

На правах рукописи

КОЗЛОВА КСЕНИЯ ИГОРЕВНА

**НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ У БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНОЙ
ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ**

14.01.07. – глазные болезни

14.03.03. – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2017

Работа выполнена на базах ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России и ГБУЗ «Научно-практический психоневрологический центр Департамента здравоохранения г. Москвы».

Научные руководители: доктор медицинских наук, профессор
Шпак Александр Анатольевич
доктор биологических наук, профессор
Гуляева Наталия Валерьевна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор кафедры офтальмологии ИПК ФМБА России, заведующая консультативно-диагностическим отделением, врач высшей категории
Курышева Наталия Ивановна

доктор медицинских наук, доцент,
заведующий кафедрой общей патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова
медицинского института РУДН
Благонравов Михаил Львович

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И.Евдокимова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «23» октября 2017 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д.208.014.01 при ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова» Минздрава России по адресу: 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Автореферат разослан _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

И.А. Мушкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Глаукома продолжает занимать лидирующее место в структуре инвалидности по зрению, несмотря на успехи в ранней диагностике, наличие большого выбора консервативных и хирургических методов лечения (Либман Е.С., 2004; Нестеров А.П., 2000; Егоров Е.А. и др., 2008; Нероев В.В. и др., 2013). Столь угрожающая статистика свидетельствует о серьезных трудностях, связанных как с пониманием природы, так с диагностикой и лечением этого заболевания.

В последние годы все большее внимание уделяется изучению механизмов развития первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ), не зависящих от уровня внутриглазного давления (ВГД). В литературе имеются данные, рассматривающие глаукому как заболевание, занимающее промежуточное положение между неврологической и офтальмологической патологией (Gupta N. et al., 2007; McKinnon S.J., 2004). Современные исследования обнаруживают сходство глаукомы с нейродегенеративными заболеваниями, в частности с болезнью Альцгеймера (Bayer A.U. et al., 2002; Gupta N. et al., 2007).

В настоящее время принято считать, что глаукома является мультифакторным нейродегенеративным заболеванием, одной из основных патофизиологических характеристик которого является необратимое повреждение ганглиозных клеток сетчатки (Еричев В.П., 2012; Акопян В.С., 2011). Развитие глаукомы обусловлено целым рядом патогенетических механизмов, включающих не только повышение ВГД, но и нарушение ауторегуляции, развитие ишемии, дефицит нейротрофических факторов, глутамат-индуцированную эксайтотоксичность, иммунологические нарушения, нарушение метаболизма кальция, оксидативный стресс (Егоров Е.А., 2014). Поэтому наряду с совершенствованием методов снижения офтальмотонуса важное значение в лечении ПОУГ приобретают поиски нейропротекторной терапии. Такое лечение может стать дополнением к гипотензивной терапии, а также использоваться в качестве монотерапии.

В последние годы во всех разделах медицины большое внимание уделяется нейротрофическим и ростовым факторам – биологическим регуляторам переживания, дифференцировки и роста клеток, организации основных физиологических процессов (Гомазков О.А., 2011; Squire L. et al., 2008). На данный момент известно больше 10 нейротрофических факторов, однако, особого внимания заслуживают нейротрофический фактор головного мозга (НФГМ) и цилиарный нейротрофический фактор (ЦНТФ).

Исследования НФГМ в клинике особенно широко проводятся при неврологических, в первую очередь, нейродегенеративных заболеваниях, таких, как болезни Альцгеймера, Паркинсона и др. (Chen L. et al., 2011; Tapia-Arancibia L. et al., 2008). В офтальмологии НФГМ изучали преимущественно в экспериментальных исследованиях на животных (Ko M.L. et al., 2001; Iwabe S. et al., 2007; Martin K.R. et al., 2003; Yu S. et al., 2006) и культурах клеток (Wordinger R.J. et al., 2000; Taylor S. et al., 2003). На моделях глаукомы показана важная роль НФГМ для выживания ганглиозных клеток сетчатки (Ko M.L. et al., 2001; Martin K.R. et al., 2003).

В офтальмологии большой интерес вызывает ЦНТФ, что во многом связано с созданием компанией Neurotech (США) импланта NT-501, способного длительно продуцировать ЦНТФ внутри глаза. Клиническая апробация импланта проводилась или проводится при пигментной дегенерации сетчатки, географической атрофии и других заболеваниях (Zhang K. et al., 2011; Kauper K. et al., 2012; Birch D.G. et al., 2013).

Однако у человека оценка содержания указанных факторов основывается только на исследованиях слезной жидкости (СЖ). Предпринимались попытки оценки НФГМ в СЖ и сыворотке крови (СК) у пациентов с глаукомой (Шпак А.А. и др., 2006, Курышева Н.И. и др., 2006, Ghaffariyeh A. et. al., 2009, 2011).

Вместе с тем отсутствует информация о том, как содержание этих факторов в слезе характеризует их изменения внутри глаза. На практике исследование данных факторов во внутриглазных структурах человека возможно только в ходе плановых оперативных вмешательств.

Таким образом, не вызывает сомнений актуальность изучения нейротрофических факторов во внутриглазных структурах больных глаукомой, а также оценки возможности косвенного определения содержания нейротрофических факторов во влаге передней камеры (ВПК) на основе исследования СЖ больных с глаукомой.

Цель: изучить содержания нейротрофического фактора головного мозга и цилиарного нейротрофического фактора во влаге передней камеры, слезной жидкости и сыворотке крови у больных с первичной открытоугольной глаукомой.

