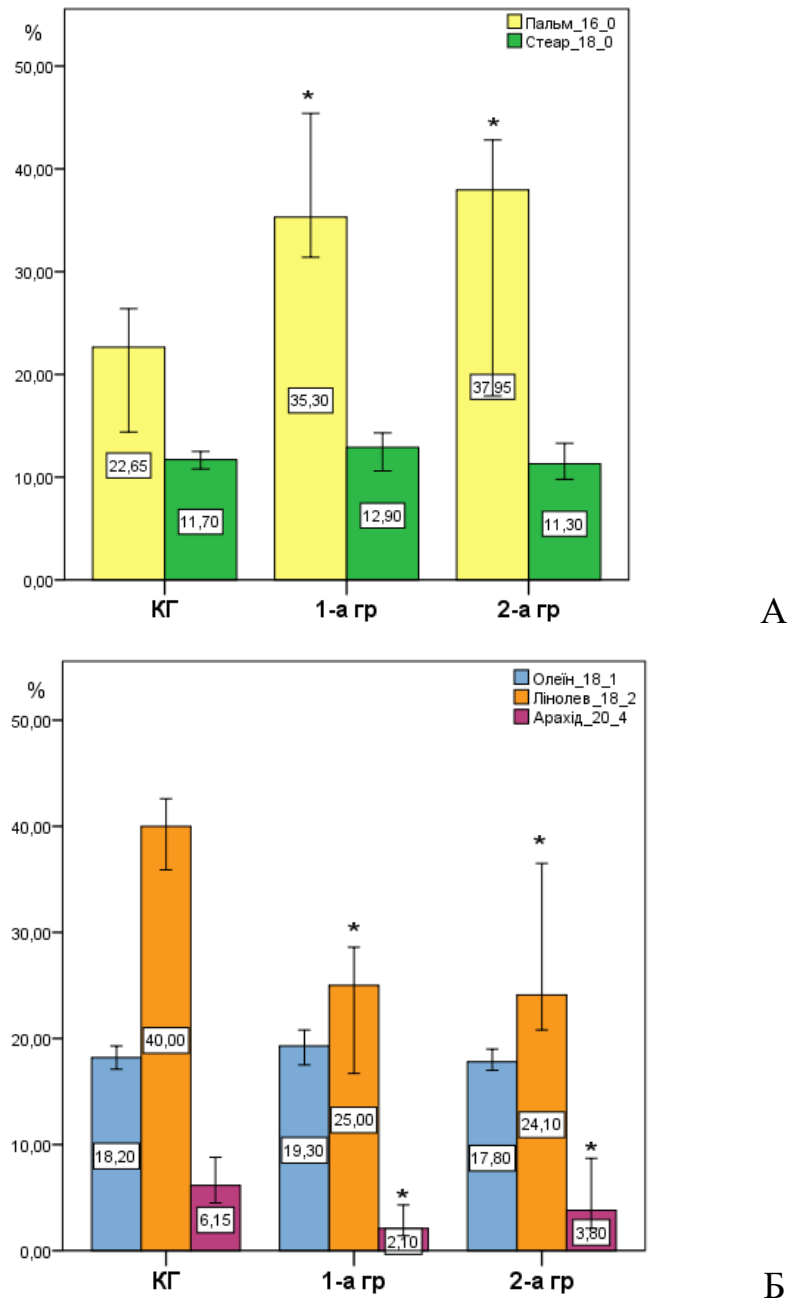


Рис. 5.1. Вміст основних насичених (А) та ненасичених (Б) ЖК в складі мембрани еритроцитів у осіб досліджуваних груп. КГ – контрольна група, 1-а – пацієнти з ПДР і тривалістю ЦД2 до 20 років, 2-а – пацієнти з ПДР і тривалістю ЦД2 понад 20 років

* – $P < 0,05$ у порівнянні із відповідним показником КГ

Так, в складі насичених ЖК ми виявили (рис.5.1) достовірне збільшення в 1,6 разів ($P<0,05$) вмісту пальмітинової ЖК у пацієнтів з ПДР у порівнянні із показником КГ. При цьому, підвищення стажу ЦД2 корелював із збільшенням С16:0, але не достовірно. Вміст стеаринової ЖК суттєво не відрізнявся у групах [3,7,10].

У складі ненасичених ЖК виявилось достовірне зниження в 1,6 разів ($P<0,05$) вмісту лінолевої ЖК в групі пацієнтів, у порівнянні із КГ, яке не змінювалося у пацієнтів в залежності від тривалості ЦД2. І також виявлене у пацієнтів зменшення арахідонової ЖК в 1-й групі в 3 рази ($P<0,05$), а в 2-й в 1,6 разів ($P<0,05$) відносно КГ [3,7,10].

Було проведено вивчення харчових звичок досліджуваних осіб, яке ми проводили за оцінкою результатів анкетування (рис. 5.2).

АНКЕТА ХАРЧУВАННЯ

Шановний пацієнт, відповіді на питання цієї анкети допоможуть нам проаналізувати особливості Вашого обміну речовин для розробки найбільш ефективних шляхів корекції Вашого стану.

Прізвище, ІП, _____

Стать _____, вік _____ (повних років),

Вага _____ кг, зріст _____ см, тривалість діабету _____ років

☒ 1. Чи притримуєтесь Ви якої-небудь дієти?

- ☐ Ні, на жаль, не вдається
- ☐ Так, дієта для діабетиків
- ☐ Так, дієта для схуднення
- ☐ Так, дієта із зменшенням солі
- ☐ Намагаюсь обмежувати кількість їжі

2. Як багато на день ви маєте фізичного навантаження?

- ☐ Пересуваюсь по дому, іноді виходжу на вулицю, в магазин
- ☐ Регулярно ходжу на роботу, йду пішки на зупинку
- ☐ Намагаюсь регулярно виконувати додаткові фізичні навантаження

3. Як багато ви вживаєте води?

- ☐ Тільки з першими блюдами та напоями
- ☐ Між прийомами їжі вживаю чай, каву, соки
- ☐ Додатково до їжі вживаю воду не менш 1,5-2 літра в день

4. Які жири (масла) ви традиційно використовуєте під час приготування їжі?

- ☐ Сало
- ☐ Масло вершкове
- ☐ Маргарин
- ☐ Оливкову олію
- ☐ Соняшникову олію
- ☐ Кукурудзяну олію

5. Скільки фруктів в день ви з'їдаєте?

- ☐ Інколи жодного не з'їдаю
- ☐ Один на день
- ☐ Намагаюсь не менше 2-3

6. Скільки овочів (окрім картоплі) в день ви з'їдаєте?

- ☐ Інколи жодного не з'їдаю
- ☐ Небагато, але і відварні, й сирі
- ☐ Намагаюсь не менше 400-450 грам

7. Чи приймаєте ви ліки для зниження рівня холестерину?

- ☐ Ні
- ☐ Так, статини (симвастатин/аторвастатин/аторіс і т.п.) (доза до або 20мг)
- ☐ Так, статини симвастатин/аторвастатин/аторіс і т.п.) (доза 40мг і більше)
- ☐ Фібрати (клофібрат; трайкор і т.п.)
- ☐ Нікотинова кислота

8. Чи приймаєте ви біоактивні добавки що містять Омега-3 жирні кислоти для зниження рівня холестерину, глюкози і поліпшення стану?

- ☐ Ні
- ☐ Іноді, за рекомендацією лікаря
- ☐ Так, регулярно

9. Який спосіб приготування їжі (наприклад м'яса) ви використовуєте переважно?

- ☐ Жаріння
- ☐ Відварювання, парування
- ☐ Запікання в духовці

Продукти	Вкажіть ☒	Частота вживання протягом останнього місяця					
		Ніколи / край рідко	1-3 в місяць	1-2 рази на тиждень	3-4 рази на тиждень	кожно го дня	2-4 на день
Каші, необроблений рис, хліб грубого помолу							
Макаронні вироби з щільнозернової муки							
Горіхи, бобові, насіння соняшника, гарбуза, арахіс							
Риба, морепродукти, ікра							
М'ясо птиці							
Свинина, яловичина							
Яйце							
Молоко, молочні продукти, ряжанка							
Твердий сир							
Майонез (1-2 стол ложки)							
Паштети							
Сметана (20% жиру)							
Ковбаси, копчені, домашні							
Сало							
Масло вершкове (5-20 гр)							
Тістечка, солодощі, випічка							

Дякуємо! Ви нам дуже допомогли.
Бажаємо скорішого одужання і доброго здоров'я.

Рис. 5.2 Анкета харчових звичок досліджуваних осіб

Для з'ясування об'єму харчових жирів які використовували досліджувані особи, було надано питання «Який спосіб приготування їжі (наприклад м'яса) ви використовуєте переважно?» із варіантами відповіді: «жаріння», «відварювання або парування», «запікання в духовці». При цьому, респондент за бажанням міг вказувати декілька шляхів готування їжі. Такій варіант був притаманний в основному особам КГ, де кожний 4-й відповів, що використовує різні варіанти (рис. 5.3). Пацієнти з ЦД2 переважно готували їжу шляхом відварювання або парування. Жаріння їжі із використанням жирів та олії вважають за кращім приблизно кожний 10-й із опитаних.

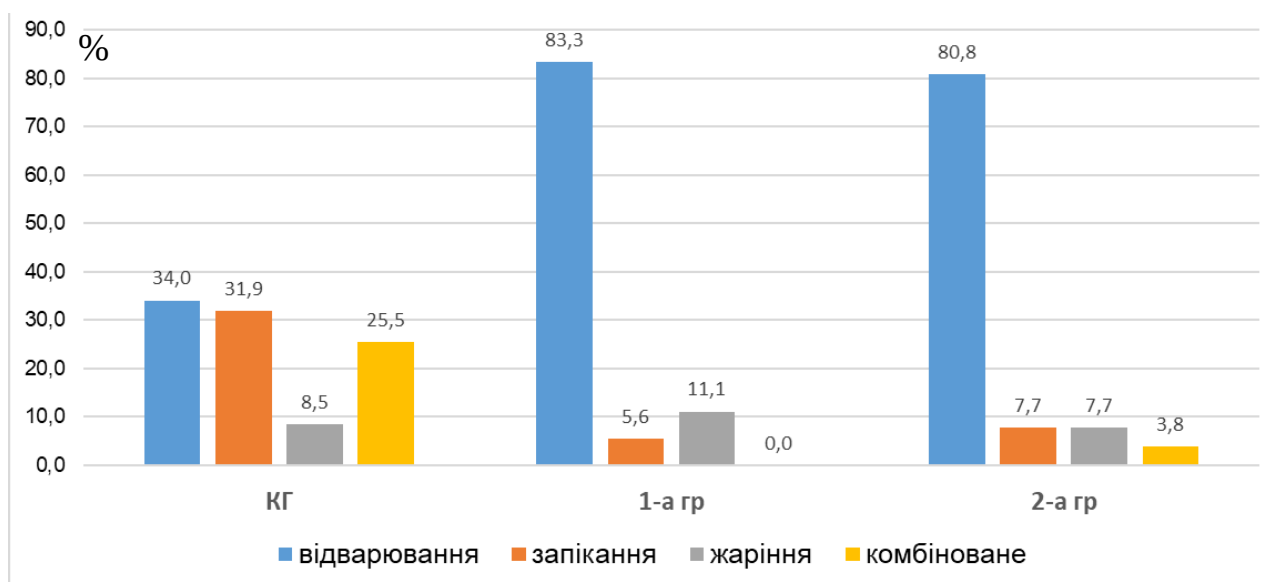


Рис. 5.3. Відносна кількість досліджуваних осіб (%), які мають відповідні звички готування їжі

Наступним кроком дослідження було з'ясування складу жирів. Питання анкети «Які жири (масла, олії) ви традиційно використовуєте під час приготування їжі?» мали варіанти відповідей: «Масло вершкове», «Маргарин», «Оливкову олію», «Соняшникову олію», «Кукурудзяну олію». За отриманими даними, ми виявили (рис. 5.4), що пацієнти з ПДР найчастіше в 1,6 разів для приготування їжі використовують соняшкову олію. Вживання оливкової олії і вершкового масла було удвічі популярним серед

осіб КГ. Незначна кількість опитуваних використовувала маргарин або кукурудзяну олію. При цьому, пацієнти із тривалим ЦД2 маргарин вживали удвічі частіше, ніж здорові особи [3,7,10].

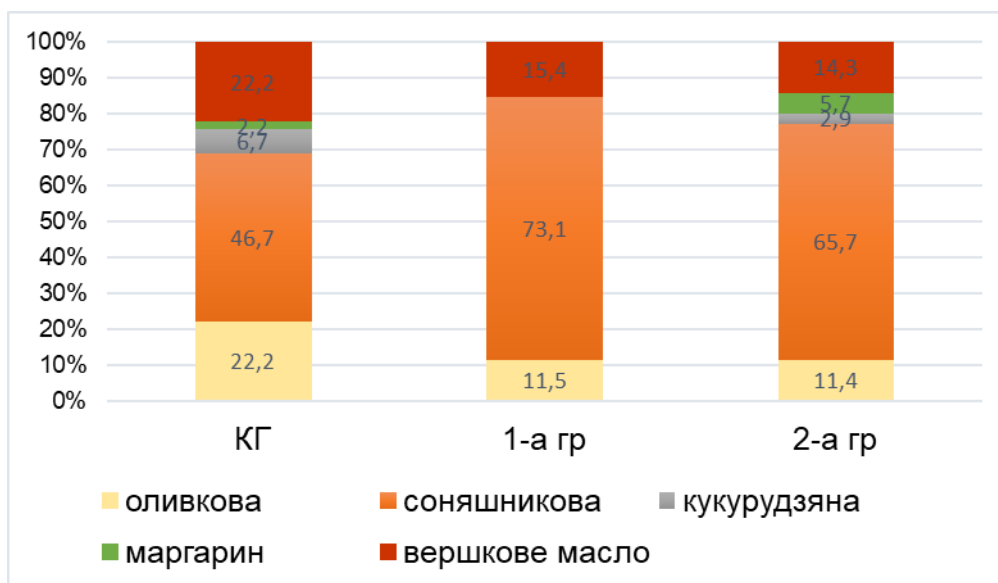


Рис. 5.4. Відносна кількість осіб (%) в досліджуваних групах, які вживали різні жири та олії в харчовому раціоні

Співставлення змін ЖК вмісту в мембранах еритроцитів пацієнтів із особливостями харчування було проведено авторами на схожій групі пацієнтів із різним ступенем ДР. Автори аналізували склад харчових продуктів, які є визнаними джерелами різних видів ЖК, розраховували коефіцієнт «раціональності» вживання продуктів та прийшли висновку, що вживання у їжу продуктів-джерел різних типів ЖК не відрізнялося у групах здорових осіб та пацієнтів з різним ступенем ДР і ЦД2 [127].

В нашій роботі ми з'ясували, що харчові звички пацієнтів з ПДР практично не відрізнялися в групах в залежності від тривалості ЦД2, але існують відмінності у порівнянні із групою здорових осіб. Характерним для пацієнтів з ПДР було відварювання або парування їжі, а в якості харчових жирів переважно використовувалась соняшникова олія. Оливкову олію та вершкове масло пацієнти з ЦД2 вживають в 2 рази менше, ніж особи КГ. Такий характер харчування вірогідно визначався тим, що людина із ЦД2

прибувала на відповідній дієті «для діабетиків» і, як ми виявили, притримування рекомендації було особливо якісним в перші роки захворювання.

Надалі ми провели аналіз складу вказаних харчових жирів. В діаграмі (рис. 5.5) ми наводимо лише основні 3 ЖК, які за об'ємом переважають в продукті. Як видно з діаграми, в складі соняшникової олії переважає ненасичена С18:2 лінолева ЖК, а насичена С16:0 пальмитинова ЖК складає незначну долю до 5-7%. Основною ЖК оливковою олії є ненасичена С18:1 олеїнова ЖК, а насичена С16:0 пальмитинова ЖК в складі оливкової олії має вміст більший в 3 рази, ніж в складі соняшникової, що навіть є схожим із маргарином [3,7,10].

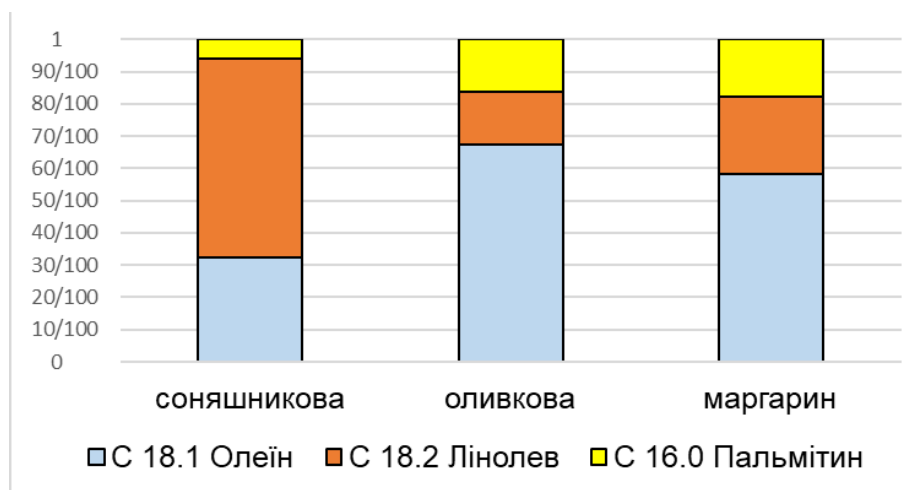


Рис. 5.5. Доля основних ЖК (за максимально допустимим вмістом %), визначена стандартом

Таким чином, ми виявили, що у пацієнтів, які використовують переважно соняшкову олію (яка багата на С18:2 лінолеву ЖК) для приготування їжі в складі мембран спостерігається парадоксальне зменшення вмісту С18:2 ЖК. Вміст олеїнової ЖК в мембранах пацієнтів і здорових осіб практично не відрізняється, однак, вони вживають в 2 рази більше оливкової олії та маргарину, тобто джерел олеїнової ЖК.

Дослідження зв'язку факторів, які впливають на розвиток ЦД2 та складу

ЖК мембран еритроцитів завжди є популярним. Американські вчені наводять дані про дослідження через опитування та спостереження протягом 11 років жінок у постменопаузі [82]. Автори провели співставлення ряду ознак: вік, раса, освіта, куріння, ступень фізичної активності, вживання алкоголю із антропометричними даними (обхват талії, зріст, індекс маси тіла), харчовим глікемічним навантаженням та сімейним анамнезом діабету прийшли висновку, що не можна чітко визначити вплив якоїсь однієї ЖК, наприклад пальмітинової, на розвиток ЦД2, але однозначно – для пацієнтів із ЦД2 є характерним перерозподіл ЖК в мембранах еритроцитів відносно здорових осіб [82].

