

**АКАДЕМИЯ ПОСТДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ВИДОВ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ И
МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-
БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»**

На правах рукописи

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

3.1.5. Офтальмология

диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
д. м. н., профессор
Лихванцева В. Г.

Москва - 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2-3
СПИСОК условных сокращений	4-5
ВВЕДЕНИЕ	6-9
ГЛАВА 1. Обзор литературы	9-41
1.1 Возрастная макулярная дегенерация и современные технологии лечения ее неоваскулярных форм	9 9-43
1.2 Ангиогенез в норме и патологии	13
1.2.1 Природные ингибиторы ангиогенеза	17
1.2.2 Стимуляторы ангиогенеза	13-17
1.3 Современные представления о механизмах фармакологической регуляции патологического ангиогенеза: принципы, проблемы, перспективы	17-31
1.4 Виды резистентности и ее распространенность	32-41
ГЛАВА 2. Материал и методы исследования	42-54
2.1 Дизайн работы	42
2.2 Клиническая характеристика пациентов, вошедших в исследование.	44
2.3 Офтальмологические методы диагностики и мониторинга	44
2.4 Методы лечения больных МНВ	45
2.5 Иммунологические методы исследования, используемые в исследовании	46
2.6 Экспериментальные исследования с разработкой моделей лимбобороговичной и хориоретинальной неоваскуляризации и экспертных критериев доклинической оценки эффективности рекомбинантных ангиостатиков в лечении неоваскулярной ВМД.	49
2.7 Характеристика используемых для лечения экспериментальных животных рекомбинантных пептидов с заявленной ангиогенной активностью.	51
2.8 Патоморфологические исследования	52
2.9 Статистические методы анализа	53

ГЛАВА 3. Изучение распространенности и фенотипа нереспондентов, а также причин нереспонденции среди больных МНВ при лечении анти-VEGF-препаратами.	54-71
3.1. Изучение распространенности нереспондентов при лечении анти-VEGF-препаратами больных МНВ	56
3.2 Изучение фенотипа нереспонентов	61
3.3 Изучение возможности прогнозирования неблагоприятного ответа на лечение на основе количественных показателей про- и антиангиогенных факторов роста в стекловидной жидкости глаз	66
ГЛАВА 4. Изучение возможности применения альтернативных технологий на основе природных ангиостатиков в эксперименте на моделях лимбороговичной и хориоретинальной неоваскуляризации глаз у лабораторных животных.	71-97
4.1 Разработка комплекса экспериментальных моделей неоваскуляризации передней (роговичной) и задней (хориоретинальной) локализации для оценки эффективности природных ингибиторов в подавлении индуцированного неоангиогенеза.	72-76
4.2 Клиническая оценка эффективности рекомбинантных пептидов эндостатина, тумстатина и PEDF в ингибировании ранних стадий ангиогенеза.	76-88
4.3 Изучение механизма действия рекомбинантных ангиостатиков с помощью электронной микроскопии.	88-89
4.4 Изучение эффективности пептидов в подавлении неоангиогенеза на моделях хориоретинальной неоваскуляризации	89-96
4.5 Морфологическое исследование глаз экспериментальных животных, получивших эндовитреальные инъекции PEDF и тумстатин	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	98-110
ВЫВОДЫ	110-111
Список литературы	111-131

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТ	антитела
ВМД	возрастная дегенерация макулы
ИГХ	иммуногистохимические исследования
ИВИ	интравитреальные инъекции
ИЛ	интерлейкины
ИФН	интерферон
КИ	клинические исследования
КПС	капилляроподобные структуры
НЯ	нежелательные явления
Моноклональные антитела	мАТ
ММП	матриксные металлопротеиназы
МНВ	макулярная неоваскуляризация
ОКТ	оптическая когерентная томография
ПДР	пролиферативная диабетическая ретинопатия
ПЭ	пигментный эпителий
РПЭ	ретинальный пигментный эпителий
РН	ретинопатия недоношенных
СНМ	субретиальная неоваскулярная мембрана
СНЯ	системные нежелательные явления
ФДТ	фотодинамическая терапия
ЭК	эндотелиальная клетка
ЭТС	эмбриональная телячья сыворотка
ETDRS	Early Treatment Diabetic Retinopathy Study – Исследование раннего лечения диабетической ретинопатии
DMEM/F12	Dulbecco`s Modified Eagles Medium/Nutrient Mixture F-12 – Среда Игла в модификации Дульбекко/Питательная смесь F12 Хама (1:1)
PRN	режим интравитреальных инъекций по потребности pro re nata (PRN)
T&E	режим «лечить и наблюдать», «treat and extent»
Q4, Q8, Q12	фиксированные интравитреальные инъекции каждые 4 недели, или 8 недель или 12 недель

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы и степень ее разработанности

Неуклонный рост продолжительности жизни в tandem со снижением деторождаемости повышает актуальность заболеваний глаз, ассоциированных с пожилым возрастом, включая возрастную макулярную дегенерацию сетчатки (ВМД). ВМД возглавляет список поставщиков необратимой слепоты пожилых людей в развитых странах. Заболевание проявляется двумя клиническими фенотипами: сухая и экссудативная или неоваскулярная (нВМД). В отсутствие лечения нВМД приводит к потере центрального зрения в течение 2-5 лет. Маркером нВМД является неоангиогенез, именуемый согласно последней международной классификации макулярной неоваскуляризацией (МНВ). Установлено, что источником новообразованных сосудов МНВ могут быть не только хориоидальные сосуды, но и сосуды глубокого ретинального сплетения [206].

За последнюю декаду лет в лечении МНВ произошла революция с открытием нескольких поколений антиангиогенных препаратов, направленных на блокировку фактора роста сосудистого эндотелия (*vascular endothelial growth factor*, VEGF). На сегодняшний день интравитреальные инъекции (ИВИ) антиангиогенных препаратов, признаны наиболее эффективным методом лечения поздней стадии МНВ [3,5,11,26,28, 180,134,176]. Благодаря этой технологии частота слепоты при этой патологии снизилась на 46% в США, на 50% в Дании и Израиле. Ангиостатические препараты с анти-VEGF механизмом используются в качестве первой линии терапии при МНВ [3,5,11,26,28,15,25,50,77,107]. Однако необходимость жесткого соблюдения режима лечения, многократность введения дорогостоящих препаратов и частые визиты к офтальмологу ложатся непреодолимым финансовым и физическим бременем на пожилых пациентов. Кроме того, мета-анализ многочисленных многолетних клинических исследований, проведенных в различных регионах мира, вскрыл высокую распространенность первичной резистентности (18-22,2%), тахифилаксии (8,9%-12,7%) и толерантности (2-10%) к анти-VEGF-препаратам, что диктует необходимость расширения арсенала терапевтических стратегий ВМД [51, 59, 63, 65, 84, 97,107, 114, 140, 148, 160, 170, 171, 192, 194, 197, 200, 213, 224,233, 237]

Наряду с этим, было показано, что VEGF является важным фактором выживания и поддержания целостности пигментного эпителия сетчатки (РПЭ) [90,152,153] и сохранности хориокапилляров [166]. Частые интравитреальные инъекции препаратов, направленных на подавление VEGF, могут повысить риск развития вторичной атрофии РПЭ и хориокапилляров [196, 85]. Наконец, установлено, что продолжительная монотерапия анти-VEGF-А препаратами может вызвать апоптоз амакриновых, биполярных

и ганглиозных клеток сетчатки, приводя к снижению остроты зрения в ряде случаев [64; 110, 114, 130]. Кроме того, частые ИВИ также могут привести к глазным осложнениям, таким как эндофтальмит [54, 55, 145, 234] гемофтальм [54], офтальмогипертензия, или к системным нежелательным явлениям (СНЯ): резкому повышению системного артериального давления [50] и к системным тромбозам [50]. В связи с чем, поиск альтернативных технологий лечения МНВ является одной из актуальных задач современной офтальмологии.

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 (SRF-/IRF-; SRF+/IRF-) и концентрации цитокинов (IL-8, bFGF) в стекловидной жидкости со 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.

Подана заявка 031857 на Патент на изобретение (регистрационный номер 2022115170 от 06.06.2022г)

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Возрастная макулярная дегенерация и современные технологии лечения ее неоваскулярных форм

ВМД является основной причиной слепоты пожилых людей в Европе, Великобритании, США, Израиле и России [1,3,9-12,17,22,48,76,88,94,131,140]. Это вызывает особую тревогу из-за посколькy стремительного роста доли пожилого населения. Ожидается, что к 2050 году число людей только в США в возрасте 65 лет и старше достигнет 82,7 миллиона человек, что более чем вдвое превышает уровень 2005 года [189]. Более того, для моделирование распространенности ВМД прогнозировало рост ранней ВМД с 9,1 миллиона в 2010 г. до 17,8 миллиона в 2050 г. [140]. Поздняя стадия ВМД имеет 2 клинических фенотипа: сухая (географическая атрофия) и экссудативная (неоваскулярная, нВМД). Без лечения нВМД приводит к потере центрального зрения в течение 2-5 лет. Маркером нВМД является неоангиогенез, именуемый согласно последней международной классификации, макулярной неоваскуляризацией (МНВ). Источником новообразованных сосудов МНВ могут быть не только сосуды хориоидеи, но и глубокого ретинального сплетения [211, 212]. Современные терапевтические технологии, имеющиеся в арсенале офтальмологов, направлены, в основном, на блокировку проангиогенного фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), которому делегирована главная роль в развитии МНВ.

1.2 Ангиогенез в норме и патологии

Ангиогенез — процесс образования новых кровеносных сосудов в органе или ткани. Различают 2 вида ангиогенеза: физиологический и патологический. Физиологический ангиогенез является неотъемлемой частью физиологических и репаративных процессов. Процессы ангиогенеза во взрослом организме протекают с умеренной интенсивностью и активизируются только при регенерации повреждённых тканей и образовании рубца, канализации тромбов, ликвидации очагов воспаления, а также при некоторых физиологических процессах организма. К ним относится беременность (образование плаценты), эмбриогенез и образование желтого тела. Физиологический ангиогенез находится под молекулярно-генетическим контролем, который обеспечивает полное его подавление в течение регламентированного отрезка времени [13, 42,50]. В здоровом организме лишь 0,01% эндотелиальных клеток (ЭК) делится, производя в среднем 1 деление в 10 лет [13].

Ангиогенез в своем развитии проходит несколько этапов:

1. Эндотелиальные клетки (ЭК), выстилающие сосуды, под влиянием проангиогенных факторов начинают перемещаться из стенки сосуда по направлению к месту ишемии. Большое значение в этом процессе имеет протеолитическая деградация экстраклеточного матрикса (ЭКМ), представленного сложно устроенной сетью коллагенов разных типов, фибриллярных гликопротеинов и протеогликанов, формирующих архитектуру ткани. При этом ЭК активируют ряд протеаз, продуцируют ферменты, в том числе матриксные металлопротеиназы и ангиогенин, разрушающие базальную мембрану сосуда. Механизм действия ангиогенина заключается в связывании его с актином, активацией тканевого активатора плазминогена, в результате чего образуется плазмин, участвующий в деградации компонентов базальной мембраны. Миграцию ЭК опосредуют молекулы адгезии и интегрины [13, 73].

2. Затем ЭК пролиферируют, формируют капилляроподобные структуры, привлекая к ним перициты и фибробласты.

3. Благодаря анастомозам между вновь образованными и предсуществующими близлежащими сосудами, формируется кровеносная сеть.

Таким образом, приоритетная роль в органогенезе, эмбриогенезе, патологическом ангиогенезе принадлежит межклеточным взаимодействиям и осуществляется благодаря белкам, компонентам ЭКМ, растворимым факторам и клеткам микроокружения [13, 73,90].

Патологический ангиогенез развивается как при избытке его стимуляторов и/или дефиците ингибиторов, так и при дефиците стимуляторов и/или избытке ингибиторов (Рис.1). В первом случае он называется избыточным, во втором случае – недостаточным ангиогенезом [13, 44].



Рис. 1. Схема патологического ангиогенеза [4]

Избыточный ангиогенез имеет место при внутриглазных опухолях, диабетической ретинопатии (ДР), ретинопатии недоношенных, МНВ, офтальмогистоплазмозе, псевдогистоплазмозном синдроме, а также при 70 соматических заболеваниях, таких как ревматоидный артрит, псориаз, атеросклероз и др. [13, 50, 40].

Недостаточный ангиогенез ассоциируется с ишемической болезнью сердца и головного мозга, нижних конечностей, ожоговой болезнью и с плохим заживлением ран. В организме одного человека могут присутствовать оба вида ангиогенеза. Например, недостаточный системный ангиогенез при ишемии нижних конечностей, может сочетаться с локальным избыточным ангиогенезом при МНВ [13]. В этом случае, системная стимуляция ангиогенеза может привести к реактивации патологического процесса в глазу. Таким образом, владея знаниями о механизмах развития и фазах ангиогенеза, можно пытаться управлять им, стимулируя недостаточный ангиогенез и ингибируя избыточный ангиогенез.

К настоящему дню не ясно, что предшествует запуску ангиогенеза: гиперпродукция стимуляторов или дефицит ингибиторов с последующей бесконтрольной продукцией стимуляторов. Большинство ученых склоняются к мысли, что «единого сценария» ангиогенеза не существует. Все определяет индивидуальное соотношение тех и других в органе-мишени (в глазу) [13]. Множество публикаций посвящено роли проангиогенных факторов в развитии патологических сосудов внутри глаза и способам их подавления [4,5,8,10, 24, 51, 55, 108,112,139], и лишь единичные работы доказывают значимость дефектов природных антиангиогенных механизмов [118,125,126,149,156]. Изучение механизмов регуляции внутриглазного ангиогенеза с поиском его ингибиторов, привели к идентификации десятков природных факторов, потенциально способных подавлять этот процесс. Первые ингибиторы ангиогенеза были обнаружены в стекловидном теле в 1977 году [3]. Полагали, что именно они обеспечивали аваскулярный статус стекловидного тела [27, 51, 157,158,169,222].

Большинство природных ингибиторов ангиогенеза представляют собой большие белковые молекулы, в нативном виде не обладающие ангиостатическими свойствами, например, коллаген XVIII, из которого был получен первый ингибитор ангиогенеза – эндостатин. Ингибировать ангиогенез могут его фрагменты. Все природные ингибиторы ангиогенеза демонстрируют свои свойства *in vitro*. Их роль подтверждает нокаутирование генов, отвечающих за их экспрессию. Однако *in vivo* с их помощью не всегда удается подавить ангиогенез. Предположительно существует универсальный регуляторный механизм, осуществляющий активацию ингибиторов ангиогенеза в природе [154,155].

Выделяют 3 типа ингибиторов ангиогенеза:

1 тип – блокирует один ангиогенный фактор;

2 тип – блокирует 2-3 ангиогенных фактора. Например, селективный ингибитор тирозинкиназных рецепторов эпидермального фактора роста (препарат иресса), подавляет продукцию проангиогенных факторов: VEGF, bFGF и TGF-α [13];

3 тип – имеет широкий спектр мишеней для воздействия (TNP-470, эндостатин и PEDF) [121].

Вполне очевидно, что чем шире спектр мишеней, тем перспективнее пептид. В этом аспекте, природные ингибиторы ангиогенеза имеют явное преимущество перед узконаправленными ингибиторами, созданными фармакоиндустрией (например, анти-VEGF-препараты).

1.2.1 Природные ингибиторы ангиогенеза

Идентифицировано несколько эндогенных ингибиторов ангиогенеза. Это: фрагменты компонентов экстраклеточного матрикса (тумстатин, эндостатин, эндорепеллин) [57, 122], тромбоспондин-1 (TSP-1) [137,226] и фактор, выделяемый пигментным эпителием (PEDF) [66,75,88,91,92].

Тумстатин – биологически активный фрагмент цепи $\alpha 3$ коллагена IV (неколлагеновый домен NC1, молекулярный вес 28 кДа). Коллаген IV типа - основной компонент базальных мембран почек, лёгких и яичек [110, 150]. Тумстатин отщепляется от базальных мембран металлопротеиназой (ММП) 9. Он ингибирует пролиферацию ЭК и индуцирует их апоптоз [69]. Рецептором тумстатина является интегрин $\alpha_v\beta_3$ (мишень). В эксперименте на мышах с нокаутом гена, ответственного за экспрессию тумстатина /или интегрин $\alpha_v\beta_3$, показано, что тумстатин специфически подавляя патологический ангиогенез, не влияет на рост и регенерацию тканей [68, 76, 81]. В аминокислотной последовательности тумстатина имеется 2 сайта связывания с $\alpha_v\beta_3$ интегрином. Первому сайту связывания соответствуют фрагменты: tum5 54-132 и 74-98, обладающие равнозначными антиангиогенными свойствами [62]. Второму сайту связывания $\alpha_v\beta_3$ интегрин соответствуют фрагмент 185-203 [15]. И tum5, и фрагмент 185-203 связываются с ЭК и клетками меланомы, при этом, tum5 ингибирует пролиферацию только ЭК, а фрагмент 185-203 – только клеток меланомы. Фрагменты тумстатина активно изучают. Цель: найти фрагмент с наибольшей активностью, но с меньшей молекулярной массой и хорошей растворимостью. Был исследован фрагмент тумстатина, включающий последовательность из 21 аминокислоты (74-98), в котором были удалены тирозин, триптофан и лейцин (75-95). В экспериментах *in vitro* и *in vivo* именно эта последовательность аминокислот специфически ингибировала пролиферацию ЭК и вызывала апоптоз опухолевых клеток [174]. Изучая свойства тумстатина, D. Heringer с соавт. пришли к выводу, что это уникальная молекула с бифункциональными свойствами. Она не только индуцирует апоптоз ЭК, но и препятствует пролиферации опухолевых клеток. Вирусный вектор, содержащий этот ген, может оказаться полезным в лечении как опухолевых, так и неоваскулярных заболеваний глаз [121,235].

Эндостатин. Если тумстатин подавляет пролиферацию ЭК, не влияя на их миграцию, то другой природный ингибитор ангиогенеза, эндостатин, напротив, останавливает миграцию ЭК, не влияя на пролиферацию [45, 62, 66]. Эндостатин связывается с интегрином $\alpha_5\beta_1$, ингибируя ангиогенез отличным от тумстатина способом. Фрагмент эндостатина 6-49 продемонстрировал активность на моделях ангиогенеза *in vitro* и *in vivo* на стадии образования трубчечно-подобных структур [66]. Источником эндостатина является коллаген XVIII. Коллаген XVIII является компонентом сосудистых базальных мембран и мембраны Бруха [68]. Три различных типа коллагена XVIII были описаны у мышей и два у человека. Многообразие его типов следствие транскрипции двух разных промоторов гена. Помимо черт коллагена, коллаген XVIII типа имеет черты гепаринсульфатных протеогликанов, присутствующих в трабекулярной сети и в роговице [68]. Мало что известно о его физиологической роли. Благодаря изучению Col18a1/мышей (нокаут гена) показана задержка регрессии гиалоидных сосудов в глазу после рождения. Доказана связь мутаций в гене человека, отвечающего за синтез коллагена XVIII-COL18A1, с синдромом Knobloch. Большинство мутаций этого гена приводят к усечению коллагена XVIII, дефициту одного или всех его изоформ и дефициту эндостатина. Синдром Knobloch представляет собой аутосомно-рецессивный тип аномалии развития глаза, проявляется витреоретинальной дегенерацией, отслойкой сетчатки, миопией высокой степени, недоразвитием макулы; часто сочетается с затылочной мозговой грыжей и атрофией радужки [66, 93, 155, 215]. Marneros A.G. изучал глаза мышей, дефицитных по коллагену XVIII/Эндостатину (Col18a1(-/-))-для выяснения роли этого компонента ЭКМ в глазу. Глаза Col18a1(-/-)мышей были исследованы с помощью световой и электронной микроскопии, сканирующего офтальмоскопа и ФАГ; проведен ИГХ анализ нейронов и РПЭ. Col18a1(-/-) мыши продемонстрировали разрушение слоя ПЭ в мезодермальном листке радужки с выбросом меланина и прилипанием его к капсуле хрусталика и к беспигментному эпителию цилиарного тела. Цилиарное тело мутантных мышей было сплющено и уплощено. С возрастом мутантные мыши демонстрировали истончение стромы радужки, ее пигментный эпителий мигрировал к заднему полюсу глаза и распластывался вдоль внутренней пограничной мембраны, пенетрируя сетчатку и формируя там кластеры клеток. Мигрирующие клетки морфологически напоминали макрофаги и фибробласты, выполняли их функции и экспрессируя их дифференциационные маркеры. ФАГ демонстрировала развитие аномальных сосудов в сетчатке. Аномалии радужки и цилиарного тела у Col18a1(-/-) мышей доказывали важную роль коллагена XVIII/эндостатина в развитии нормальной архитектоники глаза. Его отсутствие ассоциировалось с изменением мембраноподобных структур внутри глаза и с развитием

серьезных дефектов в радужке, хориоиде и сетчатке, формируя аномалии, имеющие поразительное сходство с синдромом пигментной дисперсии у человека. Кроме того, потеря коллагена XVIII/эндостатина формировала условия для миграции клеток ПЭ радужки в сетчатку [156-158].

Известно, что формирование патологических депозитов под сетчаткой – друз, является одним из ранних признаков ВМД. У нокаутированных мышей с дефицитом эндостатина, отмечали прогрессивное накопление депозитов, напоминающих друзы при ВМД [65]. Дефицит эндостатина также сопровождался нарушением метаболизма витамина А в РПЭ и снижением родопсина. Кроме того, стареющие мутантные мыши демонстрировали разрушение фоторецепторов и увеличение экспрессии кислых фиброглиальных белков в нейронах сетчатки. Все это приводило к прогрессивному снижению зрения. Данные доказывали важную роль эндостатина /коллагена XVIII в поддержании нормальной архитектоники мембраны Бруха, функций РПЭ и зрительного анализатора в целом [65]. Авторы считают, что ультраструктурная организация коллагена в составе мембраны Бруха поддерживается благодаря эндостатину/коллагену XVIII. В свою очередь, мембрана Бруха, являясь частью молекулярной сети базальной мембраны, обеспечивает нормальное функционирование РПЭ и всей сетчатки в целом [65].

Основываясь на результатах ИГХ анализа экспрессии эндостатина в 7 донорских глазах и 36 мембранах, извлеченных из глаз с МНВ, Tatar пришел к выводу, что эндостатин играет ключевую роль в развитии МНВ [108]. Высокие концентрации эндостатина присутствовали в сосудах хориоидеи и в комплексе РПЭ- мембрана Бруха в донорских глазах в отсутствие патологии и отсутствовали в МНВ. Авторы считают, что эндогенное введение эндостатина для устранения его дефицита, может оказать лечебный эффект при нВМД [108].

К. Takahashi исследовал биологические эффекты гиперэкспрессии эндостатина на новообразованных сосудах сетчатки, индуцированных VEGF [215]. После субретинального введения пары аденовирусных векторов (AGV), обеспечивающих тамоксифен-индуцированную экспрессию эндостатина, и последующей ИВИ тамоксифена, возобновлялась экспрессия эндостатина в сетчатке. Это снижало проницаемость сосудов сетчатки, вызванных VEGF, отек и толщину сетчатки. Данные свидетельствовали о том, что эндостатин может быть эндогенным ингибитором проницаемости сосудов, а также неоваскуляризации. Авторы пришли к выводу, что перенос генов, модулирующих синтез и экспрессию эндостатина, может быть способом снижения риска развития трех ключевых причин слепоты: отека макулы при ДР, МНВ и отслойки сетчатки [216, 215]. К аналогичному выводу пришел А. Marnerosetal, изучая нокаутированных мышей с

дефицитом эндостатина. Как оказалось, такие мыши в 3 раза более восприимчивы к развитию МНВ. Добавление в пищу эндостатина мышам с его дефицитом сопровождалось снижением числа сосудов в модели МНВ. При этом в группе контроля – у мышей с нормальным уровнем эндостатина, патологические сосуды практически не обнаруживались, а МНВ не развивалась. Полагают, что эндостатин может пополнить список антиангиогенных препаратов, потенциально пригодных для лечения МНВ [217].

PEDF. Другим потенциальным средством лечения МНВ и регуляции ангиогенеза признан природный пептид PEDF (pigment epithelial derived factor), выделенный в конце 1980-х годов из культуральной среды первичных эмбриональных клеток РПЭ человека [34]. PEDF–гликопротеин с молекулярной массой в 50 кДа из суперсемейства ингибиторов сериновых протеаз. PEDF синтезируется в эмбриональных тканях и тканях взрослого организма – головном и спинном мозге, печени, костях, глазах, сердце и лёгких [33, 101, 102, 112, 113, 115, 232]. PEDF является сильнейшим эндогенным ингибитором ангиогенеза: он в 2 раза активнее ангиостатина и в 7 раз активнее эндостатина [82]. PEDF подавляет миграцию ЭК даже в присутствии мощных проангиогенных факторов VEGF, bFGF и ИЛ-8 [83]. Антиангиогенные эффекты PEDF реализуются через рецептор VEGFR-1 [21]. Механизм действия PEDF не изучен. Есть данные, что, наряду с подавлением активности VEGF, он индуцирует Fas-зависимый апоптоз ЭК [25, 115]. Впервые на него обратили внимание, обнаружив наряду с высокой концентрацией VEGF и низкий уровень PEDF в стекловидной жидкости (СТЖ) глаз с ПДР [101, 108]. Показано, что возрастные различия в экспрессии VEGF и PEDF в хориоиде в норме отсутствуют [52, 53]. Более того, экспрессия VEGF при МНВ была сопоставимой с возрастной нормой, чего нельзя было сказать о PEDF. Экспрессия этого пептида при МНВ была снижена в РПЭ ($p=0.0073$), базальной пластинке РПЭ ($p = 0.0141$), мембране Бруха ($p < 0,0001$) и строме хориоидеи ($p = 0.0161$) [53]. Было выдвинуто предположение, что **PEDF является антагонистом VEGF** [76,77,78,101] и подавляет ангиогенез, вызванный широким спектром факторов роста [72]. В экспериментах на мышах PEDF блокировал развитие аномальных сосудов, не влияя на нормальные сосуды сетчатки [33]. На моделях СНМ у животных PEDF вызывал апоптоз ЭК и ингибировал ангиогенез [103]. Продemonстрировано, что именно баланс PEDF и VEGF предотвращает развитие МНВ при ПДР и ВМД [114]. В зависимости от условий микроокружения PEDF проявлял уникальную способность как стимулировать, так и подавлять неоваскуляризацию в глазу. Так, в тканях здорового глаза с нормальным парциальным насыщением кислорода, PEDF ингибировал ангиогенез, блокируя выработку проангиогенных веществ [101]. При снижении кислорода в тканях глаза, что происходит у пожилых лиц, PEDF, напротив, стимулировал рост новых сосудов [33].

В дополнение к антиангиогенным свойствам PEDF продемонстрировал **нейропротекторный эффект**, уменьшая апоптоз фоторецепторов, вызванный H_2O_2 повреждением РПЭ [221], позволяя сохранить их морфологию, функции, и пространственную организацию сетчатки в целом [76,77,78,83]. Он также оказывал нейропротекторный эффект при офтальмогипертензионном повреждении ГКС [41], обеспечивал защиту нейронов от токсических эффектов глутамата [33,95,109,110, 111,218,219].

В онкологии гиперпродукция PEDF ассоциируется не только с подавлением опухолевого ангиогенеза, но и с регрессией многих типов опухолей, включая меланому [34, 102, 107], а также, с более редким метастазированием и улучшением витального прогноза [103]. За индукцию апоптоза, торможение миграции ЭК отвечает фрагмент PEDF 24-57 [93], состоящий из 34-х аминокислот, не содержащий сайтов фосфорилирования. Точкой приложения фрагмента PEDF 24-57, является стадия образования трубочки в ангиогенезе.

PEDF в разных тканях глаза существенно различается. Она достигает максимума в апикальной части РПЭ и интерфоторецепторном матриксе (144 nM), превосходя в 7-25 раз его экспрессию в СТЖ и в камерной влаге. Такое распределение белка способствует поляризации РПЭ и тонкой организации хориоретинального комплекса [83]. Все это позволяет рассматривать PEDF в качестве терапевтического агента с мультипотентными свойствами: нейротрофным, нейропротекторным, противоопухолевым и антиангиогенным [33], потенциально пригодного для лечения ВМД, ПДР и внутриглазных опухолей.

1.2.2 Стимуляторы ангиогенеза

Способностью стимулировать ангиогенез обладают различные пептиды: фактор роста фибробластов (bFGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), ангиопоэтин -1 и -2 (ang-1, ang-2), а вместе с ними еще около двух десятков факторов. Ключевой фигурой запуска ангиогенеза признан VEGF [2,3,12]. VEGF является хорошо изученным молекулярным участником патогенеза нВМД. Экспрессия VEGF индуцируется ишемией/гипоксией и воспалением. VEGF активирует ЭК, заставляя их пролиферировать, мигрировать, собираться в трубки и формировать связанную сеть сосудов, выживать и усиливать проницаемость сосудистой стенки. VEGF стимулирует миграцию ЭК путем усиления подвижности и гиперэкспрессии матричных металлопротеиназ и плазминогенных активаторов, молекул остеопонтина и матричных рецепторов ($\alpha v \beta 3$ интегрина), а также мостиков коннексина-43. Инактивация аллеля гена VEGF ведет к гибели эмбрионов из-за аномалий развития кровеносных сосудов примерно на 9-й день беременности. Дифференцировка ангиобластов при этом не нарушается, но нарушается образование

просветов сосудов и их ответвлений, а, следовательно, прерывается ангиогенез в целом [2,3,12]. Инактивация гена VEGF в постнатальном периоде ведет к нарушению развития сосудов и жизнеспособности ЭК, задерживает рост и развитие печени, сердца и почек, приводя к летальному исходу. Мутации гена VEGF приводят к различным заболеваниям, сопровождающимся неоангиогенезом. Так, полиморфизм в позиции -634 C/G гена VEGF повышает активность промотера, 634C аллель связан с повышенной экспрессией VEGF. Чаще всего аллель-634C выявляется при ПДР [19, 105]. Полиморфизм -634C/G признан маркером риска развития ПДР. Распространенность этой мутации в популяции больных СД составляет примерно 30%. Заметим, у здоровых людей с генотипом CC уровень VEGF в сыворотке выше, чем при генотипах CG и GG [113].

После рождения экспрессия VEGF уменьшается. Она низка в большинстве тканей взрослых, за исключением мест активного ангиогенеза, таких как яичники, матка и кожа. Высокие уровни VEGF в почках взрослого человека связаны с эндотелиальными фенестрациями. Экспрессия VEGF повышается во время ишемии или воспаления сетчатки и хориоидеи, развития опухоли [12,19]. Эффекты VEGF обычно ограничиваются близлежащими областями, но возможно дистантное воздействие. Свои эффекты VEGF реализует через рецепторы: VEGFR-1 VEGFR-2, VEGFR-3, нейтрофилин-1 и нейтрофилин-2. Различают 3 основных мембранных тирозин-киназных рецептора: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-2) и VEGFR-3 (Flt-3). Все эти рецепторы после связывания с лигандом VEGF подвергаются фосфорилированию. Активация этих рецепторов ведет к включению многочисленных внутриклеточных пост-рецепторных сигнальных каскадов, запускающих патологический ангиогенез. Наиболее активный изомер VEGF-A воздействует на ЭК через VEGFR-1 и VEGFR-2. Однако роль этих рецепторов в ангиогенезе различна. Отсутствие у экспериментальных животных VEGFR-2 снижает плотность сосудов сосудистой сети, а дефицит VEGFR-1 приводит к гиперпродукции дезорганизованных сосудов и скоплений ЭК [12]. Гиперэкспрессия VEGFR-2 на ЭК запускает пролиферацию, миграцию и дифференцировку, а также к блокировке апоптоза и увеличивает сосудистую проницаемость [3,12]. Функции VEGFR-2 менее понятны. Существуют еще циркулирующие (не связанные с клетками) рецепторы VEGF, предположительно играющие роль ловушек для VEGF, попавшего в системный кровоток. VEGFR-3 участвует в образовании лимфатических сосудов [43, 90]. Рецепторы к VEGF появляются на поверхности ангиобластов или ЭК в условиях ишемии и избытка VEGF и только тогда ЭК пролиферируют, мигрируют и образуют трубчкоподобные структуры, представляющие собой каркас для построения сосудистой сети. Чем более выражен дисбаланс между про- и антиангиогенными факторами, тем больше ошибок в «конструкции» вновь построенных

сосудов: неправильная пространственная ангиоархитектоника дополняется неполноценной мозаичной структурой сосудистой стенки, облегчающей доставку питательных веществ ишемизированным тканям.

Доказано, что VEGF - не только основной индуктор ангиогенеза, но и нейрональной пролиферации. Он - координатор роста как сосудов, так и нейронных сетей. VEGF обладает мощными нейротрофными и нейропротективными свойствами [56, 57], которые проявляются в условиях гипоксии и/или ишемии [57]. К. Jin продемонстрировал это *in vitro* на клеточных линиях нейронов гиппокампа HN33 и на первичной культуре церебральной корковых нейронов крысы. VEGF сокращал объем гибели нейронов, на модели *in vitro* церебральной ишемии. В концентрации 50 нг/мл он вдвое повышал выживаемость клеток после 24 часовой гипоксии и/или гипогликемии [56]. Нейропротекторные эффекты реализовывались через рецепторы VEGFR-2 и neuropilin-1, но не VEGFR-1. Попытка воспроизвести нейропротекторный эффект VEGF другим пептидом – плацентарным фактором роста, являющимся основным лигандом рецептора Neuropilin-1 оказалась неудачной. Факты подчеркивают важную роль рецепторов VEGFR-2 и нейропилина, а также VEGF в нейропротекторных механизмах [56].

1.3 Современные представления о механизмах фармакологической регуляции патологического ангиогенеза: принципы, проблемы, перспективы

Сложный механизм ангиогенеза с участием многих молекулярных участников, раскрывает много возможностей для терапевтического вмешательства. Антиангиогенная терапия — это терапия, направленная на ингибирование ангиогенеза. Ее мишенями могут клетки, регуляторные молекулы, участвующие в ангиогенезе, или гены, отвечающие за синтез проангиогенных или антиангиогенных факторов. Эволюция фармакоиндустрии насчитывает более 500 препаратов с заявленными антиангиогенными свойствами. Пятьдесят из них находятся в активной разработке [2, 3, 12, 35]. Одной из самых популярных и востребованных современных технологий борьбы с ангиогенезом в клинической офтальмологии является анти-VEGF-терапия [12]. Неуклонный интерес к развитию этого направления и расширение спектра препаратов и инновационных технологий с VEGF-зависимыми механизмами отмечается на протяжении последних 20 лет. В основе этого направления лежит концепция, что молекула VEGF является ключевой молекулой в запуске неоангиогенеза в глазу. Прорабатывается блокировка проангиогенной активности VEGF на всех уровнях (Рис. 2.) [12, 28, 75]:

- 1) **подавление биологической активности VEGF** путем связывания активного сайта VEGF;

2) конкурентное **связывание мембранной части** доменов тирозин-киназных рецепторов VEGF, расположенных на ЭК моноклональными АТ анти-VEGF-R-1/ DC 101 и VEGF-R-2/DC 101) антителами [12, 28, 86];

3) блокировка **внутриклеточной передачи сигнала** через **внутриклеточные домены** тирозин-киназных рецепторов малыми молекулами (Sunitinib, Sorafenib, Su6668, Axinib, AG-03736, Semaxanib и Vatalanib и др.) [3, 12, 37, 90];

4) блокировка/инактивация мессенжера РНК и **подавление синтеза VEGF** методом РНК-интерференции (sirRNA/Bevasiranab) и/или природными ингибиторами (Rapamycin) [35, 36, 96-98];

5) **подавление экспрессии промоторов гена VEGF-A**, а также генов рецепторов VEGFR-1 и VEGF-R2 с помощью ингибитора гистонацетилазы FK228 или рекомбинантных синтетических олигонуклеотидов [12,28, 37, 88];

6) **подавление синтеза VEGF на генном уровне** путем локального переноса/трансфекции в субретинальное пространство вирусного вектора (плазмиды), блокирующего ген, отвечающий за экспрессию VEGF или тирозин-киназных рецепторов [12,28,35].

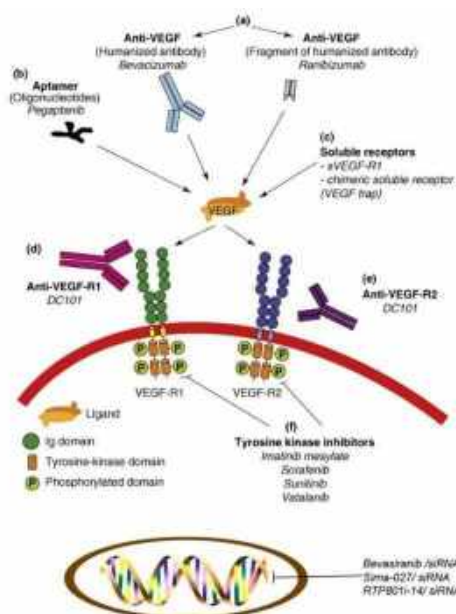


Рис. 2. Механизмы и принципы регуляции ангиогенеза с помощью VEGF-зависимых препаратов [48]

Как видно из представленных данных, большинство механизмов, используемых в лечении ВМД, направлены на ингибирование функции VEGF. Это возможно как с помощью моноклональных антител (мАТ), создаваемых с помощью инновационных биотехнологий, так и с помощью молекул с противоположными эффектами. Подходы на основе мАТ предназначены для прямого воздействия на VEGF или его рецепторы. Отличительной способностью мАТ является большое количество различных клеточных мишеней, участвующих в ангиогенезе. К мишеням относят перициты, окружающие стенку

сосуда, макрофаги, вырабатывающие большое количество медиаторов, и, конечно же, ЭК. Основная цель АТ - не убить ЭК, как структурную единицу сосудистой сети, а подавить ее активность, ингибировать ее пролиферацию и/или миграцию [3, 84]. Подавление именно этих функций ЭК прерывает рост новых сосудов. На этапе развития и внедрения АТ в практическую медицину в числе достоинств этой технологии выдвигали низкий риск формирования лекарственной резистентности, в основе которой, лежит генетическая неустойчивость клеток-мишеней. Полагали, что ЭК, как главная мишень АТ, характеризуется высокой устойчивостью генома [3, 12, 42]. Третьей особенностью АТ признавали большую продолжительность лечения. И наконец, применение АТ отнесли к разряду плохо управляемых и плохо прогнозируемых процессов [3, 84].

Другой класс лекарств, представляет собой так называемый рецептор-приманку или ловушку VEGF. Это - белок, имитирующий рецептор VEGF, который связываясь с молекулой VEGF, инактивирует ее. Еще один подход заключается в ингибировании VEGF путем инактивации активности тирозинкиназного рецептора VEGF, благодаря связи с которым молекула VEGF реализует свои биологические эффекты.

В списке последних инновационных технологий VEGF-зависимых механизмов ингибирования ангиогенеза, стоит РНК-интерференция, направленная на подавление гена на стадии транскрипции, трансляции, деаденилирования или деградации мРНК. Этот класс представлен малыми молекулами РНК и запускается ферментом Dicer, разрезающим длинные молекулы двуцепочечной РНК (dsRNA) на короткие фрагменты порядка 21-25 нуклеотидов, называемые siRNA. Молекулы siRNAs устраняют потенциальные проангиогенные стимулирующие эффекты своих мишеней. Эффекты молекул siRNAs временные. Иное дело - промотор экспрессирующие shRNAs или miRNAs, который может потенциально обеспечить долговременное молчание в результате однократного введения в глаз (рис. 2). Лечение глазных заболеваний путем контроля экспрессии генов является эффективным методом. Посттранскрипционное «глушение» генов происходит, когда матричная РНК (мРНК) определенного гена-мишени разрушается. Разрушение мРНК, кодирующей вредный белок, препятствует трансляции с образованием активного генного продукта.

VEGF-A является признанным драйвером неоангиогенеза. Связываясь с внеклеточными лиганд-связывающими доменами двух тирозинкиназных рецепторов (VEGFR-1 и VEGFR-2) VEGF-A запускает каскад реакций, активируя гены ангиогенеза и сосудистой проницаемости. Сравнительно недавно возник терапевтический интерес к VEGF-C и VEGF-D. Было показано, что эти изоформы увеличиваются в ответ на ингибирование VEGF-A [148,149]. Избирательная блокада VEGF-A может запускать

компенсаторную активацию VEGF-C и VEGF-D. Прерывание ангиогенеза не происходит и формируется резистентность к анти-VEGF-терапии. Поэтому активно изучаются пути подавления этого механизма резистентности.

Наряду с VEGF-зависимым механизмом запуска ангиогенеза, признаны альтернативные пути, использующие векторную ось Ang-Tie 2. В этом пути ключевыми цитокинами, которые взаимодействуют с трансмембранной рецепторной тирозинкиназой (Tie-2), являются ангиопоэтин-1 и ангиопоэтин-2 [139]. В условиях нормы Tie-2 связывается с ангиопоэтином-1, который является защитным фактором, способствующим стабильности сосудов и ЭК, рекрутированию перицитов и ингибированию факторов сосудистой проницаемости [139]. Однако в условиях запуска неоангиогенеза активируется конкурентный ингибитор ангиопоэтин-2, вытесняющий Ang-1 и происходит дестабилизация ЭК, воспаление и разрушение гематоретинального барьера. Комбинированная терапия, направленная на эти ангиогенные факторы, в тандеме с антиVEGF-препаратами, может гипотетически обеспечить дополнительные преимущества.