Задачи исследования:

1. Определить классификацию нарушений полей зрения, обеспечивающую наиболее детальную характеристику прогрессирования глаукомного процесса.
2. Оценить влияние возрастной катаракты на содержание НФГМ и ЦНТФ в слезной жидкости и сыворотке крови.
3. Изучить содержание НФГМ в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у пациентов с ПОУГ и характер его изменений по мере прогрессирования глаукомы.
4. Изучить соотношения концентраций НФГМ в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у пациентов с возрастной катарактой без и в сочетании с ПОУГ.
5. Изучить содержание ЦНТФ в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у пациентов с ПОУГ и характер его изменений по мере прогрессирования глаукомы.
6. Изучить соотношения концентраций ЦНТФ в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у пациентов с возрастной катарактой без и в сочетании с ПОУГ.

7. Разработать неинвазивные способы оценки содержания НФГМ и ЦНТФ во влаге передней камеры больных с ПОУГ.

Научная новизна

1. Определена периметрическая классификация, обеспечивающая наиболее детальную характеристику прогрессирования глаукоматозного процесса.
2. Впервые доказано, что возрастная катаракта не оказывает существенного влияния на содержание НФГМ и ЦНТФ в СЖ и СК.
3. Впервые изучено содержание НФГМ во влаге передней камеры больных с ПОУГ; установлен характер изменений концентрации НФГМ во ВПК, СЖ и СК по мере прогрессирования глаукомы.
4. Впервые определены соотношения концентраций НФГМ во влаге передней камеры, слезной жидкости и сыворотке крови у больных с ПОУГ и возрастной катарактой.
5. Впервые изучено содержание ЦНТФ во влаге передней камеры, СЖ и СК больных с ПОУГ и характер его изменений по мере прогрессирования глаукомы.
6. Впервые определены соотношения концентраций ЦНТФ во влаге передней камеры, слезной жидкости и сыворотке крови у больных с ПОУГ и возрастной катарактой.
7. Впервые предложены способы оценки содержания НФГМ и ЦНТФ во влаге передней камеры на основе данных исследования слезной жидкости.

Практическая значимость

Предложенная в работе схема последовательной оценки взаимозависимости концентраций нейротрофических факторов во ВПК и СЖ у больных ПОУГ может быть использована для изучения других цитокинов и

иных биологически активных веществ в целях разработки неинвазивных способов оценки их содержания во ВПК.

Предложенные способы оценки содержания НФГМ и ЦНТФ во ВПК будут полезны для определения эффективности клинического применения этих и других цитокинов или иных лечебных воздействий, в том числе при динамическом наблюдении или при сравнительных исследованиях.

Для более детальной характеристики прогрессирования глаукоматозного процесса в учреждениях, оснащенных компьютерными периметрами, рекомендовано использование классификации Mills et al.

Основные положения, выносимые на защиту

Возрастная катаракта не оказывает существенного влияния на содержание НФГМ и ЦНТФ в слезной жидкости и сыворотке крови.

У пациентов с ПОУГ существенно снижено содержание НФГМ и ЦНТФ во ВПК и СЖ, а также уровень НФГМ в СК. НФГМ и ЦНТФ демонстрируют различный характер изменений в зависимости от стадии глаукоматозного процесса: концентрация НФГМ во всех изученных биологических жидкостях минимальна в начальной стадии ПОУГ, в то время как содержание ЦНТФ во ВПК и СЖ демонстрирует наибольшее снижение у пациентов с тяжелой ПОУГ.

Концентрации НФГМ и ЦНТФ во ВПК пациентов с ПОУГ могут быть приближенно определены по их содержанию в СЖ с использованием предложенных расчетных формул.

Внедрение в практику

Разработанные методики неинвазивной оценки содержания НФГМ и ЦНТФ во ВПК внедрены в практическую деятельность головной организации ФГАУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздрава России и ГБУЗ «Научно-практический психоневрологический центр Департамента здравоохранения г. Москвы».

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы представлены на Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы офтальмологии» (Москва, 2014); еженедельных научно-практических конференциях ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России (Москва, 2016, 2017); конгрессе Российского Глаукомного общества (Москва, 2016); научно-практической конференции с международным участием «IX Российский общенациональный офтальмологический форум» (Москва, 2016); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения» (Москва, 2017); ежегодных конференциях Ассоциации исследователей в области зрения и офтальмологии – ARVO (Сиэтл, США, 2016; Балтимор, США, 2017).

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 9 научных работ, из них 3 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Получен 1 патент на изобретение № 2617066 от 1.04.2016.

Объем и структура публикации

Диссертация изложена на 111-ти страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, 4-х глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Список литературы включает 40 отечественных и 110 иностранных источников. Диссертация иллюстрирована 10-ю таблицами, 6-ю рисунками.

Диссертация входит в план раздела 2 по государственному заданию ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова» Минздрава России за 2014-2017 гг. (УДК 617.7 № гос. регистрации АААА-А17-117040410115-9).

Иммуноферментный анализ выполнялся на базе лаборатории ГБУЗ «НПЦ им. Соловьева ДЗМ» к.б.н. Дружковой Т.А. под руководством и контролем профессора, д.б.н. Гуляевой Н.В.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Общая характеристика пациентов. В исследование были включены 165 человек (165 глаз), из них 55 человек были отнесены в основную группу – пациенты с катарактой и сопутствующей ПОУГ различной степени выраженности; 66 человек – в группу сравнения – пациенты с возрастной катарактой; 29 человек – в контрольную группу – испытуемые без офтальмологической патологии; и 15 здоровых добровольцев, на слезной жидкости которых проводилась отработка методик определения нейротрофических факторов. Не было достоверных отличий по возрасту и полу между группами.