В роботі [127] проводили дослідження вивчення екзогенних та ендогенних впливів на ліпідний обмін. Автори висловили думку про відсутність прямої залежності між екзогенним впливом у вигляді аліментарного вживання продуктів-джерел ЖК і розвитком діабету, але виявили зв'язок експресії внутрішньоклітинного регуляторного протеїну L-FABP із перерозподілом вмісту ЖК в мембранах еритроцитів, що надає підставу вважати ендогенні клітинні механізми основою глибокого порушення ліпідного гомеостазу.

Вимірювання концентрації L-FABP у досліджуваних осіб (рис. 5.6) показало, що вміст шаперону підвищується у пацієнтів з ПДР відносно КГ, але не достовірно. Показник корелює із тривалістю захворювання на ЦД2 і в 2-й групі достовірно відрізняється в 1,87 ($P=0,029$) рази від КГ, відмінність від 1-ю та 2-ю групою недостовірна ($P=0,11$) [3,7,10].

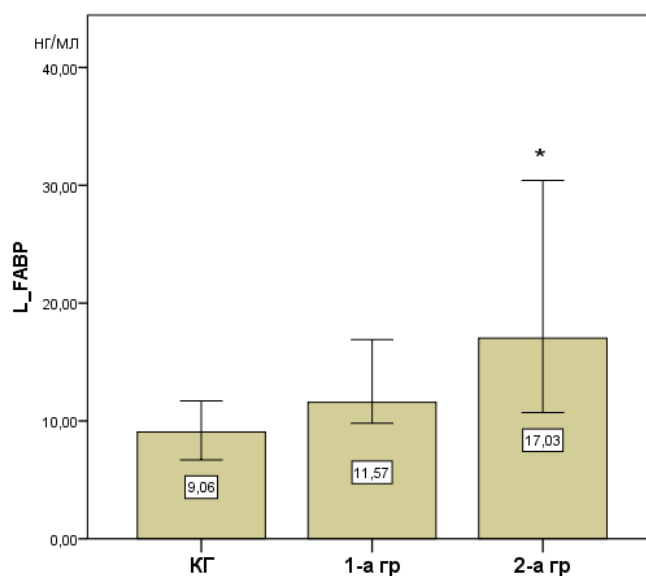


Рис. 5.6. Сироваткова концентрація L-FABP (нг/мл) у осіб досліджуваних груп

Таким чином, проведене дослідження показало, що ЖК склад клітинних мембран у пацієнтів на ПДР має суттєві відмінності відносно здорових осіб, але їх напрям не є ортодоксальним підвищенням насичених ЖК і зниженням ненасичених ЖК. У пацієнтів з ЦД2 достовірно підвищується лише вміст насиченої пальмітинової ЖК, знижується вміст ненасиченої лінолевої ЖК і такий стан не прогресує з часом. Також виявлено, що ступінь вживання прямих джерел вказаних ЖК у пацієнтів відрізняється у порівнянні із особами КГ. Ефект вживання харчових джерел у вигляді популярності серед пацієнтів на ЦД2 соняшникової олії багатої на лінолеву ЖК є практично протилежним тим змінам, які спостерігаються в складі мембрани. Також відмінність в групах ступеню вживання джерела олеїнової ЖК (оливкової олії у пацієнтів КГ та маргарину у пацієнтів 2-ї групи) не призводить до зміни вмісту вказаної ЖК в мембранах клітин.

Такі відмінності надають підставу вважати основним механізмом регуляції жирнокислотного стану в організмі ендогенні механізми, які забезпечують розподіл ЖК в клітині.

Одним з головних регуляторів внутрішньоклітинного обміну ЖК є протеїн L-FABP, який підвищується у пацієнтів з ЦД2 та корелює із стажем

захворювання.

Дослідження L-FABP в групі осіб без діабету, але з підвищеними рівнями глюкози крові та холестерину, виявили зменшений показник ІМТ, незначне підвищення ПНЖК в мембранах еритроцитів та рівень сироваткового L-FABP в 1,2 рази менший ніж у відносно здорових осіб ($P>0,05$) і в 2 рази менший ніж у пацієнтів з ЦД2 ($P<0,05$). Можна припустити, що за певних умов, при наявності метаболічних зсувів, саме зменшення експресії L-FABP на тлі підвищення ПНЖК в клітинах запобігає розвитку ожиріння і діабету [127].

Отже, отримані результати, дозволяють зробити наступні висновки. Вивчення спектру основних ЖК в мембранах еритроцитів пацієнтів з ПДР не змінювалися у залежності від тривалості ЦД2 і показало достовірне підвищення в 1,6 разів вмісту насиченої пальмітинової ЖК, зниження в 1,6 разів вмісту ненасиченої лінолевої і арахідонової ЖК відносно показників групи здорових осіб. Проте збільшене у 2 рази вживання соняшникової олії, багатой на лінолеву ЖК, пацієнтами з ПДР все одно було неефективним для встановлення балансу ЖК і супроводжувалося зниженням лінолевої ЖК, що свідчить про інший механізм дисбалансу ЖК в складі мембран їх еритроцитів, ніж аліментарний шлях. Концентрація L-FABP в сироватці крові у пацієнтів на ПДР була вище, ніж в групі здорових осіб і чітко корелювала із тривалістю захворювання на ЦД2, що визначає вплив шаперону L-FABP важливим механізмом регуляції ліпідного обміну.

Резюме до розділу 5

В результаті виконання цього етапу дослідження було встановлено, що спектр основних ЖК в мембранах еритроцитів пацієнтів з ПДР не змінювався у залежності від тривалості ЦД2 і стадії ПДР. Спостерігалось достовірне підвищення в 1,6 разів вмісту насиченої пальмітинової ЖК, зниження в 1,6 разів вмісту ненасичених лінолевої і арахідонової ЖК відносно показників

КГ. Проте збільшене у 2 рази вживання соняшникової олії, багатої на лінолеву ЖК, пацієнтами з ПДР все одно було неефективним для встановлення балансу ЖК і супроводжувалося зниженням лінолевої ЖК, що свідчить про інший механізм дисбалансу ЖК в складі мембран еритроцитів, ніж аліментарний шлях. Концентрація L-FABP в сироватці крові у пацієнтів на ПДР була вище, ніж в групі здорових осіб і чітко корелювала із тривалістю захворювання на ЦД2, що визначає вплив шаперону L-FABP важливим механізмом регуляції ліпідного обміну.

Даний розділ висвітлено в наступних публікаціях:

1. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Вивчення факторів впливу на обмін жирних кислот у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету. Архів офтальмології України. 2020; 8(1):25-32. doi: 10.22141/2309-8147.8.1.2020.200733 [3]
2. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ, Іванюта ЕП. Регуляція ліпідного метаболізму у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету. Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні питання офтальмології»; Вер 23-24 2020; телеміст Одеса-Тернопіль; 2020, 49-51. [7]
3. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ, Зелінська МВ. Зв'язок рівня L-FABP у сироватці крові хворих з проліферативною діабетичною ретинопатією з різною тривалістю цукрового діабету в залежності від генотипу CYP2E1. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Філатовські читання-2021». Трав 20-21 2021. Одеса, «Чорномор'я». [10]

РОЗДІЛ 6

МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ТА СТРУКТУРНІ ЗМІНИ ЕРИТРОЦИТІВ ПАЦІЄНТІВ ІЗ ПРОЛІФЕРАТИВНОЮ ДІАБЕТИЧНОЮ РЕТИНОПАТІЄЮ ТА РІЗНОЮ ТРИВАЛІСТЮ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ

Еритроцити у пацієнтів з діабетом стикаються з безліччю ризиків, таких як гіперглікемія, гіперосмолярність, окислювальний стрес, запалення і порушення ліпідного обміну, що призводить до посилення агрегації, зниження деформованості клітин і зниження плинності мембран. Ці зміни в еритроцитах в кінцевому підсумку призводять до порушення мікроциркуляції і діабетичних ускладнень[167].

Як важливий компонент кровообігу, еритроцити є чутливим індикатором стану здоров'я організму. Деякі показники параметрів еритроцитів, такі як концентрація гемоглобіну, гематокрит і швидкість осідання еритроцитів, можна виміряти безпосередньо по крові, тоді як деякі параметри, такі як середній обсяг клітин (MCV), середній рівень гемоглобіну в клітинах або середня концентрація гемоглобіну в клітинах можна розрахувати тільки на основі декількох вимірюваних показників за допомогою гематологічного аналізатору. Ці параметри відображають стан еритроцитів з різних сторін і можуть бути використані в першу чергу для оцінки морфології, структури, функції і продукції еритроцитів для подальшої діагностики деяких захворювань [74].

Тому, на даному етапі роботи ми вивчали морфо-функціональні та структурні зміни еритроцитів пацієнтів із проліферативною діабетичною ретинопатією та різною тривалістю цукрового діабету 2 типу.

До обстеження були залучені 106 пацієнтів, але для цього дослідження, ми пацієнтів поділили на 4 групи за тривалістю ЦД2 (рис. 6.1). У пацієнтів 1-ї

групи Gr_1 (n=17) середній вік ($M \pm m$) складав $61,7 \pm 2,8$ років, тривалість ЦД2 визначалася до 10 років, у 2-й групі Gr_2 (n=19) середній вік – $62,3 \pm 2,2$ років, тривалість ЦД2 була 10-17 років, у 3-й групі Gr_3 (n=49) середній вік – $64,1 \pm 1,5$ років, тривалість ЦД2 – 18-20 років, у 4-й групі Gr_4 (n=21) середній вік – $68,1 \pm 2,5$ років, тривалість ЦД2 – понад 20 років. Гендерний аналіз складу досліджуваних груп за статтю не виявив достовірних відмінностей, доля жінок в групах була наступною: Gr_1 – 55%, Gr_2 – 67%, Gr_3 – 54%, Gr_4 – 65%.

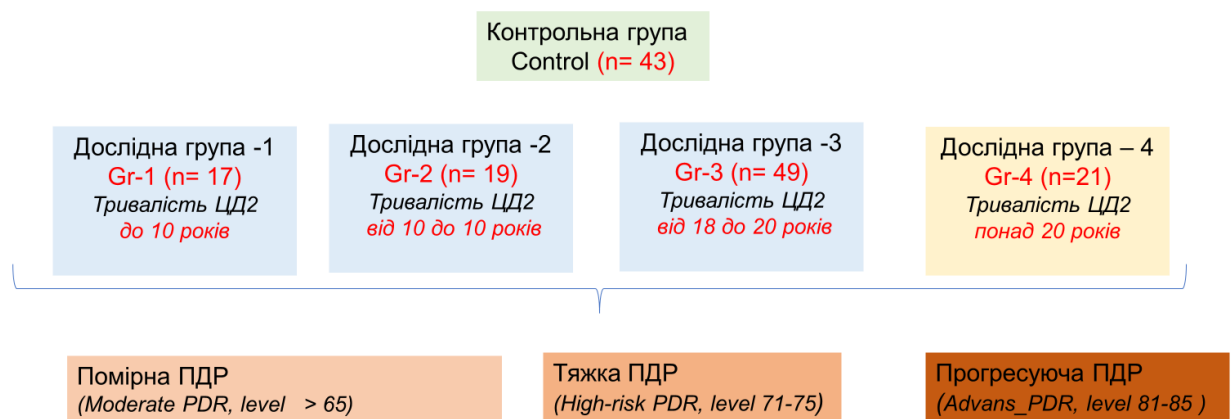


Рис. 6.1. Групи що досліджувалися для вивчення і порівняння морфо-функціональних та структурних змін еритроцитів. Розподіл груп вказаний із врахуванням тривалості основного захворювання та стадії ПДР

Групу порівняння контрольну (КГ, n=43, жінок 65%) склали добровольці, у яких не було порушення вуглеводного обміну (за рівнем глікованого гемоглобіну), що звернулися з метою профілактичного огляду в Університетську клініку НМУ імені О. О. Богомольця, були співставні за віком та статтю із пацієнтами.

Вивчення офтальмологічного статусу за протоколом ETDRS показало, що тривалість основного захворювання збільшувалася із поглибленням ПДР. У пацієнтів груп Gr_1 та Gr_2 переважно виявлена початкова та помірна ПДР, а у пацієнтів груп Gr_3 та Gr_4 переважно ПДР високого ризику та

прогресуюча. Не зважаючи на те, що пацієнти отримували терапію за консультаціями ендокринолога, рівень глюкози та глікованого гемоглобіну у пацієнтів достовірно перевищували показники КГ (табл.1).

Таблиця 6.1

Показники вуглеводного обміну в досліджуваних групах пацієнтів з ПДР та різною тривалістю ЦД 2 (Gr_1-4) та осіб контрольної групи КГ, (M±m)

Показник	Gr_1, n=17	Gr_2, n=19	Gr_3, n=49	Gr_4, n=21	Control, n=43
Глюкоза крові, ммоль/л	10,25±1,2*	9,98±0,8*	9,45±0,6*	10,83±0,7*	5,0±0,1
Глікований гемоглобін, %	7,26±0,6*	7,94±0,6*	7,29±0,5*	9,3±0,5*	5,2±0,09

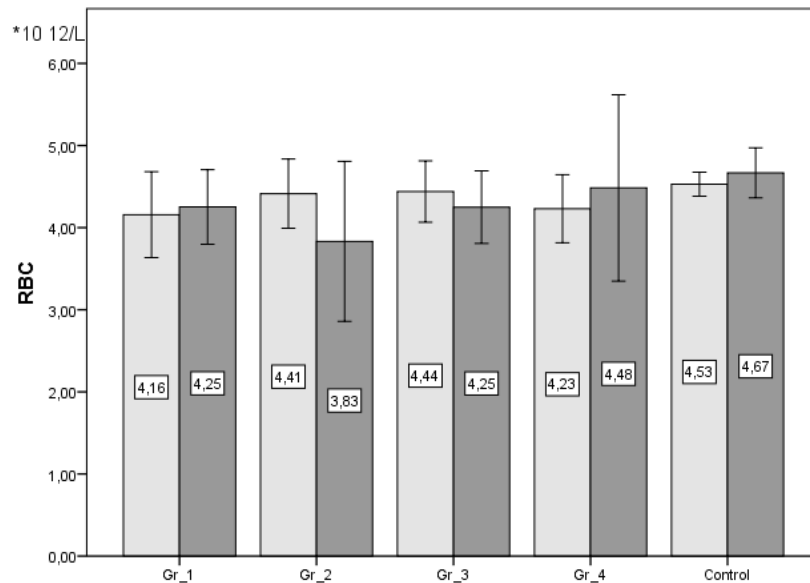
Примітка: * – $p < 0,05$ у порівнянні із КГ.

Суттєвої різниці показників вуглеводного обміну між групами пацієнтів не виявлено. Однак, відомо, що «золотим стандартом» оцінки гіперглікемії є глікований гемоглобін, ми визначили підвищення в групі Gr_4 на 15% від показників груп Gr_1-3, що свідчить про тривалу стійку гіперглікемію у пацієнтів цієї групи і низьку ефективність терапії ЦД.

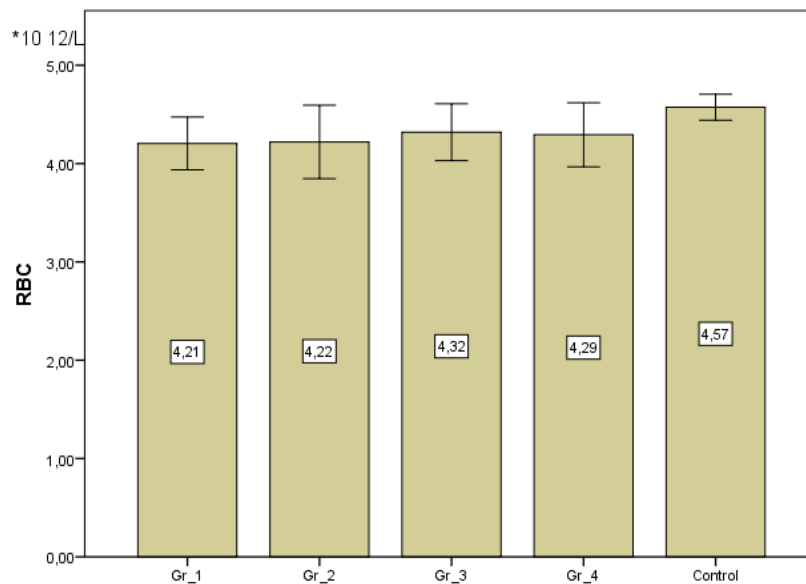
Оскільки існує фізіологічна різниця еритроцитарних параметрів у чоловіків та жінок, ми провели аналіз усіх показників із врахуванням статі. Наводимо приклад показника кількості еритроцитів - RBC в групах із визначенням статі пацієнтів (рис. 6.2), як приклад того, що коливання еритроцитарних показників гемограми у осіб різної статі не було суттєвим та достовірним.

Більш того, наприклад, в групах Gr_1, Gr_3 кількість еритроцитів була більшою у жінок. Ми вважаємо, що це природне, оскільки гендерні відмінності еритроцитарних параметрів визначає вплив статевих гормонів на інтенсивність еритропоезу. У наших групах, середній вік досліджуваних осіб перевищує 60 років, і вплив статевих гормонів на процеси проліферації кісткового мозку суттєво знижений [4,9,11]. Тому, подальші дослідження еритроцитарних параметрів ми наводимо узагальнені по групах, без кореляції

із статтю.



А



Б

Рис. 6.2. Кількість еритроцитів в досліджуваних групах пацієнтів з ПДР та різною тривалістю ЦД 2 (Gr_1-4) та осіб контрольної групи КГ ($M \pm m$, ДІ 95%), А – розподіл за гендерною відзнакою: світлі стовпчики – жінки, темні – чоловіки. Б – загальна кількість в групі

Примітки:

1. * – $p < 0,05$ у порівнянні із КГ за критерієм Шеффе,
2. # – $p < 0,05$ у порівнянні із КГ за критерієм Даннет (двосторонній).

Оцінка морфо-функціональних параметрів еритроцитів показала, що кількісні еритроцитарні показники RBC, HGB, HTC, MCH, MCHC, MCV, RDW, відображали чітку картину анемічного синдрому за рахунок

зменшення кількості клітин – переносників кисню (табл. 6.2).

