

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

**Германова Виктория Николаевна**

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ СЕЛЕКТИВНЫХ  
ИММУНОДЕПРЕССАНТОВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ИЗБЫТОЧНОГО  
РУБЦЕВАНИЯ В ХИРУРГИИ ГЛАУКОМЫ**

3.1.5 – офтальмология

3.3.2 – патологическая анатомия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

**Карлова Елена Владимировна**

доктор медицинских наук, профессор

**Волова Лариса Теодоровна**

Самара – 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|   |    |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ.....   | 5  |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....   | 14 |
| 1.1. Патогенез заживления операционной раны .....   | 14 |
| 1.2. Методы контроля послеоперационного рубцевания.....   | 19 |
| 1.3. Перспективы применения селективных иммунодепрессантов для<br>коррекции избыточного рубцевания.....                                   | 25 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....   | 36 |
| 2.1. Дизайн исследования.....   | 36 |
| 2.2. Методы насыщения антиглаукоматозных дренажей селективными<br>иммунодепрессантами .....   | 38 |
| 2.2.1. Методы определения способности дренажей к сорбции селективных<br>иммунодепрессантов .....  | 39 |
| 2.2.2. Методы исследования десорбции селективных иммунодепрессантов из<br>материала дренажей.....   | 41 |
| 2.3. Методы определения эффективности и безопасности пролонгированного<br>применения селективных иммунодепрессантов <i>in vitro</i> ..... | 42 |
| 2.3.1. Методика получения первичных культур клеток.....   | 42 |
| 2.3.2. Определение антипролиферативной активности и цитотоксичности<br>циклоспорина А и эверолимуса.....                                  | 44 |
| 2.4. Методы проведения эксперимента <i>in vivo</i> .....  | 46 |
| 2.4.1. Методы исследования влияния антиглаукоматозного препарата на<br>состояние глазной поверхности лабораторных животных .....          | 47 |
| Таблица 4 – Оценка степени повреждения роговичного эпителия по шкале<br>Эфрона.....   | 48 |
| 2.4.2. Техника выполнения гипотензивного вмешательства <i>in vivo</i> .....   | 48 |
| 2.4.3. Методы гистологического исследования зоны операции .....   | 51 |
| 2.4.4. Методы послеоперационного обследования животных .....  | 51 |
| 2.5. Методы статистической обработки полученных результатов. ....   | 52 |

|  |     |
|--|-----|
| ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ПОДГОТОВКИ АНТИГЛАУКОМАТОЗНЫХ ДРЕНАЖЕЙ .....  | 53  |
| 3.1. Оценка способности дренажей к сорбции циклоспорина А .....  | 53  |
| 3.2. Оценка динамики десорбции циклоспорина А из дренажей.....   | 56  |
| 3.3. Оценка способности дренажей к сорбции эверолимуса. ....   | 58  |
| 3.4. Оценка динамики десорбции эверолимуса из дренажей .....   | 61  |
| ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ И ЦИТОТОКСИЧНОСТИ СЕЛЕКТИВНЫХ ИММУНОДЕПРЕССАНТОВ. ....                  | 65  |
| 4.1. Результаты получения первичной культуры фибробластов теноновой капсулы человека .....   | 65  |
| 4.2. Определение антипролиферативной активности и цитотоксичности циклоспорина А.....  | 68  |
| 4.2.1. Определение антипролиферативной активности циклоспорина А.....  | 68  |
| 4.2.2. Определение цитотоксичности циклоспорина А .....  | 73  |
| 4.3. Определение антипролиферативной активности и цитотоксичности эверолимуса .....  | 77  |
| 4.3.1. Определение антипролиферативной активности эверолимуса.....   | 77  |
| 4.3.2. Определение цитотоксичности эверолимуса.....  | 81  |
| ГЛАВА 5. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ СЕЛЕКТИВНЫХ ИММУНОДЕПРЕССАНТОВ В ГИПОТЕНЗИВНОЙ ХИРУРГИИ <i>IN VIVO</i> .....       | 85  |
| 5.1. Результаты исследования влияния антиглаукоматозного препарата на состояние тканей глазной поверхности лабораторных животных ..... | 85  |
| 5.1.1. Результаты офтальмологического обследования глазной поверхности лабораторных животных .....                                     | 86  |
| 5.1.2. Результаты гистологического исследования .....  | 90  |
| 5.2. Результаты гистологического исследования зоны операции .....  | 92  |
| 5.3. Клинико-функциональные результаты гипотензивных вмешательств, выполненных <i>in vivo</i> .....                                    | 104 |

|  |     |
|--|-----|
| 5.3.1. Результаты офтальмологического обследования животных.....   | 105 |
| 5.3.2. Гипотензивная эффективность вмешательств с применением дренажей,<br>насыщенных селективными иммунодепрессантами ..... | 116 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....   | 120 |
| ВЫВОДЫ .....   | 131 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....   | 133 |
| ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ .....   | 134 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....   | 135 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....   | 137 |
| ПРИЛОЖЕНИЯ .....   | 159 |

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

В настоящее время выявлено около 70 миллионов случаев глаукомы по всему миру, а к 2040 году прогнозируемое число людей, страдающих данным заболеванием, составит 111,8 миллионов человек (Tham Y.C. et al., 2014). Согласно статистике Министерства здравоохранения Российской Федерации, в 2017 году заболеваемость глаукомой составила 1133,5 случаев на 100 000 взрослого населения. В нашей стране глаукома занимает лидирующие позиции в структуре инвалидности вследствие заболеваний органа зрения (Макогон С.И. и др., 2015; Азнабаев Б.М. и др., 2017). В Самарской области по состоянию на 01.01.2017 на учете с глаукомой состояли 31980 человек, из которых инвалидов по данному заболеванию – 1243 человека (Золотарев А.В. и др., 2017).

Эффективного этиологического лечения глаукомы до сих пор не существует. Тем не менее, общепризнано, что снижение внутриглазного давления (ВГД) – основной метод патогенетического лечения данного заболевания (Глаукома. Национальное руководство, 2014; Куроедов А. В. и др., 2018; Terminology and Guidelines for Glaucoma, 2020; Антонов А.А. и др., 2020; Егоров Е.А. и др., 2020). Существует большое разнообразие медикаментозных и лазерных методов его снижения. При их неэффективности или невозможности применения, а также в случае выявления продвинутых стадий заболевания ведущую роль приобретают гипотензивные вмешательства, призванные создать новые пути оттока внутриглазной жидкости (ВГЖ).

Независимо от вида хирургии эффект от операции зачастую оказывается нестойким. Через 6 месяцев от 0,4 до 10% вмешательств теряют свою эффективность, а в более поздние сроки – от 1,7 до 53%. Нуждаемость в повторных операциях составляет 30% (Шмырева В.Ф. и др., 2010; Глаукома. Национальное руководство, 2014; Бабушкин А.Э., 2017). Основной причиной недостаточной эффективности хирургического лечения глаукомы являются процессы избыточного рубцевания тканей глаза между конъюнктивой, теноновой капсулой и эписклерой, а также в зоне иссеченной трабекулы и шлеммова канала (Van Bergen T. et al., 2014; Masoumpour M. et al., 2016; Петров С.Ю., 2017; Zada M. et al., 2018; Бикбов М.М. и др., 2019; Trelford C.V. et al., 2020).

В настоящее время предложено множество методов контроля послеоперационного рубцевания: минимизация хирургической травмы, имплантация различных дренажных устройств, интра- и послеоперационное применение противовоспалительных и антипролиферативных лекарственных средств, из которых наибольшим эффектом обладает митомицин С (Петров С.Ю., 2017; Holló G. et al., 2017; Zada M. et al., 2018.; Бикбов М.М. и др., 2019). Тем не менее, высокая эффективность данного препарата сопровождается повышенной вероятностью развития угрожающих зрению осложнений (кератопатии, увеитов, супрахориоидального кровоизлияния, гипотонии и симптоматической макулопатии, позднего эндофтальмита, катаракты) (Fan Gaskin J. et al., 2014; Holló G. et al., 2017; Cumurcu T. et al., 2017; Бикбов М.М. и др., 2019; Захидов А.Б., 2020). С целью коррекции рубцевания также было предложено местное применение глюкокортикостероидов, ингибиторов факторов роста, антагонистов лейкотриенов, ингибиторов ангиогенеза, протеолитических средств и др. (Khaw P.T., 2001; Van Bergen T. et al., 2014; Masoumpour M. et al., 2016; Петров С.Ю., 2017). Зачастую изолированное применение тех или иных методик не приносит ожидаемого результата (Khaw P.T., 2001; Masoumpour M., 2016). Поэтому различными авторами была предложена комбинированная концепция профилактики послеоперационного рубцевания в виде применения дренажей, насыщенных лекарственными препаратами (Тахчиди Х.П. и др., 2008; Бикбов М.М. и др., 2017; Хуснитдинов И.И., 2018). Несмотря на многообразие, существующие на данный момент способы коррекции избыточного рубцевания в хирургии глаукомы либо недостаточно эффективны, либо не отвечают требованиям безопасности. Продолжается научный поиск новых агентов, способных обеспечить высокий эффект операции при минимальном риске и тяжести побочных эффектов. В настоящее время все больше внимания уделяют изучению веществ, обладающих избирательным механизмом действия, таргетно воздействующих на отдельные звенья каскада воспаления и репарации. К таким веществам относятся, в том числе, иммунодепрессанты, характеризующиеся селективным действием, в частности, циклоспорин А (ЦсА) и ингибитор механистической мишени рапамицина (mechanistic target of rapamycin – mTOR) эверолимус. ЦсА избирательно воздействует на Т-хелперы и приводит к ингибированию синтеза интерлейкина-2 (ИЛ-2), одного из ключевых медиаторов воспалительного каскада, активирующего другие иммунокомпетентные клетки и

стимулирующего синтез провоспалительных цитокинов, усиливающих в свою очередь пролиферацию в послеоперационной ране (Faulds D. et al., 1993; Matsuda S. et al., 2000). Антипролиферативный эффект ингибиторов mTOR основан на торможении биосинтеза белка и липидов клетками, а также остановке клеточного деления в фазе G1. При этом выявлено, что ингибиторы mTOR воздействуют не только на иммунокомпетентные клетки, но и непосредственно на фибробласты, играющие ключевую роль в формировании соединительной ткани после операционной травмы (Averous J. et al., 2007; Chatterjee A. et al., 2015; Saxton R.A. et al., 2017). Механизм действия данных иммунодепрессантов, характеризующийся как прямым, так и опосредованным ингибированием функции фибробластов, обуславливает их потенциал в качестве антипролиферативных агентов в хирургии глаукомы, что определяет актуальность данной работы.

### **Степень разработанности темы исследования**

Изучению применения ЦсА и ингибиторов mTOR в хирургии глаукомы посвящены работы нескольких исследователей (Park K.H. et al., 1996; Lattanzio F.A. et al., 2005; Fakhraie G. et al., 2009; Dai Z. et al., 2016; Yan Z.C. et al., 2011; Eren K. et al., 2015; Cinik R. et al., 2016). Опубликованные данные по применению вышеназванных иммунодепрессантов с целью профилактики рубцевания весьма противоречивы. В большинстве работ, не показавших эффективность применения ЦсА, исследовали послеоперационное применение данного препарата в виде капель. Однако способность ЦсА к диффузии через конъюнктиву и роговицу низкая (Ben Ezra D. et al., 1990; Tang-Liu D.D. et al., 2005), вследствие чего, вероятно, не были созданы терапевтические концентрации ЦсА в зоне операции. Противоречивыми были и результаты интраоперационной аппликации ЦсА и ингибиторов m-TOR, что связано с тем, что пик концентрации Т-лимфоцитов, являющихся основной мишенью действия данных препаратов, приходится лишь на 5-7 сутки после операции, и при однократной аппликации терапевтические концентрации препарата в зоне вмешательства не сохраняются в течение столь длительного времени. Изучение патофизиологических основ заживления операционной раны позволяет предположить наибольшую эффективность пролонгированной доставки данных препаратов к зоне гипотензивного

вмешательства в терапевтических концентрациях в течение 7 – 14 дней после хирургии. В доступной на настоящий момент литературе не описано удовлетворительного способа пролонгированного применения ЦсА или ингибиторов mTOR для профилактики рубцевания в хирургическом лечении глаукомы, что определяет актуальность данной работы и служит основанием для постановки цели исследования.

### **Цель исследования**

Разработка и экспериментальное обоснование способа пролонгированного применения селективных иммунодепрессантов для коррекции избыточного рубцевания в хирургии глаукомы.

### **Задачи исследования**

1. Разработать способ предоперационной подготовки антиглаукоматозных дренажей на основе полимолочной кислоты, позволяющий усилить их антипролиферативный эффект путем насыщения селективными иммунодепрессантами (циклоспорином А либо эверолимусом);

2. Определить антипролиферативную активность и цитотоксичность циклоспорина А и эверолимуса в эксперименте на культуре фибробластов теноновой капсулы человека на основании морфометрического анализа;

3. Провести клинико-морфологическую оценку влияния длительных инстилляций комбинированного гипотензивного препарата на ткани глазной поверхности в эксперименте *in vivo*;

4. В эксперименте *in vivo* изучить влияние имплантации антиглаукоматозных дренажей, насыщенных циклоспорином А либо эверолимусом, на воспаление и репарацию в зоне фистулизирующей гипотензивной операции на основании гистологического анализа;

5. Произвести оценку эффекта хирургических вмешательств с имплантацией антиглаукоматозных дренажей, насыщенных циклоспорином А либо эверолимусом, в эксперименте *in vivo*.



## Научная новизна

1. Впервые разработан способ предоперационной подготовки биорезорбируемых антиглаукоматозных дренажей на основе полимолочной кислоты путем их насыщения циклоспорином А либо эверолимусом, позволяющий получить стандартизированные дренажи с заведомо известным количеством сорбированных иммунодепрессантов в соответствии с разработанными математическими моделями.

2. Впервые доказан прямой антипролиферативный эффект циклоспорина А и эверолимуса на фибробласты теноновой капсулы человека в пределах концентраций 0,05-2,0 мкг/мл и 0,5-20,0 мкг/мл соответственно при сохранении их жизнеспособности.

3. Впервые разработан способ профилактики послеоперационного рубцевания при хирургическом лечении глаукомы, включающий применение биорезорбируемых дренажей на основе полимолочной кислоты, насыщенных селективными иммунодепрессантами, для коррекции избыточного рубцевания в хирургии глаукомы (Патент РФ на изобретение № 2724854 от 25.06.2020).

## Теоретическая и практическая значимость

1. Разработанный способ предоперационной подготовки биорезорбируемых дренажей на основе полимолочной кислоты путем их насыщения селективными иммунодепрессантами (циклоспорином А либо эверолимусом) позволяет получать стандартизированные дренажи с антипролиферативными свойствами для повышения эффективности хирургического лечения глаукомы.

2. Полученные в ходе эксперимента *in vitro* на культурах фибробластов теноновой капсулы человека данные о концентрациях циклоспорина А и эверолимуса, оказывающих антипролиферативный эффект, являются теоретической основой для создания систем доставки лекарств с вышеуказанными препаратами для терапии состояний, сопровождающихся фиброзом теноновой капсулы.

3. В ходе эксперимента *in vivo* доказано, что имплантация биорезорбируемых антиглаукоматозных дренажей на основе полимолочной кислоты, насыщенных селективными иммунодепрессантами (циклоспорином А либо эверолимусом), способствует снижению интенсивности послеоперационного рубцевания и повышению

эффективности гипотензивной хирургии без увеличения вероятности развития осложнений.

4. После проведения дополнительных доклинических и соответствующих клинических исследований предложенный способ профилактики послеоперационного рубцевания в хирургии глаукомы может быть использован для повышения эффективности гипотензивных операций у пациентов в офтальмологических стационарах.

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

1. Разработанный способ пролонгированного применения селективных иммунодепрессантов в хирургии глаукомы, заключающийся в имплантации в ходе гипотензивного вмешательства антиглаукоматозных дренажей на основе полимолочной кислоты, насыщенных циклоспорином А либо эверолимусом, позволяет повысить эффективность хирургического лечения глаукомы за счет снижения интенсивности процессов послеоперационного рубцевания в эксперименте *in vivo*.

2. Циклоспорин А и эверолимус оказывают прямой антипролиферативный эффект на фибробласты теноновой капсулы человека в концентрациях 0,05-2,00 мкг/мл и 0,5-20,0 мкг/мл соответственно при отсутствии цитотоксичности.