Активный поиск и непрерывная разработка новых препаратов свидетельствуют о недостаточно высоком и/или непродолжительном терапевтическом эффекте известных лекарственных средств с антиангиогенной активностью. Другим возможным объяснением этого факта может быть недостаточная изученность фундаментальных основ управления ангиогенезом. Учитывая популярность разработок анти-VEGF препаратов для лечения ВМД руководитель исследовательской группы D'Amore обратила внимание офтальмологов на другой аспект этой проблемы [109]. Она и сотрудники ее лаборатории воспроизвели эффекты анти-VEGF препаратов, вводя в глаза взрослых мышей растворимый рецептор VEGF, известный как sFlt1, связывающий и нейтрализующий VEGF наподобие Lucentis. После 2-х недельного эксперимента исследователи обнаружили, что препарат не повлиял на кровеносные сосуды сетчатки, но индуцировал гибель клеточных элементов внутреннего и наружного ядерных слоев сетчатки, в частности, амакриновых клеток, участвующих в нейротрансмиссии зрительного сигнала; и клеток Мюллера, участвующих в зрении и поддержке фоторецепторов; отвечающих за цветовое и ночное зрение. Морфологические изменения коррелировали с потерей функций, что нашло отражение в электроретинографических данных [91]. Они также провели ИГХ исследования и обнаружили, что фоторецепторы и клетки Мюллера экспрессируют рецепторы VEGFR2, в то время, как их клеточное микроокружение и в меньшей степени клетки Мюллера, экспрессируют молекулу VEGF. Авторы установили, что супрессия синтеза VEGF приводит к смерти клеток Мюллера, функции которых по жизнеобеспечению сетчатки неоценимы. Таким образом, они пришли к заключению, что VEGF в аутокринной манере

поддерживает выживаемость клеток Мюллера и фоторецепторов, выступая в качестве их нейропротектора. Продолжительная анти-VEGF терапия приводит к апоптозу РПЭ и фоторецепторов и снижению зрительных функций, что подтверждается электроретинографическими данными [91]. «Мышиные глаза отличаются от человеческого глаза», – говорит D'Amore. «Безусловно, мы не можем экстраполировать непосредственно эти результаты на глаза человека, но наши исследования предоставляют важную информацию, которая должна быть учтена при расширении показаний к долгосрочному использованию этих препаратов.». Сегодня информация о том, что VEGF продуцируется в норме клетками сетчатки и необходим для нормального выживания РПЭ дискутируется [56, 57, 64, 74]. Исследования продолжаются [203].

Одним из первых препаратов, ингибирующих активность VEGF и появившихся на фармацевтическом рынке, стал Pegaptanib (Macugen, Макуген, «VEGFPharmaceuticals» и «Pfizer»). Макуген – олигонуклеотидный аптамер, ингибирующий активность VEGF₁₆₅. Аптамеры представляют собой лиганды нуклеиновых кислот, связывающие различные мишени. Связываясь с молекулами белка, аптамеры меняют их пространственную структуру и/или подавляют их биологическую активность [44,50]. Связывая VEGF, аптамер анти-VEGF, препятствует его связи с рецептором и запуску каскада внутриклеточных реакций. Многоцентровое дозозэскалационное исследование инициировано Eyetech Study Group в 1998г. В исследование были включены 15 пациентов с субфовеолярной СНМ. Они получили одну ИВИ препарата в глаз. Доза варьировалась между 0.25 и 3.00 мг. Через 3 месяца после ИВИ 80% глаз имели улучшение или стабилизацию зрительных функций; 26.7% улучшили функции на 3 и более строчки по шкале ETDRS. Признаки хориоидальной или ретинальной токсичности отсутствовали [43,50]. Целью II фазы было уточнение безопасности многократных ИВИ 3 мг Макугена. Макуген вводили трижды с 28-дневным интервалом в комбинации с фотодинамической терапией (ФДТ) и без нее 21 пациенту с классической СНМ. ФДТ проводили за 5-10 дней до ИВИ препарата. Серьезных осложнений не зафиксировано. Стабилизация или улучшение функций по истечении 3-месячного курса имели место у 87.5% пациентов, получивших только Макуген, из них 25% глаз продемонстрировали улучшение зрения на 3 и более строчки по шкале ETDRS. В комбинации с ФДТ 60% глаз также добавили 3 и более строки. Фаза II подтвердила безопасность многократных ИВИ Макугена и хороший лечебный эффект в виде улучшения зрительных функций, особенно в сочетании с ФДТ [38]. В 2001 году сразу 2 проспективных, рандомизированных двойных слепых, многоцентровых, контролируемых клинических исследований (VISION) стартовали в 117 регионах мира (USA-CANADA-Протокол № 1004; по другим центрам – Протокол № 1003). В исследование вошли 1208 пациентов старше 50

лет с субфовеолярной СНМ при ВМД. Сравнивали эффективность доз 0.3, 1.0 или 3.0 мг с инъекцией физ. раствора (плацебо-контроль). Инъекции выполнялись монокулярно каждые 6 недель в течение 48 недель. Критерием оценки эффективности была пропорция пациентов, потерявших менее 15 знаков с начала исследования при сроках наблюдения 54 недели. К этому сроку 70% пациентов, получивших 0.3 мг Макугена ($p < 0.001$), 71% пациентов, получивших 1.0 мг ($p < 0.001$), и 65% лиц, получивших 3.0 мг ($p < 0.03$), показали потерю менее 15 знаков Снеллена по сравнению с 55% лиц группы плацебо-контроля. Вторым критерием оценки эффективности Макугена, стало количество пациентов в группе, потребовавших дополнительного лечения ФДТ: их было намного меньше в группе, применявшей 0.3 мг препарата, по сравнению с группой плацебо-контроля. Не было выявлено дозозависимой связи. Пропорция лиц, потерявших < 15 знаков Снеллена, была выше в группах, получивших меньшие дозы (0.3 и 1.0 мг) по сравнению с группой, получившей 3.0 мг. Сегодня в США применение Макугена в офтальмологии разрешено только для лечения СНМ при ВМД. В Европейском Союзе Макуген изъят из обращения по причине более высокой эффективности других представителей этой группы [80].

В 2004 году на фармацевтическом рынке появился препарат бевацизумаб (Авастин, «Genentech, Inc», США) - рекомбинантное полноразмерное человеческое мАТ против VEGF [58, 84]. Авастин распознает все изоформы VEGF [12, 84]. В отличие от Макугена он гликозилирован и имеет фрагмент Fc. Согласно инструкции к препарату основным и единственным на сегодняшний день способом введения Авастина является внутривенная капельная инфузия при злокачественных солидных опухолях. Введение его ИВИ пациентам с МНВ на глазном дне является *“off-label”*. Доклинические исследования у приматов показали хорошую проницаемость препарата в сетчатку, в наружный фоторецепторный слой и слой РПЭ при ИВИ [49, 234]. В двух небольших неконтролируемых клинических исследованиях, проводимых в 2004-2005 гг. одной и той же группой, Авастин вводили внутривенно пациентам с ВМД. Отмечено улучшение функций и уменьшение отека и толщины сетчатки (по данным ОКТ). Препарат хорошо переносился, не вызывал серьезных осложнений, кроме внутриглазной гипертензии, потребовавшей терапии [71, 73]. ИВИ Авастина показали эффективность, сопоставимую с Луцентисом или ФДТ [11, 26, 30, 84, 88, 94, 99, 117]. Вместе с тем, имелись сообщения о развитии асептического интраокулярного воспаления после ИВИ [31, 32, 118, 119, 195, 204]. В порядке объяснения представлена версия о том, что домен Fc Авастина способствует развитию иммунного ответа, активируя фагоциты и/или каскад комплемента, повышая т.о. их чувствительность к провоспалительной реакции. Авастин также способен гликозилировать экстраклеточные белки, повышая их иммуногенный потенциал [14, 92, 119, 190]. Сравнивая эффективность,

безопасность и переносимость доз 2.5 и 5.0 мг/кг эксперты пришли к выводу о том, что результаты идентичные. У пациентов с отслойкой РПЭ системное введение Авастина сопровождалось сокращением площади МНВ и высоты отслойки [22, 168, 189]. Проанализирована эффективность Авастина у пациентов, не отвечавших на макуген. В течение первой недели после введения на ОКТ была зафиксирована резорбция жидкости с повышением зрения; эффект держался 4 недели [89, 117]. Фаза I была проведена для оценки безопасности и переносимости ИВИ Авастина пациентами с МНВ. Авастин вводили в дозе 1,0, 1,5, 2,0 мг. Из 45 пациентов, вошедших в исследование, 43 завершили. 12 недель спустя: зрение было стабильным или даже более высоким, отсутствовали признаки прогрессирования СНМ или локального воспаления в передней или задней камере [30]. Доказательства преимуществ ИВИ Авастина по сравнению с ФДТ или ИВИ триамцинолона при МНВ росли по мере того, как появлялись свежие данные об улучшении зрения и уменьшении отека макулы [12]. Ретроспективное исследование продолжительностью 12 недель с участием 266 пациентов с СНМ выявило улучшение зрения у 38.8%. Толщина сетчатки в макуле уменьшалась в среднем на 127 микрон [99]. Схожие результаты представили Rich с соавт.: 44% случаев с повышением остроты зрения на 3 строчки и выше, снижение толщины сетчатки на площади до 1000 микронов [87]. Avery подтвердил размеры площади резорбции отека сетчатки, а также прибавку зрения в 20 знаков за 8 недель [18]. Несмотря на то, что ИВИ препарата в целом хорошо переносились пациентами, имелись сообщения о развитии интраокулярного воспаления после инъекций [15, 118, 119].

В июне 2006 года Агентство по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA) одобрило к применению препарат Ranibizumab (Lucentis, Луцентис). В отличие от Bevacizumab, имеющего два связывающих домена, Луцентис имеет только один домен, однако, при этом демонстрировал более высокое сродство к VEGF. Его малая молекулярная масса (48 kD против 149kD у Авастина) позволяла ему лучше проникать через все слои сетчатки к мишени – рецепторам VEGF новообразованных сосудов. Более длинный период полураспада Луцентиса – 28-30 дней против 17-21 дней у Авастина обосновывал интервалы между ИВИ. Ежемесячные ИВИ Луцентиса останавливали рост сосудов в 90% случаев с ВМД, из них 30-40% пациентов улучшали зрение [88,189]. Эффективность Луцентиса изучали в двух крупных исследованиях (III фаза): **MARINA** (Minimally Classic/Occult Trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the treatment of neovascular AMD) и **ANCHOR** (Anti-VEGF Antibody for the Treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularization in Age-Related Macular Degeneration). MARINA сравнивала эффективность Луцентиса против плацебо-контроля при минимально классической СНМ /оккультной СНМ (ВМД). В MARINA вошли 716 пациентов, которые

получили 24 ежемесячных ИВИ (0.3 или 0.5 мг). В контроле «лечили» плацебо. Критерием эффективности стала пропорция пациентов, потерявших менее 15 знаков от исходных показателей за 12 месяцев наблюдения. По завершении 1 года 94.5% лиц в группе, получившей 0.3 мг Луцентиса, и 94.6% в группе, получившей 0.5 мг потеряли менее 15 знаков по сравнению с 62.2% пациентов группы плацебо-контроля. Улучшили зрение на >15 знаков 24.8% первой группы (0.3 мг) и 33.8% второй группы (0.5 мг) по сравнению с 5% в контроле. Средний прирост функций составил 6.5 знаков в 1 группе (0.3 мг) и 7.2 знака во 2 группе (0.5 мг) против потери 10.4 знака в группе плацебо-контроля. При 2-х летнем наблюдении были выявлены 1% эндофтальмита и 1.3% увеита. Было доказано, что препарат тормозит снижение зрения при минимально классической или оккультной СНМ в течение 2-х лет, при минимуме осложнений [191]. В исследование **ANCHOR** вошли 423 пациента (143 – ФДТ; и 2 группы по 140 человек, которым вводили Луцентис). В качестве группы/метода сравнения была выбрана ФДТ с Визудином. К началу этих исследований, ФДТ с Визудином на поздних стадиях преимущественно классической СНМ была стандартом лечения, доказавшим замедление прогрессирования нВМД. ИВИ препарата проводили трижды ежемесячно с обязательным мониторингом глаз. Были представлены функциональные доказательства, что 3 ежемесячные ИВИ Луцентиса в дозе 0,3 мг дают лучшие результаты, чем ежеквартальные инъекции в дозе 0.3 или 0.5 мг. К окончанию 2х летнего наблюдения в группах, леченных Луцентисом, 89.9%-90.0% потеряли менее 15 знаков от исходной остроты (против 65% в группе ФДТ-контроля), а 34-41.0%, напротив, добавили ≥ 15 знаков в обеих группах (против 6.3% в группе ФДТ). Таким образом, средний прирост зрения составил 8.1-10.7 знаков на фоне лечения Луцентисом против снижения зрения на 9.8 знаков на фоне ФДТ [92,188].

PIER (III фаза) представляли собой многоцентровые, рандомизированные, двойные слепые, плацебо-контролируемые исследования, целью которых стал анализ эффективности и безопасности Луцентиса. Схема введения: первые 3 месяца вводили препарат ежемесячно, затем ежеквартально на протяжении 1 года. Результаты 1 года наблюдения опубликованы в 2007 году. Пациенты были рандомизированы на 3 группы. Первая группа состояла из 60 пациентов и получала 0.3 мг препарата, вторая группа – включала 61 пациент и получала 0.5 мг, третья – 63 и плацебо, соответственно. Критерием эффективности служил градиент изменения остроты зрения к концу 1 года наблюдения по сравнению с исходными функциями. Данные были таковы: -16.3 (1) – 1.6 (2) и 0.2 (3) знака для плацебо-контроля (1) – 0.3 мг (2) и 0.5 мг (3), соответственно ($p \leq 0.0001$, по сравнению с группой плацебо-контроля. Т.о., Луцентис тормозил рост СНМ и снижал перфузию

стенки сосудов. Лечебный эффект во время ежеквартальных ИВИ существенно снизился [26].

Многоцентровое рандомизированное, слепое контролируемое исследование **FOCUS** проводило анализ эффективности и побочных эффектов комбинации Луцентиса и ФДТ с Визудином у пациентов с преимущественно классической СНМ (ВМД) на протяжении 2-х лет. В исследование вошли 106 пациентов, получавших ежемесячно инъекции Луцентиса 0.5 мг. Группа плацебо-контроля состояла из 56 человек. Всем им провели ФДТ на 0 день исследования, сеансы ФДТ повторяли ежеквартально по мере того, как это было необходимо. Критерии эффективности: изменения функций, динамика размеров очага (по ОКТ) и частота сеансов ФДТ в группах. К концу второго года 88% пациентов, получивших Луцентис и ФДТ, потеряли менее 15 знаков от исходной остроты зрения по сравнению с 75% пациентов в группе плацебо-контроля и ФДТ. 25% пациентов в комбинированной группе добавили более 15 знаков против 7% в группе ФДТ+ плацебо. Т.о. межгрупповая разница в прибавке зрения составила 12.4 знака. Кроме того, в группе комбинированного лечения остановился рост СНМ, быстрее резорбировался отек и субретинальная жидкость; потребность в ФДТ была ниже. Для сравнения: 0.4 против 3 сеансов в группе плацебо-контроля. Эндофталмиты и увеиты развивались, соответственно, в 2.9% и 12.4% в группе комбинированного лечения и 0% в группе плацебо-контроля+ ФДТ [11, 26].

В 2009 году были опубликованы двухлетние проспективные неконтролируемые, дозовариабельные исследования группы **PrONTO**. (Prospective Optical Coherence Tomography Imaging of Patients with neovascular Age-Related Macular Degeneration Treated with Intraocular Ranizumab), где в качестве критерия оценки эффективности использовали данные ОКТ. В исследование включали пациентов с н ВМД с толщиной сетчатки в области макулы 300 микрон и выше. Вводили 3 ИВИ Луцентиса по 0.5 мг. На протяжении 1 года наблюдения пациентам делали ИВИ ежемесячно в случае, если сетчатка утолщалась более чем на 100 микро и/или зрение снижалось более чем на 5 знаков. На втором году наблюдения курс повторяли в случае повышения объема жидкости на ОКТ в субретинальном пространстве. Завершили исследование 37 пациентов. По завершении двух лет наблюдения зрение повысилось в среднем на 11.1 знаков, толщина сетчатки уменьшилась на 212 микрон, при этом в 43% случаях прирост зрения составил 15 знаков и выше. В среднем понадобилось 9.9 инъекций для этого [60].

К настоящему времени активно изучается рекомбинантный белок VEGF-Trap (Афлиберцепт, Эйлеа) в котором домены рецепторов VEGF-R1 и VEGF-R2 соединены с фрагментом Fc IG G. Молекула имеет высокое сродство ко всем изоформам VEGF, включая VEGFA и VEGFB, и к плацентарным факторам роста 1 и 2 (PGF-1, PGH-2). Препарат

представляет собой ловушку активных форм VEGF. Связь VEGF-Trap с молекулой VEGF длится 150 дней, что увеличивает интервалы между ИВИ. VEGF-Trap прошел I, II и III фазы клинических испытаний (VIEW 1 и 2), где были оценены безопасность и эффективность. В дозе 2 и 4 мг отмечен прирост зрения в среднем на 13.5 знаков. Интервал между ИВИ варьировал от 45 до 420 дней. Побочных и/или системных эффектов не обнаружено [35].

Перспективным направлением VEGF-зависимой антиангиогенной терапии было признано создание малых молекул, блокирующих тирозин-киназные домены рецепторов VEGF. К этой категории препаратов относят Semaxanib и Vatalanib («Novartis», Швейцария, ингибируют VEGFR-2 (Flk-1)). К сожалению, в связи с низкой эффективностью и высокой системной токсичностью они были выведены из разработки, не дойдя до офтальмологии. Другие препараты этой группы (Axiinib, AG-03736), только вступили на путь КИ. Более успешными и перспективными признаны мультикиназные ингибиторы, воздействующие на тирозин-киназные рецепторы нескольких типов: Sunitinib, Sorafenib, Su6668, (блокируют рецепторы VEGF, FGF, PDGF, c-kit) [2-3]. До офтальмологии также пока не дошли.

РНК-интерференция вошла в клиническую и экспериментальную офтальмологию в начале третьего тысячелетия с препаратом Бевазираниб. Бевазираниб (Bevasiranib, «Acuity Pharmaceuticals») находится в разработке с 2007г, представляет собой синтетические малые молекулы РНК (siRNA), обеспечивающие «молчание» гена, отвечающего за синтез VEGF. I-II фазы КИ препарата подтвердили эффективность РНК-интерференции в лечении ВМД. Бевазираниб уменьшал рост сосудов в сетчатке и улучшал зрение. Малые дозы препарата стабилизировали заболевание на несколько месяцев, высокие дозы давали более продолжительный результат. Полагали, что препарат можно использовать в комбинации с Авастином [98]. Однако в 2009 году департамент здравоохранения Майами Орко объявил о прекращении КИ Бевазираниба. Было доказано, что васкуляризация прерывается благодаря не специфичным для siRNA эффектам, а - активации Toll-like рецептора 3 (TLR3) и последующей активации ИФН γ и ИЛ-12. Другими словами, функции siRNAs обеспечивают неспецифическое подавление ангиогенеза путем прямого взаимодействия siRNAs с TLR3, а не воздействия на заявленную мишень.

Абиципар (abicipar; Allergan plc, Ирландия/Molecular Partners AG, Швейцария)— первый кандидат на фиксированный 12-недельный (Q12) анти-VEGF препарат при МНВ». Этот препарат DARP π связывает все изоформы VEGF-A с высокой аффинностью и специфичностью. Молекулы DARP π представляют собой класс небольших высокостабильных, благодаря сконструированным связывающим белкам, содержащих анкириновые повторяющиеся домены [150]. Их небольшой размер позволяет использовать более высокие дозы в малом объеме и улучшить проникновение в ткани [143]. DARP π

обеспечивает оптимальное сочетание аффинности, молярной дозы и периода полувыведения с продолжительностью эффекта. Абиципар продемонстрировал эффективность в качестве ингибитора VEGF в моделях ангиогенеза *in vitro* и *in vivo* [150]. По сравнению с ранибизумабом абиципар имеет меньшую молекулярную массу (34 против 48 кДа), связывается с VEGF-A165 человека с аффинностью в 90 раз выше (486 фМ против 42,5 пМ), и имеет более длительный период полувыведения из глаза: ≥ 13 дней против 7,2 [43,170,106]. Улучшение зрения, достигнутое в первый год исследований **CEDAR** и **SEQUOIA**, сохранилось на второй год только после 4х ИВИ абиципара, что сопоставимо с результатами ежемесячного введения ранибизумаба. Зрение и толщина сетчатки сохранялись на протяжении 104 недель и не менялись при ИВИ в режиме Q12 против ИВИ ранибизумаба в режиме каждые 4 недели (Q4). Т.о. 10 инъекций абиципара в течение 2 лет против 25 инъекций ранибизумаба» (CEDAR и SEQUOIA, зарегистрированные как NCT02462928 и NCT02462486 на сайте ClinicalTrials.gov). Ранее были достигнуты первичные конечные точки у доли пациентов со стабилизацией зрения на 52-й неделе, при этом эффективность в режиме Q8 и Q12 абиципара была сопоставимой с режимом Q4 ранибизумаба. В течение 104-й недели пациенты получали абиципар по 2 мг по схеме Q8 и Q12 или ранибизумаб по 0,5 мг каждые Q4. Острота зрения к 52-й неделе в группе Q8 увеличилась на 8,9 буквы, Q12 — на 7,4 буквы, а в группе ранибизумаба — на 9,4 буквы от исходного уровня. С 52-й по 104-ю неделю изменения зрения были аналогичны: в группе Q8 прирост составил 7,8 буквы, Q12 — 6,1 буквы, а в группе ранибизумаба — 8,5 буквы. На 104-й неделе стабильное зрение продемонстрировали 93% пациентов 1 группы (Q8), и 90% пациентов 2 группы абиципара (Q 12) и 94% пациентов группы ранибизумаба [108]. Лечение обеими схемами абиципара приводило к значимому снижению CRT к 4-й неделе по сравнению с исходным уровнем, что сохранялось до 52-й недели. Абиципар обеспечивал более быстрое и полное рассасывание интравитреальной и субретинальной жидкости, чем ранибизумаб [42], при нем клиренс интравитреальной и субретинальной жидкости был более быстрым, а осушение сетчатки лучше. Это имело важное значение, поскольку интравитреальные и субретинальные жидкостные компартменты, сохраняющиеся даже при снижении CRT, и по-видимому, влияли на зрение [174]. Анализ объединенных КИ **CEDAR/SEQUOIA** показал преимущества абиципара перед ранибизумабом. Так доля пациентов с «сухой» макулой через 4 недели после 3-й загрузочной дозы составляла 56,5% в группе абиципара Q8 и 52,2% в группе Q12, 41,9% в группе афлиберцепта Q8 и 48,8% в группе бролуциумаба Q8 в КИ **OSPREY** [61]. Общая частота (НЯ), включая связанные с системным ингибированием VEGF, была сопоставима в трех группах. Однако абиципар

имел высокий риск развития эндофтальмита по сравнению ранибизумабом. В целом НЯ привели к прекращению лечения 77 пациентов (12,3%) в группе абиципара Q8, 75 пациентов (12,0%) в группе абиципара Q12 и 25 пациентов (4,0%) в группе ранибизумаба Q4. Частота случаев внутриглазного воспаления была одинаковой в группах абиципара, превышая показатели ранибизумаба: 15,1% и 15,4% при абиципаре Q8 и Q12 по сравнению с 0% при ранибизумабе Q4.[109]. На 52-й неделе среднее изменение МКОЗ по сравнению с исходным уровнем составило 7,5, 6,4 и 8,4 буквы, а CRT составило -144, -145 и -144 мкм в группах абиципар Q8, абиципар Q12 и ранибизумаб Q4, соответственно [60, 61]. Эксперты пришли к выводу, что Абиципар Q8 и Q12 не уступал ранибизумабу Q4 по первичной конечной точке МКОЗ на 52-й неделе. ИВИ абиципара Q12 и Q8 снижали исходы МНВи бремя лечения по сравнению с ежемесячными ИВИ ранибизумаба. Хотя внутриглазное воспаление чаще встречалось при применении абиципара [58].

Kodiak Sciences в 2020 г. вывел на рынок препарат для лечения МНВ - **KSI-301** [179] **KS-301** напоминает классические анти- VEGF препараты, однако он основан на платформе биополимерного конъюгата АТ (ABC) 950 кДа, специально разработан для повышения долговечности [179]. Доклинические исследования продемонстрировали увеличенный период его полувыведения - 10–12 дней. Эффективность KSI-301 оценивали изменением от исходного уровня до 52-й недели средней МКОЗ и ОКТ. Наблюдали среднее улучшение от 5,7 букв до 69,7 букв ETDRS в первый год [179] и снижение толщины сетчатки на 105 мкм. Пациенты получили 3 загрузочные дозы, а затем еще по две ИВИ. В среднем в течение 1-го года было проведено 5 инъекций. У KSI-301 был отличный профиль безопасности. Большинство НЯ были расценены как легкие и соответствовали профилю ИВИ анти-VEGF.

В 2019 году новый препарат Conbercept (Китай) был одобрен для лечения влажной формы ВМД и признан безопасным и эффективным [179,192]. **Конберцепт** - слитый белок массой 141 кДа, который, как и афлиберцепт, действует как приманка рецептора против VEGF [192], но с более высокой аффинностью связывания. Он содержит дополнительный четвертый связывающий домен VEGFR2. Полагают, что эта конструкция обеспечивает повышенную стабильность комплекса рецептор-лиганд и длительный период полураспада [192]. Были инициированы два исследования фазы 3 для нВМД: PANDA-1 и PANDA-2, которых участвовали по 1140 пациентов, получавших 0,5 или 1 мг конберцепта или 2 мг афлиберцепта, с первичным анализом эффективности через 36 недель. В PANDA-1 пациенты получали 3 нагрузочные дозы в течение 8-й недели, затем продолжали принимать дозу каждые Q8 в течение 92х недель. В PANDA-2 доза вводилась pro re nata после 40-й недели, при этом группы 0,5 мг конберцепта и афлиберцепта шли в одном режиме, как

PANDA-1, до этого момента, после чего группа конберцепта 1 мг перешла на режим Q12 через 8 недель и режим PRN на 40-й неделе. Испытания PANDA завершены в 2020 г.

Orthea разработал и вывел на рынок OPT-302, растворимую форму человеческого рецептора VEGF-3, блокирующую VEGF-C, VEGF-D и VEGF-A [192]. **OPT-302** представляет собой молекулу-ловушку, нейтрализующую активность VEGF-C/-D, блокируя активацию ими рецепторов VEGFR2 и VEGFR-3. Полагают, что OPT-302 в тандеме с анти-VEGF-A- препаратами может устранить резистентность, проявляющуюся при лечении анти-VEGF-A препаратами. Эффективность OPT-302 в комбинации с ранибизумабом оценивали КИ **ShORe**, а в комбинации OPT-302 с афлиберцептом - **COAST** [192]. Завершены фазы 2b и 3. В ShORe и COAST было включено 990 нелеченых пациентов. Оценены эффективность и безопасность ИВИ 2,0 мг OPT-302 в комбинации с 0,5 мг ранибизумаба /или 2,0 мг афлиберцепта по сравнению с монотерапией ранибизумабом или афлиберцептом. Первичной конечной точкой исследований стало изменение МКОЗ от исходного уровня к 52 неделе комбинированной терапии OPT-302 по сравнению с монотерапией анти-VEGF-A.

GB-102 – система доставки анти-VEGF с замедленным высвобождением биоразлагаемых микрочастиц, содержащих малат **сунитиниба** (ингибирует рецептор VEGFR-2/Flk-1). Контролируемое высвобождение микрочастиц предполагает ИВИ два раза в год для поддержания зрения и сохранения сетчатки. В исследование **ADAGIO** Phase 1/2a были включены 4 когорты из 8 пациентов с МНВ, получавших разовую дозу 0,25, 0,5, 1 или 2 мг GB-102 [192]. 88% пациентов через 3 месяца и 68% через 6 месяцев получали однократную дозу GB-102. КИ прошли успешно со сроками наблюдения до 8 мес. Толщина сетчатки в центре снижена во все сроки наблюдения по сравнению с исходными показателями. Однако появилась проблема, связанная с тем, что лекарство не агрегировалось в полости стекловидного тела, приводя к дисперсии частиц. У девяти из 32 испытуемых наблюдались сходные симптомы, в том числе боль в глазах, светобоязнь и нечеткость зрения [192]. Был разработан новый производственный процесс для устранения дисперсии микрочастиц и неполной агрегации, намечены новые испытания. В фазу 2b **ALTISSIMO** оценивали эффективность GB-102 у ранее леченных пациентов с nAMD [192]. Исследование состояло из трех когорт, получавших вначале: 1 мг или 2 мг GB-102 или 2 мг афлиберцепта. Затем когорты GB-102 получали ту же дозу каждые 6 месяцев, тогда как последняя контрольная группа продолжит получать афлиберцепт 2 мг каждые 2 месяца. Преимущества GB-102 очевидны уже сейчас. GB-102 имеет самый длительный период между ИВИ. Разработка GB-103, предназначенного для дозирования 1 раз в год, уже началась.

В лечении нВМД наметился сильный вектор к генно-терапевтическим технологиям. Генная терапия уже показала себя многообещающей в лечении наследственных заболеваний сетчатки. Разработчики генной терапии предложили RGX-314 и ADVM-022, в виде одноразовых субретинальных инъекций

RGX-314 представляет собой генную конструкцию для связывания и нейтрализации VEGF способом, сходным с ранибизумабом [228]. RGX-314 использует аденоассоциированный вирус серотипа 8 (AAV8) в качестве основы. Поглощаясь клетками сетчатки, генный вектор обеспечивает высокие уровни продукции фрагмента АТ. Предложено два способа глазного введения RGX-314: однократное субретинальное введение во время витрэктомии; и супрахориоидальное введение в амбулаторных условиях. **ATMOSPHERE** — первое из двух запланированных КИ по оценке субретинальной доставки RGX-314 у ранее леченых больных нВМД [68,69]. Пациентам была выполнена витрэктомия и был введен субретинально RGX-314 в 5 разных дозах. В целом RGX-314 хорошо переносился: у 13 пациентов было зарегистрировано 20 серьезных СНЯ, в том числе в виде значительного снижения зрения в когорте 5. Наиболее распространенные несерьезные НЯ были легкими, это: (87%): послеоперационное кровоизлияние в конъюнктиву (69%), воспаление (36%), раздражение глаз (17%), боль в глазах (17%) и снижение зрения (17%). У 67-83% пациентов наблюдали пигментные изменения сетчатки в периферическом нижнем отделе. В двух когортах с более высокими дозами пациенты через 1,5 года после введения продемонстрировали стабильную остроту зрения и снижение CRT на -46-93 мкм. В когорте 4 из 12 (33%) пациентов не получали инъекций анти-VEGF через 6 месяцев после введения RGX-314 и продемонстрировали среднее изменение МКОЗ по сравнению с исходным уровнем на +2 буквы через 1,5 года. Восемь из одиннадцати (73%) пациентов не получали инъекций анти-VEGF через 6 месяцев после введения RGX-314 и продемонстрировали среднее изменение МКОЗ по сравнению с исходным уровнем на -2 буквы через 1,5 года. Эти данные показывают значимое снижение бремени анти-VEGF лечения в когортах 4 и 5. С положительными результатами завершены КИ ATMOSPHERE и ожидаемыми результатами супрахориоидальной доставки RGX-314 КЛИ AAVIATE.

ADVM-022 представляет собой технологию генной терапии, преследующей целью обеспечение экспрессии анти-VEGF в сетчатке. В КИ **OPTIC** основной целью была оценка безопасности и переносимости однократной внутривенной инъекции ADVM-022. Вторичные цели заключались в оценке МКОЗ и анатомии с помощью спектральной ОКТ (SD-OCT), а также в оценке необходимости экстренной терапии [69]. Все пациенты получали инъекции афлиберцепта за 1–2 недели до введения дозы ADVM-022. Была проведена 24- и 52-недельная оценка безопасности и эффективности с последующим

наблюдением на 104-й неделе. Пациенты получали пероральную профилактику стероидами в когортах 1 и 2 и профилактику стероидными глазными каплями в когортах 3 и 4. В целом, ADVIM-022 хорошо переносился, имел благоприятный профиль безопасности при высоких и низких дозах. Он показал надежную и устойчивую эффективность. Была отмечена стойкость эффекта до 92 недель после однократной инъекции IVT с 0 дополнительными инъекциями в когорте 1. Через 18 месяцев в когорте 1 наблюдалась устойчивая экспрессия белка анти-VEGF в камерной влаге. Снизилась кратность инъекций за 12 мес. Большинству пациентов не требовалось дополнительных инъекций. Исследование OPTIC продлили до 5 лет наблюдения. Два глобальных КИ Фазы 3 (**PIVOTAL-a** и **PIVOTAL-b**) начаты в конце 2021 года. Заметим, генная терапия отличается от других методов лечения тем, что в глаз не имплантируются импланты, вызывающие широкий спектр осложнений. Однако и она не лишена недостатков. Недостатком генной терапии является невозможность ее отключить.

Т.о. многочисленные исследования, прошедшие в разных странах и континентах с различной расовой принадлежностью, продолжительностью от 12 месяцев до 10 лет- **MARINA, ANCHOR; PIER; HARBOR, ABC; CATT; IVAN; GEFAL; LUCAS; ALTAIR, SAVE-AMD, EXCITE, TREX-AMD, CANTREAT, VIEW 1, VIEW 2, TREND, HAWK, HARRIER** - продемонстрировали высокую эффективность и высокий профиль безопасности антиангиогенной терапии. Благодаря внедрению анти-VEGF препаратов (Луцентис, Эйлеа, Бролуцузумаб) в МНВ прогноз заболевания резко изменился. Вероятность улучшения остроты зрения (ОЗ) в течение первых двух лет лечения от «почти достоверной» слепоты [95] приблизилась к 30% [35,36, 152, 99, 100]. Мы стали лучше понимать, диагностировать и лечить МНВ.

1.4 Виды резистентности и ее распространенность

Вместе с тем, несмотря на то, что анти-VEGF- технология была революционной в снижении показателей легальной слепоты, вызванной ВМД, далеко не все пациенты реагировали положительно. Многочисленные КИ свидетельствуют о присутствии в популяции нВМД определенной доли пациентов с первичной резистентностью к анти-VEGF препаратам. Кроме того, выявлены случаи снижения ответа на введение препаратов в течение первых 2-х лет и формирования вторичной резистентности [136,137,138,125].

Заметим, термины «резистентная» и «рефрактерная» недавно признаны фармакологическими синонимами [153]. При этом не прописано, как следует классифицировать «статус респондента» на антиангиогенное лечение. Slakter [166], и Amoaku [17] предложили классифицировать ответ на анти-VEGF терапию, базируясь на

функциональных и морфологических критериях, градируя его на: оптимальный (хороший) ответ, частичный ответ, плохой ответ и отсутствие ответа.

Долгие годы шли бурные дискуссии о том, **какие признаки** следует считать **экспертными при присвоении статуса рефрактерной МНВ**. Одни авторы считают маркером «рефрактерности» выход красителя из сосудов на ФАГ, фиброваскулярную отслойку пигментного эпителия (fPED) с IRF и/или SRF на ОКТ, увеличение геморрагий на глазном дне после 6 загрузочных ежемесячных ИВИ [12,15]. Морфоструктурные изменения сетчатки, имитирующие экссудацию, такие как наружные пертурбации [208] и интратретиальные кисты [21 195], признаны хроническими маркерами дегенерации сетчатки, а не признаком рефрактерности.

Вопрос о том, следует ли ориентироваться на функции при выявлении рефрактерных форм, долгие годы оставался открытым. Мнения экспертов расходились. Некоторые исключили из спектра критериев оценки остроту зрения (BCVA). Еще в 2010 году Slakter [166] отметил, что BCVA может не увеличиваться, а, напротив, уменьшаться, несмотря на полный регресс признаков активности и ремиссию заболевания, даже у респондентов. Он объяснил это вторичными изменениями МНВ, такими как субретиальный фиброз, образование рубцов, атрофия РПЭ и фоторецепторов, заявив, что по этим причинам BCVA не является надежным критерием при определении ответной реакции или невосприимчивости к лечению [166]. В тоже время, в клинической практике было несколько работ, в которых анализировали ответ на основе BCVA [135, 40, 50; 111].

Большинство клиницистов оценивают ответ и принимают решение о повторении курса на основании офтальмоскопических и ОКТ признаков активности. Регресс или разрешение экссудации считается хорошим ответом на лечение [107, 201, 33, 78, 96, 64; 32, 28]. При разных подходах к оценке эффективности антиангиогенного лечения МНВ распространенность нереспондентов варьирует в широком коридоре: от 7,5 до 68 %. Так, D.F. Martin стойкую экссудацию в макуле методом ОКТ обнаружил у 51,5%, леченых ранибизумабом, у 67,4% пациентов, получавших бевацизумаб на протяжении 2 лет [158]. Другие эксперты на основании ОКТ демонстрируют рефрактерность на уровне $\approx 22,2$ % [5, 9, 39, 17, 137]. В КИ, анализирующих по функциональным показателям (BCVA), представлены иные цифры. Так, Вуип после 12-месячного курса лечения бевацизумабом, выявил 68,1 % нереспондентов [16]. Grewal [116] и Tranos [224] показали, что половину пациентов без улучшения зрения следует признать резистентными [14]. По данным Otsuji 10,1 % глаз ($n = 213$), на фоне

3 загрузочных ИВИ ранибизумаба показали нереспондентность на морфофункциональном уровне [171]. Shin [200] выявил 7,5 % нереспондентов (n=267) на терапию антиVEGF препаратами (ранибизумаб и бевацизумаб). В их исследовании стойкий и/или увеличивающийся интра- или субретинальный экссудат был принят в качестве критерия отсутствия реакции. В рекомендациях RCOphth по лечению МНВ с помощью анти-VEGF-терапии предложено использовать зрительные функции в тандеме с ОКТ-параметрами [187].

Еще одним термином, требующим разъяснения, стал термин «рецидивирующая» МНВ. Установлено, что помимо стационарной экссудации встречаются пациенты со свежими кровоизлияниями в сетчатку или усилением SRF/IRF после первоначального разрешения экссудации. Мнения относительно того, как расценивать такое клиническое течение, разошлись. Одни эксперты считают, что «рецидив» означает эпизод подавления экссудации в течении МНВ, требующий частых инъекций [167]. Другие полагают, что «рецидивирующая» МНВ должна продемонстрировать полное исчезновение экссудации после 6 загрузочных ИВИ в тандеме с множественными рецидивами (минимум 2) экссудации или нарастанием IRF/SRF с изменениями остроты зрения после отмены лечения. Заметим, только 1 рецидив экссудации они предлагали диагностировать как «рецидив» МНВ вместо «рецидивирующая» МНВ. Выявлены нюансы. С точки зрения прогноза на лечение рецидивирующая экссудация сетчатки предпочтительнее рефрактерной МНВ. Несмотря на многократные рецидивы экссудации, некоторые глаза хорошо реагируют на частые инъекции и в итоге достигают длительной ремиссии с «осушением» макулы. Другие со временем отвечают на лечение хуже и сохраняют стойкую экссудацию. Таким пациентам можно смело диагностировать «рефрактерную МНВ» [117]. Реже после хорошего первичного ответа с регрессом отека позже развивается один рецидив экссудации и сразу после него появляется резистентность к лечению [68,128]. Доказано, что группа с рецидивами МНВ — второй по значимости поставщик резистентных форм. В качестве главных фармакологических причин рефрактерности признаны тахифилаксия и толерантность. Оба термина отражают суть одного биологического феномена - снижения эффективности лекарственного препарата. Однако есть принципиальные отличия, влияющие на выработку стратегии и тактики (табл. 1).

Толерантность — концепция фармакологии, отражает привыкание к лекарственному средству (синоним: резистентность), когда реакция пациента на конкретное лекарство и физиологическая концентрация этого лекарства снижаются с каждой последующей инъекцией. Феномен нарастает медленно и выявляется по истечении длительного промежутка времени. Толерантность клинически проявляется снижением

регресса IRF и/или SRF с каждой последующей инъекцией препарата; возможны рецидивы отека, после которых развивается рефрактерность, несмотря на продолжающееся лечение [128].