Критериями включения для всех групп испытуемых были: возраст старше 50 лет, длина глаза менее 26 мм, у пациентов – неосложненная операция факоэмульсификации катаракты с имплантацией ИОЛ, истинное ВГД не выше 20, при глаукоме – 25 мм рт.ст.

Критериями исключения были: тяжелая сопутствующая глазная патология, гиперметропия высокой степени и серьезные соматические заболевания. Допускались отдельные сопутствующие заболевания, такие как гипертоническая болезнь 1-2 стадии, мерцательная аритмия и т.п. в стадии компенсации.

В основную группу и группу сравнения были включены пациенты, которым выполнялась ФЭК+ИОЛ одним хирургом на базе МНТК «МГ». Контрольную группу составили испытуемые, проходившие диспансеризацию на базе ГБУЗ «НПЦ им. Соловьева».

Методы обследования. Всем пациентам проводили комплексное офтальмологическое обследование, включавшее авторефрактометрию, визометрию без коррекции и с коррекцией, периметрию, тонометрию,

тонографию, биомикроскопию, офтальмоскопию, ультразвуковую эхобиометрию, электрофизиологические исследования (определение порога электрической чувствительности и электрической лабильности), пациентам основной группы и группы сравнения проводилась компьютерная периметрия (КП). Спектральную оптическую когерентную томографию (ОКТ) и гониоскопию проводили только пациентам основной группы.

ОКТ производили для оценки перипапиллярного слоя нервных волокон сетчатки, параметров диска зрительного нерва и слоя ганглиозных клеток сетчатки с внутренним плексиформным слоем. КП выполняли по программе «30-2 SITA standard», которая включает исследование 76 точек центрального поля зрения, расположенных в пределах 30° от точки фиксации с шагом в 4°. У пациентов с ПОУГ стадии заболевания определяли в сравнительном аспекте по классификациям Нестерова-Бунина, Mills et al., Hodapp-Parrish-Anderson и Brusini P.

Статистическую обработку проводили на персональном компьютере с использованием программ Excel и R. Нормально распределенные данные представлены в формате $M \pm \sigma$. Сравнение таких количественных признаков в двух группах проводили с применением t-теста Уэлча, в трех и более группах – методом дисперсионного анализа с последующим попарным сравнением с использованием метода Холма для коррекции эффекта множественных сравнений. В тех случаях, когда количественные данные в большинстве групп и подгрупп не имели нормального распределения, а часть подгрупп имела малый объем, данные представлены в формате: медиана (интерквартильный размах). Для их сравнения использовали непараметрические методы: при сравнении двух групп – U-критерий Манна-Уитни, при сравнении трех и более групп – критерий Крускала-Уоллиса с последующим попарным сравнением с использованием метода Холма для коррекции эффекта множественных сравнений. Качественные признаки сравнивали с использованием точного критерия Фишера. Соотношения количественных признаков оценивали методами линейной регрессии и корреляционного анализа по Пирсону.

Зависимость при коэффициенте корреляции r (по абсолютной величине) 0,2-0,39 считалась слабой, 0,4-0,59 – умеренной, 0,6-0,79 – сильной. Статистически значимым считали уровень $P < 0,05$.

Клинико-лабораторные методы исследования

Для определения нейротрофических факторов в сыворотке использовали периферическую кровь, взятую натощак из локтевой вены в стерильных условиях в количестве 5 мл. Для получения сыворотки образцы крови центрифугировали со скоростью 3000 об/мин в течение 15 минут, затем сыворотку аликвотировали и замораживали при температуре ниже -20 °C и хранили от 1 до 4 месяцев без повторных циклов размораживания и оттаивания. Непосредственно перед анализом все исследуемые сыворотки и компоненты тест-системы прогревали при комнатной температуре.

Для определения нейротрофических факторов в СЖ использовали стимулированную слезу, взятую вечером в день перед операцией в количестве 70-120 мкл из нижнего конъюнктивального свода пипеточным дозатором.

Для определения нейротрофических факторов во ВПК использовали влагу, взятую из передней камеры после парацентеза роговицы с помощью канюли на инсулиновом шприце в объеме 100-120 мкл, во время проведения фактоэмульсификации катаракты.

Образцы биологических жидкостей помещали в стерильные пробирки типа эппендорф, замораживали при температуре ниже -20 °C и хранили от 1 до 4 месяцев без повторных циклов размораживания и оттаивания. Непосредственно перед тестированием биологический материал размораживали при комнатной температуре, центрифугировали 10 минут со скоростью 4000 об/мин.

Концентрацию НФГМ в СК определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора «Human BDNF Immunoassay» фирмы R&D Systems (США). Концентрацию НФГМ в СЖ и ВПК определяли методом твердофазного ИФА с использованием набора «The BDNF Emax® ImmunoAssay System» фирмы Promega Corporation (США) строго по

протоколу исследования, предложенному фирмой производителем набора [www.promega.com].

Концентрацию ЦНТФ в СК, СЖ и ВПК определяли методом ИФА с использованием набора «Human CNTF Immunoassay» фирмы R&D Systems (США). Учитывая, что собранное у пациентов количество СЖ и ВПК было существенно меньше, чем необходимо для тестирования указанным методом, приходилось разбавлять биологический материал. Для рабочего варианта тестирования ЦНТФ было выбрано разведение проб СЖ и ВПК в соотношении 1:3 (в 4 раза) с последующим кислотным гидролизом разведенных проб по методике, предложенной Okragly A.J., Naak-Frendscho M. (1997 г.), для увеличения содержания свободной формы ЦНТФ в вышеуказанном биологическом материале и повышения его доступности для определения.

