

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«МЕЖОТРАСЛЕВОЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС
«МИКРОХИРУРГИЯ ГЛАЗА» ИМЕНИ АКАДЕМИКА С.Н. ФЕДОРОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

КОЗЛОВА КСЕНИЯ ИГОРЕВНА

**НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ У БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНОЙ
ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ**

14.01.07. – глазные болезни

14.03.03. – патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Шпак Александр Анатольевич

доктор биологических наук, профессор

Гуляева Наталия Валерьевна

Москва – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Нейротрофические факторы, их биологическая роль	11
1.2. Нейротрофический фактор головного мозга	13
1.2.1. Роль НФГМ в патогенезе неврологической патологии	14
1.2.2. Роль НФГМ в патогенезе заболеваний зрительно-нервного аппарата глаза.....	16
1.3. Цилиарный нейротрофический фактор.....	19
1.3.1. Роль ЦНТФ в патогенезе неврологической патологии	20
1.3.2. Роль ЦНТФ в патогенезе заболеваний зрительно-нервного аппарата глаза.....	21
1.4. Нейродегенеративные аспекты патогенеза глаукомы	26
1.5. Соотношения различных биологически активных веществ в слезной жидкости и внутриглазных структурах	30
1.6. Классификации стадий первичной открытоугольной глаукомы.....	31
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	36
2.1. Общая характеристика материала исследования	36
2.2. Клинико-функциональные методы исследования.....	38
2.3. Клинико-лабораторные методы исследования	41
2.3.1. Описание и подготовка биологического материала, взятого для исследования	41
2.3.2. Определение НФГМ в биологических жидкостях человека	44
2.3.2.1 Определение НФГМ в сыворотке крови	44
2.3.2.2 Определение НФГМ в слезной жидкости и влаге передней камеры	45
2.3.3. Определение ЦНТФ в биологических жидкостях человека	46
2.3.3.1. Определение ЦНТФ в сыворотке крови.....	46

2.3.3.2 <i>Определение ЦНТФ в слезной жидкости и влаге передней камеры</i>	47
Глава 3. КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ.	50
3.1. Дооперационное обследование пациентов.....	50
3.2. Операция и послеоперационное обследование пациентов.....	52
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА ГОЛОВНОГО МОЗГА	59
4.1. Содержание НФГМ в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у больных с возрастной катарактой	59
4.2. Содержание НФГМ в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у больных с ПОУГ	61
4.2.1. <i>Динамика изменений содержания нейротрофического фактора головного мозга в исследуемых биологических жидкостях по мере прогрессирования глаукомы</i>	63
4.3. Соотношения НФГМ в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови	65
ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИЛИАРНОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА	68
5.1. Содержание ЦНТФ в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у больных с возрастной катарактой	68
5.2. Содержание ЦНТФ в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у больных с ПОУГ	70
5.2.1. <i>Динамика изменений содержания цилиарного нейротрофического фактора в исследуемых биологических жидкостях по мере прогрессирования глаукомы</i>	72
5.3. Соотношения ЦНТФ в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови	74
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	78
ВЫВОДЫ	90
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	92
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	93
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	94

ВВЕДЕНИЕ

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 серьёзных трудностях, связанных как с пониманием природы, так и 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 появляются сведения, рассматривающие глаукому как заболевание, занимающее промежуточное положение между неврологической и офтальмологической патологиями (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, особое внимание 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 (Ко М.Л. 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 (Ко М.Л. et al., 2001; Martin K.R. et al., 2003).

Особое внимание в офтальмологии привлекает ЦНТФ, что во многом связано с созданием компанией Neurotech (США) импланта NT-501, способного длительно продуцировать ЦНТФ внутри глаза. Клиническая апробация импланта 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. В свою очередь исследование данных факторов у человека во внутриглазных жидкостях и структурах возможно только в ходе плановых оперативных вмешательств. Большой интерес представляют изменения указанных факторов по мере прогрессирования ПОУГ, что, в том числе, требует выбора наиболее адекватной классификации нарушений полей зрения, обеспечивающей наиболее детальную характеристику стадийности глаукомного процесса.

Таким образом, не вызывает сомнений актуальность изучения нейротрофических факторов во внутриглазных структурах больных глаукомой, а также оценка 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:

1. Определить классификацию нарушений полей зрения, обеспечивающую наиболее детальную характеристику прогрессирования глаукоматозного 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.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Нейротрофические факторы, их биологическая роль

В зарубежной и отечественной литературе в настоящее время все больше появляется данных о важной роли нейротрофических факторов для физиологии и патологии нервной системы. Нейротрофические факторы – регуляторные белки нервной ткани, которые способствуют пролиферации, дифференцировке, поддержанию жизнеспособности и функционирования нейронов [98].

В настоящее время все многообразие нейротрофических факторов можно разделить на подсемейства:

- 1) «нейротрофины» или подсемейство фактора роста нервов (NGF, BDNF, NF-3, NF-4/5);
- 2) подсемейство глиального фактора (GDNF, NTR, ART, PSP);
- 3) «нейропоэтины» или подсемейство цилиарного (реснитчатого) фактора (CNTF, LIF, IL-6);
- 4) другие нейротрофические факторы [17].

Нейротрофические факторы играют важную роль на этапах пренатального и постнатального нейрогенеза [16]. В эмбриогенезе они участвуют в формировании фенотипа клеток, влияют на цитоархитектонику коры головного мозга, в онтогенезе контролируют рост и дифференцировку нейронов, в постнатальном периоде способствуют образованию новых синаптических связей [43].

Имеются данные, что эти пептиды в определенных количествах синтезируются постоянно, активно же выделяются при функциональной необходимости [15].

Нейротрофические факторы воздействуют на механизмы нейропластичности, регулируя формирование новых синапсов [17], стимулируют выживание, миграцию, пролиферацию, регенерацию нейронов, арборизацию (ветвление дендритов) и спрутинг (рост аксонов) в направлении клеток мишеней, обеспечивают пластичность синапсов, активность ионных каналов и рецепторов нейромедиаторов [86].

Кроме того, они служат важными регуляторами нейрогенеза, образования новых клеток из (прогениторных) стволовых нейрональных предшественников [17, 30].

Их свойства связаны со способностями препятствовать окислительному стрессу, предотвращать образование свободных радикалов и оказывать влияние на процессы апоптоза, а также принимать участие в контроле процессов физиологического развития и сохранения структурной и функциональной целостности нейронов [103].

История изучения нейротрофических факторов началась в 1951 году, когда Rita Levi-Montalcini совместно со Stanley Cohen открыли фактор роста нервов – Nerve Growth Factor. В результате серии исследований было обнаружено, что происходит активное деление симпатических нервных клеток и ветвление их аксонов при пересадке опухоли в куриный зародыш. Вещество, которое оказывало стимулирующее действие, было названо фактором роста нервов. За это открытие авторам была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине в 1986 году [98].

Нейротрофические факторы являются высокомолекулярными полипептидами, структурно гомологичными первому открытому фактору – фактору роста нервов – и способствуют функциональному сохранению различных структур мозга [18, 115].

Эффекты данных факторов или их предшественников реализуются через взаимосвязи с различными видами рецепторов семейства тирокиназы (Trk-

рецепторы) и рецепторами p75NTR из семейства рецепторов фактора некроза опухоли – самыми универсальными, но при этом низкоаффинными.

Trk-рецепторы взаимодействуют только со зрелыми формами, а рецептор p75 связывает как зрелые, так и проформы нейротрофических факторов.

1.2. Нейротрофический фактор головного мозга

Одним из наиболее изучаемых факторов из подсемейства нейротрофинов является нейротрофический фактор головного мозга (НФГМ) – brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Он изначально был выделен из мозга свиньи в 1982 году, затем, в 1989 г., был клонирован [45, 97], после чего была показана его важная роль в регуляции жизнеспособности и дифференцировки различных нейронов (сенсорных, двигательных, ганглионарных, дофаминергических, холинергических и ГАМК-ергических нейронов) [45].

НФГМ – это полипептид с молекулярной массой 27,2 кДа, который синтезируется путем протеолиза белка-предшественника преНФГМ (pro-BDNF). Каждый мономер состоит из 120 аминокислот, биологическую активность может проявлять только при димеризации [125].

НФГМ и преНФГМ активируют два различных вида рецепторов: первый взаимодействует с рецептором семейства тирозинкиназы (TrkB), а второй – из семейства рецепторов фактора некроза опухоли (p75NTR). При этом НФГМ активирует процессы дифференциации нейронов, ингибирует проапоптотические протеины и регулирует уровень внутриклеточного Ca^{2+} , что стимулирует секрецию самого нейротрофина; а преНФГМ запускает каскад реакций, которые приводят к апоптозу клеток [118].

Данный нейротрофин содержится в больших количествах в таламусе, неокортексе, мозжечке, гиппокампе и в области коры головного мозга [48]. Это

объясняется тем, что НФГМ может образовываться с помощью различных типов глиальных клеток: астроцитов, шванновских клеток, олигодендроцитов, микроглии.

Источником НФГМ в сыворотке являются тромбоциты, которые связывают, депонируют и в ответ на внешние стимулы высвобождают нейротрофин [70, 107], чем и объясняется его высокое содержание на системном уровне [41, 51].

1.2.1. Роль НФГМ в патогенезе неврологической патологии

Участие НФГМ в дифференцировке нервной ткани подтверждается его экспрессированием в эмбриональном головном мозге на 5-9 неделе нейроонтогенеза [32].

Как показывают исследования, НФГМ вовлекается в патогенез любого органического поражения центральной нервной системы – нейродегенеративного, ишемического [137, 138], травматического, а также в механизмы развития психических заболеваний – шизофрении, аффективных расстройств, таких как тревога и депрессия [36].

Достаточное количество работ посвящено изучению НФГМ при болезни Альцгеймера. Установлено, что у данной группы пациентов в развернутой стадии заболевания уровень НФГМ и его матричной рибонуклеиновой кислоты снижен в сыворотке крови и цереброспинальной жидкости без существенных различий концентрации в этих биологических жидкостях. Степень снижения НФГМ коррелировала с тяжестью клинических проявлений заболевания. Однако на ранних стадиях болезни Альцгеймера показано повышение этого нейротрофина в ликворе и сыворотке крови, которое, по мнению авторов, может носить компенсаторный характер [65].

Также известно, что НФГМ действует на дофаминергические нейроны черной субстанции. Исследование уровня НФГМ у пациентов с болезнью Паркинсона выявило связь этого нейротрофина с продолжительностью заболевания и тяжестью его моторных проявлений [94].

Активно ведутся работы по изучению участия НФГМ в патогенезе тревоги, депрессии и нарушений когнитивных и поведенческих процессов у человека [37, 87]. Считается, что нейротрофин тесно ассоциирован с депрессией и стрессом [8]. Клинические наблюдения демонстрируют снижение НФГМ у больных с депрессивными расстройствами [9, 62]. Снижение его экспрессии преимущественно в гиппокампе после стресса и ее восстановление длительным введением антидепрессантов привело к созданию нейротрофической теории депрессии [64], согласно которой изменение уровня НФГМ является одним из механизмов формирования и терапии данной психопатологии [8].

На сегодняшний день участие НФГМ доказано в регуляции запрограммированной гибели нейронов [17, 42, 116, 132]. В эксперименте Шебитц В.Р. с соавт. (2008 год) показали, что НФГМ индуцирует антиапоптотические механизмы после инсульта, уменьшает размер инфаркта и вторичную гибель нервных клеток [35].

Многие из исследователей занимаются работами по изучению участия НФГМ в патогенезе повреждения и в процессах регенерации при травмах головного и спинного мозга. Известно, что при травме спинного мозга НФГМ оказывает стимулирующее влияние на нейрогенез в области повреждения [90] и угнетает апоптоз нейронов и олигодендроцитов [71].

1.2.2. Роль НФГМ в патогенезе заболеваний зрительно-нервного аппарата глаза

О том, что НФГМ экспрессируется в различных структурах глаза, свидетельствуют немало исследований. У животных белок обнаруживается во внутренних и наружных слоях сетчатки, в слое нервных волокон [82, 135]. Другими источниками НФГМ считаются клетки трабекулярного аппарата [144] и глиальные клетки Мюллера [135]. НФГМ к ганглиозным клеткам сетчатки поступает также с кровотоком и по межбололочным пространствам зрительного нерва [78]. После пребывания указанных клеток в среде с низким уровнем кислорода и глюкозы наблюдается повышенная секреция и нейротрофина, и его рецептора. Эти данные, по мнению исследователей, свидетельствуют о важной роли НФГМ в ответ на ишемические процессы при глаукоме [93].

На экспериментальных моделях глаукомы показано, что в клетках сетчатки отмечается снижение количества НФГМ, который определяется только в слоях ганглиозных клеток и нервных волокон. Рецептор TrkB, который обнаруживается в перечисленных выше слоях сетчатки в норме, в большем количестве определяется при глаукоме, что, по мнению авторов, может являться компенсаторным процессом в ответ на недостаток НФГМ [82].

В эксперименте выявляется нарушение аксоплазматического транспорта НФГМ при повышении ВГД. Нейротрофин и его рецептор аккумулируются у головки зрительного нерва непосредственно за склерой и достигают ганглиозных клеток в значительно меньшей концентрации по сравнению с контрольными глазами как при остром, так и при хроническом повышении ВГД [122]. По некоторым данным, при остром повышении ВГД до высоких показателей ретроградный транспорт НФГМ снижается на 74% [124]. Везикулы, содержащие НФГМ, также скапливаются во внутриглазных участках

аксонов ганглиозных клеток сетчатки, что свидетельствует о нарушении и антероградного транспорта нейротрофина [122].

В экспериментальных исследованиях разных авторов установлено, что экзогенный НФГМ способен задерживать апоптоз ганглиозных клеток сетчатки. М.Л. Ко с соавторами (2001 год) изучили действие нейротрофина при трехкратном интравитреальном введении в глаза крыс с повышенным в 2,5 раза ВГД. По их данным, после второй и третьей инъекций выживание клеток составило 91,3 и 82,7% соответственно, что оказалось статистически значимым отличием от результатов, полученных в контрольной группе [89]. Помимо инъекций НФГМ, группой авторов во главе с Domenici L. (2014 год) была доказана эффективность инстилляций в конъюнктивальный свод мышей и крыс нейротрофина, растворенного в физиологическом растворе. Даже одна капля при концентрации 12 мг/мл увеличивала уровень НФГМ в сетчатке исследуемых животных [61].

В последнее время растет интерес к возможному применению генной инженерии для доставки НФГМ к клеткам сетчатки. Достигнуты хорошие результаты в исследованиях *in vitro*: показано, что «инфицирование» ганглиозных клеток сетчатки адено-ассоциированным вирусом возможно, и инфицированные клетки способны к выработке НФГМ [99]. Аналогичные результаты получены при интравитреальном введении животным ДНК НФГМ с помощью вирусного вектора [105], в результате чего происходит повышенный синтез нейротрофина и отмечается значительный нейропротекторный эффект терапии [105]. В последнее время изучается возможность «невирусных» систем доставки генов [55]. Группой авторов было доказано, что индукция 3D-сфероидов ММСК лимба способствует значительному увеличению продукции НФГМ и может рассматриваться в качестве клеточного препарата для безопасной и длительной нейропротекции в лечении оптических нейропатий [5].

По сравнению с исследованиями на животных, значительно меньше встречается работ, выполненных на клиническом материале, а авторы ограничиваются изучением только СЖ и СК. Установлено, что у больных ПОУГ по мере прогрессирования заболевания происходит значительное снижение концентрации НФГМ как на системном, так и на локальном уровнях [38]. Обнаруживается определенная корреляция содержания нейротрофина в слезе со стадией заболевания, числом скотом в центральном поле зрения, отношением площадей экскавации и диска зрительного нерва и толщиной слоя нервных волокон сетчатки (СНВС) [38].

В другом исследовании также отмечена значимость НФГМ в патогенезе глаукомной оптической нейропатии [22]. Авторы показали, что низким значениям нейротрофина в СЖ соответствуют более выраженные глаукомные изменения, оцениваемые с помощью параметров головки зрительного нерва и СНВС. Установлена достоверная взаимосвязь между уровнем НФГМ и показателями светочувствительности глаза, а также такими периметрическими индексами, как MD и PSD. При динамическом наблюдении отмечено большее прогрессирование глаукомного процесса у больных с низким содержанием нейротрофина в СЖ по сравнению с контрольной группой, что говорит о его прогностической значимости при этом заболевании.

В 2009 году Ghaffariyeh A. с соавторами показали снижение концентрации НФГМ в слезе пациентов с глаукомой нормального давления. Они сделали вывод, что данный биохимический показатель может стать косвенным признаком для ранней диагностики глаукомы [73]. В 2011 году эти же авторы пришли к выводу, что определение НФГМ в СК является надежным, быстрым и экономически выгодным методом диагностики ранней стадии ПОУГ, так как имело место достоверное снижение концентрации НФГМ в СК у пациентов основной группы по сравнению с контролем (здоровые лица).

Имеется лишь единственная работа U.R. Chowdhury с соавт. (2011 год), в которой НФГМ был найден во ВПК людей в двух группах из четырех [58].

Важно отметить, что данная группа авторов изучала весь белковый спектр ВПК, получаемой при хирургии неосложненной катаракты, а не непосредственно данный нейротрофин.

1.3. Цилиарный нейротрофический фактор

Еще одним представителем нейротрофических факторов является цилиарный нейротрофический фактор (ЦНТФ) - ciliary neurotrophic factor (CNTF).

ЦНТФ относится к ограниченному семейству нейропоэтических цитокинов [39, 129], молекулярный вес данного фактора составляет 22,7 кДа [21, 92].

