

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN TUẤN THANH HẢO

**NGHIÊN CỨU NỒNG ĐỘ  
YẾU TỐ TĂNG SINH TÂN MẠCH TRONG  
THỦY DỊCH TRƯỚC VÀ SAU TIÊM NỘI NHÃN  
BEVACIZUMAB Ở BỆNH VĨNG MẠC ĐÁI THÁO ĐƯỜNG**

Chuyên ngành : Nhãn khoa

Mã số : 62720157

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI – 2019

**CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH  
TẠI TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

Người hướng dẫn khoa học:

**PGS.TS. Phạm Trọng Văn**

**Phản biện 1: PGS.TS. Hoàng Năng Trọng**

**Phản biện 2: PGS.TS. Nguyễn Văn Đàm**

**Phản biện 3: PGS.TS. Trần Văn Khánh**

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp

Trường tại: Trường Đại học Y Hà Nội.

*Vào hồi giờ ngày tháng năm*

**Có thể tìm hiểu luận án tại:**

- Thư viện Quốc gia
- Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội

## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH VÀ BÀI BÁO LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ĐÃ CÔNG BỐ

1. Nguyễn Tuấn Thanh Hào, Nguyễn Quốc Đạt, Phạm Trọng Văn, Vũ Tuấn Anh (2018). Nồng độ yếu tố tăng sinh tân mạch trong thủy dịch ở bệnh VMĐTĐ và ảnh hưởng của liệu pháp Bevacizumab, *Tạp chí Nghiên cứu y học*, 112 (3), 60 - 67.
2. Nguyễn Tuấn Thanh Hào, Phạm Trọng Văn, Vũ Tuấn Anh (2018). Nồng độ yếu tố tăng sinh tân mạch trong thủy dịch trước và sau tiêm Bevacizumab nội nhãn điều trị phù hoàng điểm do đái tháo đường, *Tạp chí Nghiên cứu y học*, 114 (5), 25 - 33.
3. Nguyễn Tuấn Thanh Hào, Phạm Trọng Văn, Vũ Tuấn Anh (2019). Nồng độ yếu tố tăng sinh tân mạch trong thủy dịch trước và sau tiêm Bevacizumab nội nhãn điều trị bệnh VMĐTĐ tăng sinh, *Tạp chí y học Việt Nam*, số 1(2), 147 – 151.

## GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

### 1. Đặt vấn đề:

Bệnh võng mạc đái tháo đường (VMĐTĐ) là nguyên nhân gây mù hàng đầu ở bệnh ĐTĐ. Bệnh là đa yếu tố và có cơ chế bệnh sinh rất phức tạp. Việc tập trung vào bản chất phân tử của bệnh và nhiều yếu tố sinh hóa để giải thích cơ chế bệnh sinh đã được đề xuất. Các nghiên cứu nhãn khoa những năm gần đây tập trung vào vai trò của VEGF, chìa khóa quan trọng giải thích nhiều cơ chế bệnh sinh của các bệnh lý võng mạc. Cho đến nay mục tiêu nhắm vào VEGF đã trở thành chiến lược điều trị trong bệnh VMĐTĐ. Bevacizumab (Avastin, Genentech Inc.) là một trong những thuốc kháng VEGF được sử dụng rất hiệu quả, an toàn cho nhiều bệnh lý mạch máu võng mạc trong đó có bệnh VMĐTĐ. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh tiêm nội nhãn Bevacizumab làm giảm nồng độ VEGF nội nhãn nhờ đó gây thoái triển tân mạch và giảm rò rỉ dịch trong bệnh VMĐTĐ. Việc xác định liều lượng thuốc kháng VEGF dựa trên nồng độ VEGF đã được nhiều tác giả trên thế giới đề cập đến như một giải pháp hợp lý. Mối tương quan giữa nồng độ VEGF trong thủy dịch với những đặc điểm của bệnh có thể góp phần giúp xác định liều lượng thuốc tiêm riêng cho từng trường hợp bệnh cụ thể. Kiến thức về những yếu tố thay đổi trong từng bệnh nhân khi điều trị thuốc kháng VEGF sẽ giúp có chiến lược điều trị tối ưu nhất. Trên thế giới, đã có nhiều nghiên cứu về nồng độ VEGF nội nhãn ở bệnh VMĐTĐ. Các nghiên cứu cho thấy tiêm Bevacizumab nội nhãn làm giảm đáng kể nồng độ VEGF trong thủy dịch ở bệnh VMĐTĐ và có sự liên quan giữa nồng độ VEGF nội nhãn với tình trạng bệnh VMĐTĐ. Ở Việt Nam, tiêm nội nhãn thuốc kháng VEGF đã được sử dụng nhiều và đã có một số nghiên cứu về hiệu quả lâm sàng của Bevacizumab trong điều trị bệnh lý mạch máu võng mạc. Tuy nhiên, vẫn chưa có nghiên cứu liên quan đến VEGF trong bệnh lý võng mạc, đặc biệt là bệnh VMĐTĐ. Do đó chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài này nhằm hai mục tiêu:

- So sánh nồng độ yếu tố tăng sinh tân mạch trong thủy dịch

trước và sau tiêm nội nhân Bevacizumab ở bệnh VMĐTĐ

- Tìm hiểu mối liên quan giữa nồng độ yếu tố tăng sinh tân mạch với đặc điểm lâm sàng của bệnh.

## 2. Những đóng góp mới của luận án:

- Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam cập nhật quan điểm mới về vai trò quan trọng của VEGF trong cơ chế sinh bệnh học ở mức phân tử và đã trở thành mục tiêu điều trị chiến lược của bệnh VMĐTĐ.

- Nghiên cứu đã xác định được cụ thể mức nồng độ VEGF trước và sau tiêm nội nhân Bevacizumab ở bệnh VMĐTĐ có so sánh với ở nhóm chứng và đã xác định được mối liên quan giữa nồng độ VEGF với đặc điểm lâm sàng của bệnh VMĐTĐ.

- Từ kết quả của nghiên cứu làm cơ sở để mở ra nhiều hướng nghiên cứu tiếp góp phần cùng những nghiên cứu khác trên thế giới nhằm làm sáng tỏ cơ chế sinh bệnh học còn chưa được hiểu rõ hết của bệnh và xác định liều lượng thuốc kháng VEGF nội nhân dựa trên nồng độ VEGF nội nhân để đạt được kết quả điều trị tối ưu nhất..

## 3. Bố cục của luận án:

Luận án có 114 trang, gồm Đặt vấn đề (2 trang), 4 chương: Chương 1: Tổng quan (31 trang), Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu (17 trang), Chương 3: Kết quả nghiên cứu (29 trang), Chương 4: Bàn luận (31 trang), Kết luận (2 trang),

Ngoài ra còn có 149 tài liệu tham khảo, trong đó có 7 tài liệu tiếng Việt, 142 tài liệu tiếng Anh, 5 phụ lục, 23 bảng, 25 biểu đồ, 18 hình ảnh minh họa.

### Chương 1 TỔNG QUAN

#### 1.1. SƠ LƯỢC VỀ BỆNH VÔNG MẠC ĐÁI THÁO ĐƯỜNG

Bệnh VMĐTĐ là biến chứng vi mạch phổ biến nhất, ảnh hưởng 30-50% bệnh nhân ĐTĐ. Bệnh gây ra bởi những thay đổi vi mạch máu do đường máu cao là yếu tố chính trong bệnh sinh của bệnh VMĐTĐ. Một số nghiên cứu sinh học phân tử của bệnh

và một vài yếu tố sinh hóa hơn là tăng đường máu để giải thích cơ chế bệnh sinh của bệnh đã được đề xuất. Các cơ chế này nói đến quá trình chuyển hóa tế bào và giải phóng cytokine, trong đó VEGF là đặc trưng nhất vì vai trò của nó trong quá trình tạo mạch, gây tăng tính thấm mạch máu. Rối loạn vi mạch máu xảy ra có thể dẫn đến hai hiện tượng: tăng tính thấm mạch máu và phá hủy mạch máu, điều này dẫn đến hai hệ quả tương ứng là phù hoàng điểm và tân mạch võng mạc. VEGF được biết như một yếu tố sinh bệnh học chủ yếu gây phá vỡ hàng rào máu võng mạc và phát sinh tân mạch, hai cơ chế bệnh sinh chính của phù hoàng điểm ĐTĐ và bệnh VMĐTĐ tăng sinh. Tăng sinh tế bào nội mô và tân mạch là do thiếu máu võng mạc dẫn đến giải phóng VEGF. VEGF có tác dụng khu trú và tỏa lan qua dịch kính tới các vùng võng mạc khác, gai thị, mỏng mắt, góc tiền phòng và tạo tân mạch ở các vùng này. Tân mạch luôn đi kèm các tế bào xơ và tế bào đệm phát triển. Tăng sinh xơ mạch tiến triển gây co kéo, xuất huyết dịch kính, bong võng mạc co kéo.

#### 1.2. TỔNG QUAN YẾU TỐ TĂNG SINH TÂN MẠCH

VEGF là một phân tử gây hoạt hóa quá trình hình thành các mạch máu. Trong điều kiện sinh lý bình thường, VEGF có chức năng hình thành các mạch máu mới. VEGF còn đảm nhận kích thích các tế bào nội mô mạch máu phát triển, tồn tại và tăng sinh. Tác động qua trung gian yếu tố VEGF quan trọng nhất trong cơ chế sinh bệnh học của bệnh VMĐTĐ là phá vỡ hàng rào máu võng mạc và sinh tân mạch.

##### 1.2.1. Phá vỡ hàng rào máu võng mạc- phù hoàng điểm

Nguyên nhân chính gây ra phù hoàng điểm là do mất tính liên tục của hàng rào máu võng mạc. Hàng rào máu võng mạc được tạo bởi hai thành phần chính: hàng rào máu trong và hàng rào máu ngoài, cả hai đều liên quan đến bệnh sinh của phù hoàng điểm ĐTĐ. Nhiều yếu tố vận mạch đóng vai trò quan trọng trong việc làm suy giảm giải phẫu và chức năng của hàng rào máu võng mạc. VEGF làm tăng cường rò rỉ và tăng tính thấm mạch máu bằng cách làm đứt gãy phức hợp liên kết chặt chẽ giữa tế bào nội mô võng mạc và làm tích tụ ngoại bào.

### **1.2.2. Thiếu máu và tân mạch võng mạc- bệnh VMĐTĐ tăng sinh**

Tắc nghẽn mạch máu gây ra thiếu máu võng mạc và dẫn đến hình thành tân mạch võng mạc. Tắc nghẽn và thiếu máu được gây ra bởi nhiều cơ chế phức tạp. VEGF đóng vai trò kích hoạt quá trình này. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng VEGF tăng lên trong dịch kính ở bệnh nhân ĐTĐ và nồng độ này có thể giảm đi sau khi quang đông toàn võng mạc. Từ đặc tính gián phân, VEGF có những đặc tính khác góp phần sinh tân mạch. VEGF gây tăng tiết enzyme thủy phân cầu nối của serine, hoạt hóa plasminogen. Những ảnh hưởng này rất thuận lợi cho sự thủy phân protein của màng đáy, đây là bước đầu tiên trong tiến trình sinh mạch dẫn đến bệnh VMĐTĐ tăng sinh.

### **1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VỀ NỒNG ĐỘ VEGF NỘI NHÃN**

#### **1.3.1. Nồng độ VEGF nội nhãn ở người bình thường**

Nghiên cứu của Kim và cs (1999) nhận thấy VEGF, và những thụ thể của VEGF là VEGFR-1 và VEGFR-2 cấu thành hiện diện ở mô mạch máu của mắt người bình thường. Sự hiện diện đồng thời của cả tế bào nguồn và tế bào đích của VEGF đã cho thấy VEGF có thể ảnh hưởng lớn trong sự duy trì tính toàn vẹn của võng mạc và chức năng của võng mạc. Do đó vai trò sinh lý của VEGF nên được cân nhắc khi sử dụng những liệu pháp kháng VEGF. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã được tiến hành nhằm xác định nồng độ VEGF nội nhãn ở người bình thường không có bệnh lý mạch máu võng mạc. Kết quả cho thấy nồng độ VEGF nội nhãn ở người bình thường thấp hơn nhiều so với ở những bệnh nhân có bệnh lý mạch máu võng mạc. Trong điều kiện sinh lý bình thường, VEGF có ở người bình thường với nồng độ thấp.

#### **1.3.2. Nồng độ VEGF nội nhãn ở bệnh VMĐTĐ và ảnh hưởng của liệu pháp kháng VEGF nội nhãn**

Nồng độ VEGF trong thủy dịch ở bệnh VMĐTĐ giảm đáng kể sau tiêm Bevacizumab nội nhãn do đó gây thoái triển tân mạch võng mạc trong bệnh VMĐTĐ tăng sinh và giảm rò rỉ dịch trong phù hoàng điểm ĐTĐ. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã được tiến

hành nhằm xác định nồng độ VEGF nội nhãn ở bệnh VMĐTĐ trước và sau tiêm nội nhãn Bevacizumab. Kết quả cho thấy nồng độ VEGF nội nhãn ở bệnh VMĐTĐ giảm đáng kể sau tiêm Bevacizumab nội nhãn. Ở cả 2 nhóm bệnh VMĐTĐ có chỉ định tiêm Bevacizumab là phù hoàng điểm và bệnh VMĐTĐ tăng sinh, nồng độ VEGF sau tiêm đều giảm xuống rõ rệt so với trước tiêm.