Тахифилаксия — фармакологический термин, описывающий отсутствие реакции на лекарство уже после первой инъекции или резкое (внезапное) снижение ответа на препарат после второй инъекции [78, 27,158,16]. Механизм тахифилаксии при анти-VEGF терапии все еще не ясен. Ее невозможно преодолеть увеличением дозы препарата. Эффективность восстанавливается путем перерыва в приеме лекарства или увеличением интервала между ИВИ. Клинически тахифилаксия отличается от толерантности и рецидивов (табл.1). При тахифилаксии на фоне продолжающегося лечения сохраняется или усиливается интравитреальный отек (по данным ОКТ), появляются свежие геморрагии или расширяется площадь старых кровоизлияний, субретинальная жидкость сохраняется или увеличивается, несмотря на повторяющиеся интравитреальные инъекции [27].

Таблица 1. Сходства и различия тахифилаксии и толерантности

	Тахифилаксия	Толерантность
Общие черты	Оба феномена отражают снижение ответа на лечение. Пациенты с тахифилаксией и толерантностью — главные поставщики рефрактерных форм нВМД. В обоих случаях потенциальный путь для устранения проблемы — переход на другой антиангиогенный препарат	
Принципиальные различия	Тахифилаксия	Толерантность
Терапевтический ответ на лечение	Отсутствует практически сразу	Снижается с каждой последующей инъекцией
Время развития феномена	Развивается с первой или второй инъекции	Развивается после 4–7 ИВИ, частота увеличивается с каждым последующим годом в среднем на 3–6 %
Клинические различия	На фоне продолжающегося лечения сохраняется или усиливается IRF (по данным ОКТ), появляются свежие геморрагии или расширяется площадь старых кровоизлияний	На фоне продолжающегося лечения с каждой последующей инъекцией снижается регресс IRF и/или SRF; возможен рецидив отека, после которого развивается рефрактерность
Пути преодоления	а. Кратковременный перерыв в лечении.	а. Эскалация дозы антиангиогенного препарата.

	b. Пролонгация интервала между инъекциями	b. Укорочение интервала между инъекциями
--	---	--

Существует мнение, что стабилизацию зрительных функций в отсутствие морфометрических подтверждений (средняя центральная толщина сетчатки, CST) на фоне ИВИ не следует считать признаком тахифилаксии [78, 64]. Считают, что при лечении ранибизумабом, имеющим сродство к VEGF-A, тахифилаксию может вызвать альтернативный бесконтрольный VEGF-зависимый ангиогенез [127]. Эта версия объясняет эффективность у них афлиберцепта, имеющего высокое сродство к VEGF-A и VEGF-B. Nigri и соавт. наблюдали стабилизацию или восстановление SRF в 87% случаев при ИВИ афлиберцепта на глазах, резистентных к ранибизумабу и бевацизумабу [85]. По другой версии тахифилаксия вызывается острым развитием АТ против анти-VEGF-препарата и возникает уже после первой дозы. Если говорить о системной иммунореактивности к ранибизумабу, то установлено, что исходная частота этого явления составляет 3% и возрастает до 6 % после ежемесячного приема ранибизумаба в течение 2х лет, на основании данных КИ ANCHOR, MARINA, FOCUS [1]. Возникает вопрос, правильно ли называть тахифилаксией снижение эффективности антиангиогенной терапии, развившееся к концу 24 месяцев? Вполне очевидна подмена представлений. Несмотря на то, что случаи тахифилаксии, толерантности и рецидивирующей МНВ относят к рефрактерной МНВ, необходимо дифференцировать эти феномены из-за принципиально различных подходов к их устранению. Толерантность разрешается эскалацией дозы или укорочением интервалов между инъекциями препарата [74]. Реже эффективность не восстанавливается [20, 36,106,123,209,196;90,40]. Взаимосвязь между увеличением дозы и анатомо-функциональными результатами оценивали в нескольких исследованиях. Исследования HARBOR [90,40] и Forooghian и соавт. [35] показали, что ежемесячный прием высоких доз ранибизумаба/бевацизумаба не восстанавливает терапевтический ответ при толерантной МНВ. Исследования LAST [15] и Brown и соавт. [10], напротив, показали, что 2,0 мг ранибизумаба помогают поддерживать анатомические и функциональные результаты и улучшать BCVA у пациентов с постоянным или рецидивирующим SRF или IRF, несмотря на неэффективную предыдущую стандартную анти-VEGF терапию. По сравнению с данными Forooghian с соавт. [29], LAST [15] и Brown с соавт. [10] результаты HARBOR [35] выглядят более убедительными из-за большой выборки. В целом можно прийти к выводу, что ИВИ высоких доз анти-VEGF агента могут оказаться неэффективными в восстановлении терапевтического ответа. Анализировали и другой путь преодоления толерантности, а именно, - увеличение частоты инъекций более одного раза в месяц. M.W. Stewart (2012) и соавт. обнаружили, что введение дозы лекарственного средства

(ранибизумаб, бевацизумаб или афлиберцепт) каждые 2 недели заметно ингибировало активность VEGF, поэтому такой режим может быть привлекательным вариантом лечения для глаз, реагирующих в течение 2 недель [175]. Вместе с тем инъекции каждые 2 недели могут стать серьезной проблемой для лиц с плохой комплаентностью и повысить финансовую затратность. Укорочение интервала при ИВИ не одобрены также FDA.

Последний мета-анализ 26 различных КИ с участием 10 821 пациента с нВМД, случайным образом распределенных по 21 различному режиму лечения ранибизумабом, показал, что 0,5 мг ранибизумаба (режим T&E) наиболее эффективен с точки зрения зрительных функций (критерий эффективности — BCVA, буквы, средне-суммарное число букв SMD = 21,41, (95% ДИ от 19,86 до 22,95), 3–4 строчки улучшения (OR = 2,83, 95 % ДИ 1,27)). Однако этот режим не сократил сроков повторного курса лечения по сравнению с ежемесячной инъекцией (SMD = -0,94; 95% ДИ от -2,26 до 0,39). Ранибизумаб в дозе 0,5 мг (3+*pro re nata*) в комплексе с нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП) оказался наиболее эффективен в снижении центральной толщины сетчатки по данным ОКТ. И только система доставки ранибизумаба (100 мг/мл) продемонстрировала возможности сокращения кратности повторных курсов лечения [199]. В связи с различием в подходах к лечению разных подгрупп рефрактерной МНВ эксперты подчеркивают необходимость отделять нереспондентов с толерантностью от больных тахифилаксией. При этом их мнения о проявлениях этих феноменов. В этом аспекте представляет интерес работа С. Nara с соавт., изучавшими частоту тахифилаксии и характеристику 313 пациентов с нВМД, ранее нелеченных, у которых развилась тахифилаксия при повторных ИВИ афлиберцепта в ретроспективном исследовании продолжительностью ≥ 12 месяцев. Тахифилаксию он определял как отсутствие какого-либо морфометрического улучшения (более 100 мкм) или ухудшение отека (CRT) в течение 1 месяца после двух и более повторных ежемесячных ИВИ. Автор выявил 8,9% тахифилаксии при ср. количестве ИВИ $10,5 \pm 7,8$, и ср. интервале до нее - $20,9 \pm 14,0$ месяца. Заметим, эти условия соответствуют более толерантности, чем тахифилаксии [51]. R. Zuber-Laskawiec с соавт (2020г.) указала на 22,2% глаз, не ответивших на антиангиогенную терапию (14/63 глаз), при этом 12,7% глаз с «ранней тахифилаксией» [209]. Нереспондентами считали тех, кто не показал положительную анатомическую и функциональную реакцию во время загрузочной терапии. Согласно определению авторов, «тахифилаксия предполагает быструю потерю чувствительности к препарату, то есть когда после повторного введения отмечается заметное ослабление эффекта, симптомы заболевания вновь появляются, несмотря на положительную первоначальную реакцию на лечение». При этом авторы ссылаются на W.M. Amoaku, представившего эту трактовку термина [19], и далее: «Тахифилаксия

развивается в течение короткого периода времени после начала терапии в отличие от лекарственной толерантности, которая определяется как значительное снижение реакции при долгосрочном применении препарата» [19]. Здесь исследователи вновь апеллируют к другим экспертам, в частности к J. Pikkell и соавт. [179]. Описания терминов звучат корректно, однако, представленные данные и трактовка результатов не вполне соответствуют указанным условиям оценки. Согласно K. Zuber-Laskawiec, у 12,7 % пациентов тахифилаксия развилась после загрузочной фазы терапии (после 4–5 доз, а не 1–2 инъекций!) антиангиогенного препарата. В этой же группе больных, по данным тех же авторов, среднее число ИВИ к 12 месяцам достигло 7 [237]. Заметим, по срокам возникновения это уже следует отнести к толерантности.

С целью изучения распространенности рефрактерных форм нВМД в 2020 году турецкий исследователь Mine Esen Barış [63] предложил подразделять плохих респондентов на следующие 5 подгрупп: 1) истинные нереспонденты, у которых стабильно присутствуют признаки активности (SRF, IRF, sub-RPE-F, свежие кровоизлияния) во время всего курса стандартного лечения; 2) частичные нереспонденты, у которых глаза демонстрируют частичное улучшение (например, минимальное снижение SRF и/или IRF) по признакам активности во время лечения; 3) VEGF-зависимые нереспонденты, у которых наблюдается полная регрессия признаков активности в результате лечения и полная неспособность переносить интервалы между инъекциями более 4–6 недель, проявляющаяся рецидивами (увеличение SRF/IRF, суб-RPE--F или PED); 4) прогрессирующие нереспонденты, у которых прогрессируют анатомические изменения, экссудация или кровотечения, несмотря на лечение; 5) нереспонденты потенциальные, которые становятся истинными нереспондентами со временем из-за снижения ответа на лечение вплоть до полного отсутствия реакции; изначально хорошо реагировавших на лечение. Критериями плохого ответа авторы считают стойкие, рецидивирующие или прогрессирующие признаки активности нВМД по данным ОКТ, проведенного через 1 месяц после 6 загрузочных доз. Благодаря такой детализации эксперту удалось установить более высокие показатели истинной распространенности нереспондентов на антиангиогенную терапию - 33,2 % (235 глаз) [31]. При этом наиболее многочисленной (37,2 %) оказалась 2-я подгруппа с частичным отсутствием ответа, в которой наблюдали неполное нивелирование признаков активности во время лечения. Доля глаз с «хорошей» реакцией на лечение, но требовавших повторной ежемесячной инъекции из-за непереносимости интервалов в лечении более 4–6 недель, составила 16,7 % (3-я подгруппа). Примерно 5 % глаз (4-я подгруппа) показали хороший начальный ответ, но перестали реагировать из-за снижения эффекта препарата с течением времени. Они были классифицированы в группу «отсутствие ответа с течением

времени». По сути, эти глаза следует отнести к толерантным, однако авторы почему-то отнесли их в подгруппу тахифилаксии. Как видно из представленных работ, сроки возникновения тахифилаксии остаются неясными и, предположительно, сильно индивидуализированы. Не обнаружено корреляции между типом ингибитора VEGF и отсутствием реакции на лечение, хотя «раннюю» тахифилаксию наблюдали чаще в глазах, получавших афлиберцепт ($p = 0,04$) [209].

Поиски предикторов резистентности завершились положительно. Присутствие серозной отслойки пигментного эпителия сетчатки (sPED) на исходном уровне ассоциировалось с отсутствием реакции. Это подтвердили на функциональном (BCVA) (OR 18,2, 95 % CI 2,86–248; $p = 0,021$) и морфометрическом уровне (OR 23,0, 95 % CI 1,80–321; $p = 0,030$) многие авторы [105, 62, 104, 47, 48, 196, 191]. Позднее стали дифференцировать типы sPED из-за ассоциативной связи с приростом зрения и морфометрическими изменениями в ответ на лечение. Было установлено, что в глазах с исходной серозной PED происходит больший прирост BCVA по сравнению с глазами с фиброваскулярной PED [49, 92.]. Punjabi и соавт., классифицируя PED на пустые, твердые или смешанные в зависимости от их внешнего вида на ОКТ, сообщили о степени полной или частичной регрессии на фоне лечения 3% твердых PED и 46% пустых PED [182]. Работа Mine Esen Varış подтвердила факт более частого выявления PED на глазах нереспондентов (88,5% против 47,1%, $p < 0,001$) и прямую связь PED с функциональным результатом антиангиогенной терапии [63]. Эксперты полагают, что неспособность разрешения экссудации из субретинального пространства или из-под RPE после лечения может указывать на необратимые структурные повреждения фоторецепторов и RPE [166]. Это объясняет отсутствие или низкие функциональные результаты лечения нВМД с PED. Есть сообщения, описывающие положительное влияние афлиберцепта на разрешение SPED [94, 62]. Следует подчеркнуть, что если не удастся разобраться в истинной причине резистентности, то переход на другой антиангиогенный препарат — беспроигрышный путь преодоления и тахифилаксии, и толерантности [63]. Всегда можно переключить пациента с бевацизумаба на ранибизумаб [144, 96], с ранибизумаба на бевацизумаб [144, 96, 101-103, 105, 24, 65] а с двух последних на афлиберцепт [65; 80; 50; 30; 109, 167, 71; 84; 124]. Наблюдательное, ретроспективное и проспективное 12-месячное исследование TITAN, проведенное в 28 центрах Франции с целью безопасности и эффективности перевода 225 пациентов, резистентных к ранибизумабу, на афлиберцепт показало, что рефрактерность возникает в среднем после 4,9 инъекции и/или через 4,8 месяца от начала лечения. Основным критерием эффективности был процент пациентов, добившихся успеха в лечении, которым считали увеличение на ≥ 1 буквы по лучшей скорректированной остроте

зрения (BCVA) и/или любое уменьшение центральной толщины сетчатки (CRT, в мкм) по сравнению с исходным уровнем к 12 месяцу после переключения на афлиберцепт [149]. Показатель успеха по указанным индикаторам составил 68,8 %. Среднее улучшение BCVA к 12-му месяцу по сравнению с исходным уровнем составило 1,5 буквы. К 12-му месяцу больше половины (55,2 %) пациентов ($n=69/125$) смогли прочитать ≥ 70 букв. У пациентов, резистентных к ранибизумабу и перешедших на афлиберцепт, улучшились морфометрические показатели. Среднее снижение CRT от исходного уровня к 12-му месяцу составило 45,0 мкм ($p < 0,001$). На исходном уровне доля пациентов с SRF составляла 70,7% ($n=87/123$), с IRF — 35,8% ($n = 44/123$), эти же показатели 12-му месяцу снизились до 48,3% ($n = 58/120$) и 22,5 % ($n = 27/120$) соответственно [149].

А.А. Chang и К.А. Aghdam показали сходные результаты: 67,7 % пациентов с рефрактерной МНВ, перешедших на афлиберцепт после ≤ 12 месяцев лечения ранибизумабом, достигли цели (увеличение на ≥ 1 буквы BCVA и/или снижение CRT между исходным уровнем и 12-м месяцем) [43;82,83]. Пациенты, считавшиеся невосприимчивыми к препаратам 1 линии, продемонстрировали дополнительный прирост (сверх 2,2 буквы, достигнутых с ранибизумабом) на 1,5 буквы через 12 месяцев после перехода на афлиберцепт. Наблюдали обратную зависимость между исходным BCVA и увеличением зрения на 12-м месяце. Пациенты с более низкими исходным BCVA имели больший прирост остроты зрения к 12-му месяцу. Получавшие ранибизумаб менее 3 месяцев до перехода, также показали больший прирост BCVA. В дополнение к уменьшению CRT после переключения на другой препарат уменьшались объемы экссудации (SRF, IRF и суб-RPE). Результаты указывали, что переход с ранибизумаба на афлиберцепт при рефрактерной нВМД, не дожидаясь 3 месяцев, может быть оправданным. Подчеркивается важность 3 ежемесячных ИВИ афлиберцепта после перехода на него. У таких пациентов более значительно улучшается зрение [66, 67]. Четырнадцать КИ продемонстрировали хороший терапевтический ответ у пациентов, устойчивых к ранибизумабу или бевацизумабу, при переходе на афлиберцепт (по ОКТ), но только пять из них подтверждают улучшение зрения [94,109,69;167;71;84;88;82]. Эксперты подчеркивают, что, несмотря на сопоставимую эффективность афлиберцепта у пациентов ($n=23$) с полной резистентностью (39,1%) и тахифилаксией (38,1%, $n=21$) к ранибизумабу по морфометрическим данным, острота зрения улучшилась только в группе тахифилаксии ($p = 0,018$) и не изменилась при резистентности ($p = 0,37$) [82]. Кроме того, в группе тахифилаксии существенно уменьшилась субфовеальная PED. Механизм переключения между двумя анти-VEGF препаратами обусловлен разными размерами молекул и различиями в их транспортировке через сетчатку в субретиальное пространство [79].

Афлиберцепт — обладает более высокой эффективностью связывания и спектром действия, чем ранибизумаб [43]. По мере того, как накапливается опыт применения анти-VEGF терапии, появляются сведения о побочных местных и системных эффектах как отдельных препаратов, так и используемых технологий [11,12,14,15,18,73,74,99,118,119]. Выявленные факты подталкивали мировое сообщество искать новые решения и стратегии борьбы с неоваскуляризацией, сопровождающей ряд глазных болезней, приводящих к слепоте.

.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1 Дизайн работы

Настоящая работа состоит из 2 фрагментов.

Первый фрагмент посвящен изучению истинной распространенности среди больных МНВ нереспонденции к официально разрешенным и введенным в Международный и Федеральный стандарт антиангиогенным технологиям лечения. Клиническая часть исследований демонстрировала истинную распространенность нереспондентов к традиционным лечебным технологиям, служила базой для изучения их клинического и ОКТ-фенотипа. На основании выявленных специфических особенностей осуществляли поиск и идентифицировали биомаркеры неблагоприятного прогноза или нереспонденции к традиционному лечению.

Клинические исследования дополнили иммунологическими исследованиями стекловидной жидкости (СТЖ) глаз на фоне введения антиангиогенных препаратов, с количественным определением провоспалительных цитокинов, которые по совокупности являются мощными индукторами альтернативных путей ангиогенеза. Полученные данные объясняли причины неэффективности терапии в ряде случаев и указывали путь к преодолению фармакологической проблемы.

Второй фрагмент работы представлял собой экспериментальные исследования, в которых на 4 моделях неоваскуляризации хориоретинальной и лимбо-роговичной локализации, сформированных на глазах 80 кроликов породы Шиншилла изучали возможность применения трех рекомбинантных ангиостатиков, являющихся точными фрагментами человеческих белков, предназначенных природой для контроля неоваскуляризации. Оба фрагмента в совокупности позволяли достичь поставленную цель.

2.2 Клиническая характеристика пациентов, вошедших в исследование.

Настоящее исследование носило проспективный когортный дизайн, включало 92 глаза 84 пациентов с впервые выявленным диагнозом МНВ и признаками активности заболевания (см ниже).

В базу данных вносили информацию о перенесенных инфарктах миокарда, инсультах, о тромбозах, атеросклерозе, гипертонической болезни, заболеваниях желудочно-кишечного тракта, мочевыделительной системы, легочных заболеваниях, гиперхолестеринемии, сахарном диабете, гипотиреозе, диффузно-токсическом зобе, тиреоидите и других аутоиммунных и наследственных заболеваниях. Мы также рассчитывали по формуле Кетле их индекс массы тела и его градации, рассчитывали перфузионное давление. Вносили систолическое и диастолическое АД, вредные привычки:

кратность приема алкоголя и количество выкуренных сигарет. Это представлялось важным при оценке особенностей терапевтического ответа на лечение.

Все пациенты подписывали информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Протокол исследований был одобрен Этическим Комитетом ФГБУ ГНЦ «Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства. Исследование проходило в рамках НИР (шифр: Профтруд -2; №10.020.21.800).

Исследование проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации.

Критерии включения

- ✓ Пациенты старше 55 лет;
- ✓ Все экссудативные формы ВМД (1,2,3 типы МНВ);
- ✓ Диагноз МНВ должен быть верифицирован ОКТ/ОКТ-А, ФАГ;
- ✓ Отсутствие в анамнезе любого лечения (лазеротерапия, ФДТ, интравитреальная и антиоксидантная терапия, БАД, ретробульбарные инъекции пептидов) в исследуемом глазу;
- ✓ Острота зрения должна была быть между 20/30 и 20/320 (ETDRS).

Критерии исключения

- ✓ Наличие МНВ иного генеза, отличного от ВМД (осложненная миопия высокой степени)
- ✓ Наличие сопутствующей макулопатии, не связанной с ВМД, приводящей к потере зрения (ЦСХ, диабетический отек макулы);
- ✓ Лазерное вмешательство на глазном дне,
- ✓ Хирургическое вмешательство на глазу с МНВ по поводу витреоретинальной патологии или катаракты за 6 мес до настоящего исследования;
- ✓ Отслойка РПЭ без признаков МНВ;
- ✓ Хирургическое лечение катаракты не ближе 6 месяцев до настоящего исследования;
- ✓ Наличие в анамнезе коронарного шунтирования, операций на опорно-двигательном аппарате, по поводу которого пациент принимает антикоагулянты;
- ✓ Наличие в анамнезе трансплантации органа,
- ✓ Наличие в анамнезе перорального приема химиотерапевтических агентов или иммунодепрессантов, а также моноклональных антител или иммуноглобулинов
- ✓ Наличие противопоказаний к введению ангиостатиков;
- ✓ Любая патология сетчатки или зрительного нерва, вызывающая снижение зрения;

✓ Любое снижение прозрачности оптических сред, способное повлиять на функциональный результат.

Среди пациентов с МНВ было 29 мужчин и 55 женщин. Возраст варьировался в диапазоне от 52 до 97 лет (см табл.2). Большинство глаз (55,5%) было факичными, реже (44,5%) – артификачными. Подавляющее большинство глаз (89,5%) имело 1 тип МНВ по данным ОКТ и ФАГ, в 11 глазах присутствовали 2 и 3 тип МНВ.

Таблица 2- Демографические характеристики, статус хрусталика, МКОЗ, количество инъекций и периоды наблюдения больных МНВ

Характеристика	Количество глаз (%)
Все глаза	92 (100%)
Оба глаза	18 (19,5)
Пол: мужчины / женщины	29 (31,5)/ 55 (68,4)
Возраст (среднее $\pm$ SD) (мин-макс)	73,4 $\pm$ 8,5 (52-97)
Факичные глаза/ Псевдофакичные	51 (55,5)/ 41 (44,5)
МКОЗ до лечения (среднее $\pm$ SD)	0,37 $\pm$ 0,26
МКОЗ после лечения (среднее $\pm$ SD)	0,46 $\pm$ 0,29
Количество инъекций (среднее $\pm$ SD) (мин-макс)	2,84 $\pm$ 0,93 (2-6)
Время наблюдения: ср. кол-во месяцев (мин-макс)	11,5 (6-12)

Все 84 пациента (92 глаза, 100%) завершили исследование и были включены в оценку результатов. Сроки наблюдения составили 12 месяцев.

2.3 Офтальмологические методы диагностики и мониторинга

Всем пациентам проводили полное офтальмологическое обследование: определяли максимально скорректированную остроту зрения (МКОЗ) по таблице Снеллена, измеряли внутриглазное давление (ВГД), выполняли биомикроскопию переднего и заднего сегментов глаза, офтальмоскопию глазного дна.

Кроме того, каждый пациент проходил обследование на ОКТ (DRI OCT Triton plus, Topcon Corporation, Япония, Swept Source; скорость сканирования составляло 100000 А-сканов в секунду). Сканирование позволяло получить как широкие (12 мм x 9 мм), трехмерные (3D) сканы, так и однострочные/5-строчные сканы, поперечные/радиальные

сканы. Высокое качество визуализации позволило получить четкие изображения сосудистого русла в хориоиде и сетчатке. Длина волны 1050 нм позволила провести ОКТ-ангиографию пациентам с непрозрачными средами, а технология обработки изображений позволяла отслеживать низкоинтенсивный кровоток в капиллярной сети и обнаруживать микроаневризмы и капиллярные нарушения. По данным ОКТ верифицировали тип МНВ в соответствии с последней международной классификацией [209]. На ОКТ фотографировали глазное дно, выполняли флуоресцентную ангиографию и аутофлуоресценцию глазного дна.

В диагностике опирались также на данные ФАГ. Четко очерченные области интенсивной гиперфлуоресценции, появляющиеся рано и демонстрирующие прогрессирующую утечку красителя, были приняты за классическую хориоидальную неоваскуляризацию (кХНВ), тогда как фиброваскулярные PED и поздняя утечка из неопределенного источника расценивали как скрытую (сХНВ). При смешанном типе поражения традиционно выделяли преимущественно классический ($> 50\%$ классического компонента) и минимально классический ($\leq 50\%$ классического компонента). В зависимости от места расположения на ОКТ-сканах выделяли следующие типы МНВ: тип 1 (под RPE), тип 2 (субретинальный) и тип 3 (интратретинальный) [209].

Активность заболевания верифицировали по центральной толщине сетчатки (CRT), субретинальной и интратретинальной жидкости (SRF, IRF), учитывали интратретинальные кисты (IRC) и PED на каждом визите пациента [26-29,39]. Глаза, демонстрирующие свежее кровоизлияние офтальмоскопически, ОКТ-признаки жидкости в виде SRF, IRC или sub-RPE и протечку красителя на ФАГД, классифицировали как имеющие активную МНВ. Их лечили ангиостатиками.

Контрольные осмотры проводили спустя 4 недели после лечения. Проверяли МКОЗ, ОКТ, ФАГД на каждом визите.

2.4 Методы лечения больных МНВ

Больных активной МНВ лечили ИВИ Афлиберцепта в соответствии с инструкцией к препарату и Федеральными национальными рекомендациями: 40 мг \мл в режиме «*treat and extend*» («Эйлеа», Bayer, Германия) в условиях операционной. ИВИ выполнял сертифицированный хирург. Содержимое флакона использовали только для одной инъекции.

Афлиберцепт (Эйлеа) - рекомбинантный гибридный белок, состоящий из фрагментов внеклеточных доменов человеческих рецепторов VEGF 1 (VEGFR-1) и 2 (VEGFR-2), соединенных с Fc-фрагментом человеческого иммуноглобулина G (IgG1).

Лечение Эйлеа начинали с введения трех последовательных ежемесячных инъекций, затем выполняли по одной инъекции каждые два месяца.

В отсутствие улучшения остроты зрения и анатомических показателей после трех загрузочных ИВИ, лечение Эйлеа прекращали и переходили на другой препарат. Ежемесячные инъекции продолжали до достижения сухости макулы. Инъекции Эйлеа повторяли на глазах с признаками персистирующей активности (свежее кровоизлияние, SRF, IRF или жидкость суб-RPE). Глаза, показавшие полную регрессию или резорбцию экссудата при последовательном обследовании до или после завершения 3х загрузочных инъекций, классифицировались как «хорошо реагирующие» (синоним: респонденты); глаза с рецидивом, персистированием экссудации или прогрессирующим ухудшением после 3 инъекций классифицировали как «плохо реагирующие» (синоним: плохие респонденты).

2.5 Иммунологические методы исследования, используемые в исследовании

В работе использовали инновационные иммунологические методы для количественного определения в малом объеме СТЖ восьми ключевых факторов роста (цитокинов), участвующих в контроле и регуляции ангиогенеза, в частности, мультиплексную цитофлуориметрию.

Технология BD Cytometric Bead Array (CBA) позволяет точно и быстро обнаружить большой спектр активных веществ в одном образце биологической жидкости малого объема - 50 мкл. 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 антителами (АТ) к цитокинам IL-8, angiogenin, TNF α , IFN α , IFN γ , VEGF, bFGF, TGF β в соответствии с инструкцией производителя (BD, США). Для оценки положения бус использовали флуоресцентные красители APC и APC-Cy7, концентрацию антигена (АГ) оценивали по интенсивности флуоресценции по каналу красителя PE. В основе метода лежит иммунная реакция АГ с АТ. Микрочастицы определенной интенсивности флуоресценции имеют на своей поверхности АТ к определенному АГ. После инкубации биологического материала с микрочастицами проводят инкубацию с АТ. При проточной цитометрии образцов происходит разделение специфичных биологически активных веществ, связанных с микрочастицами с дискретной флуоресценцией по трем каналам флуоресценции. Во избежание перекрытия бус по размерам, цитокины были сгруппированы следующим образом:

1. IL-8 (бусы A9), TNF- α (бусы C4), IFN- α бусы (B8)
2. VEGF (бусы B8), bFGF (бусы C5), angiogenin (бусы C4)

3. IFN- γ (бусы B8)

4. TGF- β (бусы B6)

Первая панель - анализ содержания IL-8 (A9), TNF- α (C4), IFN- α (B8):

Измеряли на восьмицветном проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Beckton Dickinson, США). Данные по прямому и боковому светорассеянию исследуемых бус отражались на двумерной гистограмме FSC/SSC (рис.3), полученной с монитора цитофлуориметра. Затем выделяли облако бус гейтом P7, а затем события из гейта P7 отображали на двумерной гистограмме APC/APC-Cy7 (рис.4). В каждом гейте замеры интенсивности флуоресценции по каналу PE и определяли концентрацию цитокина по сравнению со стандартом, поставляемым производителем.

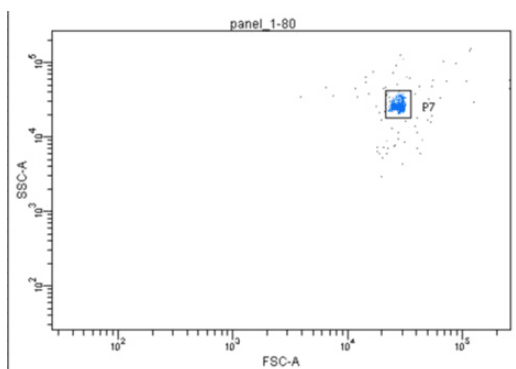


Рисунок 3- Двумерная гистограмма в координатах FSC/SSC

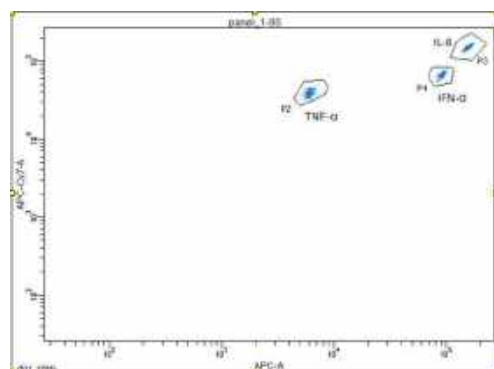


Рисунок 4 – Распределение бус из гейта P7 в координатах APC/APC-Cy7

Вторая панель - анализ содержания VEGF (B8), bFGF (C5), angiogenin (C4):

Данные по прямому и боковому светорассеянию исследуемых бус отражали на двумерной гистограмме FSC/SSC (рис. 5). Затем выделяли облако бус гейтом P7, а затем события из гейта P7 отображали на двумерной гистограмме APC/APC-Cy7 (рис. 6). В каждом гейте замеры интенсивности флуоресценции по каналу PE для определения концентрации цитокина по сравнению со стандартом, поставляемым производителем.

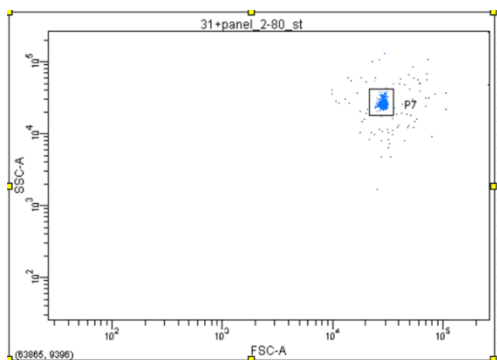


Рисунок 5 – Двумерная гистограмма в координатах FSC/SSC

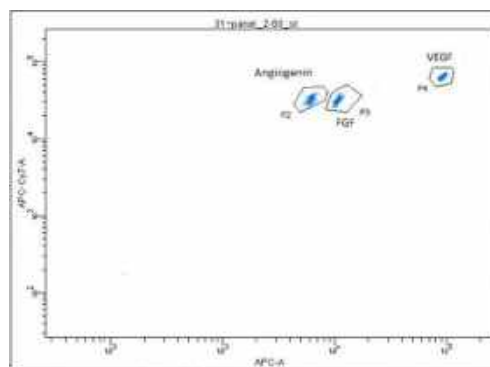


Рисунок 6 – Распределение бус из гейта P7 в координатах APC/APC-Cy7.

Третья панель - анализ содержания IFN- γ (B8):

Данные по прямому и боковому светорассеянию исследуемых бус отражали на двумерной гистограмме FSC/SSC (рис. 7). Затем выделяли облако бус гейтом P7, а после события из гейта P7 отображали на двумерной гистограмме APC/APC-Cy7 (рис. 8). В каждом гейте измеряли интенсивность флуоресценции по каналу PE для определения концентрации цитокина по сравнению со стандартом, поставляемым производителем.

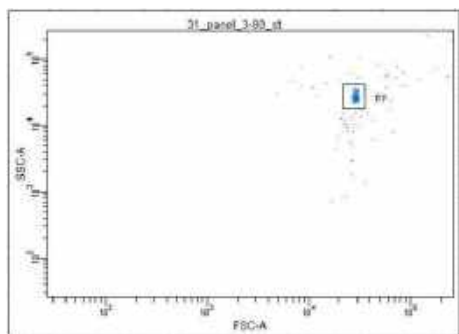


Рисунок 7 – Двумерная гистограмма в координатах FSC/SSC

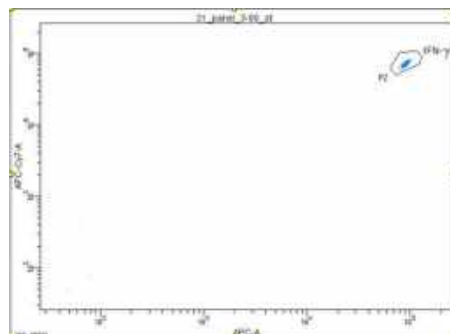


Рисунок 8 – Распределение бус из гейта P7 в координатах APC/APC-Cy7

Четвертая панель - анализ содержания TGF- β (B6):

Данные по прямому и боковому светорассеянию исследуемых бус отражали на двумерной гистограмме FSC/SSC (рис. 9). Затем выделяли облако бус гейтом P7, а затем события из гейта P7 отображали на двумерной гистограмме APC/APC-Cy7 (рис. 10). В каждом гейте измеряли интенсивность флуоресценции по каналу PE для определения концентрации цитокина по сравнению со стандартом, поставляемым производителем.

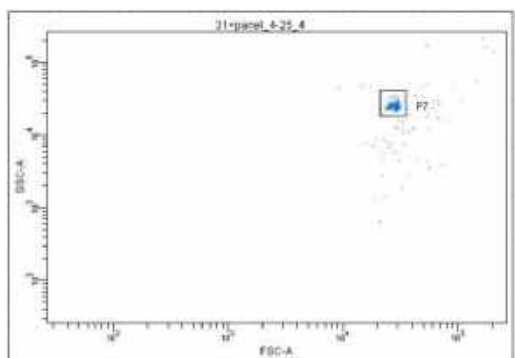


Рисунок 9 – Двумерная гистограмма в координатах FSC/SSC

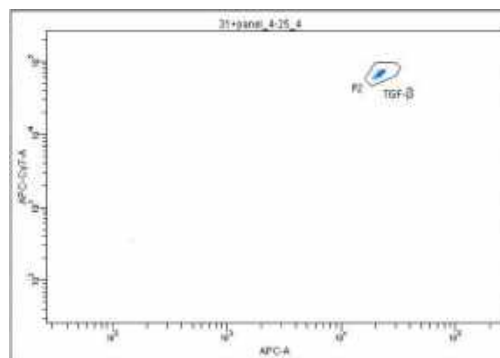


Рисунок 10 – Распределение бус из гейта P7 в координатах APC/APC-Cy7

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.)

2.6 Экспериментальные исследования по обоснованию применения и доклинической оценке эффективности рекомбинантных ангиостатиков в лечении МНВ

Постоянная эволюция технологий в лечении МНВ и меняющихся требований к ним диктовали разработку стратегии их внедрения в клиническую практику. Первым этапом служит оценка их безопасности, эффективности, достоинств и недостатков, отработка показаний и противопоказаний на экспериментальных моделях заболеваний глаз. В связи с чем, **целью настоящего фрагмента** стала разработка различных моделей заболеваний глаз, протекающих с неоангиогенезом с последующей адаптацией их к изучению биологических эффектов потенциальных препаратов и разработка критериев комплексной оценки их эффективности в эксперименте.

В работе использовали 2 модели неоваскуляризации глаз хориоретинальной локализации и 2 модели неоваскуляризации роговичной локализации. (см Главу 5). Все модели формировали на глазах одного биологического вида экспериментальных животных – кроликах породы Шиншилла (80 кроликов). После формирования моделей МНВ на глазах экспериментальных животных, на них тестировали рекомбинантные пептиды с заявленным антиангиостатическим потенциалом.

Картину глазного дна фотографировали на фундус-камере, выполняли ангиографию переднего или заднего отрезка глаза с флуоресцеином на этапе появления активного неоангиогенеза и на фоне лечения. Ежедневно на протяжении всего срока наблюдения проводили биомикроскопию/офтальмоскопию.

Мониторинг и оценку состояния глаз кроликов осуществляли, используя следующие средства и методы визуализации: бинокулярный (налобный) офтальмоскоп непрямого вида Heine, фундус-камеру VISUCAM 500 ZEISS (цветное фотографирование), ручную фундус-камеру Portable Ophthalmic Imager Volk Optical, Inc., фундус-камеру FF 450 ZEISS (флуоресцеиновая ангиография), сканирующий лазерный офтальмоскоп F-10 Nidek (флуоресцеиновая ангиография, аутофлуоресценция).

Кроликов обездвигивали, вводя в краевую ушную вену р-р Xylazine из расчета 25 мг/кг веса животного. Ретробульбарно вводили 0,5 мл3 р-ра Лидокаина 2%. Из эксперимента животных выводили передозировкой р-ра Нимбутала 2%, вводимого внутривенно.

Глазные яблоки энуклеировали после кругового конъюнктивального разреза, полной миотомии глазодвигательных мышц и неврэктомии зрительного нерва.

Экспериментальные исследования проводили в аттестованной по GLP лаборатории в соответствии с действующей в РФ нормативной базой и рекомендациями в присутствии

ветеринара (на базе ФГАОУ ВО РНИИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России).

Использовали в работе следующие **РЕГУЛИРУЮЩИЕ СТАНДАРТЫ и**

Регламентирующих нормативно правовые документы:

1. Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»
2. Приказ Минздравсоцразвития России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении правил лабораторной практики»
3. Национальный стандарт Российской Федерации (ГОСТ 33044-2014 от 26.01.2015) «Принципы лабораторной практики GLP», М, «Стандартинформ», 2015.
4. «Лабораторные животные» (положение и руководство, Российская Академия Медицинских Наук, Москва, 2003).
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств; Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., «Медицина», 2005. – 832 с.
7. Санитарно-эпидемиологические правила СП 2.2.1.3218-14 "Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)" от 29 августа 2014 г.
8. Директива 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб., 2012. – 48 с.
9. Руководства по доклиническому исследованию противоопухолевых лекарственных средств (под ред. Миронова А.Н. - М.: Гриф и К, 2012)
10. Директива ЕС (The European Council Directive (86/609/EEC)) по соблюдению этических принципов в работе с лабораторными животными
11. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. FELASA, 2010.
12. Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев СП 2.2.1.3218-14 РФ, утв. 29 августа 2014 года № 51.
13. «Правила лабораторной практики в РФ»(Good Laboratory Practice, GLP) на лабораторных животных категории SPF (specific pathogen free). 19.06.2003 г.
14. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ; под ред. Хабриева Р.У., изд.2, 2005;
15. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств под ред. А.Н.Миронова, 2018.

12. Резолюция ARVO «По использованию животных в экспериментальных исследованиях» 2018г.

2.7 Характеристика тестируемых рекомбинантных пептидов с заявленной антиангиогенной активностью

Для тестирования биологической активности был предоставлен блок антиангиогенных препаратов, состоящий из 3-х рекомбинантных белков: тумстатина, эндостатина и PEDF. Препараты были получены в лаборатории биотехнологии Научно-исследовательского института биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (зав. Лаб.- академик РАН Мирошников А.И.).

Рекомбинантные белки получали с использованием ДНК, в структуру которой вводили ген другого организма, включая гены растений, бактерий и человека. Важной особенностью рекомбинантных белков является высокая степень экспрессии целевого белка, на порядок превышающая уровень экспрессии в клетках родного организма. Экспрессия генетической информации, заключенной в генах живых организмов, осуществлялась путем ее переноса от нуклеиновых кислот к белкам по схеме: ДНК→РНК→белок. Последовательность нуклеотидов в кодирующей части гена определяла последовательность аминокислот в белке, кодируемом этим геном, при помощи генетического кода, который, за немногими исключениями, универсален для всех живых организмов. Были сконструированы экспрессионные плазмиды, обеспечивающие биосинтез в коллекционных штаммах *E. Coli* белков, содержащих структуры природных пептидов, подавляющих ангиогенез: фрагмент тумстатина (69–95); фрагмент фактора дифференцировки пигментного эпителия (24–57); фрагмент эндостатина (1–49).

