

*На правах рукописи*

**КУЗНЕЦОВ АНДРЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ  
ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ  
НЕОВАСКУЛЯРНОЙ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ  
ДЕГЕНЕРАЦИИ И КАТАРАКТЫ**

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

14.01.07 – глазные болезни

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Челябинск – 2021

Работа выполнена на кафедре Глазных болезней Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

#### **Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор **Зурочка Александр Владимирович**,

доктор медицинских наук, доцент **Дроздова Елена Александровна**

#### **Официальные оппоненты:**

**Козлов Иван Генрихович**, доктор медицинских наук, профессор кафедры организации и управления в сфере обращения лекарственных средств Института последипломного образования ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет);

**Файзрахманов Ринат Рустамович**, доктор медицинских наук, профессор кафедры глазных болезней Института усовершенствования врачей ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Ведущая организация:** ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится 21 октября 2021 года в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 001.035.01 на базе ФБГНУ НИИВС им. И. И. Мечникова (105064, Россия, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5 А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФБГНУ НИИВС им. И. И. Мечникова и на сайте института <https://instmech.ru/home>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук

И.В. Яковлева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Глаз представляет собой уникальный аппарат, который в физиологических условиях сохраняет аутоотолерантность, а при нарушении целостности системы обеспечивает разворачивание реакций иммунного реагирования, как на патогенные, так и на собственные антигены глаза (Дикинов З. Х. с соавт., 2014; Гаджиева Б. Х., 2016). Поддержание локальной иммуносупрессии интраокулярной среды глаза обеспечивается рядом механизмов, включающих секрецию цитокинов клетками глазоассоциированной лимфоидной ткани (EALT), конституционально низкую экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости МНС I и II типа, феномен иммунного отклонения АСАИД (anterior chamber-associated immune deviation) при попадании растворимых антигенов в переднюю камеру глаза (Черешнева М. В. с соавт., 2004; Калюжин О. В., 2011).

По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ведущими причинами слепоты в мире являются катаракта, глаукома и неоваскулярная возрастная макулярная дегенерация (нВМД) (Нероев В. В., 2008, 2013; Resnikoff S. et al., 2004). Возрастная макулярная дегенерация (Н35.3 по МКБ-10) поражает 10–13% лиц старше 65 лет в России и странах Европы (Ambati J., 2013; Schmidt-Erfurth U. et al., 2014). Наряду с ВМД возрастная катаракта (Н25.0 по МКБ-10) является одной из основных причин нарушений зрения в мире: на ее долю, по данным ВОЗ, приходится 47,8% случаев снижения остроты зрения (Resnikoff S. et al., 2004). Катаракта и нВМД характеризуются наличием общих факторов риска, таких как возраст, курение, сердечно-сосудистые заболевания, и могут развиваться параллельно у одного пациента (Tabandeh H. et al., 2012).

Ключевую роль в патогенезе нВМД и катаракты играют иммунологические механизмы (Калюжин О. В., 2011; Мухамедьянова А. Ш., 2014; Слепова О. С. с соавт., 2015). Под влиянием средовых факторов, оксидативного стресса, старения, генетических мутаций происходит активация факторов, стимулирующих иммунный ответ (Дикинов З. Х., 2014; Nussenblatt R. В., 2009). Неоваскулярную форму ВМД относят к иммуновоспалительным заболеваниям органа зрения, ассоциированным с изменениями иммуносупрессивного фона во внутренних структурах глаза, обусловленными дисбалансом цитокинового профиля интраокулярной среды (Grossniklaus H. E., 2001; Gupta N., 2003). В современной литературе имеются отдельные данные об изменении цитокинового профиля влаги передней камеры у лиц с возрастной катарактой, которое заключается в повышении уровней IL-7, IL-12p70, IFN-2- $\alpha$  и MCP-3 и снижении уровней bFGF, IL-1R $\alpha$ , TNF- $\alpha$  и IL-9 (Li J., 2013). Представлен сравнительный анализ данных, отражающих цитокиновый профиль влаги передней камеры глаза у лиц с нВМД и возрастной катарактой, указывающий на значительное повышение уровней VEGF, растворимого рецептора VEGF-1 и VEGF-2, MCP-1, IL-6 и IL-8 у лиц с нВМД (Mimura T., 2019).

Идентификация ключевого патогенетического фактора неоваскулярной ВМД, а именно фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), привела к открытию нового направления в терапии данной формы ВМД (Нероев В. В., 2008, 2013; Злобин И. В., 2013; Самра С., 2011; Cheung L. K., 2014). Ряд многоцентровых рандомизированных клинических исследований доказывает, что интравитреальное ингибирование VEGF-A способно эффективно блокировать патогенетический процесс при нВМД, восстанавливать морфологию сетчатки и улучшать или сохранять ее нейросенсорные функции

у большинства пациентов с неоваскулярной ВМД (Brown D. M. et al., 2006; Rosenfeld P. J. et al., 2006; Cheung L. K., 2013, 2014). В настоящее время на российском фармакологическом рынке зарегистрировано два препарата для проведения анти-VEGF терапии интравитреального введения с целью лечения нВМД: ранибизумаб и афлиберцепт.

В последние годы появляются отдельные работы, изучающие локальный иммунный статус и исходы хирургического лечения катаракты у пациентов с ВМД и другими заболеваниями сетчатки (Оренбуркина О. И., 2011; Файзрахманов Р. Р., 2014, 2015, 2019; Broun D., 2010; Abouammoch M. A., 2013).

**Цель исследования** – оценка цитокинового профиля жидких сред глаза и клинико-иммунологической эффективности комбинированного хирургического лечения неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации и катаракты с одномоментным интраоперационным интравитреальным введением ингибиторов ангиогенеза.

**Задачи исследования:**

1. С использованием мультиплексного анализа изучить концентрации иммунных факторов в слезной жидкости и определить их значимость в патогенезе изучаемой патологии.

2. Оценить концентрации провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста во влаге передней камеры глаза и определить их значимость в патогенезе изучаемой патологии.

3. Определить показатели офтальмостатуса и морфометрические параметры макулы при неоваскулярной форме возрастной макулярной дегенерации и катаракте в динамике после факэмульсификации катаракты с имплантацией интраокулярной линзы и при комбинированном лечении с введением ингибиторов ангиогенеза.

4. Оценить уровни иммунных факторов в слезной жидкости пациентов основной группы в динамике комбинированного хирургического лечения с одномоментным интраоперационным интравитреальным введением ранибизумаба.

5. Провести оценку иммунных факторов в слезной жидкости пациентов основной группы в динамике комбинированного хирургического лечения с одномоментным интраоперационным интравитреальным введением афлиберцепта.

**Методология и методы исследования.** Выполнено краткосрочное проспективное динамическое нерандомизированное исследование иммунных аспектов патогенеза и клинико-иммунологической эффективности применения комбинированной терапии неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации и катаракты с применением ингибиторов неоангиогенеза. Работа проведена на базе офтальмологического отделения ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница» и кафедре глазных болезней ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России в период 2013–2019 гг.

План исследования соответствовал положениям Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (ВМА) последнего пересмотра (Токио, 2010) с учетом примечаний к параграфу 29, внесенных генеральной ассамблеей ВМА (Вашингтон, 2002), и был одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протоколы № 10 от 09.11.2013; № 8 от 02.09.2015; № 8 от 02.10.2019). От всех пациентов получено письменное информированное согласие на использование биологического материала (слезной жидкости, влаги передней камеры глаза) в научных целях. В исследовании принимали участие 52 пациента с нВМД и катарактой, поступивших в офтальмологическое отделение ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница» для планового оперативного лечения катаракты и нВМД. Группу контроля составили 14 условно здоровых лиц (28 глаз) соответствующего возраста, показатели офтальмостатуса которых соответствуют возрастной норме.

Отбор пациентов в основную группу исследования осуществляли методом сплошной выборки с учетом критериев включения, какими являлись наличие нВМД согласно критериям классификации Международной исследовательской группы International ARM Epidemiologic Study Group (1995), принятой в Женеве (1996), и наличие центральной или незрелой катаракты II–III плотности по L. Buratto (Buratto L., 2003).

Для достижения цели и решения поставленных задач использованы клинические, иммунологические, инструментальные и статистические методы исследования.

**Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора.** Достоверность результатов работы, правомочность основных положений и выводов основаны на достаточном числе наблюдений, полноте и широте литературного обзора, использовании современных методов статистической обработки материалов исследования с применением программ Statistica v. 10.0 for Windows и IBM SPSS Statistics 19, глубоком и аргументированном анализе полученных результатов. Достоверность результатов подтверждена актом проверки первичной документации от 11.10.2019.