Во всех приведенных исследованиях оптическую плотность проб СК СЖ и ВПК измеряли на автоматическом иммуноферментном анализаторе ChemWell® 2910 (Combi), используя основной фильтр 450 нм, отсекающий – 630 нм. Расчет концентрации образцов проводили автоматически по калибровочной кривой кубический сплайн.

Результаты исследований

Дооперационное обследование пациентов основной группы. В исследование вошли 55 пациентов (55 глаз) с ПОУГ различной степени выраженности и катарактой в возрасте от 55 до 84 лет (средний возраст – $72,36 \pm 6,18$ лет), среди них мужчин – 23 (41,8%), женщин – 32 (58,2%).

Длительность течения глаукомы от момента постановки диагноза составляла от 1 до 120 месяцев (в среднем $32,15 \pm 25,1$ месяцев). Микроинвазивная непроникающая глубокая склерэктомия была выполнена ранее у 31 пациента, из них у 3 человек дважды, у 15 дополнена в последующем лазерной десцеметогониопунктурой. У одного пациента была выполнена

глубокая склерэктомия, у двух селективная лазерная трабекулопластика. Все операции были выполнены не ранее, чем за 3 месяца до операции ФЭК+ИОЛ.

Гипотензивную терапию применяли 48 человек. Подавляющее большинство (40 человек) инстиллировали β -блокаторы, значительно меньшая доля (23 и 15 человек) – аналоги простагландинов и ингибиторы карбоангидразы соответственно, всего 5 человек – агонисты α_2 -адренорецепторов. Из них 29 человек применяли два и более вида препаратов, в том числе комбинированные.

Некорригированная острота зрения составляла в среднем $0,17 \pm 0,16$, острота зрения с максимальной коррекцией – $0,34 \pm 0,21$; ВГД – $17,2 \pm 4,1$ мм рт. ст., длина переднезадней оси глаза – $23,3 \pm 0,8$ мм.

При биомикроскопии во всех случаях передний отрезок глаза был спокойным, роговица прозрачной, передняя камера средней глубины, фako- и иридоноз отсутствовали. Были выявлены помутнения хрусталика различной степени выраженности. Четких клинически выраженных признаков псевдоэксфолиативного синдрома выявлено не было.

По данным гониоскопии у всех обследуемых угол передней камеры был открыт, средней ширины, определялась слабая пигментация структур дренажной зоны (0-1 степень).

При офтальмоскопии, которая была проведена не в полном объеме в связи с наличием помутнений в слоях хрусталика, были выявлены изменения ДЗН: побледнение различной степени выраженности, увеличение размера экскавации, сдвиг сосудистого пучка к носу, наличие зоны перипапиллярной атрофии.

Послеоперационное обследование пациентов. На следующий день после операции средняя максимально корригированная острота зрения составила $0,69 \pm 0,19$. Среднее значение ВГД было $20,4 \pm 4,1$ мм рт.ст. У 7 пациентов потребовалось назначение дополнительного гипотензивного препарата для снижения ВГД в послеоперационном периоде. У всех этих пациентов была

развитая или далекозашедшая стадии глаукомы. Средние значения остроты зрения и ВГД в зависимости от стадии ПОУГ представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Распределение пациентов по стадиям ПОУГ (классификация Mills et al., 2006), средние показатели остроты зрения и ВГД в зависимости от стадии ПОУГ

Стадия	Количество, n	Острота зрения	ВГД
1 – Начальная (Early defect)	9	0,76±0,14	18,0±2,7
2 – Развитая (Moderate defect)	12	0,76±0,13	19,7±2,5
3 – Далекзашедшая (Advanced defect)	18	0,71±0,19	21,3±3,7
4 – Тяжелая (Severe defect)	16	0,58±0,23	21,4±5,4

Для решения одной из поставленных задач было проведено сравнение 4-х наиболее часто используемых в клинике классификаций стадий ПОУГ. Распределение пациентов основной группы по стадиям ПОУГ в зависимости от параметра VFI представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Изменения параметра Visual Field Index (VFI) по стадиям глаукомы при использовании различных классификаций ПОУГ

Стадия	Параметр	Классификация (авторы)			
		Mills et al.	Hodapp-Parrish-Anderson	Brusini	Нестеров-Бунин
1. Начальная (early defect)	n	9	9	3	17
	M±σ	91,3±3,57	91,3±3,57	92,3±5,03	90,5±3,2
	Min-max	85-97	85-97	87-97	84-97
2. Развитая (moderate defect)	n	12	13	11	16
	M±σ	87,8±3,38	87,2±3,9	91,1±1,7	64,6±17,1
	Min-max	82-92	80-92	87-94	38-87
3. Далекозашедшая (advanced defect)	n	18	33	9	22
	M±σ	56,1±12,4	39,8±21,1	83,9±3,5	31,7±19,8
	Min-max	38-80	2-78	78-89	2-67
4. Тяжелая (Severe defect)	n	16		14	
	M±σ	23,9±17,2		55,1±8,9	
	Min-max	2-55		46-75	
5. Тяжелая 2 (Severe defect)	n			18	
	M±σ			24,3±16,9	
	Min-max			2-55	

Примечание: n – число пациентов, M – среднее значение VFI.

Как видно из таблицы 2, все классификации достаточно равномерно описывали 1-ую стадию процесса. К 1-ой и 2-ой стадиям по классификации Нестерова-Бунина относится больше пациентов, что затушевывает факт позднего выявления глаукомы у части пациентов и/или не своевременно отражает переход процесса в далекозашедшую стадию. Классификация Hodapp-Parrish-Anderson наоборот хорошо выявляет начальную и развитую стадии процесса, но 3-я стадия включает чрезмерно большое количество пациентов, что подтверждается очень широким диапазоном значений VFI. Классификация Brusini et al. выделяет в качестве начальной стадии совершенно незначительные изменения поля зрения, которые встречались лишь у 3 пациентов. Очевидно, что выделение этой стадии не имеет существенного практического значения.