По химической структуре ЦНТФ является полипептидом из 200 аминокислотных остатков. Первоначально он был идентифицирован как трофический фактор парасимпатических нейронов 8-дневного куриного эмбриона R. Adler и соавторами в 1979 г., и с тех пор не раз было продемонстрировано его нейропротекторное действие [67, 81, 96, 104, 114, 123]. Исследования, проводимые *in vitro*, показали стимулирующую активность ЦНТФ по отношению к нейронам сенсорных ганглиев, мотонейронам и симпатическим нейронам.

Известно, что ЦНТФ экспрессируется глиальными клетками центральной и периферической нервной системы [130].

Он проявляет свойства ростового фактора и способствует дифференцировке развивающихся нейронов и глиальных клеток, обеспечивает трофику и принимает участие в защите аксономированных либо поврежденных нейронов [21].

Молекулы ЦНТФ локализованы внутри клетки и при её разрушении оказываются во внеклеточной среде, в результате чего концентрация ЦНТФ может играть роль маркера степени деструкции нервной ткани [10].

С другой стороны, ЦНТФ при повреждении способен влиять на выживаемость нейронов сетчатки, гиппокампа, спинальных ганглиев и может быть маркером репаративных процессов в ЦНС.

Свое действие фактор оказывает через рецептор CNTFR α и гликопротеин gp-130. После связывания ЦНТФ с рецепторами происходит связывание gp-130 с рецептором ингибирующего фактора лейкемии (LIFR), и весь комплекс быстро перемещается внутрь клетки. В цитоплазме происходит активация тирозинкиназы семейства Janus, что приводит к фосфорилированию тирозинового остатка белка STAT (Signal transducer and activator of transcription). В свою очередь, STAT подвергается димеризации и перемещается в ядро, где происходит активация генов, необходимых для выживания клеток. Следует также отметить, что для сбалансирования эффекта цитокина существуют и механизмы подавления его действия. В частности, это тирозиновые фосфатазы, приводящие к дефосфорилированию активированных ферментов, и ингибиторы взаимодействия STAT с соответствующими генами [77].

1.3.1. Роль ЦНТФ в патогенезе неврологической патологии

ЦНТФ участвует в патогенезе ряда неврологических заболеваний. В частности, при воспроизведении амилоидной формы болезни Альцгеймера на мышцах испытывали влияние фрагментов ЦНТФ. Вещества, обозначенные как пептиды, стимулировали рост новых нейронов и их выживание в специфических локусах субвентрикулярной зоны и гиппокампе [126].

Клиническое значение ЦНТФ показано в работе Зиньковского А.К., Мусиной Л.О. (2012), исследовавших значение ЦНТФ для выживания нейронов в условиях эпилептизации мозга [19,20,25]. Установлено увеличение данного фактора по мере прогрессирования эпилепсии, а также его изменения на фоне нейрометаболической терапии [19,20,25].

В работе Дуйсебекова М.М. (2008 год) было изучено количественное содержание ЦНТФ в сыворотке и спинномозговой жидкости больных с черепно-мозговой травмой [10]. Исследование показало, что в первые сутки у пациентов с тяжелой степенью ушиба головного мозга содержание ЦНТФ существенно ниже, чем у больных с ушибом средней степени тяжести и у здоровых лиц. У пациентов с травмой средней степени тяжести максимальный подъем концентрации данного фактора выявляется на седьмые сутки болезни, а при тяжелой – на 14-е сутки с возможным последующим нарастанием в восстановительном периоде. Авторами рекомендовано для оценки степени повреждения нервной ткани после ушиба головного мозга определять содержание нейротрофического фактора в СК и в спинномозговой жидкости больных [10, 108].

1.3.2. Роль ЦНТФ в патогенезе заболеваний зрительно-нервного аппарата глаза

ЦНТФ у животных обнаруживается в наружных сегментах фоторецепторов [141], в ганглиозных клетках как в соме, так и в аксонах [113, 141], во внутренних ядерных слоях сетчатки [85]. Другими источниками ЦНТФ считаются глиальные клетки Мюллера [141]. Цитокин и его рецептор также обнаружены в клетках решетчатой пластинки и астроцитах ГЗН [102]. Рецептор CNTFR α идентифицирован в клетках пигментного эпителия, в фоторецепторах,

во внутренних и наружных плексиформных и внутренних ядерных слоях сетчатки, а также в ганглиозных клетках и в слое нервных волокон [46].

Большое количество исследований показывают, что экспрессия ЦНТФ меняется при разного рода повреждениях нервной ткани глаза. Например, его уровень повышается в клетках Мюллера при введении в глаз токсических доз каиновой кислоты и N-метил-D-аспартата [80]. После аксотомии количество ЦНТФ также повышается, достигает пика через 2 недели и снижается до контрольного уровня через четыре недели [141]. При хронической компрессии зрительного нерва также выявлено повышение количества ЦНТФ в ганглиозных клетках сетчатки [53].

Интересное исследование, проведенное A.Muller и соавторами (2008 год), показало, что повышение синтеза ЦНТФ в астроцитах сетчатки приводит к активации белка STAT и переводит аксотомированные нейроны в стадию активной регенерации [114]. При этом индуктором ЦНТФ служит повреждение хрусталика. Интравитреальное введение антител против ЦНТФ или ингибитора Janus киназы подрывает указанный эффект [114].

При хроническом повышении ВГД ЦНТФ также подвергается повышенному синтезу в клетках Мюллера. На экспериментальной модели глаукомы, полученной путем коагуляции эписклеральных вен, показано, что если до вмешательства ЦНТФ идентифицируется только в слое ганглиозных клеток, то после повышения ВГД цитокин обнаруживается во внутренних и наружных ядерных слоях сетчатки. Его уровень достигает пика к 7-14 дню после коагуляции сосудов, а далее начинает снижаться [145]. Похожее исследование также показывает, что на поздних стадиях глаукомы количество ЦНТФ снижено в значительной мере [148].

Нейропротекторные свойства цитокина подтверждаются также в исследованиях с введением экзогенного ЦНТФ. С использованием достижений генной инженерии разработаны способы доставки ЦНТФ к клеткам сетчатки. Применяются два метода. Первым методом является трансплантация

различных клеточных культур, способных к выработке белков. Используются клетки Шванна, пигментного эпителия, мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, фибробласты. Эффект относительно недолгий — продукция белков продолжается около двух месяцев. Однако разработаны специальные имплантируемые приспособления, значительно продлевающие этот срок. Вторым методом является введение ДНК с помощью вирусных векторов. Чаще всего в качестве вектора используется ААВ типа 2. После однократного введения его эффективность сохраняется до года. Считается, что оба метода достаточно безопасны для глаза.

В исследованиях Y. Hu (2005 год) и Y. Fang (2012 год) сравнили трансплантацию клеток Шванна в чистом виде с пересадкой тех же клеток, «инфицированных» ЦНТФ в аксотомированные глаза крыс [67, 81]. «Инфицированные» клетки в большей степени активизировали регенераторные процессы (рост аксонов нейрональных клеток) в срок 1 мес. В другом исследовании в витреальную полость глаз крыс, перенесших ишемию с последующей реперфузией, вводили мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, секретирующие ЦНТФ, либо физиологический раствор на фосфатном буфере (контроль). Ганглиозные клетки сетчатки в основной группе подвергались апоптозу в меньшей степени, чем клетки контрольной группы, хотя через четыре недели после трансплантации уровень ЦНТФ уже был достаточно низким [100].

В своем исследовании R.E. MacLaren с соавторами (2006 год) вводили ЦНТФ в глаза крыс с помощью адено-ассоциированного вируса [104]. До введения производили дозированное локальное повреждение сетчатки, вызывавшее также окклюзию одной из ветвей центральной артерии сетчатки. По сравнению с контрольной группой (без ЦНТФ), в которой выжило всего 2% ганглиозных клеток, в основной группе этот показатель достиг 12% [104]. При раздавливании зрительного нерва у взрослых крыс интравитреальное введение ЦНТФ с использованием адено-ассоциированного вируса [96] наряду с

повышением выживаемости ганглиозных клеток сетчатки приводило также к регенерации нейронов, многие аксоны достигали дистальных частей зрительного нерва, а некоторые даже хиазмы. В другой части опыта при перерезке зрительного нерва и трансплантации аутологичного периферического нерва в место разреза, к седьмой неделе выживало еще больше ганглиозных клеток (около 25% популяции), и половина из них имела связь с трансплантатом (окрашивалась при введении в него красителя). Авторы заключают, что комбинированный подход, т.е. доставка ЦНТФ с помощью вирусного вектора и клеточных технологий в сочетании с хирургическим лечением может оказаться наиболее эффективным методом нейропротекции.

Введение адено-ассоциированных вирусов, содержащих ЦНТФ, исследуется также на экспериментальных моделях глаукомы. ЦНТФ оказывает значительный нейропротекторный эффект — на 15% меньше ганглиозных клеток погибает при повышении ВГД по сравнению с контрольной группой [123].

Компания Neurotech разработала имплант, основанный на инновационной технологии инкапсуляции клеточных культур (Encapsulated Cell Technology) под названием NT-501. Имплант является небольшой трубкой (6 на 1 мм), которая имеет полупроницаемую мембрану, позволяющую секретировать белковый продукт (ЦНТФ), находящийся внутри генетически модифицированных клеток. Его капсула, с одной стороны, позволяет кислороду и питательным веществам диффундировать внутрь трубки, а с другой — является барьером для иммунных факторов организма. NT-501 имеет петлю, с помощью которой он подшивается к склере после введения в витреальную полость, соответственно, при необходимости его возможно эксплантировать (например, для корректировки дозы препарата). Надо также отметить, что после эксплантации NT-501 через 12-24 мес. клетки все еще способны продуцировать ЦНТФ в терапевтических дозах, что говорит о возможности продолжительной доставки ЦНТФ к сетчатке в обход гемато-ретиального барьера [149].

В начальной стадии колбочковой дистрофии сетчатки, при которой отмечается только потеря наружных сегментов фоторецепторов, введение ЦНТФ в глаза крыс с помощью системы, подобной NT-501, приводит к задержке потери колбочек, и даже отмечается регенерация их наружных сегментов. Эффект подтвержден с помощью иммуногистохимических исследований и электроретинографии через 140 дней после имплантации системы [101].

Р.А. Sieving и соавт. (2006 год) сообщают о хороших результатах первой фазы клинического исследования NT-501 при пигментном ретините [128]. В нем принимали участие десять пациентов. Первая группа больных получала низкую дозу ЦНТФ, вторая — высокую дозу. Через 6 мес. после имплантации системы ни один пациент не отмечал ухудшения остроты зрения, а у нескольких больных даже наблюдалось улучшение, соответствующее 2-3 строчкам по таблице Снеллена. Местных и системных осложнений практически не наблюдалось [128]. Во второй фазе исследования принимали участие 67 пациентов с начальной и 65 пациентов с далеко зашедшей стадией пигментного ретинита. В один глаз больным вводился NT-501 в двух разных дозах, а в другой глаз — плацебо. На данном этапе статистически значимых результатов нет, что объясняется медленным прогрессированием заболевания [128].

Эффективность NT-501 у больных с географической атрофией желтого пятна изучалась в клиническом исследовании второй фазы, включавшем 51 пациента. Сравнивались группы пациентов, получавших ЦНТФ в двух разных дозах или плацебо. Через 12 мес. методом оптической когерентной томографии выявлялось утолщение сетчатки, коррелирующее с дозой ЦНТФ. Стабилизация зрительных функций была достигнута у 96% пациентов в группе с высокой дозой ЦНТФ по сравнению с 83% случаев в группе, которой вводили низкую дозу белка, и 75% пациентов — в группе плацебо [149].

Каурер К. с соавторами в 2012 году изучили фармакокинетику препарата NT-501, который применялся для лечения пигментного ретинита и

географической атрофии [88]. В течение двух лет наблюдали за 4 группами пациентов из двух фаз исследования. Группы отличались по дозам препарата и срокам имплантации. Оценивали скорость секреции ЦНТФ из эксплантов и содержание ЦНТФ в стекловидном теле. Исследователи показали, что ЦНТФ продуцировался даже после 24 месяцев имплантации, а период полураспада ЦНТФ в стекловидное тело составляет 51 месяц. Также в СК не были обнаружены ни ЦНТФ, ни антитела к ЦНТФ и инкапсулированным клеткам. Все это показало благоприятный фармакокинетический профиль для лечения хронических дегенеративных заболеваний сетчатки без системного воздействия.

Компания Neurotech получила разрешение FDA (Food and Drug Administration) на лечение редкого заболевания – идиопатических макулярных телеангиоэктазий 2 типа – препаратом NT-501.

В вышеупомянутой работе U.R. Chowdhury с соавторами, где исследовали ВПК, получаемую при хирургии неосложненной катаракты, на наличие различных белковых частиц, был обнаружен рецептор CNTF (CNTFR α) во всех четырех группах [58].

1.4. Нейродегенеративные аспекты патогенеза глаукомы

По определению Европейского глаукомного общества ПОУГ – это хроническая прогрессирующая оптическая нейропатия, объединяющая группу заболеваний с характерными морфологическими изменениями головки зрительного нерва и слоя нервных волокон сетчатки при отсутствии другой офтальмопатологии и врожденных аномалий [66]. Для этого заболевания характерны прогрессирующая гибель ганглиозных клеток сетчатки и

возникновение дефектов поля зрения, что нередко сопряжено с повышением ВГД [14, 27].

Длительно глаукому рассматривали лишь как глазное заболевание, основным фактором риска которого считали повышенное ВГД. Именно на его снижение были направлены все терапевтические и хирургические методы лечения. Однако, несмотря на доказанную нормализацию ВГД у каждого пятого пациента с ПОУГ продолжается ухудшение зрительных функций [57]. Это еще раз подтверждает неоспоримый факт существования механизмов развития глаукомной оптической нейропатии, не зависящих от уровня ВГД.

Среди современных теорий патогенеза глаукомы можно выделить механическую (ретенционную), биомеханическую, сосудистую, метаболическую, генетическую, аутоиммунную, нейродегенеративную. Возможно, именно нейродегенеративная теория сможет объединить все накопленные данные о патогенезе глаукомной оптической нейропатии.

Одной из важных патофизиологических характеристик ПОУГ является повреждение ганглиозных клеток сетчатки [1, 14]. Этот процесс возникает вследствие целого ряда 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 [12].

В последнее время многие авторы сходятся на том, что разрушение нейроэлементов зрительного пути может происходить из-за процесса вторичной трансинаптической нейродегенерации. По мнению N. Gupta с соавторами (2006 год), такой процесс объединяет первичную глаукому с другими нейродегенеративными заболеваниями, при этом ключевым элементом их развития является аксонопатия [74].

В литературе всё чаще встречаются работы, свидетельствующие о наличии тесных связей первичной открытоугольной глаукомы с такими

нейродегенеративными заболеваниями, как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона [1, 2, 14, 50, 75, 110]. По данным A.U. Bayer (2001 год), частота встречаемости глаукомы у пациентов с болезнью Альцгеймера составляет 25,9%, в то время как в контрольной группе этот показатель равен 5,2% [44]. Подтверждением относительной схожести этих двух патологических состояний является обнаружение дефектов полей зрения у пациентов с болезнью Альцгеймера, напоминающих картину глаукомного поражения зрительных функций [139]. Безусловно их объединяют рост заболеваемости с возрастом, избирательное поражение определенного вида нейронов, схожий механизм гибели нервных клеток [63, 75, 136].

В развитии нейродегенеративных заболеваний особая роль принадлежит митохондриям [109]. Митохондриальная патология может быть одним из ключевых звеньев патогенеза ПОУГ [83]. Структурно-функциональные изменения митохондрий приводят к «окислительному стрессу» и эксайтотоксичности (от англ. excitotoxicity – токсичность, развивающаяся при возбуждении) [134]. Основой патологии при эксайтотоксичности является нарушение кальциевого гомеостаза и активация N-Метил-D-аспартата (NMDA) рецепторов. Косвенным доказательством того, что явление эксайтотоксичности присутствует и при глаукоме, является положительное нейропротективное действие антагонистов медиаторов NMDA-рецепторов. В эксперименте на животных при длительном повышении ВГД отмечено замедление гибели аксонов зрительного нерва при введении мемантина [76]. У обезьян длительно сохранялись зрительные функции, а при регистрации электроретинограммы были выявлены лишь незначительные изменения [76]. Считается, что антагонисты NMDA-рецепторов снижают эксайтотоксичность путем стабилизации клеточных мембран, которая была дестабилизирована митохондриальной дисфункцией и снижением продукции АТФ [142].

В последние годы исследователи уделяют большое внимание роли β -амилоида в развитии глаукомной нейрооптикопатии [146, 147]. Так, было

выявлено присутствие β -амилоида у мышей с экспериментальной глаукомой, уровень его носил дозозависимый эффект [110]. На культуре выделенных ганглиозных клеток сетчатки мышей было продемонстрировано нейротоксическое действие предшественника β -амилоида в присутствии индуктора его синтеза. Дегенерация нейронов сетчатки была пропорциональна времени воздействия β -амилоида и его концентрации. При добавлении в культуру клеток ингибитора синтеза β -амилоида гибель клеток прекращалась [140]. Сывороточный амилоид при помощи полимеразной цепной реакции был также обнаружен у пациентов с глаукомой в трабекулярной зоне, а его уровень в СК был выше, чем у пациентов без глаукомы [143]. В настоящее время активно рассматривается возможность апробации препаратов, применяемых в лечении нейродегенеративных расстройств при болезни Альцгеймера, в терапии глаукомной нейрооптикопатии.

При глаукоме выделяют 4 степени изменения аксонов: 1 - безвозвратно погибшие; 2 - имеющие признаки, соответствующие острой фазе дегенерации; 3 - с дистрофическими изменениями, вследствие которых при сохранении условий существования они могут погибнуть, и 4 - аксоны, структура которых полностью сохранена [127]. Учитывая это, следует сказать, что актуальным направлением терапии глаукомы является нейропротекция, которая, прежде всего, уменьшает явления дистрофии в третьей группе аксонов, а также сохраняет целостность структуры неизмененных элементов. С позиции клинической медицины нейропротекцию можно определить как комплекс терапевтических мероприятий, направленных на предотвращение, уменьшение, а в ряде случаев, и обратимость процессов гибели нервных клеток. Такая терапия глаукомы эффективна только при условии достижения «давления цели» с помощью медикаментозного лечения, лазерного или хирургического воздействий.