Эндостатин и тумстатин, протеолитические фрагменты коллагенов VIII и IV типов, известны как эндогенные ингибиторы ангиогенеза. Природный тумстатин подавляет пролиферацию эндотелиальных клеток, связываясь с интегрином $\alpha_v\beta_3$. Природный эндостатин предотвращает миграцию эндотелиальных клеток, действуя через интегрин $\alpha_5\beta_1$, и ингибирует ангиогенез отличным от тумстатина путём. Теоретически комбинация этих двух препаратов могла оказаться перспективной для подавления патологического ангиогенеза. Природный PEDF также является эндогенным ингибитором ангиогенеза: он в 2 раза активнее ангиостатина и в 7 раз активнее эндостатина. Механизм антиангиогенного действия PEDF ещё не до конца изучен, и, по-видимому, включает в себя, наряду с подавлением активности VEGF, Fas-зависимый апоптоз ЭК. Обладают ли аналогичными свойствами рекомбинантные пептиды эндостатин, тумстатин и PEDF нам предстояло

изучить. Во многом их активность определялась правильностью выбранных фрагментов, а, следовательно, их физико-химическими характеристиками.

2.8 Патоморфологические исследования

Патоморфологические исследования выполняли с целью оценки эффективности лечения глаз животных с экспериментальными моделями лимбобороговичной и хориоретинальной неоваскуляризации.

По завершении эксперимента энуклеированные глазные яблоки кроликов фиксировали в забуференном 10% формалине (БиоВитрум, Санкт-Петербург) в течение 24 часов. Подготовка фиксированных образцов осуществлялась при помощи бинокулярного микроскопа Микромед МС-2 Zoom (Микромед, Санкт-Петербург).

Дофиксацию, дегидратацию и инфильтрацию парафином гистологических образцов проводили с использованием автоматического тканевого процессора Leica TP1020 (Leica, Германия). Заливку в парафин проводили посредством заливочного центра Leica EG1160 (Leica, Германия). Результаты окрашивания оценивали с помощью светового микроскопа «Carl Zeiss» (Германия) под увеличением x100, x200, x400 (рис.11) Парафиновые срезы изготавливали на ротационном микротоме Leica RM2235 (Leica, Германия) и окрашивали гематоксилином и эозином на автоматическом аппарате для многоцветного окрашивания Leica ST5020 (Leica, Германия). Для микроскопии и получения фотографий препаратов использовали микроскоп Leica DM1000 с цифровой фотокамерой DMC 2900.

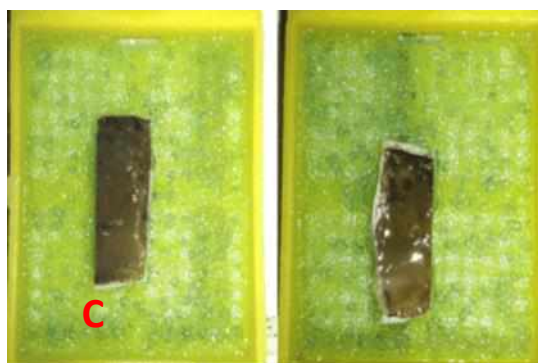
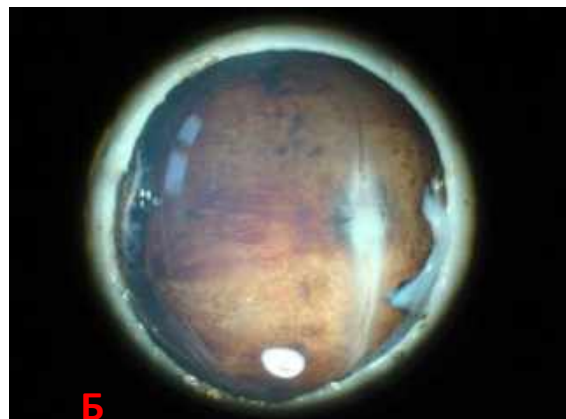


Рисунок 11 .А,Б,С,Д Глаза в заливочных блоках. А: участок глазного яблока в месте введения Матригеля. Б: просматривается на макроscopicком препарате гиперемия зоны интереса на глазном дне. В: фрагменты тканей глаз для исследования.

На *втором этапе* на срезах с парафиновых блоков тканей глаз, предназначенных для стандартного патоморфологического исследования, с целью изучения влияния тестируемых ангиостатиков на эндотелиальные клетки хориоидеи, сетчатки и радужки выполняли **иммуногистохимический (ИГХ) анализ**. Использовали в работе первичные антитела (АТ) и их разведения (табл. 3). Для этого помещали парафиновые срезы тканей глаз толщиной 3 мкм в термостат при 37°C на 40 минут, после этого их депарафинировали дважды в ксилоле по 10 минут, затем регидратировали в 96° спирте х 3 раза по 3 минуты, после чего срезы промывали в дистиллированной воде х трижды по 1 минуте и в 3% перекиси водорода в течение 10 минут. Для "демаскировки" АГ срезы прогревали в течение 45 минут на водяной бане в предварительно нагретом до 95-99°C цитратном буфере. Затем, стекла охлаждали при комнатной температуре в течение 20 минут, промывали в дистиллированной воде 5 минут и в фосфатном буфере TRIS-HCL х 2 раза по 5 минут. Каждый срез обводили восковым карандашом и раскапывали первые АТ автоматическими дозированными пипетками объемом 40 мкл. Инкубация с первыми АТ длилась 40 минут во влажной среде. Затем срезы промывали трижды в TRIS-HCL буфере в течение 5 минут. Инкубацию со вторыми АТ [LSAB®+kit, DAKO] проводили при комнатной температуре в течение 30 минут, и затем срезы промывали 3 раза по 5 минут в TRIS-HCL буфере. Инкубацию с АТ, меченными стрептавидином, [LSAB®+kit, DAKO], проводили при комнатной температуре в течение 20 минут, и затем срезы промывали 3 раза по 5 минут. Для визуализации ИГХ-реакции использовали DAB+ систему [DAKO]. Реакцию проводили в темноте в течение 2-х минут. После чего их промывали в 3-х сменах дистиллированной воды. Срезы докрашивали гематоксилином Майера, промывали под проточной водой 3 минуты, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, помещали в ксилол. Применяли 3 смены по 5 минут, после чего, заключали в канадский бальзам под покровные стекла. Негативным контролем служила ИГХ реакция без добавления первичных АТ.

Таблица 3 - Панель использованных антител к эндотелиальным клеткам

АНТИТЕЛА	КЛОН	РАЗВЕДЕНИЕ	ФИРМА
CD31	JC70A	1:40	DAKO
CD34	QVEnd 10	1:50	DAKO

2. 8 Статистические методы анализа

Компьютерный анализ полученных данных проводили с помощью пакета прикладных статистических программ SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc.,

США) с применением стандартных алгоритмов вариационной статистики. В частности, для показателей, измеренных по интервальной (количественной) шкале (возраст, диаметр и высота опухоли, сроки выживания и т.п.), рассчитывали среднее значение, среднеквадратическое отклонение и ошибку среднего. Для оценки значений отрезных точек, которые находились на отметке 5-10-25-50-75-90% и 95%, использовали процедуру **UNIVARIATE**, позволяющую определить 95%-е доверительные интервалы, медиану, моду, размах и интерквартильное расстояние. Для некоторых (в основном морфологических) показателей, измеренных по ранговой (порядковой) шкале рассчитывали как средне-групповые ранги, так и частотные распределения. Это представлялось необходимым для построения таблиц сопряженности (процедура **TABLES**). Анализ показателей, измеряемых по номинальной (качественной) шкале («наличие/отсутствие»), проводили с определением частоты выявления показателя в процентах (процедура **FREQ**). При этом к качественным показателям относили следующие признаки: наличие митозов, лимфоидную инфильтрацию, некрозы, кровоизлияния, отек. К качественным показателям также отнесли характеристику экспрессии того или иного маркера. Достоверность связи между показателями, измеренными по номинальной или ранговой шкале (пол, характер выбытия из исследования, число факторов риска, степень эффективности лечения – степень нормализации ХС-ЛНП и т.п.) оценивали с помощью таблиц сопряженности (процедура **TABLES**) с расчетом нескольких модификаций критерия Хи-квадрат, коэффициентов сопряженности Крамера и др.

ГЛАВА 3. Изучение распространенности и фенотипа нереспондентов, а также причин нереспонденции среди больных МНВ при лечении анти-VEGF-препаратами.

После постановки первичного диагноза МНВ, определения ее типа клинически (офтальмоскопически), методом ОКТ и ФАГ, определяли активность заболевания. В качестве биомаркеров активности МНВ традиционно принимали параметры центральной толщины сетчатки (CRT), наличие субретинальной и интравитреальной жидкости (SRF, IRF), отслойку пигментного эпителия (PED). Глаза, демонстрирующие свежее кровоизлияние офтальмоскопически, ОКТ-признаки экссудации в виде SRF, IRC или sub-RPE и протечку красителя на ФАГ, классифицировали как имеющие активную МНВ [4,9,10, 27, 24,36].

Глаза с активной МНВ лечили интравитреальными инъекциями (ИВИ) Афлиберцепта 40 мг \мл в режиме «treat and extend» («Эйлеа», Bayer, Германия) в условиях операционной. В обязательном порядке выполняли 3 загрузочных инъекции. Контроль лечения проводили спустя 4 недели после каждой инъекции. Проверяли МКОЗ, ОКТ, ФАГД.

ИВИ повторяли на глазах с признаками персистирующей активности (свежее кровоизлияние, SRF, IRF или жидкость суб-RPE). Глаза, показавшие полную регрессию или резорбцию при последующем обследовании до или после завершения 3х загрузочных инъекций, классифицировали как «хорошо реагирующие» (синоним: респонденты, рис.12А и В), в то время как глаза с рецидивом, персистированием экссудации или прогрессирующим ухудшением после 3х инъекций были классифицированы как «плохо реагирующие» (синоним: плохие респонденты).

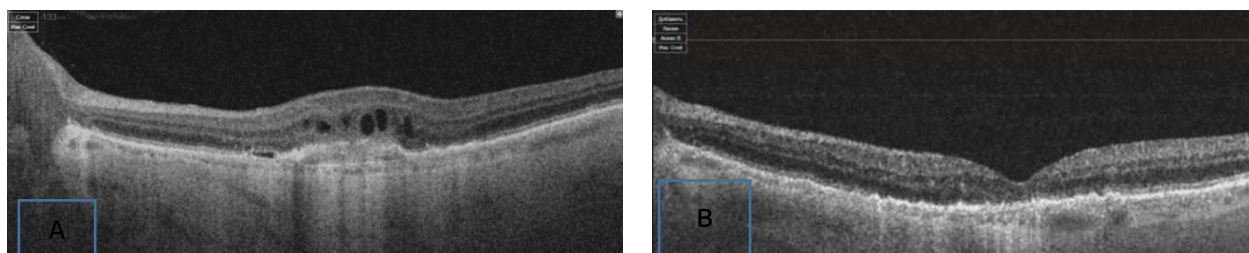


Рисунок 12: ОКТ глаза респондента с хорошим ответом на лечение. А): скан до инъекции Афлиберцепта. В): скан после лечения.

3.1 Изучение распространенности нереспондентов при лечении анти-VEGF-препаратами и характеристики их фенотипов среди больных МНВ

Идеальными респондентами проявили себя 19 из 92 глаз (84 пациента), т.е. только 21,7% глаз продемонстрировали идеальный ответ на анти-VEGF-технологии. В поиске маркера риска резистентности, изучали межгрупповые различия хороших и плохих респондентов.

Было установлено, что **среди плохих респондентов** в 2 раза чаще встречалась билатеральные формы МНВ (табл.4; $p=0,0035$), доминировали женщины (72,6%, $p=0,0844$), в то время как респонденты не имели гендерных различий (46,4% против 53,6%; н/д). **Плохие респонденты** были моложе ($M_{\text{ср}} \pm SD$: $73,9 \pm 8,5$ против $77,4 \pm 7,2$; $p = 0,064$). У них в 2 раза чаще встречались факичные глаза, чем у респондентов (61,6% против 31,6%; $p = 0,0084$)

Таблица 4 - Демографическая характеристика, статус хрусталика, МКОЗ, количество инъекций и периоды наблюдения хороших и плохих респондентов

Характеристика	Хорошие респонденты (%)	Плохие респонденты (%)
Все глаза	19 (21.7)	73 (78.3)
Оба глаза	6 (33.33)	12 (66.67)*
Мужчины/ Женщины	9 (46,37)/ 10 (53,63)	20 (27,4)/ 53 (72,6)
Возраст (среднее $\pm$ SD)/ (мин-макс)	$77,4 \pm 7,2$ / (66-93)	$73,9 \pm 8,5$ / (52-97)
Факичные глаза/Псевдофакичные	6 (31,6)/ 13 (68,4)	45 (61,6)*/ 28 (38,4)
МКОЗ до лечения $M_{\text{ср.}} \pm SD$	$0,37 \pm 0,26$	$0,44 \pm 0,26$
МКОЗ после лечения $M_{\text{ср.}} \pm SD$	$0,46 \pm 0,29$	$0,48 \pm 0,29$
Кол-во ИВИ $M_{\text{ср.}} \pm SD$ (мин-макс)	$2,7 \pm 0,75$ / (2-4)	$2,86 \pm 0,93$ / (2-6)
Срок наблюдения Ср. кол-во месяцев (мин-макс)	12,5 (6-14)	12,5 (6-14)

*Примечание: достоверность различий глаз респондентов от нереспондентов: * - $p < 0,01$*

Среди хороших и плохих респондентов примерно одинаково распределялись глаза с нормальной и утолщенной сетчаткой в центре (78,9% против 72,6%, н/д) (табл.4). Это объясняло отсутствие межгрупповых различий по МКОЗ и различий в градиенте прироста МКОЗ на фоне лечения. При этом, в группе нереспондентов в 2 раза чаще методом ОКТ выявляли субретинальную жидкость SRF (37% против 15,8%, $p = 0,0334$), и в 2 раза реже встречалась интравитреальная жидкость IRF (20,6 % против 42,1%; $p= 0,0714$).

На глазах обеих групп в 100% присутствовала отслойка РПЭ (PED). При этом, у всех 19 респондентов была серозная или (у 3х) - серозно+фиброваскулярная PED, у 73 нереспондентов – фиброваскулярная и геморрагическая ($p<0,05$).

Таким образом, существенных межгрупповых различий при разделении больных МНВ на респондентов и нереспондентов мы не выявили.

Таблица 5 - ОКТ- характеристика респондентов и нереспондентов

Характеристика	Респонденты	Нереспонденты
	Количество глаз (%)	Количество глаз (%)
Центральная толщина сетчатки утолщена	15 (78,9)	53 (72,6)
Субретинальная жидкость (SRF)	3 (15,8)	27 (37,0)*
Интраретинальная жидкость (IRF)	8 (42,1)	15 (20,6)
Отслойка пигментного эпителия (PED)	19 (100)	73 (100)
Тип неоваскуляризации ОКТ		
тип 1	17 (89,5)	64 (87,7)
тип 2	2 (10,5)	6 (8,2)
тип 3	0	3 (4,1)

Поэтому в дальнейшем при изучении фенотипа нереспонденции мы подразделили группу нереспондентов на **5 подгрупп**, исходя из реакции глаза на введение препарата:

1. **Истинные нереспонденты** (глаза без изменений признаков активности (SRF, IRF, жидкость суб-RPE, свежее кровоизлияние) на протяжении всего курса лечения) (рис. 13.1 А и В);

2. **Частичные нереспонденты** (глаза с частичным улучшением, минимальная регрессия SRF и/или IRF) признаков активности во время лечения (рис. 13.2А и В);

3. **Зависимые от анти-VEGF** (глаза, показавшие полную регрессию экссудата на фоне ИВИ, но не переносившие интервалов между ИВИ более 4х недель и реагирующие на них рецидивом (увеличение SRF/IRF, суб-RPE жидкости или размера PED) (рис.13.3 А, В,С).

4. **Ухудшение с прогрессированием анатомических изменений**, с экссудацией или кровоизлиянием, несмотря на лечение ИВИ (рис 13.4А,В,С и 13.5 А,В,С).

5. **Снижение ответа на ИВИ** (глаза, изначально хорошо реагирующие на лечение, со временем перестающие реагировать или снижающие ответ на введение препарата; феномен тахифилаксии) (рис. 13.6А,В,С)

В соответствие с изложенной градацией ответа на лечение (см выше), 6 глаз (6,5%) с МНВ были классифицированы как **истинные нереспонденты**, 25 (27,2%) - **частичные нереспонденты**, 23 (25%) глаза как **зависимые от ИВИ анти-VEGF** препарата, 7 (7,6%) глаз продемонстрировали анатомическое **ухудшение**, несмотря на лечение, а 11 (11,9%) глаз – как **снижение ответа с течением времени на ИВИ** (феномен тахифилаксии). Изучали

межгрупповые различия и ОКТ-особенности каждой из выделенных подгрупп. Статистический анализ выявил достоверные отличия в некоторых подгруппах.

Глаза **всех пяти подгрупп нереспондентов** отличались от глаз респондентов более высокими ср.-групповыми показателями глазного перфузионного давления и ВГД, что позволяло говорить о более выраженных нарушениях ауторегуляции кровотока. Вероятно, это препятствовало всасыванию препарата (табл.3).

При этом **истинные нереспонденты** были моложе респондентов (для сравнения: $68,8 \pm 2,2$ против $77,4 \pm 1,6$ лет; $p < 0,05$) (табл.5); среди них было 42,9% заядлых курильщиков (против 0% у респондентов), выкуривающих более 20 сигарет в сутки, 14,3% больных страдали гипотиреозом ($p < 0,1$).

По данным ОКТ на всех (100%) глазах этой подгруппы была утолщена сетчатка в центре и достоверны межгрупповые различия ср.-групповой **CTR** глаз истинных нереспондентов от респондентов (исходно: $412,5 \pm 60,0$ против $339,9 \pm 23,3$ мкм, $p < 0,05$), которые нарастали от инъекции к инъекции за счет различий в ответной реакции на лечение.

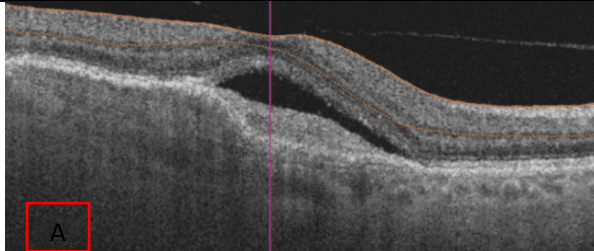
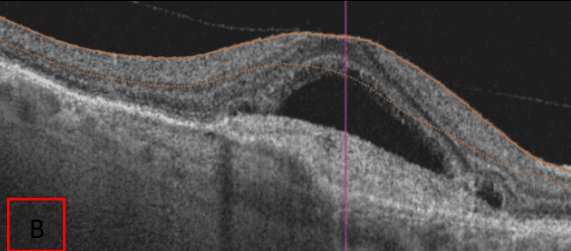
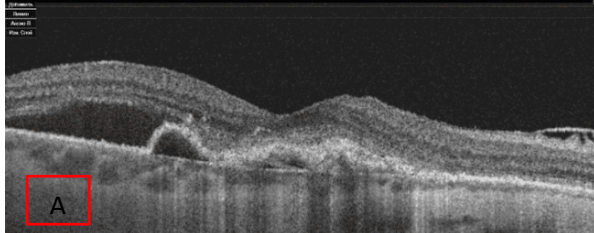
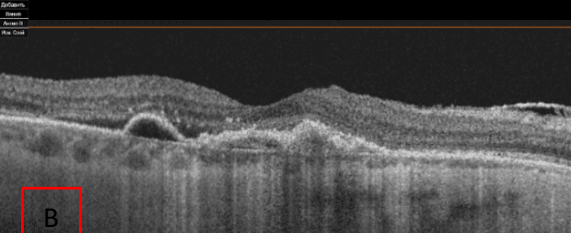
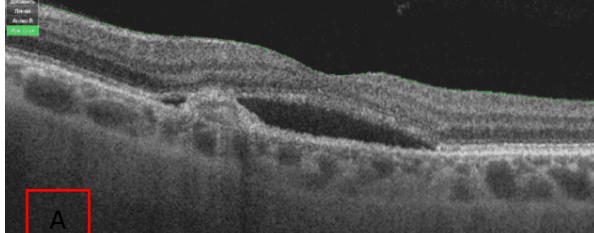
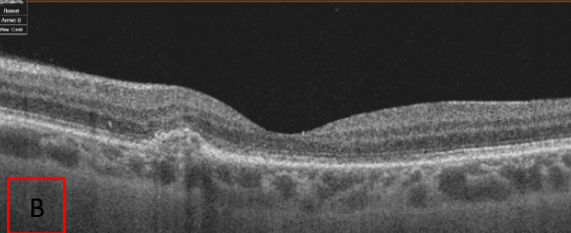
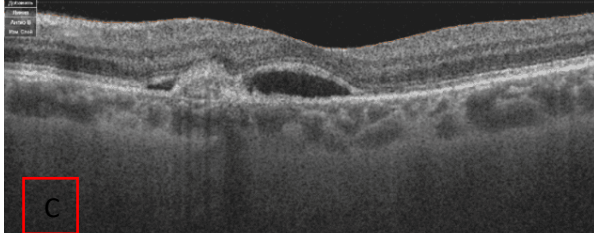
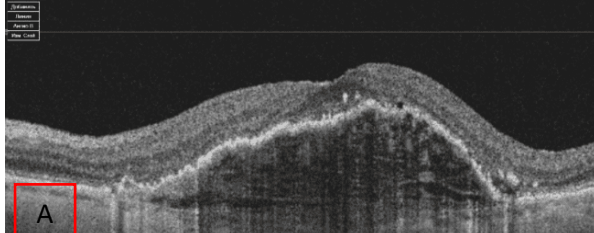
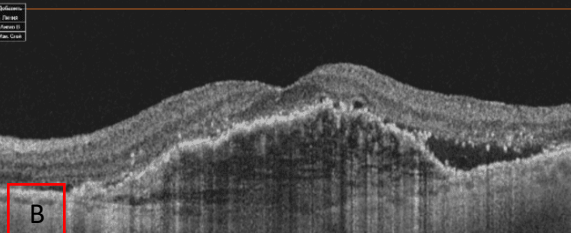
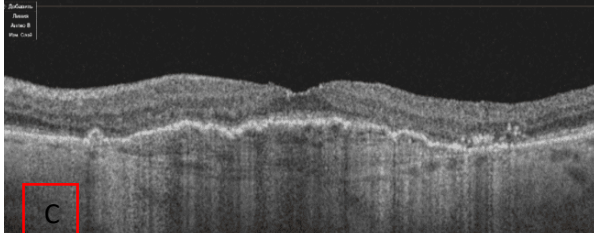
По данным ОКТ ср.-групповая высота отслойки РПЭ (**PED**) истинных нереспондентов превышала показатели респондентов (для сравнения: $239,2 \pm 49,8$ против $143,2 \pm 16,0$ мкм, $p < 0,05$), от инъекции к инъекции различия нарастали. Так, на 3х из 7 глаз отслойка РПЭ развивалась после второй инъекции, а еще в одном глазу после третьей инъекции и сохранялась до конца срока наблюдения. Доминировала фиброзно-вазкулярная отслойка РПЭ (PED, 71,4%), реже встречалась серозная PED (28,6%).

По сравнению с респондентами у истинных нереспондентов в 2 раза чаще выявляли SRF (33,3% против 15,8%, $p = 0,3$, н/д), и в 2,5 раза реже – IRF ($p = 0,2$, н/д). При этом принципиальных отличий по сочетанию комбинации SRF+ / SRF- с IRF+ / IRF- не выявлено (см табл.). Среди нереспондентов встречали в 2,5 раза чаще сочетание SRF+/IRF- (28,6% против 10,5%, $p = 0,3$).

Т.о., в ОКТ-фенотипе истинных нереспондентов среди морфоструктурных показателей доминировала более высокая отслойка РПЭ на фоне более толстой сетчатки в центре - **CTR**.

Частичные нереспонденты практически не отличалась по возрасту, каждый третий (36%) из них страдал ожирением, а каждый шестой - гипотиреозом и сахарным диабетом. В 15% случаев у них были повышены диастолические показатели АД (90+мм рт ст).

Глаза частичных нереспондентов демонстрировали более высокие ср.-групповые показатели ВГД ($14,6 \pm 0,8$ против $12,8 \pm 2,6$ мм рт ст, $p < 0,01$) и перфузионного давления, по сравнению с респондентами ($76,0 \pm 1,8$ против $73,7 \pm 2,8$ мм рт ст, $p < 0,01$).

		Рис. 13.1 А и В: ОКТ глаза истинного нереспондента. А): скан до лечения; В): скан после лечения; отсутствуют какие-либо изменения по SRF, IRF, PED.
		Рис. 13.2 А и В: ОКТ-скан глаза частичного нереспондента с минимальной регрессией SRF и IRF на фоне лечения. А): скан ОКТ до лечения; В): скан ОКТ после лечения
		
Рисунок 13.3 : ОКТ сканы глаза, зависящего от анти-VEGF. А) - скан до лечения, В) – скан после инъекции Афлиберцепта; С) – скан через 4 недели после инъекции.		
		
Рисунок 13.4 А , В, С, ОКТ-сканы глаза с тахифилаксией. А)- скан до лечения; В) – скан после 1 инъекции Афлиберцепта; С) – скан спустя 4 недели после загрузочного курса		

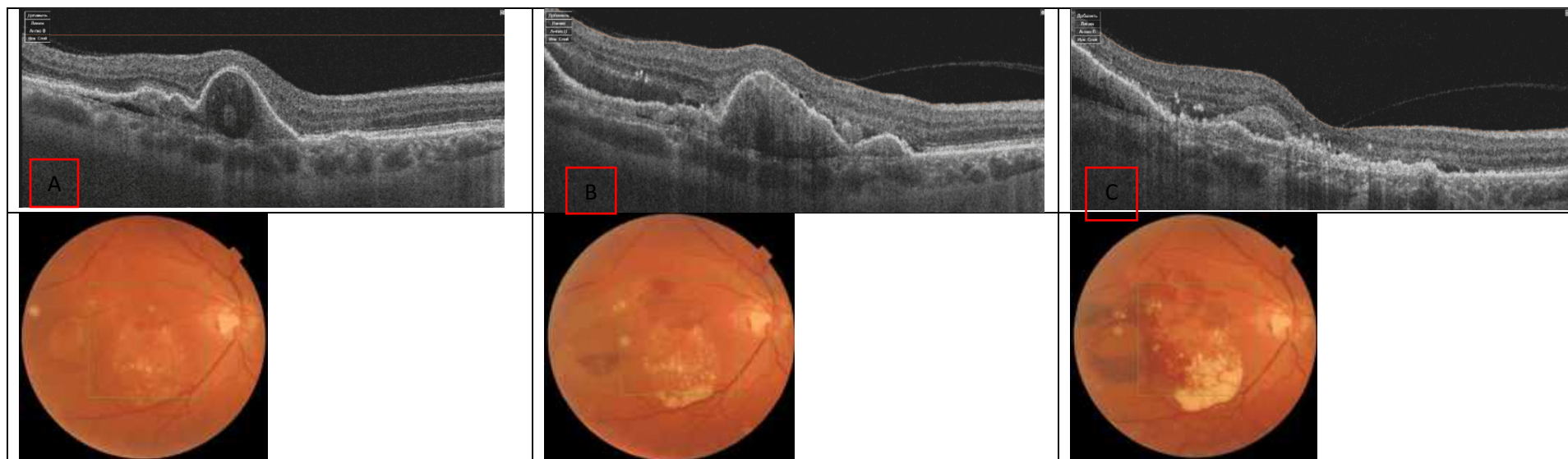


Рисунок 13.5 ОКТ- скан глаза с **прогрессированием анатомических изменений**, с экссудацией и свежим кровоизлиянием, несмотря на лечение. А) скан до введения Афлиберцепта; В) скан после 1 инъекции; С) скан после 3 инъекции.

3.2 Изучение фенотипа нереспондентов

ОКТ-параметры **CTR** и частота выявления повышенных показателей **CTR (32%)** на глазах **частичных нереспондентов** была сопоставимой с показателями респондентов, хотя коридор вариабельности был шире. В 38,6% выявляли SRF ($p=0,09$), в 26,9% - IRF (н/д). Имела место сильная тенденция к более высокой **PED** (для сравнения: $200,8 \pm 27,3$ против $143,2 \pm 16,0$, $p=0,07$). Выявляли разные типы PED, при этом в 4 раза чаще присутствовала жидкость под РПЭ (19,2 против 5,2% у респондентов, $p=0,2$). Обнаруживали 1 и 3 типа МНВ. Т.о. в ОКТ-фенотипе частичных нереспондентов преобладали глаза с более высокой PED.

Пациенты, зависящие от анти-VEGF препаратов, ничем примечательным не выделялись. Статистически значимых различий по анамнестическим показателям, полу, возрасту, наличию соматических заболеваний у них не выявлено (см табл.6).

По сравнению с группой респондентов, их достоверным отличием стали более высокие, ср.-групповые показатели глазного перфузионного давления ($76,6 \pm 1,6$ против $73,7 \pm 2,8$ мм рт ст, $p < 0,001$) и ВГД ($14,5 \pm 0,7$ против $12,8 \pm 0,6$ мм рт ст, $p=0,06$). В их глазах в 2 раза чаще присутствовал собственный хрусталик, а не искусственный (69,6% против 31,6%, $p < 0,05$).

Выявлена сильная тенденция к повышению CTR и высоты PED ($p=0,08$ и $p=0,1$, соответственно). Доминирующие ОКТ-фенотипы : **SRF+/IRF- (48%)** и **SRF-/IRF- (44%)**. Превалировал 1 тип МНВ (91,3%), изредка встречался 2 тип (8,7%, соответственно) (табл .7)

В связи с чем, мы проанализировали возможности применения в качестве маркера риска развития зависимости от анти VEGF – технологии **ОКТ-фенотипа SRF+/IRF-**. Ниже представлены расчеты частоты совпадения прогноза на таких глазах (**ОР, 95% ДИ**).

Частота неблагоприятных состояний

p1 (%) =	15,38		
p2 (%) =	58,62	p =	0,00763
		Значимость	$p < 0.01$

Показатели

относительного риска

Границы 95%-го ДИ:

		<i>левая</i>	<i>правая</i>
Odds-ratio =	0,128	0,024	0,687
Risk-ratio =	0,262	0,071	0,974

Чувствительность и специфичность по формуле Байеса составили: 68,5% и 81,8%, соответственно.

Таблица 6 - Характеристика клинических фенотипов респондентов и нереспондентов среди пациентов с МНВ (кол-во глаз, %)

Характеристика	Истинный респондент	Истинный нереспондент	Частичный нереспондент	Зависимый от анти-VEGF	Ухудшение	Тахифилаксия
	19 (20,6%)	7 (7,6%)	25 (27,2%)	23 (25,0%)	7 (7,6%)	11 (12,0%)
Ср возраст	77,4±1,6	68,8±2,2**	74,4±1,6	74,7±2,2	74,5±3,8	74,4±2,5
Диастолическое АД ≥90 мм рт ст	0%	0%	15%	4,4%	14,3%	9,0%
Ожирение	47%	0%	36%	31,9%	72%**	20%
Гипотиреоз	0%	14,3%	11,5%	9%	15%*	0%
СД	15,6%	0%	11,5%	8,7%	28,7%	27,3%
Курящие /к-во сигарет в день	0%	42,9%/>20**	0%	0%	14,3%/5	0%
Артифакция	68,4%	33,3%*	42,3%*	30,4%**	28,7%**	63,7%
CTR (Mcp±m)	339,9±23,3	412,5±60,0	338,0±28,4	381,9±28,9	440,4±119,2**	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
RED (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%
ВГД	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

Таблица 7 - ОКТ характеристика подгрупп глаз с плохим ответом на Афлиберцепт (кол-во глаз,%)

ОКТ-признак	Истинный нереспондент	Частичный нереспондент	Зависимый от анти-VEGF	Ухудшение	Тахифилаксия
Субретинальная жидкость SRF+	2 (28,6)	10 (40,0)	12 (51,2)	2 (28,6)	1 (9,1)
Интраретинальная жидкость IRF+	2 (28,6)	6 (24,0)	2 (8,7)	4 (57,2)	1 (9,1)
Серозная PED	2 (28,6)	2 (8,0)	1 (4,4)	1 (14,3)	1 (9,1)
Фиброваскулярная PED	5 (71,4)	18 (72,0)	17 (73,9)	5 (71,4)	10 (90,9)
Геморрагическая PED	0	0	0	0	0
Серознофиброваскулярная PED	0	4 (16,0)	4 (17,4)	0	0
Фиброваскулярногеморрагическая PED	0	1 (4,0)	1 (4,35)	1 (14,3)	0
тип 1 MNB	6 (85,7)	23 (92,0)	21 (91,3)	4 (57,2)	10 (90,9)
тип 2 MNB	1 (14,3)	0	2 (8,7)	2 (28,6)	1 (9,1)
тип 3 MNB	0	2 (8)	0	1 (14,2)	0

Таблица 8 - Распределение ОКТ-фенотипов среди респондентов и нереспондентов (кол-во глаз, %)

ОКТ-фенотип	Истинный респондент	Истинный нереспондент	Частичный нереспондент	Зависимый от анти-VEGF	Ухудшение	Тахифилаксия
	19 (20,6%)	7 (7,6%)	25 (34,2%)	23 (25,0%)	7 (7,6%)	11 (12,0%)
SRF+/IRF-	2 (10,5)	2 (28,6)	9 (36)	11 (48)	1 (14,3)	1 (9,1)
SRF-/IRF-	9 (47,4)	3 (42,8)	10 (40)	10 (44)	2 (28,6)	9 (81,8)
SRF-/IRF+	7 (36,8)	2 (28,6)	5 (20)	1 (4)	3 (42,8)	1 (9,1)
SRF+/IRF+	1 (5,3)	0 (0)	1 (4)	1 (4)	1 (14,3)	0 (0)
1 тип MHB	17	6	23	21	4	10
SRF+/IRF-	2 (11,7)	1 (16,7)	8 (34,8)	10 (47,6)	0 (0)	1 (10)
SRF-/IRF-	7 (41,2)	3 (50)	10 (43,5)	9 (42,98)	1 (25)	8 (80)
SRF-/IRF+	7 (41,2)	2 (33,3)	4 (17,4)	1 (4,7)	2 (50)	1 (10)
SRF+/IRF+	1 (5,9)	0 (0)	1 (4,3)	1 (4,7)	1 (25)	0 (0)
2 тип MHB	2	1	0	2	2	1
SRF+/IRF-	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	1 (100)
SRF-/IRF-	2 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	1 (50)	0 (0)
SRF-/IRF+	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	0 (0)
SRF+/IRF+	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
3 тип MHB	0	0	2	0	1	0
SRF+/IRF-	0 (0)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	1 (100)	0 (0)
SRF-/IRF-	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
SRF-/IRF+	0 (0)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
SRF+/IRF+	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

В группе с анатомическим ухудшением, несмотря на лечение, превалировали лица с ожирением (72% против 42,1, $p < 0,05$), 15% из них страдали гипотиреозом ($p=0,08$) и 28,7% - сахарным диабетом (н/д). По количеству курильщиков и числу выкуриваемых сигарет в сутки (5 шт/сутки) группа занимала второе место. Следует отметить, что ни в одной из выделенных подгрупп более не встречались курильщики (!)

Ср.-групповые показатели глазного перфузионного давления у них превышали аналогичные параметры всех предыдущих подгрупп и достоверно превышали показатели респондентов ($76,6 \pm 7,3$ против $73,7 \pm 2,8$ мм рт ст, $p < 0,01$), как впрочем, и средне-групповые показатели ВГД ($16,4 \pm 4,5$ против $12,8 \pm 2,6$ мм рт ст, $p < 0,05$).

Их глаза также имели более высокие ср.-групповые показатели **CTR** ($440,4 \pm 119,2$ против $339,9 \pm 23,3$ мкм, $p < 0,05$) и самую высокую (среди всех групп) **PED** ($273,0 \pm 87,9$ против $143,2 \pm 16,0$ мкм, н/д). Недостоверность различий объясняется исключительно малым количеством глаз в группе. Частота выявления **IRF** и **SRF** была сопоставимой с показателями респондентов. Так, в 42,8% случаев имел место ОКТ-фенотип SRF-/IRF+, реже - SRF+/IRF- (28,6%) и SRF+/IRF+ (14,3%). При этом, чаще присутствовали 2 и 3 тип МНВ (42,9% против 10,9% в группе респондентов, $p = 0,00001$) (табл7).

Пациенты с тахифилаксией практически не имели статистически значимых различий от респондентов по анамнестическим показателям и наличию соматических заболеваний. Лица с избыточным весом встречались в небольшом проценте (20%) случаев, как и гипотиреоз (9,0%). Более распространенным заболеванием в этой группе был сахарный диабет - в 27,3%.

На глазах с тахифилаксией ср.-групповые показатели ВГД и перфузионного глазного давления незначимо превышали аналогичные показатели респондентов.

При тахифилаксии только в половине глаз (54,6%) была утолщена сетчатка и потому ср.-групповые показатели **CTR** оказались не самые высокие ($410,4 \pm 91,3$ против $339,9 \pm 23,3$ мкм, $p < 0,05$). На всех (100%) глазах имела место PED со средней высотой $237,5 \pm 62,0$ мкм (против $143,2 \pm 16,0$ у респондентов, $p < 0,05$).

В ОКТ-характеристике глаз с **тахифилаксией** обращали на себя внимание отсутствие субретинальной (SRF-, 90,9%) и интратретинальной (IRF-, 90,9%) жидкости, высокая распространенность фиброваскулярной PED (90,9%); 90,0% глаз демонстрировали 1 тип МНВ.

По ОКТ- данным доминировал фенотип: SRF-/IRF- (в 81,8%)

Мы проанализировали возможность применения в качестве маркера риска развития тахифилаксии ОКТ-фенотип SRF-/IRF-. Ниже представлены расчеты частоты совпадения прогноза на глазах с ОКТ-фенотипом **SRF-/IRF-(OR, 95% ДИ)**

Частота неблагоприятных состояний

p1 (%) = 18,18
p2 (%) = 51,52

p = 0,04481
Значимость p < 0.05

Показатели

относительного риска

Границы 95%-го ДИ:

		<i>левая</i>	<i>правая</i>
Odds-ratio =	0,209	0,039	1,119
Risk-ratio =	0,353	0,097	1,291

Чувствительность маркера по формуле Байеса этого маркера составили: = 47,8%; специфичность – 90%, соответственно.

Резюме

Распределив нереспондентов на 5 подгрупп по изложенному принципу градирования мы получили возможность изучить распространенность, описать особенности и клинический фенотип глаз **VEGF – зависимых респондентов**, а также подгруппу глаз, потенциально отвечающих снижением ответа на анти VEGF-терапию, то есть, глаз с **тахифилаксией**. Это раскрывало возможность прогнозирования ответа на лечение на исходном этапе первичной диагностики.

Вместе с тем, известно, что природное течение заболевания и/или ИВИ препаратов с анти-VEGF-механизмами действия могут развернуть молекулярные пути патологического внутриглазного ангиогенеза в сторону провоспалительных механизмов, что может снизить или устранить терапевтический эффект анти VEGF-терапии. Этот аспект требовал изучения. В рамках этого мы провели специальные иммунологические исследования (см ниже)

3.3 Изучение возможности прогнозирования неблагоприятного ответа на лечение на основе количественных показателей про- и антиангиогенных факторов роста в стекловидной жидкости глаз

Настоящий фрагмент работы посвящен изучению уровня про- и антиангиогенных факторов роста в стекловидной жидкости (СТЖ) глаз с МНВ на фоне антиангиогенной терапии и возможности их применения в качестве биомаркеров прогноза ответа на лечение.

В исследование вошли 3 группы больных (n=72). Первая группа была представлена больными с активной МНВ (n=24), ранее получавшими две-три эндовитреальные инъекции препарата ранибизумаба. Вторая группа состояла из пациентов с сенильной катарактой без признаков ВМД (n=38). Третья группа включала больных с катарактой, осложненной МНВ (n=10). Исследование имело проспективный поперечный (статичный) дизайн.

В образцах СТЖ больных определяли концентрацию 8 ключевых цитокинов и ростовых факторов, потенциально участвующих в ангиогенезе. Методика исследования описана в главе 2 «Материал и методы».

Поскольку у нас не было показателей абсолютно здоровых глаз (норма), то мы сравнивали показатели в интересующей нас группе 1 с группами 2 и 3. Показатели группы 3, в которой катаракта осложнялась наивной МНВ, мы принимали за условно приближенные к тем, которые могли бы быть до лечения. А показатели катарактальных больных в группе 2 принимали за те, которые нужно достичь в ходе лечения.

Проангиогенные факторы роста

По сравнению с сенильной катарактой в СТЖ глаз с леченой МНВ чаще (75% против 47,5%, $p < 0,05$) и на более высоком уровне присутствовали проангиогенные цитокины TNF α (Mcp $\pm$ m: $2,4 \pm 0,5$ 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%, $p < 0,05$; Mcp: $10,1 \pm 5,9$ против $2,7 \pm 1,0$, $p < 0,01$).

