

*На правах рукописи*

**ГЕВОРКЯН АРМИНЕ СЕЙРАНОВНА**

**КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ  
ПРИРОДНЫХ ИНГИБИТОРОВ АНГИОГЕНЕЗА ПРИ  
НЕОВАСКУЛЯРНОЙ ФОРМЕ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ  
ДЕГЕНЕРАЦИИ.**

3.1.5. Офтальмология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва -2022

Работа выполнена на кафедре офтальмологии Академии постдипломного образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (АПО ФГБУ ФНКЦ ФМБА России), г. Москва

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор **Лихванцева Вера Геннадьевна**

**Официальные оппоненты:**

**Володин Павел Львович** - доктор медицинских наук, Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий отделом лазерной хирургии сетчатки

**Файзрахманов Ринат Рустамович** - доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой глазных болезней Института усовершенствования врачей Федерального Государственного Бюджетного Учреждения Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации (ИУВ ФГБУ «НМХЦ им.Н.И.Пирогова» Минздрава России).

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт глазных болезней» имени М.М. Краснова (ФГБНУ «НИИГБ» им. М.М. Краснова)

Защита диссертации состоится « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 г. в \_\_\_\_\_ на заседании диссертационного совета 68.1.010.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФМБА России) по адресу: 125371, Москва, Волоколамское шоссе, д. 91.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, по адресу: 125371, Москва, Волоколамское шоссе, д. 91 и на сайте диссертационного совета <http://medprofedu.ru>

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук,

профессор

Овечкин Игорь Геннадьевич

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы и степень ее разработанности

Неуклонный рост продолжительности жизни в сочетании со снижением деторождаемости повышает актуальность заболеваний глаз, ассоциированных с пожилым возрастом, включая возрастную макулярную дегенерацию сетчатки (ВМД). ВМД возглавляет список поставщиков необратимой слепоты пожилых лиц в развитых странах. Заболевание проявляется двумя клиническими фенотипами (сухая и экссудативная или неоваскулярная, нВМД). В отсутствие лечения нВМД приводит к потере зрения в течение 2-5 лет. Маркером нВМД является неоангиогенез, именуемый согласно последней международной классификации макулярной неоваскуляризацией (МНВ) (FARVO, 2021). Установлено, что источником новообразованных сосудов МНВ могут быть не только хориоидальные сосуды, но и сосуды глубокого ретинального сплетения (Spaide, 2021). За последнее десятилетие в лечении МНВ в арсенале офтальмологов появилось несколько поколений антиангиогенных препаратов, действие которых направлено на блокировку фактора роста сосудистого эндотелия (vascular endothelial growth factor, VEGF). На сегодняшний день интравитреальные инъекции (ИВИ) ангиостатиков, признаны «золотым стандартом» лечения МНВ (Будзинская М.В., 2018, 2020, 2022; Педанова Е.К., 2021; Файзрахманов Р.Р., 2016, 2018, 2021; Peden M.C., 2015; Johnston S.S., 2013, Hassan M., 2016; Papadopoulos Z., 2019). Благодаря этой технологии частота слепоты при МНВ снизилась на 46% в США, на 50% в Дании и Израиле. Анти-VEGF-препараты используют в качестве первой линии терапии (Файзрахманов Р.Р., 2019; Астахов Ю.С., 2019; Зайцева О.В., 2021; Нероев В.В., 2021, 2022; Sloan F.A., 2014, Bloch S.B., 2012; Skaat A., 2012). Первоначальная концепция этой таргетной технологии строилась на основе факта, что молекула VEGF — самый мощный и доминирующий медиатор, запускающий и поддерживающий патологический ангиогенез при МНВ путем рецептор-лигандного взаимодействия. Блокирование этой молекулы должно прервать стимулы к росту новых сосудов и привести к запустеванию новообразованных сосудов. Для прерывания каскада VEGF предложено 2 основных подхода: блокаду лиганда (антителами к VEGF, растворимыми рецепторами или фузионными белками) и блокаду тирозинкиназных рецепторов (антителами к рецепторам), расположенных на мембране эндотелиальной клетки сосудов. Существенным недостатком технологии является кратковременность эффекта. Наш арсенал анти-VEGF-препаратов быстро пополняется. При этом стойкость терапевтического эффекта от препарата к препарату увеличивается незначительно. В опросе, проведенном в 2018 году в США, 73,2% опрошенных ретинологов указали на необходимость снижения нагрузки на лечение, а 56,3% указали на потребность в пролонгированном препарате, обеспечивающем стойкий эффект. Наряду с этим, выявлена когорта пациентов, не отвечающих на ИВИ анти-VEGF-препаратов

- так называемых нереспондентов. Системный (post hoc) мета-анализ исследований, проведенных в различных регионах мира и в разных этнических группах показал распространенность первичной резистентности (18-22,2%), тахифилаксии (8,9%-12,7%) и толерантности (2-10%) к анти-VEGF-терапии (Bontzos G., 2020; Freund K.B., 2022; Mathis T., 2022; Zuber-Lascawiec K., 2019; Hara C., 2019; Amoaku WM, 2015,2021; Krebs I., 2013; Gasperini J.L., 2012). Применение анти-VEGF-терапии у таких нереспондентов приводит к неоправданной потере времени, уменьшает их шансы на сохранение зрительных функций.

К настоящему времени установлено, что способностью стимулировать ангиогенез, наряду с VEGF, обладают многие ростовые факторы: фибробластный фактор роста (bFGF), фактор роста тромбоцитов (platelet-derived growth factor, PDGF), ангиопоэтин -1 и -2 (ang-1, ang-2) и еще около трех десятков молекул, а триггером к запуску ангиогенеза признан дисбаланс про- и антиангиогенных факторов. Причем, чем больше он выражен, тем больше ошибок в «конструкции» вновь построенных сосудов: неправильная пространственная ангиоархитектоника дополняется неполноценной мозаичной структурой сосудистой стенки без выстилки эндотелиальными клетками (ЭК), облегчая доставку питательных веществ ишемизированным тканям. Чем дольше длится неангиогенез, тем больше появляется молекулярных «игроков на поле». В построении таких сосудов принимают участие белки экстраклеточного матрикса и матриксные металлопротеиназы. Блокируя молекулу VEGF или рецепторы VEGF, мы воздействуем лишь на одно звено патогенеза, не влияя на восстановление молекулярного баланса. Более того, блокировка молекулы VEGF способна привести к развитию обходных молекулярных шунтов ангиогенеза, например, через молекулу bFGF. Контроль регуляции ангиогенеза предполагает реализацию комплекса механизмов, участвующих в образовании сосудов. Рычаги воздействия на разных этапах ангиогенеза меняются: от подавления пролиферации и миграции ЭК, формирования капилляроподобных структур на ранних этапах до ингибирования ангиогенеза и резорбции новообразованных сосудов с аномальной стенкой на поздних стадиях. На необходимость расширения терапевтического арсенала нВМД указывают публикации, свидетельствующие о важной роли воспаления в патогенезе заболевания (Zuber-Laskawiec K., *et al.* 2019; Schaal S., *et al.* 2018; Forooghian F, *et al.* 2009; Eghøj MS, *et al.* 2012; Gasperini JL, , *et al.* 2012; Bakall B. УЕ *et al.* 2013.). Таким образом, ранняя диагностика рефрактерных форм нВМД к анти-VEGF-терапии и разработка альтернативных технологий, направленных на прерывание патологического ангиогенеза у пациентов с нВМД являются актуальными проблемами, требующими всестороннего изучения.

**Цель работы:** обосновать клинически и экспериментально возможность применения природных ингибиторов ангиогенеза у больных МНВ.