Таблиця 6.2

Морфо-функціональні параметри еритроцитів в досліджуваних групах пацієнтів з ПДР та різною тривалістю ЦД 2 (Gr_1-4) та осіб контрольної групи КГ (M±m)

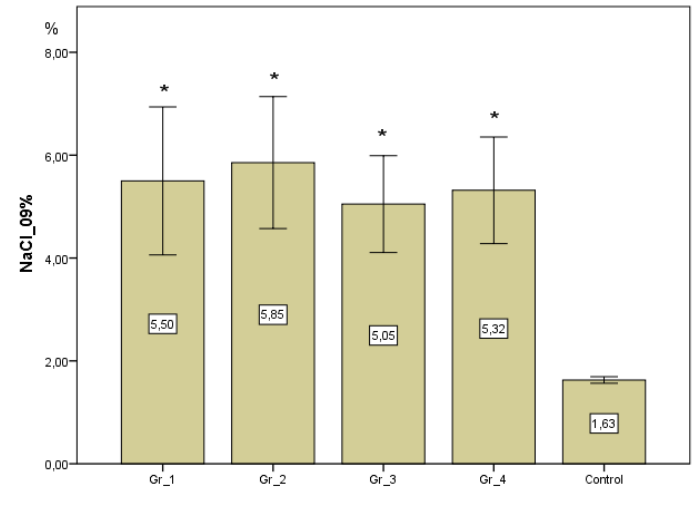
Показник	Gr_1, n=17	Gr_2, n=19	Gr_3, n=49	Gr_4, n=21	Control, n=43
HGB, g/l	131,6±5,2 p=0,051 #p=0,009	130,16±2,64 *p=0,015 #p=0,002	131,73±5,25 *p=0,006 #p=0,001	134,58±5,17 #p=0,023	150±2,27
HTC, %	35,66±1,15 #p=0,049	36,68±0,85	37,70±1,36	37,0±1,37	39,34±0,47
MCH, pg	31,3±1,01	31,42±1,37	30,42±0,64 #p=0,039	31,47±0,95	32,95±0,54
MCHC, g/l	396,0±9,1	356,16±8,9 #p=0,019	348,63±4,8 *p=0,001 #p=0,0003	365,25±9,8	381,29±3,8
MCV, fl	84,8±1,58	87,98±2,24	87,24±1,34	86,3±1,46	86,3±0,79
RDW, %	11,62±0,11	11,64±0,08	11,74±0,09	11,54±0,11	11,71±0,16

У пацієнтів з ПДР в порівнянні із КГ виявили достовірні відмінності вмісту гемоглобіну та залежних від нього розрахункових показників МСН та МСНС. Вірогідно, така картина обумовлена порушенням утворення гемоглобіну в еритробласті та його накопиченням у зрілій клітині. В той же час, не виявили чіткої залежності зміни морфо-функціональних параметрів еритроцитів від тривалості ЦД2. Водночас, ми виявили стійку тенденцію у пацієнтів в порівнянні із КГ до зменшення гематокриту і еритроцитів. На тлі незмінених параметрів анізоцитозу MCV та RDW така картина відображує втрату клітин з кровотока, що також обумовлює гіпоксію у пацієнтів з ЦД2 та вимушує замислитися над причинами попереднього старіння клітин. Одним із факторів, якій зумовлює загибель еритроцитів є зменшення їх осмотичної та механічної резистентності, що призводить до гемолізу клітин.

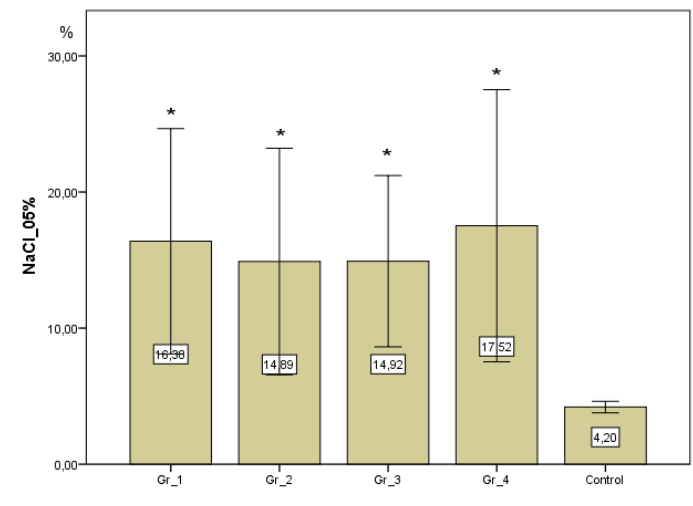
Отже, наступним кроком нашого дослідження було вивчення ступеня гемолізу еритроцитів стандартизованими методами.

Виявили суттєву різницю у структурних властивостях еритроцитів пацієнтів з ПДР у порівнянні із КГ (рис. 6.3).

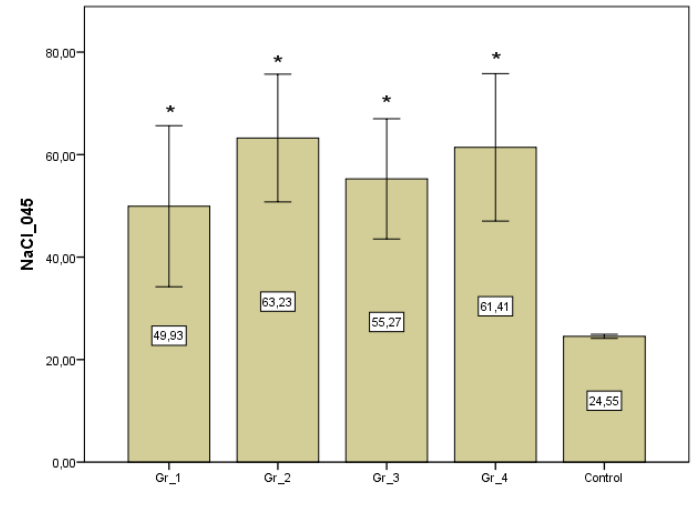
початок рис. 6.3



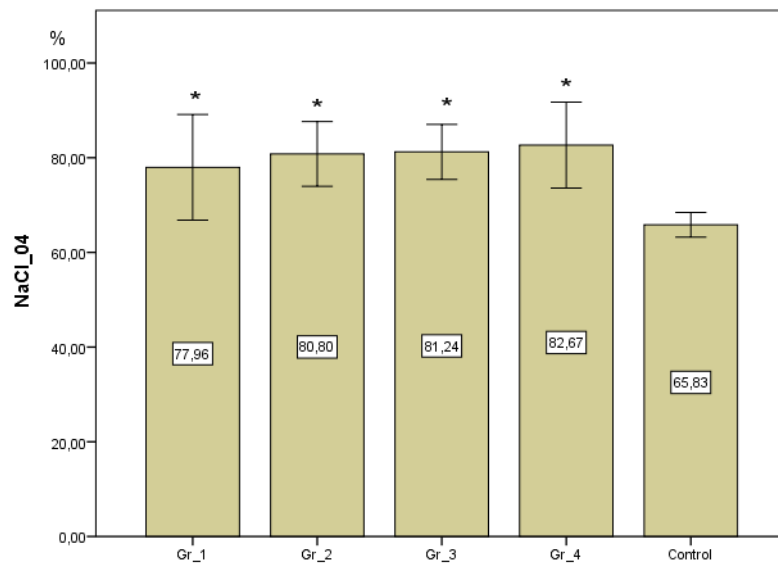
А



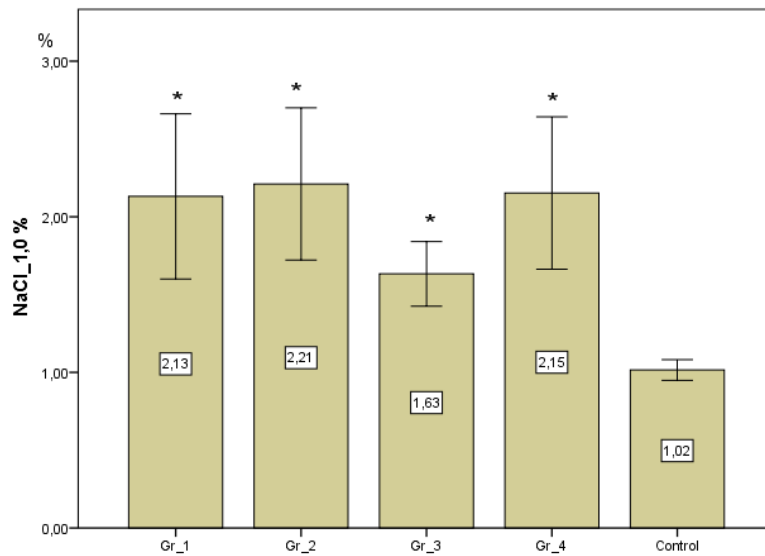
Б



В



Г



Д

Рис. 6.3. Порівняння показника осмотичної резистентності (% гемолізованих клітин) в досліджуваних групах пацієнтів з ПДР та різною тривалістю ЦД 2 (Gr_1-4), осіб контрольної групи КГ ($M \pm m$, ДІ 95%)

А – розчин NaCl 0,9%; Б – NaCl 0,5%; В – NaCl 0,45%; Г – NaCl 0,4%;

Д – NaCl 1,0%

Примітка: * – $p < 0,05$ у порівнянні із КГ за критерієм Шеффе

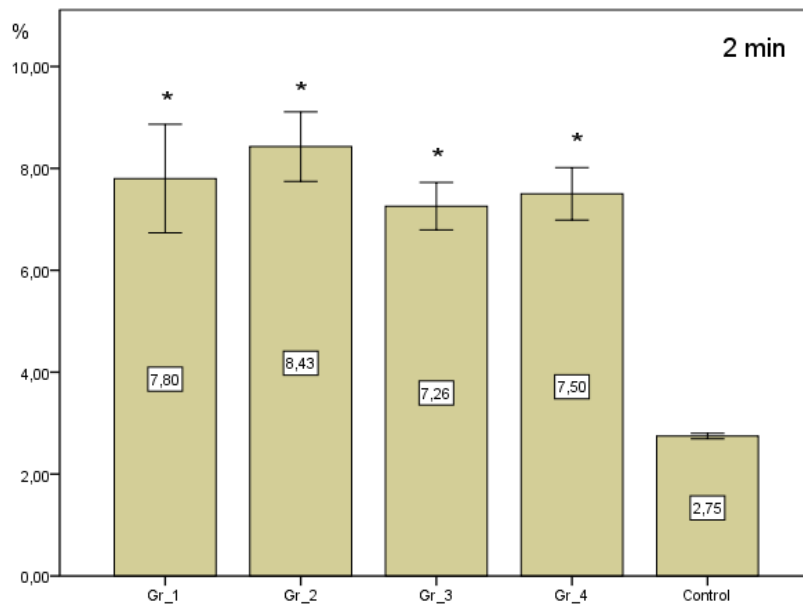
За нормальної осмотичної резистентності гемоліз еритроцитів починається у розчині NaCl 0,5% (мінімальна осмотична резистентність),

повний гемоліз еритроцитів відбувається при концентрації NaCl 0,35% (максимальна осмотична резистентність). У розчині NaCl 0,9% у пацієнтів з ПДР осмотичний гемоліз не мав статистичної різниці в залежності від тривалості ЦД2, але був в 3-3,3 рази ($p < 0,05$) більше, ніж у здорових осіб. У розчині NaCl 0,5%, осмотична резистентність еритроцитів пацієнтів була зменшена відносно осіб КГ в 3,5-4 ($p < 0,05$) рази і також не відрізнялася достовірно в залежності від тривалості ЦД2. У розчині NaCl 0,45% різниця осмотичної резистентності пацієнтів з КГ складала 2-2,5 рази ($p < 0,05$), а при концентрації NaCl 0,4%, відрізнялася на 20% ($p < 0,05$), і практично 80% еритроцитів пацієнтів ушкоджувалися [4,9,11,81].

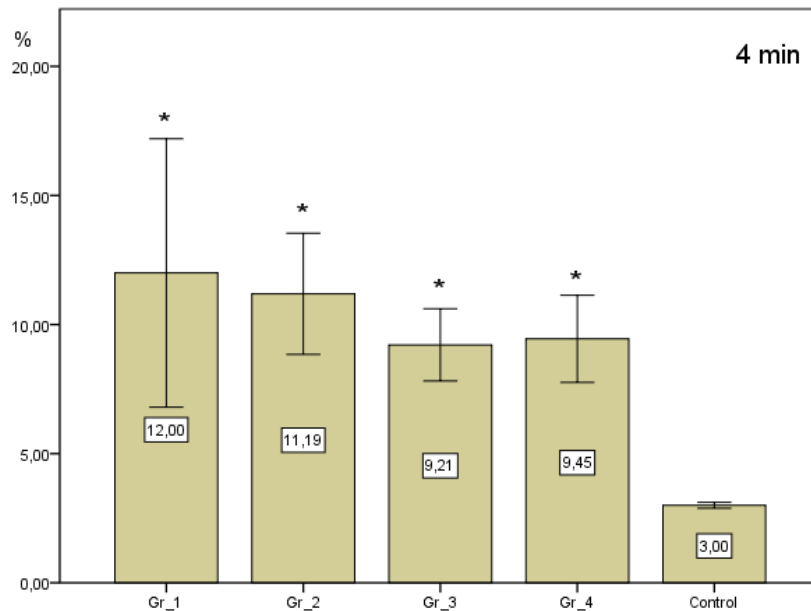
При підвищенні концентрації NaCl до 1,0% у пацієнтів з ПДР також спостерігалася в 2 рази ($p < 0,05$) зменшення стійкості мембрани еритроцитів, що підвищувало гемоліз у порівнянні із КГ. При цьому, найбільш адаптованими до ушкодження еритроцитів виявилися клітини пацієнтів групи Gr_3, у яких доля ушкоджених клітин в 1,5 рази ($p < 0,05$) була більшою, ніж у КГ, але різниця не була достовірною у порівнянні із іншими групами пацієнтів.

Стійкість до ушкодження мембран еритроцитів пацієнтів також суттєво відрізнялася у порівнянні із КГ (рис. 6.4).

Механічний гемоліз виникав при режимі центрифугування протягом 2 хв у пацієнтів в 2,6-3 р інтенсивніше ніж у здорових осіб. А при центрифугуванні 4 хв – у пацієнтів порушувалося в 3-3,75 разів більше клітин. При цьому, більш тривале центрифугування витримували клітини у пацієнтів із більшою тривалістю ЦД2, і доля еритроцитів, що гемолізувалися на початку захворювання була на 18% більше, ніж після довгочасної адаптації організму до порушення обміну [4,9,11,81].



А



Б

Рис. 6.4. Порівняння показника механічного гемолізу еритроцитів (% гемолізованих клітин) в досліджуваних групах пацієнтів з ПДР та різною тривалістю ЦД 2 (Gr_1-4), й осіб контрольної групи КГ ($M \pm m$, ДІ 95%).

А – при режимі центрифугування 2 хвилини; Б – 4 хвилини

Примітка: * – $p < 0,05$ у порівнянні із КГ за критерієм Шеффе

Таким чином, у пацієнтів з ПДР в порівнянні із КГ виявили зменшення вмісту гемоглобіну та залежних від нього розрахункових показників МСН та МСНС, але без кореляції із тривалістю ЦД2. Виявлену тенденцію до

зменшення RBC у пацієнтів з ПДР вважаємо пов'язаною із скороченням перебування клітин в кровотоці та передчасним еріптозом. Гемоліз еритроцитів у фізіологічному розчині у пацієнтів з ПДР був в 3-3,3 рази ($p < 0,05$) більше, ніж у здорових осіб, не мав достовірної різниці в залежності від тривалості ЦД2. Гемоліз еритроцитів пацієнтів в розчині NaCl 0,5% та 0,45% підвищувався в 3,5-4 ($p < 0,05$) рази та 2-2,5 рази ($p < 0,05$) відповідно. При підвищенні концентрації NaCl до 1,0 % у пацієнтів з ПДР також спостерігалось в 2 рази ($p < 0,05$) зменшення стійкості мембрани еритроцитів у порівнянні із КГ. При цьому, найбільш адаптованими до ушкодження еритроцитів виявилися клітини пацієнтів із тривалістю ЦД 18-20 років. Механічний гемоліз еритроцитів у пацієнтів з ПДР виникав в 2,6-3 разів інтенсивніше при центрифугуванні 2 хв та в 3-3,75 разів більше при центрифугуванні 4 хв, що є свідченням зменшення структурної стійкості клітин і втрати властивостей до механізмів ефективної перфузії, що неминуче поглиблює порушення мікроциркуляції.

Резюме до розділу 6

У пацієнтів з ПДР виявили зменшення вмісту гемоглобіну та залежних від нього розрахункових показників MCH та MCHC у порівнянні із КГ, але без залежності від тривалості ЦД2. Виявлену тенденцію до зменшення еритроцитів у пацієнтів з ПДР вважаємо пов'язаною із скороченням перебування клітин в кровотоці через передчасне руйнування мембрани. Осмотичний гемоліз еритроцитів у пацієнтів з ПДР був в 3-3,3 рази ($p < 0,05$) вище, ніж у осіб КГ, однак його ступінь не відрізняється в залежності від тривалості ЦД2. Механічний гемоліз еритроцитів у пацієнтів з ПДР виникав в 2,6-3 разів інтенсивніше при центрифугуванні 2 хв та в 3-3,75 разів більше при центрифугуванні 4 хв, що є свідченням зменшення структурної стійкості клітин і втрати властивостей до механізмів ефективної перфузії, що неминуче поглиблює порушення мікроциркуляції.

Даний розділ висвітлено в наступних публікаціях:

1. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ, Прусак ОІ. Морфофункціональні та структурні зміни еритроцитів пацієнтів із проліферативною діабетичною ретинопатією та різною тривалістю цукрового діабету 2 типу. Офтальмологічний журнал. 2021; 5:21-7. doi: <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh202152127> [4]
2. Hanyuk V, Petrenko O, Natrus L. Analysis of erythrocytes' parameters in patients with varying degrees of diabetic retinopathy. Tbilisi International Ophthalmology Conference - TIOC 2020, abstract book, Dec 19-20 2020; Tbilisi, Georgia; 2020, 46-7. [81]
3. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Вивчення осмотичної резистентності еритроцитів хворих з проліферативною діабетичною ретинопатією та різною тривалістю цукрового діабету. ІХ Науково-практична конференція дитячих офтальмологів та оптометристів України з міжнародною участю «Своє дитинство треба бачити`2021» Чер 10-12 2021, збірник праць / під редакцією професора С. О. Рикова. Бугаз Одеської області; 2021, 98-9. [9]
4. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Вплив гіперглікемії на резистентність еритроцитів пацієнтів із проліферативною діабетичною ретинопатією на тлі цукрового діабету 2 типу. «Рефракційний пленер`21»: науково-практична конференція з міжнародною участю, Жовт 29-30 2021, збірник праць / під редакцією член-кореспондента НАМН України, професора С. О. Рикова. Київ; 2021. [11]

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Діабетична ретинопатія є одним з частих ускладнень цукрового діабету 2 типу і є незворотним і сліпим захворюванням очей. Залежно від ступеня прогресування ДР поділяють на непроліферативну діабетичну ретинопатію та проліферативну діабетичну ретинопатію, відповідно до комплексу ушкоджень за шкалою ETDRS визначали помірну (PDR), тяжку (High-risk PDR) та прогресуючу ПДР (Advans PDR). При НДР стан супроводжується втратою периваскулярних клітин сітківки, витоком розширених мікросудин та утворенням невеликих аневризм доти, доки сітківка не набухне і не вплине на зір пацієнта. При ПДР порушується гемато-ретинальний бар'єр та знижується судинний перфузійний тиск. Найбільш типовою особливістю ПДР є поширення опосередкованого ішемією дисбалансу між ангіогенними та антиангіогенними факторами, що призводить до гіперплазії, що може призвести до крововиливу в склоподібне тіло та відшарування сітківки. Втрата зору насамперед пов'язана з двома станами: діабетичним макулярним набряком та ПДР; ДМО може виникнути на будь-якій стадії діабетичної ретинопатії, але ризик збільшується з тяжкістю ураження ДР з поширеністю до 71% пацієнтів з ПДР [112].