### **Степень достоверности**

Степень достоверности диссертационного исследования подтверждается достаточным объемом объектов исследования на каждом этапе (295 образцов антиглаукоматозных биорезорбируемых дренажей на основе полилактида, 65 образцов культур клеток фибробластов теноновой капсулы человека, 52 глаза кроликов), использованием современных методов исследования на этапах *in vitro* и *in vivo*, современных методов статистической обработки данных.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации доложены и обсуждены на X Международной (XIX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (г. Москва, 2015 г.), всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Аспирантские чтения" (г. Самара, 2015, 2018, 2019, 2020 гг.), на Конгрессе Европейского глаукомного общества (г. Флоренция, 2018, в онлайн формате, 2020 г.), на Всемирном глаукомном конгрессе (г. Мельбурн, 2019 г.), на международной конференции "Успехи в исследовании глаукомы и клинической практике" (г. Амстердам, 2019 г.), на международном конгрессе по хирургии глаукомы (г. Лондон, 2020 г.), на научно-практической конференции «Лечение глаукомы: инновационный вектор» (г. Москва, 2021 г.), на научно-практической конференции «Лига молодых офтальмологов» (г. Уфа, 2021 г.), на научно-практической конференции «Общая и военная офтальмология» (г. Санкт-Петербург, 2021 г.), на всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения» (г. Москва, 2021 г.).

### **Внедрение результатов исследования**

Полученные в ходе выполнения диссертационной работы результаты применяются в преподавании курса офтальмологии для студентов, ординаторов и аспирантов на кафедре офтальмологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ. Результаты исследования внедрены в практическую работу лаборатории культур клеток человека биотехнологического центра «БиоТех» и лаборатории экспериментальной морфологии Института экспериментальной медицины и биотехнологии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава РФ.

### **Личный вклад автора**

Автор принимал непосредственное участие в постановке цели и задач исследования, разработке дизайна исследования, анализе современной отечественной и

зарубежной литературы по изучаемой проблеме, разработке алгоритма и методологии экспериментальных исследований. Автор принимал участие в проведении экспериментов *in vitro*, самостоятельно проводил исследование *in vivo*. Автором самостоятельно проведен сбор данных и их статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов.

### **Связь темы диссертации с планом основных научно-исследовательских работ университета**

Работа выполнена в рамках комплексной научной темы кафедры офтальмологии и кафедры глазных болезней ИПО ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России: «Совершенствование методов диагностики и лечения больных с социально значимой офтальмологической патологией». Номер государственной регистрации темы: 121121700220-7.

### **Соответствие паспорту специальности**

Диссертационное исследование соответствует паспортам следующих научных специальностей: 3.1.5 – офтальмология, в области разработки новых хирургических технологий и 3.3.2 – патологическая анатомия, в области исследования патогенетических механизмов развития заболеваний в целом и отдельных их проявлений (симптомы, синдромы), создания основ патогенетической терапии.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликована 21 научная работа, из которых 3 – в журналах, индексируемых в международной базе данных Scopus, 7 – в журналах, рецензируемых ВАК РФ. Получен 1 патент РФ на изобретение № 2724854 от 25.06.2020.

### **Структура и объем работы**

Текст диссертации изложен на 162 страницах машинописного текста, состоит из введения, 5 глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования, а также 3 главы результатов собственных исследований и заключения. В работе представлено 29 таблиц и 92 рисунка, а также 3 приложения. Список литературы содержит 223 источника, из них отечественных – 96, зарубежных – 127.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Патогенез заживления операционной раны

Любое повреждение хирургического или травматического генеза запускает в организме жизненно важный процесс – заживление раны, приоритетом которого становится остановка кровотечения, предотвращение проникновения инфекционных агентов, восстановление целостности ткани и её функции [113]. В отличие от большинства хирургических вмешательств, при которых желаемым результатом является полноценное заживление, в хирургии глаукомы ситуация обратная: незавершенное рубцевание операционной раны обеспечивает фильтрацию ВГЖ из передней камеры в субконъюнктивальное пространство, обуславливая успех операции. Избыточное рубцевание, напротив, является основной причиной неэффективности гипотензивной хирургии [170, 220].

Управление процессами рубцевания требует понимания патофизиологических процессов, лежащих в основе заживления ран.

Заживление ран конъюнктивы, теноновой капсулы и склеры характеризуется фиброзом и протекает согласно закономерностям, наблюдающимся при заживлении большинства тканей организма, не относящихся к нервной системе [135, 216].

Условно процесс заживления ран разделяют на несколько стадий. Согласно морфологической классификации, в зависимости от вида преобладающих в каждой стадии клеток выделяют лейкоцитарную, макрофагальную и фибробластическую фазы [61]. Серов В.В. и Шехтер А.Б. в 1981 г. выделили 3 перекрывающиеся во времени фазы: травматического воспаления, новообразования соединительной ткани и формирования и перестройки рубца [73]. С точки зрения патофизиологии, традиционно выделяют фазы альтерации, экссудации и пролиферации [77].

В настоящее время многие ученые выделяют 4 перекрывающиеся друг друга во времени фазы заживления раны: фаза коагуляции (гемостаза), воспаления, пролиферации и ремоделирования. Тем не менее, следует учитывать, что различные звенья данного процесса происходят непрерывно и взаимосвязанно [56, 113].

### Фаза коагуляции

Травматическое повреждение тканей и сосудов запускает каскад свертывания крови, в ходе которого происходит, в том числе, активация тромбоцитов и фактора Хагемана, что способствует не только вазоконстрикции и тромбообразованию, но и накоплению множества хемоаттрактантов, факторов роста и митогенов. Поврежденные сосуды становятся источником форменных элементов крови, тромбоцитов, иммунокомпетентных клеток, а также некоторых медиаторов воспаления, таких как простагландины, лейкотриены, гистамин и серотонин. На данном этапе тромбоциты становятся ведущим звеном в контроле заживления раны посредством выделения различных факторов роста и хемоаттрактантов (Таблица 1) [107, 113, 127, 220].

Таблица 1 – Спектр цитокинов, синтезируемых иммунокомпетентными клетками

| Иммунокомпетентные клетки         |                          | Цитокины  |  |
|-----------------------------------|--------------------------|---|--|
| Лимфоциты                         | Т-хелперы (CD4+)         | Th <sub>0</sub>   | ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-13, ИФН- $\gamma$ , TNF- $\beta$ |
|                                   |                          | Th <sub>1</sub>   | ИЛ-2, ИЛ-3, ИФН- $\gamma$ , TNF- $\beta$                                       |
|                                   |                          | Th <sub>2</sub>   | ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-13   |
|                                   | Т-цитотоксические (CD8+) | ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, ИФН- $\gamma$ , TNF- $\gamma$  |  |
| В-лимфоциты                       |                          | ИЛ-1, ИЛ-12   |  |
| Макрофаги и дендритические клетки |                          | ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, TGF- $\beta$ , ИФН- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , EGF, IGF, PDGF, FGF, КСФ, ИФ- $\alpha, \beta$ |  |
| Фибробласты                       |                          | ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-11, КСФ, PDGF, VEGF, IGF, TGF- $\beta$ , EGF, FGF, ИФН- $\alpha, \beta$                                |  |
| Эндотелиальные клетки             |                          | ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-7, TNF- $\alpha$ , PDGF, VEGF, PlGF, FGF   |  |
| Тромбоциты                        |                          | PDGF, CTGF, VEGF, IGF, EGF, TGF- $\beta$ , ИЛ-1, ИЛ-8   |  |

Сокращения: ИЛ – интерлейкин, ИФН – интерферон, КСФ – колониестимулирующие факторы, TNF – фактор некроза опухоли, TGF – трансформирующий фактор роста, EGF – эпителиальный фактор роста, IGF – инсулиноподобный фактор роста, PDGF – тромбоцитарный фактор роста, FGF – фактор роста фибробластов, КСФ – колониестимулирующие факторы, VEGF – фактор роста эндотелия сосудов, PlGF – плацентарный фактор роста, CTGF – фактор роста соединительной ткани

### Фаза воспаления (дни 0-5)

Первые иммунокомпетентные клетки, нейтрофилы, появляются в ране через 6 часов после ее возникновения (Рисунок 1). Их количество достигает максимума через

24-48 часов, а затем постепенно уменьшается до минимума через 72 часа после повреждения [113, 212]. Главная функция нейтрофилов – фагоцитоз бактерий и чужеродного материала [107, 113, 220]. Доказано, что присутствие нейтрофилов в ране необязательно для ее заживления, и в отсутствие инфекционного загрязнения их функцию на себя берут макрофаги [107, 191].

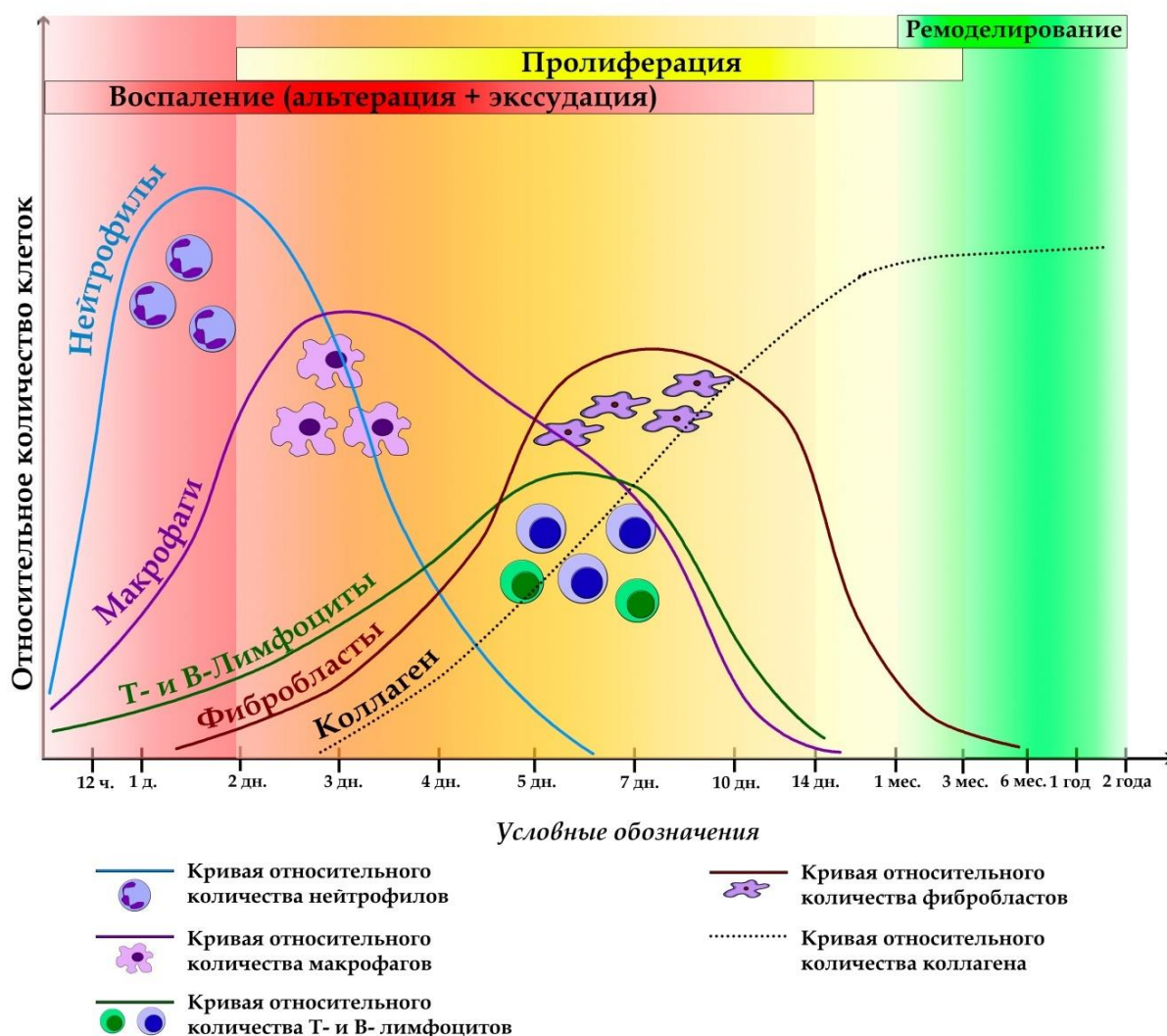


Рисунок 1 – Схематическое изображение хода воспалительного процесса (рисунок авторский)

Макрофаги в больших количествах появляются в ране спустя 48-96 часов, достигают максимума своей концентрации через 72 часа после повреждения и персистируют в ране в меньших количествах вплоть до полного заживления (Рисунок 1) [107, 113, 177]. Главными функциями макрофагов являются фагоцитоз некротизированных тканей и патогенных микроорганизмов, а также синтез множества



факторов роста и цитокинов (Таблица 1), инициирующих образование экстрацеллюлярного матрикса [68, 124]. В отличие от нейтрофилов, макрофаги являются необходимым звеном в процессе заживления ран [164]. При этом интенсивность стимуляции ангио- и коллагеногенеза макрофагами находится в прямой зависимости от их количества.

Лимфоциты присутствуют в ране с 1 дня после повреждения, однако число их начинает прогрессивно расти с 5 по 7 дни после травмы. Большое количество лимфоцитов персистирует в ране до 14 дня и далее постепенно снижается в течение 4 месяцев (Рисунок 1). Реакция лимфоцитов представляет собой специфический иммунный ответ на травму и инфекцию. Т-лимфоциты активируются, когда «узнают» антиген, представленный им антиген-презентирующими клетками (макрофагами), отвечая на данный стимул пролиферацией антиген-специфических Т-лимфоцитов. Продуцируемые ими цитокины (Таблица 1), в свою очередь, как непосредственно, так и косвенно активируют и вызывают пролиферацию других иммунокомпетентных клеток, в том числе макрофагов, а также фибробластов [68, 107]. Экспериментально доказано, что Т-лимфоциты необходимы для полноценного заживления ран [101, 181]. Было обнаружено, что на ранних стадиях заживления (5-14 дни) среди субпопуляций Т-лимфоцитов в ране преобладают CD4<sup>+</sup> клетки (хелперы и эффекторы) [175]. В дальнейшем данное соотношение смещается в пользу CD8<sup>+</sup> клеток. Если на начальных стадиях Т-лимфоциты оказывают стимулирующее влияние на фибробласты, то позднее включаются регуляторные механизмы, ограничивающие репарацию, и происходит переключение от активирующей к ингибирующей роли Т-лимфоцитов в заживлении раны [107].

### **Фаза пролиферации (дни 3-14)**

В данную фазу происходит формирование грануляционной ткани. В этот период происходит быстрый рост количества клеточных элементов, в первую очередь, фибробластов, проявляющих повышенную активность (Рисунок 1). Ключевые процессы данной фазы, ангиогенез и фиброгенез, происходят под воздействием факторов роста главным образом, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), тромбоцитарного фактора роста (PDGF) и трансформирующего фактора роста бета (TGF- $\beta$ ), синтезируемых как фибробластами, так и другими иммунокомпетентными клетками (макрофагами и

лимфоцитами). Под воздействием TGF- $\beta$  происходит дифференцировка фибробластов в миофибробласты, обеспечивающие сокращение и закрытие раны [220].

### **Фаза ремоделирования (день 7 – 1 год)**

Данная финальная фаза заживления раны характеризуется созреванием фиброваскулярной ткани с формированием рубца под воздействием матриксной металлопротеиназы (ММП), синтезируемой фибробластами и макрофагами. ММП вызывает селективную деградацию экстрацеллюлярного матрикса, главным образом, за счет расщепления фибронектина и гиалуроновой кислоты. Происходит замещение коллагена I типа коллагеном III типа, кросслинкинг его волокон и последующая дегидратация с формированием плотного гипоцеллюлярного рубца. Уменьшение количества миофибробластов осуществляется за счет их апоптоза. Ремоделирование рубца длится вплоть до 1 года после повреждения и продолжается в течение всей жизни на минимальном уровне [113].

### **Особенности заживления послеоперационной раны у пациентов, страдающих глаукомой**

Абсолютное большинство пациентов, направляемых на хирургическое лечение глаукомы, находятся на длительной медикаментозной терапии гипотензивными препаратами [63, 65]. Данные препараты сами по себе, а также консерванты, входящие в их состав, вызывают изменения тканей глазной поверхности, характеризующиеся снижением слезопродукции, повреждением эпителия и хроническим воспалением [1, 37, 53, 65, 100]. При этом в конъюнктиве обнаруживают увеличение количества эпителиальных слоев и изменение плотности бокаловидных клеток, в субэпителиальных слоях происходит накопление коллагена и клеточных элементов, в частности, тучных клеток, макрофагов, лимфоцитов и фибробластов [65, 118, 121, 140, 184]. В слезной и внутриглазной жидкости выявляют повышенную экспрессию провоспалительных цитокинов (интерферона-гамма (ИФН- $\gamma$ ), -альфа (ИФН- $\alpha$ ), фактора некроза опухолей (TNF), ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12 [36, 62, 91, 115, 116, 118].