Последующие стадии во многом соответствуют классификации Mills et al. со смещением на 1 ступень. Хотя эта классификация выглядит более детальной, но, по существу, она мало что дает в практическом отношении. Следует учитывать, что эта классификация патентованная, что требует дополнительной оплаты при ее официальном применении. Кроме того, она чувствительна к помутнениям оптических сред глаза, а так как у всех пациентов обязательным сопутствующим диагнозом была катаракта, использование данной классификации до операции было невозможно.

На фоне остальных классификации предпочтительной выглядела классификация Mills et al. Эта классификация так же, как и другие классификации, основанные на использовании метода статической компьютерной периметрии, позволяла четко выделять начальную и развитую стадии ПОУГ. По сравнению с наиболее распространенной классификацией Hodapp-Parrish-Anderson внесен очень важный элемент: продвинутая (далекозашедшая) стадия делится на две с выделением стадии тяжелой глаукомы. Это позволяет фиксировать прогрессирование и у пациентов с далекозашедшей стадией болезни, что чрезвычайно важно в практическом отношении. Поэтому именно классификация Mills et al. была избрана для использования в настоящей работе.

Хотелось бы отметить неравномерное количество больных по стадиям ПОУГ. Вероятнее всего это связано с поздней диагностикой глаукомы, так как на ранних стадиях выявить патологический процесс очень сложно из-за отсутствия специфической симптоматики и большинство пациентов обращается за помощью на поздних стадиях.

Результаты исследования нейротрофических факторов.

Основной материал исследования составили пациенты с катарактой. Выбор данного контингента пациентов объяснялся широкой распространенностью заболевания, частой необходимостью хирургического лечения (в том числе относительной простотой получения влаги передней

камеры при факоэмульсификации катаракты), относительно доброкачественным течением, которое не сопровождается существенными изменениями воспалительного или иммунного характера, во многом благодаря тому, что хрусталик является бессосудистой и лишенной нервов структурой. Однако для решения немаловажной задачи оценки влияния возрастной катаракты на содержание нейротрофических факторов в СЖ и СК, необходимо было сравнить больных, оперируемых по поводу неосложненной катаракты со здоровыми испытуемыми аналогичного возраста. Для решения данной задачи в группе сравнения была выделена подгруппа больных сходного возраста и пола путем исключения пациентов моложе 61 и старше 75 лет (подгруппа катаракты 61-75 лет). Данные представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3 – Возраст, пол и содержание НФГМ в СЖ и СК (пг/мл) у пациентов с возрастной катарактой (подгруппа 61-75 лет) и здоровых испытуемых, $M \pm \sigma$ (Min-Max)

	Подгруппа катаракты 61-75 лет (n=33*)	Контрольная группа (n=29**)
Возраст, лет	68,5±4,3 (61-75)	67,5±4,7 (61-78)
Пол, м / ж	9 / 24	9 / 20
НФГМ в СЖ	117,0±44,1 (25,0-196,0)	110,7±26,2 (59,0-201,4)
НФГМ в СК	23170±7070 (8450-36500)	25600±5350 (16770-37290)

По всем признакам различия статистически недостоверны

* Для НФГМ в СК n=32

** Для НФГМ в СК n=28

Таблица 4 – Возраст, пол и содержание ЦНТФ в СЖ и СК (пг/мл) у пациентов с возрастной катарактой (подгруппа 61-75 лет) и здоровых испытуемых, медиана (интерквартильный размах)

	Подгруппа катаракты 61-75 лет (n=34*)	Контрольная группа (n=29**)
Возраст, лет	67,0 (65,0-70,8)	66,0 (65,0-70,0)
Пол, м / ж	10 / 24	9 / 20
ЦНТФ в СЖ	41,4 (28,2-51,9)	40,2 (31,2-48,0)
ЦНТФ в СК	4,20 (2,60-6,60)	4,90 (3,30-8,00)

По всем признакам различия статистически недостоверны

* Для ЦНТФ в СК n=33

** Для ЦНТФ в СК n=28

Было выявлено, что при одинаковых половозрастных характеристиках сравниваемые группа и подгруппа не различались по содержанию обоих нейротрофических факторов в СЖ и СК. Это позволяло полагать, что возрастная катаракта не оказывает существенного влияния на указанные параметры.

Следующий этап работы был посвящен изучению содержания нейротрофических факторов в СЖ, ВПК и СК у больных ПОУГ.

В данный раздел вошли пациенты основной группы (55 человек) и пациенты группы сравнения (62 человека в разделе ЦНТФ, 57 – в разделе НФГМ), относительно которой оценивались изменения средних показателей больных с глаукомой.

В результате проведенных исследований выявлено, что концентрация НФГМ у пациентов с катарактой и ПОУГ по сравнению с больными с катарактой была существенно снижена как во ВПК и СЖ ($P < 0,001$), так и в СК

($P < 0,05$). В начальной стадии ПОУГ отмечалось резкое снижение уровня НФГМ во всех изученных биологических жидкостях ($P < 0,001$), особенно выраженное во ВПК – более, чем в 2,5 раза. В последующих стадиях показатели НФГМ последовательно повышались по сравнению с начальной ПОУГ, оставаясь, однако, сниженными относительно группы сравнения (отличие достоверно для ВПК и СЖ; таблица 5). Выявленные особенности изменений содержания НФГМ во ВПК подтверждались также его обратной зависимостью от периметрического индекса VFI: коэффициент корреляции $r = -0,404$; $P = 0,002$.