Незважаючи на велику кількість досліджень патогенетичних шляхів ПДР, і вивченню факторів що призводять до діабетичної ретинопатії, її патогенез досі не зрозумілий [112]. Через те, сьогодні не існує ефективних заходів раннього лікування діабетичної ретинопатії, а варіанти лікування, які доступні при прогресуванні захворювання, дуже обмежені, і тому результати лікування часто незадовільні.

Отже, продовжує мати велику актуальність детальні дослідження молекулярних механізмів патогенезу діабетичної ретинопатії та розробка нових терапевтичних засобів. Метаболоміка – один із нових, цікавих перспективних напрямків вивчення механізмів розвитку ПДР. Метою

метаболоміки є виявлення біомаркерів, які допоможуть зрозуміти патогенез захворювання. При ПДР виникають незворотні пошкодження сітківки, які тісно пов'язані з метаболічними змінами. Цей факт можна використовувати як хороший спосіб для раннього виявлення потенційних діагностичних біомаркерів, лікування та прогнозування захворювання.

Окислювальний стрес (ОС) – пошкоджуючий стан, зумовлений порушенням балансу між утворенням та інактивацією вільних радикалів кисню, відіграє важливу роль розвитку ДР. Доведено, що при гіперглікемії значно і тривалий час підвищений рівень активних форм кисню (АФК) та знижений рівень антиоксидантів, таких як супероксиддисмутаза (СОД) та глутатіон (GSH). Це приводить до дисбалансу в окислювально-антиоксидантній системі, АФК ушкоджують тканину сітківки та прискорює апоптоз. Отже, наявність ОС підвищений як перший механізм, який створює умови для змін у сітківці, а високий рівень АФК розглядається як важливий фактор ушкодження при ДР [64].

Оксид азоту (NO) одночасно із супероксидним радикалом (O_2^-) є важливим учасником ушкоджувальних впливів. NO виробляється L-аргініном за допомогою конститутивної синтази оксиду азоту (cNOS) або індукцибельної NOS (iNOS). Надмірна експресія NO, бере участь у різних патологічних станах. Відомо, що iNOS і CYP2E1 сприяють пошкодженню, спричиненому окислювальним стресом, однак дослідження їх регуляції показали спірні результати [62, 92].

Наша ідея вивчення рівня аргінази базувалася на розумінні то що, рівні метаболіту аргініну підвищені в плазмі у пацієнтів із ДР порівняно із пацієнтами без ДР [134]. Аргінін є субстратом ферменту аргінази. Надекспресія аргінази у сітківці пацієнтів із діабетом призводить до дефіциту аргініну, що бере участь у шляху обміну NOS, і призводить до недостатності NO та подальшого обмеження дії вазодилаторів, дисфункції ендотеліальних клітин, збільшення продукції азоту та АФК, що посилює ДР.

Отже, нашою нульовою гіпотезою було визначення підвищення

аргінази-1 у пацієнтів із ПДР, проте наші дані про вміст аргінази у пацієнтів виявилися вкрай несподіваними. Ми продемонстрували підвищення аргінази у пацієнтів з ПДР на тлі ЦД2 понад 20 років. І максимальним виявлений фермент у пацієнтів із помірною ПДР, коли захворювання переходить саме у стадію проліферації і активуються судинні механізми ушкодження сітківки. Подальше поглиблення ретинопатії вже не супроводжується високою активністю аргінази-1. Це дає нам підставу вважати, що саме на стадії помірної ПДР відбувається критичний вплив надекспресії аргінази, який є шкідливим для ендотеліальних клітин.

Інші дослідження продемонстрували участь аргінази в патогенетичних каскадах при розвитку гіпертонії, ожиріння, діабету та ін. [22, 113, 139, 165]. Автори демонструють суттєву розбіжність і варіабельність, вмісту аргінази в плазмі досліджуваних осіб і пояснюють це розповсюдженістю ферменту в тканинах та клітинах організму [121]. В даний час аргіназа розглядається дослідниками як потенційний біомаркер перебігу і тяжкості цих захворювань. Автори стверджують, що аргіназа може сприяти прогресуванню ЦД2 та його ускладнень завдяки своїй регулюючій ролі у функціях β-клітин, інсулінорезистентності та судинної дисфункції через опосередкування метаболізму L-аргініну, запальних реакцій та окисного стресу [180].

Є думка про те, що продукція гену *CYP2E1* грає вирішальну роль у розвитку ЦД2 через механізми впливу на вільні форми кисню у пацієнтів з ожирінням [168, 178]. Надекспресований *CYP2E1* демонструє високу здатність продукувати вільні радикали, які, ймовірно, спричиняють пошкодження печінки та перекисне окислення ліпідів.

CYP2E1 – опосередкований метаболізм різних токсикантів призводить до утворення вільних радикалів як побічних продуктів, що, у свою чергу, сприяє прогресу ряду захворювань. Повідомлялося про диференціальні регуляторні механізми *CYP2E1* у різних системах органів та експериментальних парадигмах.

За нашими даними, носії поліморфного варіанту *CYP2E1* зокрема алелю G однаково були розповсюджені в популяції, але мали підвищену схильність до експресії аргінази-1 при розвитку ПДР. Що також є підґрунтям вважати механізми впливу оксидативно-нітрозативного стресу базовими у патогенезі розвитку ендотеліальної дисфункції та виникнення мікросудинних аномалій.

Отже, клінічні та експериментальні дослідження свідчать про те, що аргіназа може бути біомаркером та діагностичним параметром ЦД2 та ПДР, як його ускладнення. Однак не існує стандарту клінічного визначення активності аргінази або рівня експресії ферменту у крові для діагностики цих захворювань. Дослідження в цьому напрямку є багатообіцяючим підходом, який сформує нові поштовхи для розробки фармацевтичних інгібіторів аргінази, для удосконалення фармакологічної терапії ПДР на тлі ЦД2.

Враховуючи численні експериментальні докази про фізіологічні регуляторні властивості транспортерів, зокрема GLUT1, який асиметрично розподіляється по полюсах ендотелію, нашою нульовою гіпотезою було наявність відмінностей в розподілі молекули в досліджуваних групах. Ми зважали на дані про підвищення вмісту GLUT1 в сітківці тварин на ранній стадії ДР, що було доведено за допомогою імуногістохімії, аналізу вестерн-блот [85]. Ця ж група дослідників продемонструвала результати поступового зниження вмісту продуктів глікації в сітківці а допомогою генетичної та фармакологічної модуляції (блокування) транспортера GLUT1 у тварин [85]. Хоча результати не були абсолютно успішними і мали обмеження, отримані дані дали підставу розглядати GLUT1 у нейронах сітківки як на цільову молекулу для зменшення ризику розвитку ДР.

Водночас дані інших дослідників в цьому напрямку суперечливі: деякі демонструють відсутність змін [101] або зниження [109] і підвищення [97] вмісту GLUT1 у сітківці при діабеті. Зрозуміло, що визначення безпосередньо молекули-транспортера в сітківці тварини не може бути прямо екстрапольовано на стан нейронів людини і на вміст транспортера у плазмі.

Дані про те що гіперглікемія впливає на цитоплазматичний протеїн GLUT1, але не на його мРНК, з одного боку підкреслює, що вміст GLUT1 у тварин регулюється посттрансляційною модифікацією та обміном у діабетичній сітківці, але з іншого – свідчить про ймовірну генетичну детермінованість вмісту транспортера.

Наші дослідження продемонстрували відсутність коливання вмісту GLUT1 у досліджуваних осіб. Ніякі фактори у пацієнтів (тривалість ЦД2, ступінь ушкодження сітківки, успішність або неуспішність корекції гіперглікемії) не показали відмінностей вмісту транспортера. Тому ми погоджуємося із думкою, що сталий вміст GLUT1 визначається генетичною детермінованістю протеїну і в складі еритроцитів й ендотелію. Однак це припущення залишає відкритим питання про фізіологічну роль транспортера, як і про можливий фармакологічний вплив на канали транспорту глюкози до нейронів, який міг би надаватися через блокування GLUT1 за наявності неуспішної корекції глюкози у крові і запобігання глюкотоксичності.

Враховуючи факт безперешкодного шляху глюкози до нейронів через GLUT-канали ендотелію та астроцитів, стає зрозумілим етіологія ушкодження нейронів продуктами глікації. Наші результат про достовірне двократне підвищення вмісту GLUT3 у пацієнтів з ПДР дають підставу вважати, що саме цей факт є критично важливим патогенетичним механізмом виникнення ДР. Підвищення вмісту GLUT3 у осіб із гіперглікемією, який навпаки мав би зменшуватися і бути перешкодою та/або регулятором надходження зайвої глюкози до нейронів, зокрема сітківки, визначає схильність нервової тканини до ушкодження. І це в черговий раз пояснює запропоновану майже 25 років тому теорію етіології ДР, яка постулювала, що індукована гіперглікемією продукція вільних радикалів кисню лежить в основі ушкодження сітківки [170].

Ми не очікували суттєвих змін у вмісті GLUT4 в плазмі обстежених, але передбачали кореляцію із їхнім індексом маси тіла. Оскільки він найбільше експресується в жировій тканині, скелетних м'язах, серці і є

чутливим до інсуліну. Він переноситься із внутрішньоклітинних компартментів у плазматичну мембрану у відповідь на позаклітинний інсулін. Після прийому їжі, багатої глюкозою, коли вміст глюкози в крові підвищується та індукується секреція інсуліну підшлунковою залозою, повинен включатися захисний механізм: прискорене через GLUT4 інсулінопосередковане поглинання глюкози адипоцитами та м'язовими клітинами має протидіяти підвищенню вмісту глюкози у крові [108]. Однак є думка, що цей регуляторний контур дефектний при ЦД2, оскільки чутливість рецепторів інсулінових у жирових і м'язових клітинах знижена [108].

Доведено, що GLUT4 експресується в нейронах, де він часто коекспресується з GLUT3 і бере участь у забезпеченні енергією головного мозку тварин для збудження нейронів. Було надано докази того, що підвищена потреба в енергії при активації нейронів під час фізичних вправ, інтелектуального навантаження або емоційного стресу сприяє експресії GLUT4 у плазматичну мембрану аксонів і цей процес знаходиться під контролем активованої протеїнкінази [27]. Ми виявили високу пряму кореляцію між транспортерами GLUT4 та GLUT3, але не виявили кореляційних зв'язків GLUT4 із стадією поглиблення ПДР.

Kumagai A.K. із співавторами (1994) вказують, що істотна частина (приблизно 50%) всього клітинного GLUT1 знаходиться у цитозольних сховищах ендотеліальної клітини і не контактує із поверхнею плазматичної мембрани [101]. Однак у відповідь на зовнішні подразники, такі як фактори росту, ці транспортери можуть швидко переміщатися до плазматичної мембрани, де беруть участь у опосередкуванні проникнення глюкози до клітини. Також дослідники продемонстрували локальне (на люменальній поверхні) 20-кратне підвищення вмісту GLUT1 у ретинальних ендотеліальних клітинах посмертних зразків сітківки 3 осіб із тривалим діабетом, але без клінічних ознак діабетичної ретинопатії.

В експериментах на щурах було показано, що 6-годинне голодування значно підвищувало вміст ендотеліального GLUT1 та нейронального GLUT3

у мембранних фракціях білків гіпоталамуса і не впливало на астроцитарну ізоформу GLUT1. Було висловлене припущення, що збільшення притоку глюкози в позаклітинну рідину та нейрони в наслідок підвищення експресії GLUT1 та GLUT3 є першою лінією захисту в початковій фазі метаболічних порушень у відповідь на харчову депривацію [60].

Протилежні дані отримали Knott R.M. та співавт. (1996), які за допомогою вимірювання мРНК, виявили посилення транскрипції GLUT1 та GLUT3 у відповідь на підвищені концентрації глюкози в культурах ендотеліальних клітин сітківки людини [97]. І вважають, що зміни транспорту глюкози в ендотелії внутрішнього гематоретинального бар'єра є підставою для розвитку мікросудинних уражень сітківки при тривалому цукровому діабеті.

Пізніше були пропоновані напрямки лікування ДР через зменшення глюкозотоксичного ушкодження сітківки фармакологічним або генетичним інгігуванням транспортерів [85], зокрема GLUT1 у нейронах сітківки, для запобігання цієї патології. Однак, незважаючи на спроби з'ясувати молекулярні та біохімічні механізми, пов'язані з дією окисного стресу та гіперглікемією на тлі ЦД2, шляхів запобігання ДР досі не досягнуто.

Також вкрай несподіваним для нас було відсутність достовірного коливання HIF-1 α і кореляції між ним і ступенем поглиблення ПДР за офтальмологічними критеріями (за рівнями ETDRS). Враховуючи доведений дослідниками вплив HIF-1 α на експресію VEGF, можна припустити, що поглиблення ПДР у цих пацієнтів не супроводжується інтенсивним ангиогенезом. Імовірно, такий механізм впливу на VEGF найбільш розвинутий на ранніх стадіях ДР або на стадії переходу із НПДР до ПДР. Але це лише наше припущення, яке потребує подальшого вивчення вказаних маркерів. У тому числі і на тваринних моделях із дослідженням локальних процесів у тканині сітківки, а не в загальному кровотоці.

Отже, незважаючи на численні спроби втрутитися в молекулярні та біохімічні шляхи, пов'язані з окисним стресом та гіперглікемією, запобігти

ДР досі не можливо. Тому дослідження механізмів надходження глюкози до сітківки, метаболізму глюкози та виникнення окисного ушкодження залишаються важливими галузями досліджень.

Проведене дослідження показало, що жирнокислотний склад клітинних мембран у пацієнтів на ПДР має суттєві відмінності відносно здорових осіб, але їх напрям не є ортодоксальним підвищенням насичених ЖК і зниженням ненасичених ЖК. У пацієнтів з ЦД2 достовірно підвищується лише вміст насиченої пальмітинової ЖК, знижується вміст ненасиченої лінолевої ЖК і такий стан не прогресує з часом. Також виявлено, що ступінь вживання прямих джерел вказаних ЖК у пацієнтів відрізняється у порівнянні із особами КГ. Ефект вживання харчових джерел у вигляді популярності серед пацієнтів на ЦД2 соняшникової олії багатой на лінолеву ЖК є практично протилежним тим змінам, які спостерігаються в складі мембрани. Також відмінність в групах ступеню вживання джерела олеїнової ЖК (оливкової олії у пацієнтів КГ та маргарину у пацієнтів 2-ї групи) не призводить до зміни вмісту вказаної ЖК в мембранах клітин.

Схожі результати описані в роботі Mahendran Y. зі спіавт. (2014) виявили, що підвищення пальмітолеїнової кислоти значно пов'язане зі зниженою секрецією інсуліну, тоді як лінолева кислота суттєво пов'язана із збільшенням секреції інсуліну [116]. Водночас, в роботі Bukowiecka-Matusiak M. зі спіавт. (2018) виявлене у пацієток із раннім гестаційним діабетом зниження в мембранах трьох насичених ЖК (міристинової, пальмітинової, стеаринової ЖК) при цьому в основному за рахунок стеаринової кислоти. Водночас вміст олеїнової ЖК та її цис-компоненту (C18:1 цис 11) було значно підвищено в мембранах еритроцитів групи пацієток у порівнянні із здоровими вагітними.

В роботі Castro-Correia C. зі спіавт. (2017) показали що у дітей, хворих на діабет вагомим маркером розвитку захворювання є більш високий рівень альфа-ліноленої жирної кислоти, ейкозапентаєнової та докозагексаєнової, а також моно- та поліненасичених ЖК [46]. Автори вважають, що ці дані є

підґрунтям до зміни харчування при лікуванні дітей, хворих на діабет. Інші дослідники виявили що розвиток ІР пов'язаний із високим рівнем стеаринової кислоти, пальмітолеїнової кислоти γ -ліноленової кислоти та низьким – лінолевої кислоти в сироватковому ефірі холестерину [104]. Вивчався механізм розвитку ІР через властивості ЖК мембрани [140]. Дослідники довели, що високий вміст пальмітинової кислоти призводить до ІР через зміни рівня фосфорилування рецептора інсуліну та субстрату рецептора інсуліну-1.

Дослідники єдині в думці про те, що поступове підвищення насичених ЖК плазми прямо пов'язане з розвитком діабету, а вживання продуктів, що містять харчовий насичений жир, може сприяти розвитку діабету [164, 166]. В експериментальних роботах дослідження молекулярних механізмів націлено на вивчення стану мембранних транспортерів, які з часом формують ІР. В роботі на тваринах, дослідники виявили, що раннє постнатальне перенасичення ЖК призвело до значного зниження рівня субстрату рецептора інсуліну-1 (Irs-1), протеїнкінази В (Akt2) і транспортеру глюкози 4 (Glut4) в епідермальному жирі щурів, що призводить до порушення сигнального шляху інсуліну у вісцеральній білій жировій тканині та скелетній мускулатурі і може відігравати головну роль в ІР [32].

Такі відмінності надають підставу вважати основним механізмом регуляції жирнокислотного стану в організмі ендогенні механізми, які забезпечують розподіл ЖК в клітині. Одним з головних регуляторів внутрішньоклітинного обміну ЖК є протеїн L-FABP, який підвищується у пацієнтів з ЦД2 та корелює із стадією захворювання.

Дослідження L-FABP в групі осіб без діабету, але з підвищеними рівнями глюкози крові та холестерину, виявили зменшений показник ІМТ, незначне підвищення ПНЖК в мембранах еритроцитів та рівень сироваткового L-FABP в 1,2 рази менший ніж у відносно здорових осіб ($P > 0,05$) і в 2 рази менший ніж у пацієнтів з ЦД2 ($P < 0,05$). Можна припустити, що за певних умов, при наявності метаболічних зсувів, саме

зменшення експресії L-FABP на тлі підвищення ПНЖК в клітинах запобігає розвитку ожиріння і діабету [127].