Изначально наблюдающийся у данных пациентов избыток провоспалительных цитокинов и факторов роста увеличивает интенсивность воспаления, что ухудшает исходы хирургии глаукомы, приводя к сокращению времени функционирования

фильтрационных подушек (ФП), уменьшению их площади, тенденции к уплощению и более раннему послеоперационному подъему ВГД [21, 63, 65, 105].

## 1.2. Методы контроля послеоперационного рубцевания

В настоящее время для контроля избыточного рубцевания предложены следующие направления: совершенствование техники вмешательств, применение антиглаукоматозных дренажей и имплантов, а также медикаментозная коррекция.

**Совершенствование техники выполнения операции** заключается в применении наименее инвазивных хирургических техник и тщательном выполнении гемостаза [149, 170, 201].

Также с целью повысить эффективность хирургического лечения глаукомы были предложены различные модели **дренажей и дренажных устройств**, относящихся к категории биоимплантов.

Все имплантируемые материалы классифицируют на токсичные, которые вызывают повреждение и гибель клеток и тканей в зоне установки; инертные, оказывающие минимальное влияние на окружающие ткани; биологически активные, взаимодействующие с тканями и вызывающими образование межповерхностных связей между имплантами и тканями; биорезорбируемые, подвергающиеся биодеградации при взаимодействии с клетками и тканями [57]. Большинство дренажей, применяемых при хирургическом лечении глаукомы, выполнены из инертных или биорезорбируемых материалов.

По характеристикам конструкции и механизма действия дренажей выделяют следующие подгруппы:

1) Дренажи-трубочки, дистальный конец которых помещают в переднюю камеру, а проксимальный с резервуаром или клапанным устройством – под конъюнктиву выше места прикрепления экстраокулярных мышц. Среди данного вида дренажей выделяют бесклапанные устройства, осуществляющие пассивный отток внутриглазной жидкости из передней камеры вне зависимости от уровня офтальмотонуса (Molteno, Baerveldt), и клапанные устройства, осуществляющие фильтрацию ВГЖ по достижении определенных значений ВГД (Ahmed, Krupin) [5, 76, 87]. Дренажи-трубочки являются одними из самых эффективных устройств в отношении гипотензивного эффекта,

достигающего 86% [2, 19, 48, 64, 162, 182]. Тем не менее, процессы рубцевания и инкапсуляции дренажа снижают эффективность примерно на 10% каждый год, доходя до уровня 26% через 15 лет [19, 162]. Кроме того, до 40% случаев имплантации данного вида дренажных устройств сопровождается осложнениями: гипотония и гипотоническая макулопатия (2-13%), отслойка сосудистой оболочки (9-24%), прорезывание трубки дренажа через склеру и конъюнктиву (2-14%), гифема (2-15%), диплопия (0,3-12%), дистрофия роговицы (1-27%) [2, 19, 48, 64, 162, 182].

2) Микродренажные устройства, фиксируемые в передней камере, с формированием оттока в шлеммов канал (i-Stent, Hydrus), в супрахориоидальное пространство (Gold micro shunt, Aquashunt, Cypass), в субконъюнктивальное пространство (Ex-PRESS, XEN Gel) [69, 76, 87]. Имплантация данных устройств обеспечивает меньший гипотензивный эффект в сравнении с другими типами вмешательств при глаукоме, поэтому применяется, в основном, у пациентов с начальными стадиями заболевания [69, 83].

3) Транслимбальные дренажи, предотвращающие склеро-склеральные и склеро-конъюнктивальные сращения. В зависимости от вида материала, используемого для изготовления данных дренажей, выделяют аутотрансплантаты (из тканей реципиента), аллотрансплантаты (из тканей донора), ксенотрансплантаты (из тканей животных), эксплантодренажи (полимерные материалы) [76, 87].

Наибольшей биосовместимостью обладают ауто- и аллодренажи, однако период их биодеструкции слишком короткий, из-за чего применение данных видов дренажей не оказывает длительного гипотензивного эффекта [76].

Широко распространено применение дренажа «Ксенопласт», изготовленного на основе свиного костного коллагена с добавлением сульфатированных гликозаминогликанов, повышающих его биосовместимость и модулирующих заживление операционной раны. Дренаж имеет пористую структуру (размеры пор 200-700 мкм) [8, 9]. В исследовании *in vivo* авторами доказано, что дренаж не обладает токсичностью [7, 11]. При имплантации в мышечную ткань животных вокруг имплантата отмечается умеренная воспалительная реакция, без выраженной макрофагальной или лимфоидной инфильтрации [6, 8]. Дренаж стоек к биодеструкции и способен стабильно располагаться в интрасклеральном пространстве в течение нескольких лет. Согласно данным клинических исследований, в раннем

послеоперационном периоде применение дренажа «Ксенопласт» позволяет достичь абсолютного гипотензивного успеха в 70-98% случаев [5, 9, 10]. В отдаленном и позднем послеоперационном периоде относительный гипотензивный эффект сохранялся на высоком уровне даже в случае лечения рефрактерной глаукомы и составлял 78,8-100% по данным различных исследований [5, 9, 13, 27]. Была предложена методика выполнения ангио-увеального дренирования с замещением иссеченной трабекулярной ткани коллагеновым дренажом «Ксенопласт». Такая модификация техники операции значительно повышала эффективность вмешательства и длительность гипотензивного эффекта [10]. Из осложнений при выполнении антиглаукоматозных операций с использованием дренажа «Ксенопласт» наиболее часто отмечали гифему (9,1-14,7%) и цилиохориоидальную отслойку (15,1-17,6%) [13].

Среди эксплантодренажей широко известен дренаж из дигеля на основе сополимера этиленгликоля и метакриловой кислоты «Репегель», обладающий гидрофобно-гидрофильными свойствами [30, 76]. Согласно литературе, в раннем послеоперационном периоде гипотензивная эффективность имплантации данного дренажа достигает 100%. Тем не менее, в отдаленном периоде наблюдают снижение абсолютного гипотензивного эффекта до 37,5% из-за процессов рубцевания в зоне вмешательства [15, 30]. Осложнения имплантации дренажей «Репегель» характерны для дренажной хирургии глаукомы в целом: отслойка сосудистой оболочки до 11,6%, гифема до 11,6%, выраженная гипотония – до 3,9% [30].

Выявлено, что наибольшей биосовместимостью и ареактивностью обладают дренажи на основе полигидроксикарбоновых кислот, в частности из полимолочной кислоты [76, 85, 87]. Срок их биодеградации составляет 4-8 месяцев. Данный период достаточен для полноценного формирования путей оттока ВГЖ при сведении к минимуму вероятности кальцификации и инкапсуляции дренажа из-за длительного нахождения в зоне вмешательства. При биодеструкции полимер расщепляется на мономеры молочной кислоты, хорошо метаболизируемой в тканях до углекислого газа и воды. Ни промежуточные, ни конечные продукты распада не являются токсичными и не вызывают воспалительной реакции [50, 86].

Многочисленные исследования российских ученых показали эффективность применения дренажа на основе полилактида «Глаутекс» в хирургическом лечении различных видов глаукомы. При изолированном применении данных дренажей в

хирургии первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ) абсолютный гипотензивный эффект в раннем послеоперационном периоде был достигнут более, чем в 90% случаев. Через 1 год после операции данный показатель составлял от 35,7% до 75,7% согласно результатам различных исследователей [4, 16, 26, 49, 54, 89]. При хирургическом лечении рефрактерной глаукомы с имплантацией дренажей на основе полилактида абсолютный гипотензивный эффект через 1 год после операции достигнут в 39,1-66,4% случаев [16, 18, 74]. Количество осложнений при имплантации дренажей «Глаутекс» не превышало показатели традиционных проникающих вмешательств при глаукоме. В частности, частота развития цилиохориоидальной отслойки (ЦХО) при выполнении синустрабекулэктомии составляла 6,9%-8,0%, возрастая до 18,2% при лечении пациентов с продвинутыми стадиями или рефрактерной глаукомой. Гифему при лечении неоваскулярной глаукомы наблюдали в 10,8-26,1% случаев, при выполнении операций у пациентов с ПОУГ данный показатель не превышал 5%. Частота прорезывания дренажа при продевании в него поверхностного склерального лоскута составила 0,4-4,3% [4, 16, 18, 26, 51, 74, 75, 89, 93].

Наиболее изученными и распространенными препаратами для **медикаментозной профилактики послеоперационного рубцевания** являются противовоспалительные препараты. **Глюкокортикостероиды (ГКС)** ингибируют миграцию, активацию и пролиферацию лейкоцитов и макрофагов, способствуют уменьшению интенсивности синтеза факторов роста и снижению сосудистой проницаемости [67]. Среди способов применения ГКС преобладают инстилляциии в конъюнктивальный мешок, а также субконъюнктивальные инъекции. Также при рубцевании в послеоперационном периоде применяют нидлинг ФП с растворами ГКС. Реже прибегают к субтеноновым и ретробульбарным инъекциям [170]. Однако применение ГКС может приводить к нежелательному повышению ВГД ввиду специфических изменений трабекулярного аппарата, а также к увеличению частоты инфекционных осложнений [170].

**Нестероидные противовоспалительные препараты** ингибируют циклооксигеназу и функцию тромбоцитов, в том числе продукцию ими факторов роста и провоспалительных цитокинов. Данная группа препаратов уступает ГКС в отношении эффективности профилактики послеоперационного рубцевания [201].

Препаратами с наибольшим антипролиферативным эффектом в хирургии глаукомы являются **5-фторурацил (5-ФУ)** и **митомицин С (ММС)** [220].

Антиметаболит 5-ФУ ингибирует синтез пиримидиновых нуклеотидов, нарушая синтез ДНК, и инициирует апоптоз клеток, находящихся в G1 и S фазах клеточного цикла, в том числе фибробластов. Наиболее эффективным способом применения 5-ФУ признан нидлинг ФП. Однако применение данного антиметаболита сопряжено с высоким риском развития осложнений, таких как повреждение заднего эпителия роговицы [170], увеит (14%), наружная фильтрация (13%), цилиохориоидальная отслойка (9%) [210].

Цитостатик ММС способствует кросслинкингу молекулы ДНК, блокирует ее репликацию, ингибирует синтез белка, что приводит к апоптозу клетки. Действие ММС не зависит от фазы клеточного цикла. Цитостатик оказывает выраженный антипролиферативный эффект на фибробласты и клетки эндотелия сосудов, что способствует повышению эффективности хирургического лечения глаукомы [66, 140]. Чаще всего ММС используют в виде кратковременных интраоперационных аппликаций [170]. Тем не менее, его применение зачастую приводит к развитию угрожающих зрению осложнений: формированию кистозных аваскулярных ФП (31%) – фактора риска развития эндофтальмита; выраженной и длительно персистирующей послеоперационной гипотонии (15-32,7%), в 8,9% случаев приводящей к гипотонической макулопатии, ЦХО, наружной фильтрации, в том числе, поздней (3,7-17,9%), инфекционным осложнениям, дистрофии роговицы [20, 44]. Известны случаи некротизирующего кератита, склеромаляции и склерэктазии вследствие применения ММС [131].

Многие исследователи считают перспективным применение **анти-VEGF препаратов** для контроля послеоперационного рубцевания. Предложено как интраоперационное их применение в виде аппликаций, так и послеоперационное в виде инъекций в переднюю камеру, в стекловидное тело, под конъюнктиву, а также в ФП [58, 59, 60, 97]. Исследования показали достаточно высокую эффективность данных препаратов, однако применение ингибиторов VEGF ассоциировано с более высокой частотой возникновения инкапсулированных аваскулярных ФП, склонных к инфицированию, в сравнении с ММС [97, 110].

В настоящее время усилия ученых направлены на исследование медикаментозных агентов, избирательно воздействующих на отдельные звенья процесса воспаления и пролиферации. Проведены клинические исследования ингибиторов TGF- $\beta$  (моноклональное антитело CAT-152 [67, 134, 148], сурамин [172], траниласт [111]),

цитокинотерапии [94], применения ферментных препаратов [39], сульфатированных гликозаминогликанов [82]. Опубликованы данные экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo* ингибиторов TGF- $\beta$  (аптамер s58 [223], декорин [138], пирфенидон [176], розиглитазон [168]) и его сигнальных путей (SB-431542 и SB-505124) [213], ингибиторов секретируемого кислого белка, обогащенного цистеином (SPARC) [189], Rho-киназы (Y-27632) [108], MMP [169], плацентарного фактора роста (PGF) [202], ангиотензина II [205], иммунодепрессантов (инфликсимаб [200], паклитаксель [170]). Дальнейшие клинические исследования вышеуказанных веществ не проводили.

Поскольку изолированное применение тех или иных методов профилактики послеоперационного рубцевания зачастую оказывается недостаточно эффективным, было предложено комбинирование нескольких стратегий, в частности, насыщение антиглаукоматозных дренажей различными противовоспалительными и антипролиферативными препаратами.

Для повышения эффективности хирургического лечения глаукомы с применением гидрогелевых дренажей отечественные ученые неоднократно разрабатывали способы их насыщения противовоспалительными и антипролиферативными лекарственными средствами, в частности, ГКС, нестероидными противовоспалительными средствами, сульфатированными гликозаминогликанами, ММС, ингибиторами VEGF [17, 22, 70, 78, 79, 80, 88].

Была исследована возможность насыщения коллагенового имплантата комплексом цитокинов «Суперлимф» (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, TNF, TGF), оказывающим иммуномодулирующее действие. Дренаж обеспечивал высвобождение комплекса цитокинов в течение 24-48 часов, и согласно полученным авторами данным, применение коллагенового дренажа, насыщенного комплексом цитокинов, позволяет повысить эффективность микроинвазивной хирургии [84]. Однако гидрофильность материала не позволяет насыщать дренаж липофильными веществами.

Тахчиди Х.П. и соавторы в 2008 г. предложили насыщать дренаж на основе сшитого полигидроксиэтилметакрилата ММС путём его выдерживания в растворе данного цитостатика. Дренаж не подвергается биодеструкции и обеспечивает высвобождение ММС в течение нескольких месяцев, значительно повышая эффективность хирургического лечения глаукомы [81].



Тем не менее, несмотря на усилия научного сообщества, до сих пор не найдено достаточно эффективного, но в то же время безопасного способа предотвратить или значительно снизить интенсивность послеоперационного рубцевания в хирургии глаукомы.

### **1.3. Перспективы применения селективных иммунодепрессантов для коррекции избыточного рубцевания**

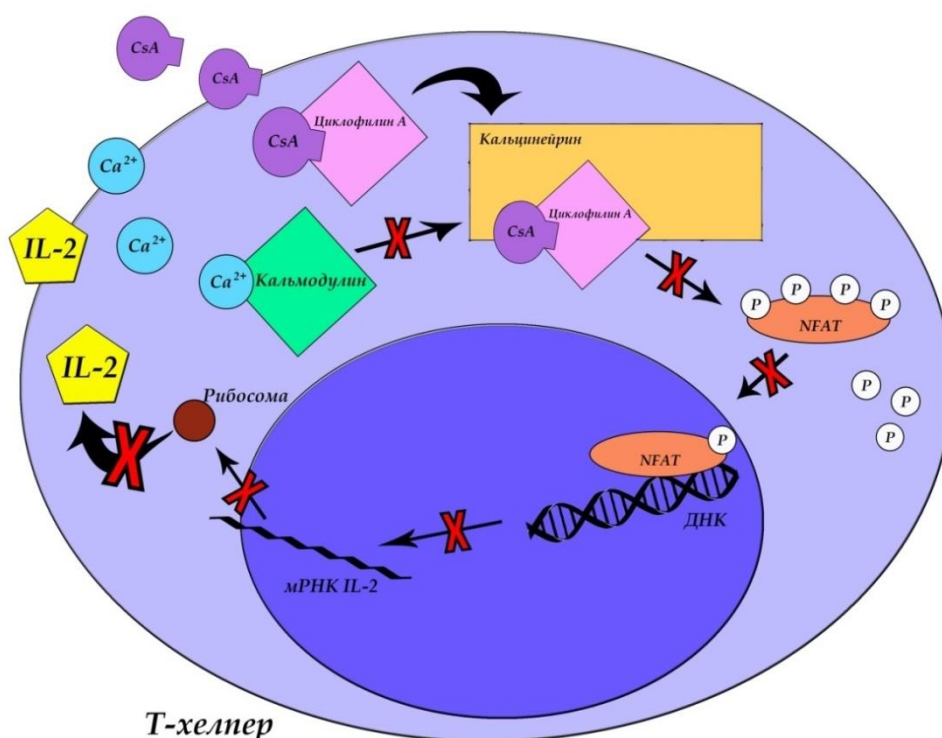
В настоящее время именно таргетное воздействие на различные звенья процесса рубцевания считается наиболее перспективной стратегией в коррекции заживления операционной раны в хирургии глаукомы и не только [140, 170, 220]. К одним из веществ, способных избирательно подавлять некоторые звенья из каскада воспаления и репарации, относятся иммунодепрессанты с избирательным механизмом действия.