Основные положения диссертации представлены в материалах XXV Всероссийской научно-практической конференции «Оренбургская конференция офтальмологов» с международным участием (Оренбург, 2014), XIII научно-практической конференции «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии – 2015» (Москва, 2015), XI Всероссийской конференции с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (Челябинск, 2016), XIV конференции иммунологов Урала (Челябинск, 2017), на XVI Всероссийском научном форуме с международным участием им. акад. В. И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2017).

Планирование научной работы, постановка цели и задач проведены совместно с научными руководителями: Александром Владимировичем Зурочкой, д-ром мед. наук, профессором, и Еленой Александровной Дроздовой, д-ром мед. наук, доцентом. Часть исследований выполнена совместно с сотрудниками кафедры глазных болезней ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России; мультиплексный анализ определения концентраций биологически активных веществ в слезной жидкости и влаге передней камеры глаза осуществлялся в лаборатории иммунологии воспаления ИИиФ УрО РАН (г. Екатеринбург) совместно с д-ром мед. наук В. А. Зурочкой. Выбор методов исследования, научно-информационный поиск, анализ и обобщение данных отечественной и зарубежной научной литературы, анализ и интерпретация полученных данных, статистическая обработка, подготовка научных публикаций, написание и оформление рукописи, внедрение результатов диссертационной работы в клиническую практику учреждений здравоохранения выполнены лично автором.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Формирование возрастной макулярной дегенерации и катаракты сопровождается изменением цитокинового профиля слезной жидкости и влаги передней камеры глаза в виде повышения провоспалительного потенциала глазоассоциированной лимфоидной ткани, усиления процессов неоангиогенеза, включения саногенетических реакций на фоне изменения иммуносупрессивного фона интраокулярной среды глаза, что отвечает концепции «паравоспаления».

2. Комбинация хирургического лечения возрастной макулярной дегенерации и катаракты с применением ингибиторов ангиогенеза позволяет улучшить показатели максимальной корригированной остроты зрения и морфометрические параметры макулы, характеризующие положительное влияние ранибизумаба и афлиберцепта на течение неоваскулярной формы возрастной макулярной дегенерации.

3. Комбинированное хирургическое лечение неоваскулярной формы возрастной макулярной дегенерации и катаракты с введением ингибиторов неоангиогенеза (ранибизумаба и афлиберцепта) приводит к однотипным и однонаправленным изменениям иммунного статуса глазоассоциированной лимфоидной ткани, снижению провоспалительного потенциала и уровня патогенетически значимого фактора роста эндотелия сосудов.

**Научная новизна работы.** В ходе исследования получены новые данные о содержании про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста в слезной жидкости при изучаемой патологии, что отражает непосредственное участие локальной иммунной системы глаза в патогенезе данного заболевания.

Впервые изучен цитокиновый профиль влаги передней камеры глаза у лиц с неоваскулярной формой ВМД в сочетании с возрастной катарактой. Показано, что формирование сочетанной патологии – нВМД и катаракты сопровождается повышением провоспалительного потенциала глазоассоциированной лимфоидной ткани, усилением процессов неоангиогенеза, а также параллельным включением ряда саногенетических реакций на фоне изменения иммуносупрессивной интраокулярной среды глаза. Впервые выявлено, что концентрация провоспалительных цитокинов и хемокинов во влаге передней камеры глаза регистрируется на несколько порядков ниже в сравнении с аналогичными показателями в слезной жидкости здоровых и больных глаз. Однако влага передней камеры глаза у пациентов с изучаемой сочетанной патологией содержит значимо более высокие в сравнении с показателями в слезной жидкости здоровых глаз концентрации факторов роста: фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), основного фактора роста фибробластов (bFGF), гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и низкие концентрации трансформирующего фактора роста бета (TGF- $\beta$ ).

В нашем исследовании впервые установлено, что проведение комбинированного хирургического лечения нВМД и катаракты с введением ингибиторов неоангиогенеза (ранибизумаба и афлиберцепта) в динамике через 1 месяц сопровождается однонаправленными и однотипными изменениями иммунного статуса: снижением концентраций фактора некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), ростом уровня антиангиогенного интерферона-гамма индуцибельного белка-10 (IP-10) и противовоспалительного цитокина – интерлейкина-13 (IL-13); выраженной положительной динамикой морфометрических показателей, регистрируемой с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ) сетчатки, что отражает снижение провоспалительного потенциала EALT и доказывает клинко-иммунологическую эффективность применения ингибиторов ангиогенеза в комбинированной терапии нВМД и катаракты. Также впервые установлено, что проведение фактоэммульсификации катаракты с имплантацией интраокулярной линзы у пациентов с сочетанной патологией – нВМД и возрастной катарактой приводит к повышению остроты зрения и не ухудшает течение нВМД в послеоперационном периоде (31 день наблюдения). Комбинированная терапия с одномоментным интраоперационным интравитреальным введением ингибиторов ангиогенеза (ранибизумаба и афлиберцепта) приводит к положительным однотипным значимым изменениям морфометрических показателей в виде уменьшения толщины сетчатки в фовеолярной области, высоты и протяженности отслойки нейрорепителлия (ОНЭ), отслойки пигментного эпителия (ОПЭ) сетчатки.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** В ходе проведенного исследования определена патогенетическая роль локальных иммунных факторов, обусловленных активацией глазоассоциированной лимфоидной ткани, в виде усиления

провоспалительного потенциала, процессов неоангиогенеза с параллельным включением ряда саногенетических реакций на фоне изменения иммуносупрессивной интраокулярной среды. Полученные в диссертационном исследовании данные свидетельствуют о клинико-иммунологической эффективности применения комбинированного хирургического вмешательства с одномоментным интраоперационным интравитреальным введением ингибиторов ангиогенеза (ранибизумаба или афлиберцепта), что позволяет рекомендовать к внедрению в практическое здравоохранение данный метод терапии при сочетанной патологии – нВМД и катаракте. Полученные с помощью мультиплексного анализа данные о содержании 28 цитокинов в слезной жидкости и влаге передней камеры глаза могут служить референсными значениями при изучении данной патологии. Результаты настоящего исследования могут быть использованы в практической работе офтальмологов, а также в преподавании соответствующих разделов на теоретических и клинических кафедрах медицинских вузов.

**Внедрение результатов исследования в практику.** Результаты исследования внедрены в клиническую практику офтальмологического отделения ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», в учебный процесс кафедры глазных болезней ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, научно-практическую деятельность ООО «Академический инновационный научный центр» (г. Екатеринбург).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, из них 6 в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК. Общий объем публикаций – 1,08 печатного листа, авторский вклад 80,97 %.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы, включающего 200 источников, из них 51 отечественный и 149 зарубежных. Работа иллюстрирована 16 таблицами, 5 рисунками.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы исследований.** Проведены исследования цитокинового профиля жидких сред глаза, определена их значимость в патогенезе неоваскулярной формы возрастной макулярной дегенерации в сочетании с возрастной катарактой. Дана оценка эффективности применения комбинированной терапии с одномоментным интраоперационным интравитреальным введением ингибиторов ангиогенеза на основе комплексного клинико-иммунологического и инструментального исследования пациентов, находящихся на лечении в отделении офтальмологии ГБУЗ ЧОКБ. Основную группу исследования составили 52 пациента в возрасте от 47 до 87 лет, средний возраст –  $(68,06 \pm 2,40)$  года, 20 мужчин (38,46 %) и 32 женщины (61,54 %) с нВМД в сочетании с катарактой, которые были распределены на 3 группы исследования: вторую группу составил 21 пациент (21 глаз), которому проводилось комбинированное хирургическое лечение катаракты (факоэмульсификация катаракты + интравитреальное введение интраокулярной линзы) с одномоментным интраоперационным интравитреальным введением ранибизумаба, средний возраст пациентов составил  $(67,70 \pm 3,50)$  года; в третью группу вошли 20 пациентов (20 глаз), которым проводили комбинированное хирургическое вмешательство – ФЭК с имплантацией ИОЛ и одномоментным интравитреальным введением афлиберцепта, средний возраст  $(68,20 \pm 4,30)$  года. Группу сравнения (группа 4) составили 11 пациентов (11 глаз) среднего возраста  $(66,80 \pm 4,40)$

года, которым проводилось только хирургическое лечение катаракты в виде ФЭК с ИОЛ. Контрольную группу 1 составили 14 человек (28 глаз) с соответствием офтальмостатуса возрастной норме, в возрасте от 45 до 86 лет, среднего возраста ( $63,70 \pm 3,60$ ) года, среди которых 9 мужчин (64,2%) и 5 женщин (35,8%). Основные этапы исследования и распределение пациентов по группам представлены на **рисунке 1**.