#### **Задачи исследования**

1. Исследовать истинную распространенность нереспондентов среди больных МНВ, получавших препараты 1 линии антиангиогенной терапии.
2. Изучить доминирующие клинические фенотипы нереспондентов среди больных МНВ, получавших препараты 1 линии терапии, с позиции прогнозирования ответа на лечение на этапе первичной диагностики.
3. Определить количественные показатели про- и антиангиогенных факторов в стекловидной жидкости больных МНВ, получавших препараты 1 линии антиангиогенной терапии для уточнения возможных причин неэффективности анти-VEGF-терапии.
4. Изучить возможности применения альтернативных технологий на основе доклинической оценки эффективности природных ангиостатиков в эксперименте на моделях лимбороговичной и хориоретинальной неоваскуляризации глаз лабораторных животных.
5. Научно обосновать и разработать перспективные подходы к оптимизации стратегии лечения больных МНВ.

#### **Научная новизна работы**

Впервые установлена распространенность нереспонденции (72,7%) к антиангиогенным препаратам 1 линии терапии среди больных МНВ и описаны клинические фенотипы нереспондентов.

Впервые изучены количественные показатели про- и антиангиогенных факторов в стекловидной жидкости больных МНВ и продемонстрирована реверсия ангиогенного фенотипа в сторону провоспалительных молекул ( $FGFb \geq 10,8$  пг/мл, ИЛ-8  $\geq 22,9$  пг/мл), что может служить возможной причиной неэффективности VEGF-зависимых технологий.

Впервые на экспериментальных моделях роговичной и хориоретинальной неоваскуляризации глаз лабораторных животных с помощью 13 экспертных критериев оценки доказана эффективность антиангиогенной терапии эндостатином (7,6 нг), тумстатином (1мкг и 4 мкг) и PEDF (1мкг и 4 мкг).

#### **Практическая значимость исследования**

Разработаны рекомендации по отбору нереспондентов на основании оценки их клинического и ОКТ фенотипа на этапе первичной диагностики МНВ.

Разработан, предложен и апробирован способ прогнозирования терапевтического ответа на анти-VEGF-технологии на основе количественных показателей про- и антиангиогенных показателей стекловидной жидкости глаз больных МНВ.

Изучены и представлены клинико-морфологические доказательства ангиостатических эффектов эндостатина, тумстатина и PEDF, позволяющие обосновать подходы к их применению.

Разработана, апробирована и предложена к практическому применению в экспериментальной офтальмологии система доклинической оценки эффективности ангиостатиков на основе комплекса из 13 экспертных критериев оценки.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

Предложен персонифицированный подход к отбору больных МНВ при назначении ангиостатической терапии на основе ОКТ признаков субретинальной и интравитреальной экссудации (SRF-/IRF-; SRF+/IRF-) и концентрации цитокинов (ИЛ-8, FGFb) в стекловидной жидкости, с своевременным применением нескольких лечебных стратегий, направленных на подавление разных механизмов ангиогенеза.

Обоснован подход к оптимизации стратегии лечения с возможностью применения альтернативных или сочетанных технологий с включением природных эндогенных ингибиторов ангиогенеза - рекомбинантных пептидов эндостатина, тумстатина и PEDF, для нереспондентов к VEGF-зависимым препаратам.

#### **Апробация работы и публикации**

Материалы работы доложены на научно-практической конференции по витреоретинальной хирургии с международным участием в Уфе (2022г).

Диссертация апробирована на кафедре офтальмологии Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России (15.06.2022г.).

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 6 статей, опубликованных в ведущих рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

#### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 131 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материал и методы исследований», 3-х глав, отражающих результаты собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложений. Работа иллюстрирована 48 рисунками, 22 таблицами.

### **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

#### **Материал и методы**

Работа выполнялась в период 2017-2022г на базах кафедры офтальмологии Академии постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» г Москвы. Диссертация состоит из двух этапов.

*Первый этап* посвящен изучению распространенности нереспонденции к лечению анти-VEGF-препаратами среди больных МНВ. На основе анализа данных ОКТ идентифицировали биомаркеры плохого ответа к традиционному лечению.

В аспекте изучения причин нереспонденции выполняли иммунологические исследования стекловидной жидкости глаз (СТЖ) на фоне введения ангиостатиков. Определяли концентрацию 8 анти- и проангиогенных цитокинов, которые могли быть драйверами альтернативных путей ангиогенеза. Полученные данные объяснили причины развития резистентности и обосновали поиск альтернативных технологий лечения МНВ.

*Второй этап* работы представлял собой экспериментальные исследования, выполненные на 2-х моделях хориоретинальной и 2-х моделях лимбо-роговичной неоваскуляризации глаз кроликов породы Шиншилл (n=80). Изучали возможность применения альтернативных ангиостатиков, являющихся фрагментами природных белков.

### **Характеристика клинического материала**

Исследование носило проспективный когортный дизайн, включало 84 пациента (92 глаза) с впервые диагностированной МНВ и признаками активности заболевания.

**Критерии включения:** возраст старше 55 лет, все типы МНВ (1,2,3 типы), диагноз верифицирован ОКТ (ОКТ-А, ФАГ), отсутствие предшествующего лечения (лазеротерапия, ФДТ, ИВИ, БАДы, антиоксидантная терапия, ретробульбарные инъекции биопептидов); острота зрения в исследуемом глазу от 20/30 до 20/320 (ETDRS).

**Критерии исключения:** МНВ иного генеза, отличного от ВМД (например, ассоциированная с миопией высокой степени), макулопатия, приводящая к потере зрения (центральная серозная хориоретинопатия, диабетический отек макулы), лазерное вмешательство на глазном дне, витреоретинальная хирургия или замена хрусталика на глазу за 6 мес до настоящего исследования, отслойка ретинального пигментного эпителия (РПЭ) без других признаков МНВ, наличие в анамнезе коронаро-коронарного шунтирования, операций на опорно-двигательном аппарате, по поводу которых пациент принимает антикоагулянты, трансплантации органов, пероральный прием химиотерапевтических агентов или иммунодепрессантов, а также моноклональных антител (АТ), любая патология сетчатки или зрительного нерва, любое снижение прозрачности оптических сред, способные повлиять на функции, противопоказания к введению ангиостатиков или использование Луцентиса / Эйлеа ранее на парном глазу.

При сборе анамнеза учитывали перенесенные инфаркты миокарда, инсульты, тромбозы, атеросклероз, гипертоническую болезнь, заболевания желудочно-кишечного тракта, мочевыделительной и дыхательной системы, сахарный диабет, гипотиреоз, диффузно-токсический зоб, тиреоидит и другие аутоиммунные и наследственные заболевания. В базу

данных заносили индекс массы тела и его градации, рассчитанные по формуле Кетле, систолическое, диастолическое и глазное перфузионное давление, вредные привычки (прием алкоголя, количество выкуренных сигарет в сутки). Сроки наблюдения составили 12 месяцев.

Все пациенты (n=84, 92 глаза, 100%) завершили исследование и были включены в исследование. Все пациенты подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Протокол исследований был одобрен Этическим Комитетом ФГБУ ГНЦ «Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА. Исследование проходило в рамках НИР (шифр: Профтруд -2; №10.020.21.800).

Диагностику проводили по МКБ-10 (H35.3). Определяли корригированную остроту зрения (МКОЗ) по таблице Снеллена, измеряли внутриглазное давление (ВГД), выполняли биомикроскопию переднего и заднего сегментов глаза, офтальмоскопию, ОКТ (DRI OCT Triton plus, Topcon Corporation, Япония, Swept Source, 1050nm). Выполняли фоторегистрацию глазного дна, ангиографию с красителями (ФАГ) и аутофлюоресценцию. По ОКТ верифицировали тип МНВ: выделяя тип 1 (под пигментным эпителием сетчатки, subRPE), тип 2 (субретинальный) и тип 3 (интратретинальный). Активность заболевания верифицировали по центральной толщине сетчатки (CRT), суб- и интратретинальной жидкости (SRF, IRF, sub-RPE), отслойке пигментного эпителия (PED), свежим кровоизлияниям при офтальмоскопии и протечке красителя на ФАГ.