Из препаратов данной группы разрешен к применению в офтальмологии лишь **циклоспорин А (ЦсА)**. ЦсА относится к ингибиторам кальцинейрина, является липофильным циклическим полипептидом и обладает противовоспалительным, иммуномодулирующим, антипролиферативным действием. Изначально ЦсА применяли в трансплантологии, в том числе и для предупреждения отторжения трансплантата роговицы. В дальнейшем широкое распространение нашло применение ЦсА в офтальмологии в качестве противовоспалительного средства, лишенного недостатков, характерных для местного применения ГКС (формирование катаракты, повышение ВГД). С 2003 года ЦсА стали успешно применять для лечения синдрома сухого глаза (ССГ). На сегодняшний день в офтальмологии ЦсА применяют при лечении увеитов, ССГ, весеннего катара, язвы Мооген, симпатической офтальмии, некротизирующего склерита, гранулематозной оптической нейропатии и некоторых других заболеваний, а также после проведения кератопластики [28, 132, 194].

ЦсА реализует иммуносупрессивное действие посредством ингибирования синтеза ИЛ-2 Т-лимфоцитами. Будучи липофильным, ЦсА проникает в цитоплазму Т-лимфоцитов через клеточную мембрану, где связывается со специфическими белками циклофилинами А (ЦфА) [47, 132, 171, 204]. Комплекс ЦсА/ЦфА изменяет свою конфигурацию, приобретая большее сродство к активным центрам серин/треонин

фосфатазы кальцинейрина, дефосфорилирующей ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) (Рисунок 2) [139, 183].

После дефосфорилирования NFAT проникает в ядро клетки, где инициирует транскрипцию генов цитокинов, в частности ИЛ-2. Сформированный под воздействием ЦсА комплекс ЦсА/ЦфА лишает кальцинейрин фосфатазной активности, блокируя его каталитическую и регуляторную субъединицы, в результате чего NFAT остается в неактивном фосфорилированном состоянии и не может проникнуть в ядро клетки для инициации синтеза ИЛ-2 (Рисунок 2) [114, 139, 171].



CsA – циклоспорин А

IL – интерлейкин

Ca<sup>2+</sup> - ионы кальция

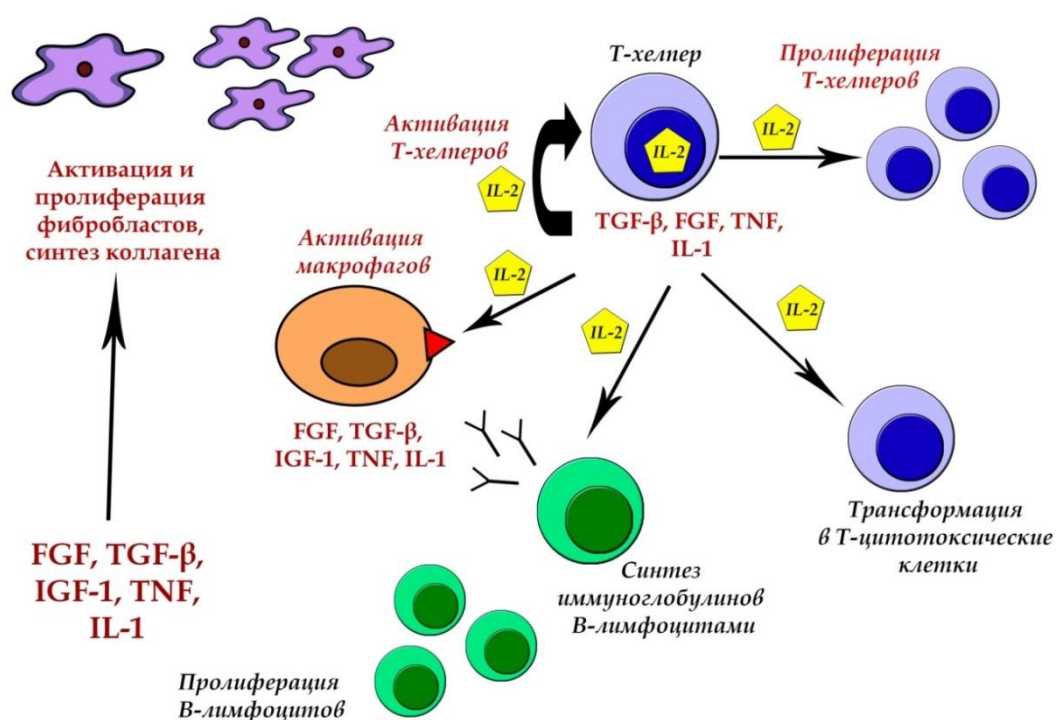
NFAT - дефосфорилирующей ядерный фактор активированных Т-клеток

P – ионы фосфора

Рисунок 2 – Механизм действия циклоспорина А  
(рисунок авторский)

ИЛ-2 – цитокин, характеризующийся сложным сигнальным каскадом. Рецепторы к ИЛ-2 обнаружены не только на иммунокомпетентных клетках, но и на других клетках, вовлеченных в процесс заживления раны, в том числе на кератиноцитах и фибробластах [124, 147, 167]. Ответ различных видов клеток на ИЛ-2 зависит, главным образом, от количества и типа рецепторов к ИЛ-2 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), а также от цитокинового микроокружения и наличия других сигнальных внутриклеточных молекул [124, 156]. ИЛ-2 стимулирует

процессы пролиферации и дифференцировки клеток в ране путем опосредованной активации сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR и MAPK. При этом происходит увеличение продукции провоспалительных цитокинов и хемоаттрактантов иммунокомпетентными клетками [124]. Исследования показали, что ИЛ-2 активирует секрецию и ответ клеток на ростовые факторы, такие как ИФН- $\gamma$ , стимулирующий синтез провоспалительного цитокина ИЛ-1, ИФН- $\alpha$ , способствующий росту эндотелиальных клеток и неангиогенезу, а также фактор роста фибробластов (FGF). ИЛ-2 ускоряет и активизирует процесс заживления раны путем прямого и опосредованного воздействия на фибробласты (Рисунок 3) [43, 90, 132, 152].



TGF- $\beta$  – трансформирующий фактор роста  $\beta$  FGF – фактор роста фибробластов  
 IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста-1 TNF – фактор некроза опухоли  
 IL – интерлейкин

Рисунок 3 – Влияние интерлейкина-2 (IL-2) на процессы рубцевания (рисунок авторский)

Через 10-14 дней с момента возникновения раны, предположительно, появляются молекулы-ингибиторы ИЛ-2, способствующие ослаблению воспалительной реакции, замедлению коллагенового кросслинкинга и ограничению избыточного формирования компонентов соединительной ткани [124].

Применение циклоспорина А, ингибирующего синтез ИЛ-2, для уменьшения интенсивности процессов послеоперационного рубцевания является патофизиологически оправданным.

Учеными из разных стран уже были выполнены попытки интра- и послеоперационного применения ЦсА в хирургии глаукомы.

Было проведено несколько исследований послеоперационного применения ЦсА в виде капель. Послеоперационные конъюнктивальные инстилляции 2% раствора ЦсА улучшали гипотензивный эффект дренажной хирургии глаукомы у кроликов при сроке наблюдения 2 месяца [178]. Исследования послеоперационного эпibuльбарного применения 0,05% эмульсии ЦсА у пациентов, подвергшихся хирургическому лечению глаукомы, показали противоречивые результаты. Ранние исследования на небольшой группе пациентов выявили положительный эффект ЦсА на исход гипотензивного вмешательства, выражавшийся в более низких значениях ВГД в исследуемой группе, а также морфологически подтвержденном угнетении активности фибробластов и более рыхлом расположении коллагеновых волокон в зоне операции [199]. Недавние исследования выявили незначительное влияние послеоперационных инстилляций 0,5% эмульсии ЦсА на уровень ВГД и функциональное состояние ФП, однако было отмечено, что применение ЦсА улучшало состояние глазной поверхности пациентов, уменьшая интенсивность симптомов ССГ и болей в оперированном глазу [130]. Невысокую эффективность ЦсА при данном способе применения можно объяснить его низкой концентрацией и ограниченной способностью к проникновению в зону операции через конъюнктиву и роговицу.

В эксперименте *in vivo* изучали интраоперационное применение ЦсА в виде однократной субконъюнктивальной инъекции в сравнении с аппликацией ММС и контрольной группой, прооперированной без лекарственных препаратов. При данном способе применения исходы гипотензивной хирургии животных, прооперированных с ЦсА, оказались близкими или даже чуть хуже результатов контрольной группы и намного уступали группе ММС. Основываясь на данных о механизме действия ЦсА и патофизиологии заживления послеоперационной раны, можно связать неудовлетворительный результат применения ЦсА в данном исследовании с недостаточной длительностью присутствия препарата в зоне вмешательства [158]. Согласно данным отечественного исследования *in vivo*, интраоперационная аппликация

ЦсА в течение 6 минут замедляла заживление ран конъюнктивы и склеры, уменьшая интенсивность репаративных процессов путем подавления клеточной миграции и пролиферации [40, 41, 42].

Также были предприняты попытки создания системы доставки лекарств с ЦсА для повышения эффективности хирургического лечения глаукомы. В эксперименте *in vivo* пролонгированное высвобождение ЦсА приводило к увеличению сроков функционирования ФП, уменьшению интенсивности неоангиогенеза и усилению гипотензивного эффекта операции [120]. Однако предложенная система доставки лекарств представляла собой трубчатый дренаж с присущими данному типу устройств недостатками.

Любой препарат, применяемый во время гипотензивного вмешательства, оказывает влияние на окружающие ткани в зоне его воздействия. Кроме того, есть небольшая вероятность его диффузии в переднюю камеру при выполнении проникающего вмешательства. Местное интраоперационное применение ЦсА не одобрено фармакологическими комитетами ввиду отсутствия официально зарегистрированных клинических исследований. Поэтому исследование возможности использования данного препарата при выполнении гипотензивных вмешательств требует определения безопасных для тканей глаза концентраций.

Было проведено несколько исследований по определению токсичности ЦсА в отношении клеток и тканей глаза [136, 180, 193]. Воздействие ЦсА в концентрации 5 мкг/мл и менее на клетки заднего эпителия роговицы в течение 7 дней не приводило к снижению жизнеспособности и митотической активности клеток. Стромальные клетки роговицы сохраняли свою жизнеспособность при гораздо больших концентрациях ЦсА – до 250 мкг/мл [136, 193]. Токсичность ЦсА в отношении клеток Chang конъюнктивы человека наблюдали при воздействии препарата в концентрации 50 мкг/мл и более в течение 90 минут. Не наблюдали цитотоксического эффекта ЦсА при длительном (в течение 7 дней) воздействии на клетки пигментного эпителия сетчатки и клетки Chang конъюнктивы в концентрации 5 и менее мкг/мл. Значительное подавление роста вышеуказанных культур клеток наблюдали при концентрации ЦсА 50 мкг/мл [136].

Большинство исследований подтвердило безопасность ЦсА для наиболее чувствительных к воздействию химических агентов клеток глазного яблока при его пролонгированном применении в концентрациях 5 мкг/мл и меньше. Однако не было

проведено исследований на культурах фибробластов теноновой капсулы человека, наиболее подверженных действию препарата при местном применении в хирургии глаукомы.

Перспективными в отношении профилактики послеоперационного рубцевания иммунодепрессантами избирательного действия являются также **ингибиторы механистической мишени рапамицина (mTOR)**.

mTOR – серин/треонин-киназа, относящаяся к семейству фосфатидил-инозитол-3 киназ (PIK3), один из центральных координаторов фундаментальных физиологических процессов эукариотических клеток, регулирующий их рост, пролиферацию и жизненный цикл [123,185,206]. Функционально и структурно mTOR состоит из двух белковых комплексов: mTOR комплекса 1 (mTORC1) и m-TOR комплекса 2 (mTORC2) [187, 208, 218]. Активация mTORC1 происходит в ответ на воздействие факторов роста (инсулина и инсулиноподобного фактора роста – 1), нутриентов (глюкозы, аминокислот), стресса (гипоксия, голодание, повреждение ДНК) в зависимости от энергетического статуса клетки и наличия кислорода [123, 133, 157, 206]. Одним из главных процессов, контролируемых mTORC1, является биосинтез белка, осуществляемый посредством фосфорилирования рибосомной S6 киназы (S6K) и связующего белка первого эукариотического фактора инициации 4E (4E-BP1), что, в свою очередь, инициирует синтез белка на уровне трансляции и транскрипции [92, 99, 208]. Кроме того, mTORC1 регулирует синтез липидов, необходимых для формирования биомембран пролиферирующими клетками [157, 206], а также координирует развитие клеточного цикла, в частности, переход клетки из фазы G1 в фазу S митоза [123, 187]. Отмечают роль mTORC1 в процессе ангиогенеза. В условиях гипоксии и воспаления mTORC1 активирует индуцируемый гипоксией фактор HIF-1 $\alpha$ , что приводит к усилению продукции VEGF [146, 192, 222]. В условиях недостатка нутриентов mTORC1 регулирует такой катаболический процесс как аутофагия и апоптоз [123, 157, 206]. Функции mTORC2 включают регуляцию выживания, роста и метаболизма клетки, а также организацию цитоскелета. При этом данный комплекс нечувствителен к присутствию нутриентов, но реагирует на факторы роста [123, 206].

С повышенной активностью mTOR связывают развитие более 80% злокачественных опухолей [126, 179, 214], некоторых заболеваний, связанных с избыточным ростом соединительной ткани (легочного, почечного, эпидурального

фиброза, птеригиума) [119, 125, 150, 161, 221], заболеваний сердечно-сосудистой системы (гипертрофической кардиомиопатии), сахарного диабета 2 типа, ожирения [157], нейродегенеративных заболеваний (болезни Альцгеймера, хореи Гентингтона) [71, 103, 187].

Именно поэтому mTOR рассматривают как терапевтическую мишень при лечении большого числа онкологических и фибропролиферативных заболеваний. Изучают применение ингибиторов mTOR, проявляющих иммунодепрессивные свойства за счет выраженного торможения пролиферации Т- и В-лимфоцитов, у пациентов, страдающих ревматическими заболеваниями, а также после трансплантации органов [92]. Антипролиферативные свойства ингибиторов mTOR применяют при лечении пациентов с ишемической болезнью сердца путем имплантации стентов с лекарственным покрытием ингибиторами mTOR для профилактики рестеноза [34, 72, 159, 174]. В последние годы проводится много исследований ингибиторов mTOR в профилактике фиброза. В ряде работ показано, что при заживлении ран отмечается гиперактивация сигнального пути mTOR [106, 142, 150, 166, 207, 212], и наоборот, нарушение заживления связано с его ингибированием [143, 145].

Вышеизложенные факторы доказывают, что mTOR является патогенетически обоснованной мишенью в терапии состояний, связанных с избыточной клеточной пролиферацией.

На данный момент единственным веществом, избирательно ингибирующим mTOR, является рапамицин (сиролимус) и его производные (эверолимус, зотаролимус, биолимус, новолимус, амфилимус) [34, 157]. Рапамицин (сиролимус) – противогрибковый метаболит, продуцируемый бактериями *Streptomyces hygroscopicus*. Изучение рапамицина выявило его иммунодепрессивные и антипролиферативные свойства [123]. Все ингибиторы mTOR обладают аналогичным механизмом действия. Препаратами с наиболее полноценно изученными фармакологическими свойствами и большим опытом клинического применения являются рапамицин (сиролимус) и эверолимус [34].

Эверолимус – аналог рапамицина, изначально разработанный как противоопухолевый агент. Аналогично рапамицину, эверолимус связывается с циклофилином FKBP-12 и ингибирует киназу mTOR. [141, 214].

Ингибиторы mTOR угнетают клеточный рост, главным образом, путем торможения mTORC1-индуцированного синтеза белков и липидов [46]. Ингибирование клеточной пролиферации происходит посредством торможения трансляции некоторых мРНК, в том числе ответственных за переход клетки из фазы G1 клеточного цикла в S-фазу [99, 160]. В нано-молярных дозах рапамицин и его производные ингибируют фосфорилирование S6K и вызывают замедление G1 фазы клеточного цикла путем ослабления TGF- $\beta$  опосредованного сигнального пути. Блокировка перехода клетки из фазы G1 в S фазу требует более высоких концентраций рапамицина. Инактивированный рапамицином комплекс mTORC1 становится неспособным адекватно фосфорилировать белок 4E-BP1 и препятствует последующему образованию комплекса инициации трансляции (eIF4F), один из компонентов которого, eIF4E, участвует в фосфорилировании белка ретинобластомы Rb, который в фосфорилированном состоянии высвобождает фактор транскрипции E2F, способствующий переходу клетки из фазы G1 в фазу S [33, 109, 160]. Посредством данного каскада реакций происходит остановка деления клеток в G1 фазе клеточного цикла.