В настоящий момент не существует нейропротекторных препаратов с доказанным действием. Однако к ним условно относятся антагонисты NMDA-

рецепторов, антиоксиданты, блокаторы кальциевых каналов, антиглаукомные препараты с нейропротекторными свойствами (бримонидин), нейротрофические факторы, антиапоптозные вещества, генную и иммуномоделирующую терапию.

1.5. Соотношения различных биологически активных веществ в слезной жидкости и внутриглазных структурах

Различные биологически активные вещества в СЖ изучаются достаточно широко. Так, например, провоспалительные и противовоспалительные цитокины оцениваются в слезе при различной патологии органа зрения [4, 13], фактор роста эндотелия сосудов – у пациентов с диабетической ретинопатией [31], эндотелин-1, метаболит оксида азота (NO₂-), трансформирующий фактор роста – β1 (ТФР-β1), фактор некроза опухоли-α (ФНО-α) – у пациентов с нарушением кровообращения в сетчатке и зрительном нерве [6]. Вместе с тем отсутствует информация о том, как содержание различных факторов в слезе характеризует их изменения внутри глаза. Лишь в единичных работах проводилось сравнение уровней некоторых биологически активных веществ как в СЖ, так и во ВПК, однако полученные результаты были весьма неоднозначными [33, 34, 84, 96, 120].

Весьма близкие концентрации во ВПК и СЖ больных с меланомой хориоидеи демонстрируют провоспалительные цитокины - интерлейкины, а также матриксная металлопротеиназа-9 [33, 34]. В данных работах выявлена прямая достоверная взаимосвязь между содержанием ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ММР-9 в слезной и внутриглазной жидкостях поражённого глаза у пациентов с меланомой хориоидеи, что свидетельствовало о нарушении гематоофтальмического барьера при развитии опухолевого процесса. [33, 34]

Jäger K. с соавторами в 2013 исследовали ферменты синтеза мочевины в СЖ, ВПК, плазме крови и показали отсутствие корреляции между слезой и двумя другими биологическими жидкостями. Однако они отметили высокую корреляцию между ферментами во ВПК и крови ($r = 0,7$, $p = 0,0001$) [84].

Почти в 70 раз более высокий уровень в СЖ по сравнению с ВПК имеет фактор ускорения распада комплемента (complement decay-accelerating factor; DAF) [95], а некоторые биологически активные вещества, определяемые в слезе, например, эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor; EGF), во ВПК выявить не удастся [120].

Следовательно, соотношения различных биологически активных веществ весьма разнообразны и должны изучаться для каждого конкретного вещества и в зависимости от патологии.

1.6. Классификации стадий первичной открытоугольной глаукомы

Многие вопросы ведения пациентов с ПОУГ, включая оценку ее прогрессирования, выбор сроков наблюдения, определение тактики лечения, требуют выделения стадий развития заболевания. Первым исследователем, предложившим устанавливать стадийность глаукомного процесса, был Поляк Б.Л. [29]. В его классификации, одобренной Всесоюзной конференцией по глаукоме в 1952 г., предусматривалось деление глаукомы не только по клинической форме (простая и застойная), но и по стадии ее развития (по изменению поля зрения и ДЗН) и состоянию компенсации ВГД.

По заданию Правления Всесоюзного общества офтальмологов Нестеровым А.П. и Буниным А.Я. [28] была разработана классификация первичной глаукомы. Это разделение на 4 стадии носит условный характер.

Стадия I (начальная) – границы поля зрения нормальные, но есть небольшие изменения в парацентральных отделах поля зрения. Эккавацация ДЗН расширена, но не доходит до края диска.

Стадия II (развитая) – выраженные изменения поля зрения в парацентральном отделе в сочетании с его сужением более чем на 10° в верхне- и/или в нижненосовом сегментах, экскавацация ДЗН носит краевой характер.

Стадия III (далекозашедшая) – граница поля зрения концентрически сужена, и в одном или более сегментах находится менее, чем в 15° от точки фиксации, краевая субтотальная экскавацация ДЗН.

Стадия IV (терминальная) – полная потеря зрения или сохранение светоощущения с неправильной проекцией. Иногда сохраняется небольшой островок поля зрения в височном секторе.

До сих пор данная классификация широко применяется в клинической практике.

Интересная классификация открытоугольной глаукомы разработана Волковым В.В. в 2001 г. [7]. Помимо 3-х клинических форм глаукомы автор выделяет стадии глаукомы: от преглаукомы до терминальной стадии. Они диагностируются по состоянию ДЗН и поля зрения, а состояние стабилизации и дестабилизации определяется в зависимости от динамики светочувствительности сетчатки в центральном поле зрения, величины флюктуаций, от числа скотом при автоматической пороговой периметрии, а также от изменений в зрительном нерве. Данная классификация заслуживает внимания, но вряд ли может быть рекомендована для широкого использования в практической работе поликлиник и больниц из-за ее сложности.

Приведенные выше классификации больше ориентируются на исследование периферических границ поля зрения (кинетическая периметрия), которые страдают при глаукоме уже в развернутых стадиях болезни. В связи с этим возникают сложности ранней диагностики глаукомы.

На Западе долгое время не выделялись стадии глаукомного процесса. Только повсеместное внедрение компьютерной периметрии способствовало созданию первых классификаций глаукомы по стадиям.

Известно, что автоматизированная статическая периметрия считается эталоном для тестирования зрительных функций при глаукоме, так как при первом обследовании обнаруживается и измеряется исходная потеря поля зрения, а в последующих отслеживается стабильность или прогрессирование процесса. Существует целый ряд периметрических классификаций, основанных на исследовании центрального поля зрения с помощью статической периметрии. Идеальный метод для разделения функциональных повреждений при глаукоме должен быть объективным, воспроизводимым и удобным. Остановимся на 3-х наиболее популярных классификациях, основанных на описанных принципах.

Наиболее распространены критерии Hodapp-Parrish-Anderson [79], которые включают среднее отклонение или средний дефект (MD), а также общее количество точек со снижением светочувствительности. Несмотря на свою популярность, эта классификация имеет недостаток – дефект поля зрения характеризуется только тремя относительно грубыми стадиями.

Лишена данного недостатка классификация, предложенная Mills et al. в 2006 году [112], где проводится деление продвинутой (далекозашедшей) стадии на две с выделением дополнительно стадии тяжелой глаукомы в зависимости от показателя среднего отклонения.

Другая классификация Brusini's Glaucoma Staging System [52] основана на среднем отклонении и стандартном отклонении (PSD). Авторы выделяют 6 стадий нарушений (от 0-ой до 5-ой стадии). Метод полезен для определения степени нарушений и для отслеживания прогрессирования с течением времени, однако, он не предоставляет информацию о местонахождении, форме и морфологии визуальных дефектов поля, поэтому очень разные дефекты могут быть отнесены к аналогичным. Кроме того, данная классификация

запатентована, поэтому официальное ее использование требует дополнительных финансовых затрат.

В последние годы на периметре Humphrey начато использование нового индекса – Visual Field Index (VFI) [59], обеспечивающего интегральную оценку нарушений поля зрения. Данный индекс может служить дополнительным инструментом при выборе оптимальной классификации глаукомы по стадиям.

В целом, вопрос определения классификации нарушений полей зрения, обеспечивающей наиболее детальную характеристику прогрессирования глаукомного процесса, ожидает еще своего решения.

Таким образом, многочисленные работы свидетельствуют о важной роли НФГМ и ЦНТФ в качестве трофических факторов для нейронов сетчатки. Эти нейротрофические факторы выявлены во многих структурах глаза животных: ганглиозных клетках, внутреннем ядерном слое, слое нервных волокон, клетках головки зрительного нерва, трабекулярного аппарата, глиальных клетках Мюллера. Большое число экспериментальных работ свидетельствует о важной роли НФГМ и ЦНТФ в предотвращении апоптоза и обеспечении жизнедеятельности фоторецепторов и ганглиозных клеток сетчатки.

На сегодняшний день принято считать, что глаукома является мультифакторным нейродегенеративным заболеванием, одной из важных патофизиологических характеристик которого является необратимое повреждение ганглиозных клеток. Поэтому наряду с методами снижения офтальмотонуса важное значение в лечении ПОУГ приобретают поиски нейропротекторной терапии. К сожалению, число работ, посвященных изучению вопроса использования нейротрофических факторов в клинике, пока невелико, и, хотя результаты указанных работ выглядят многообещающими, практическое значение данных исследований весьма ограничено. Одной из важных проблем является недостаточность сведений о концентрации нейротрофических факторов во внутриглазных структурах. Небольшое число

работ указывает лишь на содержание факторов в слезе или внутриглазной жидкости, а сведения об их соотношениях в зарубежной и отечественной литературе отсутствуют.

Поэтому изучение содержания нейротрофических факторов во ВПК и СЖ могло бы внести существенный вклад в изучение патогенеза ряда серьезных офтальмологических заболеваний, позволило бы осуществлять обоснованный отбор пациентов для нейротрофической терапии и контроль эффективности такого лечения. Определение соотношений концентраций тех или иных нейротрофических факторов в СЖ и ВПК позволило бы оценить информативность исследований содержания нейротрофических факторов в СЖ. Большой интерес представляют также изменения указанных факторов по мере прогрессирования ПОУГ, что, в том числе, требует выбора наиболее адекватной классификации нарушений полей зрения, обеспечивающей наиболее детальную характеристику стадийности глаукомного процесса.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Общая характеристика материала исследования

Настоящее исследование базируется на анализе клинико-функциональных и клинико-лабораторных методов исследования 165-ти пациентов (165-ти глаз). Отбор пациентов осуществляли сплошным методом в период с марта 2014 года по февраль 2017 года.

Все пациенты были разделены на 3 группы, сформированные в зависимости от глазной патологии:

1-я группа – *основная* – пациенты с катарактой и сопутствующей ПОУГ различной степени выраженности (55 человек);

2-я группа – *сравнения* – пациенты с возрастной катарактой (66 человек);

3-я группа – *контрольная* – испытуемые без офтальмологической патологии (29 человек).

Кроме того, на слезной жидкости 15-ти здоровых добровольцев, которые не были включены в указанные группы, проводилась отработка методики определения содержания нейротрофических факторов.

У каждого человека в анализ включали только один глаз (у пациентов – оперированный, у здоровых лиц – избранный случайным методом).

В основную группу были включены пациенты, которым выполнялась ФЭК+ИОЛ. У них катаракта сочеталась с ПОУГ различной степени выраженности, которая была подтверждена как клинически, так и с помощью специальных методов исследования. Длительность течения глаукомы от момента постановки диагноза составляла от 1-го до 120-ти месяцев (в среднем $32,15 \pm 25,1$ месяцев). Микроинвазивная непроникающая глубокая склерэктомия была выполнена ранее у 31-го пациента, из них у 3-х человек дважды, у 15-ти

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.

В группу сравнения вошли пациенты с возрастной неосложненной катарактой, которым также была выполнена операция ФЭК+ИОЛ.

Распределение больных по возрасту и полу в основной группе и группе сравнения представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Распределение пациентов в основной группе и группе сравнения по возрасту и полу

Группы	Средний возраст M \pm σ (Мин – Макс)	Пол	
		мужчины	женщины
Основная	72,4 \pm 6,2 (55-84)	23	32
Сравнения	69,6 \pm 8,8 (53-88)	18	44

Примечание: различие групп по возрасту и полу недостоверно ($P > 0,05$)

Контрольную группу составили испытуемые, проходившие диспансеризацию на базе ГБУЗ «НПЦ им. Соловьева ДЗМ», возраст и пол которых были сопоставимы с контингентом больных группы сравнения – 67,5 \pm 4,7 лет, 9 мужчин и 20 женщин.

Критериями включения для всех групп пациентов были: возраст старше 50-ти лет, длина глаза менее 26-ти мм, у пациентов – неосложненная операция (ФЭК+ИОЛ), истинное ВГД не выше 20, при глаукоме – 25 мм рт.ст.

Критериями исключения были: терминальная глаукома, тяжелая сопутствующая глазная патология (дегенеративные заболевания сетчатки, увеиты, атрофия зрительного нерва и др.), гиперметропия высокой степени и соматические заболевания (сахарный диабет, бронхиальная астма, аутоиммунные, онкологические заболевания, инсульт и инфаркт в анамнезе и другая серьезная соматическая патология), отсутствие которых подтверждалось опросом, исследованием соматического статуса и анализом данных медицинской документации. Допускались отдельные сопутствующие заболевания, такие как гипертоническая болезнь 1-2 стадии, мерцательная аритмия, стенокардия напряжения I-II функционального класса и т.п. У всех обследуемых лиц сопутствующая патология находилась в стадии компенсации.

2.2. Клинико-функциональные методы исследования

Объективному обследованию органа зрения всех пациентов предшествовал тщательный сбор анамнеза по поводу жалоб, течения, времени возникновения и динамики заболевания, а также наличия сопутствующих заболеваний, предшествующих офтальмологических вмешательств и травм глаз.

Всем пациентам, вошедшим в данное исследование, проводили комплексное офтальмологическое обследование, включающее 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.

Визометрию проводили без коррекции и с максимальной очковой коррекцией с помощью проектора знаков и фороптера фирмы Topcon ACP-5 (Япония).

Автокераторефрактометрию выполняли на аппаратах Nidek ARK-710A, Topcon KR-8100 (Япония) в естественных условиях.

Динамическую периметрию проводили на проекционном периметре АППЗ-01 (Россия) или дуговом периметре ППП-60 (Россия) по общепринятой методике.

Тонометрию выполняли на пневмотонометре фирмы «Торсон» (Япония) и контактным методом с помощью тонометра Маклакова грузом 10,0 грамм.

Тонографию выполняли по показаниям пациентам с глаукомой при помощи компрессионного тонографа ТНС-100 (Россия) в течение 4 минут.

Биомикроскопию переднего отрезка глаза проводили с использованием щелевой лампы модели SL-120 фирмы «Carl Zeiss Meditec AG» (Германия).

Гониоскопию проводили пациентам с глаукомой с помощью 4-х зеркальной линзы Ван-Бойнингена для оценки степени открытия угла передней камеры.

Офтальмоскопию выполняли при достаточной прозрачности сред переднего отрезка глаза с помощью линзы «Max field» 90 дптр фирмы «Ocular Instruments» (США). Оценивали состояние диска зрительного нерва (цвет, границы, глубину и величину экскавации, характер височного края, сдвиг сосудистого пучка, наличие перипапиллярной хориоретианальной атрофии), слой нервных волокон, состояние макулярной зоны, калибр и ход сосудов глазного дна, их световые рефлексы.

Ультразвуковые методы исследования (*эхобиометрию и В-сканирование*) выполняли с помощью ультразвукового биометра «SSI» (Sonometrics Systems, Inc., США) для измерения длины переднезадней оси глазного яблока, глубины

передней камеры глаза, толщины хрусталика и офтальмологического сканера «Eye Cubed» (Ellex Inc., Австралия) для оценки состояния стекловидного тела и структур заднего полюса глаза.

Определение порога электрической чувствительности и электрической лабильности органа зрения проводили по стандартной методике с использованием «Фосфен-тестера» (Россия).

ОКТ производили на аппарате «Cirrus HD-OCT 5000» фирмы «Carl Zeiss Meditec AG» (Германия). Расширения зрачка не требовалось. Осуществляли сканирование области ДЗН по протоколу «Optic Disc Cube 200x200» с последующим анализом, который выполняли по протоколу «ONH and RNFL OU Analysis», а также макулярной области по протоколу «Macular Cube 512x128» с последующим анализом слоя ганглиозных клеток по протоколу «Ganglion Cell OU Analysis» (программное обеспечение версии 8.1.0.117).

КП проводили на периметре Humphrey Field Analyzer II (Carl Zeiss Meditec Inc.) 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°. Пациентам, которым не удавалось провести обследования до операции ввиду выраженных помутнений хрусталика, проводили компьютерную периметрию через два дня после ФЭК+ИОЛ. Если отсутствовали данные проведенных ранее исследований или они были недостаточного качества, периметрию проводили повторно до получения повторяемых результатов. Все 55 человек с ПОУГ были оценены согласно критериям, характерным для различных стадий изменений центрального поля зрения по классификациям Mills et al., Hodapp-Parrish-Anderson и Brusini P. [52, 79, 112].

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 [54]. Статистически значимым считали уровень $P < 0,05$.

2.3. Клинико-лабораторные методы исследования

2.3.1. Описание и подготовка биологического материала, взятого для 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-ти минут, затем сыворотку аликвотировали и замораживали при температуре ниже -20 °C и

хранили от 1-го до 4-х 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 (рисунок 1).



Рисунок 1 – Пипеточный дозатор для сбора биологических жидкостей

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-го до 4-х месяцев без повторных циклов размораживания и оттаивания. Непосредственно перед тестированием биологический материал размораживали при комнатной температуре, центрифугировали в течение 10-ти минут со скоростью 4000 об/мин.