В роботах вітчизняних дослідників була вивчена роль L-FABP, як важливого учасника ліпідного обміну на тлі гіперглікемії у пацієнтів з ДР [41, 144]. Авторами була сформована концепція реалізації генетично детермінованих внутришньоклітинних L-FABP-залежних патофізіологічних механізмів ліпідного метаболізму, що обумовлюють прогресування ДР у пацієнтів із ЦД2 та різним *PPARG* генотипом. У носіїв Pro12Pro генотипу ДР, як ускладнення ЦД2, виникає в результаті хронічного запалення за рахунок *PPARG*-залежної транскрипції генів, експресії ферментів, що окислюють арахідонову ЖК, синтезу метаболітів, які впливають на стан ендотелію. У носіїв алелю 12A1a гальмується *PPARG*-залежна транскрипція генів, і ЖК утилізуються в клітині за рахунок впливу інших L-FABP механізмів, що призводить до активації прямого пероксисомного окиснення, виникненню оксидативного стресу та пошкодження ендотелію активними формами кисню.

Отже, наші дані отримані про ймовірно механізми впливу шаперону L-FABP у спроможність транспорту ЖК у клітину необхідно враховувати як для розробки ефективних схем корекції ліпідного метаболізму у хворих на ПДР, так і впливу ЦД2 на властивості клітинних мембран, які визначаються в значній мірі ЖК станом. Оскільки стан мембрани клітини визначає міжклітинну взаємодію/кооперацію для забезпечення внутрішньоклітинних сигналів, а стан мембрани еритроцитів є важливою умовою функціональної спроможності клітин і стану тканинного дихання.

У клінічній практиці вимірювання морфо-функціональних показників еритроцитів використовують для диференціальної діагностики анемії, а також для характеристики анемічного синдрому (стану). Це може бути транзисторне явище, але й може бути обумовлене органічними порушеннями.

У пацієнтів з ЦД2 еритроцити втрачають нормальну гнучкість

мембрани та деформабільність [87]. Але до сьогодні невідомі причини цього явища. При зміні внутрішнього середовища організму кількість нормальних еритроцитів, які мають природню форму двояковогнутого диска зменшується в міру поступового збільшення кількості деформованих еритроцитів, що ще більше збільшує ризик діабетичних ускладнень.

Важливим механізмом порушення структури мембрани вважається підсилення неферментативного глікозилювання мембранних та внутрішньоклітинних білків [36]. Перш за все це відбивається на функції гемоглобіну та його здібності віддавати кисень тканинам. Глікозилювання спектрину також призводить до незворотного порушення структурно-функціональних властивостей клітини, механічної стабільності клітин, зниження їх резистентності до механічних впливів [71].

Спостерігаючи за змінами функціональних властивостей та структури еритроцитів у діабетиків, можна краще зрозуміти механізми прогресування ПДР. Blaslov K. та співавт. (2019), показали, що як MCV, так і RDW були позитивно пов'язані з HbA1c і виникненням діабетичної ретинопатії [36]. Повідомляється також, що MCV є потенційним фактором ризику захворювання периферичних артерій і залежить від тяжкості захворювання; отже, його можна використовувати в якості предиктора макросудинних ускладнень діабету [99]. Це і було нашою нульовою гіпотезою. Однак, ми не виявили достовірної різниці вказаних параметрів у пацієнтів з ПДР у порівнянні із КГ, та у пацієнтів із різною тривалістю ЦД2.

Ми спостерігали тенденцію до зменшення RBC у пацієнтів з ПДР та достовірне зменшення вмісту гемоглобіну в еритроцитах пацієнтів. Вважаємо, це пов'язане із скороченням перебування клітин в кровотоці та передчасним порушенням клітин. Схожу картину дослідники описують під терміном - «еріптоз» [35]. Є дані, про скорочення тривалість життя еритроцитів пацієнтів з діабетом на 13% [136]. Гіперглікемія, підвищений осмос і ОС у пацієнтів з діабетом змінюють концентрацію заліза і білка всередині і поза еритроцитів, а потім активують шляхи еріптоза. У пацієнтів

з діабетом основні шляхи еріптоза включають обмін іонів кальцію, активацію факторів тромбоцитів і каспаз; які взаємодіють один з одним [35].

В роботах Lee S. зі співавт. (2015) показано, що у пацієнтів з ПДР зниження деформованості еритроцитів, яка обумовлена їх особливою динамічною формою і дозволяє забезпечувати ефективну перфузію, поглиблювало порушення мікроциркуляції [111]. Також дослідники виявили, що гіперглікемія підвищує осмотичну крихкість еритроцитів [129]. Це виявляється внаслідок окисних модифікацій мембранно зв'язаних білків у еритроцитах. Мембрана еритроцитів стає слабкою і не витримує навіть м'якого гіпотонічного стану, що призводить до підвищеної осмотичної крихкості. У хворих на ЦД2 із поганим контролем глікемії може бути ризиком розвитку анемії та супутніх ускладнень.

Ми також довели суттєве погіршення осмотичної та механічної резистентності еритроцитів у пацієнтів з ПДР, яке не було пов'язане із тривалістю ЦД2, але суттєво розрізняло функціональні властивості еритроцитів у пацієнтів в порівнянні із особами КГ. Такі спостереження визначають вагому роль несудинних патогенетичних механізмів у розвитку та поглибленні ретинопатії, та визначають напрямки та шляхи фармакологічної корекції мікроциркуляторних ускладнень на тлі ЦД2.

Таким чином, ми провели дослідження комплексу механізмів, які не лише дуже щільно пов'язані із загальними змінами в організмі пацієнта із ДЦ2, а обґрунтовано створюють усі умови для розвитку та поглибленню гіпоксії, оксидативно-нітрозативного стресу, порушення важливих метаболітів обмінів, сприяють розвитку ліпооксидації.

Ми вважаємо, що особлива цінність таких досліджень у доказовості ряду припущень, які на сьогодні існують в діабетології, ендокринології, офтальмології щодо потенційних механізмів ушкодження сітківки. Кожну задачу нашого дослідження ми формулювали для перевірки певної гіпотези, яку ми створювали на основі даних про сучасні патогенетичні ланки ПДР. Таким чином, ми отримували власні підтвердження або спростування

висловлених теорій, концепцій і гіпотез інших авторів.

Варто зазначити, що жодна із теорій розвитку та поглиблення ПДР на тлі ЦД2 сьогодні достеменно не сформована і чим глибше дослідники занурюються у вивчення молекулярних механізмів, генетичних схильностей або маркерів метаболоміки, то тим більше отримають нових плацдармів для дослідження. Здебільшого, такий погляд виникає через відсутність прямих кореляцій, однозначної, однакової форми реалізації механізмів ушкодження сітківки. Тому, пошук продовжується саме в напрямку персоналізації протікання тих чи інших процесів в залежності від комбінації ряду факторів майже у кожного пацієнта.

Ми зі свого боку мали на меті привернути увагу до нелокальних, не судинних механізмів, але вкрай важливих механізмів, які обов'язково реалізуються у пацієнтів із ЦД2 і створюють певні передумови ушкодженням нейронів сітківки і процесів проліферативного процесу у вигляді інтенсивного росту судин. Цей погляд розкриває значні практичні перспективи лікування пацієнтів, оскільки на основі отриманих фактів та вивчених закономірностей охарактеризовані нами несудинні механізми розвитку ПДР мають розглядатися як мішені для терапевтичних схем при веденні пацієнтів із ЦД2. Вказані патогенетичні ланки необхідно враховувати для прогнозування перебігу захворювання і розробці засобів профілактики прогресування ДР у пацієнтів із різною тривалістю ЦД2.

ВИСНОВКИ

1. Цукровий діабет є глобальною епідемією з високими показниками захворюваності та смертності. За прогнозами, до 2045 року кількість людей з діабетом у всьому світі досягне 629 мільйонів, що становитиме 10% світового населення. ДР – основне мікросудинне ускладнення діабету, є основною причиною сліпоти у дорослих працездатного віку. Дослідження нових патогенетичних чинників розвитку та прогресування ДР, а також на підставі цього розробка нових напрямків профілактики залишаються важливими питаннями сучасної офтальмології.

2. Виявлене підвищення вмісту аргінази-1 в крові у пацієнтів з ПДР та ЦД2 тривалістю понад 20 років. У носіїв алелю G гену CYP2E1 спостерігали достовірне коливання ферменту в залежності від стадії ПДР. При помірній стадії вміст аргінази-1 був вище в 2,6 разів ($p < 0,05$) ніж в КГ; на стадії прогресування з помірної до тяжкої, експресія аргінази-1 зменшувалася, була в 1,3 рази менше КГ і в 3,5 рази ($p < 0,05$) менше в групі помірної ПДР. У пацієнтів із прогресуючою стадією аргіназа-1 підвищувалася і була у 1,8 рази ($p < 0,05$) більше у порівнянні з тяжкою ПДР.

3. У пацієнтів з ПДР та ЦД2 виявлено двобічну кореляцію вмісту GLUT3 та глюкози крові ($r = 0,581$), глікованого гемоглобіну ($r = 0,553$), GLUT1 ($r = 0,440$), GLUT4 ($r = 0,372$). Підвищення вмісту GLUT3 у пацієнтів з ПДР не залежало від ступеня ушкодження сітківки, тривалості ЦД2 і концентрації глюкози, що визначало цей механізм транспорту до клітини, як основну патогенетичну ланку глюкозотоксичності в нейронах при хронічній гіперглікемії. Відсутність достовірного коливання вмісту транспортерів GLUT1 та GLUT4 у плазмі пацієнтів із різною стадією ПДР та тривалістю ЦД2 і осіб контрольної групи свідчило про генетично детерміновані механізми, спрямовані для базової підтримки гомеостазу і не залученими до виникнення мікросудинних ускладнень на тлі ЦД2. Вміст HIF-1 α у пацієнтів був вище на 25%, проте не відрізнявся в залежності від ступеню

прогресування ПДР та тривалості ЦД2.

4. Спектр основних ЖК в мембранах еритроцитів пацієнтів з ПДР не змінювався у залежності від тривалості ЦД2 і стадії ПДР. Спостерігалось достовірне підвищення в 1,6 разів вмісту насиченої пальмітинової ЖК, зниження в 1,6 разів вмісту ненасичених лінолевої і арахідонової ЖК відносно показників КГ. Збільшене у 2 рази вживання соняшникової олії, багатої на лінолеву ЖК, пацієнтами з ПДР було неефективним для встановлення балансу ЖК і супроводжувалося зниженням лінолевої ЖК, що свідчило про інший механізм дисбалансу ЖК в складі мембран еритроцитів, ніж аліментарний шлях. Концентрація L-FABP в сироватці крові у пацієнтів на ПДР була вище, ніж в групі здорових осіб і корелювала із тривалістю ЦД2, що визначало вплив шаперону L-FABP, як важливий механізм регуляції ліпідного обміну.

5. У пацієнтів з ПДР було виявлено зменшення вмісту гемоглобіну та залежних від нього розрахункових показників MCH та MCHC у порівнянні із КГ, але без залежності від тривалості ЦД2. Тенденція до зменшення еритроцитів у пацієнтів з ПДР була пов'язана із скороченням перебування клітин в кровотоці через передчасне руйнування мембрани. Осмотичний гемоліз еритроцитів у пацієнтів з ПДР був в 3-3,3 рази ($p < 0,05$) вище, ніж у осіб КГ, однак його ступінь не відрізнявся в залежності від тривалості ЦД2. Механічний гемоліз еритроцитів у пацієнтів з ПДР виникав в 2,6-3 разів інтенсивніше при центрифугуванні 2 хв та в 3-3,75 разів більше при центрифугуванні 4 хв, що було свідченням зменшення структурної стійкості клітин і втрати властивостей до механізмів ефективної перфузії, що неминуче поглиблювало порушення мікроциркуляції.

6. Несудинні механізми розвитку ПДР мають значний вклад у патогенез захворювання і мають розглядатися як мішені для терапевтичних схем при веденні пацієнтів із ЦД2. Надекспресія аргінази-1 у носіїв алелю G гену CYP2E1 визначає ланку окисдатовно-нітративного стресу, підвищення вмісту транспортера глюкози GLUT3 обґрунтовує

глюкотоксичність в нейронах, підвищення шаперону L-FABP в сироватці крові призводить до відсутності ефективної регуляції ліпідного обміну й дисбалансу ЖК через дієтичні та харчові рекомендації, підвищена хімічна та механічна ламкість еритроцитарних мембран створює умови гіпоксії та поглиблення мікроциркуляції. Вказані патогенетичні ланки необхідно враховувати для прогнозування перебігу захворювання і розробці засобів профілактики прогресування ДР у пацієнтів із різною тривалістю ЦД2.

7. Теоретичні здобутки, отримані в процесі виконання дисертації були впроваджені в навчальний процес кафедр: офтальмології та оптометрії післядипломної освіти Інституту післядипломної освіти Національного медичного університету, офтальмології ФПДО Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького МОЗ України, офтальмології Національного університету охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика МОЗ України, офтальмології Дніпровського національного медичного університету, оторингології та офтальмології Буковинського державного медичного університету, оториноларингології з офтальмологією Полтавського державного медичного університету. Практичні результати роботи були впроваджені в офтальмологічному відділенні КНП КОР «Київська обласна клінічна лікарня» (м. Київ), у відділенні мікрохірургії ока КНП СОР «Сумська обласна клінічна лікарня» (м. Суми), Медичному центрі ТОВ ОКТАР «Центр оптичної реабілітації ОКТАР» (м. Полтава), Національній дитячій спеціалізованій лікарні МОЗ України «ОХМАТДИТ» (м. Київ) та медичному центрі ПП «Світ Здоров'я» (м. Мукачеве).

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Розроблені і впроваджені в практику рекомендації щодо профілактики прогресування ДР при ЦД2.

1. При веденні пацієнтів із ПДР при ЦД2 варто враховувати підвищені ризики до ушкоджень тканин ока через оксидативно-нітрозативний стрес, ушкодження ендотеліальних клітин і призначати відповідну терапію. Найбільший ризик мають хворі-носії поліморфного варіанту *CYP2E1*, зокрема алелю G, які мають підвищену схильність до експресії аргінази-1.

2. У пацієнтів із ПДР при ЦД2 харчові рекомендації щодо вживання олій із певними компонентами жирних кислот не є достатньо ефективним шляхом впливу на розподіл ЖК в мембранах клітин, оскільки основний механізм ліпідних порушень визначається дизрегуляцією шаперону L-FABP, який визначає шляхи транспорту ЖК у клітину і вміст ЖК у мембранах.

3. У пацієнтів із ПДР при ЦД2 знижені показники осмотичної та механічної резистентності еритроцитів, що варто враховувати при оцінці гематологічних параметрів, характеристиці анемічного синдрому та призначенні фармакологічної корекції.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Біохімія: підручник [за загальною редакцією проф. А.Л. Загайка, проф. К.В. Александрової]. Х.: вид-во «Форт». 2014; 728 с.
2. Варивончик ДВ, Риков СО, Гудзь АС, Денисюк ЛІ. Наукове обґрунтування Національної стратегії боротьби зі сліпотою в Україні на період до 2030 року. Архів офтальмології України. 2015; 3(2):6-13.
3. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Вивчення факторів впливу на обмін жирних кислот у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету. Архів офтальмології України. 2020; 8(1):25-32. doi: 10.22141/2309-8147.8.1.2020.200733
4. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ, Прусак ОІ. Морфофункціональні та структурні зміни еритроцитів пацієнтів із проліферативною діабетичною ретинопатією та різною тривалістю цукрового діабету 2 типу. Офтальмологічний журнал. 2021; 5:21-7. doi: <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh202152127>
5. Ганюк ВМ. Вміст аргінази-1 у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію з різною тривалістю цукрового діабету залежно від генотипу CYP2E1. Архів офтальмології України. 2023; 11(1):6-11. doi: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.11.1.2023.311>
6. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Глюкозні транспортери сімейства GLUT у патогенезі проліферативної діабетичної ретинопатії у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу. Фізіологічний журнал. 2023; 69(3):31-8. doi: <https://doi.org/10.15407/fz69.03.031>
7. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ, Іванюта ЕП. Регуляція ліпідного метаболізму у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету. Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні питання офтальмології»; Вер 23-24 2020; телеміст Одеса-Тернопіль; 2020, 49-51.
8. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Сироватковий вміст аргінази-1 у пацієнтів на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю

цукрового діабету в залежності від генотипу CYP2E1. Науково-практична конференція з міжнародною участю Рефракційний пленер`20, Жовт 15-17 2020; Київ; 2020, 47-9.

9. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Вивчення осмотичної резистентності еритроцитів хворих з проліферативною діабетичною ретинопатією та різною тривалістю цукрового діабету. IX Науково-практична конференція дитячих офтальмологів та оптометристів України з міжнародною участю «Своє дитинство треба бачити`2021» Чер 10-12 2021, збірник праць / під редакцією професора С. О. Рикова. Бугаз Одеської області; 2021, 98-9.

10. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ, Зелінська МВ. Зв'язок рівня L-ФАВР у сироватці крові хворих з проліферативною діабетичною ретинопатією з різною тривалістю цукрового діабету в залежності від генотипу CYP2E1. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Філатовські читання-2021». Трав 20-21 2021. Одеса, "Чорномор'я".

11. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Вплив гіперглікемії на резистентність еритроцитів пацієнтів із проліферативною діабетичною ретинопатією на тлі цукрового діабету 2 типу. «Рефракційний пленер`21»: науково-практична конференція з міжнародною участю, Жовт 29-30 2021, збірник праць / під редакцією член-кореспондента НАМН України, професора С. О. Рикова. Київ; 2021.

12. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Вивчення вмісту глюкозних транспортерів у пацієнтів із проліферативною діабетичною ретинопатією на тлі цукрового діабету 2 типу. «Рефракційний пленер`2022»: науково-практична конференція з міжнародною участю, Жов 20-21 2022, збірник праць / за редакцією член-кореспондента НАМН України, професора С. О. Рикова. Київ; 2022, 102.

13. Єфіменко НВ, Сибірна НО. Вплив системи L-аргінін-NO на про- та антиоксидантну рівновагу в еритроцитах щурів за умов алкогольної інтоксикації. Фізіол. Журн. 2016; 62(4):77-83.

14. Завгородня НГ, Безугла ЕА. Порівняльна характеристика параметрів ексакації диска зорового нерва при різних гемодинамічних типах первинної

відкритокутової глаукоми. Архів офтальмології України. 2013; 1(1).