Неоднократно было доложено о том, что ингибиторы mTOR замедляют заживление ран. Поскольку препараты данной группы нашли широкое применение в трансплантологии, многие исследователи обращали внимание на развитие осложнений, связанных с нарушением заживления послеоперационных ран у пациентов после пересадки почек, печени, сердца, получавших после вмешательства ингибиторы mTOR, в сравнении с другими группами иммунодепрессантов [122, 137, 154]. Данные наблюдения послужили стимулом к изучению влияния ингибиторов mTOR на заживление ран *in vivo*. Исследования показали, что как системное, так и местное применение ингибиторов mTOR вызывало значительное снижение прочности раны на разрыв, уменьшение плотности коллагеновых волокон, угнетение неоангиогенеза, что в итоге приводило к достоверному уменьшению площади и длины рубца [188, 207].

Многочисленными исследованиями доказана высокая клиническая эффективность применения стентов с лекарственным покрытием, обеспечивающих пролонгированное высвобождение ингибиторов mTOR, в отношении профилактики рестеноза, сопровождающегося избыточной репарацией, миграцией и пролиферацией гладкомышечных клеток сосудов, чрезмерным синтезом компонентов соединительной ткани в ответ на травму сосудистой стенки при имплантации стента [159]. Доказано, что



ингибиторы mTOR обладают более высоким антипролиферативным потенциалом в сравнении с цитостатиком паклитакселем, достоверно не отличаясь по эффективности внутри своей фармакологической группы [34, 174]. Эффект ингибиторов mTOR в профилактике рестеноза заключается в торможении миграции и пролиферации клеток неоинтимы, а также гладкомышечных клеток сосудов [72, 159]. При местной доставке ингибиторов mTOR не отмечено системного иммунодепрессивного действия [34].

Антипролиферативные свойства ингибиторов mTOR изучали и в офтальмологии. Согласно результатам исследований *in vitro*, применение рапамицина приводило к 60% ингибированию PDGF-индуцированной пролиферации фибробластов теноновой капсулы человека в концентрации 30 нг/мл и к 37% подавлению базовой пролиферативной активности фибробластов в концентрации 10 нг/мл. Препарат не оказывал цитотоксического действия в концентрациях 10-100 нг/мл [186]. Также применение рапамицина вызывало снижение пролиферативной активности фибробластов роговицы человека на 46%. При этом в исследуемых культурах был значительно снижен уровень маркера трансформации фибробластов в миофибробласты  $\alpha$ -SMA (17% SMA-позитивных клеток в исследуемой группе против 69% в контрольной). Рапамицин также снижал фибробласт-опосредованное сокращение коллагенового геля [173]. Применение эверолимуса в концентрации 0,1 мкг/мл приводило к ингибированию пролиферации клеток ретинального пигментного эпителия. Концентрация эверолимуса 10 мкг/мл дополнительно ингибировала миграцию клеток ретинального пигментного эпителия и значительно снижала экспрессию mTOR. При концентрации препарата 50 мкг/мл наблюдали явный цитотоксический эффект [153]. В эксперименте *in vivo* местное или системное применение рапамицина приводило к подавлению хориоидальной неоваскуляризации [209]. Также получены хорошие результаты местной аппликации рапамицина для профилактики фиброза при проведении фоторефракционной кератэктомии у крыс. Степень выраженности помутнения роговицы была значительно ниже в группе рапамицина в сравнении с контрольной и практически не отличалась от группы ММС. Авторы связали полученные результаты с уменьшением уровня апоптоза кератоцитов в исследуемых группах [163]. В другой экспериментальной модели фоторефракционной кератэктомии *in vivo* субконъюнктивальное применение рапамицина сразу после и через 2 недели после операции приводило к снижению выраженности индекса помутнения роговицы (0,75

против 2,17 в контрольной группе) [173]. Рапамицин также способствовал уменьшению неоваскуляризации и степени помутнения роговицы после химического ожога роговицы щелочью у крыс. Также в роговице животных группы рапамицина было снижено содержание TGF- $\beta$ 1 и ИЛ-6, а также наблюдалась сниженная экспрессия  $\alpha$ -SMA, отражающего трансформацию фибробластов в миофибробласты [190].

Антипролиферативный потенциал ингибиторов mTOR для профилактики рубцевания в хирургии глаукомы изучали *in vivo*. Интраоперационное применение сиролимуса продлевало эффект гипотензивной операции. При этом субконъюнктивальная имплантация лекарственной пленки с сиролимусом оказывала значительно больший и длительный эффект в сравнении с интраоперационной аппликацией того же препарата, что доказано с помощью данных регулярного офтальмологического осмотра животных, тонометрии, гистологических и иммуногистохимических методов [217]. Результаты применения сиролимуса в виде интраоперационной аппликации в концентрации 30 нг/мл при выполнении трабекулэктомии были сравнимы с результатами применения MMC. При этом количество фибробластов, мононуклеарных фагоцитов, а также уровни TGF- $\beta$ , FGF- $\beta$  и PDGF были значительно ниже в исследуемых группах в сравнении с контрольной [128]. На настоящий момент было проведено единственное исследование по оценке влияния эверолимуса на исходы фильтрующей хирургии глаукомы *in vivo*. Эверолимус применяли в виде однократной 3-минутной интраоперационной аппликации в концентрации 30 нг/мл. Время функционирования фильтрационной подушки было увеличено в группе эверолимуса в сравнении с группой MMC и контрольной группой. Также в группе эверолимуса наблюдали наиболее стабильный гипотензивный эффект операции и сниженную экспрессию таких факторов пролиферации как TGF- $\beta$ 1, MMP-2, MMP-9 и PCNA [112].

Таким образом, анализ литературных источников позволил сделать вывод, что иммунодепрессанты, обладающие селективным механизмом действия, в частности циклоспорин А и эверолимус, являются перспективными агентами в отношении профилактики послеоперационного рубцевания в хирургии глаукомы при условии разработки патофизиологически обоснованного способа их применения.

Основными клетками-мишенями данных препаратов являются Т-лимфоциты, которые хотя и присутствуют в ране в малых количествах с момента ее возникновения,

достигают пика своей концентрации лишь на 5-7 сутки после операционной травмы. Также именно в это время происходит значительный рост количества фибробластов и их коллаген-синтетической активности в ране. Поэтому минимальный срок доставки препаратов к зоне вмешательства должен составлять 7 дней. На данный момент не разработан способ доставки циклоспорина А и эверолимуса к зоне вмешательства, обеспечивающий пролонгированное местное действие данных препаратов в течение указанного интервала времени. Поэтому требует изучения возможность насыщения антиглаукоматозных дренажей селективными иммунодепрессантами как носителей, способных обеспечивать постепенное высвобождение лекарственных веществ из своей структуры.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Дизайн исследования

Диссертационная работа представляет собой серию экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo* (Таблица 2). Было изучено применение ингибитора кальцинейрина циклоспорина А и ингибитора mTOR эверолимуса для коррекции процессов избыточного рубцевания в гипотензивной офтальмохирургии как препаратов с наибольшим антипролиферативным потенциалом из группы иммунодепрессантов. Оба препарата обладают селективным механизмом действия, описанным в разделе 1.3 главы 1 настоящей диссертации.

Таблица 2 – Дизайн исследования

| <b>I. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ <i>IN VITRO</i></b>   |   |                         |                   |
|--|---|-------------------------|-------------------|
| <b>1. Разработка способа насыщения биорезорбируемых антиглаукоматозных дренажей циклоспорином А и эверолимусом</b>   |   |                         |                   |
| <i>Материал</i>  | <i>Структура</i>  | <i>Иммунодепрессант</i> | <i>Количество</i> |
| Дренажи на основе полилактида  | Пористая  | ЦсА                     | n=60              |
|  |   | Эверолимус              | n=60              |
|  | Микроволокнистая  | ЦсА                     | n=60              |
|  |   | Эверолимус              | n=45              |
| <b>2. Определение скорости десорбции иммунодепрессантов из материала полученных антиглаукоматозных дренажей</b>  |   |                         |                   |
| <i>Исследуемые образцы дренажей</i>  |   |                         | <i>Количество</i> |
| Пористый дренаж, насыщенный ЦсА  |   |                         | n=32              |
| Микроволокнистый дренаж, насыщенный ЦсА  |   |                         | n=8               |
| Пористый дренаж, насыщенный эверолимусом   |   |                         | n=20              |
| Микроволокнистый дренаж, насыщенный эверолимусом   |   |                         | n=10              |
| <i>Методы пунктов 1 и 2:</i>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Высокоэффективная жидкостная хроматомасс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС/МС)</li> <li>- Микровзвешивание</li> <li>- Построение математической модели</li> </ul> |                         |                   |
| <b>3. Получение первичных культур клеток фибробластов теноновой капсулы человека из донорского материала</b>   |   |                         |                   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Прижизненная биопсия образцов теноновой капсулы человека (n=7)</li> <li>- Культивирование по методике первичных эксплантатов</li> </ul> |   |                         |                   |

| <b>4. Определение антипролиферативной активности и токсичности селективных иммунодепрессантов в эксперименте на культурах фибробластов теновой капсулы человека</b>                                |  |                                    |  |
|--|--|------------------------------------|--|
|  | <i>Исследуемая группа 1 (n=25)</i>   | <i>Исследуемая группа 2 (n=30)</i> | <i>Группа контроля (n=10)</i>                              |
| <i>Препарат</i>  | Циклоспорин А  | Эверолимус                         | Питательная среда без добавления препарата                 |
| <i>Концентрация препарата в среде (мкг/мл)</i>   | 2,0 (n=5)  | 20 (n=5)                           | 0,0 (n=5)  |
|  | 1,0 (n=5)  | 15 (n=5)                           | Питательная среда без добавления препарата + ДМСО, 0,02 мл |
|  | 0,5 (n=5)  | 10 (n=5)                           |  |
|  | 0,2 (n=5)  | 5 (n=5)                            |  |
|  | 0,05 (n=5)   | 1 (n=5)                            | 0,0 (n=5)  |
|  |  | 0,5 (n=5)                          |  |
| <i>Методы:</i>   | - Окраска: трипановый синий, судан IV и гематоксилин Майера, Набор флуорофоров (Live/Dead Cell-Mediated Cytotoxicity Kit)<br>- Морфометрия                       |                                    |  |
| <b>II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ <i>IN VIVO</i></b>   |  |                                    |  |
| <b>1. Изучение влияния антиглаукоматозного консервант-содержащего препарата на состояние тканей глазной поверхности лабораторных животных</b>  |  |                                    |  |
| <i>Группа 1</i>  | Ежедневные инстилляции в конъюнктивальную полость комбинированного консервант-содержащего гипотензивного препарата ( $\beta$ -блокатор + аналог простагландинов) |                                    | 40 глаз  |
| <i>Группа 2 (контрольная)</i>  | Ежедневные инстилляции в конъюнктивальную полость 0,9% NaCl  |                                    | 12 глаз  |
| <i>Срок эксперимента</i>   | 3 месяца   |                                    |  |
| <i>Методы наблюдения</i>   |  |                                    | <i>Срок (сут.)</i>   |
| <i>Офтальмологический осмотр</i>   | Биомикроскопия   |                                    | 1, 7, 14, 28, 60, 90                                       |
|  | Фоторегистрация переднего отрезка  |                                    |  |
|  | Тест Ширмера I   |                                    |  |
|  | Офтальмоскопия   |                                    |  |
| <i>Гистологический</i>   | Окраска гематоксилин и эозин; гематоксилин и альциановый синий по Сиддмену.  |                                    | 90   |
| <b>2. Выполнение гипотензивной операции с применением насыщенных иммунодепрессантами биорезорбируемых антиглаукоматозных дренажей на основе полимолочной кислоты на экспериментальных животных</b> |  |                                    |  |
| <i>Группы</i>  | <i>Вмешательство</i>   |                                    | <i>Количество глаз</i>                                     |
| <i>Группа контроля</i>   | Гипотензивное вмешательство проникающего типа с  |                                    | 12   |

|  |   |   |
|--|---|---|
|  | имплантацией ненасыщенного антиглаукоматозного дренажа  |   |
| Группа ЦсА   | Гипотензивное вмешательство проникающего типа с имплантацией антиглаукоматозного дренажа, насыщенного циклоспорином А | 12  |
| Группа эверолимуса   | Гипотензивное вмешательство проникающего типа с имплантацией антиглаукоматозного дренажа, насыщенного эверолимусом    | 12  |
| <b>3. Оценка эффективности и безопасности коррекции избыточного рубцевания путем применения различных селективных иммунодепрессантов при моделировании гипотензивного вмешательства <i>in vivo</i></b> |   |   |
| Группа контроля  | Группа ЦсА  | Группа эверолимуса                                  |
| Методы наблюдения  |   | Срок (сут.)   |
| Офтальмологический осмотр  | Биомикроскопия  | До операции, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 28, 60, 90, 180 |
|  | Фоторегистрация переднего отрезка глаза   |   |
|  | Тонометрия  |   |
|  | Офтальмоскопия  |   |
| Гистологический  | Гематоксилин, эозин   | 7, 28, 180  |
|  | Гематоксилин, пикрофуксин   |   |
|  | Гематоксилин, пикросириус красный   |   |
| <b>III. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ</b>  |   |   |
| Программное обеспечение  |   | STATISTICA 12, MS Office Excel 2010                 |

## **2.2. Методы насыщения антиглаукоматозных дренажей селективными иммунодепрессантами**

Поскольку циклоспорин А и эверолимус являются липофильными веществами, имеющими крайне низкую растворимость в воде (30 мкг/мл и 1,63 мкг/мл при 25 °С соответственно), очень сложно добиться их сорбции большинством полимерных материалов, используемых при изготовлении антиглаукоматозных дренажей. Анализ литературы позволил сделать вывод, что наиболее подходящим для данных целей материалом является полимолочная кислота. Главным преимуществом дренажей на основе данного полимера в контексте нашего исследования является гидрофобность, обеспечивающая способность дренажа сорбировать липофильные лекарственные вещества, а также препятствовать клеточной адгезии. Дренажи на основе полимолочной кислоты обладают наиболее оптимальным периодом биodeградации (4-8 месяцев),

достаточным для оказания антипролиферативного эффекта, но при этом не слишком избыточным, при котором может наблюдаться инкапсуляция и кальцификация дренажа. Кроме того, доказано, что антиглаукоматозные дренажи на основе полимолочной кислоты обладают наибольшей биосовместимостью и ареактивностью [23, 24, 76, 85, 87].

Учитывая вышеизложенные данные, биорезорбируемый антиглаукоматозный дренаж на основе полимолочной кислоты (ООО «Хайбитек», Россия) был выбран в качестве платформы для насыщения ЦсА и эверолимусом. Была исследована способность двух моделей дренажа, имеющих одинаковый химический состав, но разную физическую структуру, к сорбции иммунодепрессантов: пористой модели с размерами пор 30-50 мкм и микроволокнистой, изготовленной по технологии Biospin.

Разработку способа насыщения антиглаукоматозных дренажей селективными иммунодепрессантами проводили на базе лаборатории физико-химических методов анализа строения вещества Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

### **2.2.1. Методы определения способности дренажей к сорбции селективных иммунодепрессантов**

Для выявления способности вышеуказанных моделей к сорбции ЦсА образцы дренажей в виде полосок стандартных размеров 10,4 мм × 2 мм × 75 мкм выдерживали в разведениях концентрата для приготовления раствора для внутривенных инфузий с содержанием действующего вещества 50 мкг/мл (Сандиммун, Novartis Pharma, Швейцария, далее - концентрат) в убывающих концентрациях. Исследовали следующие разведения концентрата сбалансированным солевым раствором (BSS): 1:0 (50,0 мг/мл), 1:1 (25,0 мг/мл), 1:2 (16,6 мг/мл), 1:4 (10,0 мг/мл), 1:7 (6,3 мг/мл), 1:15 (3,1 мг/мл) и 1:30 (1,6 мг/мл).

Образцы дренажей выдерживали в растворах с вышеуказанными концентрациями ЦсА в течение 5, 10, 15 и 30 минут. Для каждого разведения ЦсА и для каждого времени экспозиции исследовали по 5 образцов дренажей. По истечении времени экспозиции дренажи извлекали из растворов, промокали фильтровальной бумагой и высушивали в вакуум-сушильном шкафу при 30°C.