*Примечание:* нВМД – неоваскулярная возрастная макулярная дегенерация; ФЭК – фактоэмульсификация катаракты; ИОЛ – имплантация интраокулярной линзы; ИВВ – интравитреальное введение.

### Рисунок 1 – Основные этапы исследования

Критериями включения пациентов в группы лечения явились наличие нВМД согласно критериям классификации Международной исследовательской группы International ARM Epidemiologic Study Group (1995), принятой в Генуе (1996), а именно: наличие отслойки пигментного эпителия сетчатки в сочетании с отслойкой нейроэпителия или другими признаками возрастной дегенерации макулы; наличие субретинальной неоваскулярной мембраны; наличие интратретинальных, субретинальных и субпигментно-эпителиальных фиброзно-глиальных изменений или фибриноподобных отложений; субретинальные кровоизлияния, не связанные с другими заболеваниями сетчатки; твердые эксудаты в макулярной области при наличии других признаков экссудативной формы ВМД, не связанные с другими заболеваниями сетчатки, а также наличие центральной или незрелой катаракты II–III плотности по L. Buratto (Buratto L., 2003).

Схема проводимых обследований для всех групп пациентов представлена в таблице 1; методы исследования – в таблице 2.

**Таблица 1 – Обследования, выполняемые в зависимости от группы исследования, и сроки их проведения**

| Обследование                                                                    | Группы                       |                                                                                                                                                                         |                                               |                         |
|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------|
|                                                                                 | Контрольная<br>(группа 1)    | ФЭК + ИОЛ + ИВВ<br>ранибизумаба<br>(группа 2)                                                                                                                           | ФЭК + ИОЛ + ИВВ<br>афлиберцепта<br>(группа 3) | ФЭК + ИОЛ<br>(группа 4) |
| Сбор анамнеза                                                                   | При включении в исследование |                                                                                                                                                                         |                                               |                         |
| Сбор образцов слезной жидкости для иммунологического исследования (n = 80)      | При включении в исследование | При включении в исследование.<br>31-й день после оперативного вмешательства                                                                                             |                                               |                         |
| Сбор образцов влаги передней камеры для иммунологического исследования (n = 52) | –                            | Во время оперативного вмешательства                                                                                                                                     |                                               |                         |
| Стандартное офтальмологическое обследование                                     | При включении в исследование | При включении в исследование.<br>1-й день после оперативного вмешательства.<br>3-й день после оперативного вмешательства.<br>31-й день после оперативного вмешательства |                                               |                         |
| Оптическая когерентная томография макулярной области (n = 66)                   | –                            | При включении в исследование.<br>1-й день после оперативного вмешательства.<br>3-й день после оперативного вмешательства.<br>31-й день после оперативного вмешательства |                                               |                         |

**Таблица 2 – Методы исследования, использованные в работе**

| Клинические методы исследования                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Оценка офтальмопатологии:</b>                                                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- биомикроскопия переднего отдела глаза (щелевая лампа ШЛ-2Б), анализ параметров хрусталика согласно колориметрической классификации L. Buratto (2003);</li> <li>- офтальмотонометрия по Маклакову;</li> <li>- офтальмоскопия – с помощью высокодиоптрийных асферических линз (щелевая лампа, линза 78 D);</li> <li>- визометрия (аппарат Рота с таблицей Сивцева – Головина);</li> <li>- тонометрия (тонометр Маклакова)</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>Инструментальные исследования:</b>                                                                | - оптическая когерентная томография макулярной области – аппарат RTVue Premier («Оптовью», США), оценка морфометрических показателей макулярной области                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Иммунологические методы                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Количественное исследование локальной продукции цитокинов различного биологического действия:</b> | - детекция на приборе Luminex Magpix 100 (США) с помощью набора реактивов для мультиплексного анализа Bio-Rad (США) 28 цитокинов: основного фактора роста фибробластов (bFGF), хемокина-эотаксина (Eotaxin), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора (GM-CSF), интерферона-гамма (IFN- $\gamma$ ), интерлейкинов (IL): IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9; уровни интерферона-гамма индуцибельного белка-10 (IP-10), моноцитарного хемоаттрактантного белка 1 (MCP-1), макрофагальных воспалительных белков 1 $\alpha$ и 1 $\beta$ (MIP-1 $\alpha$ и MIP-1 $\beta$ ), тромбоцитарного фактора роста (PDGF), хемокина, экспрессируемого и секреторируемого Т-клетками при активации (RANTES), фактора некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), трансформирующего фактора роста бета (TGF- $\beta$ ). Количественные результаты выражали в пг/мл |

**Статистические методы.** Статистическую обработку результатов проводили на ПК под управлением операционной системы Windows XP с использованием пакета прикладных программ Statistica v. 10.0 for Windows и IBM SPSS Statistics 19 с применением методов параметрической и непараметрической статистики (Реброва О. И., 2002). Статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$ .

**Методы оперативного и иммуотропного лечения.** Используемые иммуотропные препараты:

- ранибизумаб – фрагмент гуманизированного антитела к фактору роста эндотелия сосудов А (VEGF-A), экспрессируется рекомбинантным штаммом *Escherichia coli* (CAS 347396-82-1);

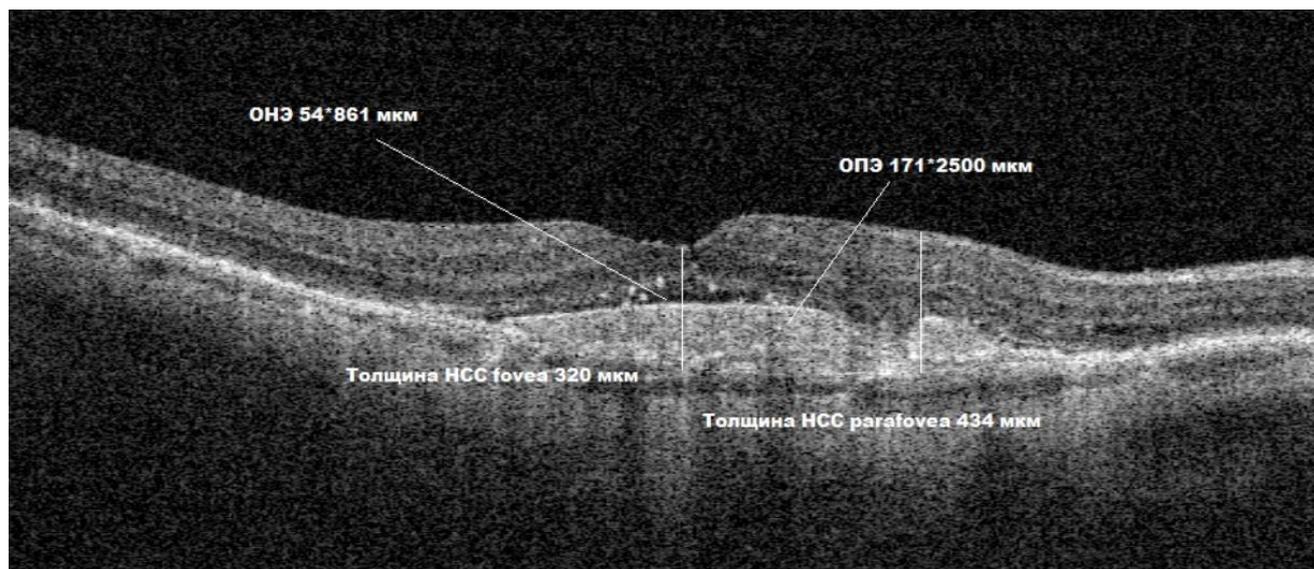
- афлиберцепт – рекомбинантный гибридный белок, состоящий из связывающихся с VEGF (vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов) частей внеклеточных доменов рецептора VEGF-1 и VEGF-2, соединенных с доменом Fc (фрагмент, способный к кристаллизации) IgG1 человека (CAS 862111-32-8).