Уровни VEGF в обеих нозологических группах оказались практически идентичны: $17,5 \pm 14,0$ (при МНВ) против $18,4 \pm 3,2$ при катаракте (н/д), при этом частота его обнаружения в катарактальной группе была достоверно выше (68,2% против 17%, $p < 0,01$, табл.3.7).

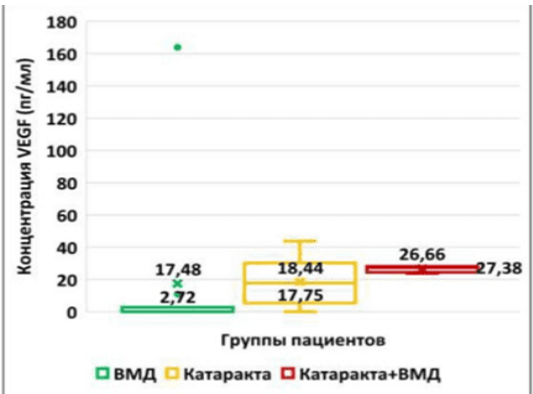
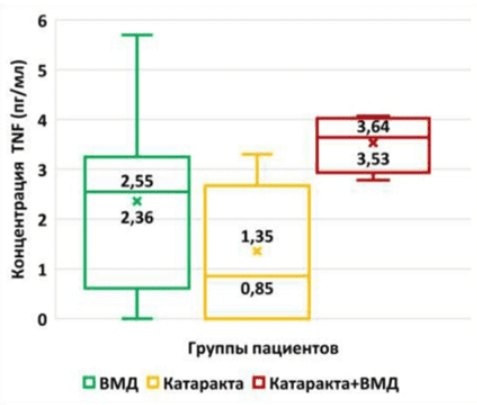
Вполне ожидаемо, что по сравнению с показателями группы 3 (Mcp= $26,7 \pm 0,9$ пг/мл, $p < 0,01$, табл. 3.7) в интересующей нас группе 1 на фоне двух-трех ИВИ ангиостатика были снижены уровни ключевого проангиогенного фактора, запускающего ангиогенез – VEGF, приближаясь к уровням катарактальных глаз (рис.3.1). Это отражалось и на концентрации и на частоте выявления VEGF (17% в группе 1 против 100% в группе 3, $p < 0,001$). В порядке объяснения можно предположить, что поскольку пациентам с МНВ ранее уже вводили

Нозологическая группа	Показатели	Концентрация , пг/мл							
		TNF	IFNα	IL-8	Angiogenin	VEGF	FGFb	IFN-γ	TGFb
Группа 1 ВМД (n=24)	Средние M±m	2,4±0,5*#	6,4 ±1,7*, ##	92,9±75,7*,###	3822,4±498,6**###	17,5±14,0	10,1±5,9**	24,0-	-
	Ст.отклонение (σ)	1,6	6,0	265,3	1745,5	48,9	20,8	-	-
	Me [Q1; Q3]	2,6 [0,6; 3,3]	5,2 [4,0; 7,8]	12,9 [5,4; 22,9]	3408,2 [4506,8; 2542,1]	2,7 [0; 2,7]	10,8 [0; 10,8]	-	-
	Коридор значений	0,0-5,7	0-24,4	4,59-972,4	1535,03-7530,0	0,0-163,9	0,0-76,8	0,0-24,0	-
	Частота выявления	75%	83%	100%	100%	17%	58,3%	8,3%	-
Группа 2 Катаракта (n=38)	Средние M±m	1,4 ±0,3	4,4 ±0,4	8,5 ±1,5	2820,2±319,3	18,4 ±3,2	2,7 ±1,0	-	206,3-
	Ст. отклонение (σ)	1,4	1,8	6,7	1404,9	14,2	4,6	-	-
	Me [Q1; Q3]	0,9 [0; 2,67]	4,8 [3,77; 5,28]	6,9 [4,39; 10,14]	2471,1 [1549,6; 3855,37]	17,8 [5,44; 30,2]	9,3 [0; 9,27]	-	-
	Коридор значений	0,0-3,3	0,0-6,8	0,0-27,73	848,4-6194,6	0,0-36,7	0,0-11,4	-	0,0-206,3
	Частота выявления	47,5%	74,3%	74,3%	100%	68,2%	26,7%	0,0%	5,3%
Группа 3 Катаракта+ ВМД	Средние M±m	3,5 ±0,3	3,8 ±1,1	5,3±0,4	5715,8 ±697,6	26,7 ±0,9	9,3		
	Ст. отклонение (σ)	0,5	2,2	0,7	1395,2	1,8			
	Me [Q1; Q3]	3,6 [2,9; 4,0]	4,8 [1,2; 5,3]	5,2 [6,07; 4,6]	4540,1 [4501,6; 7423,6]	27,4 [24,5; 29,1]			
	Коридор значений	3,4-4,1	0-5,4	4,6-6,2	4506,8-7988,8	23,8-28,1	0-9,3	-	-
	Частота выявления	100%	66,6%	100%	100%	100%-	10 %	-	-

Таблица 9 - Концентрация проангиогенных и антиангиогенных цитокинов в стекловидной жидкости при катаракте и МНВ на фоне лечения

Примечание: * - достоверность различий от группы 2 p <0,05; ** p <0,01; # - достоверность различий от группы 3 p <0,05; ## p <0,01; ### p <0,001

ангиостатик ранибизумаб, то, возможно, продукция VEGF уже находилась под контролем препарата или была подавлена. Одновременно зафиксированы достоверно более низкие концентрации и других проангиогенных факторов – ангиогенина (Мср. =3822,4±498,6 пг/мл против 5715,8±697,6 пг/мл, $p<0,05$; рис.3.2) и TNF (2,4±0,5 пг/мл против 3,5±0,3 пг/мл, $p<0,05$; рис. 3). Т.о., на фоне инъекций ранибизумаба уровень двух других проангиогенных факторов роста (ангиогенина и TNF) также приблизился к показателям катарактальных больных, не достигая их значений. Различия все еще оказались статистически значимы ($p<0,05$; $p<0,01$, соответственно).

	
Рисунок 14.1 Диаграмма с демонстрацией уровня VEGF в группах 1 (МНВ) -2 (катаракта) -3 (катаракта+ МНВ).	Рисунок 14.2 Диаграмма с демонстрацией сравнительного уровня ангиогенина в группах 1 (МНВ) -2 (катаракта) -3 (катаракта+ МНВ).
	Рисунок 14.3 Диаграмма с демонстрацией сравнительного уровня TNF в группах 1 (МНВ) -2 (катаракта) -3 (катаракта+МНВ).

Заметим, при этом, на фоне ИВИ ангиостатика повышались концентрации плюрипотентных цитокинов с проангиогенными и провоспалительными свойствами, в частности, IFN α ($p=0,05$, рис. 14) и IL-8 ($p=0,11$; различия оказались недостоверными из-за значительного разброса значений, поэтому расценены как сильная тенденция; рис. 14.5); и практически в СТЖ каждого второго глаза появлялся FGFb. В то время, как в группе

сопоставления с катарактой и наивной МНВ этот фактор роста обнаружен только в одной из десяти проб.

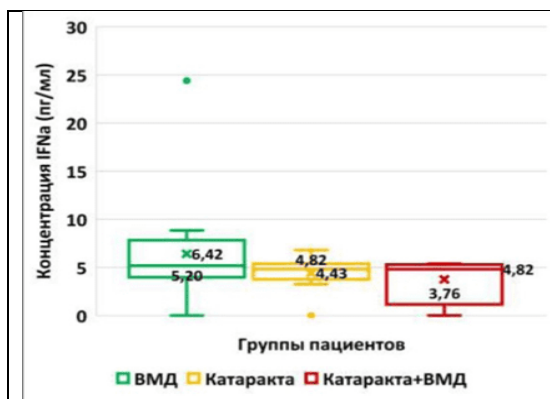


Рисунок 14.4 Диаграмма с демонстрацией сравнительного уровня IFNα в группах 1 (МНВ) -2 (катаракта) -3 (катаракта+ МНВ).

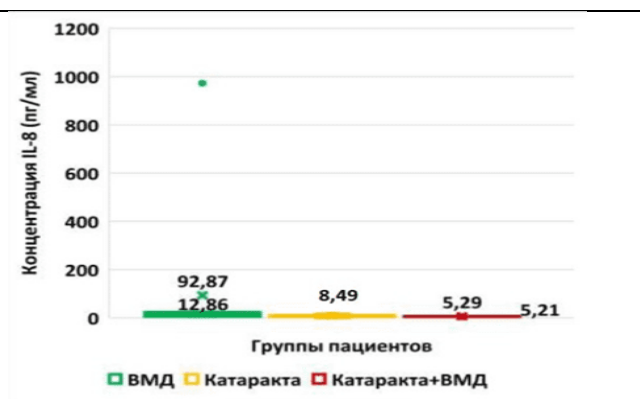


Рисунок 14.5 Диаграмма с демонстрацией сравнительного уровня IL-8 в группах 1 (МНВ) -2 (катаракта) -3 (катаракта+ МНВ).

Мы проанализировали возможную взаимосвязь количественных показателей цитокинов в СТЖ с ответом на ИВИ Ранибизумаба (табл 3.8).

Таблица 10 - Взаимосвязь ответа на анти-VEGF препарат с количественными показателями факторов роста bFGF и ИЛ-8

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 оценки возможности применения этих факторов в качестве маркеров риска неблагоприятного ответа или нереспонденции на анти-VEGF-препараты (см табл.3.9).

Таблица 11 - Показатели относительного риска и 95% ДИ (OR, 95% ДИ)

Маркер	Показатели относительного риска		Границы 95% ДИ		p
			<i>левая</i>	<i>правая</i>	
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+ FGFb	Odds-ratio	96,0	5,1	1791,3	0,00039
	Risk-ratio	6,6	1,1	40,6	

Резюме

Повышенные уровни **проангиогенных** факторов роста IL-8, ангиогенина, TNF α и bFGF в СТЖ глаз с МНВ на фоне антиангиогенной терапии позволяют говорить о наличии других, независимых от VEGF, действующих механизмов стимуляции ангиогенеза.

Отсутствие **антиангиогенных** факторов роста IFN γ и TGF β в СТЖ позволяет думать о наличии исходного дефекта в контроле регуляции ангиогенеза при МНВ.

Редкое обнаружение VEGF в комплексе с достоверным снижением его концентрации на фоне лечения **анти-VEGF препаратами** глаз с МНВ демонстрирует целевое ингибирование на практике. На фоне антиангиостатического лечения происходит инверсия ангиогенного фенотипа с формированием новых обходных путей ангиогенеза, что, по-видимому, может служить обоснованием для перевода на препараты с другими механизмами действия.

Глава 4. Разработка экспериментальных моделей неоваскуляризации глаз и комплекса экспертных критериев для доклинической оценки эффективности рекомбинантных пептидов эндостатина, тумстатина и PEDF на их основе.

Применительно к поставленным задачам были разработаны и адаптированы две экспериментальные модели неоваскуляризации лимбобороговичной, доступной визуализации, и две модели неоваскуляризации хориоретинальной локализации. Разные сроки развития неоваскуляризации и разные преимущественные механизмы индукции патологического процесса позволяли изучать все возможные биологические эффекты тестируемых препаратов.

Первую модель (прошивание роговицы викриловыми швами) использовали для оценки возможности пептидов подавлять ранние этапы ангиогенеза, их вводили одновременно с индуктором ангиогенеза. На второй модели (щелочной ожог роговицы) анализировали возможность пептидов подавлять как ранние, так и поздние стадии ангиогенеза (пептиды вводили с 1 или 7-го дня эксперимента, когда сосудистая сеть уже частично сформирована). На этом этапе предполагалось оценить аваскулогенный эффект пептидов. Изучая клинкоморфологические особенности неоваскуляризации на разных экспериментальных моделях, параллельно мы разрабатывали экспертные критерии количественной оценки биологических эффектов разной направленности – ангиостатического, противовоспалительного, противоотечного и т.д.

Оценку эффективности проводили клинически, ангиографически и морфологически с применением различных количественных методов оценки (см. Главу 2).

4.1 Разработка комплекса экспериментальных моделей неоваскуляризации передней (роговичной) и задней (хориоретинальной) локализации для оценки эффективности природных ингибиторов в подавлении индуцированного неоваскуляризации.

Экспериментальные модели хориоретинальной неоваскуляризации

Модель № 1 формировали путем имплантации Матригеля (гелеобразная смесь белков, выделяемых клетками мышинной саркомы Энгельбрета-Холма-Сварма) экспериментальным животным (20 кроликам) в субхориоидальное пространство, модифицируя процедуру, описанную Passaniti A. [140]. Использовали аликвоты (100 мкл) Матригеля (BD Biosciences), содержащие гепарин 60 У.Е./мл и 500 нг/мл VEGF165, приготовленные на льду (рис15). Матригель с 500 нг/мл VEGF165 вводили субхориоидально после формирования профильного туннельного «кармана» в склере в правом глазу 15 половозрелым кроликам породы Шиншилл (рис. 15-16-17).



Рисунок 15. Приготовленные на льду аликвоты (100 мкл) Матригеля (BD Biosciences), содержащие гепарин 60 У.Е./мл, VEGF165 (10, 100 или 500 нг/мл)

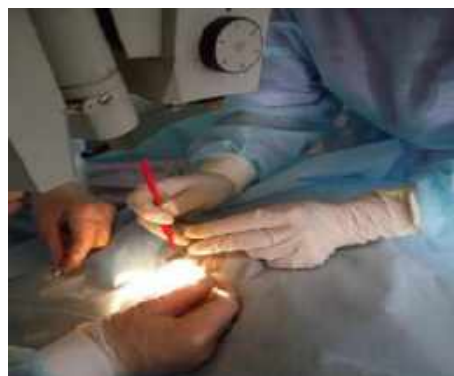


Рисунок 16. Подготовка к эксперименту. Фиксация глаза.

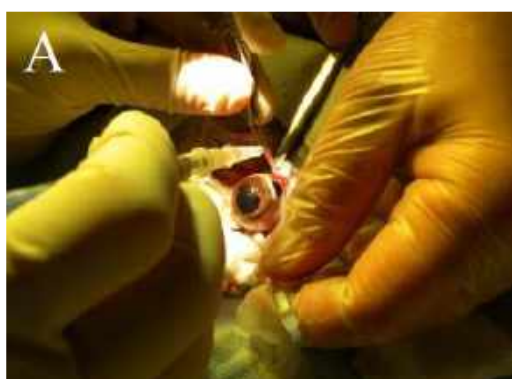


Рисунок 17. Этапы выполнения эксперимента.

Предварительно выполняли склеральный надрез склеры (на 5/6 толщины) в ретроэкваториальной части склеры, затем осуществляли её тоннельное расслоение в сторону заднего полюса. В образовавшийся «карман» вводили подготовленный Матригель. Вход в тоннель герметично зажимали пинцетом на 1-2 минуты, позволяя веществу под влиянием температуры тела полимеризоваться.

Матригель быстро преобразовывался в цельный, гелеобразный имплантат. Конъюнктивальный разрез и доступ к туннелю, как и сам туннель, не ушивали.

Модель № 2 модифицировали путем повреждения мембраны Бруха лазерным воздействием на глазах с имплантированным в субхориоидальное пространство Матригелем. Для этого 20 кроликам (породы Шиншилл, массой 3,5-4,0 кг) дополнительно на 7 сутки выполняли лазеркоагуляцию сетчатки, используя лазерное излучение длиной волны 577 нм. При этом экспозиция была постоянной - 0,1 сек, диаметр пятна в фокальной плоскости составлял 100 мкм; мощность составляла 350 мВт. Наносили по 5 коагулятов рядом с диском зрительного нерва в 100 мкм от видимой границы аномальных дилатированных сосудов (рис. 18) .

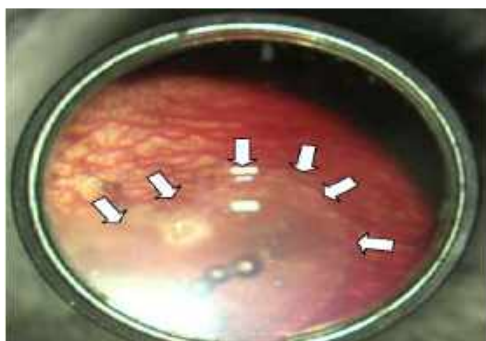


Рисунок 18. Модель 2.

Картина глазного дна после введения Матригеля и нанесения коагулятов.

Экспериментальные модели лимбо-роговичной неоваскуляризации

Модель № 3 неоваскуляризации передней локализации (лимбо-роговичной) формировали путем щелочного ожога или нанесения 40 секундной аппликации на апекс роговицы диском хлопчатобумажной ткани диаметром 7 мм, пропитанным 10% раствором NaOH кроликам породы Шиншилл (20 кроликов) [5] (рис.19 а,б,с,д,е) .



Рисунок 19а. Клиническая картина на 4 сутки со дня щелочного ожога. Диффузный отек роговицы. В центре просматривается участок эктазии на месте наиболее глубокого ожога. С лимба идет васкуляризация, которая заходит примерно на 1 мм в сторону оптического центра



Рисунок 19б. Клиническая картина на 10 сутки со дня щелочного ожога. Диффузный отек роговицы остается. Продолжается васкуляризация. К этому сроку она занимает примерно одну треть диаметра роговицы



Рисунок 19с. Клиническая картина на 18 сутки со дня ожога. Формируется тотальное бельмо роговицы с мощными «ветвями» новообразованных сосудов, идущих с лимба

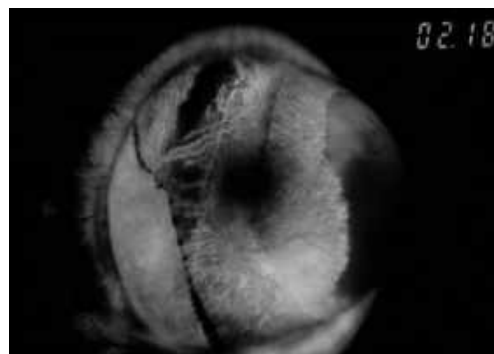


Рисунок 19д. Ангиографическая картина на 10 сутки. Визуализируется зона лимбальной васкуляризации с новообразованными сосудами, плавно переходящая в зону остаточного отека роговицы

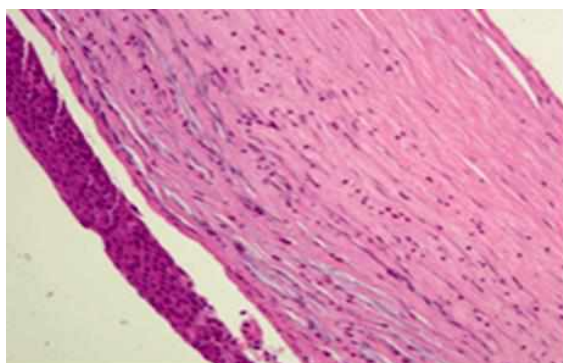


Рисунок 19е. Гистологическая верификация лимбороговичной неоваскуляризации: верхняя треть роговицы под многослойным клеточным пролифератом пронизана новообразованными сосудами, подлежащих подсчету. Ув/ x200, окраска гематоксилин – эозин

Модель № 4 формировали путем прошивания роговицы кролика викриловыми швами в три ряда через всю площадь роговицы [1] (20 кроликов). Известно, что викриловые нити 6-0, 7-0 вызывают воспалительную реакцию, в которой действуют провоспалительные и проангиогенные индукторы неангиогенеза. Патологический процесс завершился формированием фиброваскулярного комплекса с образованием сосудов в строме роговицы [рис. 20].

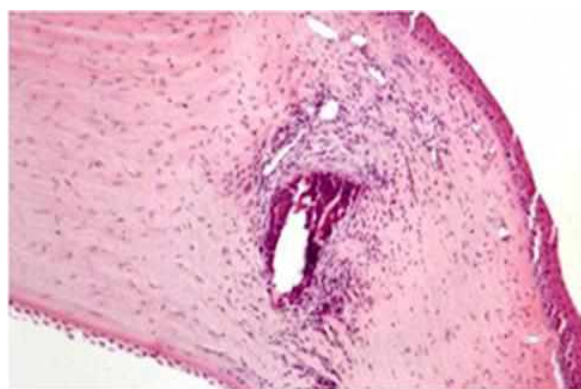


Рисунок 20а. Клиническая картина на 14 сутки после прошивания роговицы викриловыми швами. Зона перифокального воспаления вокруг швов в роговице пронизана новообразованными сосудами	Рисунок 20б. Гистологическая верификация лимбо-роговичной неоваскуляризации, проходящей через зону викрилового шва. Просматривается вокруг шва мощный грануляционный вал. Над ним видны многочисленные новообразованные сосуды
--	--

Все 4 экспериментальные модели продемонстрировали клинические признаки неоваскуляризации, верифицированные ангиографически, морфометрически (№1 и №2 по данным ОКТ; *in vivo*) и морфологически (№1-4, *ex vivo*). При этом, не все модели одинаково успешно реализовались и приводили к клинике ожидаемого заболевания. Процент «выхода» СНМ на моделях 1-2-3-4 составил 100% - 75% - 80% - 100%, соответственно. Каждая из моделей позволяла применить разработать свои способы количественной оценки. В совокупности комплексный подход к экспериментальным исследованиям потенциально повышал доказательность базы при оценке эффективности испытуемых ангиостатиков.

4.2 Клиническая оценка эффективности рекомбинантных пептидов эндостатина, тумстатина и PEDF в ингибировании ранних стадий ангиогенеза.

Первая модель ангиогенеза

В первой модели, индуцированной прошиванием роговицы с лимба викриловыми швами (8-0), тестируемые пептиды в расчетных дозах: 7,2 нг PEDF, 96 нг эндостатина, 70,2 нг тумстатина вводили субконъюнктивально в день прошивания роговицы, то есть, одновременно с индукцией ангиогенеза.

В *контрольных глазах*, начиная с 7-го дня после нанесения швов, отмечали врастание сосудов в роговицу с лимбальной зоны. Новообразованные сосуды образовывали сплошной красный "ореол". К 15-м суткам вся роговица контрольных глаз оказывалась пронизанной сетью сосудов (Рис. 21.). Развивался мощный тотальный диффузный отек роговицы, который не позволял просмотреть детально структуры передней камеры, включая радужку.

Все 3 антиангиогенных пептида оказывали сопоставимый, дозозависимый, клинически значимый антиангиогенный эффект. Он проявлялся тем, что во всех опытных глазах при сроках наблюдения до 45-х суток отсутствовало врастание сосудов в роговицу. Отсутствовал диффузный отек роговицы. При этом перифокальный отек роговицы развивался вокруг каждого шва, глубина распространения отека зависела от глубины прошивания и варьировалась от 1/2 до 2/3 толщины роговицы. Отек был более выражен на фоне инъекций

эндостатина (Рис. 20В) и почти не развивался на фоне лечения PEDF (Рис. 20С). Шовный материал со временем разволокнялся и резорбировался.

Таким образом, все фрагменты пептидов оказывали сопоставимый, клинически значимый антиангиогенный эффект. Он проявлялся прерыванием лимбороговичной васкуляризации, несмотря на нанесенную травму и внесение в роговицу мощного индуктора ангиогенеза (викрил). Во всяком случае, клинически (*ad oculus*) они не выявлялись. Биомикроскопически их удавалось идентифицировать лишь при 16 кратном увеличении.



Рис. 20 А: опытный глаз после 10 инъекций тумстатина. Рис. 20 В: Опытный глаз после 10 инъекций эндостатина. Рис. 20 С. Опытный глаз после 10 инъекций PEDF

Для количественной оценки эффектов ангиостатиков была предложена и использована балльная система оценки васкуляризации опытных и контрольных глаз. Результаты применения пептидов были сопоставлены (Табл. 12). Было установлено, что наиболее мощным клиническим ангиостатическим эффектом обладал PEDF (5 баллов). Ему незначительно уступал тумстатин (4 балла). Замыкал ряд антиангиогенных пептидов – эндостатин (3 балла).

Таблица 12 - Результаты клинической оценки антиангиогенной активности ингибиторов ангиогенеза

Анализируемый глаз	Васкуляризация (в баллах)	Антиангиогенная активность(в баллах)
Контроль	5	-
PEDF (опыт)	0	5
Тумстатин (опыт)	1	4
Эндостатин (опыт)	2	3

На фоне инъекций пептидов отмечали также снижение отека роговицы по сравнению с контрольными глазами. Противоотечный эффект PEDF, тумстатина и эндостатина

варьировался по степени выраженности. В этом аспекте предпочтение также следовало отдать PEDF, на фоне которого наименее выраженными были как перифокальный отек вокруг швов, так и отек стромы роговицы. Роговица сохраняла свою прозрачность (Табл. 13).

Таблица 16. Результаты колориметрической оценки противоотечных эффектов ингибиторов ангиогенеза PEDF, тумстатина и эндостатина

Тестируемый пептид	Помутнение/Отек (пиксели)	Роговица (пиксели)	Площадь помутнения (%)
PEGF опыт	5568	68832	8
Тумстатин опыт	30306	77674	41
Эндостатин опыт	200926	245256	82
Контроль	330298	330365	100

Во всех опытных глазах, благодаря сохранности прозрачности роговицы, при осмотре на целевой лампе удавалось просмотреть структуры передней камеры глаза под экспериментальными швами.

Морфологическая оценка

Клинические данные были подтверждены результатами морфологических исследований. Было доказано, что все пептиды обладали сопоставимыми антиангиогенными эффектами. Они проявлялись достоверным снижением количества новообразованных сосудов на единицу площади среза тканей в зоне просмотра по результатам морфометрических исследований ($p < 0,001$) (Табл. 14). При этом колориметрические показатели суммарного просвета сосудов на срезе в пикселях и индекс васкуляризации лимбо-роговичной зоны достоверно снижались ($p < 0,001$). В пределах расчетной дозы тумстатин и PEDF обладали более мощным антиангиогенным эффектом на ранних стадиях ангиогенеза. Эндостатин по степени выраженности биологических эффектов значительно уступал им.

При исследовании роговицы методом световой микроскопии обращала на себя внимание различная степень выраженности отека (плотность и глубина распространения) и клеточной инфильтрации роговицы вокруг экспериментальных швов. Инфильтрат преимущественно состоял из лимфоцитов, плазмочитов и эозинофилов.

При исследовании роговицы методом световой микроскопии обращала на себя внимание различная степень выраженности отека (плотность и глубина распространения) и клеточной инфильтрации роговицы вокруг экспериментальных швов.

Таблица 14 - Количественная морфометрическая и колориметрическая оценка биологических эффектов антиангиогенных пептидов

Тестируемый пептид	Тестируемый глаз	Колориметрическая оценка		Морфометрическая оценка
		Количество пикселей (Мср. $\pm m$)	Индекс васкуляризации (Мср. $\pm m$)	Количество сосудов на срезе, шт, (Мср. $\pm m$)
Тумстатин (n=10)	Контроль	128830 $\pm$ 1115	0,03	90 $\pm$ 17
	Опыт	73788 $\pm$ 1491*	0,01*	33 $\pm$ 5*
PEDF (n=10)	Контроль	243734 $\pm$ 1125	0,016	76 $\pm$ 8
	Опыт	64974 $\pm$ 1234*	0,008*	38 $\pm$ 5*
Эндостатин (n=10)	Контроль	102882 $\pm$ 1112	0,02	83 $\pm$ 6
	Опыт	58886 $\pm$ 1265*	0,01	24 $\pm$ 4**

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

Инфильтрат преимущественно состоял из лимфоцитов, плазмоцитов и эозинофилов. Все пептиды достоверно снижали количество клеточных элементов в инфильтрате, развившемся вокруг викриловых швов (Табл. 15).

Таблица 15 - Количественная морфометрическая и колориметрическая оценка потенциала рекомбинантных пептидов подавлять ранние стадии ангиогенеза.

Тестируемый пептид	Тестируемый глаз	Инфильтрация		
		Протяженность отека, мм	Количество клеток в инфильтрате диаметром 0,03 мм ²	Процентная доля эозинофилов, %
Тумстатин (n=10)	Контроль	2,89 $\pm$ 0,25	116 $\pm$ 27	13,8%
	Опыт	1 $\pm$ 0,15*	42 $\pm$ 13*	28,6%
PEDF (n=10)	Контроль	3,23 $\pm$ 0,31	130 $\pm$ 21	46%
	Опыт	2,38 $\pm$ 0,11*	39 $\pm$ 11*	12,8%*
Эндостатин (n=10)	Контроль	1,02 $\pm$ 0,08	65 $\pm$ 13	15%
	Опыт	0,95 $\pm$ 0,025*	41 $\pm$ 9**	61%

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

Сравнительные аспекты количественной оценки противоотечного и противовоспалительного эффекта антиангиогенных пептидов продемонстрировали преимущества тумстатина и PEDF перед эндостатином (Рис. 21-24).

Выявленный биологический эффект тумстатина и PEDF, по-видимому, можно объяснить ингибированием секреции VEGF, ответственного за проницаемость сосудистой стенки.

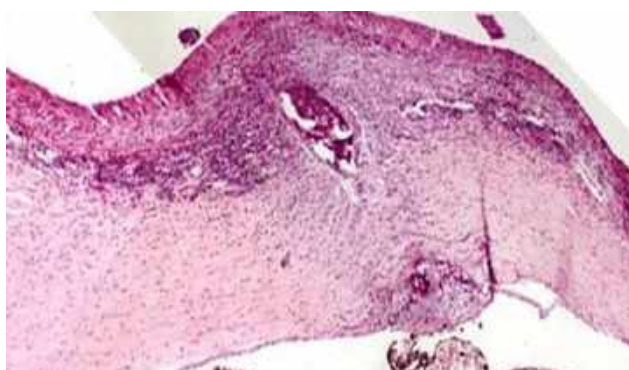


Рис. 21 Размеры инфильтрата на контрольном глазу. Окраска гематоксилин-эозин, х 100.

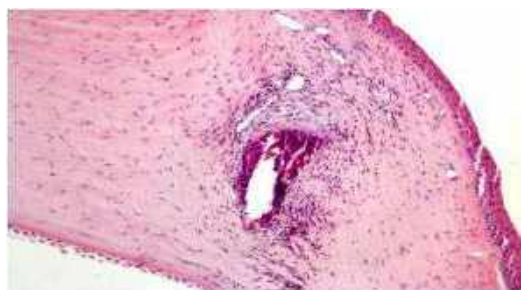


Рис. 22. Размеры инфильтрата на опытном глазу на фоне инъекций эндостатина. Окраска гематоксилин-эозин, х 100.

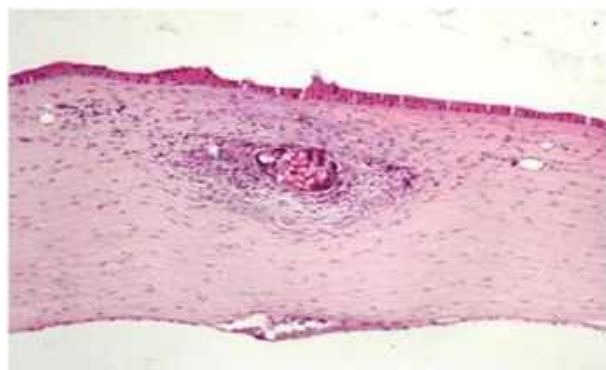


Рис. 23. Размеры инфильтрата на опытном глазу на фоне инъекций PEDF. Окраска гематоксилин-эозин, х 100.

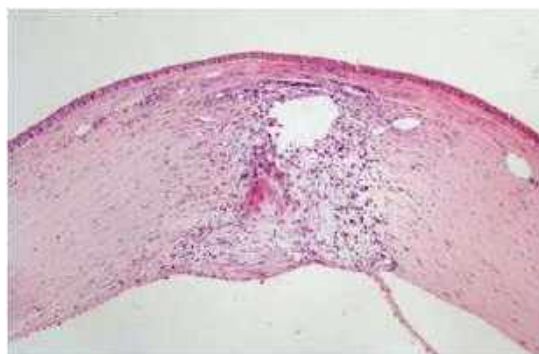


Рис. 24. Размеры инфильтрата на опытном глазу на фоне инъекций тумстатина значительно меньше, чем на контрольном.

Меньшая доля эозинофилов в инфильтрате, развившемся вокруг шва на фоне PEDF, свидетельствовала о возможном непрямом десенсибилизирующем /противоаллергическом /противовоспалительном потенциале этого пептида.

Из других патоморфических изменений были отмечены следующие: эндотелий роговицы был дистрофически изменен во всех исследуемых опытных и контрольных глазах, в некоторых глазах обнаружены передние синехии в области экспериментальных дефектов.

Они объяснялись перифокальным воспалением, которое возникало вокруг викриловых швов, проходящих сквозь всю толщину роговицы, и контактирующих с тканями передней камеры глаза.

На светооптическом уровне токсического влияния исследуемых пептидов на эндотелий нормальных сосудов радужки и хориоидеи не обнаружено.

На первый взгляд, иммуногистохимические исследования с маркером CD31 казались неинформативными и непригодными для наших целей. (Рис. 25-26). Положительная ИГХ-реакция была обнаружена в эндотелии собственных сосудов радужной оболочки, в то время как в новообразованных сосудах в грануляционной ткани вокруг искусственных дефектов роговицы ИГХ-реакция на маркер CD31 оказалась отрицательной. В связи с этим, можно было предположить, что экспрессия CD31 эндотелиальными клетками начинается не сразу с момента образования сосудов, а несколько отсрочено в процессе во времени - к этапу их созревания. Это делает ИГХ-реакцию с маркером CD31 неприменимой для подсчета индекса васкуляризации в нашем эксперименте. Вместе с тем, полученную негативную реакцию можно было расценивать как факт развития неполноценных новообразованных сосудов, не содержащих слоя эндотелиальных клеток в стенке. В этом, по-видимому, и проявлялся один из антиангиогенных эффектов используемых природных ингибиторов ангиогенеза.

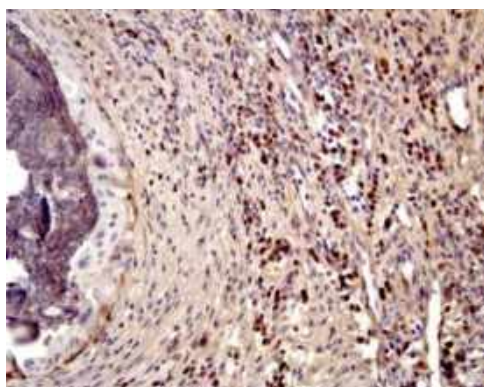


Рис. 25. Отрицательная реакция в сосудах грануляционной ткани с маркером CD31. X 200.

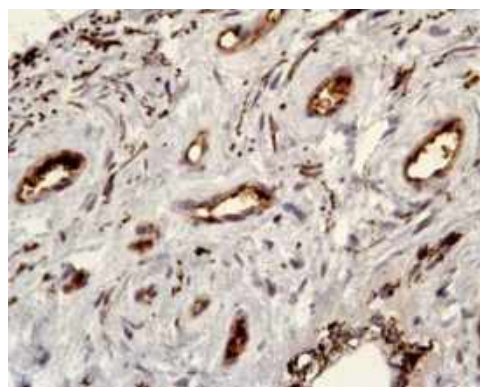


Рис. 26. Положительная реакция в эндотелии сосудов радужной оболочки с маркером CD31. X 200.

Таким образом, проведенные исследования позволяли утверждать о том, что все 3 тестируемых рекомбинантных пептида, представлявшие собой фрагменты природных ингибиторов ангиогенеза, обладают заявленными ангиостатическими свойствами. Они проявляются уменьшением интенсивности образования сосудов в ответ на индукцию ангиогенеза викриловыми швами. Антиангиогенные эффекты пептидов, по-видимому, осуществляются благодаря торможению миграции и пролиферации эндотелиальных клеток, и/или их преждевременным индуцированным апоптозом, что морфологически проявляется

отсутствием ЭК в стенке новообразованных сосудов практически на всем протяжении. Негативная ИГХ-реакция с маркером ЭК - CD31 новообразованных сосудов подтверждает этот вывод.

Наряду с антиангиогенными эффектами тестируемые пептиды обладали противоотечными и антипролиферативными эффектами, проявляющимися в уменьшении количества клеточных элементов вокруг викрилового шва и сокращении общей площади клеточной инфильтрации.

Вторая модель ангиогенеза

Для подтверждения наличия антиангиогенного потенциала пептидов тумстатина и PEDF, определенного при прошивании роговицы викриловыми швами, предстояло подтвердить на модели щелочного ожога роговицы.

Для изучения ангиостатических эффектов на ранних этапах неоваскуляризации пептиды вводили, начиная со дня нанесения щелочного ожога, то есть, одновременно с индукцией ангиогенеза, субконъюнктивально, ежедневно в расчетных дозах: 7,2 нг PEDF, 96 нг эндостатина, 70,2 нг тумстатина.

Животных выводили из эксперимента на 12 сутки.

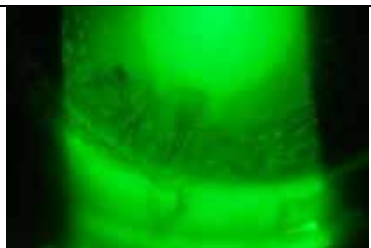
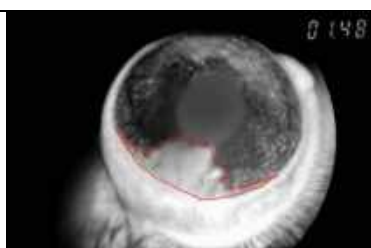
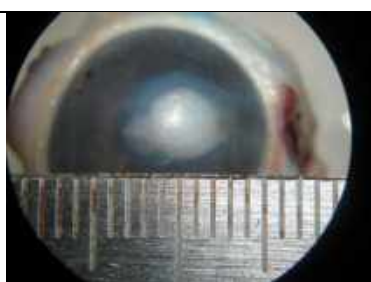
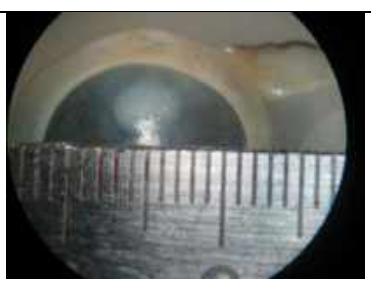
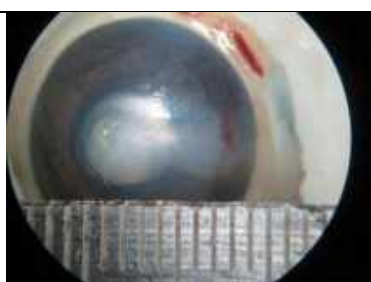
В контрольных глазах, начиная с 3 дня после нанесения ожоговой травмы, отмечали бурное врастание сосудов в роговицу с паралимбальной зоны. Новообразованные сосуды образовывали сплошной красный "ореол". К 18-м суткам роговица контрольного глаза оказывалась пронизанной сетью сосудов, распространяющихся в оптический центр и порой переплетающихся между собой.

Для визуализации сосудов перилимбальной сети и их количественного подсчета использовали ангиографический метод. В таблице 16 представлены результаты ангиографии и фоторегистрация этапа количественной оценки.

В Табл. 16 представлены клинические и ангиографические результаты эксперимента. В 1 строке представлены фотографии с моделью ангиогенеза на фоне введения пептидов (2, 3 и 4 колонка, первая строка) и без лечения (контроль, 1 колонка). Как видно из представленных данных, клинически и ангиографически зона перилимбальной васкуляризации глаз с ожогом на фоне введения многократных инъекций 7,2 нг PEDF достоверно отличалась от таковой в контрольном глазу без лечения (Для сравнения: 16 % в контроле и 3% в опыте; $p < 0,001$).

Площадь васкуляризации в опытном глазу, пролеченном другим ангиостатическим пептидом тумстатином также в 1,6 раза отличалась от контроля (10% против 16%, $p < 0,05$).

Таблица 16- Сравнительная клиническая и ангиографическая оценка пептидов PEDF и тумстатина.

Ранние сроки эксперимента (10-е сутки)		
Контроль (без лечения)	PEDF (24-57)	Тумстатин (69-95)
		
		
		
		

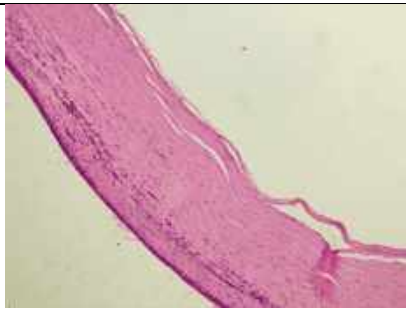
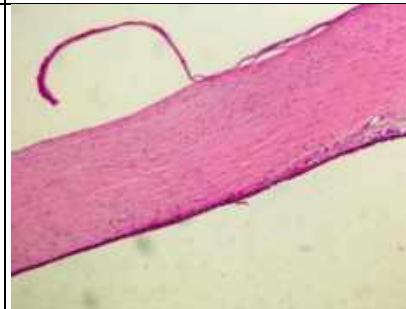
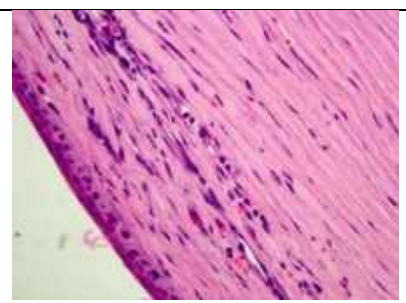
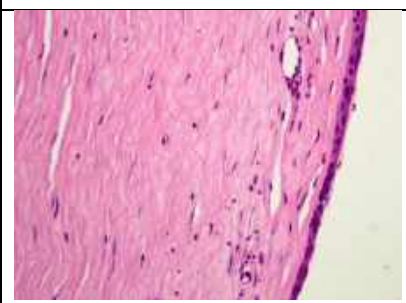
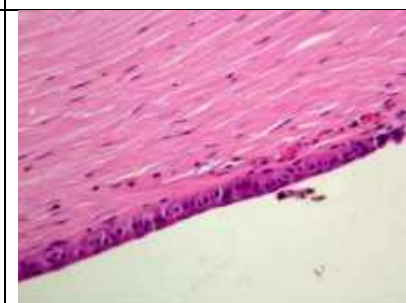
Примечание: 1 строка – клиническая картина по завершении эксперимента; 2 строка – фоторегистрация в бескрасном свете; 3 строка – выделенная зона флюоресценции в программе Photoshop; 4 строка – макропрепарат на этапе измерения площади бельма.