Nghiên cứu của Funk và cs (2010) nhận thấy nồng độ VEGF trong thủy dịch trên những mắt bệnh phù hoàng điểm do ĐTĐ sau tiêm giảm xuống gấp gần 20 lần so với trước tiêm nội nhãn Bevacizumab. Nghiên cứu của Cancariniva và cs (2014) nhận thấy nồng độ VEGF trong thủy dịch ở 33 mắt bệnh VMĐTĐ tăng sinh giảm rõ rệt sau tiêm nội nhãn Bevacizumab. Những kết quả nghiên cứu đã đề xuất rằng VEGF bị chặn bởi Bevacizumab và gây giảm nồng độ VEGF tự do trong thủy dịch. Việc xác định liều lượng thuốc kháng VEGF dựa trên nồng độ VEGF đã được nhiều tác giả trên thế giới đề cập đến. Nghiên cứu của Takayuki Hattori và cs (2010) tiếp cận phương pháp dò liều dựa trên nồng độ VEGF nội nhãn như sau: Kết quả nồng độ VEGF trong dịch kính đo được trước tiêm Bevacizumab là từ 221 pg/l đến 7960 pg/l. Vì vậy tác giả tính liều Bevacizumab cần để chặn lại VEGF trong dịch kính ở nồng độ 10.000 pg/ml. Giả sử thể tích dịch kính là khoảng 4 ml, trọng lượng phân tử VEGF là 38 kDa, như vậy tổng số VEGF hiện diện trong dịch kính tính được là  $1,1 \times 10^{-12}$  mol. Bởi vì 1 phân tử Bevacizumab gắn kết được với 2 phân tử VEGF, trọng lượng phân tử của Bevacizumab là 150 kDa, nên tổng lượng Bevacizumab cần để chặn VEGF trong dịch kính tính ra được là 83 ng, đây là lượng thuốc tối thiểu. Theo Takayuki có thể xác định chính xác được liều Bevacizumab dựa vào nồng độ VEGF trong dịch kính. Tuy nhiên để đo nồng độ VEGF nội nhãn, việc lấy mẫu thủy dịch là dễ và an toàn hơn nhiều so với lấy mẫu dịch kính. Cũng đã có nhiều nghiên cứu cho thấy có sự tương quan giữa nồng độ VEGF trong dịch kính và thủy dịch. Do vậy với cách tiếp cận này chúng ta có thể đưa ra được liều cụ thể riêng cho từng trường hợp lâm sàng nhằm đạt được hiệu quả điều trị tối ưu. Vấn đề này sẽ còn được tiếp tục nghiên cứu trong những nghiên cứu xa hơn.

### 1.3.3. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF nội nhãn với đặc điểm lâm sàng của bệnh VMĐTĐ

VEGF có tính hòa tan được do đó có thể đo được trong khoang thủy dịch như một dấu hiệu chỉ điểm cho sự tăng VEGF của võng mạc. Một số nghiên cứu đã được tiến hành để đo nồng độ VEGF trong thủy dịch như một phương tiện để tiên lượng nguy cơ phù hoàng điểm do ĐTĐ hay phù hoàng điểm dạng nang sau phẫu thuật ở bệnh nhân ĐTĐ. Funatsu và cs (2002) nghiên cứu nhận thấy nồng độ VEGF trong thủy dịch có tương quan đáng kể với mức độ nặng của phù hoàng điểm dựa trên kết quả soi đáy mắt và chụp mạch huỳnh quang. Nghiên cứu đã báo cáo nồng độ VEGF trong thủy dịch tăng cao ở bệnh nhân phù hoàng điểm ĐTĐ và mức nồng độ VEGF thủy dịch có tương quan với mức độ trầm trọng của tình trạng phù hoàng điểm theo mức độ tăng huỳnh quang vùng hoàng điểm. Nghiên cứu của Moosang Kim và cs (2015) nhận thấy mức độ VEGF trong thủy dịch không khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 3 nhóm phù hoàng điểm do ĐTĐ theo phân loại hình thái học trên OCT. Sinh bệnh học của phù hoàng điểm dạng bong võng mạc thanh dịch có liên quan với prostaglandin hoặc những cytokine gây viêm và VEGF, vì vậy Bevacizumab có hiệu quả ít hơn đối với dạng phù này bởi vì nó chỉ ức chế VEGF. Shimura và cs (2008) đã báo cáo nếu thêm Triamcinolone để ức chế cả prostaglandin và những cytokine khác thì sẽ có kết quả điều trị tốt hơn chỉ điều trị kháng VEGF đối với dạng phù này. Trong điều kiện bình thường, có sự cân bằng giữa các yếu tố kích thích và ức chế hình thành tân mạch. Khi BVMTĐTĐ tăng sinh xảy ra, sự cân bằng này nghiêng về phía các yếu tố kích thích tân mạch như một cố gắng để tăng cường cung cấp máu. Nồng độ cao của VEGF trong thủy dịch tương quan có ý nghĩa thống kê với nồng độ VEGF trong dịch kính, và nồng độ VEGF trong dịch kính có tương quan với mức độ nặng của bệnh VMĐTĐ và mức độ tiến triển của bệnh VMĐTĐ tăng sinh. Mối tương quan giữa nồng độ VEGF trong thủy dịch với những yếu tố khác của bệnh có thể góp phần giúp xác định liều lượng thuốc tiêm riêng cho từng trường hợp bệnh cụ thể. Hiểu biết tốt hơn về những yếu tố thay đổi trong từng bệnh nhân sẽ giúp có chiến lược

điều trị tối ưu nhất [3]. Với việc sử dụng rộng rãi Bevacizumab trên toàn cầu, cần xác định nồng độ VEGF trong các mô khác nhau để cho khuyến cáo tin cậy tối ưu về liều lượng thuốc lý tưởng.

## Chương 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu được tiến hành tại Bệnh viện Mắt Đà Nẵng từ tháng 01 năm 2016 đến tháng 05 năm 2018

##### 2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn

*Nhóm bệnh:* Bệnh nhân được chẩn đoán xác định bệnh VMĐTĐ có chỉ định tiêm Bevacizumab nội nhãn: Phù hoàng điểm ĐTĐ có ý nghĩa lâm sàng; Bệnh VMĐTĐ tăng sinh. Bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu.

*Nhóm chứng:* Bệnh nhân mổ đục thủy tinh thể, không có bệnh VMĐTĐ hay bệnh lý khác ở mắt. Bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu.

##### 2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

Bệnh nhân có tiền sử bệnh tim mạch hay đột quỵ, dị ứng với Bevacizumab; có nhiễm trùng cấp tính tại mắt, có bệnh lý khác kèm theo tại mắt; có tân mạch mỏng mắt hay glôcôm tân mạch; đã tiêm các thuốc nội nhãn như Triamcinolone, thuốc ức chế VEGF, đã laser võng mạc, đã phẫu thuật nội nhãn trong vòng 3 tháng trước khi nghiên cứu.

#### 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

##### 2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả lâm sàng có nhóm chứng.

##### 2.2.2. Cơ mẫu nghiên cứu

$$n = Z^2_{(\alpha,\beta)} \frac{\partial_1^2 + \partial_2^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

Trong đó  $Z_{(\alpha,\beta)}$  là hệ số tin cậy ở mức độ xác suất  $\alpha = 0,05$ ;  $\beta = 0,1$

Tính ra cỡ mẫu nhóm bệnh  $n = 41$  mắt. Nghiên cứu chọn 60 mắt của 38 bệnh nhân với đủ tiêu chuẩn lựa chọn đưa vào nghiên cứu.

Tính ra cỡ mẫu nghiên cứu nhóm chứng  $n = 9$  mắt. Nghiên cứu chọn 15 mắt của 15 bệnh nhân đủ tiêu chuẩn lựa chọn đưa vào nghiên cứu.

**Cách chọn mẫu:** Tất cả những bệnh nhân thỏa mãn điều kiện trên và lấy lần lượt đủ số lượng.

### **2.2.3. Trang thiết bị sử dụng trong nghiên cứu**

#### **2.2.4. Quy trình nghiên cứu**

##### **2.2.4.1. Khám bệnh nhân trước tiêm**

- Hỏi bệnh.
- Khám và điều trị nội khoa, nội tiết.
- Khám lâm sàng.
- Chụp ảnh màu võng mạc theo 7 trường tiêu chuẩn của ETDRS.

- Chụp mạch huỳnh quang:

+Xác định mức độ tăng huỳnh quang vùng hoàng điểm.

+Xác định diện tích vùng võng mạc thiếu máu, diện tích vùng tân mạch võng mạc và gai thị nhờ chức năng đo diện tích vùng của phần mềm Adobe. Hình ảnh chụp được trên máy CMHQ được chuyển vào phần mềm Adobe. Tổng diện tích vùng võng mạc thiếu máu, vùng tân mạch võng mạc và gai thị trong 7 trường tiêu chuẩn của ETDRS được tính theo đơn vị pixel, sau đó được quy đổi sang diện tích đĩa thị

- Chụp OCT:

+Dùng chương trình 3D scan, Radial scan, để đánh giá độ dày võng mạc trung tâm hoàng điểm, thể tích hoàng điểm và hình thái phù hoàng điểm. Bản đồ võng mạc đường kính 6 mm quanh trung tâm chia thành 9 vùng với dữ liệu đi kèm.

+Định lượng mức độ phù hoàng điểm bằng chỉ số độ dày võng mạc trung tâm đường kính 1mm trung tâm hoàng điểm, thể tích hoàng điểm.

+Xác định hình thái phù hoàng điểm.

- *Siêu âm mắt:* đánh giá tình trạng tổn thương dịch kính võng mạc gồm bong dịch kính sau, xuất huyết dịch kính, tăng sinh xơ, bong võng mạc co kéo.

##### **2.2.4.2. Quy trình lấy mẫu bệnh phẩm thủy dịch**

- Thời điểm lấy bệnh phẩm:

+Nhóm bệnh:

▪ Trước khi bắt đầu tiến hành tiêm nội nhãn Bevacizumab.

▪ Sau khi tiêm nội nhãn Bevacizumab 1 tuần.

+ Nhóm chứng: Ngay trước khi tiến hành phẫu thuật đục TTT.

- Quy trình lấy mẫu:

+Giải thích cho bệnh nhân.

+Nhỏ thuốc tê bề mặt nhãn cầu bằng Alcain 1 %. Sát trùng mắt bằng dung dịch Povidine 5 %. Đặt vành mi.

+Dùng bơm tiêm 1 ml và kim tiêm 30 G chọc tiền phòng rút ra 0,1 – 0,2 ml thủy dịch không pha loãng. Mẫu thủy dịch được chứa trong ống eppendorf và được bảo quản ở ngăn đông lạnh  $-80^{\circ}\text{C}$  cho đến khi được phân tích.

+Trước và sau thủ thuật dùng kháng sinh nhỏ mắt Vigamox.

##### **2.2.4.3. Quy trình tiêm nội nhãn Bevacizumab**

- Giải thích cho bệnh nhân.

- Nhỏ thuốc tê bề mặt nhãn cầu bằng Alcain 1 %. Sát trùng mắt bằng dung dịch Povidine 5 %. Đặt vành mi.

- Dùng bơm tiêm 1 ml và kim tiêm 30 G tiêm 1,25 mg/ 0,1ml Bevacizumab (Avastin) vào buồng dịch kính qua pars plana cách rìa từ 3,5 – 4 mm, dùng tấm bông vô trùng ấn nhẹ lên chỗ tiêm để tránh trào ngược.

- Trước và sau thủ thuật dùng kháng sinh nhỏ mắt Vigamox.

*Theo dõi bệnh nhân :* Bệnh nhân được theo dõi ngay sau tiêm. Ghi nhận các biến chứng tại mắt và toàn thân có thể xảy ra.

##### **2.2.4.4. Định lượng nồng độ yếu tố VEGF trong thủy dịch**

- Nguyên lý: Định lượng VEGF sử dụng kỹ thuật miễn dịch ELISA sandwich. Kháng thể đơn dòng đặc hiệu với VEGF của người được gắn lên pha rắn. Bất kỳ phân tử VEGF nào có trong mẫu chuẩn và mẫu thử sẽ gắn lên kháng thể đơn dòng trên pha rắn. Sau bước rửa, mọi thành phần không liên kết sẽ được loại bỏ.

Kháng thể đa dòng gắn men đặc hiệu với VEGF được thêm vào giếng. Sau khi rửa sạch các thành phần không liên kết, cơ chất tạo màu được thêm vào. Dung dịch acid sulfuric được thêm vào để dừng phản ứng tạo màu của enzym và cơ chất. Cường độ màu tỷ lệ thuận với nồng độ VEGF có trong mẫu.

+Hóa chất: Hóa chất xét nghiệm: Quantikine Human VEGF ELISA Kit, mã số DVE00. Hóa chất kiểm tra chất lượng: Quantikine Immunoassay Control, mã số QC01-1, hãng R&D System Inc, Minneapolis, Minneosta, USA.

### **2.2.5. Các biến số nghiên cứu và tiêu chí đánh giá**

#### **2.2.5.1. Đánh giá đặc điểm bệnh nhân theo tình trạng toàn thân**

- Tuổi chia làm 3 nhóm: < 40 tuổi; 40- 60 tuổi; >60 tuổi.
- Giới: nam hoặc nữ
- Loại ĐTĐ: Loại 1; Loại 2.
- Thời gian mắc bệnh ĐTĐ được chia các nhóm: < 5 năm; 5-10 năm; 10-15 năm; > 15 năm.
- Glucose huyết lúc đói được chia thành 3 mức độ:  $\leq 7$  mmol/l;  $7 - 10$  mmol/l;  $> 10$  mmol/l.
- Nồng độ HbA1C được chia thành 2 mức độ: Tốt:  $\leq 7$  %; Kém:  $>7$  %

#### **2.2.5.2. Đánh giá đặc điểm bệnh nhân theo các tổn thương tại mắt**

- Thị lực: Tốt; Khá; Kém; Gần mù
- Tiền sử laser võng mạc được chia thành 2 nhóm: Có; Không
- Tình trạng bong dịch kính sau chia thành 4 nhóm: Độ 0: Không có bong dịch kính sau.; Độ 1: Bong dịch kính sau từng phần kèm dày màng dịch kính sau. Độ 2: Bong dịch kính sau từng phần không kèm dày màng dịch kính sau. Độ 3: Bong dịch kính sau hoàn toàn.
- Tình trạng bệnh VMĐTĐ: Không tăng sinh; Tăng sinh
- Tình trạng phù hoàng điểm: Không; Có.
- Tình trạng mức độ tăng huỳnh quang vùng hoàng điểm: Thấp; Cao
- Phân loại hình thái học phù hoàng điểm được chia làm 3 nhóm: Lan tỏa; Dạng nang; Bong thanh dịch dưới võng mạc hoàng điểm.