Комбинированное лечение пациентов с нВМД и катарактой включало хирургический этап: ФЭК выполнялась с помощью офтальмологической микрохирургической системы Stellaris (Bauch & Lomb, USA) через разрез 2,2 мм с соблюдением стандартных протоколов операций (Buratto L., 2003), после завершения ФЭК и имплантации эластичной заднекамерной ИОЛ пациентам выполнялось ИВВ анти-VEGF препарата. Препараты ранибизумаб и афлиберцепт применяли согласно инструкции по медицинскому применению соответствующего препарата по показанию «лечение неоваскулярной (влажной) формы возрастной макулярной дегенерации у взрослых». Ранибизумаб вводили интравитреально в дозе 0,5 мг (0,05 мл), афлиберцепт – в дозе 2 мг (0,05 мл) с соблюдением стандартного протокола интравитреальных инъекций. Инъекцию проводили в одном из меридианов: 1.30, 4.30, 7.30 или 10.30 в 4 мм от лимба, при артификации – в 3 мм от лимба после разметки склерометром. Осложнений в ходе оперативного вмешательства не наблюдали ни в одном случае. В послеоперационном периоде все пациенты получали стандартную терапию, включающую инстилляцию в оперированный глаз антибактериальных препаратов, нестероидных противовоспалительных средств.

Окончательный срок динамического наблюдения за всеми пациентами составлял 31 день (1 месяц), что обусловлено механизмом действия вводимых препаратов.

## Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе исследования проводилась комплексная оценка офтальмологического статуса пациентов клиническими и инструментальными методами. Состояние макулярной области у всех пациентов основной группы по данным спектральной ОКТ (**рисунок 2**) соответствовало критериям классификации Международной исследовательской группы International ARM Epidemiologic Study Group (1995), принятой в Генуе (1996), для постановки диагноза нВМД. Диагноз нВМД был выставлен в соответствии с клинической классификацией возрастной макулярной дегенерации (модифицированной по MPS 1991, TAP 1999, VIP 2001).



*Примечание:* ОПЭ (мкм) – высота отслойки (первая цифра) и протяженность (вторая цифра) пигментного эпителия; ОНЭ (мкм) – высота отслойки (первая цифра) и протяженность (вторая цифра) нейроэпителия сетчатки; толщина НСС fovea, parafovea (мкм) – толщина сетчатки в фовеолярной и парафовеолярной области.

## **Рисунок 2 – Показатели оптической когерентной томографии, используемые для верификации диагноза «неоваскулярная возрастная макулярная дегенерация»**

Исходно в 50% случаев (26 глаз) диагностировали наличие смешанной неоваскулярной мембраны, на 11 глазах (21,2%) диагностировали наличие «классической» неоваскулярной мембраны (2-й тип ХНВ), на 15 глазах (28,8%) – «скрытой» неоваскулярной мембраны (1-й тип ХНВ). В большинстве случаев (39 глаз, 75%) изменения макулярной области характеризовались наличием ОНЭ различной высоты (от 21 до 386 мкм) и протяженности (от 127 до 4120 мкм), ОПЭ была выявлена реже, на 12 глазах (23%), высотой от 50 до 524 мкм и протяженностью от 291 до 4100 мкм. На одном глазу (1,9%) имелись признаки фиброза в макулярной области.

По данным офтальмологического обследования средние значения показателя остроты зрения пациентов группы контроля составляли ( $0,9 \pm 0,05$ ), уровень офтальмотонуса не превышал 20 мм рт. ст. (средний показатель составил ( $18,4 \pm 1,5$ ) мм рт. ст.); по данным ОКТ патологии макулярной области выявлено не было.

Сформированные группы были однородны по возрасту, показателю максимальной корригированной остроты зрения (МКОЗ) и большинству параметров макулярной области по данным ОКТ.

Известно, что иммунная привилегия глаза как органа заключается в обеспечении толерантности по отношению к собственным антигенам, реализуемой за счет ряда механизмов, включающих наличие гематоофтальмического барьера, конституциональной неполноценности дренажной лимфатической системы, слабой экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости МНС I и II типа, феномена ACAID (от англ. anterior chamber associated immune deviation) в субретинальном пространстве, обеспечивающего «иммунное отклонение» при попадании растворимых антигенов в переднюю камеру глаза.

Глазоассоциированная лимфоидная ткань (eye-associated lymphoid tissue – EALT) содержит Т- и В-лимфоциты, плазматические клетки, фибробласты, макрофаги,

дендритные клетки, которые могут мигрировать, взаимодействовать друг с другом посредством активных молекул: цитокинов, молекул адгезии, хемокинов.

Для оценки локального иммунитета слизистой глаза при неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации и катаракте и иммунологической эффективности интраокулярно вводимых ингибиторов ангиогенеза нами в качестве материала для исследования использована слезная жидкость, собранная неинвазивным методом и используемая большинством авторов в научных исследованиях (Schnetlera R., 2012; Santacruz C. et al., 2015). Кроме того, впервые при изучении данной патологии интраоперационно нами отобраны образцы влаги передней камеры глаза для оценки содержания иммунных факторов в сравнении с показателями слезной жидкости.

Патофизиологической основой развития нВМД и ряда сопутствующих патологий, в том числе катаракты, является развитие паравоспалительных и собственно воспалительных изменений в тканях глаза, нарушение целостности гематоретинального барьера, сопровождающееся повышением проницаемости сосудов хориоидеи и сетчатки, усилением процессов неоваскуляризации вследствие повышения экспрессии VEGF.

Во влаге передней камеры глаза у пациентов с неоваскулярной формой ВМД и катарактой методом мультиплексного анализа нами были изучены концентрации ряда провоспалительных и регуляторных цитокинов: TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, интерферона- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ); IP-10, макрофагальных воспалительных белков 1 $\alpha$  и 1 $\beta$  (MIP-1 $\alpha$  и MIP-1 $\beta$ ); bFGF, хемокина эотаксина (Eotaxin), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), GM-CSF, тромбоцитарного фактора роста (PDGF-BB), TGF- $\beta$ , фактора роста эндотелия сосудов (VEGF); хемокина, экспрессируемого и секретируемого Т-клетками при активации (RANTES), моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1) – всего 28 биологически активных веществ, количественное содержание которых выражали в пг/мл.

Наши исследования показали, что слезная жидкость здоровых глаз содержит лабораторно определяемые фоновые концентрации цитокинов, в том числе провоспалительной направленности: TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, при этом концентрация только IFN- $\gamma$  в группе пациентов с нВМД и катарактой была значимо выше, чем в слезе здоровых глаз. Концентрации IP-10, RANTES и MIP-1 $\beta$  значимо превышали уровни данных хемокинов в слезе группы контроля ( $p=0,004$ ,  $p=0,02$  и  $p=0,04$  соответственно), что может отражать процесс привлечения активированных Т-клеток в очаг воспаления. Важнейшим свойством IP-10 является ингибирование ангиогенеза, что в случае формирования неоваскулярной формы ВМД может служить сдерживающим фактором. RANTES (Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted) – хемокин, секретируемый Т-клетками при активации, также является хемоаттрактантом для моноцитов и Т-клеток фенотипа CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>, его концентрация в тканях увеличивается при активации и инфильтрации последних моноцитами. Параллельно с RANTES происходит повышение концентрации MIP-1 $\beta$  в слезной жидкости пациентов с нВМД и катарактой более чем в 2 раза, что может свидетельствовать о повышении хемоаттрактантной активности лейкоцитов за счет повышения внутриклеточной концентрации кальция, повышения экспрессии молекул адгезии. Так, зафиксированные нами повышенные концентрации IFN- $\gamma$ , RANTES и MIP-1 $\beta$  у лиц с нВМД и возрастной катарактой в сравнении с возрастной нормой свидетельствуют о повышении провоспалительного и хемотаксического потенциала ткани EALT.

Изучение концентраций цитокинов с противовоспалительным и регуляторным механизмом действия у пациентов с нВМД и катарактой показало наличие высокого уровня антагониста рецептора к интерлейкину-1 (IL-1RA), что можно расценивать как проявление саногенетических реакций, обеспечивающих защиту тканей глаза от действия провоспалительного цитокина IL-1 путем конкурентного ингибирования гомологичных рецепторов. В то же время молекула IL-1RA обладает рядом эффектов, способствующих локальной вазодилатации путем стимуляции синтеза простагландинов и оксида азота. Также установлено повышение концентрации основного фактора роста фибробластов в слезной жидкости пациентов с нВМД и катарактой, что указывает на его участие в патогенезе данной патологии, учитывая его ангиогенные и репаративные свойства. Нами также зафиксировано многократное повышение концентрации патогенетически значимого в развитии нВМД фактора роста эндотелия сосудов в слезной жидкости на фоне снижения концентрации трансформирующего фактора роста бета, который наряду с другими формирует иммуносупрессивную интраокулярную среду. Снижение концентрации TGF- $\beta$  в слезной жидкости может свидетельствовать о снижении или потере иммунной привилегии глаза и лежать в основе развития аутоиммунных воспалительных и паравоспалительных реакций.

Отсутствие значимых различий по другим биологически активным молекулам в основной группе по сравнению с группой контроля, вероятно, обусловлено тем, что изучаемая патология, нВМД и катаракта, является хроническим процессом.