Таблица 5 – Концентрация НФГМ в изученных биологических жидкостях (пг/мл), соотношение концентраций во ВПК и СЖ у больных с катарактой без и в сочетании с ПОУГ, $M \pm \sigma$ (Min-Max)

	Группа сравнения (n=57)	Основная группа				
		Всего (n=55)	ПОУГ 1 (n=9)	ПОУГ 2 (n=12)	ПОУГ 3 (n=18)	ПОУГ 4 (n=16)
ВПК	54,6±29,6 (8,0-168,0)	35,2±14,2 (8,0-64,0) ***	20,5±13,1 (8,5-48,4) ***	34,6±17,1 (8,0-60,0) *	37,2±10,0 (16,5-54,8) **, †	41,6±11,2 (24,8-64,0) *, ††
СЖ	116,2±43,1 (25,0-203,0)	78,0±25,1 (41,0-149,8) ***	56,8±10,3 (42,5-69,0) ***	92,4±34,9 (41,0-149,8) †	80,1±20,4 (46,0-108,0) ***, ††	76,7±20,2 (47,4-114,0) ***, †
ВПК/СЖ	0,48±0,19 (0,13-0,99)	0,46±0,18 (0,15-1,06)	0,36±0,22 (0,15-0,85)	0,38±0,20 (0,15-0,77)	0,47±0,08 (0,31-0,65)	0,57±0,18 (0,37-1,06)
СК	22440±7580 (8450-41180)	19230±5960 (6810-31760) *	13990±3240 (9510-20180) ***	18370±8100 (6810-31760)	20260±5940 (9300-31240) †	21670±3080 (17640-28230) †††

*, **, *** - отличие от группы сравнения достоверно с $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$

†, ††, ††† - отличие от начальной ПОУГ достоверно с $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$

Группы ПОУГ II, III, IV между собой статистически не различаются

Примечание: для СК в группе сравнения n=53

В настоящей работе впервые представлены данные об изменениях содержания НФГМ во ВПК у больных ПОУГ, в том числе по мере прогрессирования заболевания. Наиболее важным и во многом неожиданным результатом явилось установленное резкое снижение содержания НФГМ во ВПК больных с начальной глаукомой, сопровождающееся одновременным выраженным снижением уровня НФГМ и в СЖ, и в СК. В последующих стадиях заболевания наблюдалось постепенное относительное повышение показателей НФГМ во всех изученных биологических жидкостях, не достигающее уровней группы сравнения во ВПК и СЖ.

Достаточно сложно найти объяснение выявленным закономерностям. Можно предположить, что определенные факторы, например, депрессия, стресс и т.п., способствующие снижению уровня НФГМ во всем организме, включая СК и ВПК, создают те неблагоприятные условия (в частности, снижение защиты ганглиозных клеток сетчатки), на фоне которых в результате воздействия местных факторов и берет свое начало ПОУГ. Тогда последующее относительное повышение содержания НФГМ можно рассматривать как нейропротекторную реакцию.

Изменения содержания ЦНТФ в изученных биологических жидкостях имели характер отличный от изменений НФГМ.

Концентрация ЦНТФ у пациентов с катарактой и ПОУГ по сравнению с больными с катарактой была существенно, в среднем более чем на $\frac{1}{3}$ снижена во ВПК и СЖ ($P < 0,001$). Содержание ЦНТФ во ВПК последовательно уменьшалось по мере прогрессирования ПОУГ, что подтверждается и прямой зависимостью содержания ВПК с параметрическим индексом VFI (коэффициент корреляции: $r = 0,349$, $P = 0,011$). Снижение было особенно выражено (в среднем более, чем в 2 раза) у пациентов с «тяжелой» ПОУГ (4 стадия по классификации Mills et al., 2006). Данные представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Концентрация ЦНТФ в изученных биологических жидкостях (пг/мл) и соотношение концентраций во ВПК и СЖ у больных с катарактой без и в сочетании с ПОУГ, медиана (интерквартильный размах)

	Группа сравнения (n=62)	Основная группа				
		Всего (n=55)	ПОУГ I (n=9)	ПОУГ II (n=12)	ПОУГ III (n=18)	ПОУГ IV (n=16)
ВПК	56,9 (36,7-72,7)	36,6*** (24,5-47,7)	41,4 (34,8-53,7)	42,65 (30,5-54,7)	38,8 (26,6-46,4)	25,4*** (16-38,1)
СЖ	38,4 (28,1-50,2)	23,6*** (15,9-30,9)	25,6 (21,6-38,4)	30,3 (21,4-35,7)	23,7* (20-26,3)	18,8*** (12,2-23,6)
ВПК/СЖ	1,46 (1,08-1,80)	1,48 (1,15-1,82)	1,4 (1,35-1,77)	1,61 (1,2-1,73)	1,58 (1,28-1,93)	1,26 (1,07-1,75)
СК	4,6 (3,2-7,1)	4,4 (3,5-6,6)	3,9 (3,2-5,6)	4,1 (2,63-4,9)	5,3 (3,8-6,6)	4,75 (3,35-8,25)

*,*** - отличие от контрольной группы достоверно с $P < 0,05$, $P < 0,001$

Примечание: для СК в группе сравнения n=58

В настоящей работе впервые представлены данные об изменениях содержания ЦНТФ во ВПК и СЖ у больных ПОУГ, в том числе по мере прогрессирования заболевания. Было впервые установлено, что развитие и прогрессирование ПОУГ сочетается с последовательным снижением уровня ЦНТФ во ВПК, наиболее выраженным в тяжелой стадии заболевания (уменьшение в среднем более, чем в 2 раза).