15. Ламазян ГР, Ситник ІМ, Натрус ЛВ, та ін. Дослідження механізмів антиоксидантного захисту плодів *Citrullus Colocynthis* та N-ацетилцистеїну на моделі цукрового діабету в щурів. Запоріж. Мед. Журнал. 2016; 5:69-77.

16. Петренко ОВ. Роль функціонального стану еритроцитів у патогенезі та розвитку діабетичної ретинопатії (огляд літератури) [Електронний ресурс] / О. В. Петренко, Л. В. Натрус, К. К. Таварткиладзе // Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика. - 2018. - Вип. 32. - С. 341-352. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Znpsnmapo_2018_32_31

17. Петренко ОВ, Натрус ЛВ., Таварткиладзе КК. Особливості вмісту жирних кислот у клітинах крові хворих на діабетичну ретинопатію. Архів офтальмології України, 2017 (5, № 3), 54-60.

18. Прудіус ПГ, Бондарчук НВ, Семенюк ІВ. Поширеність діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет 1-го типу Вінницької області. Международный Эндокринологический Журнал. 2007; 8(2). Режим доступу: <http://www.mif-ua.com/archive/article/1837>

19. Риков СО, Петренко ОВ, Ганюк ВМ, Натрус ЛВ. Вміст аргінази-1 у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету в залежності від генотипу CYP2E1. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Філатовські читання-2023». Трав 24-26 2023. Одеса; 2023, 90-1.

20. Тронько МД, Соколова ЛК, Власенко МВ, Костюкевич АА. Досягнення цілей лікування пацієнтами із цукровим діабетом в Україні. Результати Міжнародного дослідження з вивчення практики ведення цукрового діабету (IDMPS). Ендокринологія. 2015; 4(20):658-68.

21. Хуторська ЛА. Динаміка поширеності та ризик розвитку діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет. Международный Эндокринологический Журнал. 2013; 51(3). Режим доступу: <http://www.mif-ua.com/archive/article/36274>

22. Adebayo AA, Oboh G, Ademosun AO. Effect of dietary inclusion of almond fruit on sexual behavior, arginase activity, pro-inflammatory, and oxidative

stress markers in diabetic male rats. *Journal of Food Biochemistry*. 2021; 45(3):e13269. doi: 10.1111/jfbc.13269

23. Alan W, Stitta M, Curtisa T. The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2016; 51:156-86.

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

25. American Diabetes Association. Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. *Diabetes Care*. 2003; 26(1):51-61.

26. Arinç E, Arslan S, Bozcaarmutlu A, Adali O. Effects of diabetes on rabbit kidney and lung CYP2E1 and CYP2B4 expression and drug metabolism and potentiation of carcinogenic activity of N-nitrosodimethylamine in kidney and lung. *Food Chem Toxicol*. 2007; 45(1):107-18. doi: 10.1016/j.fct.2006.07.026

27. Ashrafi G, Wu Z, Farrell RJ, Ryan TA. GLUT4 mobilization supports energetic demands of active synapses. *Neuron*. 2017; 93:606-15.

28. Atshaves BP, Martin G, Hostetler HA, et al. Liver fatty acid binding protein and obesity. *J Nutr Biochem*. 2010; 21(11):1015-32.

29. Babu N. Influence of hypercholesterolemia on deformability and shape parameters of erythrocytes in hyperglycemic subjects. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2009; 41(3):169-77.

30. Badr GA, Tang J, Ismail-Beigi F, Kern TS. Diabetes downregulates GLUT1 expression in the retina and its microvessels but not in the cerebral cortex or its microvessels. *Diabetes*. 2000; 49:1016-21.

31. Barnard ND, Scialli AR, Turner-McGrievy G, et al. The effects of a low-fat, plant-based dietary intervention on body weight, metabolism, and insulin sensitivity. *Am J Med*. 2005; 118(9):991-7.

32. Bei F, Jia J, Jia YQ, et al. Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. *Lipids Health Dis*. 2015; 26(14):96. doi: 10.1186/s12944-015-0094-2

33. Benarous R, Sasongko MB, Qureshi S, et al. Differential association of serum lipids with diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol*

Vis Sci. 2011; 52(10):7464-69. doi: <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7598>

34. Bhatti JS, Sehrawat A, Mishra J, et al. Oxidative stress in the pathophysiology of type 2 diabetes and related complications: current therapeutics strategies and future perspectives. *Free Radical Biology and Medicine*. 2022; 184:114-34.

35. Bissinger R, Bhuyan AAM, Qadri SM, Lang F. Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases. *The FEBS Journal*. 2018; 286(5):826-54.

36. Blaslov K, Kruljac I, Mirošević G, et al. The prognostic value of red blood cell characteristics on diabetic retinopathy development and progression in type 2 diabetes mellitus. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2019; 71(4):475-81. doi: 10.3233/ch-180422

37. Boden G, Chen X, Iqbal N. Acute lowering of plasma fatty acids lowers basal insulin secretion in diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes*. 1998; 47(10):1609-12.

38. Brynes AE, Edwards CM, Jadhav A, et al. Diet-induced change in fatty acid composition of plasma triacylglycerols is not associated with change in glucagon-like peptide 1 or insulin sensitivity in people with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2000; 72:1111-8.

39. Borkman M, Storlien LH, Pan DA, Jenkins AB, Chisholm DJ, Campbell LV. The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids. *N Engl J Med*. 1993 Jan 28;328(4):238-44. doi: 10.1056/NEJM199301283280404. PMID: 8418404.

40. Buraczynska M, Zakrocka I. Arginase gene polymorphism increases risk of diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus patients. *J Clin Med*. 2021; 10(22):5407. doi: 10.3390/jcm10225407.

41. 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 European Scientific Journal, (Warsaw, Poland)*. 2019; 9(49/1): 19-25.

42. Byun H, Hillman TR, Higgins JM, Diez-Silva M, Peng Z, Dao M, Dasari

RR, Suresh S, Park Y. Optical measurement of biomechanical properties of individual erythrocytes from a sickle cell patient. *Acta Biomater.* 2012; 1/8(1):4130-8.

43. Caimi G, Presti R.L. Techniques to evaluate erythrocyte deformability in diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* 2004; 41(3):99-103.

44. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2006 ; 75(3):197-202.

45. Candiloros H, Muller S, Zeghari N, et al. Decreased erythrocyte membrane fluidity in poorly controlled IDDM: Influence of ketone bodies. *Diabetes Care.* 1995; 18(4):549-51.

46. Castro-Correia C, Sousa S, Norberto S, et al. The fatty acid profile in patients with newly diagnosed diabetes: why it could be unsuspected. *Int J Pediatr.* 2017; 2017:6424186. doi:10.1155/2017/6424186

47. Cetin EN, Bulgu Y, Ozdemir S, et al. Association of serum lipid levels with diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol.* 2013; 6(3):346-9. doi: 10.3980/j.issn.2222-3959.2013.03.17

48. Chakravarthy H, Navitskaya S, O'Reilly S. Role of acid sphingomyelinase in shifting the balance between proinflammatory and reparative bone marrow cells in diabetic retinopathy. *Stem Cells.* 2016; 34(4):972-83.

49. Chang HY, Li X, Karniadakis GE. Modeling of biomechanics and biorheology of red blood cells in type 2 diabetes mellitus. *Biophys J.* 2017; 113(2):481-90. doi: 10.1016/j.bpj.2017.06.015

50. Chen H, Zhang X, Liao N, Ji Y, Mi L, Gan Y, Su Y, Wen F. Decreased expression of Glucagon-like peptide-1 receptor and Sodium-glucose co-transporter 2 in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022; 17:13: 1020252. doi: 10.3389/fendo.2022.1020252

51. Chernobryvtsev OP. The endothelial dysfunction factors in diabetes mellitus 2 type. *Journal of Education, Health and Sport formely of Health Sciences.* 2019; 9(1):525-33.

52. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *The Lancet.* 2010; 376(9735):124-36. doi: 10.1016 / S0140-6736 (09) 62124-3

53. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD,

Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018; 138:271-81. doi: 10.1016/j.diabres.2018.02.023

54. Cho Young I, Michael P, Mooney BS, Cho Daniel J. Hemorheological disorders in diabetes mellitus. *J Diabetes Sci Technol.* 2008; 6(2):1130-8.

55. Choromańska B, Myśliwiec P, Dadan J, Hady HR, Chabowski A. The clinical significance of fatty acid binding proteins. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2011; 24;65:759-63.

56. Connor KM, Giovanni JP, Lofqvist C. Increased dietary intake of ω -3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med.* 2007; 13(7):868-73.

57. Cooper GM. *The cell. A molecular approach.* Sunderland: Boston Univ. 2nd ed. 2000; 739 p.

58. Costagliola C. Oxidative state of glutathione in red blood cells and plasma of diabetic patients: in vivo and in vitro study. *Clin. Physiol. Biochem.* 1990; 8(4):204-10.

59. Cundiff DK, Claudio RN. Diet and diabetic retinopathy: insights from the diabetes control and complications trial (DCCT). *Med Gen Med.* 2005; 7(1):3.

60. Dakic T, Jevdjovic T, Lakic I, et al. Food For Thought: short-term fasting upregulates glucose transporters in neurons and endothelial cells, but not in astrocytes. *Neurochem.* 2019; 44:388-99.

61. Davis M, Fisher M, Gangnon R, et al. Risk factors for high-risk proliferative diabetic retinopathy and severe visual loss: Early treatment diabetic retinopathy study report 18. *Investigative ophthalmology & visual science.* 1998; 39:233-52.

62. Deepali Singh, Archana Yadav, Chetna Singh. Autonomous regulation of inducible nitric oxide synthase and cytochrome P450 2E1-mediated oxidative stress in maneb- and paraquat-treated rat polymorphs. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 2021; 178:104944. doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104944

63. Dey D, Bhattacharya A, Roy S, Bhattacharya S. Fatty acid represses insulin receptor gene expression by impairing HMGA1 through protein kinase

Cepsilon. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007; 357(2):474-9.

64. Domingueti CP, Dusse LM, Carvalho M, de Sousa LP, Gomes KB, Fernandes AP. Diabetes mellitus: the linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. J Diabetes Complications. 2016; 30(4):738-45.

65. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs – an extension of the modified airleie house classification: ETDRS report № 10. Ophthalmology. 2020; 127(4S):99-119. doi: 10.1016/j.opthta.2020.01.030

66. Elms SC, Togue HA, Rajas M, Xu Z, Caldwell RW, Caldwell RB. The role of arginase 1 in diabetes-induced retinal vascular dysfunction in mouse and rat models of diabetes. Diabetologia. 2013; 56:654-62. doi: 10.1007/s00125-012-2789-5

67. Endo J, Arita M. Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. J Cardiol. 2016; 67(1):22-27.

68. Enriquez YR, Giri M, Rottiers R. Christophe Fatty acid composition of erythrocyte phospholipids is related to insulin levels, secretion and resistance in obese type 2 diabetics on Metformin. Clin. Chim. Acta. 2004; 346(2):145-152.

69. Epidemiology of diabetes interventions and complications research group, et al. Diabetes control and complications trial. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. N. Engl. J. Med. 2000; 342:381-9.

70. Esteves A, Ehrlich R. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2006; 142(3-4):262-74. doi:10.1016/j.cbpc.2005.11.006

71. Ferents IV, Brodyak IV, Lyuta MIa, et al. Effects of decarboxylated L-arginine on morphofunctional characteristics of the erythron in experimental diabetes mellitus in rats. Fiziol Zh. 2014; 60(4):70-9.

72. Fernandes R, Suzuki K, Kumagai AK. Inner blood-retinal barrier GLUT1 in long-term diabetic rats: an immunogold electron microscopic study. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44:3150-4.

73. Fernandes R, Carvalho AL, Kumagai A, Seica R, Hosoya K, Terasaki T,

Murta J, et al. Downregulation of retinal GLUT1 in diabetes by ubiquitinylation. *Mol Vis*. 2004; 10:618-28.

74. Ford J. Red blood cell morphology. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2013; 35(3):351-7.

75. Fuhrman BJ, Barba M, Krogh V, et al. Erythrocyte membrane phospholipid composition as a biomarker of dietary fat. *Ann Nutr Metab*. 2006; 50(2):95-102.

76. Gabbs M, Leng S, Devassy JG, et al. Advances in our understanding of oxylipins derived from dietary PUFAs. *Adv Nutr*. 2015; 15(6(5)):513-40.

77. Garnier M, Attali JR, Valensi P, et al. Erythrocyte deformability in diabetes and erythrocyte membrane lipid composition. *Metabolism*. 1990; 39(8):794-8.

78. Gellert S, Schuchardt JP, Hahn A. Low long chain omega-3 fatty acid status in middle-aged women. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2017; 117:54-9.

79. Grimaldi PA. Peroxisome proliferator-activated receptors as sensors of fatty acids and derivatives. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64(19-20):2459-64. doi: 10.1007/s00018-007-7278-5

80. Hammer SS, Busik JV. The Role of dyslipidemia in diabetic retinopathy. *Vision Res*. 2017; 139:228-36.

81. Hanyuk V, Petrenko O, Natrus L. Analysis of erythrocytes' parameters in patients with varying degrees of diabetic retinopathy. *Tbilisi International Ophthalmology Conference - TIOC 2020, abstract book, Dec 19-20 2020; Tbilisi, Georgia; 2020*, 46-7.

82. Harris WS, Luo J, Pottala JV, Margolis KL, Espeland MA, Robinsonet JG. Red blood cell fatty acids and incident diabetes mellitus in the women's health initiative memory study. *PLoS One*. 2016; 11(2): e0147894. doi: 10.1371/journal.pone.0147894

83. Hodge AM, English DR, O'Dea K, et al. Plasma phospholipid and dietary fatty acids as predictors of type 2 diabetes: interpreting the role of linoleic acid. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2007; 86(1):189-197.

84. Hodson L, Skeaff CM, Fielding BA. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog Lipid Res.* 2008; 47(5):348-80.
85. Holoman NC, Aiello JJ, Trobenter TD, et al. Reduction of Glut1 in the neural retina but not the RPE alleviates polyol accumulation and normalizes early characteristics of diabetic retinopathy. *J Neurosci.* 2021; 41(14):3275-99.
86. Hsieh YT, Tsai MJ, Tu ST, Hsieh MC. Association of abnormal renal profiles and proliferative diabetic retinopathy and diabetic macular edema in an asian population with type 2 diabetes. *JAMA Ophthalmol.* 2018; 136(1):68-74. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2017.5202
87. Hung-Yu Chang, Xuejin Li, George Em Karniadakis. Modeling of biomechanics and biorheology of red blood cells in type 2 diabetes mellitus. *Biophys J.* 2017; 113(2):481-90. doi: 10.1016/j.bpj.2017.06.015
88. Hussein J, Mostafa E, M. El-Waseef, et al. Effect of omega-3 fatty acids on erythrocyte membrane in diabetic rats. *Maced. J. Med. Sci.* 2011; 4(3):234-9.
89. Hussein JS. Cell membrane fatty acids and health. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2013; 5(3):38-46.
90. International diabetes federation annual report 2015. https://www.oedg.at/pdf/1606_IDF_Atlas_2015_UK.pdf
91. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2015.
92. Israr A, Smriti S, Ashutosh K., Brajesh KS, Vinod K, Amit KC, Dharendra S et al. Biochemical and molecular mechanism of N-acetyl cysteine and siymarin mediated protection against maneb and paraquat-induced hepatotoxicity in rats. *Chem Biol Interact.* 2013; 201(1-3):9-18. doi: 10.1016/j.cbi.2012.10.027
93. Kamada T, Yamashita T, Baba Y, et al. Dietary sardine oil increases erythrocyte membrane fluidity in diabetic patients. *Diabetes.* 1986; 35(5):604-11.
94. Kamat SG, RoyR. Evaluation of fish oils in amelioration of diabetes-induced tissue damages in mice (*Mus musculus*). *South Asian J Exp Biol.* 2015; 5(1):32-40.
95. Katanov D, Gompper G, Fedosov DA. Microvascular blood flow

resistance: Role of red blood cell migration and dispersion. *Microvasc Res.* 2015; 99:57-66.

96. Kenyeres P, Rabai M, Toth A, Kesmarky G, Marton Z, Alexy T, Toth K. Reviewing data reduction methods for ektacytometry. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2011; 47(2):143-50.

97. Knott RM, Robertson M, Muckersie E, Forrester JV. Regulation of glucose transporters (GLUT-1 and GLUT-3) in human retinal endothelial cells. *Biochem J.* 1996; 15(318):313-7.

98. Koehrer P, Saab S, Berdeaux O, Isaïco R, Grégoire S, Cabaret S, Bron AM, Creuzot-Garcher CP. Erythrocyte phospholipid and polyunsaturated fatty acid composition in diabetic retinopathy. *PLoS One.* 2014; 9(9):e106912. doi: 10.1371/journal.pone.0106912

99. Kor C-T, Hsieh Y-P, Chang C-C, Chiu P-F. The prognostic value of interaction between mean corpuscular volume and red cell distribution width in mortality in chronic kidney disease. *Scientific Reports.* 2018; 8(1):11870.

100. Kowluru RA, Zhong Q, Santos JM, Thandampallayam M, Putt D, Gierhart DL. Beneficial effects of the nutritional supplements on the development of diabetic retinopathy. *Nutr Metab (Lond).* 2022; 19(1):1. doi: 10.1186/s12986-021-00620-w

101. Kumagai AK, Glasgow BJ, Pardridge WM. GLUT1 glucose transporter expression in the diabetic and nondiabetic human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35:2887-94.

102. Kumagai AK, Vinorez SA, Pardridge WM. Pathological upregulation of inner blood-retinal barrier Glut1 glucose transporter expression in diabetes mellitus. *Brain Res.* 1996; 706:313-17.

103. Kung CM, Tseng ZL, Wang HL. Erythrocyte fragility increases with level of glycosylated hemoglobin in type 2 diabetic patients. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2009; 4(3(4)):345-51. doi: 10.3233/CH-2009-1245. PMID: 19996523

104. Kurotani K, Sato M, Ejima Y, et al. High levels of stearic acid, palmitoleic acid, and dihomo- γ -linolenic acid and low levels of linoleic acid in serum cholesterol ester are associated with high insulin resistance. *Nutr Res.* 2012;

32(9):669-75.

105. Lands B. Consequences of essential fatty acids. *Nutrients*. 2012; 4(9):1338-57.

106. Lange JR, Metzner C, Richter S, et al. Unbiased high-precision cell mechanical measurements with microconstrictions. *Biophys J*. 2017; 112(7):1472-80.

107. Larsson H, Persson SU, Hedner P. Changes in the functional state of the erythrocyte membrane: significance for red cell filterability and blood viscosity. *Scand J Clin Lab Invest*. 1990; 50(2):177-81.