Развитие нВМД связано с формированием нейродегенеративного поражения глаз, развитием атрофических поражений с неоваскуляризацией сетчатки и активацией системы комплемента, активностью макрофагов, лимфоцитов, тучных клеток, фибробластов, что сопровождается нарушением интраокулярных иммуносупрессивных механизмов, повышением проницаемости гематофтальмического барьера и контактом аутоантигенов глаза с периферическими иммунокомпетентными клетками, что приводит к потере иммунной толерантности. Эти постулаты вполне согласуются с нашими данными, показывающими, что при формировании нВМД в сочетании с возрастной катарактой повышается провоспалительный потенциал EALT (IFN- $\gamma$ , IP-10, RANTES и MIP-1 $\beta$ ), происходит усиление процессов неангиогенеза (bFGF, VEGF) с включением ряда саногенетических реакций (IL-1RA) на фоне изменения иммуносупрессивной интраокулярной среды глаза (TGF- $\beta$ ).

Выявленные нами изменения цитокинового профиля отражают возможное наличие локального ретинального паравоспаления, сопровождаемого активацией микроглии, ретинальной миграцией, активацией системы комплемента в мембране Бруха и на клетках пигментного эпителия сетчатки. В связи с этим нами проведено изучение биологически активных молекул во влаге передней камеры глаза, не имеющей дренирующих лимфатических сосудов, в сравнении с показателями слезной жидкости пациентов с нВМД в сочетании с катарактой и слезной жидкости здоровых глаз.

Мультиплексный анализ определения микроконцентрации иммунных факторов во влаге передней камеры глаза показал наличие всех изучаемых нами цитокинов, но в концентрации на несколько порядков ниже в сравнении с аналогичными показателями в слезной жидкости здоровых и больных глаз, что, возможно, связано с более низким представлением иммунных клеток во внутренней среде глаза, рядом анатомо-физиологических особенностей, связанных с особой структурированностью интерстициального пространства цилиарных отростков и цилиарного тела, наличием внесосудистой циркуляции тканевой жидкости в интерстиции, что создает некую

камерность и обособленность интраокулярных образований и в совокупности делает содержимое влаги передней камеры глаза сравнимым с показателями внутренних жидкостных сред центральной нервной системы (ЦНС). Наибольшее превышение концентрации в слезной жидкости относительно влаги передней камеры было получено для IL-1 $\beta$  (в 21,4 раза), IL-8 (в 18,9 раза) и IP-10 (в 27,9 раза).

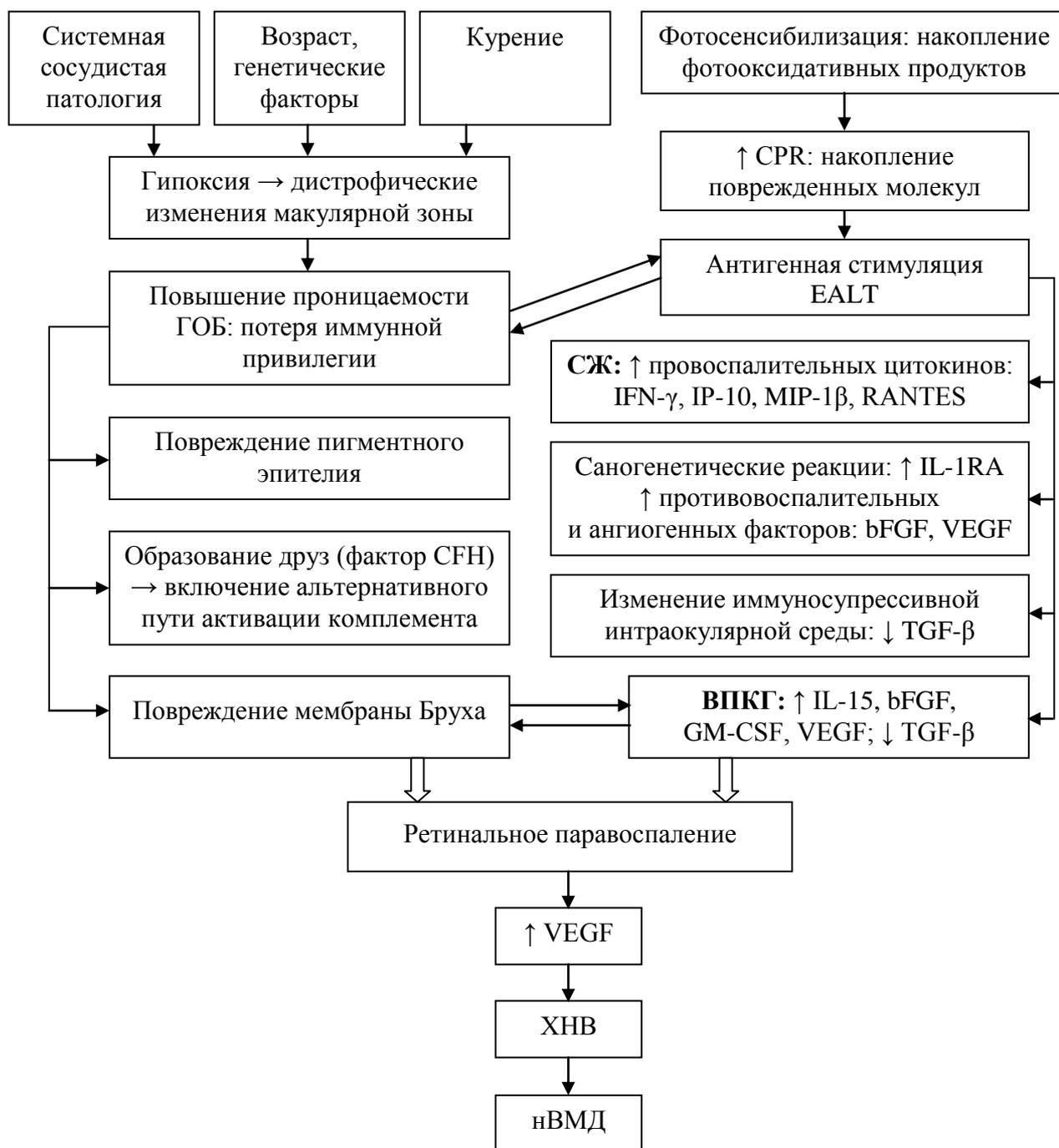
Однако концентрации MIP-1 $\beta$  и RANTES во влаге передней камеры глаза не имели значимых различий с показателями слезной жидкости здоровых глаз, но оставались более низкими в сравнении с показателями слезной жидкости пациентов с нВМД и катарактой.

Ряд исследований подтверждает наличие иммуносупрессивной интраокулярной среды, которая обеспечивается определенным уровнем секреции иммуносупрессивных веществ, низкомолекулярных пептидов – TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -меланоцитстимулирующего гормона ( $\alpha$ -MSH), вазоактивного интестинального пептида (VIP), ассоциированного с геном кальцитонина пептида (CGRP), свободного кортизола, рецепторного антагониста IL-1 (IL-1RA), что способствует подавлению развития внутриглазного воспаления. Так, нами зафиксированы еще более низкие в сравнении со слезной жидкостью больных глаз концентрации TGF- $\beta$ , формирующего наряду с другими иммуносупрессивную интраокулярную среду, способствующую подавлению активации Т-лимфоцитов, НК-клеток, макрофагов EALT.

Во влаге передней камеры глаза концентрация практически всех изучаемых иммунных факторов противовоспалительной направленности, а также факторов роста, за исключением IL-15 и bFGF, достоверно отличалась от таковой в слезной жидкости и также была на несколько порядков ниже. Известно, что основной фактор роста фибробластов выполняет свои функции в основном в головном мозге, в сетчатке глаз, гипоталамических структурах и секретирующих органах (гипофизе, тимусе, коре надпочечников), клетках крови и обладает выраженными ангиогенными свойствами в отношении гипоксически измененных тканей мозга и интраокулярных структур, в частности при атрофии пигментного эпителия сетчатки и мембране Бруха. При развитии неоваскулярной формы ВМД активация комплемента по альтернативному пути участвует в процессах хориоидальной неоваскуляризации, следствием которой является стимуляция выработки bFGF и VEGF, основных индукторов неоангиогенеза. В процессах морфогенеза сосудистых образований именно bFGF способствует синтезу коллагена, опосредованного активацией рецепторов VEGFR-1 и включением с-Акт модулин/кальмодулин-зависимого сигнала в обновляемых структурах.