Поскольку концентрат ЦсА, помимо действующего вещества, содержит вспомогательные, необходимые для его растворения в воде (полиоксиэтилированное касторовое масло в количестве 650 мг/мл и этанол 96% в количестве 278 мг/мл), с высокой точностью определить содержание ЦсА в образцах дренажей по приросту массы невозможно. Поэтому дренажи подвергали измельчению и определяли содержание ЦсА в образцах методом высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) на хроматографической системе Prelude SPLC (Thermo Fisher Scientific, США), сопряженной с тройным квадрупольным масс-спектром TSQ Endura (Thermo Fisher Scientific, США). Хроматографический анализ выполняли в градиентном режиме на колонке Accucore PFP (Thermo Fisher Scientific, США). Подвижную фазу А представляла собой вода с 0,1% раствором муравьиной кислоты, подвижную фазу В – ацетонитрил с 0,1% раствором муравьиной кислоты. Исследование проводили в режиме мониторинга множественных реакций. Калибровочные растворы были изготовлены из 10 мг навески порошка циклоспорина А (98,5%, Sigma-Aldrich, США). Образцы исследуемых дренажей помещали в 1,5 мл смеси ацетонитрила и воды в соотношении 1:1. Затем вышеуказанные растворы разбавляли в 100 раз и проводили хромато-масс-спектрометрию (Рисунок 4).

Ввиду высокой гидрофобности и отсутствия растворимой лекарственной формы эверолимуса, для насыщения пористой и микроволокнистой моделей дренажа на основе полимолочной кислоты данным иммунодепрессантом предварительно получали 1%, 2% и 3% суспензию препарата. Для этого порошок эверолимуса (>95%, Sigma-Aldrich, США) тонко измельчали, необходимое его количество помещали в физиологический раствор и воздействовали ультразвуковыми волнами мощностью 630 Вт частотой 22 кГц в течение 0,5-1,0 минуты с помощью ультразвукового диспергатора И100-6/1 (ООО «Инлаб», Россия). Образцы дренажей взвешивали на микровесах (NETZSCH-Gerätebau GmbH, Германия). В полученную суспензию помещали образцы дренажей и воздействовали ультразвуковыми волнами с вышеуказанными параметрами в течение 2-8 минут в случае насыщения пористой модели и 2-5 минут в случае микроволокнистой. Далее дренажи извлекали из суспензии, промокали фильтровальной бумагой и высушивали в вакуум-сушильном шкафу при 30 °С. Для выявления количества сорбированного эверолимуса образцы дренажей повторно взвешивали на микровесах. Количество сорбированного эверолимуса определяли по приросту массы дренажа.



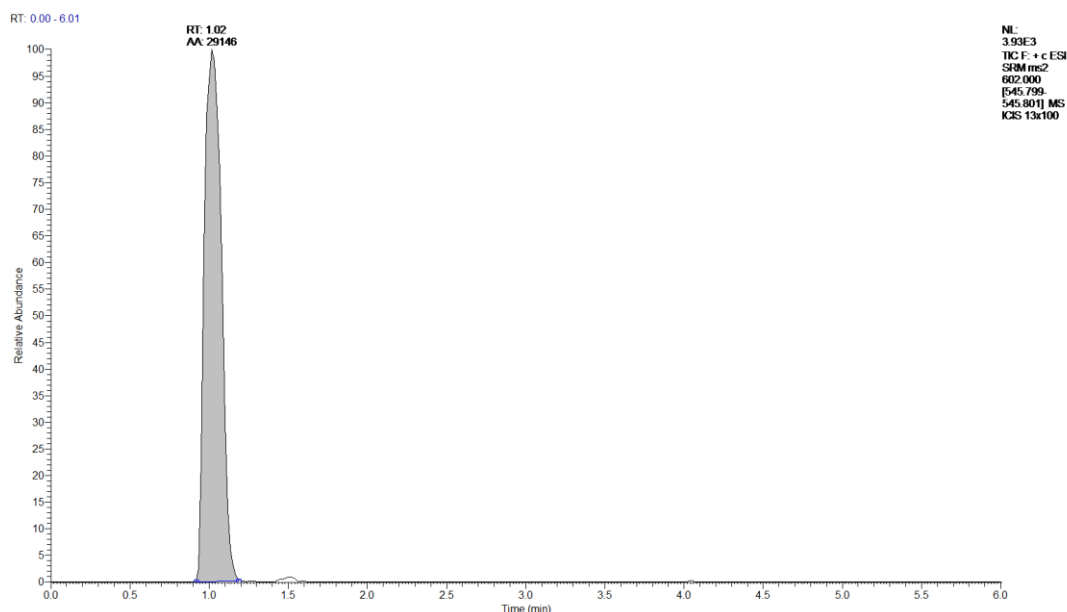


Рисунок 4 – Определение концентрации ЦсА в образцах дренажей методом высокоэффективной жидкостной хромато-масс спектрометрии. Хроматограмма

### 2.2.2. Методы исследования десорбции селективных иммунодепрессантов из материала дренажей

Для определения динамики высвобождения циклоспорина А и эверолимуса из дренажей *in vitro* создавали экспериментальные условия, моделирующие зону операции после гипотензивного вмешательства. За скорость оттока ВГЖ принимали среднее значение согласно данным литературы – 3 мл/сутки. Образцы дренажей выдерживали в закрытых емкостях с BSS соответствующего объема (0,75 мл в случае определения концентрации за 6 часов и 3 мл в случае определения концентрации за сутки) в шейкере-инкубаторе ES-20/60 (Biosan, Латвия) при температуре 37 °С (50-60 оборотов/мин). Через каждые 6 часов в течение 1 суток и через каждые 24 часа в последующий период времени дренажи извлекали из растворов и перемещали в новые для продолжения эксперимента. Концентрацию ЦсА определяли с помощью ВЭЖХ-МС по методике, описанной в разделе 2.2.1 настоящей главы. При этом ввиду невозможности определения исходного количества ЦсА непосредственно в дренажах без их разрушения, для его определения использовали по 3 дополнительных дренажа, которые насыщали в заданных условиях и затем определяли количество сорбированного ЦсА с помощью ВЭЖХ-МС. За исходное значение принимали среднее арифметическое.

Для определения концентрации эверолимуса дренажи взвешивали на микровесах до и после вымывания в растворе.

Концентрацию (С) рассчитывали по формуле:

$C = \Delta m / V$ , где

$\Delta m$  – разность масс дренажа до и после экспозиции в растворе,

$V$  – объем раствора, равный оттоку ВГЖ за заданный промежуток времени.

### **2.3. Методы определения эффективности и безопасности пролонгированного применения селективных иммунодепрессантов *in vitro***

В доступной на сегодняшний день литературе не опубликовано исследований по определению концентраций циклоспорина А и эверолимуса, оказывающих прямой антипролиферативный эффект на фибробласты теноновой капсулы человека – основных клеток, подвергающихся действию препаратов при выполнении гипотензивных вмешательств, что обусловило необходимость проведения данного этапа исследования.

Серию экспериментальных исследований *in vitro* на культурах клеток проводили в соответствии со стандартом ISO 5 на базе лаборатории культур клеток биотехнологического центра «БиоТех» ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России в лаборатории культур клеток биотехнологического отдела, оснащенной комплексом «чистых помещений» класса Б с возможностью создания зон класса А.

#### **2.3.1. Методика получения первичных культур клеток**

В ходе выполнения данного этапа исследования была разработана технология получения первичных культур фибробластов из донорских образцов теноновой капсулы человека.

Для получения первичных культур образцы теноновой капсулы человека (7 образцов, размер 2 × 2 мм) были изъяты у пациентов ГБУЗ СОКОБ им. Т.И. Ерошевского путем прижизненной биопсии во время выполнения хирургического лечения заболеваний глаз после получения добровольного информированного согласия и одобрения Комитетом по биоэтике при СамГМУ и локальным этическим комитетом ГБУЗ СОКОБ им. Т.И. Ерошевского. Доноры ранее не

подвергались хирургическому лечению офтальмологической патологии, не страдали хроническими инфекционными, онкологическими заболеваниями, сахарным диабетом, не получали гормональную терапию, цитостатики и другие лекарственные вещества, влияющие на пролиферативную активность клеток. Транспортировку донорского материала осуществляли в стерильном пенициллиновом флаконе, наполненном физиологическим раствором.

Материал был извлечен из транспортировочного флакона стерильным пинцетом и перенесен в лабораторную чашку Петри со стерильным раствором Хенкса. Транспортировочный флакон со средой помещали в термостат на 24 часа для проведения теста на стерильность. Через 24 часа признаков контаминации и микробного обсеменения не было выявлено ни в одном случае.

После трехкратной отмывки фрагментов теноновой капсулы от крови и слизи приступали к механическому измельчению материала. Отработанный раствор отбирали стерильными пипетками и проводили ферментативную обработку донорского материала раствором коллагеназы из поджелудочной железы краба 0,1% в течение 1 минуты. Инактивировали действие фермента стерильным раствором Версен 0,02% (реактивы ООО «Биолот», Россия).

Клетки были получены по методике первичных эксплантатов, описанной К.Н. Гринбергом [25, 32], с использованием полной ростовой среды (среда 199 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «Биолот») и 40 мкг/мл гентамицина в CO<sub>2</sub> –инкубаторе MCO-18AC (Sanyo – Incubator, MCO-18 A, Япония) при 5% CO<sub>2</sub>, температуре 37 °С и постоянной влажности. Обследование методом полимеразной цепной реакции показало отсутствие контаминации культуры инфекционными агентами, в том числе микоплазмами и цитомегаловирусом.

### 2.3.2. Определение антипролиферативной активности и цитотоксичности циклоспорина А и эверолимуса

Фибробласты теноновой капсулы человека высевали на дно лунок 96-луночных культуральных планшетов в дозе  $2 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> и культивировали в стандартных условиях с использованием полной ростовой среды. При достижении 80% конфлуентности монослоя из лунок отбирали культуральную среду и заменяли ее свежей, в состав которой вводили препарат.

Для получения исследуемых питательных сред группы ЦсА в образцы добавляли концентрат данного препарата (Сандиммун, Novartis Pharma, Швейцария) до получения требуемых концентраций препарата: 0,05 мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл и 2 мкг/мл.

Для получения питательной среды с требуемой концентрацией эверолимуса, использовали его порошок (>95%, Sigma Aldrich, США), который предварительно разводили в 0,02 мл диметилсульфоксида (ДМСО) (ООО «Биолот», Россия) до получения следующих концентраций препарата в питательной среде: 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 15 мкг/мл и 20 мкг/мл.

Планшеты помещали в СО<sub>2</sub>-инкубатор при постоянной влажности и температуре. Культивирование производили в течение 7 дней.

Группой контроля служила культура фибробластов теноновой капсулы человека в полной ростовой питательной среде без добавления лекарственных препаратов в эксперименте с ЦсА и без добавления препаратов, но с внесением 0,02 мл ДМСО в серии исследований с эверолимусом.

В каждой серии эксперимента использовали по 5 повторов культур клеток для каждой группы.

Ежедневно производили визуальную оценку и фоторегистрацию культуры с помощью аппаратно-программного комплекса (АПК) на основе инвертированного микроскопа Olympus CKX 41 («Olympus», Япония) при увеличении  $\times 100$  и  $\times 200$  с использованием программного обеспечения CellSens Standart 1.7 («Olympus», Япония). Оценивали структурные особенности клеток и монослоя в целом, считали количество клеток на 1 мм<sup>2</sup>.

По окончании эксперимента монослой окрашивали витальным красителем трипановым синим по стандартной методике с целью выявления клеток с поврежденными мембранами. Раствор трипанового синего не проникает через неповрежденные клеточные мембраны, поэтому окрашивание ядра в синий цвет свидетельствует о нарушении жизнеспособности клетки. Равномерно интенсивно окрашенные клетки считают нежизнеспособными. Для выявления внутриклеточных липидных включений и общей оценки структуры монослоя применяли гистологическую окраску суданом IV и гематоксилином Майера. С помощью окраски набором флуорофоров («Live/Dead Cell-Mediated Cytotoxicity Kit», Invitrogen, США) определяли жизнеспособные клетки, характеризовавшиеся зеленой флуоресценцией и поврежденные клетки с красной флуоресценцией ядер. Принцип действия флуоресцентных красителей аналогичен описанному выше: через неповрежденные мембраны живых клеток может проникнуть лишь компонент набора, характеризующийся зеленым свечением ( $\text{DiOC}_{18}$ ), в то время как второй компонент (пропидия йодид) проникает в клетку лишь при условии повреждения мембраны. В клетке пропидия йодид проникает в ядро, где связывается с ДНК, что и обуславливает красное свечение ядер поврежденных клеток. Анализ окрашенных препаратов, фоторегистрацию и морфометрию производили с помощью АПК на основе исследовательского микроскопа Olympus BX41 («Olympus», Япония), с использованием программного обеспечения «Морфология 5.2» («ВидеоТест», Россия) и CellSens Standart 1.7 («Olympus», Япония) при увеличении  $\times 100$ ,  $\times 200$  и  $\times 400$ .

Пролиферативную активность и жизнеспособность клеток характеризовали на основании следующих показателей: плотность монослоя, индекс пролиферации, время удвоения культуры, количество удвоений, доля поврежденных клеток в монослое, ядерно-цитоплазменное соотношение.

**Плотность монослоя** (количество клеток на  $1 \text{ мм}^2$ ) считали в нативных препаратах с использованием программного обеспечения CellSens Standart 1.7 («Olympus», Япония).

Формулы, по которым производили расчет показателей, представлены ниже:

**Индекс пролиферации (PI):**  $PI = N_t/N_1$ ,

**Время удвоения культуры (DT):**  $DT = t \times \lg 2 / \lg(N_t/N_1)$ ,

**Количество удвоений культуры (PDL):**  $PDL = (\lg(N_t) - \lg(N_1)) / \lg 2$ , где

$N_1$  – плотность клеток в монослое через 24 часа после посадки клеток,

$N_t$  – количество клеток монослоя на момент определения показателя.

$t$  – время роста культуры (часы),

**Ядерно-цитоплазменное отношение (ЯЦС):**  $ЯЦС = S_N/S_c$ , где

$S_N$  – площадь ядра,

$S_c$  – площадь цитоплазмы.

В окрашенных гематоксилином и суданом IV препаратах с использованием программного обеспечения CellSens Standart 1.7 определяли площадь клетки и её ядра ( $S_N$ ). Для получения площади цитоплазмы ( $S_c$ ) из 1-го показателя вычитали 2-й.

#### 2.4. Методы проведения эксперимента *in vivo*

Экспериментально-морфологическое обоснование эффективности и безопасности применения биорезорбируемых антиглаукоматозных дренажей, насыщенных циклоспорином А и эверолимусом проводили на базе биотехнологического центра «БиоТех» и Института экспериментальной медицины и биотехнологии СамГМУ в соответствии с Хельсинкской конвенцией о гуманном обращении с экспериментальными животными (1975 г.), Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.), приказом Минздрава России №199н от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Проведение эксперимента одобрено комитетом по биоэтике при СамГМУ.

Эксперимент выполнен на 52 глазах половозрелых кроликов породы советская шиншилла весом 3,0-4,0 кг. Животным не выполняли моделирование глаукомы, т.к. традиционные методы моделирования сами по себе воздействуют на оболочки и дренажную систему глаза, провоцируя избыточный рост соединительной ткани на структурах угла передней камеры, либо изначально изменяя интенсивность воспаления и репарации, оцениваемых в ходе исследования. Экспериментальное моделирование глаукомы могло бы исказить полученные результаты и привести к невозможности дифференцировать изменения, вызванные препаратами для моделирования глаукомы, от изменений, вызванных

иммунодепрессантами, предлагаемыми для профилактики послеоперационного рубцевания.

#### **2.4.1. Методы исследования влияния антиглаукоматозного препарата на состояние глазной поверхности лабораторных животных**

Большинство пациентов, направляемых на хирургическое лечение глаукомы, в течение длительного времени находятся на гипотензивной терапии антиглаукоматозными препаратами, которые оказывают значительное влияние на состояние тканей глазной поверхности и ухудшают исходы операции [63, 65, 105, 197]. Поэтому для изучения влияния ЦсА и эверолимуса на процессы послеоперационного рубцевания *in vivo* в условиях, максимально приближенных к реальной клинической практике, первым этапом лабораторным животным выполняли длительные инстилляции консервант-содержащего комбинированного гипотензивного препарата.

Группу 1 составили 40 глаз 40 кроликов, которым в течение 3 месяцев до операции выполняли ежедневные однократные инстилляции комбинированного препарата, содержащего  $\beta$ -блокатор тимолола малеат 0,5% и аналог простагландинов латанопрост 0,005%, в состав которого входит консервант бензалкония хлорид в концентрации 0,1 мг/мл (Pfizer, США). Контрольную группу 2 составили 12 глаз 12-ти кроликов, которым ежедневно выполняли инстилляцию 0,9% раствора натрия хлорида.

Кроликам выполняли офтальмологическое обследование, включавшее в себя биомикроскопию на ручной щелевой лампе (SHIN NIPPON XL-1, Япония), пробу Ширмера I с использованием полосок Fluo Strips (Contacare Ophthalmics and Diagnostics, Индия), фоторегистрацию переднего отрезка глаза. Вышеперечисленные исследования проводили непосредственно перед выполнением эксперимента, а также на 14, 28, 60 и 90 сутки.