Лечили интравитреальными инъекциями (ИВИ) Афлиберцепта 40 мг \мл («Эйлеа», Bayer, Германия) в условиях операционной. ИВИ выполнял сертифицированный хирург. Содержимое флакона использовали на одну инъекцию. Контроль проводили спустя 4 недели после ИВИ. На каждом визите проверяли МКОЗ, ОКТ, ФАГ. Загрузочный курс состоял из 3 ежемесячных ИВИ, затем переходили на инъекции каждые два месяца. При отсутствии улучшения зрения и сохранении экссудации после 6 ИВИ, переходили на другой препарат.

#### **Иммунологические методы исследования**

Определяли одновременно концентрацию в 50 мкл СТЖ 8 цитокинов, контролирующих ангиогенез. Использовали тест-систему BD Cytometric Bead Array (BD, США) и восьмицветный проточный цитофлуориметр (FACS Canto II, Beckton Dickinson, США). Концентрацию цитокинов определяли с помощью бус, покрытых АТ к ИЛ-8, ангиогенину, фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), интерферон (IFN) $\alpha$  и IFN $\gamma$ , VEGF, bFGF, трансформирующий фактор роста (TGF) $\beta$ . Для оценки положения бус использовали флуоресцентные красители APC и APC-Cy7; концентрацию антигена (АГ) оценивали по интенсивности флуоресценции по каналу красителя PE. Во избежание перекрытия бус по размерам, цитокины были сгруппированы следующим образом: (1): ИЛ-8 (бусы A9), TNF- $\alpha$



(бусы C4), IFN $\alpha$  бусы (B8); (2). VEGF (бусы B8), bFGF (бусы C5), angiogenin (бусы C4), (3): IFN $\gamma$  (бусы B8), (4): TGF $\beta$  (бусы B6).

Исследования выполняли в лаборатории клинической иммунологии Учреждения Российской академии медицинских наук НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта Северо-Западного отделения РАМН (рук. – проф. Сельков С.А.)

### **Экспериментальные исследования**

Эффективность альтернативных антиангиогенных технологий оценивали в эксперименте. Формировали 2 модели хориоретинальной неоваскуляризации и 2 модели лимбороговичной неоваскуляризации на глазах кроликов породы Шиншилла (n=80). Этапы эксперимента регистрировали, по завершении выполняли морфологические исследования.

Экспериментальные исследования проводили в присутствии ветеринара в GLP аттестованной лаборатории в соответствии с действующей в РФ нормативной базой и рекомендациями (на базе ФГАОУ ВО РНИИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России).

Оценивали эффективность 3-х рекомбинантных белков: тумстатина, эндостатина и PEDF. Препараты были получены в лаборатории биотехнологии НИИ биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (зав. Лаб. - академик РАН Мирошников А.И.).

Эндостатин и тумстатин (протеолитические фрагменты коллагенов VIII и IV типов) известны как эндогенные ингибиторы ангиогенеза. Тумстатин подавляет пролиферацию ЭК, связываясь с интегрином  $\alpha_v\beta_3$ . Эндостатин предотвращает миграцию ЭК, действуя через интегрин  $\alpha_5\beta_1$ . Природный фактор роста выделяемый РПЭ (*Pigment epithelium-derived factor*, PEDF) в качестве эндогенного ингибитора ангиогенеза в 2 раза активнее ангиостатина и в 7 раз активнее эндостатина. Механизм антиангиогенного действия PEDF не изучен. Полагают, что, наряду с подавлением активности VEGF, он индуцирует Fas-зависимый апоптоз ЭК. Их комбинация может быть перспективной в подавлении патологического ангиогенеза.

**Морфологические исследования** с целью количественной оценки эффективности лечения глаз тестируемыми пептидами, выполняли на парафиновых срезах энуклеированных глаз животных, дополняя иммуногистохимическими (ИГХ) и электронно-микроскопическими исследованиями.

### **Статистические методы анализа**

Результаты анализировали с помощью пакета прикладных статистических программ SAS (Statistical Analysis System, США). Для показателей, измеренных по интервальной (количественной) шкале, рассчитывали среднее значение, среднеквадратическое отклонение и ошибку среднего. Достоверность связи между показателями, измеренными по номинальной или ранговой шкале оценивали с помощью таблиц сопряженности с расчетом нескольких модификаций критерия Хи-квадрат, коэффициентов сопряженности Крамера и др.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Наблюдали 84 больных (29 мужчин, 55 женщин, 92 глаза) с МНВ в возрасте от 55 до 97 лет. У большинства из них были факичные глаза (55,5%) реже (44,5%) – артификачные (таблица 1).

Таблица 1- Характеристика больных МНВ

| Характеристика                                       | Количество глаз (%)     |
|--|-------------------------|
| Все глаза  | 92 (100%)               |
| Билатеральный процесс                                | 18 (19,5%)              |
| Мужчины /Женщины                                     | 29 (31,6%) / 55 (68,4%) |
| Возраст (среднее $\pm$ SD лет), (мин-макс)           | 73,4 $\pm$ 8,5 (55-97)  |
| Статус хрусталика: факичные глаза/артификачные       | 51 (55,5%)/41 (44,5%)   |
| МКОЗ до лечения (M $\pm$ SD)                         | 0,37 $\pm$ 0,26         |
| МКОЗ после лечения (среднее $\pm$ SD)                | 0,46 $\pm$ 0,29         |
| Количество инъекций (среднее $\pm$ SD, мин-макс)     | 3,04 $\pm$ 1,93 (3-6)   |
| Время наблюдения (среднее количество мес. (мин-макс) | 12,5 (8-18)             |

Полную регрессию МНВ после 3х загрузочных ИВИ классифицировали как «хорошая респонденция» (респондент). Рецидивы, флуктуации экссудации, прогрессирующее ухудшение после 3 ИВИ классифицировали как «плохая респонденция» (нереспондент). Принципиальных межгрупповых различий между респондентами и нереспондентами не обнаружили. Исключение составил тип PED: у всех 19 респондентов была серозная или серозно-фиброваскулярная PED, в то время как у 73 нереспондентов – фиброваскулярная и геморрагическая ( $p < 0,05$ ).

Далее нереспондентов подразделяли на 5 подгрупп (Амоаки W.M., 2021г):

1. Истинные нереспонденты (не изменяется активность по SRF, IRF, остается экссудат под РПЭ, свежее кровоизлияние во время лечения);
2. Частичные нереспонденты ( $\leq 15\%$  регрессии SRF и/или IRF; слабое снижение активности во время лечения);
3. Зависимые от анти-VEGF (регрессия экссудата сразу после ИВИ, при интервале между ИВИ более 4х недель развивается рецидив SRF/IRF, экссудат суб-РПЭ или PED);
4. Ухудшение с прогрессированием (рост SRF/IRF, высоты и площади PED, свежие кровоизлияния);
5. Тахифилаксия (изначально хороший ответ со временем снижается).

Респонденты отличались от нереспондентов повышенными ср.-групповыми показателями глазного перфузионного давления и ВГД, что говорило о более выраженных нарушениях ауторегуляции кровотока. Вероятно, это препятствовало всасыванию препарата.