Таблица 17- Количественная ангиографическая оценка ангиостатического эффекта пептидов тумстатина и PEDF на модели щелочного ожога.

Критерий оценки	Контроль (без лечения)	Тумстатин	PEDF
Вся роговица, пиксели	681883	746366	835171
Флуоресцирующая область, пиксели	110423	75952	26190
Отношение площади васкуляризации к площади роговицы, %	16	10*	3**
Диаметр роговицы, мм	12,5	12	12,3
Диаметр бельма, мм	7,75	5,75	4,5

Результаты эксперимента подтвердили, что на ранних сроках ангиогенеза каждый из пептидов на ожоговой модели неоваскуляризации оказывает клинически значимый ангиостатический эффект. Результаты морфологических исследований представлены в Табл. 18.

Таблица 18- Морфологическая оценка эффективности ангиостатических пептидов PEDF и тумстатина на модели щелочного ожога в поздние сроки эксперимента.

Контроль	Тумстатин (69-95)	PEDF (24-57)
		
		

Примечание. 1 строка – морфологическая картина в области васкуляризации, увеличение x100, окраска гематоксин-эозин; 2 строка – морфологическая картина в области васкуляризации, увеличение x200, окраска гематоксин-эозин; 4 строка – морфологическая картина роговицы в зоне ожога, увеличение x400, окраска гематоксин-эозин.

На световом уровне при гистологическом исследовании в паралимбальной зоне опытного глаза кролика, при субконъюнктивальном введении PEDF, обнаруживалась слабая инфильтрация полиморфно-ядерными лейкоцитами субэпителиальных слоев стромы роговицы. Инфильтрация распространялась на 1/10 толщины склеры. Вростание кровеносных сосудов, распространялось на 2 мм от лимба. Сосуды располагались только в поверхностном и среднем слоях роговицы. Отек стромы в перилимбальной зоне практически отсутствовал. В области химического ожога отмечали выраженное рубцевание, занимающее 1/2 толщины роговицы, а также, - выраженную инфильтрацию полиморфно-ядерными лейкоцитами, отек стромы и слущивание переднего эпителия роговицы.

При гистологическом исследовании в паралимбальной зоне опытного глаза кролика, при субконъюнктивальном введении тумстатина, обнаруживалась умеренная инфильтрация полиморфно-ядерными лейкоцитами субэпителиальных слоев стромы роговицы. Инфильтрация распространялась на 1/3 толщины склеры. Кровеносные сосуды врастали в роговицу на 3,5мм от лимба. Сосуды располагались в верхних слоях роговицы. Отек стромы перилимбально практически отсутствовал. В области химического ожога отмечали слабое рубцевание на 1/3 толщины роговицы, а так же слабую инфильтрацию полиморфно-ядерными лейкоцитами, отек стромы и слущивание переднего эпителия роговицы.

При гистологическом исследовании контрольного глаза с моделью щелочного ожога безо всякого лечения в паралимбальной зоне обнаруживалась слабая инфильтрация полиморфно-ядерными лейкоцитами в виде единичных перисосудистых скоплений. Кровеносные сосуды врастали с лимбального сосудистого сплетения и распространялись в сторону оптического центра на 5мм от лимба (Табл.19. Сосуды располагались только в поверхностном слое роговицы. Отек стромы в перилимбальной зоне практически

Таблица 19- Количественная морфометрическая и колориметрическая оценка биологических эффектов антиангиогенных пептидов при создании модели щелочного ожога роговицы

Препарат	Колориметрическая оценка		Морфометрическая оценка
	Количество пикселей (Мср. $\pm m$)	Индекс васкуляризации (Мср. $\pm m$)	Количество сосудов на срезе, шт, (Мср. $\pm m$)
PEDF	1975464 $\pm$ 20040	0,01 $\pm$ 0,004	12 $\pm$ 3
Тумстатин	2664409 $\pm$ 61933	0,02 $\pm$ 0,005	25 $\pm$ 6
Контроль	1987486 $\pm$ 17311	0,08 $\pm$ 0,020	89 $\pm$ 11

отсутствовал. В области химического ожога отмечалось умеренное рубцевание, занимающее 1/3 толщины роговицы, а так же умеренная инфильтрация полиморфно-ядерными лейкоцитами, отек стромы и гиперплазия и слущивание переднего эпителия.

Резюме

Проведенные экспериментальные и морфологические исследования подтверждали эффективность применения тестируемых природных ингибиторов ангиогенеза на ранних стадиях неоваскуляризации при одновременном введении их с индукторами ангиогенеза. Вместе с тем, утверждать, что они будут эффективны и на поздних стадиях этого процесса не было оснований. Их пригодность в качестве аваскулогенных пептидов на поздних стадиях ангиогенеза должна быть проверена.

Оценка возможности регуляции поздних стадий ангиогенеза с помощью рекомбинантных пептидов эндостатина, тумстатина и PEDF

Возможность подавлять поздние стадии ангиогенеза оценивали на модели щелочного ожога роговицы, при этом введение ангиостатических пептидов в опытных глазах начинали с 7-го дня эксперимента, когда вросшие в роговицу сосуды образовывали "венчик", в котором дифференцировались полноценные почти «зрелые» сосуды с кровотоком.

Мониторинг опытных глаз, леченных рекомбинантными ингибиторами ангиогенеза показал, что аваскулогенный эффект присутствует у одного тумстатина в 10-кратной терапевтической дозе. Клинически значимый, визуально регистрируемый эффект имел место на глазах кроликов уже после 5 инъекций тумстатина (Табл. 20).

Таблица 20- Результаты клинической оценки антиангиогенной активности ингибиторов ангиогенеза.

Анализируемый глаз	Васкуляризация (в баллах)	Антиангиогенная активность (в баллах)	
		Расчетная доза	Расчетная доза x 10
Контроль	5	-	-
PEDF (опыт)	4	2	2
Тумстатин (опыт)	1	2	5
Эндостатин (опыт)	2	2	3

Он проявлялся в виде снижения плотности новообразованных сосудов в паралимбальной зоне роговицы, регрессии концевой части наиболее разветвленного отдела новообразованных

сосудов, а также сокращении диаметра «зрелых» сосудов с циркулирующим кровотоком (Рис.27-35).

Эндостатин оказывал умеренный эффект исключительно на ранних стадиях прерывания ангиогенеза в 10-кратной дозе. Это проявлялось незначительным снижением плотности сосудистой лимбальной сети. По мере того, как сосудистая сеть заканчивала свое формирование, активность пептида нивелировалась.

PEDF, даже при использовании его в дозе, 10-кратно превышающей рекомендуемую дозу, в указанный временной интервал ангиогенеза, оказывал слабую аваскулогенную активность. Сосудистая сеть в области лимба практически сохраняла свою исходную плотность на единицу площади, диаметр сосудов изменялся незначительно, а кровоток в них сохранялся. Элементы ремоделирования (запустевание и/или разрушение) сосудистой сети проявлялись незначительно.



Рис. 27. Фотография глаза до лечения. 8-е сутки после ожоговой травмы.

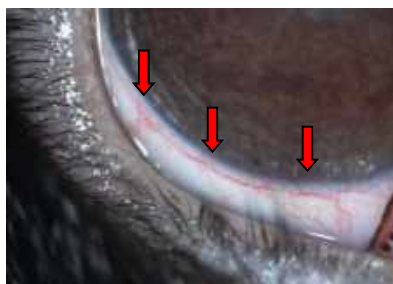


Рис. 28. Фотография глаза после 5 инъекций тумстатина (опыт, x 10 кратная доза).



Рис. 29. Фотография глаза после 10 инъекций тумстатина (опыт, x10 кратная доза).



Рис. 30. Фотография глаза до лечения (опыт).

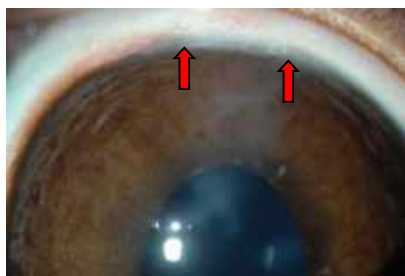


Рис. 31. Фотография глаза после 5 инъекций PEDF (опыт, 10-кратная доза).

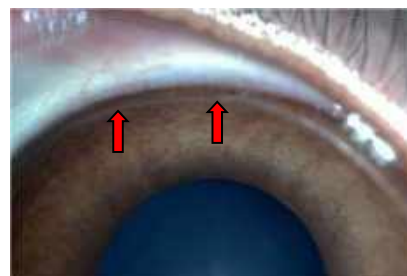


Рис. 32. Фотография глаза после 10 инъекций PEDF (опыт, 10-кратная доза).



Рис. 33. Фотография глаза до лечения.

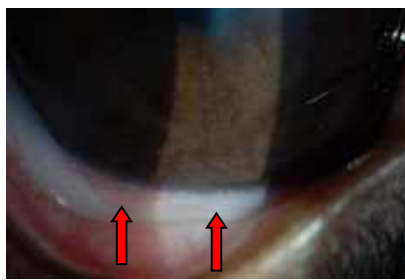


Рис. 34. Фотография глаза после 5 инъекций эндостатина (опыт, 10-кратная доза).



Рис. 35. Фотография глаза после 10 инъекций эндостатина (опыт, 10-кратная доза).

4.3 Изучение механизма действия рекомбинантных ангиостатиков с помощью электронной микроскопии.

Известно, что сосудистое сплетение паралимбальной сети представлено капиллярами и прекапиллярами. Они представляют собой полые трубки, выстланные изнутри эндотелиальными клетками, вместе с подлежащим слоем ткани (субэндотелием) образующими внутреннюю оболочку. Средняя, или мышечная, оболочка артерий отделена от внутренней очень тонкой внутренней эластичной мембраной. Снаружи сосуды окружены перицитами.

Было установлено, что ультраструктура нормального сосуда в паралимбальной зоне максимальной васкуляризации в контрольном глазу после химического ожога роговицы к 30 дню эксперимента имеет полностью сформированную структуру.

Стенка полноценного сосуда содержит все указанные структуры, включая внутреннюю оболочку, с распластанными на ней эндотелиальными клетками (красная стрелка на Рис. 36.). Снаружи они окружены перицитами (желтая стрелка на Рис. 37.).

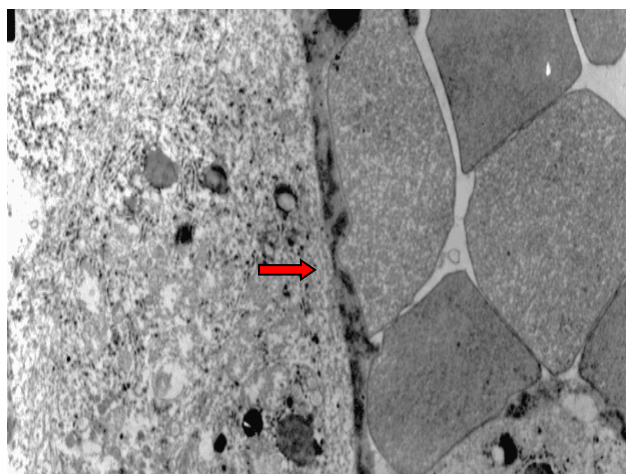
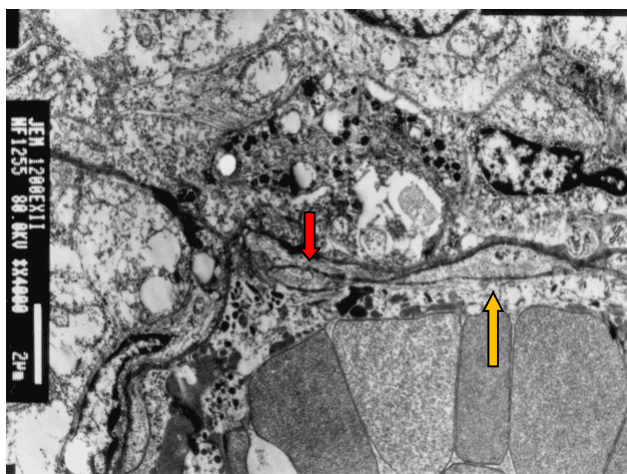


Рис. 36. Ультраструктура нормального сосуда в контрольном глазу после химического ожога роговицы. Линейка-маркер с масштабом в 1 мкм в наружном углу.

Ультраструктурные исследования сосуда в зоне интереса в экспериментальном глазу после воздействия тумстатином демонстрируют отсутствие эндотелия и истончение сосудистой стенки.

Резюме

Экспериментально доказана на 2-х моделях переднего ангиогенеза возможность регуляции ранних и поздних стадий ангиогенеза с помощью природных ингибиторов – молекул эндостатина, тумстатина и PEDF в терапии заболеваний глаз, протекающих с неоваскуляризацией. Проведен анализ сравнительной эффективности использования рекомбинантных пептидов **эндостатина, тумстатина и PEDF** на ранних и поздних этапах ангиогенеза в эксперименте. На ранних стадиях ангиогенеза наиболее мощным клиническим антиангиогенным эффектом обладал PEDF, на поздних – тумстатин.

4.4 Изучение эффективности пептидов в подавлении неоваскуляризации хориоретинальной неоваскуляризации

Модель № 3. Под воздействием имплантированного в супрахориоидею Матригеля с VEGF165, активизировалась пролиферация эндотелиальных клеток хориокапилляров, последние дилатировались и появлялись аномально дилатированные хориоидальные сосуды, зрительно напоминающие полипоидальные.

Офтальмоскопически на глазном дне просматривались сосудистые выпячивания, которые ограничивались субретинальной локализацией, вероятнее всего, из-за барьерной роли интактной мембраны Бруха и сохранного ретинального эпителия, однако, в рамках ограниченного пространства сосуды хориоидеи приобретали аномальные крупные размеры и мешотчатую конфигурацию. Через 7 дней после введения Матригеля с 500 нг/мл VEGF165 на глазном дне в месте, соответствующем зоне введения со стороны склеры комплекса Матригеля, просматривались слабо проминирующие в стекловидное тело участки **«ретино-хориоидальных сосудоподобных»** стволов явно аномальных размеров. По их ходу были отчетливо видны паравазальные гиперпигментированные линии «сопровождения». Для верификации на 7 день проводили флюоресцентную ангиографию (FA) и регистрацию аутофлюоресценции (AF) (рис 58 а,б,с,д).

Рис. 37. Ультраструктура сосуда после воздействия тумстатином. Эндотелий отсутствует. Мембрана сосудистой стенки истончена. Увеличение x 2000.

Персистенция и увеличение численности «сосудистых стволов» в течение двух-трех недель после имплантации VEGF165, их связь с сосудистой оболочкой глаза и характер гемоциркуляции в них позволяли считать, что природа этих аномальных структур носит сосудисто-пролиферативный характер.

Полагаем, что под воздействием имплантированного в супрахориоидею Матригеля с VEGF165, активизируется пролиферация эндотелиальных клеток хориокапилляров и более крупных хориоидальных стволов. Вследствие этого начинают формироваться сосудистые мальформации – аневризматические выпячивания, которые на начальном этапе эксперимента ограничиваются субпигментной локализацией, вероятнее всего, из-за барьерной роли интактной мембраны Бруха. Однако в рамках ограниченного пространства эти структуры приобретают контуры аномально крупных для этой зоны сосудистых стволов. Клинически эти сосуды напоминают полипоидальную форму васкулопатии или так называемую ПХВ. Ангиографически на фоне введения флуоресцеина натрия эти «сосудистые стволы», интенсивно окруженные гиперпигментацией, демонстрируют трудноразличимую, но нормальную внутрисосудистую флюоресценцию (рис.38е).



Рисунок 38а. Глазное дно кролика сразу после введения Матригеля в субхориоидальное пространство. Визуализируется слабо проминирующий очаг

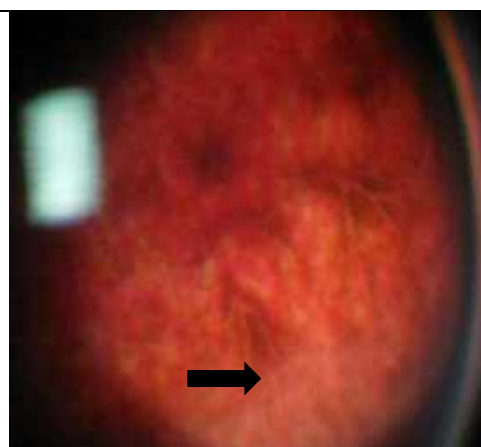
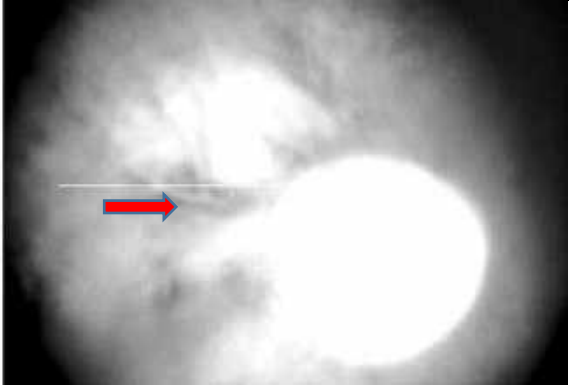
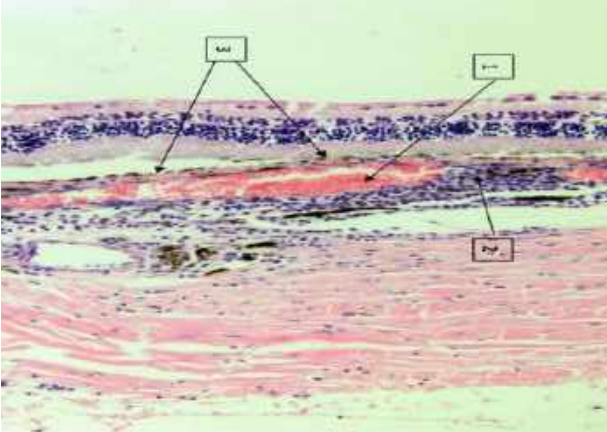


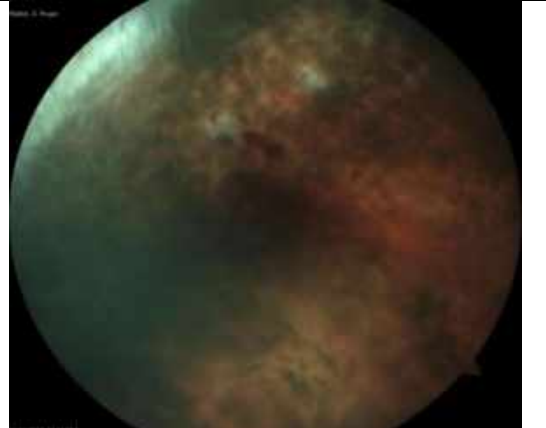
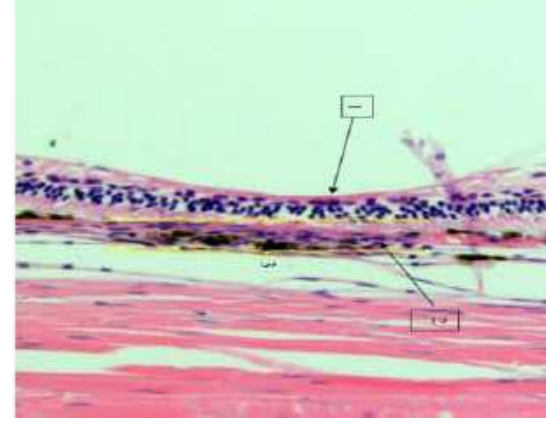
Рисунок 38б. Глазное дно кролика с аномально крупными сосудами хориоидеи через 7 дней после введения Матригеля

	
Рис. 38с. <i>En face</i> ИК-изображение сетчатки. Оптический срез проходит через бифуркацию anomального сосуда	Рис. 38д ОКТ скан проходит в 2-х местах через бифуркацию anomально расширенного «сосудистого ствола», в месте обозначенном на <i>en face</i> ИК-изображении сетчатки.
	
Рис. 38е: Флюоресцеиновая ангиограмма сетчатки	Рис. 38д: 1 - anomальный расширенный, сосуд хориокапиллярного слоя хориоидеи, по типу полипоидального, заполнен эритроцитами (1); 2 - клеточный пролиферат смешанного состава паравазально (2); 3 - слой пигментного эпителия и мембрана Бруха (3); над ними щелевидная экссудативная отслойка нейросенсорной сетчатки. Ув. х 200, окраска гематоксилином и эозином

Модель № 4

Первые этапы формирования модели № 4 выполняли также, как и на модели №3. После чего выполняли деструкцию мембраны Бруха лазерным воздействием (см Главу 2). На глазном дне в течение первых трёх дней в месте коагуляции сохранялся фокальный отёк сетчатки, по краям коагулятов местами возникали точечные петехиальные кровоизлияния. В следующие 2 недели развивалась неоваскуляризация, впоследствии переходящая в

хориоретинальный рубец с отложением в нем пигмента. У некоторых животных (9 глаз) на месте коагулятов, начиная с 6 суток после лазеркоагуляции, образовывалась локальная отслойка РПЭ с последующим формированием фиброваскулярного комплекса. К 21 дню формировалась скрытая СНМ, которую также верифицировали с помощью ангиографии и гистологии. (рис. 39 а, б, с, д, е, ж).

	
Рис. 39а. Глазное дно на этапе нанесения коагулятов различной интенсивности	Рис. 39б. Глазное дно на 7 сутки после нанесения коагулятов. Визуализируется кровоизлияние на самом краю коагулята и веточки новообразованных сосудов
	
Рис. 39 с: ФАГ картина образования хориоидальной неоваскуляризации: диффузная гиперфлюоресценция в месте образования неоваскуляризации, флюоресценция в месте образования хориоретинального рубца	Рис. 39д Срез на месте коагулята сетчатки; 1 - коагулят проходит в пределах слоя нервных волокон и ганглиозных клеток. 2 – просматривается клеточный пролиферат в прилежащей хориоиде. 3 – участок дефекта в мембране Бруха с дефектом в слое ретинального пигментного эпителия

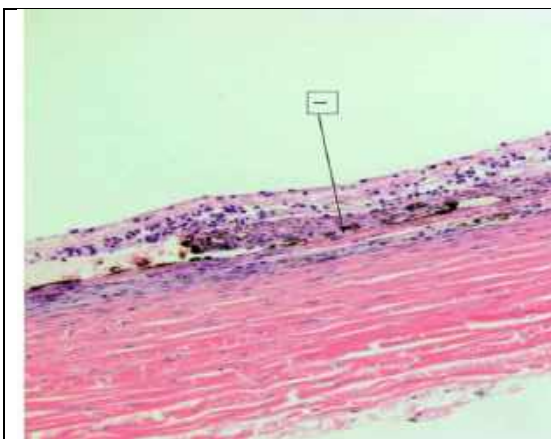


Рис. 39е: 1- гистологический срез проходит через фиброваскулярный субретинальный комплекс (1).

Увеличение x200, окраска гематоксилином и эозином

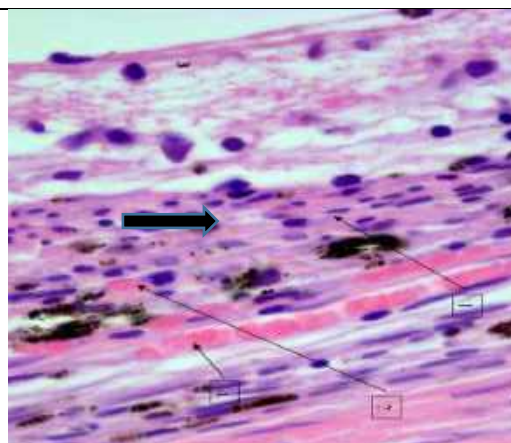


Рис. 39ж: 1- срез через фиброваскулярную субретинальную мембрану (1). 2 - под ней виден капилляр с эритроцитами (2), 3 - сетчатка над СНМ истончена (3).

Просматриваются собственные сосуды хориоидеи (4). Ув. x 100, окраска гематоксилин- эозином

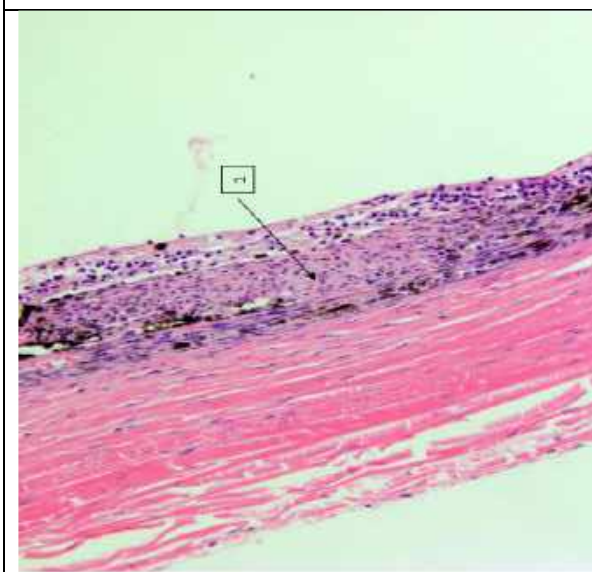


Рисунок 39з – Фиброваскулярная субретинальная мембрана. Второй участок. Увеличение x200, окраска гематоксилином и эозином

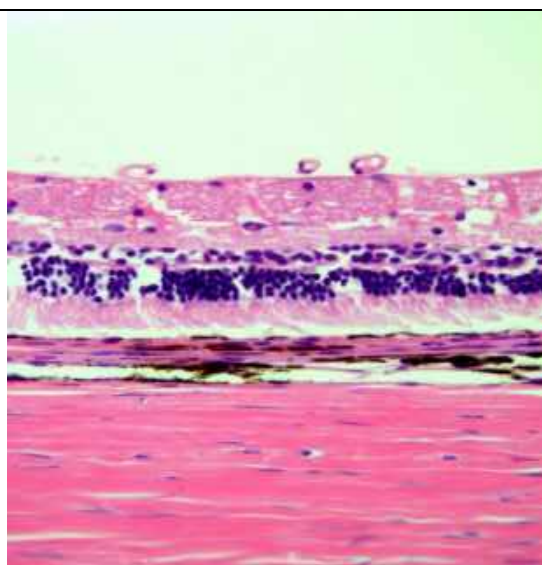
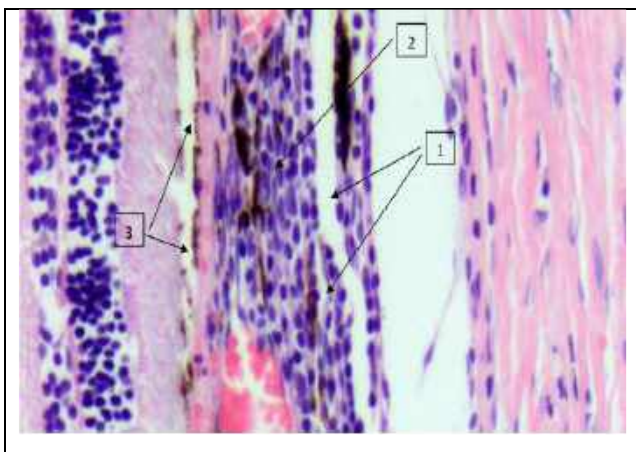
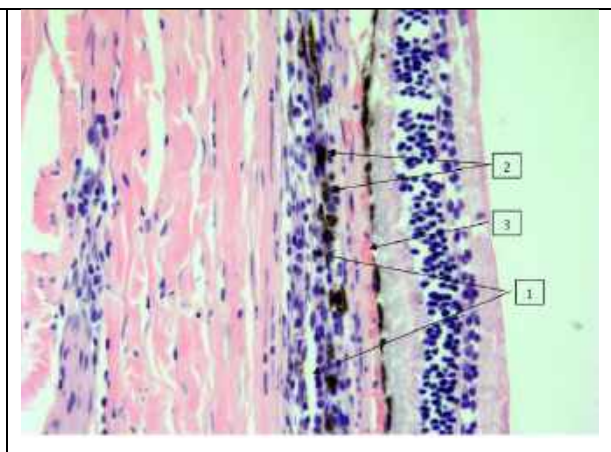


Рисунок 40. Гистологический срез контрольного здорового глаза кролика

	
Рис. 39 и – Капилляроподобные структуры с клеточной выстилкой. 2 – Скопление клеток (клеточный пролиферат). 3 – Пигментный эпителий с мембраной Бруха Ув. х200, окраска гематоксилином эозином	Рис. 39к. Капилляроподобные структуры с клеточной выстилкой. 2 – Меланофоры в составе клеточного пролиферата. 3 – Собственные сосуды хориоидеи, содержащие эритроциты. Ув. х400, окраска гематоксилином и эозином

Представленные результаты подтверждают эффективность воспроизведения обеих моделей неоваскуляризации на глазном дне лабораторных животных -кроликов.

Установлено, что формирование новообразованных сосудов во всех использованных моделях неоваскуляризации **происходило в сроки от 7 до 20 дней**. С учетом этих сроков в последующем тестировали фармакологическую активность пептидов антиангиогенного назначения.

Была проведена серия экспериментов по оценке эффективности и спектра биологических эффектов антиангиогенных субстанций на индуцированную хориоидальную неоваскуляризацию в глазах экспериментальных животных.

Сравнительную оценку «терапевтического» действия PEDF и тумстатина проводили при различных дозировках, на разных сроках введения и суммарной дозе введенного вещества.

В этой **серии** экспериментов (10 кроликов/10 глаз) патологическая ретинохориоидальная неоваскуляризация была смоделирована на правых глазах.

В течение 4 недель еженедельно вводили интравитреально десяти животным PEDF, а другим десяти животным (4) тумстатин. Дозировка ингибиторов была следующей: 5 кроликов (5 глаз) получили по 1 мкг PEDF, 5 животных - (5 глаз) - по 4 мкг PEDF; кроликов (5 глаз) получили по 2 мкг тумстатина, 5 животных - (5 глаз) получили по 4 мкг в инъекции. Состояние

испытуемых глаз исследовали каждые 2 недели методами цветной фоторегистрации глазного дна и ОКТ, каждые 4 недели методом ФАГ сетчатки.

В пяти контрольных глазах (OS), не получавших инъекций до конца опыта, к окончанию 4 недели наблюдений были зафиксированы несомненные признаки хориоидальной неоваскуляризации (ХНВ) в зоне воздействия. Флюоресцеиновая ангиографии (ФАГ) сетчатки продемонстрировала единичные комплексы патологической ХНВ во всех 5 глазах (Рис.41). Размеры (площадь) этих очагов были оценены на ФАГ и ОКТ-морфометрически, а также с помощью гистологических исследований.

В 1 группе опытных животных с использованием PEDF в одном (1) глазу в середине опыта развился умеренно выраженный витреит с клеточно-экссудативным выпотом, что не позволило завершить курс лечения. В остальных (9) глазах с неосложненным состоянием к моменту обследования глазного дна: 4 кролика получили по четыре инъекции PEDF в дозе 1 мкг и 5 кроликов (5 глаз) получили по четыре инъекции PEDF в дозе 4 мкг. На глазах опытных кроликов 1 группы, получивших еженедельные инъекции PEDF по 1мкг (3 глаза) и по 4 мкг (5 глаз) ни на цветных фотографиях, ни на ФА исследовании не было обнаружено признаков ХНВ. В одном из трех глаз, несмотря на еженедельные инъекции PEDF в дозе 1 мкг в очаге VEGF-лазерного воздействия сформировался очаг патологической неоваскуляризации.

Во 2 группе опытных животных на фоне введения тумстатина также у одного кролика в глазу возникла отслойка сетчатки, а у другого кролика в середине курса развился активный витреит, что не позволило завершить эксперимент. Т.о., из 8 глаз, завершивших эксперимент, 4 кролика получили по 4 инъекции тумстатина (4 глаза) в дозе 4 мкг и 4 кролика по 4 инъекции в дозе 2 мкг. На остальных 8 глазах, получивших 4 еженедельных инъекции PEDF (х по 2 мкг и х по 4 мкг) «клинических» (неоваскуляризация на ФА, субретиальная экссудация на ОКТ) признаков ХНВ обнаружено не было (Рис.42).



Рис.41. Флюоресцеиновая ангиография активной ХНВ (контроль)

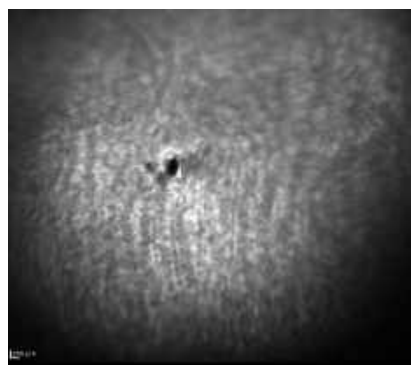


Рис 42. Флюоресцеиновая ангиография зоны регресса ХНВ (опыт)

4.5 Морфологическое исследование глаз экспериментальных животных, получивших эндовитреальные инъекции PEDF и тумстатин

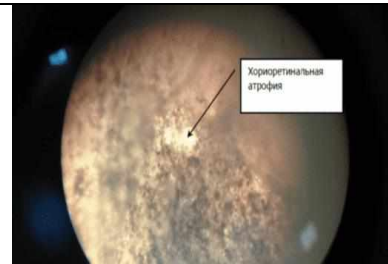
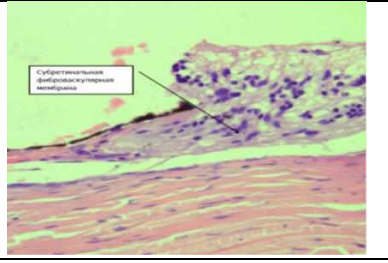
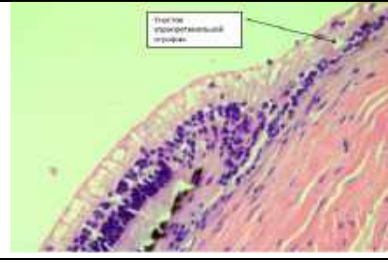
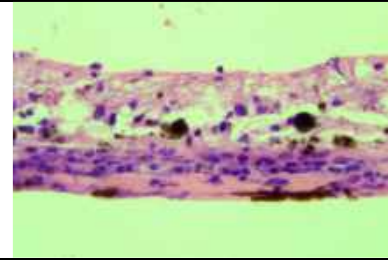
Для гистологического исследования получены 5 глаз нелеченых кроликов группы контроля (контроль), 10 глаз кроликов, пролеченных PEDF, и 10 глаз, пролеченных тумстатин.

В трех опытных глазах (1 глаз из 1 группы 1 и 2 глаза из 2 группы) обнаружены признаки вялотекущего эндофтальмита, в связи с чем, результаты лечения на них не оценивали.

На макропрепаратах 5 глаз нелеченых кроликов (контроль) (5 из 5, 100%) были обнаружены серовато-белые субретинальные проминирующие образования округлой или овальной формы, с зоной перифокального воспаления и ХНВ (Рис.43)

В 9 глазах, получавших эндовитреальные инъекции 1 и 4 мг PEDF с первой недели после создания модели макроскопически, просматривались белесоватые плоские атрофические участки, окруженные ободком гиперпигментации (Рис.44-45)

В 8 глазах, получавших эндовитреальные инъекции тумстатина (1 мкг и 4 мкг) были также обнаружены характерные серовато-белые, несколько проминирующие участки (1 глаз), или зоны обширной атрофии, окруженные ободком гиперпигментации (5 глаз) (Рис.46-48)

		
Рис.43. Субретинальная ХНВ. Макропрепарат. Увеличение x40	Рис.44. Участок хориоретинальной атрофии на глазу, леченом PEDF. Макропрепарат. Увеличение X40.	Рис.45. Участок хориоретинальной атрофии, на глазу с ХНВ, леченом тумстатином. Макропрепарат. Увеличение X40.
		
Рис46. На фото показан участок на котором граничат сохранная хориоидея (слева) и фиброваскулярная мембрана (справа). Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение x400	Рис47. Участок перехода сохранных внутренних оболочек в участок хориоретинальной атрофии. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение x400	Рис. 48. Участок атрофии сетчатки на месте регрессии ХНВ после лечения тумстатином. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение x400

На световом уровне гистологически в 5 контрольных глазах, на участках субретинального введения VEGF165 с Матригелем были обнаружены фиброваскулярные мембраны. Мембраны локализовались в областях со сквозным дефектом пигментного эпителия и мембраны Бруха. Клеточный состав фиброваскулярного комплекса включал: большое количество фибробласто-подобных клеток, различной степени дифференцировки с овальными крупными ядрами светло-фиолетовой окраски с отчетливо различным эозинофильным ядрышком; множественные глиальные элементы, с круглым небольшим интенсивно окрашенным ядром; дистрофически измененные пигментные клетки; единичные гранулоцитарные лейкоциты. В толще фиброваскулярного комплекса обнаружено различное количество капилляроподобных структур. Зачастую фиброваскулярные мембраны были окружены участками атрофии сетчатки и хориоидеи.(Рис.48). При микроскопическом исследовании опытных глаз 1 группы и глаз 2 группы без признаков субретинальной фиброваскулярной мембраны обнаружена зона атрофии сетчатки и хориоидеи (Рис.48.)

Субретинальные фиброваскулярные мембраны, обнаруженные в одном из 5-ти глаз 1 группы и в 1 глазу 2 группы имели сходное строение с выше описанными мембранами, выявленными в контрольных глазах кроликов. Вместе с тем, выявлены некоторые отличия, так мембраны контрольных глаз: имели большую площадь, толщину и имели большее количество и диаметр новообразованных сосудов (см. Таблицу 21).

Таблица 21-Количественная оценка эффективности PEDF и тумстатина по результатам гистологических морфометрических показателей

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

Эффективность PEDF и тумстатина была дополнительно оценена количественно. Для этого были использованы морфометрические гистологические экспертные критерии (см таблицу)

Резюме

Таким образом, в экспериментальном фрагменте нашей работы мы использовали 4 модели неоваскуляризации (2 лимбо-роговичной и 2 хориоретинальной локализации), которые адаптировали к поставленным задачам и цели.

В ходе эксперимента мы разработали и применили принципиально различающиеся количественных способа оценки эффективности антиангиогенных пептидов:

- метод колориметрической (прижизненной) оценки площади ХНВ и её клинических проявлений;
- ангиографический метод (ФАГ) (оценка площади ретинальной экссудации)
- морфометрический метод на патогистологических препаратах.

Точность этих методов далека от совершенства, но при сравнительной оценке *in situ* совокупность этих методов позволяет измерить площадь и толщину ХНВ, верифицировать как прогрессию, так и регрессию ХНВ. Полученные нами в эксперименте результаты указывают на выраженное антиангиогенное действие фрагмента (44-77) PEDF и в меньшей степени, фрагмента (69-95) тумстатина (Tum) человека. Рекомбинантный фрагмент (44-77) PEDF в дозе 1 и 4 мкг оказывает ингибирующее действие на развитие субретинальных патологических сосудов в кроличьих глазах с моделированной неоваскуляризацией и по своим антиангиогенным свойствам превосходит фрагмент (69-95) тумстатина (Tum) человека. Более эффективна доза 4 мкг PEDF. Рекомбинантный фрагмент (44-77) PEDF не только тормозит неоваскуляризацию, но и вызывает регрессию новообразованных сосудов.