Выраженность конъюнктивальной гиперемии оценивали в баллах по шкале от 0 до 3 (Таблица 3). Повреждение роговичного эпителия оценивали по шкале Эфрона после окрашивания роговицы флуоресцеином и биомикроскопии с кобальтовым фильтром (Таблица 4).

На 90-е сутки проводили гистологическое исследование конъюнктивы, склеры и роговицы 4-х глаз в каждой группе. Вывод животных из эксперимента осуществляли

путем передозировки препаратов для наркоза. Для выполнения гистологического исследования глаза животных энуклеировали по следующей методике: выполняли циркулярный разрез конъюнктивы в 1 см от лимба, выделяли и пересекали наружные мышцы глаза, после чего пересекали зрительный нерв у мобилизованного глазного яблока. Удаленное глазное яблоко помещали в раствор нейтрального формалина 10% на 24 часа. Далее для гистологического исследования иссекали блок тканей переднего отрезка, содержащий роговицу, радужку, область лимба и прилежащие оболочки глазного яблока с конъюнктивой и теноновой капсулой. Иссеченный блок тканей подвергали стандартной гистологической проводке и фиксировали в парафине.

Гистологические срезы толщиной 6 мкм были изготовлены с помощью микротомы (МС-2, Россия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также альциановым синим по Сидмену с дополнительной окраской ядер гематоксилином Майера. Анализ полученных гистологических препаратов выполняли с помощью системы визуализации на базе микроскопа (Olympus BX 41, Германия) и программы «Морфология 5.2» («ВидеоТест», Россия).

Таблица 3 – Оценка выраженности конъюнктивальной гиперемии

| Баллы | Интерпретация        |
|-------|----------------------|
| 0     | Нет гиперемии        |
| 1     | Слабовыраженная      |
| 2     | Средней степени      |
| 3     | Выраженная гиперемия |

Таблица 4 – Оценка степени повреждения роговичного эпителия по шкале Эфрона

| Баллы | Интерпретация               |
|-------|-----------------------------|
| 0     | Окрашивания нет             |
| 1     | Следы окрашивания           |
| 2     | Слабое окрашивание          |
| 3     | Окрашивание средней степени |
| 4     | Выраженное окрашивание      |

#### 2.4.2. Техника выполнения гипотензивного вмешательства *in vivo*

Данный этап исследования выполнен на 36 глазах кроликов из группы 1 предыдущего этапа исследования. Всем животным выполняли модель гипотензивного вмешательства проникающего типа с имплантацией биорезорбируемого пористого дренажа на основе полимолочной кислоты (Рисунок 4). При выполнении вмешательств на глазах контрольной группы имплантировали дренаж, не насыщенный лекарственными препаратами. Глаза группы ЦсА оперировали с применением дренажа, насыщенного циклоспорином А *ex tempore*, а глаза группы эверолимуса – с

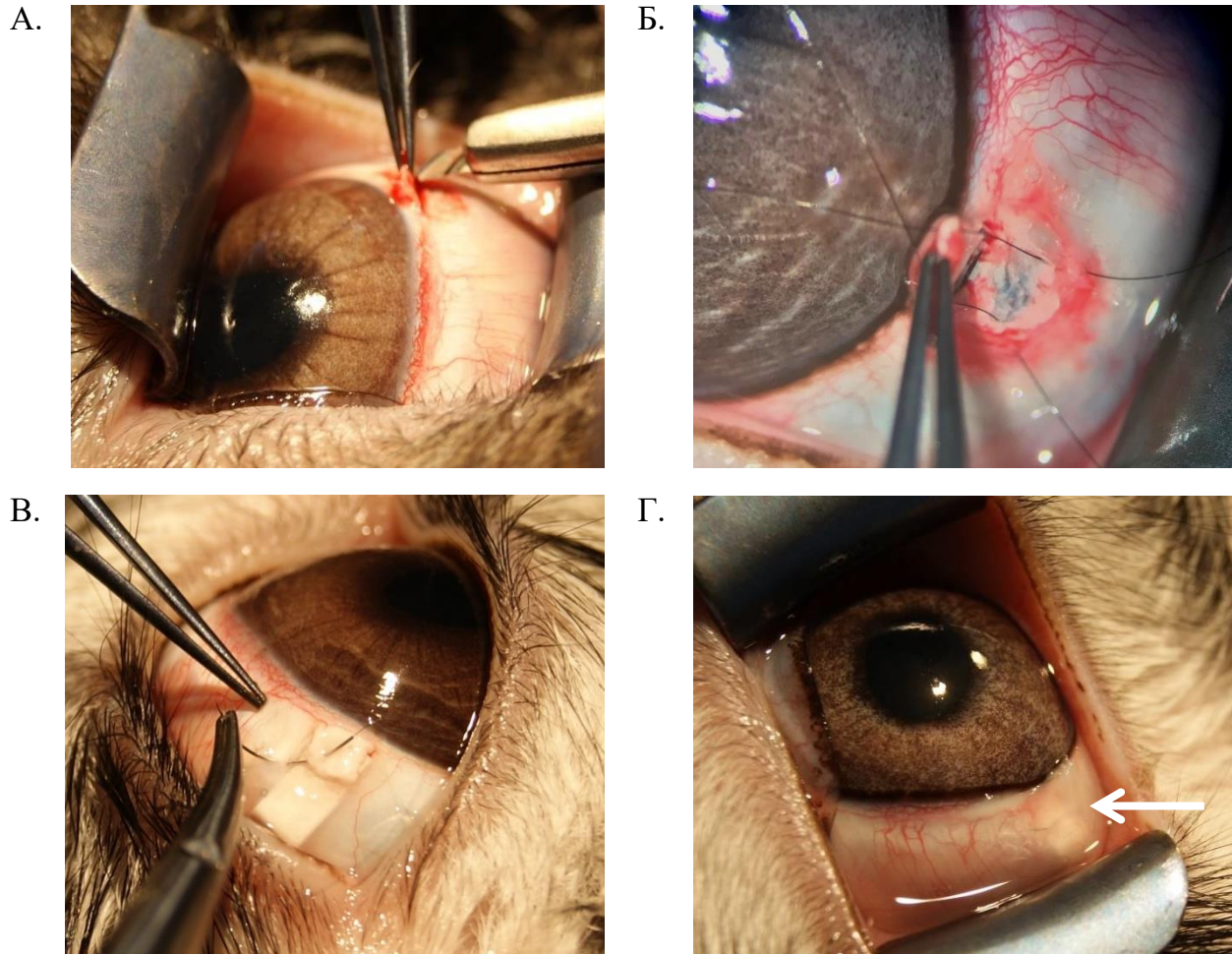


имплантацией дренажа, предварительно насыщенного данным препаратом в лабораторных условиях перед стерилизацией.

Гипотензивное вмешательство проводили с применением внутримышечного наркоза комбинированным препаратом, содержащим тилетамин гидрохлорид 5% и золазепам 5% (Золетил 100, Virbac Sante Animale, Франция), и ксилазина гидрохлоридом 2% (Рометар, Bioveta, a. s., Чехия) в соответствии с массой животных. Операционное поле обрабатывали 5% раствором повидон-йода (Бетадин, ЭГИС, Венгрия). Разрез конъюнктивы производили параллельно лимбу в 1 мм от него. Конъюнктиву и тенонову капсулу отсепаровывали от подлежащих тканей. Выкраивали склеральный лоскут основанием к лимбу размерами  $3 \times 3$  мм на  $2/3$  толщины склеры до прозрачных слоев роговицы (Рисунок 5 А, Б). Выделяли и иссекали склеральный блок с трабекулой размерами  $0,5 \times 3,0$  мм. Выполняли базальную иридэктомию. Под склеральный лоскут имплантировали пористый биорезорбируемый антиглаукоматозный дренаж на основе полилактида, выполненный в форме муфты размером  $5,2 \times 2$  мм толщиной 150 мкм. С целью профилактики прорезывания в послеоперационном периоде, дренаж имплантировали длинной осью перпендикулярно лимбу в сложенном состоянии, чтобы дистальная его часть находилась под поверхностным склеральным лоскутом, а проксимальная выходила на поверхность склеры выше склерального лоскута и находилась под конъюнктивой и теноновой капсулой (Рисунок 5 В, Г).

При проведении вмешательства кроликам группы ЦсА дренаж предварительно погружали в раствор, полученный из концентрата ЦсА для приготовления раствора для внутривенных инфузий в разведении с BSS в соотношении 1:30 на 15 минут. Перед имплантацией дренаж промокали стерильной фильтровальной бумагой. Кроликам группы эверолимуса имплантировали пористый дренаж на основе полимолочной кислоты, предварительно насыщенный эверолимусом в лабораторных условиях с помощью ультразвукового воздействия (мощность 630 Вт частота 22 кГц) на образец, помещенный в 2% суспензию эверолимуса в физиологическом растворе, в течение 6 минут. Далее дренаж подвергали высушиванию и стерилизации. Кроликам контрольной группы имплантировали пористый дренаж, не содержащий лекарственных препаратов. Поверхностный склеральный лоскут ушивали двумя узловыми швами нитью нейлон 10/0. Разрез конъюнктивы и теноновой капсулы герметично ушивали узловыми швами нитью нейлон 10/0. В оперированный глаз закапывали комбинированный препарат

ципрофлоксацина гидрохлорида 0,3% и дексаметазона 0,1% (Комбинил, Sentiss Pharma Pvt. Ltd., Индия) сразу после операции, а также 4 раза в день в послеоперационном периоде в течение 1 недели.



А. Отсепаровка склерального лоскута;

Б. Склеральный лоскут отсепарован, ткань трабекулы обнажена;

В. Дренаж имплантирован длинной осью перпендикулярно лимбу, фиксация склерального лоскута;

Г. Фильтрационная подушка после операции. Визуализируется дренаж (стрелка).

Рисунок 5 – Ход операции

### **2.4.3. Методы гистологического исследования зоны операции**

Животных выводили из эксперимента через 7 дней, 1 месяц и после полной визуальной резорбции дренажа (6 месяцев). Выбор данных сроков обусловлен патофизиологическими процессами, протекающими в послеоперационной ране: на 5-7 дни после повреждения наблюдается пик концентрации Т-лимфоцитов, являющихся основными клетками-мишенями действия ЦсА и эверолимуса; через 1 месяц заканчивается клеточная пролиферация и наиболее активная фаза синтеза коллагена, и начинается ремоделирование синтезированной соединительной ткани; исследование тканей после полной резорбции дренажа позволяет изучить послеоперационный рубец на заключительных этапах его формирования. Эвтаназию, энуклеацию глаз и изготовление гистологических срезов производили согласно методике, описанной в разделе 2.4.1 настоящей диссертации. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, гематоксилином и пикрофуксином по Ван Гизону, гематоксилином и пикросириусом красным. Анализ полученных гистологических препаратов выполняли с помощью системы визуализации на базе микроскопа (Olympus BX 41, Германия) и программы «Морфология 5.2» (ВидеоТесТ, г. Санкт-Петербург, Россия). В статистический анализ включали репрезентативные срезы каждого глаза с визуализацией дренажа в слоях склеры и между теноновой капсулой и эписклерой. Оценивали клеточный состав (мононуклеары, гигантские клетки инородных тел (ГКИТ), гранулоциты, фибробласты) и количество новообразованного коллагена внутри дренажа, толщину и плотность капсулы вокруг дренажа, количество новообразованных кровеносных сосудов, выраженность пространств для оттока ВГЖ. Вышеперечисленные параметры оценивали в баллах по шкале от 0 до 5 согласно межгосударственному стандарту оценки биологического действия медицинских изделий [31].

### **2.4.4. Методы послеоперационного обследования животных**

Перед операцией, а также в течение всего послеоперационного периода (на 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 28, 60, 90, 180 сутки) до вывода животных из эксперимента осуществляли офтальмологическое обследование, включавшее в себя биомикроскопию на ручной щелевой лампе (SHIN NIPPON XL-1, Япония), офтальмоскопию с помощью

офтальмоскопа (Welch Allyn 11720, США), тонометрию с использованием портативного ветеринарного тонометра Tonovet (Tiolat, Финляндия), фоторегистрацию переднего отрезка глаза. При биомикроскопии оценивали реакцию тканей на оперативное вмешательство, состояние конъюнктивы, морфологию фильтрационной подушки по оценочной шкале фильтрационных подушек университета Индианы (IBAGS), состояние роговицы, передней камеры (ее глубину и прозрачность влаги), радужной оболочки и хрусталика.

## **2.5. Методы статистической обработки полученных результатов.**

Создание базы данных, статистическую обработку и графическое изображение полученных результатов производили с помощью программного обеспечения STATISTICA 12.0 (StatSoft Inc., США) и MS Excel 2010 (Microsoft Corporation, США).

Гипотезу о нормальном распределении исследуемых выборок проверяли с помощью критериев Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса и Шапиро-Уилка. Также производили анализ гистограмм распределения. Поскольку полученные данные имели распределение, отличное от нормального, при анализе результатов использовали непараметрические методы статистики. В тексте диссертации результаты представлены в виде значений  $Me$  ( $Q_1$ ;  $Q_3$ ), где  $Me$  – медиана,  $Q_1$  и  $Q_3$  – 1-й и 3-й квартили соответственно. При сравнении двух независимых групп между собой использовали критерий Манна-Уитни, при сравнении трех и более групп – критерий Краскела-Уоллиса. При сравнении двух зависимых выборок применяли критерий Уилкоксона, при наличии 3 и более зависимых выборок – критерий Фридмана. При проведении корреляционного анализа применяли определение коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Для построения математических моделей использовали метод множественной нелинейной регрессии. При этом качество полученных математических моделей оценивали с помощью коэффициента детерминации  $R^2$ . Математическую модель считали удовлетворительной при  $R^2 > 0,8$ . Статистическую значимость при оценке количества осложнений вмешательств в сравниваемых группах оценивали с помощью критерия  $\chi^2$  с поправкой Йейтса.

Результаты считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ПОДГОТОВКИ АНТИГЛАУКОМАТОЗНЫХ ДРЕНАЖЕЙ

Целью данной главы явилась разработка способа предоперационной подготовки антиглаукоматозных дренажей на основе полимолочной кислоты путем их насыщения селективными иммунодепрессантами.

Для достижения данной цели необходимо было решить следующие задачи:

- Произвести оценку способности дренажей на основе полимолочной кислоты к сорбции циклоспорина А;
- Определить динамику высвобождения циклоспорина А из материала дренажа в эксперименте *in vitro*;
- Определить способность дренажей на основе полимолочной кислоты к сорбции эверолимуса;
- Определить динамику десорбции эверолимуса из материала дренажей *in vitro*.

#### 3.1. Оценка способности дренажей к сорбции циклоспорина А

Помещение микроволокнистой и пористой моделей биорезорбируемого дренажа на основе полимолочной кислоты в неразбавленный концентрат ЦсА приводило к мгновенному набуханию и нарушению структуры дренажа, вероятно, ввиду воздействия высокой концентрации этанола на полилактид (концентрация этанола в неразбавленном концентрате 26,7%). В разведениях концентрата ЦсА с BSS в соотношениях 1:1 и 1:3 также происходила деформация и пластификация образцов. Нарушения физико-химических свойств дренажей не наблюдали при их выдержке в разведениях концентрат: BSS = 1:7 и более. При этом изначальная наибольшая концентрация вспомогательных веществ (этанола и полиоксиэтилированного касторового масла) в растворе составила 3,3% и 8,1%, соответственно, что заведомо меньше указанных в литературе токсических концентраций при местном применении в офтальмологии [151, 196]. Количество ЦсА, сорбированного образцами дренажей из растворов в разведениях 1:7, 1:15 и 1:30 с разной продолжительностью насыщения, представлено в Таблице 5.

Таблица 5 – Количество сорбированного образцами дренажей ЦсА при условии насыщения в растворах с различными концентрациями препарата в течение 5-30 минут, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

| Разведение<br>(концентрат ЦсА :<br>BSS) | Время выдержки<br>дренажа, мин. | Кол-во сорбированного ЦсА, мкг |                   |
|---|---------------------------------|--------------------------------|-------------------|
|   |                                 | Пористый                       | Микроволокнистый  |
| 1:7                                     | 5                               | 1,35 (1,33; 1,37)              | 1,02 (1,01; 1,03) |
|   | 10                              | 3,56 (3,55; 3,57)              | 2,13 (2,12; 2,15) |
|   | 15                              | 4,75 (4,74; 4,76)              | 3,21 (3,19; 3,23) |
|   | 30                              | 4,79 (4,75; 4,80)              | 3,25 (3,22; 3,26) |
| 1:15                                    | 5                               | 1,87 (1,86; 1,88)              | 0,93 (0,93; 0,95) |
|   | 10                              | 3,12 (3,12; 3,15)              | 1,54 (1,52; 1,55) |
|   | 15                              | 4,45 (4,43; 4,45)              | 2,86 (2,83; 2,88) |
|   | 30                              | 4,45 (4,45; 4,46)              | 2,89 (2,87; 2,91) |
| 1:30                                    | 5                               | 1,37 (1,35; 1,38)              | 0,41 (0,40; 0,43) |
|   | 10                              | 2,95 (2,93; 2,96)              | 1,07 (1,03; 1,08) |
|   | 15                              | 3,87 (3,86; 3,89)              | 2,12 (2,10; 2,12) |
|   | 30                              | 3,91 (3,89; 3,91)              | 2,13 (2,12; 2,15) |

Получена высокая воспроизводимость результатов с минимальным разбросом значений внутри каждой группы дренажей, соответствующим погрешности ВЭЖХ-МС, благодаря чему стала возможной разработка высокоточной математической модели зависимости количества сорбированного ЦсА от времени экспозиции дренажей и концентрации раствора. Согласно полученной модели сорбция ЦсА дренажом в большей степени зависела от времени экспозиции, чем от исходной концентрации раствора (коэффициент корреляции Спирмена 0,76 против 0,18 для пористой модели и 0,74 против 0,40 для микроволокнистой).