108. Le HG, Shakoar A. Diabetic and Retinal Vascular Eye Disease. *Med Clin North Am*. 2021; 105(3):455-72.

109. Leão LL, Tangen G, Barca ML, Engedal K, Henrique S Santos, Machado FS, Paula AM, Monteiro-Junior RS. Does hyperglycemia downregulate glucose transporters in the brain? *Medical Hypotheses*. 2020; 139: 109614. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109614

110. Lee R, Wong TY, Sabanayagam C. Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss. *Eye Vision (London, England)*. 2015; 2:17.

111. Lee S, Lee MY, Nam JS, et al., Hemorheological approach for early detection of chronic kidney disease and diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabetes Technology & Therapeutics*. 2015; 17(11):808-15.

112. Li H, Liu X, Zhong H, Fang J, Li X, Shi R, Yu Q. Research progress on the pathogenesis of diabetic retinopathy. *BMC Ophthalmol*. 2023; 23(1):372. doi: 10.1186/s12886-023-03118-6

113. Li HY, Yuan Y, Fu YH, Wang Y, Gao XY. Hypoxia-inducible factor-1 α : A promising therapeutic target for vasculopathy in diabetic retinopathy. *Pharmacol Res*. 2020; 159:104924.

114. Lombardo YB, Chicco AG. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *J. Nutr. Biochem*. 2006; 17(1):1-13.

115. Lu L, Seidel CP, Iwase T, Stevens RK, Gong YY, Wang X, Hackett SF, Campochiaro PA. Suppression of GLUT1; a new strategy to prevent diabetic

complications. *J Cell Physiol.* 2013; 228(2):251-7. doi: 10.1002/jcp.24133

116. Mahendran Y, Ågren J, Uusitupa M, et al. Association of erythrocyte membrane fatty acids with changes in glycemia and risk of type 2 diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2014; 99(1): 79-85.

117. Malamas A, Chranioti A, Tsakalidis C, et al. The omega-3 and retinopathy of prematurity relationship. *Int J Ophthalmol.* 2017; 18(10(2)):300-5.

118. Malone JJ, Morrison AD, Pavan PR, Cuthbertson DD. Prevalence and significance of retinopathy in subjects with type 1 diabetes of less than 5 years' duration screened for the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care.* 2001; 24(3):522-6. doi:10.2337/diacare.24.3.522

119. Matthäus C, Lahmann I, Kunz S, et al. EHD2-mediated restriction of caveolar dynamics regulates cellular lipid uptake. *BIORXIV.* 2020; 511709. doi: <https://doi.org/10.1101/511709>

120. Michiels C. Physiological and pathological responses to hypoxia. *Amer. J. Pathol.* 2010; 162(5):1865-72.

121. Ming XF, Rajapakse AG, Yepuri G, et al. Arginase II promotes macrophage inflammatory responses through mitochondrial reactive oxygen species, contributing to insulin resistance and atherogenesis. *Journal of the American Heart Association.* 2012; 1(4): e000992. doi: 10.1161/JAHA.112.000992

122. Mizutani M, Kern TS, Lorenzi M. Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *J Clin Invest.* 1996; 12(97):15.

123. Mohammad Asif. The prevention and control the type-2 diabetes by changing lifestyle and dietary pattern. *J Educ Health Promot.* 2014; 3(1):Published online. doi: 10.4103/2277-9531.127541

124. Moura DS, Silva DC, Williams AJ, et al. Automatic real time evaluation of red blood cell elasticity by optical tweezers. *Rev Sci Instrum.* 2015; 86 (5):053702. doi: 10.1063/1.4919010.

125. Musielak M. Red blood cell-deformability measurement: review of techniques. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2009; 42(1):47-64.

126. Narayanan SP, Rojas M, Suwanpradid J, Toque HA, Caldwell W,

Caldwell RB. Arginase in retinopathy. *Prog. Retin. Eye Res.* 2013; 36:260-280. doi: 10.1016/j.preteyeres.2013.06.002

127. Natrus LV, Gayova LV, Byhovets MYu, Osadchuk YuS, Konovalov SE. The value of regulatory effects on lipid metabolism in during complicated diabetes mellitus. *Fiziologichnyi Zhurnal.* 2020; 66(1):25-34.

128. Odegaard AO, Jacobs DR, Sanchez OA, et al. Oxidative stress, inflammation, endothelial dysfunction and incidence of type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2016; 15:51. doi: 10.1186 / s12933-016-0369-6

129. Padmini H, Bhagwat K. Monitoring glycosylated haemoglobin and osmotic fragility with respect to blood glucose level in type II diabetes mellitus. *International Journal of Health Sciences & Research.* 2015; 5(4):171-4.

130. Palomino-Schätzlein M, Lamas-Domingo R, Ciudin A, et al. A translational in vivo and in vitro metabolomic study reveals altered metabolic pathways in red blood cells of type 2 diabetes. *Journal of Clinical Medicine.* 2020; 9(6):1619.

131. Pardridge WM, Boado RJ. Molecular cloning and regulation of gene expression of blood-brain barrier glucose transporter, in *The Blood-Brain Barrier. Cellular and Molecular Biology.* 1993; 395-440.

132. Patel PS, Sharp SJ, Jansen E, et al. Fatty acids measured in plasma and erythrocyte-membrane phospholipids and derived by food-frequency questionnaire and the risk of new-onset type 2 diabetes: a pilot study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk cohort. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2013; 98(1):255-8.

133. Peduzzi M, Mellim M, Fonda S, Codeluppi L, Guerrieri F. Comparative evaluation of blood viscosity in diabetic retinopathy. *Int Ophthalmol.* 1984; 1(7):15-9.

134. Peters KS, Rivera E, Warden C, Harlow PA, Mitchell SL, Calcutt MW, Samuels DC, Brantley MA. Plasma arginine and citrulline are elevated in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 2022; 235:154-62.

135. Petr M, Stastny P, Zajac A, et al. The role of peroxisome proliferator-activated receptors and their transcriptional coactivators gene variations in human trainability: a systematic review. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(5):1472.

doi:10.3390/ijms19051472

136. Qiang Y, Liu J, Du E. Dynamic fatigue measurement of human erythrocytes using dielectrophoresis. *Acta Biomater.* 2017 Jul 15;57:352-362. doi: 10.1016/j.actbio.2017.05.037. Epub 2017 May 17. PMID: 28526627.

137. Qadri SM, Bissinger R, Solh Z, and Oldenborg P-A. Eryptosis in health and disease: A paradigm shift towards understanding the (patho)physiological implications of programmed cell death of erythrocytes. *Blood Reviews.* 2017; 31(6):349-61.

138. Qiang Y, Liu J, Du E. Dynamic fatigue measurement of human erythrocytes using dielectrophoresis. *Acta Biomater.* 2017; 15:57:352-62. doi: 10.1016/j.actbio.2017.05.037

139. Ren Y, Li Z, Li W, Fan X, Han F, Huang Y, Yu Y, Qian L, Xiong Y. Arginase: Biological and therapeutic implications in diabetes mellitus and its complications. *Oxid Med Cell Longev.* 2022; 2022:2419412. doi: 10.1155/2022/2419412.

140. Reynoso R, Salgado LM, Calderón V. High levels of palmitic acid lead to insulin resistance due to changes in the level of phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1. *Mol Cell Biochem.* 2003; 246(1-2):155-62.

141. Rodrigues HG, Vinolo MA, Sato FT. Oral administration of linoleic acid induces new vessel formation and improves skin wound healing in diabetic rats. *PLoS One.* 2016; 20(11):10.

142. Romero MI, Platt DH, Tawfik HE, Labazi M, Remessy AB, Bartoli M, Caldwell R, Caldwell RW. Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circ. Res.* 2008; 102:95-102. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.155028

143. Rownak N, Akhter S, Khatun M, Baksh S, Rafiq S, Rahman M. Study of osmotic fragility status of red blood cell in type II diabetes mellitus patients. *Europ. J of Envir. and Public Health.* 2017; 1(2):06.

144. Rykov SO, Natrus LV, Bykhovets MIu. PPAR γ -mediated differences in energy substrate among T2DM patients differing in the stage of diabetic retinopathy. *J. Ophthalmol. (Ukraine).* 2019; 6:7-14. doi.org/10.31288/oftalmolzh20196714

145. SanGiovanni JP, Chew EY. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog Retin Eye Res.* 2005; 24(1):87-138.
146. Schuchardt JP, Schmidt S, Kressel G. Modulation of blood oxylipin levels by long-chain omega-3 fatty acid supplementation in hyper- and normolipidemic men. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2014; 90(2-3):27-37.
147. Schuchardt JP, Köbe T, Witte V. Genetic Variants of the FADS Gene cluster are associated with erythrocyte membrane LC PUFA levels in patients with mild cognitive impairment. *J Nutr Health Aging.* 2016; 20(6):611-20.
148. Seki R, Okamura T, Ide T, Kage M, Sata M, Uyesaka N, Maruyama T. Impaired filterability of erythrocytes from patients with chronic hepatitis C and effects of eicosapentaenoic acid on the filterability. *J. Physiol. Sci.* 2007; 57(1):43-9.
149. Sharma Y, Saxena S, Mishra A, et al. Nutrition for diabetic retinopathy: plummeting the inevitable threat of diabetic vision loss. *Eur J Nutr.* 2017; 1-15.
150. Shilova OG. Novyye aspekty patogeneza i lecheniya diabeticheskoy retinopatii. *International Journal of Endocrinology.* 2012; 4:44 [in Russia] <http://www.mif-ua.com/archive/article/30957>
151. Shima T, Taniguchi K, Tokumaru Y, Inomata Y, Arima J, Lee SW, Takabe K, Yoshida K, Uchiyama K. Glucose transporter-1 inhibition overcomes imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumor cells. *Oncol Rep.* 2022; 47(1):7.
152. Shin S, Ku Y, Babu N, Singh M. Chicco Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus. *Indian J Exp Biol.* 2007; 45(1):121-8.
153. Sumarriva K, Uppal K, Ma C, Herren DJ, Wang Y, Chocron IM, Warden C, et al. Arginine and carnitine metabolites are altered in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019; 60(8):3119-26. doi: 10.1167/iovs.19-27321.
154. Sun GY, Simonyi A, Fritsche KL, Chuang DY, Hannink M, Gu Z, Greenlief CM. Docosahexaenoic acid (DHA): An essential nutrient and a nutraceutical for brain health and diseases. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2017; 136:3-13. doi: 10.1016/j.plefa.2017.03.006
155. Sun Q, Ma J, Campos H, Hankinson SE, Hu FB. Comparison between plasma and erythrocyte fatty acid content as biomarkers of fatty acid intake in US

women. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86(1):74-81.

156. Sushil K Jain, Robert McVie, Duett J, Herbst J. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes.* 1989; 38(12):1539-43.

157. Tanner TC, Lux K. Spreading of red cell blood suspensions on paper as a simple test of cell deformability. *Acta Biol. Med. Germ.* 1981; 40(2):739-42.

158. Tatsumi K, Katsumoto Y, Fujiwara R, Nakabe K. Numerical and experimental study on the development of electric sensor as for measurement of red blood cell deformability in microchannels. *Sensors (Base).* 2012; 12(8):10566-83.

159. Tikhonenko M, Lydic TA, Opreanu M, et al. N-3 polyunsaturated Fatty acids prevent diabetic retinopathy by inhibition of retinal vascular damage and enhanced endothelial progenitor cell reparative function. *PLoS One.* 2013; 8(1): e55177. doi: 10.1371/journal.pone.0055177

160. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet.* 1998; 352:837-53.

161. Visaria J, Iyer NN, Raval A, Kong S, Hobbs T, Bouchard J, Kern DM, Willey V. Incidence and prevalence of microvascular and macrovascular diseases and all-cause mortality in type 2 diabetes mellitus: A 10-year study in a US commercially insured and Medicare Advantage population. *Clin. Ther.* 2019; 41:1522-36. doi: 10.1016/j.clinthera.2019.05.012.

162. Voeikov VL. Reactive oxygen species--(ROS) pathogens or sources of vital energy? Part 1. ROS in normal and pathologic physiology of living systems. *J Altern Complement Med.* 2006; 12(2):111-8.

163. Waheed NK. Atlas of Retinal. Proliferative Diabetic Retinopathy OCT: Optical Coherence Tomography. 2018. Available internet : <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/proliferative-diabetic-retinopathy>

164. Wang L, Folsom AR, Zheng ZJ. Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities

(ARIC) Study. *Am J Clin Nutr.* 2003; 78(1):91-8.

165. Wang S, Fang F, Jin WB, Wang X, Zheng DW. Assessment of serum arginase 1, as a type 2 diabetes mellitus diagnosis biomarker in patients. *Exp. Ther. Med.* 2014; 8:585-90. doi: 10.3892/etm.2014.1768

166. Wang W, Zhu J, Lyu F, et al. ω -3 polyunsaturated fatty acids-derived lipid metabolites on angiogenesis, inflammation and cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2014; 113-115:13-20.

167. Wang Y, Yang P, Yan Z, Liu Z, Ma Q, Zhang Z, Wang Y, Su Y. The Relationship between erythrocytes and diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Research.* 2021; 2021:6656062. doi: 10.1155/2021/6656062

168. Wang Z, Hall SD, Maya JF, et al. Diabetes mellitus increases the in vivo activity of cytochrome P450 2E1 in humans. *Br J Clin Pharmacol.* 2003; 55(1):77-85. doi:10.1046/j.1365-2125.2003.01731.x

169. Winocour PD, Bryszewska M, Watala C, et al. Reduced membrane fluidity in platelets from diabetic patients. *Diabetes.* 1990; 39(2):241-4.

170. Wu Y, Zou H. Research progress on mitochondrial dysfunction in diabetic retinopathy. *Antioxidants (Basel).* 2022; 15 (11(11)):2250.

171. www.diabeticretinopathy.org.uk

172. www.eastcarolinaretina.com // How A Healthy Diet Can Reduce Your Risk of Diabetic Retinopathy

173. www.moz.gov.ua

174. Yan J, Li B, Chen Y, Gu C, Dai G, Zhang Q, Zheng Z, et al. Prevalence and predictors of developing vision-threatening diabetic retinopathy within the first three years of type 2 diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023; 14:1305378. doi: 10.3389/fendo.2023.1305378

175. Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 2012; 35(3):556-64. doi: 10.2337/dc11-1909

176. You ZP, Zhang YL, Shi K, Shi L, Zhang YZ, Zhou Y, Wang CY. Suppression of diabetic retinopathy with GLUT1 siRNA. *Sci Rep.* 2017; 7(1):7437. doi: 10.1038/s41598-017-07942-x

177. Zhang D, Lv FL, Wang GH. Effects of HIF-1 α on diabetic retinopathy angiogenesis and VEGF expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018; 22(16):5071-6.
178. Zhang L, Tang J, Wang Y, Wang X, Wang F. Association of CYP7A1 and CYP2E1 Polymorphisms with Type 2 Diabetes in the Chinese Han Populations. *Pharmgenomics Pers Med*. 2022; 15:843-55.
179. Zhang Q, Li Z, Zhao S, et al. Analysis of red blood cells' dynamic status in a simulated blood circulation system using an ultrahigh-speed simultaneous framing optical electronic camera. *Cytometry A*. 2017; 91(2):126-32.
180. Zhou Z, Mahdi A, Tratsiakovich Y, et al. Erythrocytes from patients with type 2 diabetes induce endothelial dysfunction via arginase I. *Journal of the American College of Cardiology*. 2018; 72(7):769-80. doi: 10.1016/j.jacc.2018.05.052.

ДОДАТКИ

Додаток № 1. Акти впровадження результатів роботи в науковий обіг та практичну діяльність



ЗАТВЕРДЖУЮ

В.о. ректора Львівського національного
медичного університету
імені Данила Галицького

Орест ЧЕМЕРИС

2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Оптимізація та профілактика проліферативної діабетичної ретинопатії з різною тривалістю у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу.

2. Установа-розробник: кафедра офтальмології та оптометрії післядипломної освіти Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (бульвар Тараса Шевченка, 13, м. Київ, 01601).

3. Автори: Ганюк В.М., Гудзь А.С., Курильців Н.Б.

4. Джерело інформації:

1) Ганюк В.М., Петренко О.В., Натрус Л.В., Прусак О.І. «Морфо-функціональні та структурні зміни еритроцитів пацієнтів із проліферативною діабетичною ретинопатією та різною тривалістю цукрового діабету 2 типу», Офтальмологічний журнал. - 2021. - № 5. С. 21–27.

2). Ганюк В.М., Петренко О.В., Натрус Л.В. «Вивчення осмотичної резистентності еритроцитів хворих з проліферативною діабетичною ретинопатією та різною тривалістю цукрового діабету», IX Науково-практична конференція дитячих офтальмологів та оптометристів України з міжнародною участю «Своє дитинство треба бачити 2021» 10-12.06.2021 С. 98-99.

3) Ганюк В.М., Петренко О.В., Натрус Л.В., Іванюта Е.П. «Регуляція ліпідного метаболізму у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету», «Актуальні питання офтальмології», 2020. С. 49–51.

4) Ганюк В.М., Петренко О.В., Натрус Л.В. Вивчення факторів впливу на обмін жирних кислот у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету. Архів офтальмології України. - 2020. - Том 8, № 1. - С. 25-32. DOI: 10.22141/2309-8147.8.1.2020.200733

5. Де і коли впроваджено: при викладанні на кафедрі офтальмології ФПДО ЛНМУ імені Данила Галицького.

6. Пропозиції: рекомендовано для подальшого використання у процесі викладання офтальмології в умовах медичних навчальних закладів.

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

Андрій ГУДЗЬ

Продовження додатку 1



«Затверджую»

Перший проректор
Національного університету
охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика
член-кореспондент НАМН України,
д. мед. н., професор Вдовиченко Ю.П.