- Tình trạng xuất huyết dịch kính: chia 4 nhóm Độ 0; 1; 2; 3.
- Tình trạng tăng sinh xơ: chia 4 nhóm Độ 0; 1; 2; 3.
- Tình trạng bong võng mạc co kéo chia 2 nhóm: Không; Có.
- Tình trạng tăng sinh võng mạc chia 2 nhóm tiến triển: Không;

Có.

**2.2.5.3. Biện chứng:** Biện chứng tại mắt; Biện chứng toàn thân

#### **2.2.6. Xử lý số liệu**

Các số liệu được thu thập, lưu trữ bằng phần mềm Excel 2016 và được xử lý theo các phép toán thống kê y học bằng phần mềm SPSS 20.0. Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn, tỷ lệ %. Kiểm định dấu hạng Wilcoxon được sử dụng để so sánh nồng độ yếu tố VEGF trong thủy dịch trước và sau tiêm Bevacizumab. Kiểm định Mann-Whitney và kiểm định Kruskal-Wallis được sử dụng để so sánh nồng độ yếu tố VEGF trong thủy dịch giữa các nhóm nghiên cứu. Hệ số tương quan Spearman được sử dụng để đánh giá mối liên quan giữa nồng độ yếu tố VEGF trong thủy dịch với các thông số lâm sàng trong nhóm nghiên cứu.  $P < 0,05$  được xem là có ý nghĩa thống kê.

#### **2.2.7. Đạo đức trong nghiên cứu**

## **Chương 3**

### **KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

Nghiên cứu thực hiện trên 75 mắt của 53 bệnh nhân, trong đó gồm 60 mắt của 38 bệnh nhân nhóm bệnh và 15 mắt của 15 bệnh nhân nhóm chứng.

#### **3.1. ĐẶC ĐIỂM NHÓM BỆNH NHÂN NGHIÊN CỨU**

##### **3.1.1. Đặc điểm bệnh nhân theo tuổi và giới**

Tuổi trung bình của nhóm bệnh là  $53,97 \pm 7,87$ . Tuổi trung bình của nhóm chứng là  $57,40 \pm 9,49$ . Ở nhóm bệnh có 20 nam chiếm 52,63%; 18 nữ chiếm 47,37%. Ở nhóm chứng có 7 nam chiếm 46,67%; 8 nữ chiếm 53,33%. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tuổi, giới giữa nhóm bệnh và nhóm chứng ( $p=0,458$ ,  $p=0,698$ ).

### **3.1.2. Phân bố bệnh nhân theo loại ĐTĐ**

Số bệnh nhân mắc ĐTĐ loại 1 có 5 ca, chiếm tỷ lệ 13,16%. Tỷ lệ mắc ĐTĐ loại 2 cao hơn, có 33/38 ca, chiếm 86,84%.

### **3.1.3. Phân bố bệnh nhân theo thời gian phát hiện ĐTĐ**

Thời gian phát hiện ĐTĐ trung bình là  $11,97 \pm 6,05$  năm, phần lớn là trên 10 năm. Gặp nhiều nhất là trên 15 năm chiếm 36,84%. Tiếp đến là từ 10 - 15 năm chiếm 31,58%.

### **3.1.4. Phân bố bệnh nhân theo tình hình kiểm soát đường huyết**

Tỷ lệ HbA1c trung bình là  $7,91 \pm 2,03$  %, trong đó 10/38 bệnh nhân có tỷ lệ HbA1c  $\leq 7\%$  (chiếm 26,32%), số còn lại có tỷ lệ HbA1c  $> 7\%$  là 28/38 bệnh nhân (chiếm 73,68%).

### **3.1.5. Phân bố số mắt theo tình trạng thị lực chỉnh kính**

Phần lớn là thị lực kém và gần mù (chiếm 76,67%) trong đó 27 mắt (45%) có thị lực kém, 19 mắt có thị lực gần mù (31,67%).

### **3.1.6. Phân bố số mắt bệnh VMĐTĐ theo tình trạng xuất huyết dịch kính**

Ở 48 mắt bệnh VMĐTĐ tăng sinh: có 19 mắt không bị xuất huyết dịch kính; 11 mắt bị xuất huyết dịch kính độ 1; 7 mắt độ 2; 11 mắt độ 3.

### **3.1.7. Phân bố số mắt bệnh VMĐTĐ theo tình trạng phù hoàng điểm**

Trong số 42 mắt không bị xuất huyết dịch kính hoặc chỉ có xuất huyết dịch kính độ 1 do đó có thể soi được đáy mắt để đánh giá chính xác tình trạng hoàng điểm và võng mạc, nghiên cứu có số mắt bị phù hoàng điểm là 35 mắt, số mắt có bệnh VMĐTĐ tăng sinh là 30 mắt.

## **3.2. NỒNG ĐỘ VEGF TRƯỚC VÀ SAU TIÊM NỘI NHÂN BEVACIZUMAB**

### **3.2.1. Nồng độ VEGF ở nhóm chứng và nhóm bệnh VMĐTĐ trước sau tiêm**

Ở 15 mắt của nhóm chứng là nhóm mắt mổ đục thủy tinh thể, nồng độ VEGF là  $120,65 \pm 45,05$  pg/ml. thấp hơn đáng kể so với ở 60 mắt của nhóm bệnh VMĐTĐ là  $428,70 \pm 337,74$  pg/ml ( $p =$

$0,000$ ). Ở 60 mắt của nhóm bệnh VMĐTĐ, sau tiêm giảm xuống chỉ còn là  $14,34 \pm 17,18$  pg/ml ( $p = 0,000$ ).

### **3.2.2. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm ở nhóm bệnh VMĐTĐ**

#### **3.2.2.1. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm theo phân nhóm bệnh VMĐTĐ**

Ở 35 mắt của nhóm phù hoàng điểm, nồng độ VEGF trước tiêm là  $447,39 \pm 368,77$  pg/ml, giảm xuống sau tiêm chỉ còn là  $14,04 \pm 17,82$  pg/ml ( $p = 0,000$ ). Ở 48 mắt của nhóm VMĐTĐ tăng sinh, nồng độ VEGF trước tiêm là  $474,23 \pm 361,32$  pg/ml, giảm xuống sau tiêm chỉ còn là  $16,96 \pm 18,11$  pg/ml ( $p = 0,000$ ).

#### **3.2.2.2. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm theo phân độ bệnh VMĐTĐ**

Ở 12 mắt của nhóm VMĐTĐ không tăng sinh, nồng độ VEGF trước tiêm là  $246,56 \pm 93,45$  pg/ml, giảm xuống rõ rệt sau tiêm chỉ còn là  $3,93 \pm 5,87$  pg/ml ( $p = 0,002$ ). Ở 48 mắt của nhóm VMĐTĐ tăng sinh, nồng độ VEGF trước tiêm là  $474,23 \pm 361,32$  pg/ml, giảm xuống rõ rệt sau tiêm chỉ còn là  $16,96 \pm 18,11$  pg/ml ( $p = 0,000$ ).

#### **3.2.2.3. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm theo tình trạng laser võng mạc**

Có 15/60 mắt (25%) có tiền sử laser võng mạc, nồng độ VEGF trước tiêm là  $327,61 \pm 362,40$  pg/ml sau tiêm giảm xuống chỉ còn  $16,55 \pm 14,59$  pg/ml ( $p = 0,001$ ); 45/60 mắt (75%) chưa được laser võng mạc, nồng độ VEGF trước tiêm là  $462,39 \pm 326,37$  pg/ml sau tiêm giảm xuống chỉ còn  $13,62 \pm 18,05$  pg/ml ( $p = 0,000$ ).

### **3.2.3. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm ở nhóm bệnh phù hoàng điểm do đái tháo đường**

#### **3.2.3.1. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm theo mức độ tăng huỳnh quang vùng hoàng điểm**

Ở 35 mắt phù hoàng điểm gồm: 18 mắt có mức độ tăng huỳnh quang cao có nồng độ VEGF trước tiêm là  $588,52 \pm 440,79$  pg/ml sau tiêm giảm xuống chỉ còn  $21,29 \pm 21,15$  pg/ml; 17 mắt có mức độ tăng huỳnh quang thấp có nồng độ VEGF trước tiêm là  $297,95$



$\pm 190,83$  pg/ml sau tiêm giảm xuống chỉ còn  $6,35 \pm 8,83$  pg/ml ( $p = 0,000$ ).

### **3.2.3.2. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm theo phân loại hình thái học phù hoàng điểm**

Nồng độ VEGF trước tiêm ở 20 mắt phù hoàng điểm lan tỏa là  $452,66 \pm 363,21$  pg/ml giảm xuống sau tiêm chỉ còn là  $12,80 \pm 19,02$  pg/ml,  $p = 0,000$ ; ở 9 mắt phù hoàng điểm dạng nang là  $389,68 \pm 301,79$  pg/ml giảm xuống sau tiêm chỉ còn là  $18,53 \pm 17,33$ pg/ml, ( $p = 0,008$ ); ở 6 mắt dạng bong thanh dịch dưới võng mạc là  $516,38 \pm 515,69$  pg/ml giảm xuống sau tiêm chỉ còn là  $11,42 \pm 15,93$  pg/ml, ( $p = 0,028$ ).

### **3.2.4. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm ở nhóm bệnh VMĐTĐ tăng sinh**

#### **3.2.4.1. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm theo tình trạng xuất huyết dịch kính**

Ở 48 mắt của nhóm bệnh VMĐTĐ tăng sinh gồm: 19 mắt không có xuất huyết dịch kính có nồng độ VEGF trước tiêm là  $411,62 \pm 235,98$  pg/ml sau tiêm giảm xuống chỉ còn  $15,53 \pm 16,52$  pg/ml; 29 mắt có xuất huyết dịch kính, nồng độ VEGF trước tiêm là  $515,26 \pm 423,01$  pg/ml sau tiêm giảm xuống chỉ còn  $17,89 \pm 19,3$  pg/ml ( $p = 0,000$ ).

#### **3.2.4.2. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm theo tình trạng bong võng mạc co kéo**

Ở 48 mắt bệnh VMĐTĐ tăng sinh gồm có: 8 mắt có biến chứng bong võng mạc do co kéo, nồng độ VEGF trước tiêm là  $358,52 \pm 336,74$  pg/ml sau tiêm giảm xuống chỉ còn  $8,76 \pm 11,61$  pg/ml ( $p=0,012$ ); 40 mắt chưa có bong võng mạc do co kéo, trước tiêm là  $497,38 \pm 365,63$  pg/ml sau tiêm giảm xuống chỉ còn  $18,60 \pm 18,82$  pg/ml ( $p=0,000$ ).

#### **3.2.4.3. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm theo tình trạng tăng sinh xơ**

Trong số 48 mắt bệnh VMĐTĐ tăng sinh có 11 mắt bị xuất huyết dịch kính độ 3 nên không thể soi được đáy mắt, do đó không thể khảo sát được tình trạng tăng sinh xơ ở 11 mắt này. Nghiên cứu trên 37 mắt có bệnh VMĐTĐ tăng sinh còn lại có 23 mắt có tăng sinh xơ và 14 mắt chưa có tăng sinh xơ. Ở 23 mắt có

tăng sinh xơ nồng độ VEGF trước tiêm là  $581,46 \pm 434,63$  pg/ml sau tiêm giảm xuống  $19,60 \pm 22,41$  pg/ml ( $p=0,000$ ); Ở 14 mắt chưa có tăng sinh xơ, trước tiêm là  $330,23 \pm 185,92$  pg/ml sau tiêm giảm xuống  $13,64 \pm 12,07$  pg/ml ( $p=0,001$ ).

#### **3.2.4.4. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm theo tình trạng tăng sinh võng mạc**

Có 31 mắt có tình trạng tăng sinh võng mạc tiến triển và chỉ có 6 mắt có tình trạng tăng sinh võng mạc không tiến triển. Ở 31 mắt tăng sinh võng mạc tiến triển, nồng độ VEGF trước tiêm là  $535,72 \pm 392,03$  pg/ml. giảm xuống sau tiêm là  $18,66 \pm 19,30$  pg/ml ( $p = 0,000$ ). Ở 6 mắt tăng sinh võng mạc không tiến triển, trước tiêm là  $273,44 \pm 258,99$  pg/ml giảm xuống sau tiêm là  $11,55 \pm 20,84$  pg/ml ( $p= 0,028$ ).

### **3.3. MỐI LIÊN QUAN GIỮA NỒNG ĐỘ VEGF VỚI ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG CỦA BỆNH**

#### **3.3.1. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với đặc điểm lâm sàng của bệnh VMĐTĐ**

##### **3.3.1.1. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với các thông số lâm sàng**

Không có sự tương quan giữa nồng độ VEGF thủy dịch với tuổi, đường máu, HbA1C, thời gian mắc ĐTĐ, thị lực với mức ý nghĩa  $p > 0,05$  và hệ số tương quan r dao động từ -0,126 đến 0,110.

##### **3.3.1.2. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với mức độ bệnh VMĐTĐ**

Nồng độ VEGF ở 48 mắt bệnh VMĐTĐ tăng sinh là  $474,24 \pm 361,32$  pg/ml, ở 12 mắt bệnh VMĐTĐ không tăng sinh là  $246,56 \pm 93,45$  pg/ml, khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $r = 0,284$ ;  $p = 0,029$ ).

##### **3.3.1.3. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với tình trạng laser võng mạc**

Nồng độ VEGF ở nhóm có laser võng mạc là  $327,61 \pm 362,40$  pg/ml, nồng độ VEGF ở nhóm không có laser võng mạc là  $462,39 \pm 326,37$  pg/ml, khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $r = -0,294$ ;  $p = 0,024$ ).