Истинные нереспонденты были моложе респондентов ( $p < 0,05$ ); 42,9 % из них оказались курильщиками ( $p < 0,001$ ), выкуривающими более 20 сигарет в сутки, каждый шестой страдал гипотиреозом (14,3%,  $p < 0,1$ ). По данным ОКТ их сетчатка в центре была толще (ср.-групповая CTR:  $412,5 \pm 60,0$  мкм против  $339,9 \pm 23,3$  мкм у респондентов,  $p < 0,05$ ) и выше PED ( $239,2 \pm 49,8$  мкм против  $143,2 \pm 16,0$  мкм,  $p < 0,05$ ); в 71,4% PED была фиброваскулярной, что в совокупности говорило о большей продолжительности заболевания, поздней фазе ангиогенеза или поздней диагностике МНВ (табл. 2).

Таблица 2 - Характеристика больных МНВ с разным типом нереспонденции

| Характеристика        | Истинный респондент | Истинный нереспондент | Частичный нереспондент | Зависимость от анти-VEGF препарата | Ухудшение      | Тахифилаксия   |
|-----------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|------------------------------------|----------------|----------------|
| кол-во глаз (%)       | 19 (20,7%)          | 7 (7,6%)              | 25 (27,2%)             | 23 (25%)                           | 7 (7,6%)       | 11(11,9%)      |
| Возраст               | $77,4 \pm 1,6$      | $68,8 \pm 2,2^{**}$   | $74,4 \pm 1,6$         | $74,7 \pm 2,2$                     | $74,5 \pm 3,8$ | $74,4 \pm 2,5$ |
| Курящие               | 0%                  | 42,9%**               | 0%                     | 0%                                 | 14,3%          | 0              |
| Кол-во сигарет в день | 0%                  | >20                   | 0                      | 0                                  | 5              | 0              |

Примечание: \* - достоверность различий от респондентов  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Частичные нереспонденты не отличались по возрасту, каждый третий (36%) страдал ожирением, 16% - гипотиреозом, 16% - сахарным диабетом. В 16% случаев их диастолические показатели АД превышали  $90^+$  мм рт ст. По данным ОКТ в 32% глаз параметры CTR превышали норму, в 40% выявляли SRF ( $p = 0,09$ ), в 24% IRF; PED была выше:  $200,8 \pm 27,3$  мкм против  $143,2 \pm 16,0$  мкм у респондентов ( $p = 0,07$ ). Присутствовали разные типы PED, 1 и 3 типы МНВ. В 19,2% экссудат располагался под РПЭ (против 5,2% у респондентов,  $p = 0,2$ ).

Зависящие от анти-VEGF-препарата глаза чаще были факичными: 69,6% против 31,6% у респондентов ( $p < 0,05$ ), среди них доминировал 1 тип МНВ (91,3%), в 73,9% их CTR была толще, чем у респондентов ( $p = 0,08$ ), и выше PED ( $p = 0,1$ , соответственно). ОКТ-фенотип SRF+/IRF- имел место в 48%, SRF-/IRF- в 44% случаев.

В группе с анатомическим ухудшением, несмотря на ИВИ, превалировали пациенты с ожирением (72% против 42,1% у респондентов,  $p < 0,05$ ), 15% страдали гипотиреозом ( $p = 0,08$ ), 28,7% - сахарным диабетом ( $p = 0,007$ ). По количеству курящих и числу выкуриваемых сигарет в сутки (5 шт/сутки) группа занимала второе место. Их CTR была толще ( $440,4 \pm 119,2$  против  $339,9 \pm 23,3$  мкм,  $p < 0,05$ ), а PED выше ( $273,0 \pm 87,9$  против  $143,2 \pm 16,0$  мкм,  $p < 0,05$ ). В 42,8% случаев паттерн ОКТ был SRF-/IRF+, в 28,6% - SRF+/IRF- и в 14,3% - SRF+/IRF+. Чаще присутствовали 2 и 3 тип МНВ (42,9% против 10,9% у респондентов,  $p < 0,01$ ).

В группе тахифилаксии в 45,5% глаз толщина сетчатки в центре (CTR) незначимо отличалась от нормы, доминировал (90,9%) ОКТ-паттерн SRF-/IRF- ( $k=0,6834$ ,  $p=0,001$ ), фиброваскулярная PED (табл.3).

Таблица 3 – Характеристика глаз в зависимости от ответа на лечение

| Характеристика            | Истинный респондент | Истинный нереспондент | Частичный нереспондент | Зависимый от анти-VEGF | Ухудшение         | Тахифилаксия |
|---------------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-------------------|--------------|
| Кол-во глаз (%)           | 19 (20,6%)          | 7 (7,6%)              | 25 (27,2%)             | 23 (25,0%)             | 7 (7,6%)          | 11 (12,0%)   |
| <b>Артифакция</b>         | 68,4%               | 33,3%*                | 42,3%*                 | 30,4%**                | 28,7%**           | 63,7%        |
| <b>CTR</b> (Mcp±m)        | 339,9±23,3          | 412,5±60,0            | 338,0±28,4             | 381,9±28,9             | 440,4±119,2*<br>* | 410,4±91,3   |
| Частота повышения         | 79,0%               | 100%                  | 65,4%                  | 78,3%                  | 57,1%             | 54,6%        |
| Коридор значений          | 184-584             | 285-562               | 125-732                | 224-692                | 191-1023          | 182-1208     |
| <b>PED</b> (Mcp±m)        | 143,2±16,0          | 239,2±49,8**          | 200,8±27,3             | 189,9±18,1             | 273,0±87,9        | 237,5±62,0** |
| Коридор значений          | 59-276              | 106-404               | 56-632                 | 85-412                 | 89-763            | 52-742       |
| Жидкость субРПЭ в %       | 5,2%                | 15,7%                 | 19,2%                  | 17,5%                  | 0%                | 18,2%        |
| <b>ВГД</b>                | 12,8 ±2,6           | 15,2±2,6**            | 14,6±0,8***            | 14,5±0,7*              | 16,5±4,9**        | 14,2±1,2     |
| Ср. перфузионное давление | 73,7±2,8            | 75,5±3,5              | 76,0±1,8***            | 76,6±1,6****           | 76,6±2,8          | 75,9±2,5     |

Примечание: \* - достоверность различий от респондентов  $p<0,001$ ; \*\*  $p<0,01$ .

В связи с чем, маркер SRF-/IRF- был проанализирован в качестве фактора риска. Вычислены отношение рисков и 95% ДИ, а также специфичность (68,5%) и чувствительность маркера (81,8%). Аналогичная ассоциативная связь ( $k=0,5936$ ,  $p=0,001$ ) выявлена между ОКТ-фенотипом SRF+/IRF- и зависимостью от ИВИ анти-VEGF-препарата. Ниже представлены расчеты частоты тахифилаксии на глазах с ОКТ-фенотипом SRF-/IRF- (OR, 95% ДИ) (табл. 4)

Таблица 4- Показатели относительного риска и 95% ДИ разных ОКТ-фенотипа SRF+/IRF-

| Фенотип   | Показатели относительного риска |       | Границы 95%-го ДИ |        | p     |
|-----------|---------------------------------|-------|-------------------|--------|-------|
|           |                                 |       | левая             | правая |       |
| SRF+/IRF- | Odds-ratio                      | 0,128 | 0,024             | 0,687  | 0,007 |
|           | Risk-ratio                      | 0,262 | 1,3               | 15,3   |       |
| SRF-/IRF- | Odds-ratio                      | 0,209 | 0,039             | 1,119  | 0,044 |
|           | Risk-ratio                      | 0,353 | 0,097             | 1,291  |       |

Чувствительность маркера SRF+/IRF- составила: 47,8%; специфичность – 90%. Таким образом, были выделены и описаны характеристики пациентов с тахифилаксией и зависимостью от анти-VEGF-препарата, в совокупности составляющих 35,9% больных МНВ. Это позволяло разработать алгоритм отбора пациентов на этапе входа в загрузочную фазу и раскрывало возможность прогнозирования ответа на лечение.