По данным экспериментальных исследований ЦНТФ обладает выраженными нейропротективными свойствами в отношении ганглиозных клеток сетчатки. Поэтому можно предполагать, что снижение уровня ЦНТФ в глазах пациентов с ПОУГ обуславливает снижение выживаемости ганглиозных клеток сетчатки в неблагоприятных условиях, например, при повышенном или неустойчивом внутриглазном давлении, что, в свою очередь, способствует дальнейшему прогрессированию глаукомы по принципу «порочного круга».

Остается не выясненным, является ли дефицит ЦНТФ одним из причинных факторов или следствием гибели ганглиозных клеток сетчатки у

больных глаукомой. В обоих случаях установленный в настоящей работе факт снижения уровня ЦНТФ в глазах пациентов с ПОУГ может служить основанием для его применения в целях повышения выживаемости ганглиозных клеток сетчатки у больных глаукомой.

Последней, но немаловажной задачей было изучение соотношений нейротрофических факторов в СЖ, ВПК и СК. Указанные соотношения в обеих группах пациентов мало различались, что позволило объединить их для последующих расчетов. Уровень НФГМ, во ВПК демонстрировал сильную корреляцию с его концентрацией в СЖ ($r=0,66$, $P<0,000$). Точно такую же корреляцию показывали концентрации ЦНТФ во ВПК и СЖ. Для обоих изученных нейротрофических факторов были предложены формулы для приближенного расчета уровня фактора во ВПК (y) по его содержанию в СЖ (x).

Для НФГМ: $y = 10,95 + 0,334 * x$

($P < 0,000$; коэффициент детерминации $R^2 = 0,417$).

Для ЦНТФ: $y = 15,85 + 0,944 * x$

($P < 0,000$, коэффициент детерминации $R^2 = 0,535$).

Поскольку есть достаточно высокий разброс индивидуальных значений, в единичных случаях этот метод может давать существенные отклонения, поэтому его целесообразно применять в группах пациентов, где индивидуальные отклонения будут усредняться.

Таким образом, выполненные исследования позволили установить существенные изменения содержания НФГМ и ЦНТФ у больных ПОУГ. Было продемонстрировано снижение содержания НФГМ у пациентов с ПОУГ во всех исследуемых биологических жидкостях, особенно выраженное в начальной стадии заболевания, что могло снижать защиту ганглиозных клеток сетчатки, на фоне чего в результате воздействия местных факторов и могла начинаться ПОУГ. Данное предположение, несомненно, требует дальнейшей экспериментальной и клинической проверки. Однако полученные результаты

могут служить основанием для разработки новых методов лечения, направленных на компенсацию дефицита НФГМ при начальной ПОУГ.

Был установлен факт последовательного уменьшения уровня ЦНТФ во ВПК по мере прогрессирования заболевания, который может служить основанием для применения данного нейротрофического фактора в целях повышения выживаемости ганглиозных клеток сетчатки у больных глаукомой.

Результаты настоящей работы на примере больных с такими формами патологии как возрастная катаракта и ПОУГ показали информативность исследований нейротрофических факторов в СЖ, что открывает новые возможности в изучении патогенеза этих и других заболеваний, определении эффективности клинического применения нейротрофических факторов и иных лечебных воздействий.

ВЫВОДЫ

1. Классификация Mills et al. (2006 г.), основанная на компьютерной статической периметрии центральных отделов поля зрения, обеспечивает наиболее детальную характеристику прогрессирования глаукоматозного процесса как на ранних, так и на поздних его стадиях.
2. Возрастная катаракта не оказывает существенного влияния на содержание НФГМ и ЦНТФ в слезной жидкости и сыворотке крови.
3. У пациентов с ПОУГ имеет место существенное снижение содержания НФГМ во ВПК, СЖ и СК, особенно выраженное в начальной стадии заболевания. В последующих стадиях снижение НФГМ во ВПК и СЖ последовательно становится менее выраженным, однако сохраняется.
4. Содержание НФГМ во ВПК у пациентов с возрастной катарактой без и в сочетании с ПОУГ демонстрирует сильную корреляцию с его уровнем в СЖ ($r=0,66$, $P<0,000$). Соотношение концентраций НФГМ во ВПК и СЖ у пациентов с возрастной катарактой без и в сочетании с ПОУГ практически не различается, составляя в среднем $0,48\pm 0,19$ и $0,46\pm 0,18$, соответственно.

5. Содержание ЦНТФ во ВПК и СЖ существенно снижено у пациентов с ПОУГ; уменьшение уровня ЦНТФ во ВПК происходит последовательно по мере прогрессирования заболевания.
6. Содержание ЦНТФ во ВПК у пациентов с возрастной катарактой без и в сочетании с ПОУГ демонстрирует сильную корреляцию с его уровнем в СЖ ($r=0,66$, $P<0,000$). Соотношение концентраций НФГМ во ВПК и СЖ у пациентов с возрастной катарактой без и в сочетании с ПОУГ практически не различается, составляя [медиана (интерквартильный размах)] 1,46 (1,08-1,80) и 1,48 (1,15-1,82), соответственно.
7. Концентрации НФГМ и ЦНТФ во ВПК пациентов с ПОУГ могут быть приближенно определены по их содержанию в СЖ с использованием предложенных расчетных формул.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для более детальной характеристики стадийности глаукоматозного процесса предлагается использовать классификацию Mills et al., которая основана на статической периметрии центральных отделов поля зрения.
2. Неинвазивную оценку содержания НФГМ во ВПК (y) следует проводить путем определения его содержания в СЖ (x) с последующим расчетом по предложенной формуле

$$y = 10,95 + 0,334 * x$$

3. Для неинвазивной оценки содержания ЦНТФ во ВПК (y) в зависимости от его содержания в СЖ (x) следует использовать предложенную формулу:

$$y = 15,85 + 0,944 * x$$

4. Предложенные способы неинвазивной оценки содержания НФГМ и ЦНТФ во ВПК (по пп.1 и 2) следует использовать преимущественно для расчетов средних показателей в группах пациентов; в индивидуальных случаях необходимо учитывать возможность существенных отклонений истинных значений от расчетных.