Акт впровадження

1. **Пропозиція для впровадження:** Оптимізація та профілактика проліферативної діабетичної ретинопатії з різною тривалістю у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу.
2. **Установа-розробник, автори:** кафедра офтальмології Національного університету охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика МОЗ України (вул. Дорогожицька, 9; м. Київ, 04112).
3. **Джерело інформації:** 1) Ганюк В.М., Петренко О.В., Натрус Л.В., Прусак О.І. «Морфофункціональні та структурні зміни еритроцитів пацієнтів із проліферативною діабетичною ретинопатією та різною тривалістю цукрового діабету 2 типу», *Офтальмологічний журнал*. - 2021. - № 5. С. 21–27; 2) Ганюк В.М., Петренко О.В., Натрус Л.В. «Вивчення осмотичної резистентності еритроцитів хворих з проліферативною діабетичною ретинопатією та різною тривалістю цукрового діабету», IX Науково-практична конференція дитячих офтальмологів та оптометристів України з міжнародною участю «Своє дитинство треба бачити 2021» 10-12.06.2021 С. 98-99; 3) Ганюк В.М., Петренко О.В., Натрус Л.В., Іванюта Е.П. «Регуляція ліпідного метаболізму у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету», «Актуальні питання офтальмології», 2020. С. 49–51. 4) Ганюк В.М., Петренко О.В., Натрус Л.В. Вивчення факторів впливу на обмін жирних кислот у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету. *Архів офтальмології України*. - 2020. - Том 8, № 1. - С. 25-32. DOI: 10.22141/2309-8147.8.1.2020.200733
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Національний університет охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика, МОЗ України (вул. Дорогожицька, 9; м. Київ, 04112).
5. **Форми впровадження:** матеріали застосовуються при викладанні на кафедрі офтальмології НУОЗ України імені П.Л. Шупика та в клінічній практиці закладу.
6. **Термін впровадження:** 2023р.
7. **Зауваження та пропозиції:** Зауважень немає. Рекомендовано для застосування процесі викладання офтальмології в умовах медичних навчальних закладів та в клінічній практиці.

Завідувач кафедри офтальмології
НУОЗ України імені П.Л. Шупика
Член-кор. НАМН України,
д. мед. н., професор

С. О. Риков

Продовження додатку 1

«Затверджую»

Генеральний директор
КНП КОР «Київська обласна клінічна лікарня»

Клюзко І.В.



Акт впровадження

1. Пропозиція для впровадження: Оптимізація прогнозування та профілактики діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет 2 типу.
2. Установа-розробник, автори: кафедра офтальмології Національного університету охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика МОЗ України (вул. Дорогожицька, 9; м. Київ, 04112).
3. Джерело інформації:
 Ганюк В.М., Петренко О.В., Натрус Л.В. Вивчення факторів впливу на обмін жирних кислот у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету. Архів офтальмології України. - 2020. - Том 8, № 1. - С. 25-32. DOI: 10.22141/2309-8147.8.1.2020.200733
 Ганюк В. М., Петренко О. В., Натрус Л. В., Прусак О. І. Морфо-функціональні та структурні зміни еритроцитів пацієнтів із проліферативною діабетичною ретинопатією та різною тривалістю цукрового діабету 2 типу. Офтальмологічний журнал. – 2021. – №5. – С. 21-27. DOI: <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh202152127>
 Ганюк В.М., Петренко О.В., Натрус Л.В., Зелінська М.В. Зв'язок рівня L-FABP у сироватці крові хворих з проліферативною діабетичною ретинопатією з різною тривалістю цукрового діабету в залежності від генотипу CYP2E1/ Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Філатовські читання-2021». 20-21 травня 2021. – Одеса, "Чорномор'я". – 380 с
 Ганюк В.М., Петренко О.В., Л. В., Натрус Л.В. Вплив гіперглікемії на резистентність еритроцитів пацієнтів із проліферативною діабетичною ретинопатією на тлі цукрового діабету 2 типу «РЕФРАКЦІЙНИЙ ПЛЕНЕР'21»: науково-практична конференція з міжнародною участю 29-30 жовтня 2021 року: збірник праць / під редакцією член-кореспондента НАМН України, професора С. О. Рикова // Київ. – 2021. –133с.
4. Базова установа, яка проводить впровадження: КНП КОР «Київська обласна клінічна лікарня», м. Київ
5. Форми впровадження: матеріали застосовуються в клінічній практиці закладу.
6. Термін впровадження: 2023р.
7. Зауваження та пропозиції: Зауважень немає. Рекомендовано для застосування в клінічній практиці.

Зав. відділення офтальмології

Герасімова Т.П.

Продовження додатку 1

«Затверджую»
директор КНП СОР «Сумська обласна клінічна лікарня»
к. мед. н. Горох В. В.
«1» лютого 2023р.



Акт впровадження

1. Пропозиція для впровадження: Оптимізація прогнозування та профілактика діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет 2 типу.

2. Установа-розробник, автори: кафедра офтальмології Національного університету охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика МОЗ України (вул. Дорогожицька, 9; м. Київ, 04112).

3. Джерело інформації:

Ганюк В.М., Петренко О.В., Натрус Л.В. Вивчення факторів впливу на обмін жирних кислот у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету. Архів офтальмології України. - 2020. - Том 8, № 1. - С. 25-32. DOI: 10.22141/2309-8147.8.1.2020.200733

Ганюк В. М., Петренко О. В., Натрус Л. В., Прусак О. І. Морфо-функціональні та структурні зміни еритроцитів пацієнтів із проліферативною діабетичною ретинопатією та різною тривалістю цукрового діабету 2 типу. Офтальмологічний журнал. – 2021. – №5. – С. 21-27. DOI: <http://doi.org/10.31288/ofthalmolzh202152127>

Ганюк В.М., Петренко О.В., Натрус Л.В., Зелінська М.В. Зв'язок рівня L-FABP у сироватці крові хворих з проліферативною діабетичною ретинопатією з різною тривалістю цукрового діабету в залежності від генотипу CYP2E1/ Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Філатовські читання-2021». 20-21 травня 2021. – Одеса, «Чорномор'я». – 380 с

Ганюк В.М., Петренко О.В., Л. В., Натрус Л.В. Вплив гіперглікемії на резистентність еритроцитів пацієнтів із проліферативною діабетичною ретинопатією на тлі цукрового діабету 2 типу «РЕФРАКЦІЙНИЙ ПЛЕНЕР'21»: науково-практична конференція з міжнародною участю 29-30 жовтня 2021 року: збірник праць / під редакцією член-кореспондента НАМН України, професора С. О. Рикова // Київ. – 2021. – 133с.

4. Базова установа, яка проводить впровадження: КНП СОР «Сумська обласна клінічна лікарня», м. Суми

5. Форми впровадження: матеріали застосовуються в клінічній практиці закладу.

6. Термін впровадження: 2023р.

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

Зав. відділенням мікрохірургії ока



к.м.н. Грицай Л. В.

Продовження додатку 1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ПП «Світ Здоров'я»

Дуфинець В.А.

«27» березня 2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Пропозиція для впровадження: Оптимізація профілактики прогресування діабетичної ретинопатії при цукровому діабеті 2 типу.

Установа – розробник, автор: Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України (бульвар Тараса Шевченка, 13 м. Київ, 01601), автор – Ганюк Вероніка Миколаївна.

Джерело інформації: Ганюк В.М. Вміст аргінази-1 у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію з різною тривалістю цукрового діабету залежно від генотипу CYP2E1. Архів офтальмології України. 2023;11(1):6-11. doi:<https://doi.org/10.22141/2309-8147.11.1.2023.311>.

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

Форми впровадження: матеріали використовуються в лікувально-діагностичній роботі.

Термін впровадження: січень 2023 – березень 2024 року.

Зачепок та пропозиції: впровадження дозволить підвищити ефективність діагностики пацієнтів з діабетичною ретинопатією при цукровому діабеті 2 типу, дозволить зробити обґрунтований вибір тактики лікування пацієнтів з діабетичною ретинопатією при цукровому діабеті 2 типу, попередити ускладнення, підвищити результати лікування пацієнтів з діабетичною ретинопатією при цукровому діабеті 2 типу та допомогти у виборі подальшої тактики диспансерного нагляду за хворими із захворюваннями сітківки, скловидного тіла та зорового нерва.

Відповідальний за впровадження:

Лікар офтальмолог вищої кваліфікаційної категорії

В. В. Тихомирова

Продовження додатку 1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

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



2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Пропозиція для впровадження: Оптимізація профілактики прогресування діабетичної ретинопатії при цукровому діабеті 2 типу.

Установа – розробник, автор: Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України (бульвар Тараса Шевченка, 13 м. Київ, 01601), автор – Ганюк Вероніка Миколаївна.

Джерело інформації: Ганюк В.М. Вміст аргінази-1 у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію з різною тривалістю цукрового діабету залежно від генотипу CYP2E1. Архів офтальмології України. 2023;11(1):6-11. doi:<https://doi.org/10.22141/2309-8147.11.1.2023.311>.

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

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 №1 засідання кафедри офтальмології та оптометрії післядипломної освіти від 10.01.2024 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 оптометристів.

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

Сергій РИКОВ

Продовження додатку 1

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



2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1.Пропозиція для впровадження: Оптимізація профілактики прогресування діабетичної ретинопатії при цукровому діабеті 2 типу.

2.Установа – розробник, автор: Національний медичний університет імені О.О.Богомольця МОЗ України (бульвар Тараса Шевченка,13 м.Київ, 01601), автор – Ганюк Вероніка Миколаївна.

3.Джерело інформації: Ганюк В.М. Вміст аргінази-1 у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію з різною тривалістю цукрового діабету залежно від генотипу CYP2E1. Архів офтальмології України. 2023;11(1):6-11. doi:<https://doi.org/10.22141/2309-8147.11.1.2023.311>.

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 2023-2024 навчального року.

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 1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

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



2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Пропозиція для впровадження: Оптимізація профілактики прогресування діабетичної ретинопатії при цукровому діабеті 2 типу.

Установа – розробник, автор: Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України (бульвар Тараса Шевченка, 13 м. Київ, 01601), автор – Ганюк Вероніка Миколаївна.

Джерело інформації: Ганюк В.М. Вміст аргінази-1 у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію з різною тривалістю цукрового діабету залежно від генотипу CYP2E1. Архів офтальмології України. 2023;11(1):6-11. doi:<https://doi.org/10.22141/2309-8147.11.1.2023.311>.

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 2023-2024 навчального року, 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 1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

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

«12» 01 2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Пропозиція для впровадження: Оптимізація профілактики прогресування діабетичної ретинопатії при цукровому діабеті 2 типу.

Установа – розробник, автор: Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України (бульвар Тараса Шевченка, 13 м. Київ, 01601), автор – Ганюк Вероніка Миколаївна.

Джерело інформації: Ганюк В.М. Вміст аргінази-1 у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію з різною тривалістю цукрового діабету залежно від генотипу CYP2E1. Архів офтальмології України. 2023;11(1):6-11. doi:https://doi.org/10.22141/2309-8147.11.1.2023.311.

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: впродовж 2023-2024 навчального року, протокол №13 засідання кафедри дитячої хірургії, отоларингології та офтальмології від 21.02.2024 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



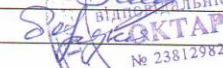
М. А. Карлійчук

Продовження додатку 1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор Медичного центру ТОВ ОКТАР
«Центр оптичної реабілітації ОКТАР»

І. А. Рассулова

«07»  2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Пропозиція для впровадження: Оптимізація профілактики прогресування діабетичної ретинопатії при цукровому діабеті 2 типу.

Установа – розробник, автор: Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України (бульвар Тараса Шевченка, 13 м. Київ, 01601), автор – Ганюк Вероніка Миколаївна.

Джерело інформації: Ганюк В.М. Вміст аргінази-1 у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію з різною тривалістю цукрового діабету залежно від генотипу CYP2E1. Архів офтальмології України. 2023;11(1):6-11. doi:https://doi.org/10.22141/2309-8147.11.1.2023.311.

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 при цукровому діабеті 2 типу, дозволить зробити обґрунтований вибір тактики лікування пацієнтів з діабетичною ретинопатією при цукровому діабеті 2 типу, попередити ускладнення, підвищити результати лікування пацієнтів з діабетичною ретинопатією при цукровому діабеті 2 типу та допомогти у виборі подальшої тактики диспансерного нагляду за хворими із захворюваннями сітківки, скловидного тіла та зорового нерва.

Відповідальний за впровадження:

Лікар офтальмолог вищої
кваліфікаційної категорії



О. В. Крючко

Продовження додатку 1



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: Оптимізація профілактики прогресування діабетичної ретинопатії при цукровому діабеті 2 типу.

Установа – розробник, автор: Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України (бульвар Тараса Шевченка, 13 м. Київ, 01601), автор – Ганюк Вероніка Миколаївна.

Джерело інформації: Ганюк В.М. Вміст аргінази-1 у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію з різною тривалістю цукрового діабету залежно від генотипу CYP2E1. Архів офтальмології України. 2023;11(1):6-11. doi:<https://doi.org/10.22141/2309-8147.11.1.2023.311>.

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 діабетичною ретинопатією при цукровому діабеті 2 типу, дозволить зробити обґрунтований вибір тактики лікування пацієнтів з діабетичною ретинопатією при цукровому діабеті 2 типу, попередити ускладнення, підвищити результати лікування пацієнтів з діабетичною ретинопатією при цукровому діабеті 2 типу та допомогти у виборі подальшої

Продовження додатку 1

тактики диспансерного нагляду за хворими із захворюваннями сітківки, скловидного тіла та зорового нерва.

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

Юрій БАРИНОВ

Медичний директор

Сергій ЧЕРНИШУК



Додаток № 2. Список публікацій здобувача за темою дисертації

Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:

1. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Вивчення факторів впливу на обмін жирних кислот у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету. Архів офтальмології України. 2020; 8(1):25-32. doi: 10.22141/2309-8147.8.1.2020.200733

2. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ, Прусак ОІ. Морфофункціональні та структурні зміни еритроцитів пацієнтів із проліферативною діабетичною ретинопатією та різною тривалістю цукрового діабету 2 типу. Офтальмологічний журнал. 2021; 5:21-7. doi: <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh202152127>

3. Ганюк ВМ. Вміст аргінази-1 у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію з різною тривалістю цукрового діабету залежно від генотипу CYP2E1. Архів офтальмології України. 2023; 11(1):6-11. doi: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.11.1.2023.311>

4. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Глюкозні транспортери сімейства GLUT у патогенезі проліферативної діабетичної ретинопатії у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу. Фізіологічний журнал. 2023; 69(3):31-8. doi: <https://doi.org/10.15407/fz69.03.031>

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

5. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ, Іванюта ЕП. Регуляція ліпідного метаболізму у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету. Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні питання офтальмології»; Вер 23-24 2020; телеміст Одеса-Тернопіль; 2020, 49-51. *(форма участі: публікація тез, усна доповідь)*

6. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Сироватковий вміст аргінази-1 у пацієнтів на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету в залежності від генотипу CYP2E1. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Рефракційний пленер`20», Жовт 15-17 2020; Київ; 2020, 47-9. *(форма участі: публікація тез, усна*

доповідь)

7. Hanyuk V, Petrenko O, Natrus L. Analysis of erythrocytes' parameters in patients with varying degrees of diabetic retinopathy. Tbilisi International Ophthalmology Conference - TIOC 2020, abstract book, Dec 19-20 2020; Tbilisi, Georgia; 2020, 46-7. *(форма участі: публікація тез)*

8. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Вивчення осмотичної резистентності еритроцитів хворих з проліферативною діабетичною ретинопатією та різною тривалістю цукрового діабету. IX Науково-практична конференція дитячих офтальмологів та оптометристів України з міжнародною участю «Своє дитинство треба бачити`2021» Чер 10-12 2021, збірник праць / під редакцією професора С. О. Рикова. Бугаз Одеської області; 2021, 98-9. *(форма участі: публікація тез, стендова доповідь)*

9. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ, Зелінська МВ. Зв'язок рівня L-FABP у сироватці крові хворих з проліферативною діабетичною ретинопатією з різною тривалістю цукрового діабету в залежності від генотипу CYP2E1. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Філатовські читання-2021». Трав 20-21 2021. Одеса, «Чорномор'я». *(форма участі: публікація тез, усна доповідь)*

10. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Вплив гіперглікемії на резистентність еритроцитів пацієнтів із проліферативною діабетичною ретинопатією на тлі цукрового діабету 2 типу. «Рефракційний пленер`21»: науково-практична конференція з міжнародною участю, Жовт 29-30 2021, збірник праць / під редакцією член-кореспондента НАМН України, професора С. О. Рикова. Київ; 2021. *(форма участі: публікація тез, стендова доповідь)*

11. Петренко ОВ, Прусак ОІ, Ганюк ВМ. Профілактика антибіотикорезистентності при лікуванні кон'юнктивітів в умовах пандемії COVID-19. Матеріали XVIII з'їзду всеукраїнського лікарського товариства та історико-термінологічної конференції ВУЛТ. Лист 5-6 2021. Українські Медичні Вісті. 2022; 14(1-2(90-91)):63-4. *(форма участі: публікація тез)*

12. Петренко ОВ, Прусак ОІ, Ганюк ВМ. Дитяча травма ока воєнного часу. «Своє дитинство треба бачити`22»: науково-практична конференція дитячих офтальмологів та оптометристів України з міжнародною участю Чер 11 2022, збірник праць / під редакцією професора С. О. Рикова. Київ; 2022. *(форма участі: публікація тез)*

13. Ганюк ВМ, Петренко ОВ, Натрус ЛВ. Вивчення вмісту глюкозних транспортерів у пацієнтів із проліферативною діабетичною ретинопатією на тлі цукрового діабету 2 типу. «Рефракційний пленер`2022»: науково-практична конференція з міжнародною участю, Жов 20-21 2022, збірник праць / за редакцією член-кореспондента НАМН України, професора С. О. Рикова. Київ; 2022, 102. *(форма участі: публікація тез, стендова доповідь)*

14. Риков СО, Петренко ОВ, Ганюк ВМ, Натрус ЛВ. Вміст аргінази-1 у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію із різною тривалістю цукрового діабету в залежності від генотипу CYP2E1. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Філатовські читання-2023». Трав 24-26 2023. Одеса; 2023, 90-1. *(форма участі: публікація тез, усна доповідь)*

Додаток №3. Апробації дисертації

Основні положення дисертаційної роботи були викладені й обговорені на:

- Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання офтальмології» (2020, телеміст Одеса-Тернопіль);
- науково-практичній конференції з міжнародною участю «Рефракційний пленер`20» (2020, Київ);
- Тбіліській міжнародній офтальмологічній конференції «Tbilisi International Ophthalmology Conference – ТІОС 2020» (2020, Тбілісі, Грузія);
- науково-практичній конференції з міжнародною участю «Рефракційний пленер`21» (2021, Київ);
- ІХ Науково-практичній конференції дитячих офтальмологів та оптометристів України з міжнародною участю «Своє дитинство треба бачити`2021» (2021, Бугаз);
- науково-практичній конференції з міжнародною участю «Філатовські читання-2021» (2021, Одеса);
- ХVІІІ З'їзді всеукраїнського лікарського товариства та історико-термінологічної конференції ВУЛТ (2021, он лайн формат);
- науково-практичній конференції з міжнародною участю «Рефракційний пленер`22» (2022, Київ);
- Х Науково-практичній конференції дитячих офтальмологів та оптометристів України з міжнародною участю «Своє дитинство треба бачити`2022» (2022, Київ);
- науково-практичній конференції з міжнародною участю «Філатовські читання-2023» (2023, Одеса).