Известно, что природное течение заболевания, а также анти-VEGF-терапия могут развернуть молекулярные пути ангиогенеза в сторону провоспалительных молекул, снижая эффект лечения. Однако информации о том, что происходит с молекулярными участниками ангиогенеза на фоне ИВИ анти-VEGF-препаратов, в литературе не представлено. Поэтому мы провели следующие исследования (см ниже).

На втором этапе изучали концентрацию про- и антиангиогенных факторов роста в СТЖ глаз с МНВ на фоне ИВИ Ранибизумаба. СТЖ забирали перед 3 инъекцией, определяли концентрацию 8 цитокинов, участвующих в ангиогенезе. Показатели леченых глаз с МНВ (группа 1) сравнивали с катарактальными глазами (группа 2) и глазами с катарактой, осложненной МНВ (группа 3) Показатели группы 3 принимали за условно приближенные к тем, которые могли бы быть до лечения, а показатели группы 2 принимали условно за возрастную «норму». По сравнению с катарактальными глазами в СТЖ глаз с леченой МНВ чаще и на более высоком уровне присутствовали проангиогенные цитокины: TNF $\alpha$  (75% против 47,5%,  $p < 0,05$ ;  $2,4 \pm 0,5$  против  $1,4 \pm 0,3$  пг/мл,  $p < 0,05$ ), ИЛ-8 (100% против 75%,  $p < 0,01$ ;  $492,9 \pm 75,7$  против  $8,5 \pm 1,5$  пг/мл,  $p < 0,01$ ), ангиогенин ( $3822,4 \pm 498,6$  против  $2820,2 \pm 319,3$ ,  $p < 0,01$ ) и FGFb (58,3% против 26,7% ,  $p < 0,05$ ; Mср:  $10,1 \pm 5,9$  против  $2,7 \pm 1,0$ ,  $p < 0,01$ ). Уровни VEGF в СТЖ глаз групп 1 и 2 оказались близки:  $17,5 \pm 14,0$  (при МНВ) против  $18,4 \pm 3,2$  (при катаракте, н/д), при этом частота обнаружения VEGF при катаракте была выше (68,2% против 17%,  $p < 0,01$ ), но не достигая значений группы 3, в которой катаракта сочеталась с МНВ (Mср= $26,7 \pm 0,9$  пг/мл,  $p < 0,01$ ), выявляясь реже (17% в группе 1 против 100% в группе 3,  $p < 0,001$ ). Одновременно зафиксированы более низкие концентрации проангиогенных факторов – ангиогенина (Mср.= $3822,4 \pm 498,6$  пг/мл против Mср.= $5715,8 \pm 697,6$  пг/мл,  $p < 0,05$ ) и TNF (Mср.= $2,4 \pm 0,5$  пг/мл против Mср.= $3,5 \pm 0,3$  пг/мл,  $p < 0,05$ ). Мы объяснили это эффективной работой анти-VEGF-технологии. Т.о., на фоне инъекций Ранибизумаба уровень проангиогенных факторов (ангиогенина и TNF) приблизился к показателям катарактальных глаз, не достигая их значений ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ , соответственно). На фоне ИВИ повышались концентрации плюрипотентных цитокинов с проангиогенными и провоспалительными свойствами, в частности, IFN $\alpha$  ( $p = 0,05$ ) и IL-8 ( $p = 0,1$ ), и в 50% СТЖ появлялся провоспалительный фактор FGFb (против 10% в группах 2 и 3,  $p < 0,05$ ). Результаты свидетельствовали о реверсии ангиогенного фенотипа на фоне двух ИВИ. Формировались

одновременно 2 новых «шунта» неоангиогенеза с новыми «игроками на сцене». Это: воспалительные цитокины ИЛ-8 и IFN $\alpha$ , в качестве промоторов ангиогенеза (1) и FGFb (2). Полученные данные демонстрировали анти-VEGF эффект ранибизумаба на глазах МНВ. В пользу этого говорили редкая частота VEGF в СТЖ и низкая (по сравнению с группой 3) концентрация. Повышенная концентрация проангиогенных факторов (TNF $\alpha$ , FGFb, ИЛ-8 и ангиогенин), говорила о продолжающейся стимуляции ангиогенеза другими механизмами. Отсутствие антиангиогенных цитокинов TGF $\beta$  и IFN $\gamma$  говорило о локальном дефекте контроля регуляции ангиогенеза. Мы проанализировали взаимосвязь количественных показателей цитокинов в СТЖ с ответом на ИВИ Ранибизумаба (табл. 5).

Таблица 5 - Взаимосвязь ответа на лечение Ранибизумабом с уровнем bFGF и ИЛ-8 в СТЖ

| Показатель                          | Количество глаз с хорошим ответом на лечение (%) | Количество глаз с плохим ответом на лечение (%) |
|-------------------------------------|--|---|
| ИЛ-8 $\geq 22,9$ пг/мл              | -  | 14  |
| ИЛ-8 $< 22,9$ пг/мл                 | 8  | 2   |
| FGFb $\geq 10,8$ пг/мл              | 1  | 15  |
| FGFb $< 10,8$ пг/мл                 | 7  | 1   |
| FGFb $\geq 10,8$ / ИЛ-8 $\geq 22,9$ | -  | 16  |

Далее мы провели оценку относительного риска и рассчитали 95% доверительный интервал для анализа связи этих факторов с неблагоприятным ответом или нереспонденцией на анти-VEGF-препараты (табл.5).

Таблица 6 - Показатели относительного риска и 95% доверительный интервал (OR, 95% ДИ)

| Маркер        | Показатели относительного риска |       | Границы 95%-го ДИ |        | P – достоверность различий |
|---------------|---------------------------------|-------|-------------------|--------|----------------------------|
|               |                                 |       | левая             | правая |                            |
| ИЛ-8          | Odds-ratio                      | 28,0  | 3,3               | 238,9  | 0,00112                    |
|               | Risk-ratio                      | 4,4   | 1,3               | 15,3   |                            |
| FGFb          | Odds-ratio                      | 105,0 | 5,7               | 1934,2 | 0,00022                    |
|               | Risk-ratio                      | 7,5   | 1,2               | 47,2   |                            |
| ИЛ-8+<br>FGFb | Odds-ratio                      | 96,0  | 5,1               | 1791,3 | 0,00039                    |
|               | Risk-ratio                      | 6,6   | 1,1               | 40,6   |                            |

Было установлено, что концентрация ИЛ-8 и FGFb в СТЖ глаз с МНВ на фоне анти – VEGF терапии может служить маркером неблагоприятного ответа на лечение. (Подана заявка 031857 на Патент, регистрационный № 2022115170 от 06.06.2022). Кроме того, проведенные исследования демонстрируют реверсию ангиогенного фенотипа с формированием новых обходных путей ангиогенеза на фоне ИВИ, что, диктует и обосновывает перевод на препараты с другими механизмами действия. В связи с этим, мы пришли к заключению о необходимости выбора альтернативных препаратов, которые теоретически могли бы помочь в решении наших

проблем. Нами были отобраны 3 ангиостатика для тестирования их терапевтического потенциала в условиях экспериментального моделирования. Этому был посвящен 3 фрагмент работы.