Особо следует подчеркнуть, что во влаге передней камеры пациентов с нВМД и катарактой нами зафиксирована достоверно более высокая в сравнении с показателями в слезной жидкости здоровых глаз концентрация VEGF, что свидетельствует об усилении интраокулярных ангиогенных сигналов при развитии данной патологии.

Кроме того, во влаге передней камеры больных глаз нами документировано повышение концентрации GM-CSF, относящегося к группе гранулоцитарно-макрофагальных колониестимулирующих факторов вместе с IL-3 и IL-5. Известно, что GM-CSF активирует Th1-зависимый иммунный ответ, способен стимулировать ангиогенез, развитие аутоиммунных поражений, заболеваний и воспаления, что вполне соответствует концепции патогенеза нВМД. Схематически патогенез формирования нВМД представлен на **рисунке 3**.



*Примечание:* ГОБ – гематофтальмический барьер; EALT – глазоассоциированная лимфоидная ткань; СЖ – слезная жидкость; ВПКГ – влага передней камеры глаза; ХНВ – хориоидальная неоваскуляризация.

### Рисунок 3 – Иммунопатогенез nВМД

В целом полученные нами данные о содержании иммунных факторов различной функциональной направленности, хемокинов и факторов роста в слезной жидкости и влаге передней камеры глаза пациентов с nВМД в сочетании с катарактой свидетельствуют о наличии иммунологического дисбаланса, заключающегося в увеличении концентрации провоспалительных факторов (IFN- $\gamma$ ), хемокинов (IP-10), макрофагального воспалительного белка (MIP-1 $\beta$ ), что отражает наличие реакций

иммунного реагирования, отвечающих концепции «паравоспаления», сопровождающегося изменением иммуносупрессивной интраокулярной среды (снижение концентрации TGF- $\beta$ ), наряду с включением саногенетических механизмов (повышение уровня IL-1RA в качестве «ловушки» растворимого IL-1) и активацией неоангиогенеза, о чем свидетельствует повышение концентрации VEGF, bFGF и GM-CSF в слезной жидкости и влаги передней камеры глаза.

Полагаем, что в силу анатомо-физиологических особенностей строения передней камеры глаза, ее функционально-структурной обособленности и функциональной схожести с ЦНС, а также в связи с наличием выраженной интраокулярной иммуносупрессивной среды некорректно проводить оценку иммунных процессов, происходящих во внутренних средах глаза, на основании иммунных показателей, полученных в слезной жидкости, поскольку последняя содержит секреторные продукты EAAT, структурные элементы которой относятся к периферическому отделу иммунной системы.

После проведенного оперативного вмешательства – ФЭК с имплантацией ИОЛ у всех пациентов отмечали повышение МКОЗ в среднем на 1 строку по таблице Сивцева – Головина уже на первый день после операции, на последующих сроках наблюдения МКОЗ продолжала нарастать и к 31-му дню после вмешательства в среднем увеличилась на 3 строки, составив  $(0,49 \pm 0,1)$ . Полученные с помощью спектральной ОКТ результаты свидетельствуют о том, что проведение ФЭК с имплантацией ИОЛ у пациентов с сочетанной патологией – нВМД и возрастной катарактой приводит к повышению остроты зрения и не ухудшает течение нВМД в раннем послеоперационном периоде по данным ОКТ макулярной области.

Ведущее значение в патогенезе неоваскулярной формы ВМД имеет фактор роста эндотелия сосудов, являющийся мощным полифункциональным цитокином и необходимым фактором репаративных процессов и неоангиогенеза. Гиперпродукция VEGF при формировании нВМД, связанная с гипоксией пигментного эпителия и наружных слоев сетчатки, чрезмерной активацией рецепторов к VEGF-A, приводит к патологической неоваскуляризации в хориокапиллярном слое и прорастанию новообразованных сосудов в сетчатку, их повышенной проницаемости, развитию отека макулы и кровоизлияниям в сетчатку. Одним из эффективных современных методов лечения данной патологии является применение препаратов на основе фрагментов моноклональных антител к изоформам VEGF.

Исходя из современных представлений о патогенезе нВМД и катаракты и согласно задачам исследования с помощью мультиплексного анализа нами проведено динамическое исследование концентрации 28 биологически активных молекул в слезной жидкости пациентов с нВМД и катарактой до и на 31-й день (1 месяц) после оперативного вмешательства в виде фактоэмульсификации катаракты с имплантацией интраокулярной линзы в комбинации с одномоментным интраоперационным интравитреальным введением ингибиторов неоангиогенеза ранибизумаба или афлиберцепта.

Ранибизумаб избирательно связывается с изоформами фактора роста эндотелия сосудов, VEGF-A (VEGF110, VEGF121, VEGF165), и предотвращает взаимодействие VEGF-A с его рецепторами на поверхности клеток эндотелия (VEGFR-1 и VEGFR-2), что приводит к подавлению неоваскуляризации и пролиферации сосудов.

Афлиберцепт действует как растворимый рецепторный «белок-ловушка», блокирует передачу сигналов через соответствующие рецепторы, подавляя пролиферацию эндотелиальных клеток, тем самым угнетая неоангиогенез.

Согласно нашим исследованиям, исходная концентрация изучаемых иммунных факторов в слезной жидкости до лечения и на 31-й день (1 месяц) после ФЭК с имплантацией ИОЛ не имела статистически значимых различий по всем показателям, что свидетельствует об отсутствии влияния проведенной ФЭК с ИОЛ на процессы интраокулярного иммунного реагирования.

Поскольку все пациенты, принимающие участие в настоящем исследовании, имели сочетанную патологию в виде нВМД и катаракты, во время проведения ФЭК с ИОЛ (группа 2) 21 пациенту (21 глаз) проведено интравитреальное введение ранибизумаба, а 20 пациентам (группа 3) после ФЭК с ИОЛ во время оперативного вмешательства проведено интравитреальное введение афлиберцепта.

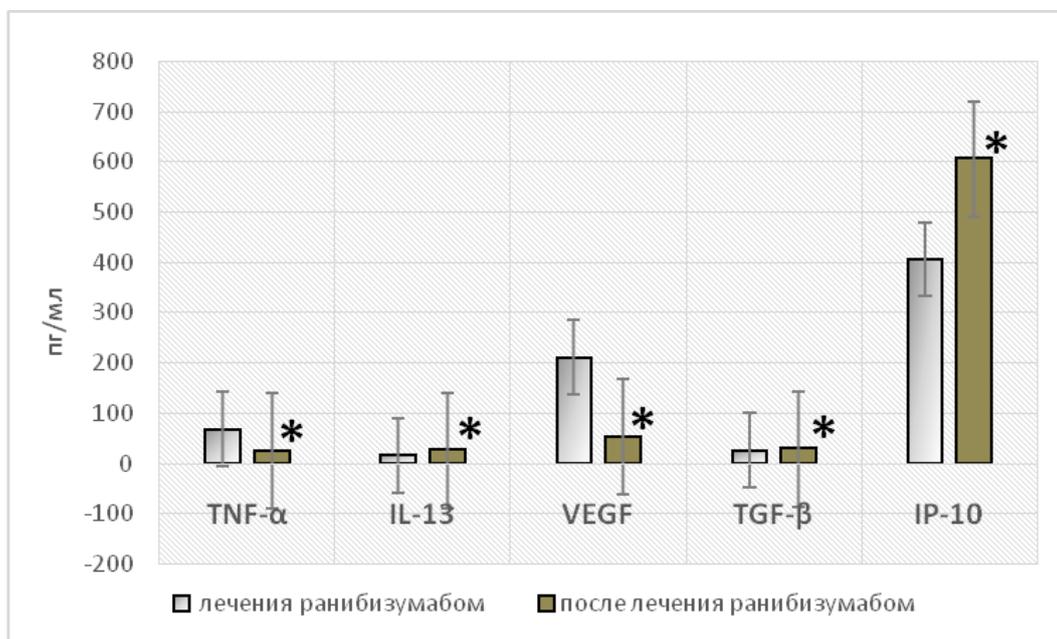
Для оценки влияния одномоментной ФЭК с имплантацией ИОЛ и ИВВ ингибиторов ангиогенеза ранибизумаба и афлиберцепта на состояние макулярной области у лиц с нВМД отдельно был проведен анализ динамики остроты зрения и параметров макулярной области по данным ОКТ во второй (ФЭК + ИОЛ + ИВВ ранибизумаба) и третьей (ФЭК + ИОЛ + ИВВ афлиберцепта) группах исследования. Согласно данным ОКТ, интравитреальное введение ранибизумаба приводит к значимым изменениям морфометрических показателей через 31 день от начала терапии в виде уменьшения толщины сетчатки в фовеолярной области, высоты и протяженности ОНЭ, ОПЭ и повышения остроты зрения в среднем на 0,13 уже на первый день после ФЭК + ИОЛ + ИВВ ранибизумаба. Это связано прежде всего с хирургией катаракты. Толщина сетчатки в парафовеолярной области на 31-й день имела стойкую тенденцию к снижению. Применение в комбинированной терапии с ФЭК + ИОЛ интравитреального введения афлиберцепта также приводит к улучшению МКОЗ уже на первые сутки после операции и положительной динамике показателей ОКТ: значимому уменьшению толщины сетчатки в фовеолярной и парафовеолярной области за счет уменьшения отека, снижению высоты и протяженности ОНЭ и ХНВ, протяженности ОПЭ на 31-й день после оперативного вмешательства с ИВВ афлиберцепта.