Если в основной и контрольной группах исследования обоих нейротрофических факторов были выполнены во всех случаях, то в группе сравнения была разница между НФГМ и ЦНТФ в количестве исследуемых образцов. У двух пациентов этой группы исследование СЖ произвести не удалось по причине выраженного синдрома сухого глаза, и они были полностью исключены из исследования. У первых 7-и пациентов НФГМ не исследовали в связи с отсутствием диагностикумов. У двух пациентов с крайне ограниченным количеством слезы исследовали только НФГМ. Указанных пациентов исключали из соответствующего раздела исследования (НФГМ или ЦНТФ). У 4-х пациентов группы сравнения и одного человека в контрольной группе исследования СК не были выполнены в связи с гемолизом крови. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Распределение исследованных образцов слезной жидкости, влаги передней камеры и сыворотки крови по группам

Группа	Всего больных	НФГМ			ЦНТФ		
		СЖ	ВПК	СК	СЖ	ВПК	СК
Основная	55	55	55	55	55	55	55
Сравнения	66	57	57	53*	62	62	58*
Контрольная	29	29	-	28*	29	-	28*
Всего	150	141	112	136	146	117	141

Примечание: * – отличается по количеству из-за гемолиза образцов крови

2.3.2. Определение НФГМ в биологических жидкостях человека

2.3.2.1 Определение НФГМ в сыворотке крови

Концентрацию НФГМ в СК определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора «Human BDNF Immunoassay» фирмы R&D Systems (США). Метод определения НФГМ основан на твердофазном «сэндвич» типе ИФА.

Определение НФГМ в СК выполняли согласно инструкции, предложенной фирмой производителем тест-системы.

Перед проведением тестирования образцы СК разводили в 20 раз раствором RD6P, предназначенным для разведения стандартов и образцов СК.

Для построения калибровочного графика использовали разведения стандартного образца НФГМ в концентрациях: 4000 пг/мл, 2000 пг/мл, 1000 пг/мл, 500 пг/мл, 250 пг/мл, 125 пг/мл, 62,5 пг/мл.

Чувствительность метода (минимальная определяемая концентрация НФГМ) по данным фирмы-производителя составляла 20 пг/мл.

Полученные результаты, умноженные на 20 (коэффициент разведения), укладывались в диапазон нормальных значений концентрации НФГМ, приведенный в инструкции к тест-системе для СК: 6186-42580 пг/мл с медианой 27793 пг/мл.

2.3.2.2 Определение НФГМ в слезной жидкости и влаге передней камеры

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].

Согласно инструкции к набору, для повышения определяемого количества НФГМ в биологическом материале проводили предварительную подготовку образцов СЖ и ВПК, разводя их в 5 раз в фосфатном буферном растворе Dulbecco's PBS (DPBS), с последующим проведением кислотного гидролиза разведенных образцов.

Для построения калибровочного графика использовали разведения стандартного образца НФГМ в концентрациях: 500 пг/мл, 250 пг/мл, 125 пг/мл, 62,5 пг/мл, 31,2 пг/мл, 15,6 пг/мл, 7,8 пг/мл.

Чувствительность метода (минимальная определяемая концентрация НФГМ) составляла 7 пг/мл.

Полученные результаты дополнительно умножали на 5, учитывая предварительное разведение образцов СЖ и ВПК буфером DPBS.

2.3.3. Определение ЦНТФ в биологических жидкостях человека

2.3.3.1. Определение ЦНТФ в сыворотке крови

Концентрацию ЦНТФ в СК определяли методом ИФА с использованием набора «Human CNTF Immunoassay» фирмы R&D Systems (США). Метод определения ЦНТФ также основан на твердофазном «сэндвич-варианте» ИФА.

За основу определения ЦНТФ в СК была взята инструкция, предложенная фирмой-производителем тест-системы.

Согласно этой инструкции проведенное производителем тестирование 34 СК здоровых волонтеров с целью выявления ЦНТФ при помощи данного метода показало, что все результаты попадали в зону ниже чувствительности метода, заявленной производителем – 8 пг/мл. Поэтому нами была предпринята попытка, не нарушая протокола исследования, повысить чувствительность метода за счет подбора разбавителя с минимальной оптической плотностью и смещением рабочей зоны калибровочного графика в область более низких концентраций (от 3,9 до 500 пг/мл), вместо заявленных производителем 31,2 пг/мл – 2000 пг/мл.

Таким образом, для построения калибровочного графика использовали разведения стандартного образца ЦНТФ в концентрациях: 500 пг/мл, 250 пг/мл, 125 пг/мл, 62,5 пг/мл, 31,2 пг/мл, 15,6 пг/мл, 7,8 пг/мл, 3,9 пг/мл. Для разбавления стандарта использовали фосфатный буфер с 1% бычьим сывороточным альбумином (PBS с 1% BSA), поскольку из шести

протестированных разбавителей у него оказалась самая низкая оптическая плотность бланка при сохранении его адьювантных свойств, а также хорошая сходимость показателя; коэффициент вариации составлял 7,8%.

Для того чтобы убедиться, что в зоне низких концентраций выбранная модификация метода работает стабильно, предварительно проверяли сходимость результатов измерений, используя три установочные серии контрольной СК. В качестве контрольной СК использовали сыворотку, собранную и смешанную от 15 здоровых добровольцев, разлитую по аликвотам и замороженную ниже 20 °С. Правильность измерений оценивали в трех установочных сериях с использованием рекомбинантного человеческого ЦНТФ в концентрациях ниже 8 пг/мл.

Чувствительность метода (минимальная определяемая концентрация ЦНТФ) в данной модификации метода составляла 2,5 пг/мл.

2.3.3.2 Определение ЦНТФ в слезной жидкости и влаге передней камеры

Концентрацию ЦНТФ в СЖ и ВПК также определяли методом ИФА с использованием тест-системы «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 (200 мкл биологического материала на каждую лунку микропланшета), приходилось разбавлять биологический материал. При попытке определить концентрацию ЦНТФ в разбавленных образцах СЖ 15 добровольцев, часть проб попадала в зону ниже порога чувствительности метода (8 пг/мл) (также как и при тестировании СК). Поэтому для анализа разведенных образцов СЖ и

ВПК использовали ту же модификацию метода «Human CNTF Immunoassay» фирмы R&D Systems (США), что и при тестировании сыворотки крови (раздел 2.3.3.1).

Для подбора оптимальной степени разведения проверяли сходимость результатов измерений концентрации ЦНТФ в объединенной СЖ добровольцев при различных разведениях: в 2, 4, 6, 8, 10 раз. Пробы СЖ с разведением образца более чем в 6 раз давали недопустимо большой разброс значений, так как в большинстве своем попадали в зону, близкую к нулевым значениям. Коэффициент вариации определяли в 5 установочных сериях СЖ (из 10 проб в каждой) при разведении СЖ PBS с 1% BSA соответственно 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5. Коэффициент вариации в установочных сериях был соответственно 6,4%, 6,9%, 7,5%, 9,4%, 12,7%.

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 год) [121], для увеличения содержания свободной формы ЦНТФ в вышеуказанном биологическом материале и повышения его доступности для определения.

Протокол для определения ЦНТФ в СЖ и ВПК был такой же как для определения ЦНТФ в СК (раздел 2.3.3.1).

Полученные результаты умножали на 4 (коэффициент разведения биологического материала).

Во всех приведенных исследованиях оптическую плотность проб СК СЖ и ВПК измеряли на автоматическом иммуноферментном анализаторе ChemWell® 2910 (Combi) (рисунок 2), используя основной фильтр 450 нм, отсекающий – 630 нм. Расчет концентрации образцов проводили автоматически по калибровочной кривой кубический сплайн.



Рисунок 2 – Автоматический иммуноферментный анализатор ChemWell® 2910 Combi.

Данный раздел работы 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., которым мы выражаем искреннюю благодарность за выполнение и помощь в проведении исследования.

Глава 3. КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ

Целью данного раздела исследования явился выбор классификации нарушений полей зрения, обеспечивающей более детальную характеристику прогрессирования глаукомного процесса. Для решения поставленной задачи потребовалось сопоставить несколько видов классификаций стадий ПОУГ, а именно широко используемую в России классификацию Нестерова-Бунина, в которой учитываются изменения периферических границ поля зрения, и 3-х наиболее известных классификаций, основанных на изменениях центрального поля зрения при компьютерной периметрии. Также в данной главе представлены детальные результаты клиничко-функциональных исследований составивших основную группу 55-ти пациентов с ПОУГ, которым была выполнена операция факоэмульсификация катаракты с имплантацией ИОЛ по поводу сопутствующей катаракты.

3.1. Дооперационное обследование пациентов

В исследование вошли 55 пациентов (55 глаз) с ПОУГ различной степени выраженности и катарактой в возрасте от 55-ти до 84-х лет (средний возраст – $72,36 \pm 6,18$ лет), среди них мужчин – 23 (41,8%), женщин – 32 (58,2%). Распределение обследуемых пациентов по полу и возрасту представлено в таблице 3.

Таблица 3 – Распределение пациентов с ПОУГ по полу и возрастным группам (n=55)

Возраст, лет	Мужчины, n	Женщины, n	Всего, n	Доля от общего количества, %
55-65	6	1	7	12,7
66-75	13	18	31	56,4
76-84	4	13	17	30,9
Всего	23	32	55	100

Некоторые другие характеристики пациентов, составивших основную группу, представлены в разделе 2.1.

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, фако- и иридолизис отсутствовали. Были выявлены помутнения хрусталика различной степени выраженности. Четких клинически выраженных признаков псевдоэкзофтальмического 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 диска различной степени выраженности, увеличение размера экскавации, сдвиг сосудистого пучка к носу, наличие зоны перипапиллярной атрофии.

3.2. Операция и послеоперационное обследование пациентов

Всем пациентам была выполнена ФЭК+ИОЛ по стандартной методике на факоэмульсификационной машине «Infinity» («Alcon», США). Имплантировались заднекамерные гидрофобные ИОЛ с капсульной фиксацией. Все операции не сопровождались какими-либо интраоперационными осложнениями. К послеоперационным можно отнести гипертензию у 7-ми пациентов, потребовавшую назначения дополнительных гипотензивных препаратов. У всех этих пациентов была развитая или далекозашедшая стадии глаукомы.

На следующий день после операции средняя максимально скорректированная острота зрения составила $0,69 \pm 0,19$. Среднее значение ВГД было $20,4 \pm 4,1$. Средние значения остроты зрения и ВГД в зависимости от стадии ПОУГ представлены в таблице 4.

Таблица 4 – 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 – Далекозашедшая (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 5.

Таблица 5 – Изменения параметра Visual Field Index (VFI) по стадиям глаукомы при использовании различных классификаций ПОУГ

Стадия	Параметр	Классификация			
		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 5, все классификации достаточно равномерно описывали 1-ую стадию процесса. Выбор классификации для отдельно взятого пациента не играет большой роли, поскольку оценить прогрессирование глаукомы не представляет трудности (сравнение в динамике поля зрения). Это важно для характеристики работы клиники и в научных целях. Особенно важен такой параметр как диагностика глаукомы на ранней стадии процесса. Если оценивать данные классификации с этой точки зрения, то ручная кинетическая периметрия не может сравниться с автоматизированной статической периметрией. 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 отражает прогрессирование 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.

Как видно из таблицы, классификация Brusini 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 запатентована, что требует дополнительной оплаты при ее официальном применении. Однако это не единственный недостаток, 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 классификаций предпочтительной выглядела классификация Mills et al. [112].

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. [112] была избрана для использования в настоящей работе. Именно ее следует рекомендовать для научных исследований и, с учетом реальных возможностей (время, оборудование), для практического использования в клинике.

Всем пациентам после факоэмульсификации катаракты была выполнена ОКТ области ДЗН с последующей оценкой толщины перипапиллярного слоя нервных волокон (RNFL) и стереометрических параметров ДЗН, а также ОКТ макулярной области с последующим анализом комплекса ганглиозных клеток сетчатки. Основные показатели ОКТ представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Средние показатели толщины перипапиллярного слоя нервных волокон и стереометрических параметров ДЗН по данным ОКТ в зависимости от стадии ПОУГ

Показатель Стадия	RNFL, µm	RNFL S, µm	RNFL I, µm	RA, mm²	ACD	VCD
1	75,00±6,54	87,67±14,60	87,22±15,94	1,04±0,21	0,53±0,22	0,54±0,19
2	66,17±6,49	71,33±16,25	83,08±9,62	0,85±0,15	0,68±0,06	0,69±0,09
3	58,11±7,10	68,06±13,33	64,83±8,89	0,75±0,15	0,78±0,07	0,82±0,06
4	56,69±6,02	64,31±9,05	59,81±9,21	0,61±0,14	0,80±0,06	0,82±0,05

Примечание: RNFL – средняя толщина перипапиллярного СНВС, RNFL S – толщина верхнего пучка перипапиллярного СНВС, RNFL I – толщина нижнего пучка перипапиллярного СНВС, RA – площадь нейроретинального пояса, ACD – соотношение площади экскавации и ДЗН, VCD – соотношение линейных размеров экскавации и ДЗН по вертикали

Как видно из таблицы 6 все средние показатели толщины перипапиллярного СНВС равномерно уменьшаются от начальной к тяжелой стадиям ПОУГ, а стереометрические параметры ДЗН соответственно достаточно плавно увеличивались. Это служит дополнительным подтверждением правильности выбора классификации Mills et al. для оценки стадийности глаукомного процесса в рамках настоящего исследования. Также была оценена толщина слоя ганглиозных клеток сетчатки в комплексе с внутренним плексиформным слоем, которые последовательно уменьшались по мере утяжеления ПОУГ.

Суммируя проведенные исследования, можно сделать вывод, что целесообразно применять не наиболее часто используемую в России классификацию ПОУГ по Нестерову-Бунину, где 4-ой стадией является уже терминальная глаукома, а классификацию Mills et al. по данным исследования центрального поля зрения, где деление по стадиям происходит более равномерно. Даже при 4-ой – тяжелой глаукоме – средняя острота зрения после операции ФЭК+ИОЛ была выше 0,5. Данный результат подтверждает известное положение о том, что центральное зрение у пациентов с ПОУГ страдает в последнюю очередь.

Важным преимуществом классификаций, основанных на исследовании центрального поля зрения, является и тот факт, что они более информативны в начальных стадиях ПОУГ, в которых изменения центрального поля зрения опережают нарушения периферических отделов.

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 обращаются за помощью на поздних стадиях.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА ГОЛОВНОГО МОЗГА

Целью данной главы явилось изучение содержания нейротрофического фактора головного мозга в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой, характер его изменений по мере прогрессирования глаукомы. Немаловажной задачей была оценка влияния возрастной катаракты на содержание фактора в слезной жидкости и сыворотке крови. Для этого были выполнены клинико-лабораторные исследования нейротрофического фактора головного мозга в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у больных с первичной открытоугольной глаукомой, у пациентов с возрастной катарактой, а также исследованы слезная жидкость и сыворотка крови здоровых испытуемых. Показаны соотношения фактора в изученных биологических жидкостях. На основе полученных результатов предложен способ определения содержания фактора во влаге передней камеры по его содержанию в слезной жидкости.

4.1. Содержание НФГМ в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у больных с возрастной катарактой

Исследование НФГМ в СК в 5-ти случаях не удалось осуществить из-за гемолиза, в том числе, у 4-х пациентов в группе сравнения и одного человека в контрольной группе.

Первым этапом работы явилось сравнение содержания НФГМ в СЖ, а также в СК у больных с катарактой и здоровых лиц для оценки влияния возрастной катаракты на указанные параметры.

Поскольку возраст больных с катарактой в группе сравнения был существенно выше, чем в контрольной группе, была выделена подгруппа больных аналогичного возраста путем исключения пациентов моложе 61-го и старше 75-ти лет (подгруппа катаракты 61-75 лет). Результаты сравнения этой подгруппы и контрольной группы представлены в таблице 7.

Таблица 7 – 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

Как следует из таблицы 7, при одинаковых половозрастных характеристиках сравниваемые группа и подгруппа не различались по содержанию НФГМ в СЖ и СК. Это позволяло полагать, что возрастная катаракта не оказывает существенного влияния на указанные параметры.

4.2. Содержание НФГМ в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у больных с ПОУГ

С учетом полученных результатов было выполнено сравнение содержания НФГМ в различных биологических жидкостях у пациентов с катарактой без и в сочетании с ПОУГ (таблица 8, столбцы 2-3). В таблице 8 представлены также изменения изученных показателей в зависимости от стадии глаукоматозного процесса.

Таблица 8 – 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

Примечания: для СК в группе сравнения n=53

Как видно из таблицы 8, в основной группе (больных с ПОУГ) отмечалось существенное (в среднем примерно на $\frac{1}{3}$) снижение концентрации НФГМ во ВПК и СЖ. Уровень НФГМ в СК был также достоверно снижен, но не столь заметно. Соотношения концентраций во ВПК и СЖ в обеих группах были практически одинаковыми.

4.2.1. Динамика изменений содержания нейротрофического фактора головного мозга в исследуемых биологических жидкостях по мере прогрессирования глаукомы

Наибольший интерес представляет динамика показателей НФГМ у больных с ПОУГ по мере прогрессирования заболевания, что являлось одной из задач исследования. Особенно выраженное снижение уровня НФГМ во всех изученных биологических жидкостях отмечалось в начальной стадии ПОУГ. При этом наиболее резкое снижение – более, чем в 2,5 раза – демонстрировал уровень НФГМ во ВПК, который затем последовательно повышался по отношению к начальной ПОУГ, хотя и оставался достоверно сниженным в сравнении с пациентами без глаукомы. Выявленные особенности изменений содержания НФГМ во ВПК подтверждались также его обратной зависимостью от периметрического индекса VFI: коэффициент корреляции $r=-0,404$; $P=0,002$ (рисунок 3).