ГЛАВА ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Любая инновационная технология в своем продвижении проходит несколько этапов. Вслед за недоверием приходит восторг, его сменяет системный метаанализ результатов и осмысление причин неудач (*posthoc analysis*).с последующим планированием дальнейшего пути развития. Антиангиогенная терапия не стала исключением из правил, скорее, ее закономерностью. Первоначальная концепция этой таргентной технологии строилась на признании факта, что молекула VEGF — самый мощный ключевой медиатор, запускающий и поддерживающий патологический ангиогенез МНВ путем рецептор-лигандного взаимодействия. Блокирование VEGF должно прервать стимулы к росту новых сосудов и привести к запустеванию новообразованных сосудов. Для прерывания сигнального каскада VEGF фармакоиндустрия предложила 2 основных подхода: блокаду лиганда (АТ к VEGF, растворимыми рецепторами или растворимыми олигонуклеотидами) и блокаду тирозинкиназных рецепторов (АТ к рецепторам), расположенных на мембране эндотелиальной клетки. Наш арсенал анти-VEGF-препаратов быстро пополняется. Сегодня у нас не возникает вопросов: Лечить или не лечить? Как лечить (режимы T&E / *pro re nata*)? Как долго лечить? Интравитреальные инъекции антиангиостатиков сегодня признаны «золотым» стандартом лечения МНВ [12, 43, 166, 167]. Благодаря этой технологии частота слепоты при нВМД снизилась на 46% в США, на 50% в Дании и Израиле. Анти-VEGF препараты признаны первой линией терапии нВМД [42, 166,167, 201]. Однако необходимость жесткого соблюдения режима лечения, многократность введения дорогостоящих препаратов и частые визиты к офтальмологу ложатся непреодолимым финансовым и физическим бременем для пожилых пациентов. В опросе, проведенном в 2018 году в США, 73,2% ретинологов указали на необходимость снижения нагрузки на лечение, а 56,3% указали на потребность в пролонгированном препарате, обеспечивающем стойкий и длительный эффект в терапии МНВ [61]. Наряду с этим, выявлена когорта пациентов, не отвечающих на ИВИ, так называемых- нереспондентов. Системный (post hoc) мета-анализ ретроспективных исследований, проведенных в различных регионах мира среди пациентов различной расовой принадлежности, вскрыл истинную распространенность первичной резистентности (18-22,2%), тахифилаксии (8,9%-12,7%) и толерантности (2-10%) к анти-VEGF-препаратам. Вполне очевидно, что лечение анти-VEGF-технологиями таких нереспондентов приводит к неоправданной потере времени и финансовых затрат, уменьшает их шансы на сохранение зрительных функций. При этом, в современных международных и Федеральных российских рекомендациях отсутствует

алгоритм дифференцированного разделения респондентов от нереспондентов на этапе первичной диагностики и выбора персонализированного алгоритма лечения.

А между тем, наши представления о молекулярных маркерах патогенеза МНВ расширились. Стратегия лечения МНВ первоначально основывалась на признании VEGF единственной ключевой молекулой в запуске ангиогенеза. В реалиях его молекулярный сценарий намного сложнее. Стимулировать ангиогенез могут многие: bFGF, PDGF, ангиопоэтин -1 и -2 (ang-1, ang-2), а также еще около трех десятков факторов роста. Более того, намечается уход от ингибирования одной молекулы VEGF. Установлено, что триггером к запуску ангиогенеза служит скорее дисбаланс про- и антиангиогенных факторов, чем избыток продукции VEGF. Показано, чем больше этот дисбаланс выражен, тем больше реализуется ошибок в «конструкции» новообразованных сосудов: неправильная пространственная ангиоархитектоника дополняется неполноценной структурой сосудистой стенки, отсутствием эндотелиальной выстилки, облегчая доставку питательных веществ ишемизированным тканям. Доказано, что чем дольше длится неангиогенез, тем больше появляется молекулярных «игроков». В построении таких сосудов принимают участие белки экстраклеточного матрикса и матриксные металлопротеиназы. Блокируя молекулу VEGF или рецепторы VEGF анти-VEGF-препаратами, мы воздействуем всего лишь на одно звено патогенного механизма, не влияя на восстановление молекулярного баланса. Более того, блокировка молекулы VEGF способна привести к развитию обходных молекулярных шунтов неоангиогенеза, например, через молекулу bFGF, на которую анти-VEGF технологии не действуют. Контроль ангиогенеза предполагает реализацию комплекса механизмов, участвующих в образовании сосудов. Рычаги воздействия на разных этапах ангиогенеза могут быть различными: от подавления пролиферации и миграции ЭК, формирования капилляроподобных структур (на ранних этапах) до резорбции новообразованных сосудов с аномальной стенкой (поздние стадии). Последние публикации, свидетельствуют о важной роли воспаления в патогенезе МНВ. Признание этого факта требует расширения арсенала терапевтических стратегий МНВ [30, 65, 75, 79, 159, 210].

В этом аспекте, особую актуальность приобретает проблема раннего распознавания рефрактерных к анти-VEGF-терапии форм МНВ со своевременным переводом на более перспективный препарат или комбинированное лечение с целью сохранения зрения. Это диктует комплексный подход с всесторонним **изучением** фенотипа больных с МНВ, не отвечающих на ИВИ ангиостатических препаратов 1 линии терапии (1) и **поиском и разработкой альтернативных лечебных технологий** (2), направленных на прерывание патологического неоангиогенеза.

В связи с чем, мы построили нашу работу следующим образом.

На первом этапе мы провели собственное проспективное исследование, в котором изучали истинную распространенность нереспондентов среди 84 больных МНВ, получавших согласно Федеральным рекомендациям ИВИ Афлиберцепта 40 мг \мл в режиме «treat and extend» («Эйлеа», Bayer, Германия). В обязательном порядке выполняли 3 загрузочных инъекции. Целью этого исследования стало изучение клинической характеристики и ОКТ-фенотипа глаз с плохой респонденцией на лечение. Был использован дифференцированный подход с разделением плохих респондентов на **5 подгрупп** в зависимости от градации их ответа на лечение и проанализированы клинические, морфоструктурные и морфометрические характеристики глаз в этих подгруппах [31]. Выделены подгруппы: **истинные нереспонденты**, не снижающие активность заболевания на протяжении всего загрузочного курса (1), **частичные нереспонденты**, частично нивелирующие (менее 15%) активность в процессе лечения (2); **зависимые от анти-VEGF-препарата** глаза, показавшие регрессию заболевания на фоне регулярных инъекций, но отвечающие рецидивом активности на удлинение интервала между ИВИ более 4х недель (3); **ухудшение с прогрессированием в виде усиления экссудации или свежих кровоизлияний**, несмотря на лечение (4); **снижение ответа на лечение с течением времени (феномен тахифилаксии)** (5).

Наши исследования показали, что идеальными респондентами на введение Афлиберцепта проявляют себя только небольшая доля глаз (!!) (27,2%, 19/92 глаз). Семь глаз (7,6%) с МНВ отвечают на ИВИ как **истинные нереспонденты**, 25 (27,2%) глаз - как **частичные нереспонденты**, 23 (25,0%) зависят от ИВИ анти-VEGF препарата, 7 (7,6%) глаз демонстрируют **ухудшение**, несмотря на лечение, а на 11 (12,0%) глазах ответ на Афлиберцепт быстро снижается (**феномен тахифилаксии**).

Глаза нереспондентов отличаются от глаз респондентов более высокими ср.-групповыми показателями глазного перфузионного и внутриглазного давления, что позволяет думать о более выраженных нарушениях ауторегуляции кровотока.

При этом каждая из выделенных подгрупп имеет свои особенности фенотипа.

Так, **истинные нереспонденты** моложе респондентов почти на 10 лет ($68,8 \pm 2,2$ против $77,4 \pm 1,6$ лет; $p < 0,05$); 42,9 % среди них заядлые курильщики (против 0% у респондентов, $p < 0,001$), выкуривающие более 20 сигарет в сутки, каждый шестой страдает гипотиреозом (14,3%, $p < 0,1$). Факты свидетельствуют о **наличии модифицируемого фактора риска (курение) плохого ответа на лечение**.

По данным ОКТ на глазах истинных нереспондентов достоверно толще сетчатка **CTR** ($412,5 \pm 60,0$ против $339,9 \pm 23,3$ мкм у респондентов, $p < 0,05$) и выше **PED** ($239,2 \pm 49,8$

против $143,2 \pm 16,0$ мкм, $p < 0,05$), доминирует фиброзно-васкулярная PED (71,4%), чаще встречался паттерн SRF-/IRF- (42,8%, 3/7 глаз), что в совокупности позволяло думать о большей продолжительности заболевания или о поздней диагностике МНВ (поздняя фаза ангиогенеза).

Частичные нереспонденты не отличались по возрасту, каждый третий (36%) страдал ожирением, а каждый шестой - гипотиреозом и сахарным диабетом. В 15% случаев их диастолические показатели АД превышали 90+мм рт ст.

Их ОКТ-параметры **CTR** и частота выявления толстой сетчатки в центре (**32%**) была сопоставимой с показателями глаз респондентов, хотя коридор вариабельности был шире. В ОКТ-фенотипе преобладали глаза с высокой PED ($200,8 \pm 27,3$ против $143,2 \pm 16,0$ у респондентов, $p = 0,07$); в 38,6% выявляли SRF ($p = 0,09$), в 26,9% - IRF (н/д), в 19,2% присутствовала жидкость 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, $p < 0,05$), доминировал 1 тип МНВ (91,3%), в 73,9% их CTR была толще (по сравнению с респондентами $p = 0,08$), 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, превалировали лица с ожирением (72% против 42,1% среди респондентов, $p < 0,05$), 15% из них страдали гипотиреозом ($p = 0,08$) и 28,7% - сахарным диабетом ($p = 0,007$). По количеству курильщиков и числу выкуриваемых сигарет в сутки (5 шт/сутки) группа занимала второе место

Их сетчатка **CTR** в центре 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 их паттерн ОКТ был SRF-/IRF+, в 28,6% - SRF+/IRF- и в 14,3% - SRF+/IRF+. Присутствовали 2 и 3 тип МНВ (42,9% против 10,9% в группе респондентов, $p < 0,001$).

В ОКТ-характеристике 45,5% глаз **с тахифилаксией**, напротив, толщина сетчатки в центре не отличалась от нормы, доминировали (81,8%) паттерн SRF-/IRF- ($k = 0,6834$, $p = 0,001$), фиброваскулярная PED (90,9%) и 1 тип МНВ (90,9%).

В связи с чем, маркер SRF-/IRF- был проанализирован в качестве фактора риска развития тахифилаксии. Вычислены отношение рисков и 95% ДИ, а также специфичность и чувствительность маркера : 68,5% и 81,8%.

Аналогичная ассоциативная связь ($k = 0,5936$, $p = 0,001$) выявлена между паттерном SRF+/IRF- и зависимостью от анти-VEGF-препаратов. Чувствительность этого маркера составили: 47,8%; специфичность – 90%:

Таким образом, благодаря проведенному исследованию были выделены и описаны специфические ОКТ паттерны глаз с тахифилаксией и глаз, зависящих от ИВИ анти-VEGF-

препаратов, что в совокупности составили 35,9%. Это позволяло разработать алгоритм отбора пациентов на этапе входа в загрузочную фазу лечебной технологии, исключить их из анти-VEGF-терапии и назначить им альтернативные методы лечения.

Мы также попытались понять, что происходит с молекулярными участниками ангиогенеза на фоне ИВИ анти-VEGF-препаратов. Этому был посвящен 2 фрагмент нашей работы.

Второй этап работы носил статичный характер и был посвящен изучению концентрации про- и антиангиогенных факторов роста в СТЖ глаз с МНВ на фоне лечения анти-VEGF-препаратами. СТЖ забирали перед третьей инъекцией, определяли концентрацию 8 ключевых цитокинов и ростовых факторов, потенциально участвующих в ангиогенезе. Показатели глаз с леченой МНВ (группа 1) мы сравнивали с катарактальными глазами (группа 2) и глазами с катарактой + МНВ (группа 3) Показатели группы 3, в которой катаракта осложнялась наивной МНВ, мы принимали за условно приближенные к тем, которые могли бы быть до лечения. А показатели катарактальных больных в группе 2 принимали за те, которые нужно достичь в ходе лечения, поскольку на их фоне отсутствовали признаки МНВ.

По сравнению с катарактальными глазами, в СТЖ глаз с леченой МНВ чаще и на более высоком уровне присутствовали проангиогенные цитокины с плюрипотентными свойствами **TNF α** (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 **bFGFb** (58,3% против 26,7%, $p < 0,05$; Мср: $10,1 \pm 5,9$ против $2,7 \pm 1,0$, $p < 0,01$).

Уровни **VEGF** в СТЖ глаз с леченой МНВ и глаз с катарактой оказались практически идентичны: $17,5 \pm 14,0$ (при МНВ) против $18,4 \pm 3,2$ (при катаракте, н/д), при этом частота обнаружения VEGF в катарактальной группе была выше (68,2% против 17%, $p < 0,01$). Таким образом, по сравнению с показателями 3 группы, в которой катаракта сочеталась с МНВ (Мср = $26,7 \pm 0,9$ пг/мл, $p < 0,01$), в 1 группе на фоне двух ИВИ ангиостатика были снижены уровни VEGF, которые приблизились к уровням катарактальных больных. Урежалась и частота выявления VEGF (17% в группе 1 против 100% в группе 3, $p < 0,001$). Мы объяснили этот факт эффективной работой ангиостатика. Одновременно зафиксированы более низкие концентрации и других проангиогенных факторов – ангиогенина (Мср. = $3822,4 \pm 498,6$ пг/мл против Мср. = $5715,8 \pm 697,6$ пг/мл, $p < 0,05$) и TNF (Мср. = $2,4 \pm 0,5$ пг/мл против Мср = $3,5 \pm 0,3$ пг/мл, $p < 0,05$). Т.о., на фоне ИВИ уровень проангиогенных факторов роста (ангиогенина и TNF) приблизился к показателям катарактальных больных, не достигая их значений ($p < 0,05$; $p < 0,01$, соответственно). А

концентрации плюрипотентных цитокинов с проангиогенными и провоспалительными свойствами, в частности, IFN α ($p=0,05$) и IL-8 ($p=0,11$; сильная тенденция) повысились. У каждого второго в СТЖ появлялся провоспалительный фактор FGFb. В то время, как в группе сопоставления с катарактой и наивной МНВ этот фактор роста обнаруживался редко (10%).

Известно, что ангиогенез складывается из нескольких этапов, контролируемых ростовыми факторами, секретируемыми как ЭК, так и клетками микроокружения, включая микроглию сетчатки, РПЭ и др. [34, 78, 124]. Каждый из цитокинов или факторов роста обладает своими контрольно-регуляторными функциями. Спектр их активности может перекрываться. Их биологические эффекты определяются концентрацией. В **низких концентрациях** провоспалительный цитокин TNF α индуцирует миграцию и пролиферацию ЭК и формирование сосудоподобных структур [65,34,82]; **bFGF**, оказывает мощный прямой проангиогенный эффект, стимулируя миграцию, пролиферацию и протеолитическую активность ЭК, способствует выживанию ЭК, защищая их от апоптоза [76,54,98]. В низких и умеренных концентрациях **IL-8** оказывает выраженное влияние на миграцию и пролиферацию ЭК, не влияя на другие его функции [58]. Однако в высоких концентрациях, как и **bFGF**, ИЛ-8 служит мощным провоспалительным цитокином и хемоаттрактантом иммунокомпетентных клеток, секретирующих большой спектр цитокинов с проангиогенным действием. На поздних стадиях ангиогенеза клетки-продуценты микроокружения секретируют антиангиогенные факторы, тормозящие миграцию и пролиферацию ЭК, не снижая их жизнеспособность. К ингибиторам ангиогенеза относят: TGF β , IFN γ , IFN α , и все тот же TNF α , который при длительном воздействии на ЭК, тормозит их пролиферацию и, в конечном итоге, запускает их апоптоз [202].

Цель нашего исследования состояла в изучении уровня про- и антиангиогенных факторов роста в СТЖ глаз с МНВ на фоне выполненных 2-3х ИВИ ангиостатика. В доступной базе подобных исследований (с таким спектром факторов роста и на фоне лечения) практически не представлено. Наше исследование, по сути, было первым в РФ. Оно позволяло понять, как, в какие сроки, и почему происходит реверсия ангиогенного фенотипа МНВ на фоне лечения. Это серьезный шаг на пути освоения и продвижения фармакологических интервенционных стратегий. Что позволили понять наши исследования?

Результаты показали, что реверсия ангиогенного фенотипа практически выявляется уже после 2 инъекции. Формируются одновременно 2 новых «шунта» неоангиогенеза с новыми «игроками на сцене». Это:

- воспалительные цитокины ИЛ-8 и IFN α в качестве промоторов ангиогенеза.
- фибробластный фактор роста FGFb.

Полученные данные также позволяли говорить о том, что на фоне ангиостатической терапии МНВ, имеет место реальное блокирование VEGF. В пользу этого утверждения говорит более редкая частота выявления этого цитокина в СТЖ и сниженная (по сравнению с показателями группы 3) концентрация, сопоставимая с концентрацией катарактальных больных (группа 2).

Отсутствие клинически значимых концентраций антиангиогенных цитокинов TGF β и IFN γ позволяли говорить о локальном дефекте контроля регуляции неоангиогенеза.

Повышенная концентрация других проангиогенных факторов, таких как TNF α , bFGF, ИЛ-8 и ангиогенин, говорила о продолжающейся стимуляции ангиогенеза другими механизмами и обходными путями. На фоне лечения анти-VEGF-препаратами происходит инверсия ангиогенного фенотипа с формированием новых обходных путей ангиогенеза, что, по-видимому, диктует подключение препаратов с другими механизмами действия или поиск препаратов с широким спектром биологических эффектов. Полагаем, что будущие терапевтические стратегии должны обладать более широким терапевтическим эффектом и учесть выявленные особенности.

В связи с этим, мы провели выбор альтернативных препаратов, которые теоретически могли бы помочь в решении наших проблем. Нами были отобраны 3 ангиостатика, которые были получены в лабораторных условиях и переданы нам для тестирования их терапевтического потенциала в условиях экспериментального моделирования. Этому был посвящен 3 фрагмент работы.

Третий фрагмент работы заключался в доклинической оценке эффективности рекомбинантных пептидов с природными ангиостатическими функциями. Целевые пептиды (тумстатин, эндостатин и PEDF) были разработаны в лаборатории биотехнологии и представлены на тестирование ИБХ РАН на предмет их пригодности в качестве ангиостатиков для лечения глазного неоангиогенеза.

Для комплексной оценки возможных биологических эффектов тестируемых пептидов были разработаны и апробированы 4 модели неоваскуляризации – 2 модели передней, лимбо-роговичной, доступной визуализации, и 2 задней, хориоретинальной локализации на глазах экспериментальных животных – кроликов. Параллельно мы разрабатывали систему экспертных оценок эффективности препаратов.

Экспертными критериями антиангиогенной активности пептидов *in vivo* стали:

- плотность васкуляризации роговицы (в баллах, пикселях; клинически, ангиографически и колориметрически);

- площадь помутнения, вызванного отеком, роговицы (в пикселях, колориметрически);
- количество новообразованных сосудов на единицу площади среза в зоне просмотра;
- показатель суммарного просвета сосудов на срезе (в пикселях, колориметрически) и индекс васкуляризации лимбо-роговичной зоны;
- полуколичественные показатели ИГХ-реакции с маркером ЭК-CD31 (морфологические исследования);
- электронно-микроскопическое исследование структуры сосудистой стенки.

На модели 1 неоангиогенеза потенциальные ангиостатики вводили *одновременно с индукторами ангиогенеза*. В качестве индуктора выступали викариновые нити. Провоспалительный и ангиостимулирующий эффекты викарила при прошивании роговицы кролика нарастают постепенно, а затем, нивелируются в связи с рассасыванием. Процесс рассасывания начинается с 10 дня, что ограничивает сроки наблюдения за моделью ангиогенеза, и, как следствие, влияет на трактовку отдаленных результатов. Поэтому, данная модель использовалась для тестирования активности пептидов на ранних этапах ангиогенеза. При этом пептиды начинали вводить в день прошивания роговицы. День индукции ангиогенеза и блокирования его тестируемыми пептидами совпадали. Далее пептиды вводили субконъюнктивально, ежедневно, 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.

На модели 2 изучали возможность прерывания ангиогенеза *на ранних и поздних стадиях* (аваскулогенная терапия). Модель переднего ангиогенеза формировали путем аппликации 10% раствора NaOH на *арех* роговицы. В отличие от предыдущей модели, щелочь признана более мощным индуктором ангиогенеза. 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 развивающейся и нарастающей гипоксии. В условиях гипоксии, запускающей рост новых сосудов, выраженность ангиогенеза достигает максимума. Процесс формирования новых кровеносных сосудов можно наблюдать в течение длительного периода времени, что позволяет использовать данную модель в качестве модели и раннего, и позднего ангиогенеза. В первом случае потенциальные ангиостатические пептиды вводили одновременно с индукторами воспаления и ангиогенеза. Во втором случае лечение ангиостатиками начинали с 7 дня эксперимента, когда сосудистая сеть частично уже была сформирована. Вросшие в

роговицу сосуды уже образовывали "венчик", в котором дифференцировались полноценные почти «зрелые» сосуды с кровотоком. Количественную оценку осуществляли колориметрически, ангиографически и морфометрически. Изучали электронно-микроскопически состояние сосудистой стенки.

Экспериментально установлено, что на *ранних стадиях ангиогенеза* все 3 рекомбинантных пептида оказывают дозозависимый эффект в пределах анализируемых доз препарата. Однако в пределах терапевтической дозы тумстатин (70,2 нг) и PEDF (7,2 нг) обладают более мощным антиангиогенным эффектом по сравнению с эндостатином.

Эффект проявлялся снижением индекса васкуляризации лимба и роговицы, уменьшением протяженности сосудов, растающих с лимба в оптическую зону роговицы опытных глаз кроликов по сравнению с контрольными глазами. Клинически (*ad oculus*) сосуды в опытных глазах не выявлялись. Биомикроскопически их удавалось идентифицировать на увеличении x16 микроскопа. Количественные и полуколичественные показатели в комплексе с морфологическими данными в этой главе мы не приводим во избежание повторов. Дополнительно был выявлен противовоспалительный эффект тумстатина и PEDF, и отсутствие такового у эндостатина. Морфологические исследования подтвердили ангиостатические эффекты. Меньшая доля эозинофилов в инфильтрате, развившемся вокруг шва на фоне PEDF, свидетельствовала о возможном непрямом противовоспалительном потенциале этого пептида. ИГХ исследования выявили негативную реакцию с маркером CD31 в новообразованной сети сосудов лимбороговичной зоны, которая оказалась положительной в сосудах радужки. Полученную информацию мы расценили как факт развития неполноценных новообразованных сосудов, не содержащих эндотелиальной выстилки в стенке. В этом, по-видимому, и проявлялся один из антиангиогенных эффектов используемых природных ингибиторов ангиогенеза

В целом, проведенные исследования позволяли утверждать о том, что все 3 тестируемых рекомбинантных пептида, представлявшие собой фрагменты природных ингибиторов ангиогенеза, обладают заявленными ангиостатическими свойствами. Они проявляются уменьшением интенсивности образования сосудов в ответ на индукцию ангиогенеза. Антиангиогенные эффекты пептидов, по-видимому, осуществляются благодаря торможению миграции и пролиферации ЭК, и/или их преждевременным индуцированным апоптозом, что морфологически проявляется отсутствием ЭК в стенке новообразованных сосудов практически на всем протяжении. Негативная ИГХ-реакция с маркером ЭК - CD31 новообразованных сосудов подтверждает этот вывод.

Наряду с антиангиогенными эффектами, тестируемые пептиды обладали противоотечными и антипролиферативными эффектами, проявляющимися в уменьшении

количества клеточных элементов вокруг викрилового шва и сокращении общей площади клеточной инфильтрации.

Возможность подавлять поздние стадии ангиогенеза или аваскулогенный потенциал оценивали на второй модели переднего ангиогенеза. 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 незначительным снижением плотности сосудистой лимбальной сети. По мере того, как сосудистая сеть заканчивала свое формирование, активность пептида нивелировалась.

Наряду с этим, ангиостатическое действие пептидов было доказано на двух моделях хориоретинальной локализации.

Рекомбинантный фрагмент (44-77) PEDF в дозе 1 и 4 мкг оказывает ингибирующее действие на развитие субретинальных патологических сосудов в кроличьих глазах с моделированной СНМ и по своим антиангиогенным свойствам превосходит фрагмент (69-95) тумстатина (Tum) человека. Более эффективна доза 4 мкг PEDF. Рекомбинантный фрагмент (44-77) PEDF не только тормозит неоваскуляризацию, но и вызывает её регрессию. Предварительные экспериментальные исследования свидетельствуют о возможном профилактическом потенциале PEDF.

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования подтверждали биологическую активность всех трех рекомбинантных фрагментов: тумстатина, эндостатина, PEDF. *In vitro* эта активность проявлялась в их способности подавлять пролиферацию (эндостатин, тумстатин, PEDF), миграцию (эндостатин) и формирование ЭК капилляроподобных структур, (эндостатин, тумстатин, PEDF) в определенных концентрациях. *In vivo* антиангиогенный потенциал тумстатина, эндостатина, PEDF реализовывался путем сокращения количества ветвей второго и третьего порядка на единицу площади, уменьшения диаметра просвета и протяженности новообразованных сосудов при введении их одновременно с индукторами ангиогенеза. Аваскулогенный потенциал тумстатина проявлялся апоптозом ЭК с последующей резорбцией сосудистой стенки. Отсутствие ЭК на сосудистой стенке при электронно-микроскопическом

исследовании в комплексе с цитотоксическим эффектом и негативная ИГХ-реакция с маркером CD 31 подтверждала этот механизм действия.

Известно, что сборка новых сосудов при ангиогенезе проходит в несколько этапов (Рис. 68):

Антиангиогенная терапия: комплексный подход

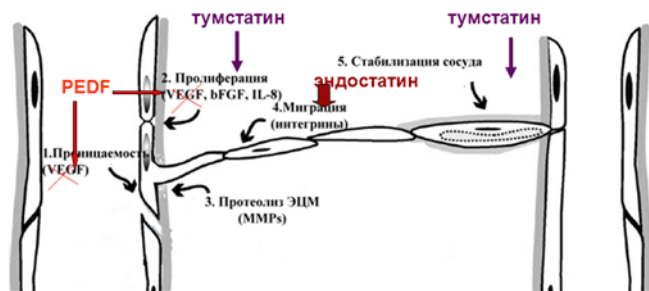


Рис. 49. Стратегии антиангиогенной терапии

Эти этапы регулируются и контролируются стимулирующими и ингибирующими ангиогенными молекулами. Известно также, что ангиостатическая (синоним: антиангиогенная терапия) и аваскулогенная терапии имеют разные точки-приложения и разные мишени. Мишенью ангиостатической терапии, чаще всего являются сигнальные молекулы, регулирующие их активность (VEGF, bFGF, IFN α IL-8, TNF), а также рецепторы, благодаря которым ангиогенез запускается (VEGFR1, VEGFR2), и гены-регуляторы экспрессии белков, запускающих ангиогенез. Мишенью аваскулогенной терапии служат в основном эндотелиальные клетки (ЭК) и экстрацеллюлярный матрикс (ЭЦМ), на котором эти ЭК прикрепляются. Полагают, что клетки эндотелия кровеносных сосудов, адгезированные на нормальном ЭЦМ, неподвижны. Компоненты ЭЦМ, являющиеся частью базальной мембраны необычайно высокой эластичности и растяжимости, состоят в основном из гликозаминогликанов. Они синтезируются и секретируются ЭК в ходе ангиогенеза и васкулогенеза. Эндотелий зрелых сосудов способен постоянно ремоделировать свой ЭЦМ [15]. Сокращение/сжатие ЭЦМ предлагается как цель терапии при ремоделировании плотности мембраны Бруха при атрофической ВМД [15-19]. Известно, что именно снижение содержания в тканях глаза природных пептидов-ингибиторов ангиогенеза приводит к истончению и разрушению мембраны Бруха с последующим каскадом событий, клинически проявляющихся симптомами ВМД [4, 18]. Принимая *ad priore* этот факт как догму, можно предложить альтернативную антиангиогенную стратегию, направленную на усиление другого рычага управления ангиогенезом: устранение дефицита природных ингибиторов ангиогенеза. Доказательства этого дефицита также присутствуют в многочисленных публикациях [4, 5, 14, 29-30, 34, 35,

40]. В этом случае полезно напомнить уже известное «золотое правило», открытие которого принадлежит «отцу ангиогенеза» и гениальному ученому Фолькману: «Контроль ангиогенеза в природе осуществляется благодаря балансу проангиогенных и антиангиогенных пептидных факторов». Из этого правила следует другое: «Дисбаланс пептидов-регуляторов можно ликвидировать, устраняя дефицит природных ингибиторов ангиогенеза». Если одна из чаши весов перетягивает, для восстановления баланса достаточно доложить противовес. Дефицит этих пептидов-ингибиторов можно устранить, вводя их путем капельных инстилляций или субконъюнктивальных инъекций.

К преимуществам таких пептидов можно отнести:

- способность подавлять одновременно несколько этапов патологического 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, создающий условия для более слабой фибротизации оптических сред глаза и сохранению зрительных функций.

Наряду с этим, рекомбинантные фрагменты природных ингибиторов ангиогенеза обладают низким молекулярным весом (Табл. 22), что обеспечивает лучшее проникновение в ткани, исключает тахифилаксию, токсические и побочные эффекты, обеспечивает возможность длительного применения при сохранении биологических эффектов.

Таблица 22 - Основные сравнительные характеристики препаратов и фрагментов пептидов

Препарат (фрагмент)	Молекулярный вес	Состав	Класс	Лечебная (расчетная) доза	Мишень
Авастин	150 кДа	Две лёгкие цепи по 214 аминокислотных остатка (а.о.) и две тяжёлые цепи по 453 а.о.	Гуманизированное моноклональное мышиное АТ к VEGF	2,5 мг	Все изоформы VEGF-A
Луцентис	48 кДа	Лёгкая цепь 213 а.о.+ тяжёлая цепь 231 а.о.	Fab фрагмент гуманизированного моноклонального мышинового АТ к VEGF	0,3 мг	Все изоформы VEGF-A

Эндостатин (1-49)	5,3 кДа	49 а.о.	Рекомбинантный пептид	96 нг	Интегрин $\alpha 5\beta 1$
Тумстатин (69-95)	3,9 кДа	35 а.о.	Рекомбинантный пептид	70,2 нг	Интегрин $\alpha V\beta 3$
PEDF(24-57)	4,0 кДа	37 а.о.	Рекомбинантный пептид	7,2 нг	37/67 кДа ламининовый рецептор

Перспективность этого пути уже подтверждена единичными работами [6, 14, 17, 34, 35].

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 α ($p<0,05$) 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 лимбобороговичной 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 капиллярноподобных 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 γ и TGF β)

и экспериментальных данных (эффективность эндостатина, тумстатина и PEDF на 4 моделях неоваскуляризации глаз) служит обоснованием подходов к применению альтернативной стратегии лечения МНВ, исключаяющей или дополняющей 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 соответствием 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулаева, Э. А. Роль системы комплемента и других воспалительных факторов в развитии возрастной макулярной дегенерации // Казанский медицинский журнал. – 2018. – Т. 99. – № 4. – С. 657-664.
2. Андреев Д.А., Ших Е.В. Клиническая фармакология и фармакотерапия. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020.
3. Астахов Ю.С., Лисочкина А.Б., Шадричев Ф.Е. Возрастная макулярная дегенерация. Клинические рекомендации // Офтальмология. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2006.- С. 164-188.
4. Астахов Ю. С., Нечипоренко П. А. Режимы назначения ингибиторов ангиогенеза при лечении пациентов с неоваскулярной возрастной макулярной дегенерацией // Офтальмологические ведомости. – 2019. – Т. 12. – № 2. – С. 47-56
5. Афанасьева М. А., Андреева И.В. Эффективность анти-VEGF-терапии у пациентов с отслойкой ретинального пигментного эпителия // Точка зрения. Восток - Запад. – 2019. – № 2. – С. 32-34.
6. Бикбов М.М., Файзрахманов Р.Р. Влияние локализации хориоидальной неоваскуляризации на морфофункциональные показатели сетчатки при возрастной макулярной дегенерации // Современные технологии в офтальмологии. – 2018. – № 2. – С. 216-222.
7. Бикбов М.М., Файзрахманов Р.Р., Ярмухаметова А.Л. Изменения центральной области сетчатки при влажной форме возрастной макулярной дегенерации после введения ранибизумаба //Вестник офтальмологии. – 2015. –131(4) – С.60- 65.
8. Бобыкин Е. В., Коротких С. А., Крохалев В. Я. Антиангиогенная терапия "влажной" возрастной макулярной дегенерации: анализ причин отказа пациентов от последующего наблюдения // Вестник офтальмологии. – 2021. – Т. 137. – № 2. – С. 66-74
9. Будзинская М.В., Педанова Е.К. Современные подходы к диагностике и ведению пациентов с влажной формой возрастной макулярной дегенерации. // Эффективная фармакотерапия. – 2018. –Т. 2. № 22. – С. 26.
10. Будзинская М.В., Фурсова А.Ж., Педанова Е.К. Специфические биомаркеры ответа на антиангиогенную терапию // Вестник офтальмологии. – 2020. –136(2). –С.117-124.
11. Будзинская М.В., Плюхова А.А., Торопыгин С.Г. Современный взгляд на лечение экссудативной формы возрастной макулярной дегенерации. // Вестник офтальмологии. 2019- Т.135(5)- 107-115.
12. Будзинская М.В., Плюхова А.А. Перспективы антиангиогенной терапии при заболеваниях сетчатки. //Офтальмология. – 2021.- 18-3S-С.638-645.

13. Жуков Н.В. Современное состояние антиангиогенной терапии. Целевая терапия без мишени? // Практическая онкология. – 2007.- Т. 8 -№ 3- С.164-170
14. Зайцева О. В., Нероева Н. В., Охочимская Т. Д., Бобыкин Е. В. Современный взгляд на проблему недостаточной эффективности антиангиогенной терапии возрастной макулярной дегенерации. // Вестник офтальмологии. – 2022. – Т. 138. – № 1. – С. 90-99
15. Зайцева О. В., Нероева Н. В., Охочимская Т. Д., Бобыкин Е. В. АнтиVEGF-терапия неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации: причины недостаточной эффективности // Вестник офтальмологии. – 2021. – Т. 137. – № 5. – С. 152-159.
16. Иошин И. Э., Аноприева Т. А. Подходы к назначению антиангиогенных препаратов при терапии пациентов с неоваскулярной возрастной макулярной дегенерацией. // Российский офтальмологический журнал. – 2019. – Т. 12. – № 3. – С. 102-112.
17. Каменских Т.Г. Дифференцированный подход к анализу ретинальной жидкости и оценке ее влияния на анти-VEGF-терапию неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации. // Вестник офтальмологии. – 2019. – Т. 135(6). – С.134-140
18. Ковалевская М. А., Перерва О. А., Ролдугин А. А., Картамышев Е. Г. Возможные проблемы анти-VEGF-терапии неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации // Вестник офтальмологии. – 2021. – Т. 137. – № 6. – С. 149-156.
19. Коротких С.А., Бобыкин Е.В.Режимы применения анти-VEGF в офтальмологии (практическое пособие с клиническими примерами). гЕкатеринбург 2020. изд-во УГМУ, 2020.-92с.
20. Куликов А. Н., Сосновский С. В., Грибанов Н. А. и др. Сравнение эффективности различных протоколов перехода на афлиберцепт при тахифилаксии к ранибизумабу у пациентов с неоваскулярной формой ВМД // Современная оптометрия. – 2017. – № 4(104). – С. 32-40
21. Лоскутов И.А. Возрастная макулярная дегенерация: анти-VEGFтерапия и качество жизни пациентов // Эффективная фармакотерапия. – 2015. – № 30. – С. 4-11.
22. Нероев В. В., Сарыгина О. И., Левкина О. А. Факторы, влияющие на глазной ангиогенез. // Вестник офтальмологию – 2009. - Том 125, №3. – С. 52 – 55.
23. Нероев В.В., Сарыгина О.И., Левкина О.А., Слепова О.С. Изучение локальной секреции про- и антиангиогенных факторов до и после проведения лазеркоагуляции сетчатки у пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией // Медицинская иммунология. – 2009. – Том 11, №4-5. – С. 369 – 370.
24. Нероев В.В. Российское наблюдательное эпидемиологическое интервенционное исследование пациентов с влажной формой возрастной макулярной дегенерации // Российский офтальмологический журнал. -2011.-4(2).-С.4-9. 36.

25. Нероев В. В., Зайцева О. В., Лисочкина А. Б. и др. О разработке и клинической апробации информационной листовки "Интравитреальные инъекции (информация для пациентов)", предложенной Экспертным советом по заболеваниям сетчатки и зрительного нерва Общероссийской общественной организации "Ассоциация врачей-офтальмологов" // Российский общенациональный офтальмологический форум. – 2021. – Т. 1. – С. 113-117.
26. Нероев В. В., Коротких С. А., Бобыкин Е. В. и др. Информационный лифлет для пациентов, получающих лечение с применением интравитреального введения лекарственных препаратов. Рекомендации Экспертного совета по заболеваниям сетчатки и зрительного нерва Общероссийской общественной организации "Ассоциация врачей-офтальмологов" // Российский офтальмологический журнал. – 2021. – Т. 14. – № S2. – С. 7-19
27. Нероева Н.В., Нероев В.В., Рябина М.В., Кармокова А.Г., Лосанова О.А. Смешанный (комбинированный) фенотип поздней стадии возрастной макулярной дегенерации // Российский офтальмологический журнал.-2021.-14(2).- С. 69-75
28. Панова И. Е., Шаимов Т. Б. Анализ эффективности применения Ранибизумаба с учетом характера неоваскуляризации при возрастной макулярной дистрофии // Современные технологии в офтальмологии. – 2015. – № 1. – С. 101-103
29. Педанова Е. К. Подходы к лечению пахихориоидальных неоваскулярных форм ВМД // Современные технологии в офтальмологии. – 2020. – № 4(35). – С. 277-278.
30. Педанова Е.К. Пахихориоидальная неоваскулопатия при нормальной субфовеолярной толщине хориоидеи // Современные технологии в офтальмологии. – 2021. – № 3(38). – С. 336-338.
31. Рудько А.С., Эфендиева М.Х., Будзинская М.В., Карпилова М.А. Влияние фактора роста эндотелия сосудов на ангиогенез и нейрогенез // Вестник офтальмологии.- 2017.- 133(3).- С.75–81.
32. Тахчиди Х.П., Гаврилова Н.А., Ланевская Н.И., Тищенко О.Е., Борзенко С.А. с соавт. Влияние фактора пигментного эпителия (PEDF) и Авастина на органотипические культуры сетчатки/// В Сб тезисов по материалам конференции «Федоровские чтения» - Москва. - 1-3 июля 2009 г - под редакцией Х.П. Тахчиди – С. 548-549.
33. Файзрахманов Р.Р. Режимы назначения анти-VEGF-препаратов при терапии неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации // Вестник офтальмологии. – 2018. - № 6. - С. 105- 113.
34. Файзрахманов Р.Р. Анти-VEGF терапия неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации: от рандомизированных исследований к реальной клинической практике // Российский офтальмологический журнал. – 2019.-12(2).-С.97-105.

35. Файзрахманов Р.Р., Шишкин М.М., Ларина Е.А., Файзрахманова О.А. Влияние афлиберцепта на ХНВМ II типа// Офтальмохирургия. – 2019. - № 4. - С. 32- 36.
36. Файзрахманов Р.Р., Воропаев В.Ю., Суханова А.В., Шаталова Е.О. Антиангиогенная терапия неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации. // Вестник офтальмологии. 2021;137(1):83–93.
37. Фурсова А. Ж., Дербенева А. С., Васильева М. А. и др. Роль различных типов локализации ретинальной "жидкости" как прогностических биомаркеров в выборе режима антиангиогенной терапии при возрастной макулярной дегенерации // Вестник офтальмологии. – 2020. – Т. 136. – № 6-2. – С. 227-234.
38. Фурсова А.Ж., Чубарь Н.В., Тарасов М.С. Антиангиогенная терапия возрастной макулярной дегенерации // Вестник офтальмологии.- 2018.- Т. 134.- № 6.- С. 59-67.
39. Фурсова А.Ж., Чубарь Н.В., Тарасов М.С., и др. Прогностические факторы эффективности антиангиогенной терапии при неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации // Вестник офтальмологии.- 2018.-134(1).-С.48 55.
40. Харакозов А. С., Куликов А. Н.. Влияние перерыва антиангиогенной терапии на анатомо-функциональный статус пациентов с неоваскулярной возрастной макулярной дегенерацией // Офтальмологические ведомости. – 2021. – Т. 14. – № 1. – С. 35-42.
41. Харакозов А. С., Куликов А. Н., Мальцев Д. С. Предикторы функционального результата антиангиогенной терапии влажной формы возрастной макулярной дегенерации // Офтальмологические ведомости. – 2020. – Т. 13. – № 4. – С. 7-13.
42. Шеланкова АВ. Будзинская МВ., Андреева. И.В., Афанасьева М.А. Реальная клиническая практика применения антиангиогенной терапии у пациентов с возрастной макулярной дегенерацией. Ретроспективный анализ функциональных результатов // Вестник офтальмологии. – 2020. – Т. 136. – № 4-2. – С. 207-213.
43. Aghdam K.A., Pielen A., Framme C., Junker B. Visual and anatomic outcomes after conversion to aflibercept in neovascular age-related macular degeneration:12-month results. // Eur J Ophthalmol. – 2016.- vol. 26(5). – P.473–478.
44. Agnès Noël, Maud Jost, Vincent Lambert et al. Anti-angiogenic therapy of exudative age-related macular degeneration: current progress and emerging concepts // Trends in Molecular Medicine. – 2007. - Vol. 13.- Issue 8.- P. 345-352
45. Adinoyi O. Garba and Shaker A. Mousa. Bevasiranib for the Treatment of Wet, Age-Related Macular Degeneration. // Ophthalmol Eye Dis.- 2010 – vol. 2 – P.75–83.
46. Almony A., Mansouri A., Shah G.K., Blinder K.J. Efficacy of intravitreal bevacizumab after unresponsive treatment with intravitreal ranibizumab. // Can J Ophthalmol.- 2011 – vol. 46(2) – P.182–185.