Проводили доклиническую оценку эффективности пептидов с ангиостатическими функциями. Пептиды тумстатин, эндостатин и PEDF были разработаны генно-инженерным путем и представлены для оценки возможности их применения в лечении глазного неоваскуляризации. Для выявления всех возможных эффектов были сформированы 4 различные модели неоваскуляризации на глазах кроликов. Была предложена и апробирована комплексная система экспертных оценок эффективности препаратов. Экспертными критериями ангиостатической активности пептидов *in vivo стали*: плотность васкуляризации роговицы (в баллах (клинически), в пикселях (ангиографически и колориметрически); площадь отека роговицы (в пикселях, колориметрически); количество новообразованных сосудов на единицу площади среза в зоне просмотра; показатель суммарного просвета сосудов на срезе (в пикселях, клинически и морфометрически), индекс васкуляризации лимбо-роговичной зоны; полуколичественные показатели ИГХ-реакции с маркером ЭК-CD31; оценка структурности новообразованных сосудов (электронно-микроскопические исследования).

На модели 1 ангиостатики вводили *одновременно с индукторами ангиогенеза*. В качестве индуктора выступали викриловые нити. Провоспалительный и ангиостимулирующий эффект викрила при прошивании роговицы нарастал постепенно, с рассасыванием нивелировался. Рассасывание начиналось с 10 дня. Модель использовали для тестирования пептидов на ранней фазе активного ангиогенеза. Пептиды вводили субконъюнктивально, 10 дней подряд, в расчетных дозах: 7,2 нг PEDF, 96 нг эндостатина, 70,2 нг тумстатина. Количественную оценку осуществляли клинически, ангиографически, колориметрически и морфометрически. Был выявлен дозозависимый эффект в пределах указанных доз на *ранних стадиях ангиогенеза* у 3 пептидов. Снижался индекс лимбороговичной васкуляризации, уменьшалась протяженность сосудов, врастающих с лимба в оптическую зону роговицы опытных глаз по сравнению с контрольными глазами. Наиболее мощным ангиостатическим эффектом обладал PEDF (5 баллов), в меньшей степени тумстатин (4 балла) и эндостатин (3 балла). На фоне инъекций пептидов уменьшался отек роговицы. Противоотечный эффект PEDF, тумстатина и эндостатина различался. В отсутствие диффузного отека вокруг каждого шва развивался перифокальный отек, его глубина зависела от глубины прошивания роговицы: от 1/2 до 2/3 ее толщины. Отек был выражен на фоне инъекций эндостатина и минимален на фоне PEDF (табл. 7).

Таблица 7 - Результаты клинической оценки антиангиогенной активности пептидов на модели с прошиванием роговицы викриловыми нитями (7-0)

| Тестируемый пептид      | Васкуляризация (в баллах) | Ангиостатическая активность (в баллах) | Противоотечный эффект (пиксели) | Площадь помутнения (%) |
|-------------------------|---------------------------|--|---------------------------------|------------------------|
| Контроль (n=10)         | 5                         | -                                      | 330298                          | 100                    |
| PEDF (опыт, n=10)       | 0                         | 5                                      | 5568                            | 8                      |
| Тумстатин (опыт, n=10)  | 1                         | 4                                      | 32306                           | 41                     |
| Эндостатин (опыт, n=10) | 2                         | 3                                      | 200926                          | 82                     |

Морфологически на световом уровне выявлены различия не только в плотности и глубине распространения отека, но и в характере клеточной инфильтрации роговицы вокруг швов. Инфильтрат состоял из лимфоцитов, плазмочитов и эозинофилов. На фоне инъекций тумстатина и PEDF клеточных элементов в инфильтрате вокруг швов было достоверно меньше (Табл. 8).

Таблица 8 - Количественная морфометрическая оценка антипролиферативного и противовоспалительного потенциала пептидов на ранних стадиях ангиогенеза (модель 1).

| Тестируемый пептид | Инфильтрация            |  |                                      |
|--------------------|-------------------------|--|--------------------------------------|
|                    | Протяженность отека, мм | Кол-во клеток в инфильтрате диаметром 0,03 мм <sup>2</sup> | Процент эозинофилов в инфильтрате, % |
| Контроль (n=10)    | 3,23±0,31               | 130±21   | 46%                                  |
| Тумстатин (n=10)   | 1±0,15*                 | 42±13*   | 28,6%                                |
| PEDF (n=10)        | 2,38±0,11*              | 39±11*   | 12,8%*                               |
| Эндостатин (n=10)  | 0,95±0,025*             | 41±9**   | 61%                                  |

Примечание: \* - достоверность различий от контроля  $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Снижение эозинофилов в инфильтрате вокруг шва на фоне PEDF свидетельствовало о непрямом противовоспалительном потенциале этого пептида. ИГХ исследования выявили негативную реакцию с маркером CD31 в новообразованной сети лимбороговичных сосудов, в тоже время позитивную реакцию в сосудах радужки. Мы расценили это как факт развития неполноценных новообразованных сосудов, не содержащих эндотелиальной выстилки. Экспериментальные данные подтверждали эффективность пептидов на ранних стадиях



ангиогенеза. Эффективность их применения на поздних стадиях ангиогенеза (аваскулогенная терапия) изучали на 2 модели.

Модель 2 формировали, нанося аппликацию 10% раствора NaOH на *арех* роговицы. Токсический парез капилляров и снижение циркуляции крови при щелочном ожоге роговицы приводят к развитию тканевой и клеточной гипоксии. Стимуляция ангиогенеза идет в 2 этапа: на этапе нанесения ожога и на этапе репаративных процессов в условиях нарастающей гипоксии. В условиях гипоксии, выраженность неоангиогенеза достигает максимума. Кровеносные сосуды формируются длительно, что позволяло использовать эту модель на ранней и поздней фазах ангиогенеза. В первом случае пептиды вводили в день ожоговой травмы, во втором случае - с 7 дня эксперимента, когда выросшие в роговицу сосуды уже образовывали "венчик", в котором дифференцировались полноценные «зрелые» сосуды с кровотоком. Количественную оценку осуществляли колориметрически, ангиографически и морфометрически. Клинически и ангиографически зона перилимбальной васкуляризации глаз с ожогом на фоне инъекций PEDF достоверно отличалась от контроля (Для сравнения: 16 % в контроле против 3% в опыте;  $p < 0,001$ , табл. 9).

Таблица 9 - Количественная оценка ангиостатического эффекта тумстатина и PEDF на модели щелочного ожога.

| Критерий оценки   | Контроль            | Тумстатин           | PEDF                |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|
| Вся роговица, пиксели   | 681883              | 746366              | 835171              |
| Площадь флуоресценции, пиксели                                | 110423              | 75952               | 26190               |
| Индекс отношения площади васкуляризации к площади роговицы, % | 16                  | 10*                 | 3**                 |
| Диаметр роговицы, мм  | 12,3                | 12,1                | 12,3                |
| Диаметр бельма, мм  | 7,75                | 5,75                | 4,5                 |
| Колориметрическая оценка:                                     |                     |                     |                     |
| Индекс васкуляризации (Мср. $\pm$ m)                          | 3987486 $\pm$ 17311 | 2664409 $\pm$ 61933 | 1975464 $\pm$ 20040 |
| Количество пикселей (Мср. $\pm$ m)                            | 0,08 $\pm$ 0,020    | 0,02 $\pm$ 0,005    | 0,01 $\pm$ 0,004    |
| Морфометрическая оценка                                       |                     |                     |                     |
| Кол-во сосудов на срезе (Мср. $\pm$ m)                        | 89 $\pm$ 11         | 25 $\pm$ 6          | 12 $\pm$ 3          |

Примечание: \* - достоверность различий аналогичного показателя на опытном глазу  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Площадь васкуляризации на фоне тумстатина меньше: 10% против 16% в контроле ( $p < 0,05$ ). Клинические данные были верифицированы морфологически. Все пептиды обладали антиангиогенными эффектами. Они проявлялись снижением количества новообразованных сосудов на единицу площади ткани в зоне просмотра ( $p < 0,001$ ), уменьшением суммарного просвета сосудов на срезе в пикселях, индекса васкуляризации лимбо-роговичной зоны