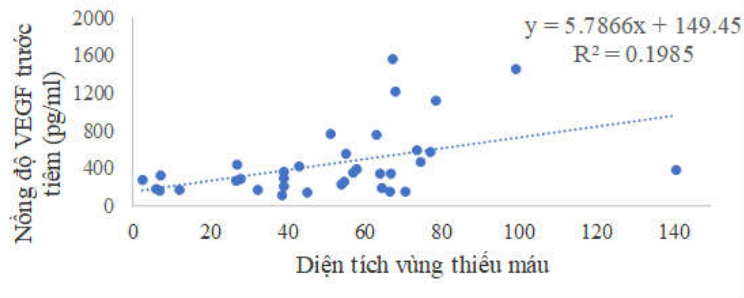
**3.3.1.4. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với tình trạng bong dịch kính sau**

Nồng độ VEGF ở nhóm không có bong dịch kính sau là  $593,26 \pm 493,82$  pg/ml, ở nhóm bong dịch kính sau từng phần kèm dày màng dịch kính sau là  $383,77 \pm 245,18$  pg/ml, ở nhóm bong dịch kính sau từng phần không kèm dày màng dịch kính sau là  $173,92 \pm 31,05$  pg/ml, ở nhóm bong dịch kính sau hoàn toàn là  $684,72 \pm 757,74$  pg/ml, không có sự khác biệt giữa các nhóm bệnh ( $r = -0.161$ ;  $p = 0,271$ ).

**3.3.2. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với đặc điểm lâm sàng ở nhóm bệnh phù hoàng điểm do ĐTD**

**3.3.2.1. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với các thông số OCT và CMHQ**

Nồng độ VEGF ở nhóm phù hoàng điểm không tương quan với độ dày võng mạc trung tâm  $p = 0,954$ ,  $r = 0,010$ ; với thể tích hoàng điểm,  $p = 0,987$ ,  $r = 0,003$ . Ngược lại, nồng độ VEGF có mối tương quan chặt chẽ với diện tích vùng thiếu máu,  $p=0,001$ ,  $r=0,522$ .



**Biểu đồ 1. Mối tương quan tuyến tính đơn biến giữa nồng độ VEGF và diện tích vùng thiếu máu ở nhóm bệnh phù hoàng điểm.**

**3.3.2.2. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với mức độ tăng huỳnh quang vùng hoàng điểm**

Nồng độ VEGF ở 18 mắt phù hoàng điểm có mức độ tăng huỳnh quang vùng hoàng điểm cao là  $588,52 \pm 440,79$  pg/ml cao hơn có ý nghĩa thống kê so với ở 17 mắt phù hoàng điểm có mức

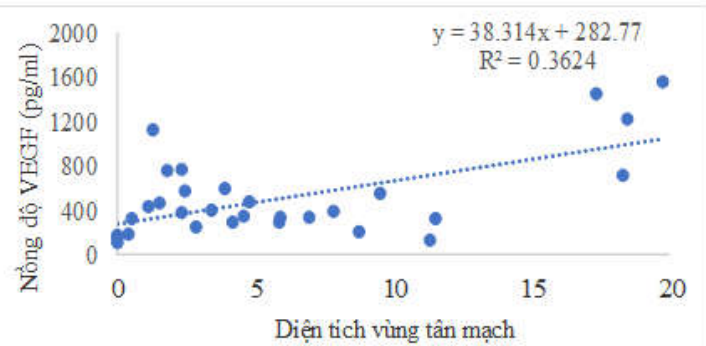
độ tăng huỳnh quang thấp là  $297,95 \pm 190,83$  pg/ml, ( $r = 0,436$ ;  $p = 0,011$ ).

**3.3.2.3. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với hình thái phù hoàng điểm**

Nồng độ VEGF ở 20 mắt phù hoàng điểm lan tỏa là  $452,66 \pm 363,21$  pg/ml, ở 9 mắt phù hoàng điểm dạng nang là  $389,68 \pm 301,79$  pg/ml, ở 6 mắt dạng bong thanh dịch dưới võng mạc là  $516,38 \pm 515,69$  pg/ml, không có sự khác biệt giữa các nhóm bệnh ( $r = 0.012$ ;  $p = 0,879$ ).

**3.3.3. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với đặc điểm lâm sàng ở nhóm bệnh VMĐTĐ tăng sinh**

**3.3.3.1. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với các thông số CMHQ**



**Biểu đồ 2. Mối tương quan tuyến tính đơn biến giữa nồng độ VEGF và diện tích vùng tân mạch ở nhóm bệnh VMĐTĐ tăng sinh**

**Bảng 1. Mô hình hồi quy tuyến tính đa biến về mối tương quan giữa nồng độ VEGF với các thông số CMHQ ở nhóm bệnh VMĐTĐ tăng sinh**

Thông số bệnh	Nồng độ VEGF (n = 30)			
	B (Sai số chuẩn)	Beta	VIF	P
C	46,646 (134,072)			

Diện tích vùng thiếu máu	4,349 (2,040)	0,304	1,005	0,042
Diện tích vùng tân mạch	36,902 (9,072)	0,580	1,005	0,000
R <sup>2</sup>	0,454			
P (Anova)	0,000			

Kết quả mô hình cho thấy nồng độ VEGF có tương quan chặt chẽ với diện tích vùng võng mạc thiếu máu và diện tích vùng tân mạch ( $p = 0,000$ ,  $VIF = 1,005$ ,  $R^2 = 0,454$ ). Phân tích mô hình hồi qui tuyến tính đa biến cho thấy cả 2 biến độc lập là diện tích vùng võng mạc thiếu máu và diện tích vùng tân mạch đều có mức độ ảnh hưởng lên đến 45,4 % kết quả dự đoán nồng độ VEGF. Từ kết quả mô hình trên chúng tôi xây dựng được phương trình hồi quy tuyến tính đa biến như sau:

***Nồng độ VEGF (pg/ml) = 46,646 + 4,349 Diện tích vùng thiếu máu + 36,902 Diện tích vùng tân mạch.***

### ***3.3.3.2. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với mức độ xuất huyết dịch kính***

Nồng độ VEGF ở 19 mắt không có xuất huyết dịch kính là  $411,62 \pm 235,98$  pg/ml, ở 11 mắt có xuất huyết dịch kính độ 1 là  $683,02 \pm 514,39$  pg/ml, ở 7 mắt độ 2 là  $416,28 \pm 424,11$  pg/ml, ở 11 mắt độ 3 là  $410,49 \pm 280,40$  pg/ml, không có sự khác biệt giữa các nhóm bệnh có ý nghĩa thống kê ( $r = -0,039$ ;  $p = 0,406$ ).

### ***3.3.3.3. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với mức độ tăng sinh xơ***

Nồng độ VEGF ở nhóm 13 mắt không có tăng sinh xơ là  $330,23 \pm 185,92$  pg/ml, ở nhóm 15 mắt có tăng sinh xơ độ 1 là  $607,17 \pm 409,76$  pg/ml, ở nhóm 4 mắt có tăng sinh xơ độ 2 là  $779,78 \pm 652,81$  pg/ml, ở nhóm 5 mắt có tăng sinh xơ độ 3 là  $345,66 \pm 260,04$  pg/ml, không có sự khác biệt giữa các nhóm bệnh có ý nghĩa thống kê ( $r = 0,136$ ;  $p = 0,166$ ).

### ***3.3.3.4. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với tình trạng bong võng mạc co kéo***

Nồng độ VEGF ở 8 mắt bệnh VM ĐTĐ tăng sinh có bong võng mạc co kéo là  $358,52 \pm 336,74$  pg/ml, ở 40 mắt bệnh VMĐTĐ tăng sinh không có bong võng mạc co kéo là  $497,38 \pm 365,63$  pg/ml, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 2 nhóm bệnh ( $r = -0,218$ ;  $p = 0,135$ ).

### ***3.3.3.5. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với tình trạng tăng sinh võng mạc***

Nồng độ VEGF ở 31 mắt bệnh VMĐTĐ tăng sinh có tình trạng tăng sinh võng mạc tiến triển là  $535,72 \pm 392,03$  pg/ml, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với ở 6 mắt có tình trạng tăng sinh võng mạc không tiến triển là  $273,44 \pm 258,99$  pg/ml, ( $r = 0,371$ ;  $p = 0,026$ ).

## **3.4. TAI BIẾN VÀ BIẾN CHỨNG**

### **3.4.1. Tai biến và biến chứng tại mắt**

Có 24 mắt đau ngay sau tiêm chiếm tỷ lệ cao nhất (40%), 14 mắt (23,3%) bị kích thích chảy nước mắt, 10 mắt (16,7%) bị xuất huyết dưới kết mạc ngay sau tiêm. Ngoài ra chúng tôi không gặp biến chứng nào khác trong quá trình làm thủ thuật và điều trị.

### **3.4.2. Tai biến và biến chứng toàn thân**

Trong quá trình điều trị và theo dõi, chúng tôi gặp 2 trường hợp tăng huyết áp chiếm tỷ lệ 5,3%. Ngoài ra chúng tôi không gặp trường hợp nào có biến chứng toàn thân khác.

## **Chương 4 BÀN LUẬN**

### **4.1. NỒNG ĐỘ VEGF TRƯỚC VÀ SAU TIÊM NỘI NHÃN BEVACIZUMAB**

#### **4.1.1. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm ở nhóm bệnh và chứng**

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy nồng độ VEGF thủy dịch ở nhóm bệnh cao hơn đáng kể so với ở nhóm chứng. Kết quả này tương tự với tất cả những nghiên cứu khác trên thế giới. Điều này

rất phù hợp với cơ chế sinh bệnh học về vai trò quan trọng của VEGF trong bệnh VMĐTĐ. Trong điều kiện sinh lý bình thường, võng mạc người bình thường chứa ít VEGF, tuy nhiên trong điều kiện bệnh lý VEGF có thể tăng tiết gây ra bởi tình trạng thiếu oxy do những bệnh lý võng mạc thiếu máu như bệnh VMĐTĐ. Ở 60 mắt của nhóm bệnh, nồng độ VEGF thủy dịch trước tiêm giảm xuống sau tiêm gấp hơn 20 lần. Tiêm Bevacizumab nội nhãn làm giảm đáng kể nồng độ VEGF trong thủy dịch ở bệnh VMĐTĐ. Kết quả tương tự cũng đã được công bố bởi nhiều tác giả khác trên thế giới.

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu nhằm xác định nồng độ VEGF nội nhãn ở nhóm chứng và nhóm bệnh VMĐTĐ trước và sau tiêm Bevacizumab, tuy nhiên các nghiên cứu sử dụng nhiều loại kỹ thuật định lượng khác nhau với các loại kit xét nghiệm của các hãng sản xuất khác nhau, và nồng độ VEGF nội nhãn ở các loại mô khác nhau có thể là ở thủy dịch, có thể là ở dịch kính. Do đó sự so sánh kết quả cụ thể giữa các nghiên cứu có thể là tương đối khác nhau, nhưng về điểm chung giống nhau giữa tất cả các nghiên cứu trong đó có nghiên cứu của chúng tôi là nồng độ VEGF định lượng được là thấp ở người bình thường, cao hơn hẳn ở người bệnh VMĐTĐ, và giảm rõ rệt sau tiêm thuốc kháng VEGF.

#### **4.1.2. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm ở nhóm bệnh**

##### **4.1.2.1. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm theo phân nhóm bệnh**

Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về nồng độ VEGF giữa 2 nhóm phù hoàng điểm và bệnh VMĐTĐ tăng sinh. Kết quả này tương tự với kết quả trong nghiên cứu của Sawada và cs (2007). Điều này lý giải có thể không có sự khác biệt về nồng độ VEGF nội nhãn giữa các bệnh nhân trong nhóm bệnh ở mức độ nặng của bệnh VMĐTĐ như bệnh VMĐTĐ tăng sinh hay phù hoàng điểm có ý nghĩa lâm sàng.

##### **4.1.2.2. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm theo phân độ bệnh VMĐTĐ**

Ở 12 mắt của nhóm VMĐTĐ không tăng sinh, so sánh với nghiên cứu của Futnasu năm 2002, kết quả nghiên cứu của chúng tôi nằm trong khoảng dao động của tác giả Futnasu. Ở nhóm bệnh VMĐTĐ tăng sinh, so sánh với 2 tác giả Sawada và Kayako

Matsuyama thì kết quả của chúng tôi cũng gần tương tự. Riêng chỉ có nồng độ VEGF thủy dịch trước tiêm thì kết quả nghiên cứu của chúng tôi nằm trong khoảng giữa giá trị của 2 nghiên cứu này. Điều này có thể giải thích là do tình trạng bệnh nhân trong nghiên cứu của tác giả Sawada là nhẹ hơn và của tác giả Kayako Matsuyama là nặng hơn nghiên cứu của chúng tôi. Về kết quả sau tiêm Bevacizumab 1 tuần thì cả 3 nghiên cứu đều cho kết quả rất giống nhau, nồng độ VEGF hạ xuống rất thấp đến mức có thể hết hoàn toàn về giá trị 0. Trong nghiên cứu của chúng tôi nồng độ VEGF thủy dịch sau tiêm Bevacizumab 1 tuần là từ 0 đến 65,73 pg/ml rất phù hợp so với của tác giả Kayako Matsuyama là từ 0 đến 64 pg/ml.

##### **4.1.3. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm theo tình trạng laser võng mạc**

Những nghiên cứu trên thế giới đã báo cáo nồng độ VEGF nội nhãn giảm xuống sau tiêm thuốc kháng VEGF nội nhãn cũng như sau laser quang đông võng mạc. Tiêm Bevacizumab đã cho thấy giảm nồng độ VEGF rõ rệt ở cả hai nhóm laser và không laser sau tiêm 1 tuần. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu khác trên thế giới.