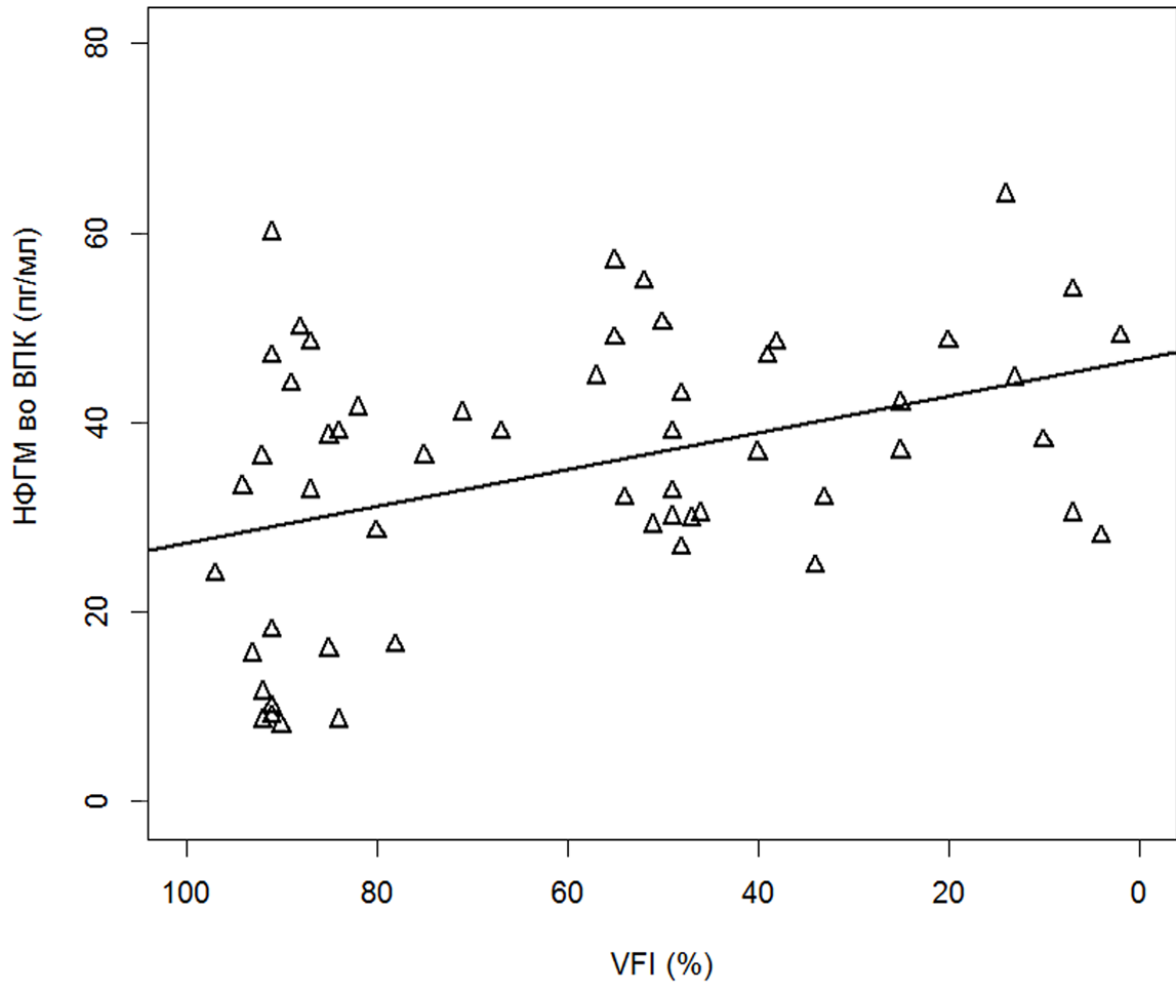


Рисунок 3 – Зависимость содержания HFGM во ВПК больных основной группы от периметрического индекса VFI (его значения по оси x даны в обратном порядке).

Показатели НФГМ в СЖ и СК также достоверно повышались во 2-4 стадиях по отношению к начальной стадии, оставаясь, однако, сниженными относительно группы сравнения (отличие от группы сравнения достоверно только для СЖ).

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.

4.3. Соотношения НФГМ в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови

Корреляционный анализ показал, что уровень НФГМ во ВПК достоверно коррелирует с его содержанием в СЖ: $r=0,59$ ($P<0,000$) в группе сравнения и $r=0,53$ ($P<0,000$) в основной группе. Сравнение коэффициентов регрессии не выявило существенных различий между этими двумя группами, что позволило объединить их для дальнейших расчетов. Корреляция уровней НФГМ во ВПК и СЖ в объединенной группе была сильной: $r=0,66$ ($P<0,000$). На рисунке 4 представлена описанная корреляция.

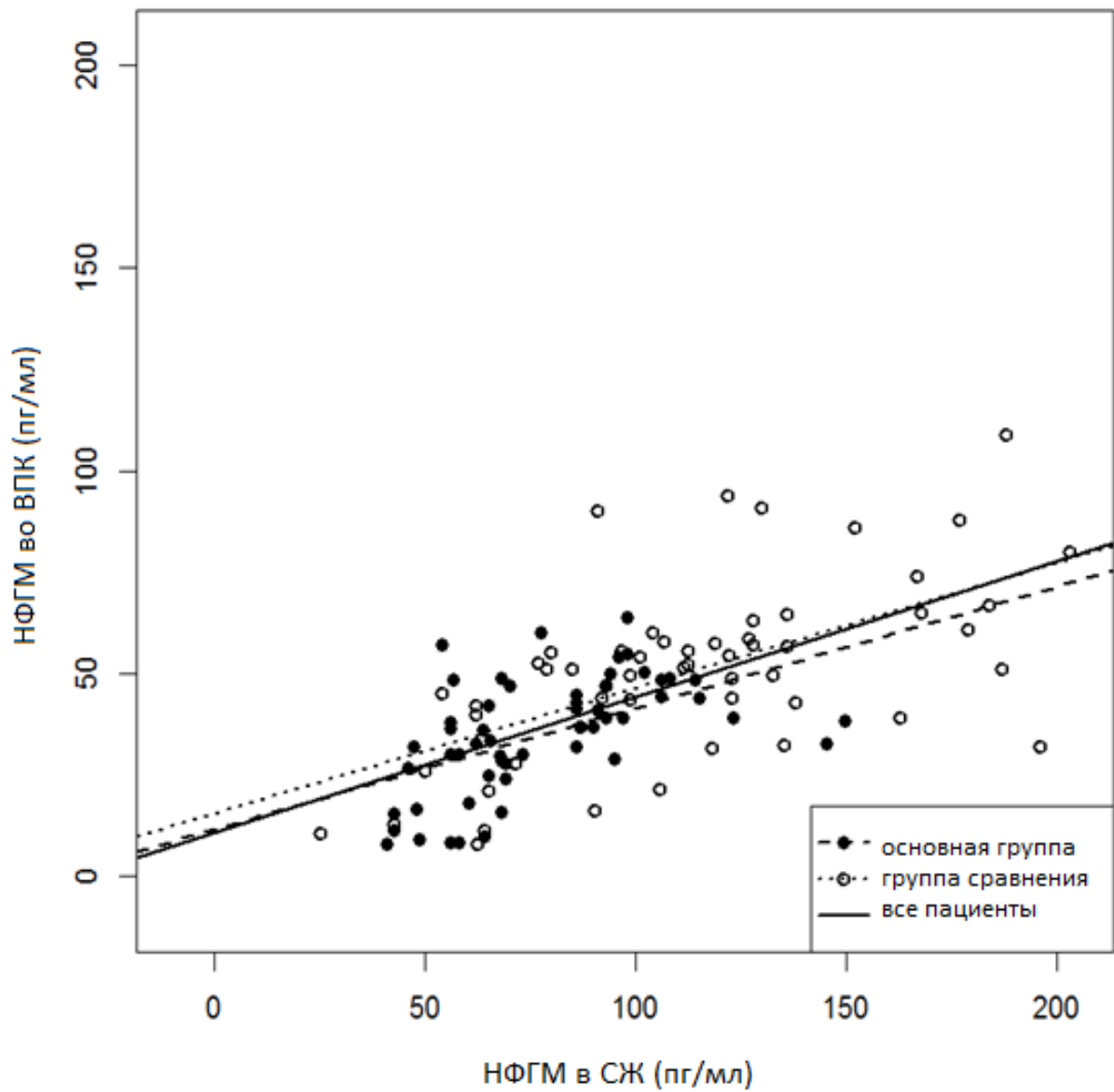


Рисунок 4 – Зависимость содержания НФГМ во ВПК от его уровня в СЖ в основной группе, группе сравнения и при их объединении.

Методом линейной регрессии была получена формула для ориентировочной оценки концентрации уровня НФГМ во ВПК (y) в зависимости от его содержания в СЖ (x):

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

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

Концентрация НФГМ в СК демонстрировала умеренную корреляцию с уровнями НФГМ во ВПК ($r=0,40$; $P < 0,000$) и в СЖ ($r=0,51$; $P < 0,000$).

Таким образом, показано, что возрастная катаракта не оказывает существенного влияния на содержание НФГМ в изученных биологических жидкостях. У пациентов с ПОУГ выявлено существенное снижение содержания НФГМ во ВПК, СЖ и СК, особенно резкое в начальной стадии заболевания. В последующих стадиях снижение НФГМ во ВПК и СЖ последовательно становится существенно менее выраженным, однако сохраняется. Установленная сильная корреляция содержания НФГМ во ВПК и СЖ открывает новые возможности для не прямой оценки уровня НФГМ во ВПК больных с ПОУГ.

ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИЛИАРНОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА

Целью представленной главы явилось изучение содержания цилиарного нейротрофического фактора в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой, характер его изменений по мере прогрессирования глаукомы. Важной задачей была оценка влияния возрастной катаракты на содержание фактора в слезной жидкости и сыворотке крови. Для этого были выполнены клинико-лабораторные исследования цилиарного нейротрофического фактора в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у больных с первичной открытоугольной глаукомой, у пациентов с возрастной катарактой, а также исследованы слезная жидкость и сыворотка крови здоровых испытуемых. Показаны соотношения фактора в изученных биологических жидкостях. На основе полученных результатов предложен способ определения содержания фактора во влаге передней камеры по его содержанию в слезной жидкости.

5.1. Содержание ЦНТФ в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у больных с возрастной катарактой

Исследование ЦНТФ в СК в 5-ти случаях не удалось осуществить из-за гемолиза, в том числе, у 4-х пациентов в группе сравнения и одного человека в контрольной группе.

Первым этапом работы явилось сравнение содержания ЦНТФ в СЖ, а также в СК у больных с катарактой и здоровых лиц для оценки влияния возрастной катаракты на указанные параметры.

Поскольку возраст больных с катарактой в группе сравнения был существенно выше, чем в контрольной группе, была выделена подгруппа больных аналогичного возраста путем исключения пациентов моложе 61-го и старше 75-ти лет (подгруппа катаракты 61-75 лет). Результаты сравнения этой подгруппы и контрольной группы представлены в таблице 5.1.

Таблица 9 – 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

Как следует из таблицы 9, при одинаковых половозрастных характеристиках сравниваемые группа и подгруппа не различались по содержанию ЦНТФ в СЖ и СК. Это позволяло полагать, что возрастная катаракта не оказывает существенного влияния на указанные параметры.

5.2. Содержание ЦНТФ в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у больных с ПОУГ

С учетом полученных результатов было выполнено сравнение содержания ЦНТФ в различных биологических жидкостях у пациентов с катарактой без и в сочетании с ПОУГ (таблица 10, столбцы 2-3). В таблице 10 также представлены изменения изученных показателей в зависимости от стадии глаукоматозного процесса.

Таблица 10 – 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 $P < 0,05$, $P < 0,001$

Примечания: для СК в группе сравнения n=58

Как видно из таблицы 10, в основной группе больных с ПОУГ отмечалось существенное (в среднем более, чем на $\frac{1}{3}$) снижение концентрации ЦНТФ во ВПК и СЖ. Уровень ЦНТФ в СК, а также соотношение концентраций во ВПК и СЖ практически не изменялись.

5.2.1. Динамика изменений содержания цилиарного нейротрофического фактора в исследуемых биологических жидкостях по мере прогрессирования глаукомы

Представляет интерес динамика показателей ЦНТФ у больных с ПОУГ по мере прогрессирования заболевания. Помимо представленных в таблице данных по стадиям процесса, о связанных с прогрессированием ПОУГ изменениях содержания ЦНТФ во ВПК можно судить по графику его зависимости от периметрического индекса VFI, количественно характеризующего состояние поля зрения (рисунок 5).

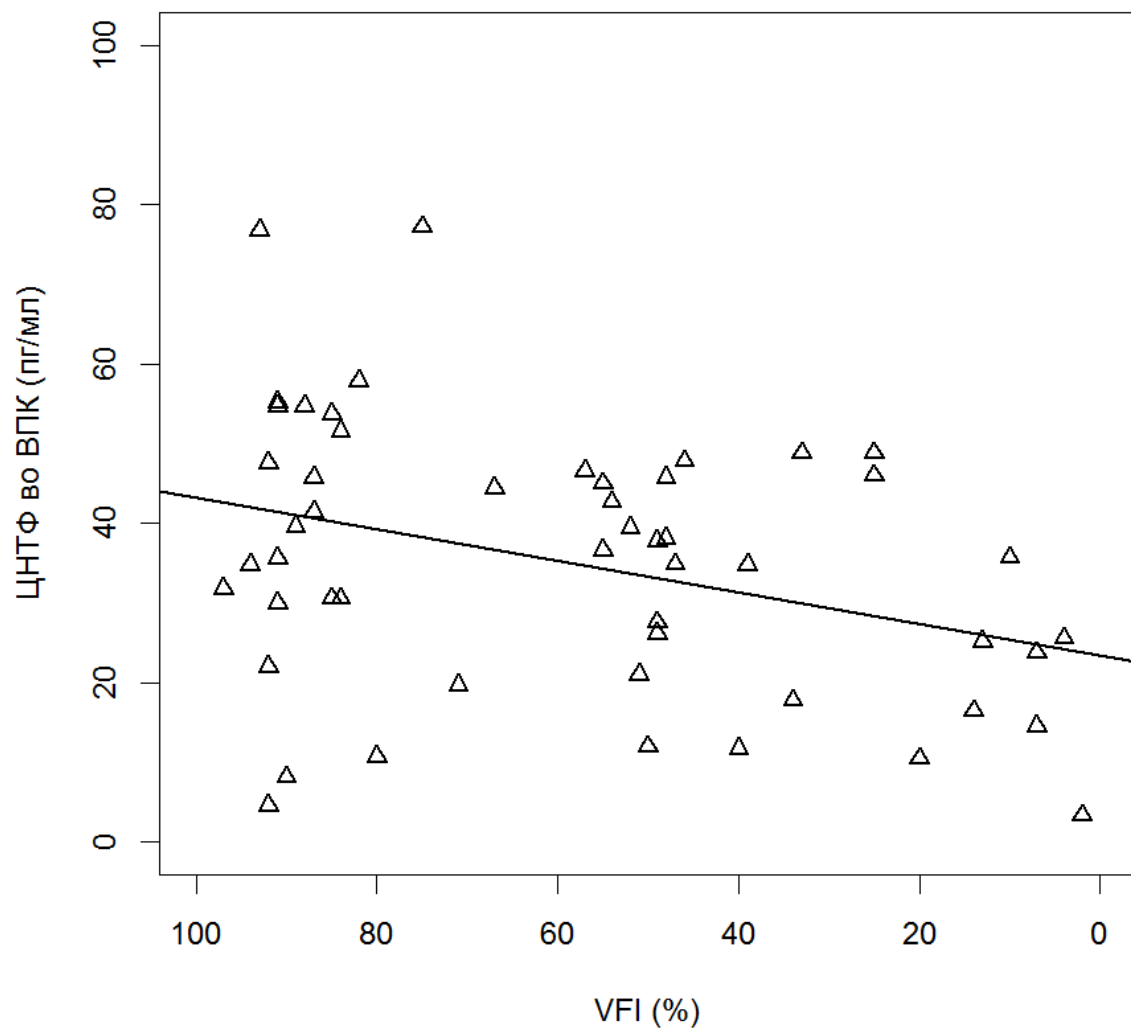


Рисунок 5 – Зависимость содержания ЦНТФ во ВПК больных основной группы от периметрического индекса VFI (его значения по оси x даны в обратном порядке).

Как видно из таблицы 10, по мере прогрессирования заболевания происходило последовательное снижение содержания ЦНТФ во ВПК, достигающее значимых отличий в тяжелой стадии ПОУГ. Корреляция с индексом VFI (рисунок 5), отражающим прогрессирование глаукомного процесса, была слабой, но статистически достоверной: коэффициент корреляции Пирсона $r=0,349$ ($P=0,011$).

Содержание ЦНТФ в СЖ было резко снижено в тяжелой стадии, а также демонстрировало достоверное снижение в продвинутой стадии ПОУГ.

Уровень ЦНТФ в СК существенно не зависел ни от показателя VFI, ни от стадии ПОУГ.

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).

5.3. Соотношения ЦНТФ в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови

Корреляционный анализ показал, что уровень ЦНТФ во ВПК достоверно коррелирует с его содержанием в СЖ: $r = 0,54$ ($P < 0,000$) в группе сравнения и $r = 0,72$ ($P < 0,000$) в основной группе. Сравнение коэффициентов регрессии не выявило существенных различий между этими двумя группами, что позволило объединить их для дальнейших расчетов. Корреляция уровней ЦНТФ во ВПК и СЖ в объединенной группе была сильной: $r = 0,66$ ($P < 0,000$). На рисунке 6 представлена описанная корреляция.