В динамике, на 31-й день (1 месяц) после ФЭК с ИОЛ и ИВВ ранибизумаба, концентрации практически всех изучаемых цитокинов провоспалительного действия и хемокинов значимо не отличались от показателей до лечения, за исключением выраженного снижения (в 2,8 раза) концентрации TNF- $\alpha$  и роста уровня хемокина субсемейства СХС макрофагального происхождения IP-10, обладающего, помимо свойств хемоаттракции, еще и выраженными антиангиогенными свойствами, что свидетельствует об изменении иммунного профиля слезной жидкости после введения ранибизумаба. Изменился также и противовоспалительный профиль слезной жидкости в виде двукратного повышения уровня IL-13, секреторного продукта активированных Th2-лимфоцитов, тогда как известны его противовоспалительные свойства, аналогичные IL-4, реализуемые через запуск системы Jak1 и Jak3 с инициацией каскада формирования лимфоцитов Th2 фенотипа, что приводит к переключению иммунного ответа по типу Th2 с последующим переключением класса генов иммуноглобулина в В-клетках.

Кроме того, IL-13 подавляет реализацию иммунопатологических реакций II типа (антителозависимая клеточная цитотоксичность и антителозависимый фагоцитоз), блокирует спонтанную и индуцированную продукцию супероксидных радикалов и провоспалительных цитокинов – IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  иммунными клетками.

После проведения ФЭК с ИОЛ и ИВВ ранибизумаба изменилась концентрация и патогенетически значимого фактора роста эндотелия сосудов: так, уровень VEGF

в слезной жидкости после введения ранибизумаба снизился более чем в 4 раза. Это является следствием реализации блокирующего действия препарата на свободные изоформы VEGF, что препятствует его связыванию со специфическими рецепторами на мембранах клеток (**рисунок 4**).

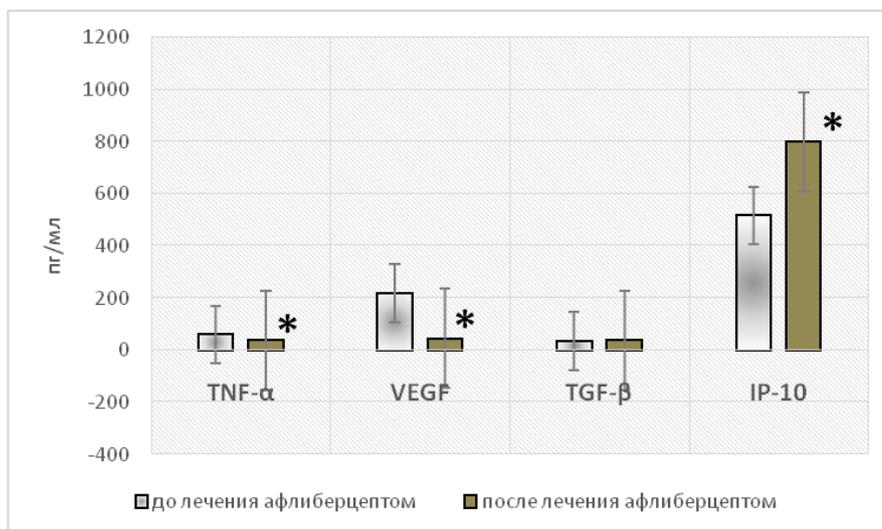


*Примечание:* TNF-α – фактор некроза опухоли альфа, IL-13 – интерлейкин-13, VEGF – фактор роста эндотелия сосудов, TGF – трансформирующий фактор роста бета, IP-10 – интерферон-гамма индуцибельный белок-10.

**Рисунок 4. Уровни про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста в слезной жидкости, значимо ( $p < 0,05$ ) изменившиеся в динамике на 31-й день после проведения факэмульсификации катаракты с имплантацией интраокулярной линзы и одномоментным интравитреальным введением ранибизумаба**

А учитывая, что нами не обнаружено значимых различий цитокинового спектра слезной жидкости до и после ФЭК с ИОЛ на 31-й день (1 месяц) после оперативного вмешательства, изменения в содержании цитокинов следует считать обусловленными именно введением препарата.

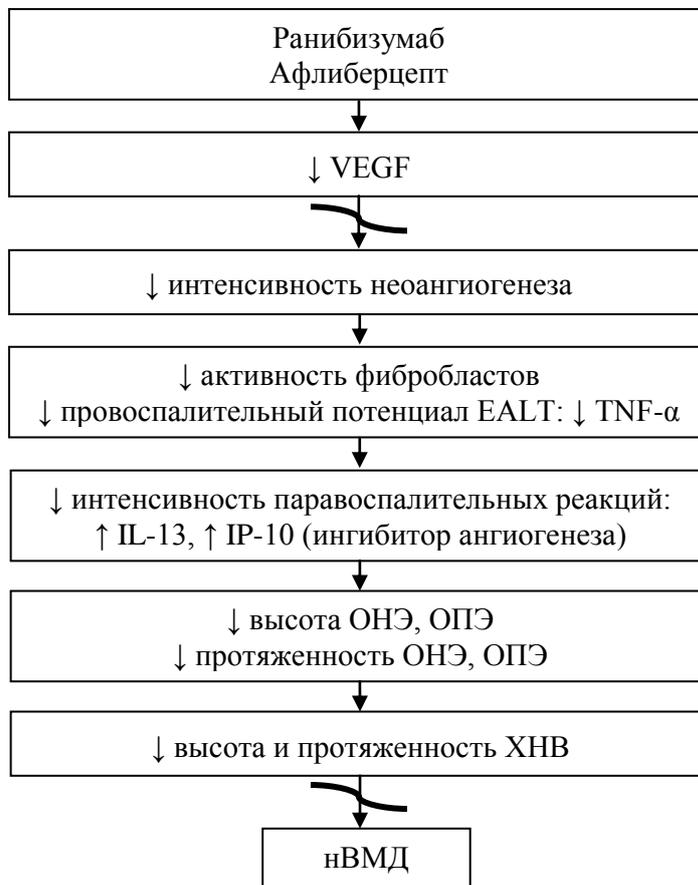
Сравнительная оценка цитокинового спектра в динамике на 31-й день (1 месяц) после ФЭК с ИОЛ и ИВВ афлиберцепта показала однотипные с ранибизумабом изменения в количественном содержании цитокинов в слезной жидкости. После лечения значимо (в 1,6 раза) снизился уровень TNF-α, 4-кратно снизился уровень VEGF на фоне роста показателя IP-10, что, с одной стороны, отражает эффективность применения ингибитора ангиогенеза, с другой – свидетельствует о снижении провоспалительного потенциала EALT (**рисунок 5**). Следует учесть, что обнаруженные нами изменения цитокинового профиля слезной жидкости после применения афлиберцепта и ранибизумаба были однонаправлены и идентичны как по качественному, так и по количественному критериям.



*Примечание:* TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа, VEGF – фактор роста эндотелия сосудов, TGF – трансформирующий фактор роста бета, IP-10 – интерфероном-гамма индуцибельный белок-10.

**Рисунок 5. Уровни про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста в слезной жидкости, значимо ( $p < 0,05$ ) изменившиеся в динамике на 31-й день после проведения факэмульсификации катаракты с имплантацией интраокулярной линзы и интравитреальным введением афлиберцепта**

Обобщенный механизм иммунокорригирующего действия ингибиторов ангиогенеза представлен на **рисунке 6**.



**Рисунок 6 – Иммунокорригирующее действие ингибиторов ангиогенеза (ранибизумаба и афлиберцепта) при комбинированном лечении нВМД и катаракты**

Таким образом, полученные нами новые данные об изменении цитокинового профиля слезной жидкости и влаги передней камеры глаза, заключающемся в снижении уровня патогенетически значимого VEGF и изменении провоспалительного профиля реагирования глазоассоциированной лимфоидной ткани на введение ингибиторов ангиогенеза, доказывают наличие иммуотропного действия последних и позволяют сделать вывод о целесообразности проведения комбинированного лечения данной сочетанной патологии с интравитреальным введением ранибизумаба или афлиберцепта.