##### **4.1.3. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm ở nhóm bệnh phù hoàng điểm do ĐTD**

##### **4.1.3.1. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm theo mức độ tăng huỳnh quang vùng hoàng điểm**

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự của tác giả Futnasu và cs (2009). Ở cả 2 nhóm phù hoàng điểm tăng huỳnh quang cao và tăng huỳnh quang thấp, nồng độ VEGF sau tiêm giảm so với trước tiêm và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ( $p = 0,000$ ).

##### **4.1.3.2. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm theo phân loại hình thái học phù hoàng điểm**

Những thay đổi hình thái học trên OCT rất hữu ích để để xác định cơ chế sinh bệnh học của bệnh. Nghiên cứu chúng tôi cho thấy ở cả 3 hình thái phù hoàng điểm, nồng độ VEGF sau tiêm giảm so với trước tiêm và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,01$ ). Kết quả này phù hợp với những nghiên cứu khác trên thế giới.

#### **4.1.4. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm ở nhóm bệnh VMĐTĐ tăng sinh**

##### **4.1.4.1. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm theo tình trạng xuất huyết dịch kính**

Nghiên cứu chúng tôi cho thấy tiêm Bevacizumab nội nhãn làm giảm nồng độ VEGF nội nhãn đáng kể chỉ 1 tuần sau tiêm ở tất cả những mắt có hoặc không có xuất huyết dịch kính. Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả khác như Qian và cs (2011), Sawada và cs (2007), Forooghian và cs (2010).

##### **4.1.4.2. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm theo tình trạng bong võng mạc co kéo**

Nghiên cứu của Jiu-Ke Li (2015) ghi nhận VEGF giảm ở tất cả các mắt sau tiêm Bevacizumab và khuyến cáo sẽ là lợi ích nếu tiêm Bevacizumab trong vòng 5 ngày trước mổ cắt dịch kính và nếu tiêm Bevacizumab trễ lâu quá 2 tuần thì hiện tượng tăng sinh xơ tiến triển mạnh do tăng bFGF sẽ gây co kéo bong võng mạc nặng hơn. Nghiên cứu chúng tôi tương tự nhiều nghiên cứu khác trên thế giới cho thấy kết quả nồng độ VEGF giảm đáng kể sau tiêm nội nhãn Bevacizumab ở cả 2 nhóm có và không có bong võng mạc co kéo. Do đó trên thực tế lâm sàng, đối với những trường hợp bệnh VMĐTĐ tăng sinh có co kéo dịch kính đe dọa võng mạc hoàng điểm hoặc bong võng mạc co kéo thì chúng tôi chỉ tiêm Bevacizumab trong vòng 1 tuần trước mổ cắt dịch kính để tránh biến chứng tăng sinh xơ co kéo có thể gây tổn hại thêm cho hoàng điểm và võng mạc.

##### **4.1.4.3. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm theo tình trạng tăng sinh xơ**

Tiêm nội nhãn Bevacizumab ức chế VEGF gây thoái triển tân mạch và thúc đẩy xơ hóa nặng hơn, có thể dẫn đến bong võng mạc co kéo tăng thêm ở một số mắt bệnh VMĐTĐ tăng sinh nặng. Nghiên cứu chúng tôi cho kết quả phù hợp với những nghiên cứu khác trên thế giới, nồng độ VEGF nội nhãn giảm hẳn sau tiêm ở tất cả những mắt bệnh VMĐTĐ tăng sinh có hay chưa có tăng sinh xơ.

##### **4.1.4.4. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm theo tình trạng tăng sinh võng mạc**

Bevacizumab tiêm nội nhãn làm giảm tất cả những VEGF tự do và gây bất hoạt tất cả hoạt động của VEGF. Nhiều nghiên cứu đã báo cáo việc tiêm nội nhãn Bevacizumab đã làm giảm nồng độ

VEGF ở tất cả những mắt bệnh VMĐTĐ tăng sinh dù tiến triển hay không tiến triển. Nghiên cứu chúng tôi cho kết quả tương tự những nghiên cứu khác trên giới, nồng độ VEGF ở những mắt bệnh VMĐTĐ tăng sinh ở cả 2 nhóm tiến triển hay không tiến triển đều giảm đáng kể sau tiêm Bevacizumab.

## **4.2. MỐI LIÊN QUAN GIỮA NỒNG ĐỘ VEGF VỚI ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG CỦA BỆNH**

### **4.2.1. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với đặc điểm lâm sàng của bệnh VMĐTĐ**

#### **4.2.1.1. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với các thông số lâm sàng**

Những nghiên cứu mới trên thế giới cho thấy nồng độ VEGF nội nhãn không có mối liên quan với các thông số tuổi, đường máu, HbA1C, thời gian mắc ĐTĐ, thị lực. Nghiên cứu chúng tôi cho kết quả phù hợp với những nghiên cứu mới này. Đối với việc kiểm soát chuyển hóa, mức glucose máu hay HbA1C ngay tại thời điểm nghiên cứu không phản ánh hết được thực sự quá trình kiểm soát đường máu của bệnh nhân trong suốt quá trình diễn tiến lâu dài gây ra biến chứng bệnh VMĐTĐ, do đó có thể không có mối tương quan với nồng độ VEGF.

#### **4.2.1.2. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với mức độ bệnh VMĐTĐ**

Nghiên cứu nhận thấy nồng độ VEGF thủy dịch cao hơn đáng kể ở nhóm bệnh VMĐTĐ tăng sinh so với nhóm bệnh VMĐTĐ không tăng sinh. Kết quả này rất phù hợp với hầu hết các nghiên cứu khác trên thế giới cho rằng nồng độ yếu tố VEGF nội nhãn có liên quan với độ nặng của bệnh VMĐTĐ.

#### **4.2.1.3. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với tình trạng laser võng mạc**

Laser gây phá hủy lớp photoreceptor là lớp tiêu thụ nhiều oxy của võng mạc do đó làm cải thiện tình trạng thiếu oxy của võng mạc từ đó giảm tiết VEGF, như vậy nồng độ VEGF thấp hơn ở nhóm đã laser võng mạc là hợp lý. Trong nghiên cứu của chúng tôi, ở nhóm bệnh nhân đã được làm laser quang đông võng mạc trước đó có nồng độ VEGF nội nhãn giảm thấp hơn ở những bệnh nhân không được laser quang đông võng mạc. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự như kết quả nghiên cứu của Praidou (2009) và của Watanabe (2005).

#### **4.2.1.4. *Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với tình trạng bong dịch kính sau***

Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ VEGF giữa 4 nhóm bệnh này không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p = 0,271$ ). Vai trò của bong dịch kính sau như là kết nối dịch kính võng mạc vẫn còn chưa rõ ràng. Nghiên cứu của chúng tôi cho kết quả tương tự những nghiên cứu của Ishizaki và cs (2006), Praidou (2009).

#### **4.2.2. *Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với đặc điểm lâm sàng ở nhóm bệnh phù hoàng điểm do ĐTB***

##### **4.2.2.1. *Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với các thông số OCT và CMHQ***

Về mối tương quan giữa nồng độ VEGF với độ dày võng mạc trung tâm, thể tích hoàng điểm, thể giới vẫn còn nhiều quan điểm chưa thống nhất. Đa số báo cáo trước đây cho rằng nồng độ VEGF nội nhãn có tương quan với độ dày võng mạc trung tâm, thể tích hoàng điểm. Ngược lại, những công bố mới gần đây lại cho thấy không có mối tương quan giữa nồng độ VEGF với độ dày võng mạc trung tâm, thể tích hoàng điểm nhưng lại có mối tương quan giữa IL6, IL8, IL10, PDGF,... với những thông số này. Quan điểm mới trong cơ chế sinh bệnh học của bệnh phù hoàng điểm cần kể đến vai trò quan trọng của những cytokin gây viêm khác và đưa ra khuyến cáo điều trị triamcinolone nội nhãn cho một số trường hợp phù hoàng điểm dai dẳng có cơ chế bệnh sinh không đáp ứng điều trị với thuốc kháng VEGF. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự những báo cáo mới gần đây trên thế giới, xét trên cả tương quan đơn biến và mô hình hồi qui tuyến tính đa biến.

Tương quan tuyến tính đơn biến (biểu đồ 1), mô hình hồi qui tuyến tính đa biến đều cho thấy mối tương quan chặt chẽ giữa nồng độ VEGF với diện tích vùng thiếu máu. Nghiên cứu chúng tôi cho kết quả phù hợp thống nhất với tất cả nghiên cứu khác trên thế giới. Bởi vì võng mạc thiếu máu phóng thích lượng lớn VEGF, nồng độ VEGF thủy dịch có thể phản ánh mức độ thiếu máu võng mạc. Do đó nồng độ VEGF có thể xem như là dấu hiệu chỉ điểm cho tình trạng thiếu máu võng mạc.

#### **4.2.2.2. *Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với mức độ tăng huỳnh quang vùng hoàng điểm***

Nghiên cứu cho thấy nồng độ VEGF ở nhóm 18 mắt phù hoàng điểm có mức độ tăng huỳnh quang cao là cao hơn so với ở nhóm 17 mắt phù hoàng điểm có mức độ tăng huỳnh quang thấp. Kết quả này tương tự với hầu hết các nghiên cứu khác trên thế giới. Hiện tượng tăng huỳnh quang cao vùng hoàng điểm phản ánh sự rò rỉ huỳnh quang do hàng rào máu võng mạc bị phá vỡ. Sự tăng huỳnh quang thấp có thể là biểu hiện giai đoạn sớm, do đó giải thích có thể nồng độ VEGF thấp ở giai đoạn sớm của bệnh là phù hợp.

##### **4.2.2.3. *Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với hình thái phù hoàng điểm***

Ở cả 3 dạng phù, nghiên cứu chúng tôi đều cho thấy nồng độ VEGF tăng cao và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 3 nhóm bệnh này ( $p = 0,696$ ). Kết quả này phù hợp với những nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới. Báo cáo của Sonado và cs (2014) và Kim và cs (2015) đều cho thấy VEGF không khác nhau giữa 3 loại hình thái học của phù hoàng điểm do đái tháo đường, chỉ có một số cytokine tiền viêm như IL6, IL8, PDGF... có liên quan với hình thái học của phù hoàng điểm.

#### **4.2.3. *Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với đặc điểm lâm sàng ở nhóm bệnh VMĐTĐ tăng sinh***

##### **4.2.3.1. *Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với các thông số CMHQ***

Nghiên cứu chúng tôi cho kết quả có mối tương quan mạnh giữa nồng độ yếu tố VEGF với diện tích vùng thiếu máu và diện tích vùng tân mạch, tương tự tất cả những nghiên cứu khác trên thế giới. Điều này phù hợp với cơ chế sinh bệnh học của bệnh. Kích thích chủ yếu cho sự phát triển các tân mạch là từ tình trạng thiếu máu cục bộ võng mạc thứ phát sau tắc nghẽn mạch máu. Việc giảm cung cấp oxy và dinh dưỡng đến võng mạc không được tưới máu có thể gây giải phóng các phân tử vận mạch vào trong nội nhãn, bao gồm chủ chốt là VEGF.

Nghiên cứu xây dựng và phân tích mô hình hồi qui tuyến tính đa biến cho thấy tương quan chặt chẽ và cả 2 biến độc lập là diện tích vùng võng mạc thiếu máu, diện tích vùng tân mạch đều có mức độ ảnh hưởng lên đến 45,4 % kết quả dự đoán nồng độ

VEGF. Từ kết quả mô hình hồi qui đa biến chúng tôi xây dựng được phương trình hồi quy tuyến tính đa biến dự đoán nồng độ VEGF như sau:

*Nồng độ VEGF (pg/ml) = 46,646 + 4,349 diện tích vùng thiếu máu + 36,902 diện tích vùng tân mạch.*

#### **4.2.3.2. *Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với mức độ xuất huyết dịch kính***

Hầu hết những nghiên cứu mới sau này đều cho thấy nồng độ VEGF nội nhãn không có mối liên quan với mức độ xuất huyết dịch kính ở bệnh VM ĐTĐ bởi vì mức độ xuất huyết dịch kính còn phụ thuộc vào thời gian nên xuất huyết có thể tiêu giảm đi. Nghiên cứu của chúng tôi cho kết quả phù hợp với kết quả của những nghiên cứu mới này.

#### **4.2.3.3. *Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với mức độ tăng sinh xơ***

Một số ít nghiên cứu trước đây cho rằng nồng độ VEGF có mối liên quan với mức độ tăng sinh xơ. Tuy nhiên những nghiên cứu mới sau này đều cho thấy nồng độ VEGF không có liên quan với mức độ tăng sinh xơ và đưa ra quan điểm về vai trò của một số yếu tố phát triển khác trong cơ chế gây tăng sinh xơ như yếu tố phát triển nguyên bào sợi cơ bản bFGF, yếu tố phát triển mô liên kết CTGF... Những quan điểm mới cho rằng sự chuyển đổi mạch-xơ được thực hiện qua trung gian của sự cân bằng giữa yếu tố sinh mạch VEGF và yếu tố tiền xơ CTGF. Nghiên cứu của chúng tôi cho kết quả nồng độ VEGF không có liên quan với mức độ tăng sinh xơ là phù hợp với kết quả của những nghiên cứu mới sau này.

#### **4.2.3.4. *Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với tình trạng bong võng mạc co kéo***

Những nghiên cứu theo quan điểm mới cho rằng mức độ tăng sinh xơ mạch không có mối liên quan với nồng độ VEGF nhưng lại có liên quan với những yếu tố phát triển khác như CTGF, TGF  $\beta$ 2, bFGF. Khi tăng sinh xơ mạch tiến triển sẽ gây co kéo bong võng mạc nặng hơn. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy nồng độ VEGF không có liên quan với tình trạng bong võng mạc là phù hợp với kết quả của những nghiên cứu khác trên thế giới.