( $p < 0,001$ ). В пределах расчетной дозы на ранних стадиях ангиогенеза более мощный эффект продемонстрировали тумстатин и PEDF. Эндостатин уступал им. Проведенные исследования на моделях лимбороговичной неоваскуляризации показали наличие ангиостатической активности у 3 тестируемых пептидов. Наряду с этим, пептиды обладали противоотечными и антипролиферативными эффектами, проявляющимися в уменьшении количества клеточных элементов вокруг викроилового шва и в сокращении общей площади клеточной инфильтрации. Аваскулогенный эффект выявлен только у одного из трех тестируемых пептидов - тумстатина. Клинически значимый эффект визуализировался на глазах с уже сформировавшимися зрелыми сосудами после 5 инъекций этого пептида в 10-кратной терапевтической дозе. Он проявлялся снижением плотности новообразованных сосудов в паралимбальной зоне роговицы, регрессией концевой части наиболее разветвленного отдела новообразованных сосудов, сокращением диаметра «зрелых» сосудов с циркулирующим кровотоком, запустеванием мелких сосудов. Эндостатин оказывал эффект исключительно на ранних стадиях прерывания ангиогенеза: с 1 по 12 день и также в 10-кратной дозе. Это проявлялось разрежением плотности лимбальной сети. По мере того, как сосудистая сеть заканчивала свое формирование, активность пептида нивелировалась.

*Модель № 3* формировали путем имплантации Матригеля, содержащего 500 нг/мл VEGF165, в карман, сформированный в субхориоидальном пространстве в ретроэкваториальной части глаза 40 кроликам через туннельный разрез склеры (Passaniti A., 2011). Под воздействием Матригеля с VEGF165 активизировалась пролиферация ЭК хориокапилляров, последние дилатировались. Через 7 дней после введения Матригеля на глазном дне просматривались проминирующие в стекловидное тело **«ретино-хориоидальные сосуды»** аномальных размеров с паравазальными гиперпигментированными линиями «сопровождения», расположенные в пределах субретинального пространства, из-за барьерной функции интактной мембраны Бруха и сохранного РПЭ. Сосудистые мальформации напоминали полипоидальную васкулопатию, ангиографически на фоне введения флуоресцеина натрия демонстрировали нормальную внутрисосудистую флюоресценцию

*Модель № 4* модифицировали из модели № 3 путем повреждения мембраны Бруха лазерным воздействием. Деструкцию выполняли на 7 сутки, используя длину волны 577 нм, экспозицию 0,1 сек, диаметр пятна в фокальной плоскости 100 мкм; мощность 350 мВт. Наносили по 5 очагов рядом с ДЗН в 100 мкм от видимой границы дилатированных сосудов.

Антиангиогенные эффекты оценивали на обеих моделях ХНВ. ХНВ формировалась в сроки от 7 до 20 дней. С учетом этих сроков тестировали фармакологическую активность пептидов. Глаза контролировали и регистрировали каждые 2 недели методами

фоторегистрации глазного дна, ОКТ, ФАГ каждые 4 недели. В течение 4 недель еженедельно вводили ИВИ PEDF (n=10) и тумстатин (n =10). Контроль не лечили. При этом 5 глаз получили по 1 мкг PEDF, 5 глаз - по 4 мкг PEDF; 5 глаз – по 2 мкг тумстатина, 5 глаз - по 4 мкг в инъекции. В контрольных глазах к окончанию эксперимента клинически и ангиографически зафиксированы признаки ХНВ в зоне воздействия. Размеры (площадь) ХНВ оценивали методами ФАГ и ОКТ, морфологически. Результаты лечения представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Эффективность PEDF и тумстатина по результатам гистологических морфометрических показателей на хориоретинальной модели неоваскуляризации (ХНВ)

| Показатель                       | Контроль | PEDF  |                 | Тумстатин |                 |
|----------------------------------|----------|-------|-----------------|-----------|-----------------|
|                                  |          | 2 мкг | 4 мкг           | 2 мкг     | 4 мкг           |
| Количество глаз с ХНВ            | 5/5      | 2 мкг | 4 мкг           | 2 мкг     | 4 мкг           |
|                                  |          | 1/5   | 0/5             | 1/5       | 0/5             |
| Диаметр ХНВ, мкм                 | 445±30   | 90    | ХНВ отсутствует | 227       | ХНВ отсутствует |
| Толщина ХНВ в мкм                | 225±36   | 45    |                 | 138       |                 |
| Количество сосудов в поле зрения | 10±3     | 2     |                 | 8         |                 |
| Средний диаметр сосуда в мкм     | 8        | 1,5   |                 | 2         |                 |

Таким образом, на 4 моделях неоваскулярных заболеваний глаз, благодаря комплексу разработанных критериев оценки эффективности, выявлен антиангиогенный потенциал тестируемых пептидов. PEDF в дозе 1 мкг и 4 мкг подавлял активность ХНВ, превосходя эффективность тумстатина. При этом, PEDF не только тормозил рост новых сосудов, но и вызывал регрессию уже сформированных сосудов (аваскулогенный потенциал).

Установлено, что именно снижение в тканях глаза природных ингибиторов ангиогенеза приводит к истончению и разрушению мембраны Бруха с последующим каскадом событий, клинически проявляющихся симптомами нВМД (Fukai N. 2002; Gariano R., 2005; Colin, 2004, Vecerra P., 2022). Этот факт может служить обоснованием к альтернативной антиангиогенной стратегии. Рычаг управления ангиогенезом: устранение дефицита природных ингибиторов ангиогенеза (Mori K., 2002; Noel A, 2007; Ogata N., 2002; Pasco S. 2019). Известно «золотое правило», открытие которого принадлежит Folkman: «Контроль ангиогенеза в природе осуществляется благодаря балансу проангиогенных и антиангиогенных факторов. Из этого правила вытекает другое. Дисбаланс пептидов-регуляторов можно ликвидировать, устраняя дефицит ингибиторов ангиогенеза. Если одна из чаши весов перетягивает, для восстановления баланса достаточно доложить противовес» (Folkman, 1997). В этом аспекте, фрагменты природных белков ангиостатиков являются перспективными. К их **преимуществам**

относятся: способность подавлять одновременно несколько этапов ангиогенеза; VEGF-независимый механизм подавления ангиогенеза; что позволяет сохранить нейропротекторные эффекты VEGF в условиях ишемии и зрительные функции; низкие действующие концентрации (для сравнения, доза Луцентиса составляет 0,3 мг, Авастина – 2,5 мг, рекомбинантные пептиды действуют в дозах менее 1 мкг); дополнительный противовоспалительный эффект, способствующий снижению фибротизации тканей глаза, сохранению нейронов и зрительных функций ( табл 11).