5. Согласно расчетам по формуле по п. 2 минимально допустимый уровень ЦНТФ в СЖ, составляет 17 пг/мл. Более низкие значения следует считать показанием к интравитреальному введению ЦНТФ при лечении заболеваний зрительно-нервного аппарата глаза. (патента на изобретение № 2617066 от 1.04.2016).
6. Предложенная в работе схема последовательной оценки взаимозависимости концентраций нейротрофических факторов во ВПК и СЖ у больных ПОУГ может быть использована для изучения других цитокинов и иных биологически активных веществ в целях разработки неинвазивных способов оценки их содержания во ВПК.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Козлова К.И.**, Головин А.В. Цилиарный нейротрофический фактор у больных с возрастной катарактой (предварительное сообщение) // Актуальные проблемы офтальмологии: IX Всерос. науч. конф. молодых ученых: Сб. науч. работ // Под ред. Б.Э. Малюгина. М., 2014. – С.39-40.
2. Шпак А.А., Гехт А.Б., Дружкова Т.А., **Козлова К.И.**, Головин А.В., Гуляева Н.В. Цилиарный нейротрофический фактор у больных с возрастной катарактой // Нейрохимия.- 2015.- Т.32.- № 4.- С.330-333.
3. Shpak A.A., Guekht A.B., Druzhkova T.A., **Kozlova K.I.**, Golovin A.V., Gulyaeva N.V. Ciliary neurotrophic factor in patients with age-related cataract // Neurochemical Journal.- 2015.- Vol.9.- N 4.- P.311-314.
4. Шпак А.А., Гехт А.Б., Дружкова Т.А., **Козлова К.И.**, Головин А.В., Гуляева Н.В.. Нейротрофический фактор головного мозга у больных с возрастной катарактой// Нейрохимия. – 2016. – Т.33, №3. – С. 253-257.
5. Shpak A.A., Guekht A.B., Druzhkova T.A., **Kozlova K.I.**, Golovin A.V., Gulyaeva N.V. Brain-derived neurotrophic factor in patients with age-related cataract // Neurochemical Journal.- 2016.- Vol.10.- N 3.- P.2401-243.

6. Shpak A., Guekht A., Druzhkova T., **Kozlova K.**, Golovin A., Gulyaeva N. Brain-derived neurotrophic factor in patients with age-related cataract // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 2016.- Vol.57.- N 12.- P.5396.

7. Шпак А.А., Гехт А.Б., Дружкова Т.А., **Козлова К.И.**, Гуляева Н.В. Соотношения нейротрофических факторов в слезной жидкости и влаге передней камеры у больных с возрастной катарактой // IX Российский общенациональный офтальмол. форум: Сб. науч. тр. М., 2016.- Т.2.- С.505-507.

8. Шпак А.А., Гехт А.Б., Дружкова Т.А., **Козлова К.И.**, Гуляева Н.В. Соотношения нейротрофических факторов в слезной жидкости и влаге передней камеры у больных с возрастной катарактой // Офтальмохирургия. – 2017. – № 1. – С.16-20.

9. Shpak A., Guekht A., Druzhkova T., **Kozlova K.**, Gulyaeva N. Ciliary neurotrophic factor in patients with age-related cataract // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 2017.- Vol.58.- N 8.- P.205.

Патент РФ на изобретение по теме диссертации

Шпак А.А., Гехт А.Б., Гуляева Н.В., Дружкова Т.А., **Козлова К.И.** Способ определения показаний к интравитреальному введению цилиарного нейротрофического фактора при лечении заболеваний зрительно-нервного аппарата глаза. Патент РФ № 2617066. Опубл. 19.04.2017; Бюл. № 11 (Приоритет от 01.04.2016).

Биографические данные

Козлова Ксения Игоревна в 2012 году с отличием окончила Волгоградский Государственный Медицинский Университет.

С 2012 по 2014 гг. проходила обучение в ординатуре ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

В 2014 году поступила в очную аспирантуру ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. С 2014 по 2017 гг. выполняла научные исследования по теме «Нейротрофические факторы у больных первичной открытоугольной глаукомой» в отделе клинико-функциональной диагностики ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

В 2014 году на IX Всероссийской конференции молодых ученых заняла первое место с докладом на секции «Новые методы диагностики в офтальмологии».

Автор 9 печатных работ (из них 3 в журналах, рецензируемых ВАК), 1 патента РФ на изобретение.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВГД внутриглазное давление

ВПК влага передней камеры

ДЗН диск зрительного нерва

НФГМ (BDNF – англ.) нейротрофический фактор головного мозга

ОКТ спектральная оптическая когерентная томография

ПОУГ первичная открытоугольная глаукома

СЖ слезная жидкость

СК сыворотка крови

СНВС слой нервных волокон сетчатки

ФЭК+ИОЛ фактоэмульсификация катаракты с имплантацией интраокулярной линзы

ЦНТФ (CNTF – англ.) цилиарный нейротрофический фактор