#### **4.2.3.5. *Mối liên quan giữa nồng độ VEGF với tình trạng tăng sinh võng mạc***

VEGF gây những thay đổi cấu trúc mạch máu, kích thích tăng tính thấm mạch và tăng sinh nội mô, kích hoạt men

metalloproteinnases phân giải mô ngoại bào và những khoảng trống cần thiết để phát triển những mạch máu. Nghiên cứu chúng tôi cho kết quả nồng độ VEGF tăng cao hơn ở những mắt có tân mạch võng mạc tiến triển so với những mắt có tình trạng tăng sinh võng mạc không tiến triển, tương tự báo cáo của các tác giả khác trên thế giới.

## **KẾT LUẬN**

### **1. Nồng độ VEGF thủy dịch trước và sau tiêm nội nhãn Bevacizumab**

Ở 15 mắt nhóm chứng là nhóm mắt mổ đục thủy tinh thể, nồng độ VEGF là  $120,65 \pm 45,05$  pg/ml, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nồng độ VEGF ở 60 mắt của nhóm bệnh là  $428,70 \pm 337,74$  pg/ml. Ở 60 mắt của nhóm bệnh, nồng độ giảm xuống sau tiêm chỉ còn là  $14,34 \pm 17,18$  pg/ml, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở tất cả các mắt phân loại theo phân độ bệnh VMĐTĐ, theo tình trạng laser võng mạc trước đó. Ở 35 mắt của nhóm phù hoàng điểm, nồng độ VEGF trước tiêm là  $447,39 \pm 368,77$  pg/ml, giảm xuống sau tiêm chỉ còn là  $14,04 \pm 17,82$  pg/ml, khác biệt có ý nghĩa thống kê. Ở 48 mắt của nhóm VMĐTĐ tăng sinh, nồng độ VEGF trước tiêm là  $474,23 \pm 361,32$  pg/ml, giảm xuống sau tiêm chỉ còn là  $16,96 \pm 18,11$  pg/ml, khác biệt có ý nghĩa thống kê.

### **2. Mối liên quan giữa nồng độ VEGF thủy dịch với đặc điểm lâm sàng**

- Không có sự tương quan giữa nồng độ VEGF với tuổi, đường máu, HbA1C, thời gian mắc ĐTĐ, thị lực, tình trạng bong dịch kính sau.

- Có mối liên quan giữa nồng độ VEGF với mức độ bệnh VMĐTĐ, tình trạng laser võng mạc.

- Ở nhóm bệnh phù hoàng điểm: Không có mối tương quan giữa nồng độ VEGF với độ dày võng mạc trung tâm, thể tích hoàng điểm, hình thái phù hoàng điểm trên OCT. Có mối tương quan giữa nồng độ VEGF với diện tích vùng võng mạc thiếu máu, mức độ tăng huỳnh quang vùng hoàng điểm.

- Ở nhóm bệnh VMĐTĐ tăng sinh: Không có mối liên quan

giữa nồng độ VEGF nội nhãn với mức độ xuất huyết dịch kính, mức độ tăng sinh xơ, tình trạng bong võng mạc co kéo. Có mối tương quan giữa nồng độ VEGF với diện tích vùng thiếu máu và diện tích vùng tân mạch, tình trạng tăng sinh võng mạc. Kết quả phương trình xây dựng được từ mô hình hồi qui tuyến tính đa biến dự đoán:

***Nồng độ VEGF (pg/ml) = 46,646 + 4,349 diện tích vùng thiếu máu + 36,902 diện tích vùng tân mạch***

### **HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP CỦA ĐỀ TÀI**

1. Nghiên cứu khảo sát cả những cytokine khác nhằm làm sáng tỏ vai trò quan trọng và mối liên quan giữa VEGF và những cytokine khác trong cơ chế sinh bệnh học phức tạp và đa yếu tố với nhiều vấn đề còn chưa rõ ràng của bệnh VMĐTĐ.

2. Tiếp tục nghiên cứu những vấn đề khác liên quan đến việc theo dõi bệnh, hiệu quả điều trị và vấn đề định liều thuốc kháng VEGF nội nhãn dựa trên nồng độ VEGF nội nhãn.

3. Mở rộng nghiên cứu về nồng độ VEGF ở những bệnh lý võng mạc khác như tắc tĩnh mạch võng mạc, thoái hóa hoàng điểm, tân mạch hắc mạc, viêm màng bồ đào...



**NGUYEN TUAN THANH HAO**

## **VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN AQUEOUS HUMOR BEFORE AND AFTER INTRAVITREAL INJECTION OF BEVACIZUMAB IN EYES WITH DIABETIC RETINOPATHY**

**Major : Ophthalmology**

**Code : 62720157**

**MEDICAL DOCTOR DISSERTATION SUMMARY**

**MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING    MINISTRY OF HEALTH**

**HANOI MEDICAL UNIVERSITY**



**HA NOI - 2019  
THE DISSERTATION IS COMPLETED AT  
HANOI MEDICAL UNIVERSITY**

**The dissertation can be found at:**

- National Library of Vietnam
- Library of Hanoi Medical University

**Scientific guidance:**

**Assoc. Pro. Ph.D Pham Trong Van**

**Reviewer 1: Assoc. Pro. Ph.D Hoang Nang Trong**

**Reviewer 2: Assoc. Pro. Ph.D Nguyen Van Dam**

**Reviewer 3: Assoc. Pro. Ph.D Tran Van Khanh**

The dissertation will be presented to the Board of Ph.D  
dissertation at University level at Hanoi Medical University.

*At the time* , *date*

**LIST OF PUBLIC SCIENTIFIC WORKS RELATED  
TO THE DISSERTATION**

**INTRODUCTION**

1. Nguyen Tuan Thanh Hao, Nguyen Quoc Dat, Pham Trong Van, Vu Tuan Anh (2018). "Vascular endothelial growth factor in the intraocular fluid of eyes with diabetic retinopathy and influence of therapy with Bevacizumab". *Journal of Medical Research*, vol. 112 (3), 60 - 67.
2. Nguyen Tuan Thanh Hao, Pham Trong Van, Vu Tuan Anh (2018). Vascular endothelial growth factor in aqueous humor before and after intravitreal injection of Bevacizumab in eyes with diabetic retinopathy. *Journal of Medical Research*, vol. 114 (5), 25 - 33.
3. Nguyen Tuan Thanh Hao, Pham Trong Van, Vu Tuan Anh (2019). Vascular endothelial growth factor in aqueous humor before and after intravitreal injection of Bevacizumab in eyes with proliferative diabetic retinopathy, *VietNam Medical Journal*, vol. 1(2), 147 – 151.

Diabetic retinopathy (DR) is a serious complication secondary to diabetic mellitus and a leading cause of blindness. The pathogenesis of DR is multifactorial, complex and still not entirely understood. The molecular pathophysiology involves the interaction of several factors: breakdown of the blood- retinal barriers, expression and release of biochemical factors, tissue hypoxia, retinal circulatory changes, or vitreous traction. There is strong evidence that VEGF plays a key role in the blood-retinal barriers breakdown and retinal microvascular occlusion leading to macular edema and retinal ischemia in DR. Intravitreal Bevacizumab (Avastin, Genentech Inc.) is commonly used for the effective treatment of DR. Studies have proposed that determining the dose of intravitreal Bevacizumab rely on intraocular levels of VEGF should be optimized. Recent studies have shown that intravitreal Bevacizumab decrease the intraocular VEGF level, cause regression of the retinal neovascular and reduce leakage. Studies reported that the VEGF level in the aqueous was correlated with the severity of DR. In Vietnam, up to now, no report has been published on measurement of intraocular VEGF levels in DR. That's the reason why we conducted this study to:

1. *To compare the concentration of vascular endothelial growth factor in the aqueous humor before and after intravitreal injection of Bevacizumab in eyes with diabetic retinopathy.*
2. *Analyze the correlation of the VEGF level in the aqueous with the disease.*

**New contributions of the thesis as follows:**

1. This is the first study in Viet Nam update the key role of VEGF in the molecule pathogenesis which has become target for treatment of diabetic retinopathy.
2. The thesis determined the concentration of VEGF in the aqueous humor before and after intravitreal injection of Bevacizumab in eyes with diabetic retinopathy and the correlation with the disease.
3. The thesis provided the base from which further studies will continue to elucidate the pathogenesis remains unclear and find the dose of intravitreal Bevacizumab rely on intraocular levels of VEGF.

**The layout of thesis:**

There are 113 pages, including: Introduction (2 pages); Chapter 1. Overview (31 pages); Chapter 2. Methods and objects of the reseach (18 pages); Chapter 3. Results (30 pages); Chapter 4. Discussion (31 pages); Conclusion (2 pages); Recommendations (1 page); Information on new contributions of the thesis (1 page). Reference: 149 documents, including 7 Vietnamese documents and 142 English documents.

**Chapter 1. OVERVIEW**

**1.1. Diabetic retinopathy**

DR is a serious microvascular complication secondary to diabetic mellitus and involves 30-50% diabetic patient. DR is one of the leading cause of blindness globally. Typical clinical manifestations of DR reflect damage to retinal blood vessels with sequelae that include of breakdown of the blood- retinal barriers, retinal microvascular occlusion leading to macular edema and retinal ischemia and neovascular in proliferative DR. The pathophysiology underlying these changes is multifactorial, complex and still not entirely understood. Besides

microvascular disease, there is evidence of inflammation and retinal neurodegeneration in the development and progression of DR. Chronic hyperglycemia induces inflammation and oxidative stress, both of which promote many interconnected biochemical processes that ultimately lead to microvascular and neuronal dysfunction. The ischemic retina secretes VEGF, an endothelial cell mitogen and an angiogenic inducer, into the vitreous cavity. VEGF increase vascular permeability and cause the formation of new vessels arising from the plane of the retina resulting in DME and PDR. Studies have shown that VEGF plays a central role in the pathophysiology of DR disease.

**1.2. Vascular Endothelium Growth Factor**

VEGF is a critical component in the tissue growth and organ repair processes of angiogenesis and vasculogenesis. While it plays a central role in the development of pathologic microvascular complications, and diabetic retinopathy in particular, VEGF is also a survival factor for endothelial cells, increases microvascular permeability and is a potent vasodilator.

The most important VEGF- mediated actions in the pathogenesis of DR are the breakdown of the blood- retinal barriers (BRB) and angiogenesis.

**1.2.1. Breakdown of BRB - Diabetic macula edema (DME)**

Vascular leakage as a consequence of the breakdown of the BRB, in particular the inner BRB, contributes to the pathogenesis of DME. Vascular permeability is mediated by increased VEGF, due to its ability to induce vascular leakage. VEGF may induce permeability by transport through cells by inducing fenestrae and vesicles by breakdown of the junctional complex.

**1.2.2. Angiogenesis- Proliferative Diabetic Retinopathy (PDR)**

The mechanism by which VEGF induces neovascularization in PDR

are multifactorial. The increase of VEGF induced by hypoxia as well as the enhancement of VEGF receptors, will be crucial in determining its angiogenic effect. VEGF concentration has been found strikingly higher in the vitreous fluid of PDR patients.

### **1.3. The research situation about intraocular VEGF concentration**

#### ***1.3.1. Intraocular VEGF concentration in normal eyes***

VEGF is produced by several types of cells within the eye (retinal pigment epithelial cells, glial cells, retinal capillary pericytes, endothelial cells, Mullers cells and ganglion cells). Kim et al (1999) reported that VEGF, VEGF-R1, and VEGF-R2 are each essential for normal blood vessel development. Many studies have shown that VEGF was detected in normal eyes. VEGF is an angiogenic factor. Because no active neovascularization occurs in normal eyes, it is possible that the VEGF observed in studies is not bioactive.

#### ***1.3.2. Intraocular VEGF concentration in DR and influence of therapy with Bevacizumab***

Intravitreally injected bevacizumab decrease the intraocular VEGF level, cause regression of the retinal and iris neovascularization, and reduce leakage. Funk et al (2010) reported that intravitreal injection of bevacizumab substantially decreased the VEGF concentration in the aqueous humor in eyes with PDR by at least 20- fold. It was reported that the VEGF level in the aqueous humor was substantially correlated with the VEGF level in the vitreous. Takayuki Hattori et al (2010) estimated the amount of bevacizumab that would be required to block VEGF in the vitreous at a VEGF concentration of 10 000 pg/ml. Assuming the volume of the vitreous to be 4 ml and the molecular weight of VEGF to be 38 kDa, the calculated total amount of VEGF

present in the vitreous is  $1.1 \times 10^{-12}$  mol. Because 1 molecule of bevacizumab binds with 2 molecules of VEGF, the total amount of bevacizumab (molecular weight, 150 kDa) required to block VEGF in the vitreous would be 83 ng, which is a minute amount.

#### ***1.3.3. The correlation of the intraocular VEGF level with the disease***

VEGF is a critical stimulus for DME and PDR. Diabetic patients with DME or PDR have elevated intraocular VEGF in the vitreous and aqueous fluids that are correlated with the disease presence and severity. VEGF is soluble and can be measured in fluid compartments within the eye as an indicator of increase retinal VEGF. Some studies have been done that tested aqueous samples for VEGF levels as a mean to predict risk of DME. Futnasu et al (2002) studied in 54 eyes with DME and found that the aqueous levels of VEGF are significantly correlated with the severity of macular edema as assessed using biomicroscopy and fluorescein angiography. Kim et al (2015) reported that there were no differences in aqueous levels of VEGF between groups according to morphologic patterns based on OCT. Praidou (2009) reported that the vitreous levels of VEGF are significantly correlated with the severity of retinal ischemia, retinal neovascular, and the activity of PDR but not correlated with the posterior vitreous detachment, vitreous haemorrhage, retinal detachment.

## **Chapter 2: SUBJECTS AND METHODOLOGY**

This prospective trial was performed at DaNang Eye Hospital from January 2016 to May 2018.

### **2.1. Study subjects.**

#### ***2.1.1. Inclusion criteria***

-DR group: Diabetic patients with diabetic clinical significant macular edema or proliferative diabetic retinopathy who were scheduled

for intravitreal injection of 1.25mg Bevacizumab. Patients agreed to participate to the study.