## ВЫВОДЫ

1. Формирование неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации в сочетании с возрастной катарактой сопровождается повышением провоспалительного потенциала глазоассоциированной лимфоидной ткани (рост уровней IFN- $\gamma$ , IP-10, RANTES и MIP-1 $\beta$  в слезной жидкости), усилением процессов неоваскуляризации (увеличение концентраций bFGF, VEGF), включением ряда саногенетических реакций (рост содержания IL-1RA) на фоне изменения иммуносупрессивной интраокулярной среды глаза (снижение уровня TGF- $\beta$ ), что в целом отвечает концепции «паравоспаления».

2. Концентрация провоспалительных цитокинов и хемокинов во влаге передней камеры глаза в несколько раз ниже в сравнении с аналогичными показателями в слезной жидкости здоровых и больных глаз, что связано с анатомо-физиологическими особенностями интраокулярного региона глаза. Наибольшее превышение концентрации в слезной жидкости относительно влаги передней камеры было отмечено для IL-1 $\beta$  (в 21,4 раза), IL-8 (в 18,9 раза) и IP-10 (в 27,9 раза).

3. Во влаге передней камеры глаза пациентов с неоваскулярной возрастной макулярной дегенерацией и катарактой имела место достоверно более высокая в сравнении с показателями в слезной жидкости здоровых глаз концентрация фактора роста эндотелия сосудов, bFGF и GM-CSF и снижение уровня TGF- $\beta$ , что свидетельствует о наличии иммунологического дисбаланса при данной патологии, усилении ангиогенных сигналов и формировании иммуносупрессивной интраокулярной среды.

4. Проведение факоэмульсификации катаракты с имплантацией интраокулярной линзы у пациентов с сочетанной патологией – неоваскулярной возрастной макулярной дегенерацией и катарактой приводит к повышению остроты зрения и не ухудшает течение неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации в послеоперационном периоде; комбинированная терапия с интравитреальным введением ранибизумаба или афлиберцепта приводит к значимым изменениям морфометрических показателей в динамике через 1 месяц от начала терапии в виде уменьшения толщины сетчатки в фовеолярной и парафовеолярной области, высоты и протяженности отслойки нейроретина, пигментного эпителия.

5. Через 1 месяц после проведения комбинированного хирургического лечения с одномоментным интравитреальным введением ранибизумаба в слезной жидкости снизилась концентрация TNF- $\alpha$ , отмечен рост уровня антиангиогенного IP-10 и IL-13 и снижение – фактора роста эндотелия сосудов, что является следствием реализации блокирующего действия препарата на свободные изоформы VEGF, препятствующего его связыванию со специфическими рецепторами на мембранах клеток.

6. В динамике через 1 месяц после комбинированного лечения – факоэмульсификации катаракты с имплантацией интраокулярной линзы

и интравитреального введения афлиберцепта значимо (в 1,6 раза) снизился уровень TNF- $\alpha$ , 4-кратно снизилась концентрация VEGF на фоне роста показателя IP-10, что, с одной стороны, отражает эффективность применения ингибиторов ангиогенеза, с другой – свидетельствует о снижении провоспалительного потенциала глазоассоциированной лимфоидной ткани.

### Практические рекомендации

1. Учитывая иммунокорригирующее действие ингибиторов ангиогенеза, пациентам с сочетанной патологией – неоваскулярной возрастной макулярной дегенерацией и катарактой целесообразно проводить комбинированное хирургическое вмешательство с одномоментным интраоперационным интравитреальным введением ранибизумаба или афлиберцепта.

2. В составе комбинированной терапии лицам с сочетанной патологией – неоваскулярной возрастной макулярной дегенерацией и катарактой ранибизумаб вводить одномоментно интраоперационно интравитреально в дозе 0,5 мг (0,05 мл); афлиберцепт вводить интравитреально в дозе 2 мг (0,05 мл) с соблюдением протокола интравитреальных инъекций.

3. Полученные с помощью мультиплексного анализа данные о содержании 28 цитокинов в слезной жидкости и влаге передней камеры глаза рекомендовано использовать в качестве референсных значений при изучении данной патологии.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

#### *Публикации в изданиях, рецензируемых ВАК:*

1. **Кузнецов, А.А.** Взаимосвязь иммунологического профиля внутриглазной жидкости и морфометрических показателей сетчатки при неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации / А.А. Кузнецов, Е.В. Тур, А.М. Быстров // Медицинская иммунология. - 2017. - Т. 19. - № 5. - С. 318.

2. **Кузнецов, А.А.** Оценка влияния интравитреального введения ранибизумаба на иммунный статус слезы у лиц с возрастной макулярной дегенерацией / А.А. Кузнецов, Е.В. Тур, К. С. Ишмаков // Российский иммунологический журнал. - 2017. - Т. 11 (20). - № 2. - С. 159–161.

3. Эффективность применения афлиберцепта у лиц с неоваскулярной возрастной макулярной дегенерацией в сочетании с хирургией катаракты / А.А. Кузнецов, Е.В. Тур, А.В. Зурочка, В.С. Рыкун // Российский офтальмологический журнал. - 2017. - Т. 10. - № 4. - С. 20–28.

4. **Кузнецов, А.А.** Оценка уровня цитокинов слезы у условно здоровых лиц в возрасте старше 50 лет / А.А. Кузнецов, Е.В. Тур, К.С. Ишмаков // Российский иммунологический журнал. - 2016. - Т. 10 (19). - № 3. - С. 294–296.

5. Тур, Е.В. Оценка уровня цитокинов слезы у пациентов с неоваскулярной возрастной макулярной дегенерацией / Е.В. Тур, **А.А. Кузнецов**, А.М. Быстров // Российский иммунологический журнал. - 2016. - Т. 10 (19). - № 3. - С. 361–362.

6. Динамика морфометрических параметров макулярной зоны по данным оптической когерентной томографии у пациентов с возрастной макулярной дегенерацией после фактоэмульсификации катаракты с имплантацией интраокулярной

линзы / А.А. Кузнецов, Е.В. Тур, Н.В. Кузнецова, А.М. Быстров // Вестник Оренбургского государственного университета. - 2014. - № 12 (173). - С. 190–194.

***Публикации в других изданиях:***

**1. Кузнецов, А.А.** Оценка эффективности лечения сочетанной патологии – катаракты и возрастной макулярной дегенерации – при одномоментном интравитреальном введении ранибизумаба и фактоэмульсификации катаракты с имплантацией интраокулярной линзы / Е.В. Тур, Н.В. Кузнецова // Современные технологии в офтальмологии. - 2015. - № 1. - С. 88–89.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ВМД – возрастная макулярная дегенерация  
 ИВВ – интравитреальное введение  
 ИОЛ – интраокулярная линза  
 МКОЗ – максимальная корригированная острота зрения  
 нВМД – неоваскулярная возрастная макулярная дегенерация  
 ОКТ – оптическая когерентная томография  
 ОНЭ – отслойка нейроэпителия  
 ОПЭ – отслойка пигментного эпителия  
 ФЭК – фактоэмульсификация катаракты  
 ХНВ – хориоидальная неоваскуляризация  
 ЦНС — центральная нервная система  
 bFGF – основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor)  
 EALT – глазоассоциированная лимфоидная ткань (eye-associated lymphoid tissue)  
 GM-CSF – гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (granulocyte-monocyte colony-stimulating factor)  
 IFN – интерферон (interferon)  
 IL – интерлейкин (interleukin)  
 IP-10 – интерфероном-гамма индуцибельный белок-10 (interferon-gamma inducible protein-10)  
 MIP – макрофагальный воспалительный белок (macrophage inflammatory protein)  
 NK – натуральные киллеры  
 RANTES – хемокин, экспрессируемый и секретируемый Т-клетками при активации (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted)  
 TGF – трансформирующий фактор роста (transforming growth factor)  
 TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor alpha)  
 VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor)

*На правах рукописи*

**КУЗНЕЦОВ АНДРЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ  
ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ  
НЕОВАСКУЛЯРНОЙ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ  
ДЕГЕНЕРАЦИИ И КАТАРАКТЫ**

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология  
14.01.07 – глазные болезни

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

---

Подписано в печать \_\_.\_\_.2021. Формат 60 × 84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Усл. печ. л. \_\_\_\_.  
Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman сур.  
Печать лазерная. Тираж \_\_\_\_ экз. Заказ № \_\_\_\_.

Отпечатано в