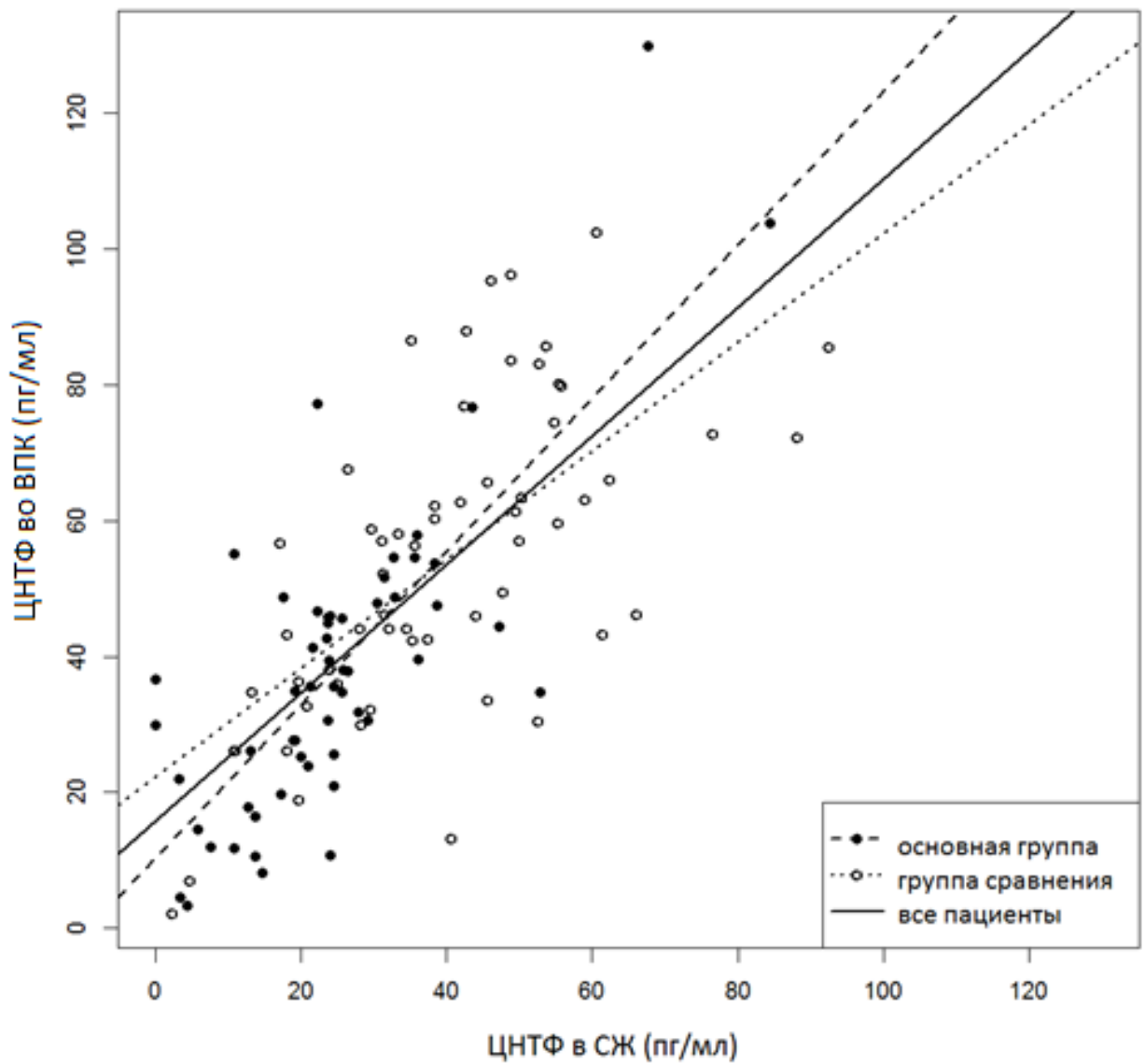


Рисунок 6 – Зависимость содержания ЦНТФ во ВПК от его уровня в СЖ в основной группе, группе сравнения и при их объединении.

Методом линейной регрессии была получена формула для ориентировочной оценки концентрации уровня ЦНТФ во ВПК (y) в зависимости от его содержания в СЖ (x):

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

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

С учетом предложенной формулы был рассчитан минимально допустимый уровень ЦНТФ в СЖ, составивший 17 пг/мл, значения ниже которого следует считать показанием к интравитреальному введению ЦНТФ при лечении заболеваний зрительно-нервного аппарата глаза¹.

Для уровня ЦНТФ в СК не было выявлено сколько-нибудь значимых корреляций с уровнями ЦНТФ во ВПК или в СЖ.

¹ Патент РФ № 2617066. Оpubл. 19.04.2017; Бюл. № 11 (Приоритет от 01.04.2016).

Таким образом, показано, что возрастная катаракта не оказывает существенного влияния на содержание ЦНТФ в изученных биологических жидкостях. У пациентов с ПОУГ выявлено существенное снижение уровня ЦНТФ во ВПК и СЖ, особенно выраженное у пациентов с «тяжелой» ПОУГ. Установлена сильная корреляция содержания ЦНТФ во ВПК и СЖ, что открывает новые возможности для непрямой оценки уровня ЦНТФ во ВПК больных с ПОУГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Глаукома на протяжении многих лет остается наиболее важной медико-социальной проблемой из-за широкого распространения и тяжести исходов заболевания [11, 24]. Несмотря на успехи в ранней диагностике, наличие большого выбора консервативных и хирургических методов лечения, она продолжает занимать лидирующее место в структуре инвалидности по зрению [11, 26].

Сохраняющийся высокий процент слепоты от этого заболевания и неудовлетворенность гипотензивным лечением глаукомы побуждают исследователей к поиску ранее неизвестных механизмов прогрессирования глаукоматозного процесса и разработке новых методов лечения. В настоящее время все большее влияние приобретает нейродегенеративная теория патогенеза ПОУГ, рассматривающая глаукому как заболевание, занимающее промежуточное положение между офтальмологической и неврологической патологиями, одной из основных патофизиологических характеристик которого является необратимое повреждение ганглиозных клеток сетчатки. 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 десятилетия нейротрофические факторы рассматриваются в качестве нейропротекторов при различных нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, рассеянный склероз [56, 133]. Нейротрофические факторы относятся к наиболее перспективным нейропротекторам, которые активно вмешиваются в генетические механизмы регенерации и апоптоза. Они регулируют как выраженность процесса программированной клеточной гибели, так и скорость его протекания.

В офтальмологии в последние десятилетия активно изучается роль различных нейротрофических факторов при многих инвалидизирующих заболеваниях глаза, в том числе при глаукоме. Так НФГМ наиболее часто изучается на экспериментальных моделях глаукомы [82, 89, 106, 148], а терапевтическое действие ЦНТФ исследуется уже в течение нескольких лет при дегенеративных заболеваниях сетчатки [49, 88, 149]. Информация о содержании нейротрофических факторов внутри глаза могла бы внести существенный вклад в изучение патогенеза ряда серьезных офтальмологических заболеваний, позволила бы осуществлять обоснованный отбор пациентов для лечения нейротрофическими факторами и контроль эффективности такого лечения. Однако у человека оценка содержания указанных факторов основывается только на исследованиях СЖ. Предпринимались попытки оценки НФГМ в СЖ и СК у пациентов с глаукомой [22, 38, 39, 72, 73]. Вместе с тем отсутствует информация о том, как содержание этих факторов в слезе характеризует их изменения внутри глаза. В свою очередь исследование данных факторов в глазу человека возможно только в ходе плановых хирургических вмешательств.

В связи с изложенным, **целью** настоящей работы явилось изучение содержания нейротрофического фактора головного мозга и цилиарного нейротрофического фактора во влаге передней камеры, слезной жидкости и сыворотке крови у больных с первичной открытоугольной глаукомой. Для реализации цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Осуществить выбор классификации нарушений полей зрения, обеспечивающей 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.

Для выполнения поставленных задач было обследовано 165 человек (165 глаз), в том числе 121 пациент с возрастной катарактой и ПОУГ, 29 здоровых испытуемых и 15 добровольцев (для отработки методики). Отбор пациентов осуществляли сплошным методом, исключали только людей с тяжелой сопутствующей глазной патологией (дегенеративные заболевания сетчатки, увеиты, атрофия зрительного нерва и др.), рефракционными нарушениями высокой степени и соматическими заболеваниями (сахарный диабет, бронхиальная астма, аутоиммунные, онкологические заболевания, инсульт и инфаркт в анамнезе и другая серьезная соматическая патология). Допускались отдельные сопутствующие заболевания, такие как гипертоническая болезнь 1-2 стадии, мерцательная аритмия, стенокардия напряжения I-II функционального класса и т.п. У всех обследуемых лиц сопутствующая патология находилась в стадии компенсации.

Все испытуемые были разделены на 3 группы, сформированные в зависимости от глазной патологии: основная группа – пациенты с катарактой и

сопутствующей ПОУГ (55 человек); группа сравнения – пациенты с возрастной катарактой (66 человек); контрольная группа – испытуемые без офтальмологической патологии (29 человек). У каждого человека в анализ включали только один глаз (у пациентов – оперированный, у здоровых лиц – избранный случайным методом). В основную группу и группу сравнения включали пациентов, которым выполнялась факоэмульсификация катаракты с имплантацией интраокулярной линзы одним хирургом на базе ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Контрольную группу составили испытуемые, проходившие диспансеризацию на базе ГБУЗ «НПЦ им. Соловьева ДЗМ».

Если в основной и контрольной группах исследования обоих нейротрофических факторов были выполнены во всех случаях, то в группе сравнения была разница между НФГМ и ЦНТФ в количестве исследуемых образцов. У двух пациентов этой группы исследование СЖ произвести не удалось по причине выраженного синдрома сухого глаза, и они были полностью исключены из исследования. У первых 7 пациентов НФГМ не исследовали в связи с задержкой в получении диагностикумов. У двух пациентов с крайне ограниченным количеством слезы исследовали только НФГМ. Указанных пациентов исключали из соответствующего раздела исследования (НФГМ или ЦНТФ). Таким образом, количество пациентов группы сравнения составило 64 человека, из них в разделе НФГМ - 57, в разделе ЦНТФ - 62 человека. У 4-х пациентов группы сравнения и одного человека в контрольной группе исследования СК не были выполнены в связи с гемолизом крови.

Наряду с традиционными методами обследование пациентов основной группы и группы сравнения включало проведение ОКТ и компьютерной периметрии.

Для решения одной из поставленных задач было проведено сравнение 4-х наиболее часто используемых в клинике классификаций стадий ПОУГ. Выбор

классификации для отдельно взятого пациента не играет большой роли, поскольку оценить прогрессирование глаукомы не представляет трудности (сравнение в динамике поля зрения). Это важно для характеристики работы клиники и в научных целях. Выбор был сделан в пользу классификации Mills et al. [112], преимуществом которой помимо всех достоинств статической периметрии центрального поля зрения, обеспечивающей четкое выделение ранних (начальной и развитой) стадий ПОУГ, является разделение далекозашедшей глаукомы на две стадии – собственно далекозашедшую и тяжелую. Из 55 пациентов у 9 человек была начальная глаукома, у 12 – развитая, у 18 – далекозашедшая и у 16 – тяжелая. Важным преимуществом этой и других классификаций, основанных на компьютерной статической периметрии центрального поля зрения, является тот факт, что они более информативны в начальных стадиях ПОУГ, в которых изменения центрального поля зрения опережают нарушения его периферических отделов. Выбор в пользу классификации Mills et al. объяснялся более равномерной оценкой стадийности глаукоматозного процесса в отличие от других вариантов классификаций центрального поля зрения.

Для достижения цели работы методику твердофазного иммуноферментного анализа, широко применяемую при исследовании СК, требовалось адаптировать для исследования в малых объемах биологических жидкостей (СЖ и ВПК). Учитывая, что собранное у пациентов количество СЖ и ВПК было существенно меньше, чем необходимо для тестирования указанным методом (200 мкл биологического материала на каждую лунку микропланшета), приходилось разбавлять биологический материал. Поэтому была выполнена отработка методики на слезной жидкости 15 здоровых испытуемых при различных разведениях: в 2, 4, 6, 8, 10 раз. 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 год) [121], для увеличения содержания свободной формы ЦНТФ в вышеуказанном биологическом материале и повышения его доступности для определения. Для повышения определяемого количества НФГМ в биологическом материале, согласно инструкции к набору, проводили предварительную подготовку образцов СЖ и ВПК, разводя их в 5 раз в фосфатном буферном растворе Dulbecco's PBS (DPBS), с последующим проведением кислотного гидролиза разведенных образцов.

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). 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). Указанные стадийные изменения подтверждались также обратной корреляцией содержания НФГМ во ВПК с периметрическим индексом VFI: коэффициент корреляции $r = -0,404$; $P = 0,002$).

НФГМ в клинике изучался у многих категорий пациентов, однако большинство исследований ограничивалось оценкой уровня нейротрофина в СК и преимущественно у пациентов с неврологической патологией [56, 133]. Только в трех работах НФГМ в СК определяли у пациентов с ПОУГ и глаукомой нормального давления [38, 72, 73, 119]. Также в 3 работах изучался уровень НФГМ в СЖ пациентов с глаукомой [22, 38, 72, 73], однако эти исследования имели весьма ограниченное значение, поскольку ни в коей мере не позволяли судить о содержании НФГМ внутри глаза. Только в одной работе, посвященной изучению белкового состава ВПК у больных, оперируемых по поводу катаракты, было установлено наличие НФГМ в половине изученных проб ВПК, однако количественной оценки уровня НФГМ не проводилось [58].

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. В других работах, изучавших НФГМ в СК, также было выявлено снижение содержания НФГМ именно на начальных стадиях глаукомы [72, 73, 119], но не в далеко зашедшей ее стадии [119], что хорошо совпадает с результатами настоящего исследования.

Достаточно сложно найти объяснение выявленным закономерностям. Необходимо учитывать экспериментально доказанное нейропротекторное действие НФГМ в отношении ганглиозных клеток сетчатки [89, 106]. Можно предположить, что определенные факторы, например, депрессия, стресс и т.п., способствующие снижению уровня НФГМ во всем организме [47], 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. Изложенные предположения несомненно требуют дальнейшей экспериментальной и клинической проверки. В то же время полученные результаты могут служить основанием для разработки новых методов лечения, направленных на компенсацию дефицита НФГМ при начальной ПОУГ.

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). 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 [69, 123]. 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».

Имеются различные данные об изменениях содержания ЦНТФ в глазах животных при моделировании глаукомы или прямом повреждении зрительного нерва. Так, уровень ЦНТФ существенно повышался в первые 4-8 недель после повреждения (раздавливания, рассечения) зрительного нерва [53, 141]. На модели глаукомы у мышей уровень ЦНТФ также заметно повышался в ранние сроки заболевания, но значительно снижался в поздних стадиях (на 30-й неделе) [148]. Полученные нами результаты соответствуют данным последнего исследования в той его части, где отмечено выраженное снижение уровня ЦНТФ в поздних стадиях заболевания. У больных с глаукомой нами не наблюдалось повышения уровня ЦНТФ, вероятно, в связи с относительно

длительным течением заболевания даже у пациентов с начальной стадией ПОУГ.

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. 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 по его содержанию в СЖ. 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.

Выявленные соотношения ВПК / СЖ имели разный характер: содержание ЦНТФ было выше во ВПК, а НФГМ – в СЖ. Подобного рода различия имеют место и в отношении других биологически активных веществ. Так, весьма близкие концентрации во ВПК и СЖ больных с меланомой хориоидеи демонстрируют провоспалительные цитокины - интерлейкины, а также матриксная металлопротеиназа-9 [33, 34]. Почти в 70 раз более высокий уровень в СЖ по сравнению с ВПК имеет фактор ускорения распада компонента (complement decay-accelerating factor; DAF) [95], а некоторые биологически активные вещества, определяемые в слезе, например, эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor; EGF), во ВПК выявить не удается [120]. Могут быть высказаны только предположения о возможных

причинах таких различий. В тех случаях, когда вещество поступает в СЖ из ВПК, важную роль могут играть такие его свойства, как молекулярный вес и липофильность [3, 150].

В нашем исследовании не было обнаружено значимой корреляции между концентрацией ЦНТФ в СК с его содержанием в двух других биологических жидкостях. Это объясняется тем, что этот фактор является достаточно локально специфичным цитокином и поэтому в СК определяется только в следовых количествах. Вероятно, имеет также значение, что при таких низких концентрациях метод ИФА работает на пределе чувствительности. В то же время обнаруженная умеренная корреляция уровня сывороточного НФГМ с содержанием НФГМ в СЖ не имеет очевидного объяснения. Возможно, благодаря высокой концентрации НФГМ в СК, он может попадать в слезу не только из ВПК, но и из общего кровотока. Нельзя также исключить, что НФГМ может в некоторых количествах образовываться непосредственно в тканях слезной железы или клетках конъюнктивы.

Данная работа имеет ряд ограничений. Содержание нейротрофических факторов изучали во ВПК пациентов, хотя, вероятно, их содержание в стекловидном теле играет намного более значимую роль в выживаемости ГКС. Очевидно, что пробы стекловидного тела не могли быть получены во время неосложненной хирургии катаракты. Существуют разноречивые данные о соотношениях белков во ВПК и стекловидном теле. В ряде исследований было показано, что уровни цитокинов во ВПК хорошо коррелируют с их содержанием в стекловидном теле [91, 117]. В отношении НФГМ и ЦНТФ подобные исследования не проводились. Тем не менее, выраженная корреляция содержания обоих нейротрофических факторов во ВПК и СЖ позволяет предположить аналогичную корреляцию и для их содержания во ВПК и стекловидном теле, что, однако, требует дополнительного изучения.

Забор СЖ и ВПК осуществлялся в разные дни, поэтому их корреляция, установленная в настоящем исследовании, могла быть занижена. На результаты

измерений содержания ЦНТФ в СЖ мог также оказывать влияние забор стимулированной СЖ. Тем не менее, это был единственный способ получить количество СЖ, минимально необходимое для исследования нейротрофических факторов, особенно у пожилых пациентов.