-Control group: Patients were scheduled to have cataract surgery, did not have a history of diabetic mellitus and have no retinal vascular diseases. Patients agreed to participate to the study.

### 2.1.2. Exclusion criteria

-Patients had ocular disease apart from DR and cataracts; iris neovascular or neovascular glaucoma; previous ocular surgery or intravitreal triamcinolone or anti VEGF injection or laser photocoagulation within 3 months before entry into the study.

## 2.2. Research methodology

### 2.2.1. Study design

Prospective clinical observational study with control group.

### 2.2.2. Sample size

Formula:

$$n = Z^2_{(\alpha,\beta)} \frac{\partial_1^2 + \partial_2^2}{(\hat{\alpha}_1 - \hat{\alpha}_2)^2}$$

n: sample size;  $Z^2_{(\alpha,\beta)}$ : express to significance, if  $\alpha = 0,05$ ;  $\beta = 0,1$

Calculated sample size:

- DR group n = 41 eyes. The study took more, selected 60 eyes to meet selection criteria for the study.

- Control group n = 9 eyes. The study took more, selected 15 eyes to meet selection criteria for the study.

### 2.2.3. Research tools

### 2.2.4. Research procedure

#### 2.2.4.1. Clinical procedures and investigations

- Information of patients.
- Endocrine examination and treatment.

- Ophthalmic examination.

- Taking fundus photographs with 7 standards fields of the ETDRS classification.

- Undergoing OCT

- Undergoing fundus fluorescein angiography.

- Undergoing B scan.

#### 2.2.4.2. Collection of aqueous humor

Before starting the intravitreal bevacizumab injection in the DR group or cataract surgery in the control group, undiluted samples of aqueous humor (0.1-0.2 ml) were aspirated by limbal paracentesis using a 30-gauge needle attached to a tuberculine microsyringe. The samples were placed immediately into sterile tubes and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in a deep freezer until they were assayed.

The same procedure was performed 1 week later in the DR group.

#### 2.2.4.3. Intravitreal injection of Bevacizumab

Under sterile conditions in the operating room, 1.25 mg (0.05 ml) of bevacizumab (Avastin 100mg/4ml) was injected into the vitreous in the superior temporal quadrant with a sharp 30-gauge needle that was inserted into the eye at 3.5-4.0 mm from the limbus. The needle was carefully removed, and a sterile cotton applicator was used to prevent reflux. The postoperative medications included topical antibiotics four times daily for at least 7 days.

#### 2.2.4.4. Measurement of VEGF

The VEGF concentration in the aqueous humor was measured using an enzym- linked immunosorbent assay for human VEGF (R&D System Inc, Minneapolis, Minnesota).

### 2.2.5. Evaluation criterias

#### 2.2.5.1. Evaluation of medical characteristics

- Patients' age: divided into 3 groups of age.
- Gender.
- Type of diabetes.
- Duration of diabetes.
- Glycemia.
- HbA1C level.

#### 2.2.5.2. Evaluation of ophthalmic characteristics

- Visual acuity.
- History of laser photocoagulation.
- Posterior vitreous detachment.
- Severity of DR.
- Grade of macula edema.
- Classification of DME on fluorescein angiography.
- Classification of DME according to morphologic pattern on OCT.
- Vitreous haemorrhage.
- Tractional retinal detachment.
- Fibrosis.
- Activity of PDR.

#### 2.2.5.3. Complication

- Ocular adverse events.
- Systemic adverse events.

### 2.6. Data analysis

All data were collected in a Microsoft Excel 2016 and analysed with SPSS version 20.0. The results were expressed as the mean  $\pm$  standard error value. The Wilcoxon, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis tests were used to analyze the different VEGF concentrations between groups. Spearman's rank order correlation coefficients were calculated. A ( $p < 0.05$ ) was considered statistically significant.

### 2.6. Ethical consideration

Topic was approved by the council of science and ethics, as well as through the university council and the science of medical ethics hospital, all data were obtained as confidentially.

## Chapter 3: RESULTS

A total of 75 eyes were included in our study: 60 eyes (38 patients) in DR group and 15 eyes (15 patients) in control group.

### 3.1. Characteristics of the sample

#### 3.1.1. Age and gender characteristics

The mean age of 38 patients in DR group was  $53,97 \pm 7,87$  years. The mean age of 15 patients in control group was  $57,40 \pm 9,49$  years. There were no significant differences between the diabetic and controls with respect to sex and age.

#### 3.1.2. Type of diabetes

13,16% of patients had diabetes type 1; 86,84% of patients had diabetes type 2.

#### 3.1.3. Duration of diabetes

The mean duration of diabetes was  $11,97 \pm 6,05$  years. Mainly of patients had duration of diabetes over 10 years.

#### 3.1.4. Glycemia

The mean HbA1C was  $7,91 \pm 2,03$  %. Mainly of patients had HbA1c rate  $> 7\%$  (73,68%).

#### 3.1.5. Vision acuity

76.67% of eyes had vision acuity lower than counting fingers from 3 meters.

#### 3.1.6. Vitreous haemorrhage

In this research, there were 48 eyes of PDR classifying into 4 groups of vitreous haemorrhage:

- Group 0: no vitreous haemorrhage (19 eyes)

- Group 1: vitreous haemorrhage grade 1 (11 eyes)
- Group 2: vitreous haemorrhage grade 2 (7 eyes)
- Group 3: vitreous haemorrhage grade 3 (11 eyes)

### **3.1.7. Macula edema**

In this research, there were 42 eyes (include of NPDR and PDR) had no vitreous haemorrhage or vitreous haemorrhage grade 1 so we can view clearly the fundus to evaluate the macula and retina. Bamong these eyes, there were 35 eyes had CSME, 30 eyes had PDR.

## **3.2. VEGF concentration in aqueous humor before and after intravitreal injection of bevacizumab**

### **3.2.1. VEGF concentration in DR group and control group**

VEGF concentration in 60 eyes with DR was  $428,70 \pm 337,74$  pg/ml, higher than in 15 eyes control with cataract was  $120,65 \pm 45,05$  pg/ml. ( $p = 0,000$ ). VEGF concentration in 60 eyes with DR dramatically decrease to  $14,34 \pm 17,18$  pg/ml 1 week after injection of bevacizumab ( $p = 0,000$ ).

### **3.2.2. VEGF concentration in DR group**

#### *3.2.2.1. VEGF concentration in PDR and DME group*

VEGF concentration in 35 eyes with DME before intravitreal injection of bevacizumab was  $447,39 \pm 368,77$  pg/ml, dramatically decrease to  $14,04 \pm 17,82$  pg/ml 1 week after injection ( $p = 0,000$ ).

VEGF concentration in 48 eyes with PDR before intravitreal injection of bevacizumab was  $474,23 \pm 361,32$  pg/ml, dramatically decrease to  $16,96 \pm 18,11$  pg/ml 1 week after injection ( $p = 0,000$ ).

#### *3.2.2.2. VEGF concentration according to severity of DR*

VEGF concentration in 12 eyes with NPDR before intravitreal injection of bevacizumab was  $246,56 \pm 93,45$  pg/ml, significantly decrease to  $3,93 \pm 5,87$  pg/ml 1 week after injection ( $p = 0,002$ ).

VEGF concentration in 48 eyes with PDR before intravitreal injection of bevacizumab was  $474,23 \pm 361,32$  pg/ml, dramatically decrease to  $16,96 \pm 18,11$  pg/ml 1 week after injection ( $p = 0,000$ ).

#### *3.2.2.3. VEGF concentration according to status of retinal laser photocoagulation*

VEGF concentration in 15 eyes with retinal laser photocoagulation before intravitreal injection of bevacizumab was  $327,61 \pm 362,40$  pg/ml, significantly decrease to  $16,55 \pm 14,59$  pg/ml 1 week after injection ( $p = 0,001$ ); VEGF concentration in 45 eyes without retinal laser photocoagulation before intravitreal injection of bevacizumab was  $462,39 \pm 326,37$  pg/ml, significantly decrease to  $13,62 \pm 18,05$  pg/ml 1 week after injection ( $p = 0,000$ ).

### **3.2.3. VEGF concentration in DME group**

#### *3.2.3.1. VEGF concentration according to classification of DME on fluorescein angiography*

VEGF concentration in 18 eyes with hyperfluorescent DME before intravitreal injection of bevacizumab was  $588,52 \pm 440,79$  pg/ml, significantly decrease to  $21,29 \pm 21,15$  pg/ml 1 week after injection; VEGF concentration in 17 eyes with minimally fluorescent DME before intravitreal injection of bevacizumab was  $297,95 \pm 190,83$  pg/ml, significantly decrease to  $6,35 \pm 8,83$  pg/ml 1 week after injection ( $p = 0,000$ ).

#### *3.2.3.2. VEGF concentration according to morphologic pattern on OCT*

VEGF concentration in 20 eyes with DRT before intravitreal injection of bevacizumab was  $452,66 \pm 363,21$  pg/ml, significantly decrease to  $12,80 \pm 19,02$  pg/ml 1 week after injection ( $p = 0,000$ ).

VEGF concentration in 9 eyes with CME before intravitreal injection of bevacizumab was  $389,68 \pm 301,79$  pg/ml, significantly decrease to  $18,53 \pm 17,33$  pg/ml 1 week after injection ( $p = 0,008$ ).

VEGF concentration in 6 eyes with SRD before intravitreal injection of bevacizumab was  $516,38 \pm 515,69$  pg/ml, significantly decrease to  $11,42 \pm 15,93$  pg/ml 1 week after injection ( $p = 0,028$ ).

### **3.2.4. VEGF concentration in PDR group**

#### *3.2.4.1. VEGF concentration according to status of vitreous haemorrhage*

VEGF concentration in 19 eyes without vitreous haemorrhage before intravitreal injection of bevacizumab was  $411,62 \pm 235,98$  pg/ml, significantly decrease to  $15,53 \pm 16,52$  pg/ml 1 week after injection; VEGF concentration in 29 eyes with vitreous haemorrhage before intravitreal injection of bevacizumab was  $515,26 \pm 423,01$  pg/ml, significantly decrease to  $17,89 \pm 19,3$  pg/ml after injection ( $p = 0,000$ ).

#### *3.2.4.2. VEGF concentration according to status of tractional retinal detachment (TRD)*

VEGF concentration in 40 eyes without TRD before intravitreal injection of bevacizumab was  $497,38 \pm 365,63$  pg/ml, significantly decrease to  $18,60 \pm 18,82$  pg/ml 1 week after injection ( $p=0,000$ ); VEGF concentration in 8 eyes with TRD before intravitreal injection of bevacizumab was  $358,52 \pm 336,74$  pg/ml, significantly decrease to  $8,76 \pm 11,61$  pg/ml after injection ( $p = 0,012$ ).

#### *3.2.4.3. VEGF concentration according to status of fibrosis*

VEGF concentration in 14 eyes without fibrosis before intravitreal injection of bevacizumab was  $330,23 \pm 185,92$  pg/ml, significantly decrease to  $13,64 \pm 12,07$  pg/ml 1 week after injection ( $p=0,001$ ).

VEGF concentration in 23 eyes with fibrosis before intravitreal injection of bevacizumab was  $581,46 \pm 434,63$  pg/ml, significantly decrease to  $19,60 \pm 22,41$  pg/ml after injection ( $p = 0,000$ ).

#### *3.2.4.3. VEGF concentration according to activity of PDR*

VEGF concentration in 31 eyes with active PDR before intravitreal injection of bevacizumab was  $535,72 \pm 392,03$  pg/ml, significantly decrease to  $18,66 \pm 19,30$  pg/ml after injection ( $p = 0,000$ ).

VEGF concentration in 6 eyes with inactive PDR before intravitreal injection of bevacizumab was  $273,44 \pm 258,99$  pg/ml, significantly decrease to  $11,55 \pm 20,84$  pg/ml after injection ( $p = 0,028$ ).

### **3.3. The relationship between VEGF and disease characteristics**

#### **3.3.1. The relationship between VEGF and DR**

##### *3.3.1.1. The relationship between VEGF and clinical parameters*

There was no correlation between VEGF concentration in the aqueous humor with the age, diabetic duration, glycemia, HbA1C, vision loss time, best corrected visual acuity ( $p > 0,05$ ).

##### *3.3.1.2. The relationship between VEGF and severity of DR*

VEGF concentration in the aqueous humor was significantly higher in patients with proliferative diabetic retinopathy than in nonproliferative diabetic retinopathy ( $r = 0,284$ ;  $p = 0,029$ ).

##### *3.3.1.3. The relationship between VEGF and status of retinal laser photocoagulation*

VEGF concentration in the aqueous humor was significantly higher in patients without retinal laser photocoagulation before than in patients with retinal laser photocoagulation before ( $r = -0,294$ ;  $p = 0,024$ ).

##### *3.3.1.4. The relationship between VEGF and status of PVD*

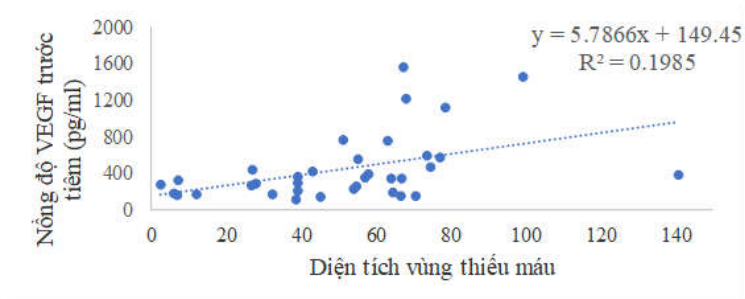
There were no differences in aqueous concentration levels of VEGF between groups classified according to the status of posterior vitreous detachment ( $r = -0,161$ ;  $p = 0,271$ ).

#### **3.3.2. The relationship between VEGF and DME**

##### *3.3.2.1. The relationship between VEGF and OCT and FFA parameters*



There was no correlation between VEGF concentration in the aqueous humor with the central retinal thickening, cube volume ( $p = 0,954, r = 0,010$ ). There was high correlation between VEGF concentration in the aqueous humor with the area of retinal ischaemia ( $p=0,001, r=0,522$ ).