Таблица 11- Сравнительные характеристики ангиостатических препаратов

| Препарат (фрагмент) | Молекулярный вес | Состав  | Класс  | Лечебная доза | Мишень                     |
|---------------------|------------------|---|--|---------------|----------------------------|
| Авастин             | 150 кДа          | 2 лёгкие (по 214 аминокислоты (а.о.) и 2 тяжёлые цепи по 453 а.о. | Гуманизованное мышиное МАТ к VEGF                | 2,5 мг        | Все изоформы VEGF-A        |
| Луцентис            | 48 кДа           | Лёгкая цепь 213 а.о.+ тяжёлая цепь 231 а.о.                       | Fab фрагмент гуманизованного мышиного МАТ к VEGF | 0,3 мг        | Все изоформы VEGF-A        |
| Эндостатин          | 5,3 кДа          | 49 а.о.   | Рекомбинантный пептид                            | 96 нг         | Интегрин $\alpha 5\beta 1$ |
| Тумстатин           | 3,9 кДа          | 35 а.о.   | Рекомбинантный пептид                            | 70,2 нг       | Интегрин $\alpha V\beta 3$ |
| PEDF                | 4,0 кДа          | 37 а.о.   | Рекомбинантный пептид                            | 7,2 нг        | ламелина рецептор          |

Наряду с этим, рекомбинантные фрагменты природных ингибиторов ангиогенеза обладают низким молекулярным весом, что обеспечивает лучшее проникновение в ткани, исключает тахифилаксию, токсические и побочные эффекты, обеспечивает возможность длительного применения при сохранении биологических эффектов.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые в Российской Федерации среди больных МНВ изучена истинная распространенность нереспондентов, включая истинных (7,6%) и частичных (27,2%) нереспондентов, зависящих от анти-VEGF-препарата (25%) и не переносящих длительные интервалы между ИВИ, отвечающих ухудшением (7,6%) и снижением ответа (тахифилаксия, 11,9%) на анти-VEGF-препараты 1 линии.

2. Установлены доминирующие фенотипы больных МНВ с тахифилаксией (ОКТ-фенотип SRF-/IRF-,  $p=0,04$ ) и с зависимостью от анти-VEGF-препарата (ОКТ-фенотип:

SRF+/IRF,  $p=0,007$ ), в совокупности составляющих 36,9%, что раскрыло возможность прогнозирования ответа на лечение на этапе первичной диагностики.

3. Показано повышение концентрации провоспалительных факторов IL-8 ( $p<0,05$ ), ангиогенина ( $p<0,05$ ), TNF $\alpha$  ( $p<0,05$ ) и bFGF ( $p<0,05$ ) в СТЖ 58,8% больных МНВ на фоне ИВИ препаратов 1 линии антиангиогенной терапии (ранибизумаб), что свидетельствует о реверсии ангиогенного фенотипа, появлении новых молекулярных участников ангиогенеза, объясняет причину неэффективности лечения и обосновывает перевод на препараты с другими механизмами действия.

4. Представлены доказательства на 4х экспериментальных моделях лимбороговичной и хориоретинальной неоваскуляризации глаз лабораторных животных эффективности применения альтернативных технологий: тумстатина (1 мкг и 4 мкг), эндостатина (7,6 нг) и PEDF (1 мкг и 4 мкг), проявляющиеся подавлением пролиферации (эндостатин, тумстатин, PEDF) и миграции (эндостатин) эндотелиальных клеток, формирования капилляроподобных структур (эндостатин, тумстатин, PEDF), что раскрывало возможности к их индивидуальному (на соответствующих стадиях) или совместному применению (на любой стадии ангиогенеза).

5. Совокупность клинических (78,3% нереспондентов), иммунологических (58,8% глаз с высоким уровнем провоспалительных цитокинов, 100% глаз с отсутствием IFN $\gamma$  и TGF $\beta$ ) и экспериментальных данных (эффективность эндостатина, тумстатина и PEDF на 4 моделях неоваскуляризации глаз) служит обоснованием подходов к применению альтернативной стратегии лечения МНВ, исключая или дополняя анти-VEGF-зависимые технологии.

## **Практические рекомендации**

Перед началом лечения МНВ необходимо оценить индивидуальные риски развития нереспонденции на препараты 1 линии антиангиогенной терапии.

При выявлении ОКТ-фенотипа SRF-/IRF-, ассоциированного со снижением ответа на анти-VEGF-препараты, и соответствии клиники прогнозу, при сохранении активности заболевания перевести пациента на альтернативные технологии.

При выявлении ОКТ-фенотипа SRF+/IRF-, ассоциированного с высокой зависимостью от анти-VEGF-препаратов, не допускать интервалов между ИВИ более четырех недель и регулировать визиты пациента для мониторинга и лечения.

## **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Лихванцева, В.Г. К вопросу о терминологии, экспертных критериях оценки эффективности антиангиогенной терапии и распространенности рефрактерных форм неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации. / В.Г. Лихванцева, В.Н. Трубилин, С.Г. Капкова, **А.С. Геворкян** // Офтальмология.- 2021. - Т.18, №3.- С. 389–398.
2. Лихванцева, В.Г.. Гиперметропия как фактор риска возрастной макулярной дегенерации. Обзор. /В.Г. Лихванцева, С.Г. Капкова, **А.С. Геворкян**, Е.Ю. Некрасова // Офтальмология. – 2022. – Т. 19, № 2.- С. 255–264.
3. Архипова, М.М. Изучение уровня про- и антиангиогенных факторов роста в стекловидной жидкости при неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации. М.М. Архипова, В.Г. Лихванцева, **А.С. Геворкян**, С.И. Рычкова, С.А. Сельков. // Офтальмология.- 2022. – Т.19, № 2. – С.368–377.
4. Лихванцева, В.Г. Сравнительные аспекты экспериментальных моделей неоваскуляризации глаз различной локализации (экспериментальные исследования). / В.Г. Лихванцева, **А.С. Геворкян**, С.Г. Капкова. // Глаз. - 2022. – Т.24, №2.- С.32-45.
5. Лихванцева, В.Г. Разработка критериев комплексной оценки эффективности антиангиогенных препаратов на моделях неоваскуляризации глаза (экспериментальные исследования). / В.Г. Лихванцева, **А.С. Геворкян**, С.Г. Капкова, К.А. Кузьмин, А.И. Мирошников, Р.С. Есипов. // Глаз. - 2022. – Т.24, №3.- С. 39–47.
6. Лихванцева, В.Г. Клинические фенотипы пациентов с неоваскулярной возрастной макулярной дегенерацией и плохим ответом на лечение Афлиберцептом. /В.Г. Лихванцева, **А.С. Геворкян**, С.Г. Капкова, Е.Ю. Некрасова. // Офтальмология. – 2022 –Т.19, №3.-С. 647–657.
7. Лихванцева, В.Г. Изучение уровня про- и антиангиогенных факторов роста в стекловидной жидкости при неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации. /В.Г. Лихванцева, **А.С. Геворкян**, С.Г. Капкова, С.И. Рычкова, М.М. Архипова, С.А. Сельков. // Отражение. 2022.-Том 1, № 13. – С. 65-69.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

|      |  |
|------|--|
| АГ   | - антиген                                      |
| АТ   | - антитела                                     |
| ВМД  | - возрастная макулярная дегенерация            |
| нВМД | - неоваскулярная ВМД                           |
| ВГД  | - внутриглазное давление                       |
| ДИ   | - Доверительный интервал                       |
| ИВИ  | - интравитреальные инъекции                    |
| ИГХ  | - иммуногистохимические исследования           |
| ИЛ-8 | - интерлейкин -8                               |
| КПС  | - капиллярноподобные структуры                 |
| МНВ  | - макулярная неоваскуляризация                 |
| МКОЗ | - максимально скорректированная острота зрения |
| ОКТ  | - оптическая когерентная томография            |
| ПДР  | - пролиферативная диабетическая ретинопатия    |
| РПЭ  | -ретиальный пигментный эпителий                |
| СНМ  | - субретиальная неоваскулярная мембрана        |
| ХНВ  | - хроническая неоваскуляризация                |
| ЭК   | - эндотелиальная клетка                        |
| СТР  | - центральная толщина сетчатки                 |
| SRF  | - субретиальная жидкость                       |
| IRF  | - интравитреальная жидкость                    |
| РЕД  | - отслойка пигментного эпителия                |
| TNF  | - фактор некроза опухоли.                      |
| VEGF | - фактор роста сосудистого эндотелия           |

IFN - интерферон  
TGF - трансформирующий фактор роста