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 (патент 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 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

NMDA N-Метил-D-аспартат

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акопян В.С., Семенова Н.С., Филоненко И.В., Цысарь М.А. Оценка комплекса ганглиозных клеток сетчатки при первичной открытоугольной глаукоме // Офтальмология. – 2011. – № 8. – С. 20-26.
2. Алексеев В.Н., Газизова И.Р., Никитин Д.Н., Тубаджи Ессам, Ринджибал Алмайсамб, Фарзад Захеда. Первичная открытоугольная глаукома и дегенеративные изменения в центральных отделах зрительного анализатора // Офтальмологические ведомости. – 2012. – № 3. – С. 23-28.
3. Аляутдин Р. Н., Иежица И. Н., Агарвал Р. Транспорт лекарственных средств через роговицу глаза: перспективы применения липосомальных лекарственных форм // Вестник офтальмологии. – 2014. – № 4. – С. 117-122.
4. Белямова А.Ф., Калинина Н.М., Чененова Л.В. Содержание цитокинов и иммуноглобулинов в слезной жидкости и сыворотке крови пациентов с синдромом «Сухого глаза» и хроническим аллергическим конъюнктивитом // Офтальмологические ведомости. – 2010. – №3.– С. 51-57.
5. Борзенко С.А., Хубецова М.Х., Сабурина И.Н., Гаврилова Н.А., Тонаева Х.Д., Островский Д.С., Ланевская Н.И., Кошелева Н.В., Зурина И.М. Клеточная нейропротекция как современный подход к лечению оптических нейропатий // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017. – № 19. – С.63-73.
6. Верховоломова А. В., Маркова Е. В., Биляк А. С. Информативность исследования слезной жидкости у пациентов с нарушением кровообращения в сетчатке и зрительном нерве // Медицинский вестник Башкортостана. – 2015. – № 2. – С.56-58.
7. Волков В.В. Предложения к построению классификации открытоугольной глаукомы // Окулист. – 2001. – № 1. – С.22–23.

8. Вялова Н. М., Левчук Л.А. Роль BDNF в формировании депрессивных расстройств // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 10. – С. 771-775.
9. Гусев Е. И., Боголепова А.Н. Роль процессов нейропластичности в развитии депрессивных расстройств // *Трудный пациент*. – 2010. - №10. – С. 115 – 119.
10. Дуйсебеков М.М., Понаморев Ю.А. Содержание провоспалительных цитокинов и цилиарного нейротрофического фактора в плазме при ушибе головного мозга // *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. – 2008. – № 9. – С.68.
11. Егоров Е.А., Астахов Ю.С., Щуко А.Г. (ред.). Национальное руководство по глаукоме (путеводитель) для поликлинических врачей. –Москва, 2008. – 136 с.
12. Егоров Е.А., Брежнев А.Ю., Егоров А.Е. Нейропротекция при глаукоме: современные возможности и перспективы // *РМЖ «Клиническая офтальмология»*. – 2014. – № 2. – С. 108-112.
13. Егорова Э.В., Борзенко С.А., Сускова В.С., Еременко И.Л. Особенности иммунного реагирования у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой с использованием дренажных имплантатов // *Офтальмохирургия*. – 2015. – № 3. – С. 13-18.
14. Еричев В.П., Туманов В.П., Панюшкина Л.А. Глаукома и нейродегенеративные заболевания // *Национальный журнал глаукома*. – 2012. – № 11. С. 62-68.
15. Гомазков О.А. Апоптоз нейрональных структур и роль нейротрофических ростовых факторов. Биохимические механизмы эффективности пептидных препаратов мозга // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Прил. Инсульт*. – 2002. – № 7. – С.17-22.
16. Гомазков О. А. Нейрогенез: монография. – М.: Икар, 2013. – 136 с.

17. Гомазков О.А. Старение мозга и нейротрофическая терапия. – М.: ИКАР, 2011. – 92 с.
18. Громова О. А. Нейротрофическая система мозга: нейропептиды, макро- и микроэлементы, нейротрофические препараты // Международный неврологический журнал. – 2007. – № 2. – С. 94-106.
19. Зиньковский А.К., Мусина Л.О, Зиньковский К.А. Особенности изменения уровня цилиарного нейротрофического фактора у женщин с различной степенью прогрессивности эпилепсии до и после лечения цераксоном // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 6. URL: <http://www.science-education.ru/100-5253>
20. Зиньковский К.А., Мусина Л.О., Слюсарь Н.Н., Зиньковский А.К., Зубарева Г.М. Особенности изменения цилиарного нейротрофического фактора у больных эпилепсией до и после терапевтической коррекции //Аллергология и иммунология – 2011. - Т.12. – №1. – С.12.
21. Каменских И.Д., Сидельникова В.С. Регуляция нейродегенеративных процессов при первичной открытоугольной глаукоме // Наноматериалы и нанотехнологии: проблемы и перспективы. – 2013. – № 2. – С. 42.
22. Курышева Н.И., Гаврилова Н.А., Аникина А.Ю. Исследование нейротрофического фактора BDNF у больных с первичной глаукомой // Глаукома. – 2006. – № 4. – С. 9-15.
23. Либман Е.С. Современные позиции клинико-социальной офтальмологии // Вестник офтальмологии. – 2004. – № 1. – С. 10-12.
24. Либман Е. С. Эпидемиологическая характеристика глаукомы / Е. С. Либман // Глаукома. – 2009. – № 1. – С. 2-3.
25. Мусина О.В. Клинико-патобиохимические и иммунологические нарушения у больных эпилепсией женского пола и их терапевтическая коррекция: Автореф. дисс... канд. мед. наук – М., 2012. – 16 с.
26. Нероев В.В., Киселева О.А., Бессмертный А.М. Основные результаты мультицентрового исследования эпидемических особенностей первичной

- открытоугольной глаукомы в Российской Федерации // Росс.офтальмол.журнал. – 2013. – № 3. – С.4-7.
27. Нестеров А.П. Первичная открытоугольная глаукома: патогенез и принципы лечения // РМЖ. Клиническа офтальмология. – 2000. – Т. 1. – № 1. – С. 4.
 28. Нестеров А.П., Бунин А.Я. Классификация первичной глаукомы // Методические указания. М. – 1977. – С. 11.
 29. Поляк Б.Л. Классификация глаукомы // Руководство по глазным болезням. М. – 1960. – Т.2. - Кн. 2. – С. 565-576.
 30. Рафиева Л.М., Сафина Д.Р., Демидюк И.В., Косторов С.В. Получение рекомбинантных нейротрофинов человека для биомедицинских исследований // Вестник МИТХТ. – 2011. – Т. 6. – № 2. – С. 51-57.
 31. Ходжаев Н.С., Черных В.В., Кунтышева К.Е. Клинико-патогенетическое и прогностическое значение факторов прогрессирования диабетической ретинопатии на фоне гипертонической болезни после факоэмульсификации // Офтальмохирургия. – 2015. – № 3. – С. 37-42.
 32. Цимбалюк В. И., Васильева И. Г., Чопик Н. Г., Галанта Е. С., Цюбко О. И., Олексенко Н. П., Вашуленко Т. Н. Экспрессия нейротрофических факторов в эмбриональном мозге человека 5–9 недель гестации // УНЖ. – 2003. – № 3. – С.13-16.
 33. Чернявская М.А., Ефремов А.В., Черных В.В. Взаимосвязь цитокинов в слезной и внутриглазной жидкости при меланоме хориоидеи // Вестник ТГУ. – 2015. – Т. 20. – № 3. – С. 710-712.
 34. Чернявская М.А., Ефремов А.В., Черных В.В., Пустоветова М.Г. Содержание матриксной металлопротеиназы-9 в слезной и внутриглазной жидкости при меланоме хориоидеи // Сибирский научный медицинский журнал. – 2015. – Т. 35. – № 3. – С. 16-20.
 35. Шибитц В.-Р., Стайгледер Т., Купер-Кун К.М., Шваб С., Соммер К., Шнайдер А., Кун Х.Г. Внутривенные инъекции мозгового

нейротрофического фактора стимулируют нейрогенез и улучшают сенсомоторное восстановление после инсульта // Журнал "Stroke (Инсульт)". – 2008. – № 1. – С.61-67.

36. Шмиголь М.В., Левчук Л.А., Лебедева Е.В., Симуткин Г.Г., Сергиенко Т.Н., Иванова С.А. Исследование полиморфизма гена мозгового нейротрофического фактора у лиц с депрессивными и коморбидными сердечно-сосудистыми заболеваниями // *Фундаментальные исследования*. – 2012. – № 5-2. – С. 388-392.
37. Шмидт Т.Е., Яхно Н.Н. Рассеянный склероз: руководство для врачей. 2-е изд. - М.: МЕДпресс-информ, 2010. – 272 с.
38. Шпак А.А., Гаврилова Н.А., Ланевская Н.И, Дегтярева М.В. Нейротрофический фактор головного мозга у больных первичной глаукомой // *Офтальмохирургия*. – 2006. – № 4. – С. 14-16.
39. Шпак А.А., Гаврилова Н.А., Соколовская Т.В., Кобахидзе Н.Г. Нейротрофический фактор головного мозга при глаукоме // *Глаукома*. – 2009. – № 4. – С.54-56.
40. Шпак А.А., Соколовская Т.В., Кобахидзе Н.Г. и др. Цилиарный нейротрофический фактор и его значение в офтальмологии // *Офтальмохирургия*. – 2012. – №4. – С. 82-85.
41. Alessio P., Giuliana M., Ruggiero F., Gabriele B., Marina F., Luca G. M., Enrico T. A method for reproducible measurements of serum BDNF: comparison of the performance of six commercial assays // *Sci Rep*. – 2015. – Vol. 5. – Article number 17989.
42. Almeida R.D., Manadas B.J., Melo C.V., Gomes J.R., Mendes C.S., Grãos M.M., Carvalho R.F., Carvalho A.P., Duarte C.B. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3 - kinase pathways // *Cell death and differentiation*. – 2005. – Vol. 10. – P. 1329–1343.

43. Alvarez-Buylla A., Garcia-Verdugo J.M. Neurogenesis in Adult Subventricular Zone // *The Journal of Neuroscience*. – 2002. – Vol. 22(3). – P. 629-634.
44. Bayer A.U., Ferrari F., Erb C. High occurrence rate of glaucoma among patients with Alzheimer`s disease // *Eur. Neurol.* – 2002. – Vol. 47. – P. 165-168.
45. Barde Y.A., Edgar D., Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain // *EMBO J.* – 1982. – Vol.1. – N 5. – P. 549-553.
46. Beltran W., Zhang Q., Kijas J.W., Gu D., Rohrer H., Jordan J.A., Aguirre G.D. Cloning, Mapping, and Retinal Expression of the Canine Ciliary Neurotrophic Factor Receptor α (CNTFR α) // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*– 2003.– Vol. 44.– P. 3642-3649.
47. Benarroch E.E. Brain-derived neurotrophic factor: Regulation, effects, and potential clinical relevance// *Neurology*. – 2015. – Vol.84. – N 16. – P.1693-1704.
48. Binder D.K., Scharfman H.E. Brain-derived neurotrophic factor // *Growth Factors*. – 2004. – Vol. 9. – P. 123-131.
49. Birch D.G., Weleber R.G., Duncan J.L., Jaffe G.J., Tao W. Randomized trial of ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for retinitis pigmentosa // *Am. J. Ophthalmol.* – 2013. – Vol. 156. – N 2. – P. 283-292.
50. Bizrah M., Guo L., Cordeiro M.F. Glaucoma and Alzheimer's disease in the elderly // *Aging Health*. – 2011. – N 5. – P. 719–733.
51. Boudewijn A.A., Indira T., Barbara F., Jacqueline G., Martin H., Buitelaar K., Richard C. Serum brain-derived neurotrophic factor: Determinants and relationship with depressive symptoms in a community population of middle-aged and elderly people // *World J Biol Psychiatry*. – 2012. – Vol. 13. – N 1. P. 39-47.
52. Brusini P. Clinical use of a new method for visual field damage classification in glaucoma. *Eur J Ophthalmol*. 1996. – Vol. 6. P. 402–407.

53. Cai J., Cheng J., Huang X., Li Y., Ma X., Li Y., Wei R. Pathologic changes in chronic intraorbital optic nerve damage in rabbits // *Brain Res.*– 2009.– Vol. 1267. – P. 103-115.
54. Campbell M.J., Swinscow T.D.V. *Statistics at square one*. 11th ed. – Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2009. – 123 p.
55. Chen D.W., Foldvari M. In vitro bioassay model for screening non-viral neurotrophic factor gene delivery systems for glaucoma treatment // *Drug Deliv Transl Res.* – 2016. – Vol. 6. – N 6. – P. 676-685.
56. Chen L., Wang Y., Xiao H. et al. The 712A/G polymorphism of Brain-derived neurotrophic factor is associated with Parkinson's disease but not Major Depressive Disorder in a Chinese Han population // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2011. – Vol. 408. – N 2. – P. 318-321.
57. Chen T.C., Wilensky J.T., Viana M.A. Long-term follow-up of initially successful trabeculectomy // *Ophtal.* – 1997. – Vol. 104. – N 7. – P. 1120-1125.
58. Chowdhury U.R., Madden B.J., Charlesworth M.C. et al. Proteome Analysis of Human Aqueous Humor // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*– 2010.– Vol. 51. – P. 4921-4931.
59. de Moraes C.G., Furlanetto R.L., Ritch R., Liebmann J.M. A new index to monitor central visual field progression in glaucoma // *Ophthalmology.* – 2014. – Vol. 121. – N 8. – P. 1531-1538.
60. Ding J., He Z., Ruan J., Ma Z., Liu Y., Gong C., Iqbal K., Sun S., Chen H. Role of Ciliary Neurotrophic Factor in the Proliferation and Differentiation of Neural Stem Cells // *J Alzheimers Dis.* – 2013. – Vol. 37. – N 3. – P. 587-592.
61. Domenici L., Origlia N., Falsini B., Cerri E., Barloscio D., Fabiani C., Sansò M., Giovannini L. Rescue of retinal function by BDNF in a mouse model of glaucoma // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 23. – N 9. – e115579.
62. Drevets W.C. Neuroplasticity in mood disorders. *Dialogues in clinical neuroscience* // *Neuroplasticity.* – 2004. – Vol. 6. – P. 199–216.

63. Dreyer E.B., Zurakowski D., Schumer R.A., Podos S.M., Lipton S.A. Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma // *Arch. Ophthalmol.* – 1996. – Vol. 114. – P. 299–305.
64. Duman R.S. Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity // *Eur Psychiatry.* – 2002. – Vol. 3. – P. 306-310.
65. Enciu A.M., Nicolescu M.I., Manole C.G., Mureşanu D.F., Popescu L.M., Popescu B.O. Neuroregeneration in neurodegenerative disorders // *BMC Neurol.* – 2011. – N 1. – P. 1-7.
66. European Glaucoma Society Terminology and Guidelines for Glaucoma, 4th Edition - Chapter 2: Classification and terminology. Supported by the EGS Foundation *British Journal of Ophthalmology.* – 2017. – P. 73-127.
67. Fang J., Jiang F., Li J., Zhu Y. Rationale for the use of multifunctional drugs as neuroprotective agents for glaucoma // *Neural Regenerat. Res.* – 2012. – N 4. – P. 313–318.
68. Fang Y., Mo X., Guo W., Zhang M., Zhang P., Wang Y., Rong X., Tian J., Sun X. A new type of Schwann cell graft transplantation to promote optic nerve regeneration in adult rats // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2010.– Vol. 4.– P. 581-589.
69. Flachsbarth K., Kruszewski K., Jung G., Jankowiak W., Riecken K., Wagenfeld L., Richard G., Fehse B., Bartsch U. Neural stem cell-based intraocular administration of ciliary neurotrophic factor attenuates the loss of axotomized ganglion cells in adult mice // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2014. – Vol. 55. – № 11. – P. 7029-7039.
70. Fujimura H., Altar C.A., Chen R., Nakamura T., Nakahashi T., Kambayashi J., Sun B., Tandon N.N. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation // *Thromb Haemost.* – 2002. – Vol. 87. – P. 728-734.