47. Al-Zamil W.M., A Yassin S. Recent developments in age-related macular degeneration: A review. // *Clin. Interv. Aging.* – 2017 – vol. 12 – P. 1313–1330.
48. Al-Khersan H., Hussain R. M., Ciulla T. A.. Innovative therapies for neovascular age-related macular degeneration. // *Expert Opin. Pharmacother.* -2019 – vol. 20 – P.1879–1891
49. Andrew NA, Lisa T, Carol YC: Ranibizumab combined with verteporfin photodynamic therapy in neovascular age-related macular degeneration (FOCUS): year 2 results.// *Am J Ophthalmol.*-2008 – Vol. 145 – P.862-874
50. Anti-VEGF Developments in Ophthalmology. Editors F. Bandello, M. Battaglia Parodi. – Karger . – 2010.-Switzerland – Basel. - P.144.
51. Amoaku W.M., Chakravarthy U., Gale R. et al.. Defining response to anti-VEGF therapies in neovascular AMD. // *Eye (Lond)* – 2015. – vol. 29(6)- P.721–731.
52. Apte R.S. Stimulation of neovascularization by the anti-angiogenic factor PEDF. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 2004. - Vol.45. - P. 4491–4497
53. Arcinue C.A., Ma F., Barteselli G. One-year outcomes of aflibercept in recurrent or persistent neovascular age-related macular degeneration. // *Am J Ophthalmol.* – 2015.- vol.159(3)- P.426–436.
54. Artunay O, Yuzbasioglu E, Raisier R, et al: Incidence and management of acute endophthalmitis after intravitreal bevacizumab (Avastin) injection. // *Eye (Lond).* -2009 – Vol.23- P.2187-2193.
55. Artunay O. Severe intraocular inflammation after injection of bevacizumab. // *Ophthalmology.* - 2010- Vol.117- P.512-516.
56. Aslankurt M., Aslan L., Aksoy A. et al.. The results of switching between 2 anti-VEGF drugs, bevacizumab and ranibizumab, in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. // *Eur J Ophthalmol.* – 2013. – vol. 23(4) – P.553–557.
57. Atchaneeyasakul L.O., Davis E., Alsheikh O.J., et al. Lentiviral Vector Transfer of Either Tumstatin or Tum-4 Gene Fails to Inhibit Proliferation of Ocular Choroidal Melanoma and Retinoblastoma Cell Cultures // *Invest Ophthalmol Vis Sci* -2005-vol.46: E-Abstract 4249
58. Avery R.L, Pieramici DJ, Rabena MD, et al. The international intravitreal Bevacizumab Safety Survey: using the internet to assess drug safety worldwide. // *Br J Ophthalmol.* – 2006- Vol.90 -.P. 1344-1349.
59. Avgikos K.N., Horgan S.E., Sivaraj R.R., Hu K. Tachyphylaxis and bevacizumab. // *Ophthalmology.*- 2009. – vol.116(9) – P.1831–1832.
60. Awata T, Inoue K, Kurihara S, et al. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. // *Diabetes.* - 2002 –Vol. 51 - № 5- P. 1635-1639.

61. Bakri SJ, Snyder MR, Reid JM. et al . Pharmacokinetics of intravitreal bavituzumab (Avastin). // *Ophthalmology* – 2007- vol. 114 – P. 885–889.
62. Bakall B., Folk J.C., Boldt H.C. Aflibercept therapy for exudative age-related macular degeneration resistant to bevacizumab and ranibizumab. // *Am J Ophthalmol.* -2013 – vol. 156(1)- P.15–22.
63. Barış M.E., Menteş J., Afrashi F. Subgroups and Features of Poor Responders to Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment in Eyes with Neovascular Age-Related Macular Degeneration // *Turk J Ophthalmol.* - 2020 – vol. 50(5) – P. 275–282.
64. Beazley-Long N, Hua J, Jehle T et al. VEGF-A165b is an endogenous neuroprotective splice isoform of vascular endothelial growth factor A in vivo and in vitro. // *Am J Pathol.* – 2013 – vol. 183(3) – P. 918-929
65. Binder S. Loss of reactivity in intravitreal anti-VEGF therapy: tachyphylaxis or tolerance? // *Br J Ophthalmol.* – 2012 – vol. 96(1)- P.1–2.
66. Bouck N. PEDF: anti-angiogenic guardian of ocular function // *Trends. Mol. Med.* – 2002.- Vol. 8. - № 7 - P. 330-334.
67. Boz M, Michels S., Geitzenauer W, et al: Effect of systemic bevacizumab therapy on retinal pigment epithelial detachment. // *Br J Ophthalmol.* -2007- Vol.91- P.785-789
68. Broadhead G.K., Hong T., Chang A.A. Treating the untreatable patient: current options for the management of treatment-resistant neovascular age-related macular degeneration. // *Acta Ophthalmol.*- 2014- vol. 92(8)- P. 713–723.
69. Brown D., Kaiser P., Michels M. Ranibizumab versus Verteporfin for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. // *N. Engl. J. Med.*- 2006- vol.355- P.1432–1444.
70. Brown DM, Michels M, Kaiser PK, et al. ANCHOR Study Group. Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration. Two year results of the Anchor Study. // *Ophthalmology.* – 2009- vol.116 – P. 57–65.
71. Busbee B.G., Ho A.C., Brown D.M. Twelve-month efficacy and safety of 0.5 mg or 2.0 mg ranibizumab in patients with subfoveal neovascular age-related macular degeneration. // *Ophthalmology.* – 2013. – vol. 120(5)- P. 1046–1056.
72. Bussolati B., Dunk C., Grohman M. et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide. // *Am. J. Pathol.* – 2001. - Vol. 159. - P.993–1008
73. Byun Y.J., Lee S.J., Koh H.J. Predictors of response after intravitreal bevacizumab injection for neovascular age-related macular degeneration. // *Jpn J Ophthalmol.* – 2010- vol. 54- P.571–577.

74. Cai J, Jiang W, Grant MB, Boulton M. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of VEGFR1 // *J Biol Chem* - 2006- vol. 281 – P. 3604–3613
75. Callanan D. Kunimoto D. Maturi R.K. et al. Double-masked, randomized, phase 2 evaluation of abicipar pegol (an anti-VEGF DARPIn therapeutic) in neovascular age-related macular degeneration. // *J Ocul Pharmacol Ther.* – 2018 – vol. 34 – P.700-709
76. Călugăru D., Călugăru M. Conbercept for treatment of neovascular age-related macular degeneration: results of the randomized phase 3 Phoenix study. // *Am. J. Ophthalmol.* - 2019. – vol.198 – P.262–263.
77. Campochiaro P.A. Channa R. Berger B.B. et al. Treatment of diabetic macular edema with a designed ankyrin repeat protein that binds vascular endothelial growth factor: a phase I/II study. // *Am J Ophthalmol.*- 2013- vol. 155 (e691-692)- P. 697-704
78. Carl DR, David MB, Prema A, et al. Randomized double-masked, sham-controlled trial of ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: PIER Study year 1.//*Am J Ophthalmol.*-2008- Vol.145 –P.239-248
79. Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. // *Nat. Med.* – 2001. - Vol. 7. - P. 575–583
80. Cartmill B.T., Parham D.M., Strike P.W. et al. How do absorbable sutures absorb? A prospective doubleblind randomized clinical study of tissue reaction to polyglactin 910 sutures in human skin // *Orbit.* – 2014. – Vol. 6. – P. 437-443.
81. Chan A, Duker J, Ko TH. Normal macular thickness measurements in healthy eyes using Stratus optical coherence tomography. // *Arch Ophthalmol* – 2006. – vol. 124- P.193–198.
82. Chang W., Noh D.H., Sagong M., Kim I.T. Pharmacogenetic association with early response to intravitreal ranibizumab for age-related macular degeneration in a Korean population. // *Mol Vis.*-2013 – vol. 19- P. 702–709.
83. Chang A., Li H.. Intravitreal aflibercept for treatment-resistant neovascular age-related macular degeneration. // *Ophthalmology.* – 2014 – vol. 121(1) – P. 188–192.
84. Chikako Hara, Taku Wakabayashi, Yoko Fukushima. Tachyphylaxis during treatment of exudative age-related macular degeneration with aflibercept. // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* - 2019 – vol. 257(11) – P. 2559–2569.
85. Cho HJ, Park SM, Kim J. et al. Progression of macular atrophy in patients undergoing anti-vascular endothelial growth factor therapy for neovascular age-related macular degeneration. // *Acta Ophthalmol.* – 2021- vol. 99(4):e540-e546.

86. Cohen S.Y., Mimoun G., Oubraham H. LUMIERE Study Group. Changes in visual acuity in patients with wet age-related macular degeneration treated with intravitreal ranibizumab in daily clinical practice: the LUMIERE study. // *Retina*. – 2013. – vol. 33 – P. 474–481.
87. Colella P., Corugno G., Auricchio A. Ocular gene therapy: current progress and future prospects. // *Trends in Molecular Medicine*. – 2021- Vol. 15- No.1- P.23-32.
88. Colin J. Barnstable and Joyce Tombran-Tink. Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential/ // *Progress in Retinal and Eye Research*- 2004. –Vol. 23 - № 5. – P. 561-577.
89. Costa RA, Jorge R, Calucci D. et al: Intravitreal bevacizumab for choroidal neovascularization caused by AMD (IBeNA Study): results of a phase I dose-escalation study.// *Invest Ophthalmol Vis Sci* – 2006 – Vol.46- P.4569-4578.
90. D'Amore P. Anti-VEGF Drugs For Retinal Diseases Could Have Serious Side Effects. Scientists Caution. // *ScienceDaily*- 2008 - Nov. 5.
91. Dawson D. W., Volpert O. V., Gillis P., et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. // *Science*. – 1999. - Vol. 285. - P. 245–248.
92. Dawson D. W., Volpert, O. V., Gillis, P., et al. Pigment-epithelium-derived factor (PEDF) occurs at a physiologically relevant concentration in human blood: purification and characterization. // *Science*. – 2009.- Vol. 215 - P. 205–212.
93. Derek Kunimoto, Young Hee Yoon. CEDAR and SEQUOIA Study Groups Efficacy and Safety of Abicipar in Neovascular Age-Related Macular Degeneration: 52-Week Results of Phase 3 Randomized Controlled Study // *Ophthalmology* . - 2020 – vol.127(10)- P. 1331-1344
94. Dugel P.U. Jaffe G.J. Sallstig P.et al. Brolucizumab versus aflibercept in participants with neovascular age-related macular degeneration: a randomized trial. // *Ophthalmology*. – 2017. – vol. 124- P. 1296-1304
95. Dugel P.U. Koh A.Ogura Y.et al. HAWK and HARRIER: phase 3, multicenter, randomized, double-masked trials of brolucizumab for neovascular age-related macular degeneration. // *Ophthalmology*. – 2020. – vol.127- P. 72-84
96. Ebner C, Wernigg C, Schütze C, et al. Retinal pigment epithelial characteristics in eyes with neovascular age-related macular degeneration: Long-term retinal changes under anti-vascular endothelial growth factor treatment.// *Wien Klin Wochenschr*. -2021- vol.133(3-4)- P.123-130.
97. Eghoj MS, Sorensen TL. Tachyphylaxis during treatment of exudative age-related macular degeneration with ranibizumab. // *Br J Ophthalmol*.- 2012- vol. 96- P.21–23.
98. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands.// *Nature*. – 1990.-Vol.346- P.818-822

99. Ehlken C., Jungmann S., Bohringer D. Switch of anti-VEGF agents is an option for nonresponders in the treatment of AMD. // *Eye (Lond)*- 2014. Vol. 28(5)- P. 538–545
100. Eyetech Study Group: Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. // *Ophthalmology*. – 2003. – Vol. 110.- P. 979-986.
101. Eyetech Study Group: Preclinical and phase IA clinical evalution of anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Retina*. 2—2.- Vol.22.- P.143-152
102. Fassnacht-Riederle H., Becker M., Graf N. Effect of aflibercept in insufficient responders to prior anti-VEGF therapy in neovascular AMD. // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. – 2014- vol. 252(11)- P. 1705–1709.
103. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor.// *J Mol Med*. -1999. -Vol.77. - P. 527-543.
104. Ferrone P.J., Anwar F., Naysan J. Early initial clinical experience with intravitreal aflibercept for wet age-related macular degeneration. // *Br J Ophthalmol*. – 2014. Vol. 98 (suppl 1):i17–i21.
105. Folkman J. Tumor angiogenesis//: *Cancer Medicine*. Holland JF, Bast RC, Morton DL, Frei E, Kufe DW (eds.).- Baltimore, Williams and Wilkins, 1997.-P.181-204
106. Fong G.H., Rossant J., Gertenstein M et al. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium // *Nature*.-1995.-Vol.376.-P.66-70.
107. Forooghian F, Cukras C, Meyerle CB, et al. Tachyphylaxis after intravitreal bevacizumab for exudative age-related macular degeneration. // *Retina* 2009 – vol. 29- P. 723–31.
108. Ford KM, D'Amore PA. Molecular regulation of vascular endothelial growth factor expression in the retinal pigment epithelium. // *Mol Vis*. – 2012. – vol. 18 – P. 519-527.
109. Foxton RH, Finkelstein A et al. VEGF-A is necessary and sufficient for retinal neuroprotection in models of experimental glaucoma. // *Am J Pathol*. – 2013. – vol. 182(4)- P. 1379-1390.
110. Fukai N., Eklund L., Marneros A. G. Lack of collagen XVIII/endostatin results in eye abnormalities. // *EMBO J*.- 2002.- Vol. 21 - P. 1535-1544.
111. Fung A.T., Kumar N., Vance S.K. Pilot study to evaluate the role of high-dose ranibizumab 2.0 mg in the management of neovascular age-related macular degeneration in patients with persistent/recurrent macular fluid <30 days following treatment with intravitreal anti-VEGF therapy (the LAST Study) // *Eye (Lond)* – 2012. Vol. 26(9)- P. 1181–1187.
112. Gariano R.H. Retinal angiogenesis in development and disease.// *Nature*.-2005- Vol. 438. – P. 960-966.

113. Gasperini JL, Fawzi AA, et al . Bevacizumab and ranibizumab tachyphylaxis in the treatment of choroidal neovascularisation. // *Br J Ophthalmol* – 2012- vol. 96- P. 14–20.
114. Gaudreault J., Fei D., Beyer J.C. Pharmacokinetics and retinal distribution of ranibizumab, a humanized antibody fragment directed against VEGF-A, following intravitreal administration in rabbits. // *Retina*. - 2007- vol. 27(9)- P. 1260–1266.
115. Gharbiya M., Parisi F. Intravitreal anti-vascular endothelial growth factor for retinal angiomatous proliferation in treatment-naïve eyes: long-term functional and anatomical results using a modified PrONTO-style regimen. // *Retina*. – 2014- vol. 34(2)- P. 298–305.
116. Grewal D.S., Gill M.K., Sarezky D., Lyon A.T., Mirza R.G. Visual and anatomical outcomes following intravitreal aflibercept in eyes with recalcitrant neovascular age-related macular degeneration: 12-month results. // *Eye (Lond)* – 2014- vol. 28(7)- P. 895–899.
117. Gokce G., Durukan A.H., Koylu M.T. Efficacy of aflibercept on exudative age-related macular degeneration in patients exhibiting complete ranibizumab resistance and tachyphylaxis // *Arq Bras Oftalmol*. – 2016. – vol. 79(6) – P.384–389.
118. Hamano Y., Zeisberg M., H. Sugimoto, J.C. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin.//*Cancer Cell*. – 2003 –Vol. 6.- P. 589–601
119. Hall L.B., Zebardast N. Aflibercept in the treatment of neovascular age-related macular degeneration in previously treated patients. // *J Ocul Pharmacol Ther*. – 2014 – vol. 30(4) – P. 346–352.
120. Hariri A., Diniz B., Fou L.V., et al. Quantitative OCT subanalysis of eyes with choroidal neovascularization switched from multiple injections of bevacizumab or ranibizumab to intravitreal aflibercept. // *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*.- 2015- vol. 46(2)- P.195–200.
121. Heringer D., McFarland T.J., Zhang Y. Assessment of Lentiviral Delivered Tumstatin and Tum-4, novel Anti-Angiogenic and Anti-Tumor proteins, on the Inhibition of Melanoma and Retinoblastoma Cell Proliferation // *Invest Ophthalmol Vis Sci* -2004.- Vol. 45: E-Abstract 3576.
122. Heussen F.M., Shao Q., Ouyang Y. Clinical outcomes after switching treatment from intravitreal ranibizumab to aflibercept in neovascular age-related macular degeneration. // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* – 2014 – vol. 252(6)- P. 909–915.
123. Hiratsuka S., Maru Y., Okada A., et al. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1 in pathological angiogenesis. // *Cancer Res*. – 2001 - Vol. 61- P.1207–1213
124. Ho A.C., Busbee B.G., Regillo K.D. for the HARBOR Study Group. Twenty-four-Month Efficacy and Safety of 0.5 mg or 2.0 mg Ranibizumab in Patients with Subfoveal

Neovascular Age-Related Macular Degeneration. // *Ophthalmology*.-2014- vol. 121(11)- P. 2181–2191.

125. Holecamp NM, Bouck N, Volpert O. Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. // *Am J Ophthalmol*. – 2002- Vol. 134. – P. 220–227.

126. Imran A. Bhutto D. Scott McLeod. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration.//*Experimental Eye Research* -2006.- Vol. 82(1)- P. 99-110.

127. Inoue M., Arakawa A., Yamane S. Variable response of vascularized pigment epithelial detachments to ranibizumab based on lesion subtypes, including polypoidal choroidal vasculopathy. // *Retina* - 2013 - 33(5):990-997.

128. Jang L., Gianniou C., Ambresin A., Mantel I. Refractory subretinal fluid in patients with neovascular age related macular degeneration treated with intravitreal ranibizumab:visual acuity outcome. // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. – 2015- vol. 253- P.1211–1216

129. Jager R.D., Mieler W.F., Miller J.W. Age-Related Macular Degeneration. // *N. Engl. J. Med*. – 2008 – vol. 358- P. 2606–2617.

130. Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2000 Vol.97. - № 18 – P. 10242-10247.

131. Jin, K.; Zhu, Y.; Sun, Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. // *Proc. Nat. Acad. Sci*. -2002 – Vol. 99. – P.11946-11950.

132. Johnston S.S., Wilson K.. Retrospective analysis of first-line anti-vascular endothelial growth factor treatment patterns in wet age-related macular degeneration. // *Adv Ther*. – 2013 – vol. 30(12)- P. 1111-1122

133. Kaiser R.S., Gupta O.P., Regillo C.D. Ranibizumab for eyes previously treated with pegaptanib or bevacizumab without clinical response. // *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. -2012- vol. 43(1) – P. 13–19.

134. Kaiser P.K., Blodi B.A., Shapiro H., Acharya N.R. Angiographic and Optical Coherence Tomographic Results of the MARINA Study of Ranibizumab in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. // *Ophthalmology*. – 2007-vol. 114 – P. 1868–1875

135. Keane PA, Liakopoulos S, Onhchin SC, et al., Quantitative subanalysis of optical coherence tomography after treatment with ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. // *Invest Ophthalmol Vis Sci* -2008- vol. 49- P.3115–3120.

136. Kent J.S., Iordanous Y., Mao A. Comparison of outcomes after switching treatment from intravitreal bevacizumab to ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration. // *Can J Ophthalmol.*- 2012- vol.47(2)- P.159–164.
137. Khan M., Aziz A.A., Shafi N.A., Abbas T., Khanani A.M. Targeting Angiopoietin in Retinal Vascular Diseases: A Literature Review and Summary of Clinical Trials Involving Faricimab. // *Cells.*-2020- vol. 9- P. 1869.
138. Klein R., Klein B.E., Linton K.L. Prevalence of Age-related Maculopathy. // *Ophthalmology.*- 2020- vol. 127- P.S122–S132.
139. Kovach J.L., Schwartz S.G., Flynn H.W. Jr, Scott I.U. Anti-VEGF treatment strategies for wet AMD. // *J Ophthalmol.* – 2012 vol. 12. – P. 2234
140. Krebs I., Glittenberg C., Ansari-Shahrezaei S. Non-responders to treatment with antagonists of vascular endothelial growth factor in age related macular degeneration. // *Br J Ophthalmol.* – 2013 vol. 97 – P. 1443–1446
141. Krohne T.U. Liu Z. Holz F.G. Meyer C.H. Intraocular pharmacokinetics of ranibizumab following a single intravitreal injection in humans. // *Am J Ophthalmol.*- 2012- vol. 154 (e682) – P. 682-686
142. Kumar N., Marsiglia M., Mrejen S. Visual and anatomical outcomes of intravitreal aflibercept in eyes with persistent subfoveal fluid despite previous treatments with ranibizumab in patients with neovascular age-related macular degeneration. // *Retina.* -2013- vol. 33(8)- P. 1605–1612
143. Kunimoto et al.: Efficacy and safety of abicipar in neovascular age-related macular degeneration: 52-week results of phase 3 randomized controlled study. // *Ophthalmology.* - 2020- vol.127 – P. 1331–1334.
144. Kunimoto D. Ohji M. Maturi R.K. et al. Evaluation of abicipar pegol (an anti-VEGF DARPin therapeutic) in patients with neovascular age-related macular degeneration: studies in Japan and the United States. // *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina.* – 2019 – vol. 50: e10-e22
145. Lalwani GA, Rosenfeld PJ, Fung AE, et al: A variable –dosing regimen with intravitreal ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: year 2 of the PrONTO Study. // *Am J Ophthalmol.*-2009 – Vol.48 – P.43-58.
146. Li J.Q., Welchowski T., Schmid M., Mauschitz M.M., Holz F.G., Finger R.P. Prevalence and incidence of age-related macular degeneration in Europe: A systematic review and meta-analysis. // *Br. J. Ophthalmol.* – 2019 – vol. 104 – P. 1077–1084.
147. Li D., Xie K., Ding G., Li J., Chen K, Tumor resistance to anti-VEGF therapy through up-regulation of VEGF-C expression. // *Cancer Lett.*- 2014- vol. 346- P. 45–52.

148. Lux A., Llacer H., Heussen F.M., Joussen A.M. Non-responders to bevacizumab (Avastin) therapy of choroidal neovascular lesions. // *Br J Ophthalmol.* – 2007 – vol. 91 – P. 1318–1322.
149. Maeshima Y., Yerramalla U.L., Dhanabal M., Holthaus K.A., Barbashov S., Kharbanda. Identification of the Anti-angiogenic Site within Vascular Basement Membrane-derived Tumstatin // *J. Biol. Chem.* – 2001. - Vol. 276. - P. 31959–31968
150. Maeshima, Y., Colorado, P. C. and Kalluri, R. Distinct Antitumor Properties of a Type IV Collagen Domain Derived from Basement Membrane// *J. Biol. Chem.* - 2000- Vol. 275. - P. 23745–23750
151. Maeshima, Y., Manfredi, M.. Extracellular Matrix-derived Peptide Binds to Integrin and Inhibits Angiogenesis// *J. Biol. Chem.*- 2001.- Vol. 276 - P. 15240–15248
152. Magali Saint-Geniez, Arindel S. R. Maharaj, Patricia A. D'Amore. Endogenous VEGF Is Required for Visual Function: Evidence for a Survival Role on Müller Cells and Photoreceptors. // *PLOS ONE.* 2008-03.-
153. Magnussen AL, Rennel ES, Hua J, Bevan HS, Beazley Long N, et al. VEGF-A165b is cytoprotective and antiangiogenic in the retina. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2010 vol. 51(8)- P. 4273-4281.
154. Marneros A.G, Douglas R Keene. Collagen XVIII/endostatin is essential for vision and retinal pigment epithelial function // *EMBO J.* 2004 vol. 23 - No 1- p. 89–99.
155. Marneros AG, Olsen BR. Age-dependent iris abnormalities in collagen XVIII/endostatin deficient mice with similarities to human pigment dispersion syndrome.// *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2003- vol.44 (6) - p.2367-2372.
156. Marneros AG, She H, Zambarakji H et al. Endogenous endostatin inhibits choroidal neovascularization. // *FASEB.* – 2007. – Vol. 21. – P. 3809-3818.
157. Marneros, A. G., Olsen, B. R. Physiological role of collagen XVIII and endostatin.// *FASEB J.* – 2005- vol. 19 - P.716-728
158. Marneros, A. G., Olsen, B. R. The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis. // *Matrix Biol.* – 2001. - Vol. 20 - P.337-345
159. Messenger W.B., Campbell J.P, Faridi A. Injection frequency and anatomic outcomes 1 year following conversion to aflibercept in patients with neovascular age-related macular degeneration. // *Br J Ophthalmol.*- 2014 – vol.98(9)- P. 1205–1207.
160. Michels S. Tachyphylaxie bei intravitrealer anti-VEGF Therapie? // *Retina* - 2009.
161. Michels S., Rosenfeld PJ., Puliafito CA, et al: Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration 12-week results of an uncontrolled open-label clinical study.// *Ophthalmology.*-2005- Vol.112 - P.1035-1047.

162. Miura M., Iwasaki T. Intravitreal aflibercept for polypoidal choroidal vasculopathy after developing ranibizumab tachyphylaxis. // *Clin Ophthalmol.* -2013- vol. 7 – P. 1591–1595.
163. Moon da R.C., Lee D.K., Kim S.H.. Aflibercept treatment for neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy refractory to anti-vascular endothelial growth factor. // *Korean J Ophthalmol.* -2015- vol.29(4) – P.226–232.
164. Mori K. Regression of ocular neovascularization in response to increased expression of pigment epithelium-derived factor. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2002. - Vol. 43. - P. 2428–2434
165. Nagai N, Lundh von Leithner P, Izumi-Nagai K. Spontaneous CNV in a novel mutant mouse is associated with early VEGF-A-driven angiogenesis and late-stage focal edema, neural cell loss, and dysfunction. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2014- vol. 55(6)- P. 3709-3719
166. Nishijima, K. Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. // *Am. J. Pathol.* - 1991. - Vol.74. - P. 767–773
167. Noel A., Lost M, Lambert V, et al. Anti-angiogenic therapy of exudative ages macular degeneration: current progress and emerging concepts.// *TRENDS in molecular Medicine* – 2007-Vol.13- No-8-P.345-352.
168. Ogata N., Nishikawa M. Inverse levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in the vitreous of eyes with rhegmatogenous retinal detachment and proliferative vitreoretinopathy. // *Am. J. Ophthalmol.* 2002- Vol. 133- P. 851–852.
169. Ogata N., Nishikawa M., Nishimura T. Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy.// *Am. J. Ophthalmol.* -2002- Vol. 134. - P.348– 353
170. Olli Arjamaa, Heikki Minn Resistance, not tachyphylaxis or tolerance // *Br J Ophthalmol* – 2012- vol. 30 – P.1823
171. Otsuji T., Nagai Y., Sho K. Initial non-responders to ranibizumab in the treatment of age-related macular degeneration (AMD) // *Clin Ophthalmol.*-2013- vol.7- P. 1487–1490.
172. Papadopoulos Z. Recent Developments in the Treatment of Wet Age-related Macular Degeneration. // *Curr Med Sci.* -2020-vol. 40(5) – P.851-857.
173. Papadopoulos Z. Aflibercept: A review of its effect on the treatment of exudative age-related macular degeneration // *European Journal of Ophthalmology* – 2019 -Vol 29 (4).
174. Pasco S., Monboisse J.C. and Kieffer N.J. The $\alpha 3(\text{IV})185\text{--}206$ Peptide from Noncollagenous Domain 1 of Type IV Collagen Interacts with a Novel Binding Site on the $\beta 3$ Subunit of Integrin $\alpha v\beta 3$ and Stimulates Focal Adhesion Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Phosphorylation.//*Biol. Chem.* -2000- Vol. 275 – P. 32999–33007

175. Passantini A., Taylor R.M., Pili R. Y.. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor, //Lab. Invest. -1992- vol. 67- P. 519–528
176. Patricia Becerra, Robert N. Fariss. Pfeffer Pigment epithelium-derived factor in the monkey retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: apical secretion and distribution // Experimental Eye Research - 2004-Vol. 78- № 2 – P. 223-234
177. Peden MC, Suñer IJ, Hammer ME, Grizzard WS. Long-term outcomes in eyes receiving fixed-interval dosing of anti-vascular endothelial growth factor agents for wet age-related macular degeneration.//Ophthalmology. -2015-vol. 122(4)- P. 803-808.
178. Pennington KL, DeAngelis MM. Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD): associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors. // Eye Vis (Lond) – 2016- vol. 3 – P.34.
179. Pikkil J., Attas S. What should I inject next? Challenging treatment decisions in the multiple anti-VEGF: a review of publications exploring anti-VEGF switching for nAMD. // *Int Ophthalmol.* -2018- vol 38 – P.2031–2039.
180. Pinheiro-Costa J. Switch to aflibercept in the treatment of neovascular AMD: one-year results in clinical practice. // *Ophthalmologica.* – 2015- vol. 233(3–4)- P. 155–161.
181. Plückthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPs): binding proteins for research, diagnostics, and therapy // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* -2015- vol. 55 – P. 489-511
182. Punjabi O.S, Huang J., Rodriguez L. Imaging characteristics of neovascular pigment epithelial detachments and their response to anti-vascular endothelial growth factor therapy. // *Br J Ophthalmol* - 2013 – vol. 97(8)- P.1024–1031.
183. Prem Patel and Veeral Sheth* New and Innovative Treatments for Neovascular Age-Related Macular Degeneration (nAMD). // *J Clin Med.*-2021 – vol. 10(11)- P. 2436.
184. Razavi S., Kodjikian J., Giocanti-Auregan A. Efficacy and safety of intravitreal aflibercept in ranibizumab-refractory patients with neovascular age-related macular degeneration BMC //Ophthalmol. -2021-vol.21 – P.90
185. Reich SJ, Fosnot J, Kuroki A. et al. Small interfering RNA targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. // *Mol. Vas.*2003-Vol.9.-P.210-216.
186. Rich RM, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, et al.: Short-term safety and efficacy of intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. // *Retina.*-2006- vol. 26- P.495-511

187. Rodrigues G.A. Mason M. Christie L.A. et al. Functional characterization of abicipar-pegol, an anti-VEGF DARPIn therapeutic that potently inhibits angiogenesis and vascular permeability. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2018- vol. 59 – P. 5836-5846
188. Rofagha S., Bhisitkul R.B., Boyer D.S., Sadda S.R., Zhang K. SEVEN-UP Study Group Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: a multicenter cohort study (SEVEN-UP). // *Ophthalmology.* 2013- vol. 120(11)- P. 2292–2299.
189. Rosenfeld P.J. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration.// *N. Engl. Med.* -2006.- Vol.355- P.1419-1431
190. Rosenfeld PJ, Fung AE, Puliafito CA, et al:Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for macular edema from central retinal vein occlusion. // *Ophthalmic Surg Lasers Imaging.* -2005- Vol.36- P.336-339.
191. Rosenfeld P.J., Brown D.M., Heier J.S. MARINA Study Group Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. // *N Engl J Med.* – 2006 vol.355(14)- P.1419–1431.
192. Samanta A., Aziz A.A, Emerging Therapies in Neovascular Age-Related Macular Degeneration in 2020. // *Asia Pac. J. Ophthalmol. (Phila.)*-2020 – vol. 9 - P.250–259.
193. Sbalaby F, Rossant J., Yamagushi T.P. et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice // *Nature.*-1995.- Vol. 376.-P.62-66
194. Schaal S, Kaplan HJ, Tetzl TH. Is there tachyphylaxis to intravitreal anti-vascular endothelial growth factor pharmacotherapy in age-related macular degeneration? // *Ophthalmology* 2008- vol. 115- P. 2199–2205.
195. Schmidt-Erfurth, Eldem B, Guymer R, et al.: on behalf of the EXCITE Study Group: Efficacy and safety of monthly versus quarterly ranibizumab treatment in neovascular age-related macular degeneration. // *Ophthalmology.* -2010. Vol. 6 – P. 124-129
196. Schütze C, Wedl M, Baumann B, Pircher M. Progression of retinal pigment epithelial atrophy in antiangiogenic therapy of neovascular age-related macular degeneration. // *Am J Ophthalmol.* -2015- vol. 159(6) – P. 1100-1114.e1
197. Sertie A.L., Sossi V. Collagen XVIII, containing an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, plays a critical role in the maintenance of retinal structure and in neural tube closure (Knobloch syndrome). // *Hum. Mol. Genet.* - 2000. - Vol.9 – P. 2051-2058
198. Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W. L. A requirement for flk-1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. // *Cell* – 1997. – Vol. 89. - P. 981–990
199. Shen J., Samul R., Silva RL. Et al. Suppression of ocular neovascularization with sirRNA targeting VEGF receptor 1. // *Gen Ther* 2006-Vol.13-P.22250-234.

200. Shin J.Y., Woo S.J., Ahn J., Park K.H. Anti-VEGF-refractory exudative age-related macular degeneration: differential response according to features on optical coherence tomography. // *Korean J Ophthalmol.* -2013-vol. 27(6) – P. 425–432.
201. Singerman LJ: Combination therapy using the small interfering RNA bevasiranib. // *Retina.*- 2009- suppl. 49-50.
202. Singh R.P., Srivastava S., Ehlers J.P. A single-arm investigator-initiated study of the efficacy, safety and tolerability of intravitreal aflibercept injection in subjects with exudative age-related macular degeneration, previously treated with ranibizumab or bevacizumab: 6-month interim analysis. // *Br J Ophthalmol.* – 2014 – vol. 98(1):i22–i27.
203. Slakter J.S. What to do when anti-VEGF therapy fails. // *Retin Physician.* 2010.
204. Spaide RF, Laud K: Intravitreal bevacizumab treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. // *Retina.*-2006.- Vol.26.- P.389-390.
205. Spaide RF . Rationale for combination therapy in age-related macular degeneration. // *Retina* 2009- vol. 29(6):S5–7.
206. Spaide R.F., Jaffe G.J. et al. Consensus Nomenclature for Reporting Neovascular Age-Related Macular Degeneration Data. // *Ophthalmology.* 2020;- vol.127 – P. 616–636.
207. Spranger J, Osterhoff M. Loss of the antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in patients with angiogenic eye disease.// *Diabetes.* – 2001. - Vol.50- P.2641–2645.
208. Souied E.H. Devin F. Mauget-Faysse M. et al. Treatment of exudative age-related macular degeneration with a designed ankyrin repeat protein that binds vascular endothelial growth factor: a phase I/II study. // *Am J Ophthalmol.* -2014- vol. 158 (e722)- P. 724-732
209. Steele, F. R., Chader, G. J. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1993. – Vol. 90.- P. 1526–1530
210. Stellmach, V., Crawford, S. E., Zhou, W., and Bouck, N. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2001. - Vol. 98- P. 2593–2597
211. Stewart M.W., Rosenfeld P.J., Penha F.M. Pharmacokinetic rationale for dosing every 2 weeks versus 4 weeks with intravitreal ranibizumab, bevacizumab, and aflibercept (vascular endothelial growth factor Trap-eye). // *Retina.* -2012- vol. 32(3) – P. 434–457.
212. Sulzbacher F. Roberts P. Relationship of retinal morphology and retinal sensitivity in the treatment of neovascular age-related macular degeneration using aflibercept. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* -2014.- vol. 56- P. 1158-1167

213. Susanne Binder Loss of reactivity in intravitreal anti-VEGF therapy: tachyphylaxis or tolerance? // *Br J Ophthalmol* – 2012 – vol. 96 – P.1-2.
214. Szaflik JP, Wysocki T. An association between vascular endothelial growth factor gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy. // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. - 2008. – Vol. 246 - № 1 – P. 39-43.
215. Taban M, Sharma S, Williams DR, et al. Comparing retinal thickness measurements using automated fast macular thickness map versus six-radial line scans with manual measurements. // *Ophthalmology*. -2009- vol.116 – P. 964–970.
216. Takahashi Kyoichi, Yoshitsugu Saishin, Yumiko Saishin et al. Intraocular expression of endostatin reduces VEGF-induced retinal vascular permeability, neovascularization, and retinal detachment. // *FASEB J*. -2001- Vol. 17. – P. 896-898
217. Takahashi T., Yamaguchi S., Chida K A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. // *EMBO J*. -2001- Vol. 20. - P. 2768–2778
218. Tatar O, Shinoda K, Adam A, Rohrbach JM. Expression of endostatin in human choroidal neovascular membranes secondary to age-related macular degeneration. // *Eye Experimental Research*. – 2006. - Vol. 83- № 2 - P 329-338
219. Tombran-Tink J, Barnstable CJ. PEDF: a multifaceted neurotrophic factor // *Nat Rev Neurosci*. -2003. – Vol. 4 – P. 628-636
220. Tombran-Tink J, Chader G, Johnson LV. PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. // *Exp Eye Res*. – 1991. – Vol. 53-P. 411-414.
221. Tombran-Tink, J., Mazuruk, K., Rodriguez, I. R. Organization, Evolutionary Conservation, Expression and Unusual Alu Density of the Human Gene for Pigment Epithelium-Derived Factor, a Unique Neurotrophic Serpin // *Mol. Vis*. – 1996- Vol. 2. – P. 11
222. Tong, J.P. Contribution of VEGF and PEDF to choroidal angiogenesis: A need for balanced expressions. // *Clin. Biochem*. – 2006. - Vol. 39. - P. 267–273.
223. Tozer K., Roller A.B., Chong L.P. Combination therapy for neovascular age-related macular degeneration refractory to anti-vascular endothelial growth factor agents. // *Ophthalmology*.- 2013- vol. 120(10)- P. 2029–2034.
224. Tranos P., Vacalis A. Resistance to antivascular endothelial growth factor treatment in age-related macular degeneration. // *Drug Des Devel Ther*.- 2013 – vol. 7- P. 485–490.
225. US Census Bureau Population Division. National Population Projections, Summary Tables: (NP-T4) Projections of the Total Resident Population by 5-Year Age Groups, Race, and Hispanic Origin with Special Age Categories: Middle Series, 1999 to 2100. Washington DC: US Census Bureau; 2020.

226. Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, Reiher F. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. // *Nat Med.* – 2002. Vol. 8. – P.349–357.
227. Wang Z., Li M., Yao Y. J // *Ophthalmol.* -2020 –vol. 7;- P. 934.
228. Wykoff C.C., Clark W.L., Nielsen J.S. Optimizing Anti-VEGF Treatment Outcomes for Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration. // *J Manag Care Spec Pharm.* - 2018 – vol. 24 (2Suppl):S3–S15.
229. Xinyu Zhao, Lihui Meng, Youxin Chen. Comparative efficacy and safety of different regimens of ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: a network meta-analysis of randomised controlled trials. // *BMJ Open.* - 2021- vol. 11(2): e040906.
230. Yamashiro K, Tsajikawa A, Miamoto K. Sterile endophthalmitis after intravitreal injection of bevacizumab obtained from a single batch. // *Retina.* – 2010- Vol. 30 –P.485-490.
231. Ying G.S., Huang J., Maguire M.G. Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials Research Group Baseline predictors for one-year visual outcomes with ranibizumab or bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2013;120(1):122–129
232. Yeou-Ping Tsao, Tsung-Chuan Ho. Pigment epithelium-derived factor inhibits oxidative stress-induced cell death by activation of extracellular signal-regulated kinases in cultured retinal pigment epithelial cells // *Life Sciences.*- 2006.- Vol. 79. -№ 6. – P. 545-550.
233. Yonekawa Y.. Conversion to aflibercept for chronic refractory or recurrent neovascular age-related macular degeneration. // *Am J Ophthalmol.* 2013- vol. 156(1) - 29–35.e22.
234. Yoshihara N., Terasaki H., Shirasawa M. et al. Permeability and anti-vascular endothelial growth factor effects of bevacizumab, ranibizumab, and aflibercept in polarized retinal pigment epithelial layer in vitro // *Retina* – 2017. – Vol. 37, № 1. – P. 179 –190]
235. Zhang Guang-mei, Zhang Ying-mei. Effects of cloned tumstatin-related and angiogenesis-inhibitory peptides on proliferation and apoptosis of endothelial cells. // *Chinese Medical Journal.* – 2008 - Vol. 121- No.22.- P -2324-2330.
236. Zois Papadopoulos Aflibercept: A review of its effect on the treatment of exudative age-related macular degeneration // *European Journal of Ophthalmology* - Vol 29, Issue 4, 2019
237. Zuber-Laskawiec K., Kubicka-Trzaska A., Karska-Basta I. Non-responsiveness and tachyphylaxis to anti-vascular endothelial growth factor treatment in naive patients with exudative age-related macular degeneration. // *J. Physiol. Pharmacol.*- 2019 – vol. 70 – P.2345