**Figure 1.** The correlation between VEGF and the area of retinal ischaemia in DME group

**3.3.2.2. The relationship between VEGF and status of fluorescent DME**

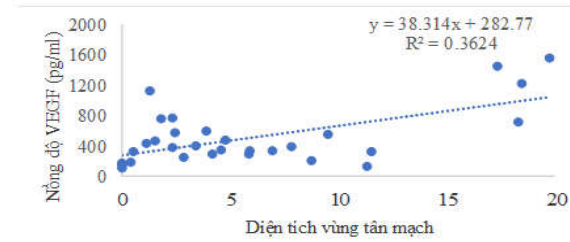
VEGF concentration in the aqueous humor was significantly higher in patients with hyperfluorescent DME than in minimally fluorescent DME ( $r = 0,436; p = 0,011$ ).

**3.3.2.2. The relationship between VEGF and status of morphologic pattern on OCT**

There were no differences in aqueous concentration levels of VEGF between 3 groups DRT, CME, SRD classified according to the status of morphologic pattern on OCT ( $r = 0.012; p = 0,879$ ).

**3.3.3 The relationship between VEGF and DR**

**3.3.3.1. The relationship between VEGF and FFA parameters**



**Figure 2.** The correlation between VEGF and the area of retinal neovascular in PDR group

**Tablet 1.** The multivariate linear regression models for the correlation between VEGF and FFA parameters in PDR group

FFA parameters	VEGF concentration(n = 30)			
	B (SE)	Beta	VIF	P
C	46,646 (134,072)			
Retinal ischaemia area	4,349 (2,040)	0,304	1,005	0,042
Retinal neovascular area	36,902 (9,072)	0,580	1,005	0,000
R <sup>2</sup>	0,454			
P (Anova)	0,000			

There was high correlation between VEGF concentration in the aqueous humor with the area of retinal ischaemia and retinal neovascular ( $p = 0,000, VIF = 1,005, R^2 = 0,454$ ). Using logistic regression models, it was determined that the estimated VEGF concentration of patient with PDR could be calculated as follows:

$$VEGF \text{ concentration (pg/ml)} = 46,646 + 4,349 \text{ Retinal ischaemia area} + 36,902 \text{ Retinal neovascular area.}$$

**3.3.3.2. The relationship between VEGF and status of vitreous haemorrhage**

There were no differences in aqueous concentration levels of VEGF between 4 groups classified according to the status of vitreous haemorrhage ( $r = -0,039$ ;  $p = 0,406$ ).

#### *3.3.3.3. The relationship between VEGF and status of fibrosis*

There were no differences in aqueous concentration levels of VEGF between 4 groups classified according to the status of fibrosis ( $r = 0,136$ ;  $p = 0,166$ ).

#### *3.3.3.4. The relationship between VEGF and status of tractional retinal detachment*

There were no differences in aqueous concentration levels of VEGF between 4 groups classified according to the status of tractional retinal detachment ( $r = -0,218$ ;  $p = 0,135$ ).

#### *3.3.3.5. The relationship between VEGF and status of activity of PDR*

VEGF concentration in the aqueous humor was significantly higher in patients with active PDR than inactive PDR ( $r = 0,371$ ;  $p = 0,026$ ).

### **3.4. Complication**

#### ***3.4.1. Ocular adverse events***

After injection of bevacizumab, no serious ocular complications developed, such as uveitis, endophthalmitis... There were 24 eyes (40%) had ocular pain, 14 eyes (23,3%) had ocular hyperemia, 10 eyes (16,7%) had subconjunctival haemorrhage. These symptoms were mild.

#### ***3.4.2. Systemic adverse event***

During the follow-up period, none of the patients developed any serious systemic adverse event. There were 2 cases (5.3%) had hypertension which was well controlled.

## **Chapter 4: DISCUSSION**

### **4.1. VEGF concentration in aqueous humor before and after intravitreal injection of bevacizumab**

#### ***4.1.1. VEGF concentration in DR group and control group***

The mean VEGF concentration in the aqueous humor in eyes with DR in our study was similar to that found by other authors who reported that intravitreal injection of bevacizumab dramatically decrease the VEGF concentration in the aqueous humor in eyes with PDR and DME by at least 10 folds. Our results showed that the VEGF concentration in the aqueous humor was also higher than in control eyes.

#### ***4.1.2. VEGF concentration in DR group***

##### *4.1.2.1. VEGF concentration in PDR and DME group*

There were no differences in aqueous concentration levels of VEGF among the subgroups with PDR and DME, was similar to that found by Sawada (2007). There may be no differences among the types of severe DR such as PDR and DME.

##### *4.1.2.2. VEGF concentration according to severity of DR*

The mean VEGF concentration in the aqueous humor in eyes according to severity of DR before and after intravitreal injection of bevacizumab was similar to that found by Futnasu (2002), Sawada (2007) and Kayako Matsuyama (2009).

##### *4.1.2.3. VEGF concentration according to status of retinal laser photocoagulation*

As expected, intravitreal injection of bevacizumab substantially decrease the VEGF concentration in the aqueous humor in eyes with or without retinal laser photocoagulation before. It was similar to other studies in the world.

#### ***4.1.3. VEGF concentration in DME group***

##### *4.1.3.1. VEGF concentration according to classification of DME on fluorescein angiography*

In DME, breakdown of the BRB is followed by leakage of fluid from the damaged retinal capillaries, and leakage of fluorescein associated with BRB breakdown leads to hyperfluorescence on FA. The mean VEGF concentration in the aqueous humor in eyes with hyperfluorescent and minimal fluorescent DME before and after intravitreal injection of bevacizumab was similar to that found by Futnasu (2009).

#### *4.1.3.2. VEGF concentration according to morphologic pattern on OCT*

Intravitreal injection of bevacizumab substantially decrease the VEGF concentration in the aqueous humor in eyes according to morphologic pattern on OCT. It was similar to other studies in the world. Many studies including this study showed that antiVEGF treatment was successful in reducing intraocular VEGF and the degree of DME.

#### **4.1.4. VEGF concentration in PDR group**

##### *4.1.4.1. VEGF concentration according to status of vitreous haemorrhage*

Intravitreal injection of bevacizumab substantially decrease the VEGF concentration in the aqueous humor in eyes with or without vitreous haemorrhage. It was similar to that found by Qian (2011), Sawada (2007), Forooghian (2010).

##### *4.1.4.2. VEGF concentration according to status of tractional retinal detachment (TRD)*

Angiogenic phase switch to fibrotic phase causing fibrovascular contracton leading to TRD in PDR. The mean VEGF concentration in the aqueous humor in eyes with or without TRD before and after intravitreal injection of bevacizumab was similar to that found by Jiu-Ke Li (2015).

##### *4.1.4.3. VEGF concentration according to status of fibrosis*

Intravitreal injection of bevacizumab substantially decrease the VEGF concentration in the aqueous humor in eyes with or without fibrosis. It was similar to other studies in the world.

#### *4.1.4.3. VEGF concentration according to activity of PDR*

VEGF is the most potent angiogenic factor in PDR. The mean VEGF concentration in the aqueous humor in eyes with active or quiescent PDR before and after intravitreal injection of bevacizumab was similar to that found by other studies in the world.

## **4.2. The relationship between VEGF and disease characteristics**

### **4.2.1. The relationship between VEGF and DR**

#### *4.2.1.1. The relationship between VEGF and clinical parameters*

There was no correlation between VEGF concentration in the aqueous humor with the age, diabetic duration, hyperglycemia, HbA1C, vision loss time, BCVA. HbA1C levels at the time of operation may not necessarily reflect their long-term glycemc control.

#### *4.2.1.2. The relationship between VEGF and severity of DR*

In agreement to previous reports, VEGF concentration in the aqueous humor was significantly higher in patients with PDR than in NPDR.

#### *4.2.1.3. The relationship between VEGF and status of retinal laser photocoagulation*

Intraocular VEGF concentration has previously been shown to be reduced after laser photocoagulation. The mean VEGF concentration in the aqueous humor higher in eyes without retinal laser photocoagulation

than in eyes with retinal laser photocoagulation, was similar to that found by Praidou (2009) and Watanabe (2005).

#### *4.2.1.4. The relationship between VEGF and status of PVD*

The role of PVD in DR pathogenesis still unclearly understood. There was no differences between VEGF concentration in the aqueous humor and status of PVD in agreement to Ishizaki (2006), Praidou (2009)'s reports.

### ***4.2.2. The relationship between VEGF and DME***

#### *4.2.2.1. The relationship between VEGF and OCT and FFA parameters*

The correlation between VEGF and CRT and CV on OCT remains unclearly. Previous studies found that not only VEGF but also proinflammatory cytokines may play an important role in breakdown of the BRB and development of DME. In our study, no correlation noted between VEGF and CRT and CV agreed with new previous studies.

There were strong correlation between VEGF and retinal ischaemia area. Because ischemic retina release high levels of VEGF, the aqueous VEGF levels also may represent the severity of retinal ischemia

#### *4.2.2.2. The relationship between VEGF and status of macula fluorescent*

VEGF concentration in the aqueous humor was significantly higher in patients with hyperfluorescent DME than in minimally fluorescent DME. It was similar to that found by previous studies. It is likely minimally fluorescent DME represents an earlier phase of disease.

#### *4.2.2.3. The relationship between VEGF and status of morphologic pattern on OCT*

There were no differences in aqueous concentration levels of VEGF between 3 groups DRT, CME, SRD, was similar to that found by Sonado

(2014) and Kim (2015). VEGF is one of the key factors for the DME. However, VEGF is not the only factor. There have been many reports describing an increase of other proinflammatory cytokines such as IL-6, IL-8,...in the intraocular fluid of eyes with DME.

### ***4.2.3 The relationship between VEGF and PDR***

#### *4.2.3.1. The relationship between VEGF and FFA parameters*

There was high correlation between VEGF concentration in the aqueous humor with the area of retinal ischaemia and retinal neovascular. VEGF is reported to be the most potent angiogenic factor in retinal ischemic progressing to retinal neovascularization. Multivariate logistic regression models showed the equation to estimate the VEGF concentration of patient with PDR: ***VEGF concentration (pg/ml) = 46,646 + 4,349 Retinal ischaemia area + 36,902 Retinal neovascular area.***

#### *4.2.3.2. The relationship between VEGF and status of vitreous haemorrhage*

There were no differences in aqueous concentration levels of VEGF between 4 groups classified according to the status of vitreous haemorrhage, was similar to that found by recent studies.

#### *4.3.3.3. The relationship between VEGF and status of fibrosis*

The causal factors of fibrosis and scarring and the regulation of the transit from angiogenesis to the fibrotic phase of PDR remain largely unknown. In our study there were no differences in aqueous concentration levels of VEGF between 4 groups classified according to the status of fibrosis was similar to that found by recent studies.

#### *4.3.3.4. The relationship between VEGF and status of tractional retinal detachment*

PDR progresses to a fibrotic phase with fibrovascular contraction causing retinal detachment. In our study, there were no differences in aqueous concentration levels of VEGF between 4 groups classified according to the status of tractional retinal detachment. It was similar to that found by other recent studies. Several growth factors have been shown to play a role in PDR such as CTGF, bFGF,...

#### 4.3.3.4. *The relationship between VEGF and status of activity of PDR*

It was previously reported that the vitreous level of VEGF was higher in active PDR than in quiescent PDR and that VEGF plays a major role in mediating intraocular neovascularization. In our study VEGF concentration in the aqueous humor was significantly higher in patients with active PDR than quiescent PDR was similar to that found by other authors. These findings suggest that the levels of VEGF in aqueous humor may reflect those in vitreous fluid and may be useful to predict the activity of PDR.

## CONCLUSIONS

### 1. VEGF concentration in aqueous humor before and after intravitreal injection of bevacizumab

VEGF concentration in 60 eyes with DR was  $428,70 \pm 337,74$  pg/ml, higher than in 15 eyes control with cataract was  $120,65 \pm 45,05$  pg/ml. VEGF concentration in 60 eyes with DR dramatically decrease to  $14,34 \pm 17,18$  pg/ml 1 week after injection of bevacizumab in all eyes according to severity of DR, status of retinal laser photocoagulation. VEGF concentration in 35 eyes with DME before intravitreal injection of bevacizumab was  $447,39 \pm 368,77$  pg/ml, dramatically decrease to  $14,04 \pm 17,82$  pg/ml 1 week after injection. VEGF concentration in 48 eyes with

PDR before intravitreal injection of bevacizumab was  $474,23 \pm 361,32$  pg/ml, decrease to  $16,96 \pm 18,11$  pg/ml 1 week after injection.

### 2. The relationship between VEGF and disease characteristics

- There was no correlation between VEGF concentration in the aqueous humor with the age, diabetic duration, glycemia, HbA1C, vision loss time, best corrected visual acuity, central retinal thickening, cube volume, status of morphologic pattern on OCT, vitreous haemorrhage, fibrosis, tractional retinal detachment.

- VEGF concentration in the aqueous humor was significantly higher in eyes with PDR; without retinal laser photocoagulation before; with hyperfluorescent DME, with active PDR.

- There was high correlation between VEGF concentration in the aqueous humor with the area of retinal ischaemia and retinal neovascular. Multivariate logistic regression models showed the equation to estimate the VEGF concentration of eyes with PDR:

$$VEGF \text{ concentration (pg/ml)} = 46,646 + 4,349 \text{ Retinal ischaemia area} + 36,902 \text{ Retinal neovascular area}.$$

## FURTHER RESEARCH DIRECTIONS

1. Continue to study the role of other cytokines in the molecule pathogenesis of diabetic retinopathy.
2. Continue to study how to determine the dose of intravitreal Bevacizumab rely on intraocular levels of VEGF.
3. Study the concentration of intraocular VEGF in other retinal vessels diseases.