71. Garrido R., Springer J.E., Hennig B., Toborek M. Nicotine up-regulates expression of neurotrophic factors and attenuates apoptosis of spinal cord neurons // *J.Neurochem.* – 2003. – N 2. – P. 1201-1213.
72. Ghaffariyeh A., Honarpisheh N., Heidari M.H., Puyan S., Abasov F. Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker in primary open-angle glaucoma // *Optom. Vis. Sci.* – 2011. – Vol.88. – N 1. – P.80-85.
73. Ghaffariyeh A., Honarpisheh N., Shakiba Y., Puyan S., Chamacham T., Zahedi F., Zarrineghbal M. Brain-derived neurotrophic factor in patients with normal-tension glaucoma // *Optometry.* – 2009. – Vol.80. – N 11. – P. 635-638.
74. Gupta N., Ang L.C., Noel de Tilly L., Yucel Y.H. Human glaucoma and neuronal degeneration in the intracranial optic nerve, lateral geniculate nucleus and visual cortex of the brain // *Br J Ophthalmol.* – 2006. Vol. 90. – N 6. – P. 674-678.
75. Gupta N., Yucel Y.H. Glaucoma as a neurodegenerative disease // *Current Opinion in Ophthalmol.* – 2007. – Vol. 18. – P. 110-114.
76. Hare W.A., Ton H., Ruiz G., Feldmann B., Wijono M., WoldeMussie E. Characterization of retinal injury using ERG measures obtained with both conventional and multifocal methods in chronic ocular hypertensive primates // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2001. – Vol. 42. – N 1. – P. 127-136.
77. Heinrich P.C., Behrmann I., Haan S., Hermanns H.M., Müller-Newen G., Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation // *Biochem. J.* – 2003. – Vol. 374. – P. 1–20.
78. Herzog K.H., von Bartheld C.S. Contributions of the optic tectum and the retina as sources of brain-derived neurotrophic factor for retinal ganglion cells in the chick embryo // *J Neurosci.* – 1998. – Vol. 18. – N 8. – P.2891-2906.
79. Hodapp E., Parrish R.K., Anderson D.R. Clinical decisions in glaucoma. St Louis: The CV Mosby Co. – 1993. – P. 52–61.
80. Honjo M., Tanihara H., Kido N., Inatani M., Okazaki K., Honda Y. Expression of ciliary neurotrophic factor activated by retinal Muller cells in eyes with

- NMDA-and kainic acid-induced neuronal death // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2000. – Vol. 41. – P. 552-560.
81. Hu Y., Leaver S.G., Plant G.W., Hendriks W.T., Niclou S.P., Verhaagen J., Harvey A.R., Cui Q. Lentiviral-mediated transfer of CNTF to schwann cells within reconstructed peripheral nerve grafts enhances adult retinal ganglion cell survival and axonal regeneration // *Mol. Ther.* – 2005. – Vol. 11. – P. 906-915.
 82. Iwabe S., Moreno-Mendoza N.A., Trigo-Tavera F. et al. Retrograde axonal transport obstruction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its TrkB receptor in the retina and optic nerve of American Cocker Spaniel dogs with spontaneous glaucoma // *Vet. Ophthalmol.* – 2007. – Vol.10. – N 1. – P.12-19.
 83. Izzotti A., Sacca S.C., Longobardi M., Cartiglia C. Mitochondrial damage in the trabecular meshwork of patients with glaucoma // *Arch. Ophthalmol.* – 2010. – Vol. 128. – N 6. – P. 724-730.
 84. Jäger K., Kielstein H., Dunse M., Nass N., Paulsen F., Sel S. Enzymes of urea synthesis are expressed at the ocular surface, and decreased urea in the tear fluid is associated with dry-eye syndrome // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 2013. Vol. 251. – N 8. – P. 1995-2002.
 85. Ji J.Z., Elyaman W., Yip H.K., Lee V.W., Yick L.W., Hugon J., So K.F. CNTF promotes survival of retinal ganglion cells after induction of ocular hypertension in rats: the possible involvement of STAT3 pathway // *Eur J Neurosci.* – 2004. – Vol. 19. – N 2. – P. 265-272.
 86. Jonhagen M. E. Nerve growth factor treatment in dementia // *Alzheimer Dis. Assoc Disord.* – 2000. – N 14. – P. 31-38.
 87. Kaufman J., Yang B.Z., Douglas-Palumberi H., Grasso D., Lipschitz D., Houshyar S., Krystal J.H., Gelernter J. Brain-derived neurotrophic factor-5-HTTLPR gene interactions and environmental modifiers of depression in children // *Biol. Psychiatry.* – 2006. – Vol. 59. – P. 673–680.
 88. Kauper K., McGovern C., Sherman S., Heatherton P., Rapoza R., Stabila P., Dean B., Lee A., Borges S., Bouchard B., Tao W. Two-year intraocular delivery

- of ciliary neurotrophic factor by encapsulated cell technology implants in patients with chronic retinal degenerative diseases // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2012. – Vol. 53. – N 12. – P. 7484-7491.
89. Ko M.L., Hu D.N., Ritch R., Sharma S.C., Chen C.F. Patterns of retinal ganglion cell survival after brain-derived neurotrophic factor administration in hypertensive eyes of rats // *Neurosci Lett.* – 2001. – Vol.305. – N 2. – P.139-142.
90. Koda M., Murakami M., Ino H., Yoshinaga K., Ikeda O., Hashimoto M., Yamazaki M., Nakayama C., Moriya H. Brain-derived neurotrophic factor supresses delayed apoptosis of oligodendrocytes after spinal cord injury in rats // *J. Neurotrauma.* – 2002. – N 6. – P. 777-785.
91. Kuiper J., Ten Dam-van Loon N., Domanian A., Schellekens P., Nierkens S., Radstake T., de Boer J. Correlation between measurement of IL-10 and IL-6 in paired aqueous humour and vitreous fluid in primary vitreoretinal lymphoma // *Acta Ophthalmol.* – 2015. – Vol.93. – N 8.- P. 680-681.
92. Lam A., Fuller F., Miller J., Kloss J., Manthorpe M., Varon S., Cordell B. Sequence and structural organization of the human gene encoding ciliary neurotrophic factor // *Gene.* – 1991. – Vol. 102. P. 271-276.
93. Lambert W.S., Clark A.F., Wordinger R.J. Effect of exogenous neurotrophins on Trk receptor phosphorylation, cell proliferation, and neurotrophin secretion by cells isolated from the human lamina cribrosa // *Mol Vis.* – 2004. – Vol 19. – N 10. – P.289-296.
94. Laske C., Stransky E., Leyhe T., Eschweiler G.W., Maetzler W., Wittorf A., Soekadar S., Richartz E., Koehler N., Bartels M., Buchkremer G., Schott K. BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls // *J Psychiatr Res.* – 2007. – N 41. – P. 387-394.
95. Lass J.H., Walter E.I., Burris T.E., Grossniklaus H.E., Roat M.I., Skelnik D.L., Needham L., Singer M., Medof M.E. Expression of two molecular forms of the

- complement decay-accelerating factor in the eye and lacrimal gland // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1990. – Vol. 31. – N 6. – P. 1136-1148.
96. Leaver S.G., Cui Q., Plant G.W., Arulpragasam A., Hisheh S., Verhaagen J., Harvey A.R. AAV-mediated expression of CNTF promotes long-term survival and regeneration of adult rat retinal ganglion cells // *Gene Ther.*– 2006.– Vol. 13.– P. 1328-1341.
97. Leibrock J., Lottspeich F., Hohn A., Hofer M., Hengerer B., Masiakowski P., Thoenen H., Barde Y.A. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor // *Nature.* – 1989. Vol. 341. – P. 149-152.
98. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later // *Science.* – 1987. – Vol. 237. – P. 1154-1162.
99. Li H.Y., Zhao J.L., Zhang H. Transfection of brain-derived neurotrophic factor gene by recombinant adeno-associated virus vector in retinal ganglion cells in vitro // *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* – 2008. – Vol. 44. – N 4. – P.354-360.
100. Li N., Li X.R., Yuan J.Q. Effects of bone-marrow mesenchymal stem cells transplanted into vitreous cavity of rat injured by ischemia/reperfusion // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*– 2009.– Vol. 247.– P. 503-514.
101. Li Y., Tao W., Luo L. et al. CNTF Induces Regeneration of Cone Outer Segments in a Rat Model of Retinal Degeneration // *PLoS One.*– 2010.– Vol. 5.– P. e9495.
102. Liu X., Clark A.F., Wordinger R.J. Expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and its tripartite receptor complex by cells of the human optic nerve head // *Mol. Vis.*– 2007.– Vol. 13.– P. 758-763.
103. Lobner D., Golner S., Hjelmhaug J. Neurotrophic factor effect on oxidative stress-induced neuronal death // *Neurochem. Res.* – 2003. – Vol. 28. – N 5. – P. 749-756.
104. MacLaren R.E., Buch P.K., Smith A.J., Balaggan K.S., MacNeil A., Taylor J.S., Osborne N.N., Ali R.R. CNTF gene transfer protects ganglion cells in rat retinae

- undergoing focal injury and branch vessel occlusion // *Exp. Eye Res.* – 2006. – Vol. 83. – P. 1118-1127.
105. Martin K.R., Quigley H.A. Gene therapy for optic nerve disease // *Eye (Lond)*. – 2004. – Vol.18. – N 11. – P.1049-1055.
106. Martin K.R., Quigley H.A., Zack D.J., Levkovitch-Verbin H., Kielczewski J., Valenta D., Baumrind L., Pease M.E., Klein R.L., Hauswirth W.W. Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2003. – Vol.44. – N 10. – P.4357-4365.
107. Martinowich K., Manji H., Lu B. New insights into BDNF function in depression and anxiety // *Nat. Neurosci.* – 2007. – Vol. 10. – P. 1089-1093.
108. Massaro A.R., Soranzo C., Carnevale A. Cerebrospinal-fluid ciliary neurotrophic factor in neurological patients // *Eur Neurol*. – 1997. – Vol. 37. – N 4. – P. 243-246.
109. McKenzie M., Liolitsa D., Hanna M. Mitochondrial disease: mutations and mechanisms // *Neurochemical Research*. – 2004. – Vol. 29. – P. 589-600.
110. McKinnon S.J. Glaucoma: ocular Alzheimer's disease? // *Front Biosci.* – 2003. – Vol. 8. – P. 1140-1156.
111. McKinnon S.J., Lehman D.M., Kerrigan-Baumrind L.A., Merges C.A., Pease M.E., Kerrigan D.F., Ransom N.L., Tahzib N.G., Reitsamer H.A., Levkovitch-Verbin H., Quigley H.A., Zack D.J. Caspase activation and amyloid precursor protein cleavage in rat ocular hypertension // *Invest. Ophthalmol. Visual. Sci.* – 2002. – N 43. – P. 1077-1087.
112. Mills R.P., Budenz D.L., Lee P.P., Noecker R.J., Walt J.G., Siegartel L.R., Evans S.J., Doyle J.J. Categorizing the stage of glaucoma from pre-diagnosis to end-stage disease // *Am. J. Ophthalmol.* – 2006. – Vol.141. – N 1. – P. 24-30.
113. Miotke J.A., MacLennan A.J., Meyer R.L. Immunohistochemical localization of CNTFRalpha in adult mouse retina and optic nerve following intraorbital nerve

- crush: evidence for the axonal loss of a trophic factor receptor after injury // *J. Comp. Neurol.*– 2007.– Vol. 500.– P. 384-400.
114. Muller A., Hauk T.G., Fischer D. Astrocyte-derived CNTF switches mature RGCs to a regenerative state following inflammatory stimulation // *Brain.*– 2007.– Vol. 130.– P. 3308-3320.
115. Muresanu D. F. Neuroprotection and neuroplasticity – a holistic approach and perspective // *Journal of the Neurological Sciences.* – 2007. – N 257. – P. 38-43.
116. Nakazawa T., Tamai M., Mori N. Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death through mAPK and PI3K signaling pathways // *Invest. Ophthalmol. Vis sci.* – 2002. – Vol. 10. – P. 3319-3326.
117. Noma H., Funatsu H., Mimura T., Harino S., Hori S. Aqueous humor levels of vasoactive molecules correlate with vitreous levels and macular edema in central retinal vein occlusion // *Eur. J. Ophthalmol.* – 2010. – Vol.20. – N 2. P.402-409.
118. Numakawa T., Suzuki S., Kumamaru E., Adachi N., Richards M., Kunugi H. BDNF function and intracellular signaling in neurons // *Histol Histopathol.* – 2010. – Vol. 25. – P. 237-258.
119. Oddone F., Roberti G., Micera A., Busanello A., Bonini S., Quaranta L., Agnifili L., Manni G. Exploring serum levels of brain derived neurotrophic factor and nerve growth factor across glaucoma stages // *PLoS One.* – 2017. – Vol.12. – e0168565.
120. Ohashi Y., Motokura M., Kinoshita Y., Mano T., Watanabe H., Kinoshita S., Manabe R., Oshiden K., Yanaihara C. Presence of epidermal growth factor in human tears // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1989. – Vol. 30. – N 8. – P. 1879-1882.
121. Okragly A.J., Haak-Frendscho M. An acid-treatment method for the enhanced detection of GDNF in biological samples // *Exp Neurol.* – 1997. – Vol. 145. – P. 592-596.

122. Pease M.E., McKinnon S.J., Quigley H.A., Kerrigan-Baumrind L.A., Zack D.J. Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2000. – Vol. 41. – N 3. – P.764-774.
123. Pease M.E., Zack D.J., Berlinicke C., Bloom K., Cone F., Wang Y., Klein R.L., Hauswirth W.W., Quigley H.A. Effect of CNTF on Retinal Ganglion Cell Survival in Experimental Glaucoma // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*– 2009.– Vol. 50.– P. 2194-2200.
124. Quigley H.A., McKinnon S.J., Zack D.J., Pease M.E., Kerrigan-Baumrind L.A., Kerrigan D.F., Mitchell R.S. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2000. – Vol. 41. – N 11. – P. 3460-3466.
125. Robinson R.C., Radziejewski C., Spraggon G., Greenwald J., Kostura M.R., Burtnick L.D., Stuart D.I., Choe S., Jones E.Y. The structures of the neurotrophin-4 homodimer and the brain-derived neurotrophic factor // *Protein Sci.* – 1999. – N 8. – P. 2589-2597.
126. Rockenstein E., Ubhi K., Doppler E., Novak P., Moessler H., Li B., Blanchard J., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Mante M., Adame A., Crews L., Masliah E. Regional comparison of the neurogenic effects of CNTF-derived peptides and cerebrolysin in A β PP transgenic mice // *J Alzheimers Dis.* – 2011. – Vol. 27. – N 4. – P. 743-752.
127. Schwartz M., Yoles E. Neuroprotection: a new treatment modality for glaucoma? // *Curr Opin Ophthalmol.* – 2000. – Vol.11. – N 2. – P. 107-111.
128. Sieving P.A., Caruso R.C., Tao W., Coleman H.R., Thompson D.J., Fullmer K.R., Bush R.A. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – Vol. 103. – N 10. – P.3896-3901.

129. Skaper S.D., Selak I., Manthorpe M., Varon S. Chemically defined requirements for the survival of cultured 8-day chick embryo ciliary ganglion neurons // *Brain Res.* – 1984. – Vol. 302. – P. 281–290.
130. Sleeman M.W., Anderson K.D., Lambert P.D., Yancopoulos G.D., Wiegand S.J. The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha // *Pharm Acta Helv.* – 2000. - Vol. 74. – P. 265-272.
131. Squire L., Berg D., Bloom F. *Fundamental neuroscience*. 3rd ed. – Amsterdam etc.: Elsevier Academic Press, 2008. – P. 437-516.
132. Sun X., Zhou H., Luo X., Li S., Yu D., Hua J., Mu D., Mao M. Neuroprotection of brain-derived neurotrophic factor against hypoxic injury in vitro requires activation of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3 – kinase // *Int. J. Devl. Neuroscience.* – 2008. – Vol.26. – P. 363-370.
133. Tapia-Arancibia L., Aliaga E., Silhol M., Arancibia S. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease // *Brain Res. Rev.* – 2008. – Vol.59. – N 1. – P.201-220.
134. Tatton W.G., Chalmers-Redman R.M., Sud A., Podos S.M., Mittag T.W. Maintaining mitochondrial membrane impermeability: an opportunity for new therapy in glaucoma? // *Surv. Ophthalmol.* – 2001. – Vol. 45. – P. 277-283.
135. Taylor S., Srinivasan B., Wordinger R.J., Roque R.S. Glutamate stimulates neurotrophin expression in cultured Müller cells// *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 2003. – Vol.111. – N 1-2. – P.189-197.
136. Tezel G. Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2006. – Vol. 25. – P. 490-513.
137. Tobias C.A., Shumsky J.S., Shibata M., Tuszynski M.H., Fischer I., Tessler A., Murray M. Delayed grafting of BDNF and NT-3 producing fibroblasts into the injured spinal cord stimulates sprouting, partially rescues axotomized red nucleus neurons from loss and atrophy, and provides limited regeneration // *Exp. Neurol.* – 2003. – Vol. 184. – N 1. – P. 97-113.

138. Tokumine J., Kakinohana O., Cizkova D. Changes in spinal GDNF, BDNF, and NT-3 expression after transient spinal cord ischemia in the rat // *J. Neurosci. Res.* – 2003. – Vol. 74. – P. 552-561.
139. Trick G.L., Trick L.R., Morris P., Wolf M. Visual field loss in senile dementia of the Alzheimer`s disease type // *Neurology.* – 1995. – Vol. 45. – P. 68-74.
140. Tsuruma K., Tanaka Y., Shimazawa M., Hara H. Induction of amyloid precursor protein by the neurotoxic peptide, amyloid-beta 25-35, causes retinal ganglion cell death // *J.of Neurochem.* – 2010. – N 6. – P. 1545-1554.
141. Valter K., Bisti S., Gargini C., Di Loreto S., Maccarone R., Cervetto L., Stone J. Time course of neurotrophic factor upregulation and retinal protection against light-induced damage after optic nerve section // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*– 2005.– Vol. 46.– P. 1748-1754.
142. Volbracht C1, van Beek J, Zhu C, Blomgren K, Leist M. Neuroprotective properties of memantine in different in vitro and in vivo models of excitotoxicity // *Eur J Neurosci.* – 2006. – Vol. 23. – N 10. – P. 2611-2622.
143. Wang W.H., McNatt L.G., Pang I.H., Hellberg P.E., Fingert J.H., McCartney M.D., Clark A.F. Increased expression of serum amyloid A in glaucoma and its effect on intraocular pressure // *Inves. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2008. – N 5. – P. 1916-1923.
144. Wordinger R.J., Lambert W., Agarwal R., Talati M., Clark A.F. Human trabecular meshwork cells secrete neurotrophins and express neurotrophin receptors (Trk) // *Invest. Ophthalmol Vis. Sci.* – 2000. Vol.41. – N 12. – P.3833-3841.
145. Wu Q., Zhang M., Song B.W., Lu B., Hu P. Expression of ciliary neurotrophic factor after induction of ocular hypertension in the retina of rats // *Chin. Med. J.*– 2007.– Vol. 120.– P. 1825-1829.
146. Yin H., Chen L., Chen X., Liu X. Soluble amyloid beta oligomers may contribute to apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma // *Med. Hypoth.* – 2008. – № 1. – P. 77-80.

147. Yoneda S., Hara H., Hirata A., Fukushima M., Inomata Y., Tanihara H. Vitreous fluid levels of beta-amyloid(1-42) and tau in patients with retinal diseases. // *Jpn. J. Ophthalmol.* – 2005. – N 2. – P. 106-108.
148. Yu S., Tanabe T., Yoshimura N. A rat model of glaucoma induced by episcleral vein ligation // *Exp. Eye Res.* – 2006. – Vol.83. – N 4. – P.758-770.
149. Zhang K., Hopkins J.J., Heier J.S., Birch D.G., Halperin L.S., Alбини T.A., Brown D.M., Jaffe G.J., Tao W., Williams G.A. Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2011. – Vol. 108. – N 15. – P. 6241-6245.
150. Zhang W., Prausnitz M.R., Edwards A. Model of transient drug diffusion across cornea // *J. Control. Release.* – 2004. – Vol. 99. – N 2. – P. 241-258.