Уравнения регрессии для двух моделей дренажей имели следующий вид:

Для пористой модели ( $R^2 = 0,9741$ ,  $p < 0,001$ , Рисунок 6):

$$z = -23,8075 - 0,4622 * x - 0,0475 * y + 44,3610 / x - 1,7346 / y + 28,0143 * \log_{10}(x)$$

Для микроволокнистой модели ( $R^2 = 0,9861$ ,  $p < 0,001$ , Рисунок 7):

$$z = -36,6453 - 0,5774 * x + 0,0072 * y + 75,2260 / x - 2,0294 / y + 37,1894 * \log_{10}(x), \text{ где}$$

$z$  – количество сорбированного дренажом ЦсА, мкг;

$x$  – время экспозиции дренажа в растворе в минутах;

$y$  – концентрация ЦсА в растворе, мкг/мл.

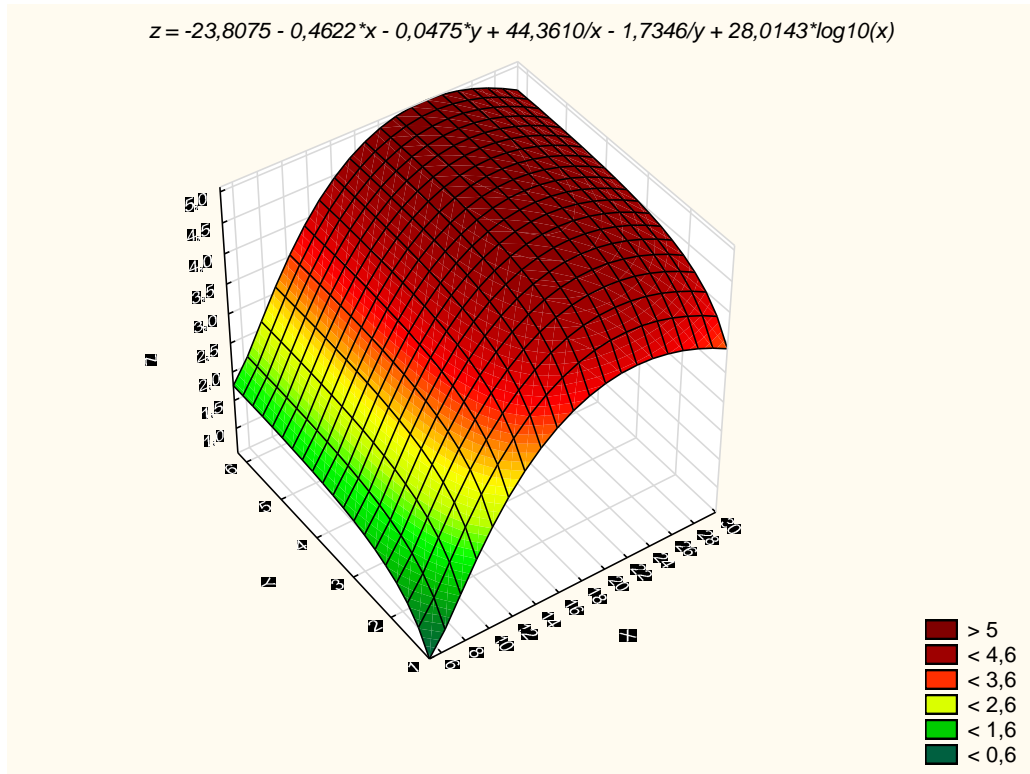


Рисунок 6 – 3D график зависимости количества сорбированного ЦсА ( $z$ ) на дренаже пористой модели от времени экспозиции ( $x$ ) и концентрации раствора для насыщения ( $y$ )

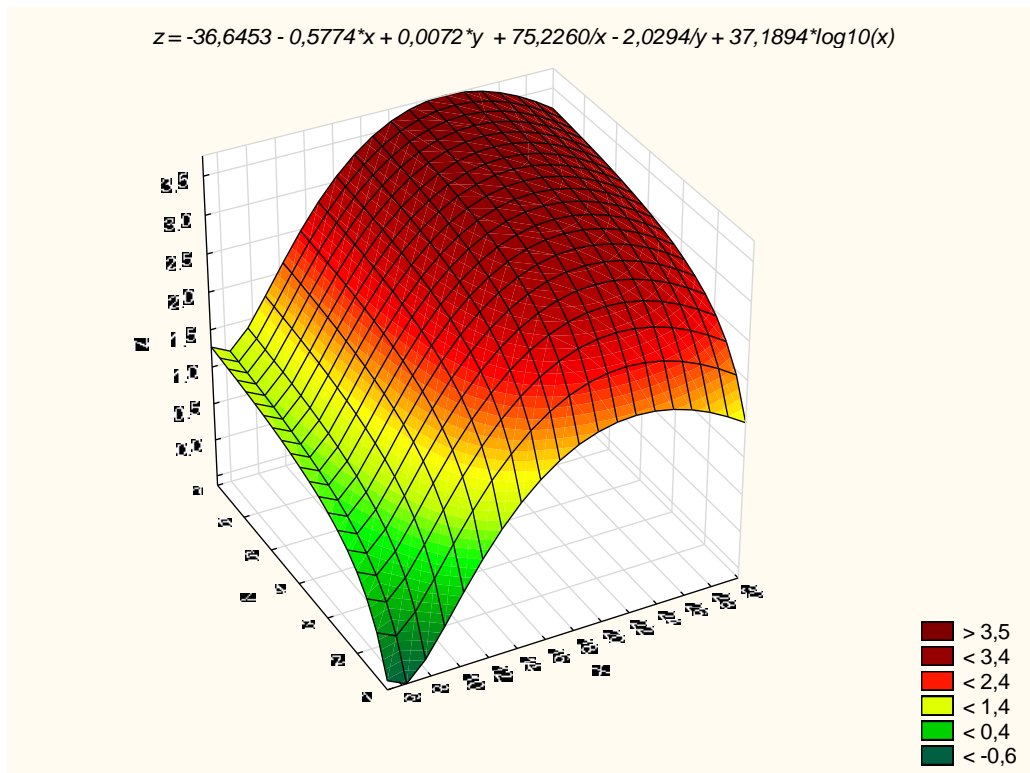


Рисунок 7 – 3D график зависимости количества сорбированного ЦсА ( $z$ ) на дренаже микроволоконистой модели в зависимости от времени экспозиции ( $x$ ) и концентрации раствора для насыщения ( $y$ )

Согласно полученным математическим моделям, увеличение количества сорбированного ЦсА происходит в прямой нелинейной зависимости от времени в интервале 5-22 минуты для пористой и 5-23 минуты для микроволокнистой моделей. Дальнейшая экспозиция дренажа в растворе не приводит к увеличению сорбции ЦсА дренажами, что подтверждено в эксперименте, в ходе которого выявлено, что статистически достоверной разницы между количеством ЦсА при насыщении в течение 15 и 30 минут не наблюдается.

В результате расчетов по математической модели максимально возможная сорбция ЦсА пористым дренажом составила 5,07 мкг, а микроволокнистой – 3,71 мкг (Приложение 1). Согласно эмпирически полученным данным, в среднем, пористые модели дренажей сорбировали на  $43,8 \pm 12,9\%$  препарата больше, чем микроволокнистые при аналогичных условиях насыщения. Максимально возможная сорбция препарата отличалась на  $32,1 \pm 0,8\%$  в пользу пористой модели.

### 3.2. Оценка динамики десорбции циклоспорина А из дренажей

Аналізу динаміки десорбції ЦсА підвергали образці, сорбовані препаратом в кількості 3,5 мкг і більше з кроком 0,5 мкг згідно з розрахунками, отриманими в ході попереднього етапу дослідження (Приложение 1). Даним умовам відповідали 4 варіанти насичення пористого дренажа і 1 – микроволокнистого. Досліджували по 5 образців кожного варіанта (Таблиця 6).

Таблиця 6 – Характеристики отобраних для аналізу десорбції ЦсА образців дренажів

| Образец | Структура дренажа | Разведение, концентрат : BSS | Время насыщения, мин | Прогнозируемое кол-во ЦсА, мкг | Исходное кол-во ЦсА, мкг (Me (Q <sub>1</sub> ; Q <sub>3</sub> )) |
|---------|-------------------|------------------------------|----------------------|--------------------------------|--|
| 1       | Пористый          | 1:7                          | 20                   | 5                              | 4,95 (4,93; 5,00)  |
| 2       | Пористый          | 1:30                         | 22                   | 4,5                            | 4,47 (4,43; 4,55)  |
| 3       | Пористый          | 1:30                         | 15                   | 4,0                            | 3,93 (3,85; 4,01)  |
| 4       | Пористый          | 1:20                         | 11                   | 3,5                            | 3,41 (3,38; 3,45)  |
| 5       | Волокнистый       | 1:10                         | 23                   | 3,7                            | 3,55 (3,52; 3,65)  |



Результаты определения динамики десорбции ЦсА из образцов дренажей представлены в Таблице 7 и в виде графика на Рисунке 8.

Таблица 7 – Динамика изменения концентрации ЦсА при его десорбции из дренажей, насыщенных в различных условиях.

| Срок  | Концентрация ЦсА, мкг/мл (Me (Q <sub>1</sub> ; Q <sub>3</sub> )) |                    |                   |                    |                    |
|-------|--|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
|       | Образец 1  | Образец 2          | Образец 3         | Образец 4          | Образец 5          |
| 6 ч.  | 1,51 (1,44; 1,53)*   | 1,30 (1,30; 1,33)* | 0,73 (0,68; 0,77) | 0,69 (0,67; 0,74)  | 1,50 (1,43; 1,63)* |
| 12 ч. | 1,29 (1,24; 1,35)*   | 0,93 (0,89; 1,07)* | 0,69 (0,63; 0,75) | 0,53 (0,47; 0,59)* | 1,11 (1,07; 1,11)* |
| 18 ч. | 0,47 (0,45; 0,57)  | 0,43 (0,32; 0,44)  | 0,53 (0,42; 0,53) | 0,51 (0,51; 0,57)  | 0,81 (0,79; 0,91)* |
| 24 ч. | 0,49 (0,46; 0,52)  | 0,51 (0,49; 0,53)  | 0,55 (0,51; 0,57) | 0,36 (0,33; 0,37)* | 0,44 (0,40; 0,63)  |
| 2 д.  | 0,23 (0,22; 0,23)*   | 0,24 (0,21; 0,27)  | 0,26 (0,24; 0,26) | 0,26 (0,25; 0,27)  | 0,14 (0,13; 0,20)* |
| 3 д.  | 0,13 (0,11; 0,13)*   | 0,12 (0,12; 0,15)  | 0,10 (0,10; 0,10) | 0,08 (0,08; 0,10)  | 0,05 (0,04; 0,06)* |
| 4 д.  | 0,14 (0,13; 0,14)  | 0,12 (0,08; 0,13)  | 0,12 (0,10; 0,12) | 0,14 (0,14; 0,15)* | 0,00 (0,00; 0,00)* |
| 5 д.  | 0,08 (0,07; 0,09)  | 0,08 (0,07; 0,10)  | 0,09 (0,09; 0,09) | 0,11 (0,08; 0,12)  | 0,00 (0,00; 0,00)* |
| 6 д.  | 0,06 (0,05; 0,07)  | 0,08 (0,07; 0,08)  | 0,07 (0,06; 0,07) | 0,04 (0,04; 0,05)* | 0,00 (0,00; 0,00)* |
| 7 д.  | 0,05 (0,04; 0,05)  | 0,05 (0,05; 0,05)  | 0,05 (0,05; 0,05) | 0,03 (0,03; 0,04)* | 0,00 (0,00; 0,00)* |
| 8 д.  | 0,02 (0,02; 0,03)  | 0,02 (0,01; 0,02)  | 0,02 (0,01; 0,02) | 0,01 (0,00; 0,01)* | 0,00 (0,00; 0,00)* |

\* p<0,05 в сравнении с образцом №3

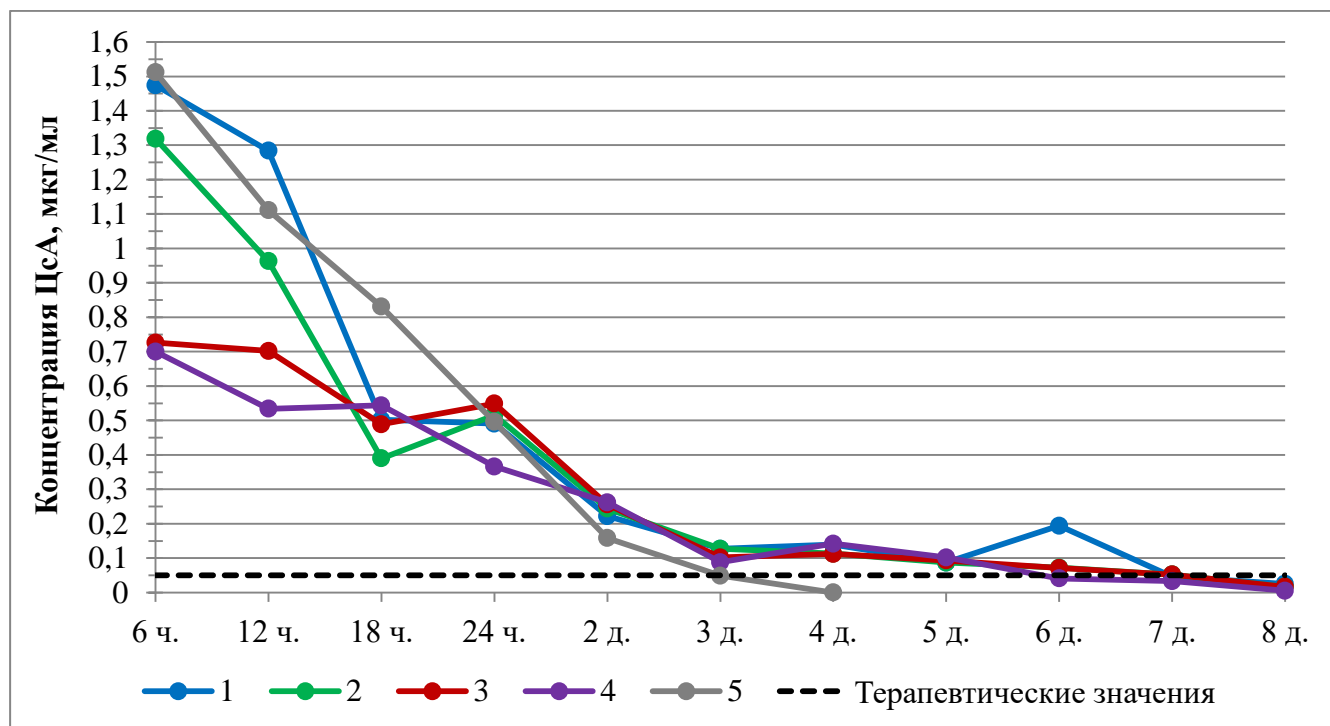


Рисунок 8 – Динамика десорбции ЦсА из исследованных образцов дренажей. Вид и исходное количество ЦсА в дренажах (Me): 1 – пористые (1 – 4,95 мкг; 2 – 4,47 мкг; 3 – 3,93 мкг; 4 – 3,41 мкг); 5 – микроволокнистый, 3,55 мкг

При анализе динамики десорбции ЦсА из образцов, содержащих 4,5 мкг ЦсА и более (образцы 1 и 2), отмечали неравномерное высвобождение препарата: в первые 6 часов эксперимента наблюдали высокую скорость десорбции ЦсА с пиком концентрации в пределах 1,3-1,5 мкг/мл. Далее десорбция ЦсА замедлялась и, начиная с 18 часов от начала эксперимента, высвобождаемые концентрации препарата сравнивались с остальными исследуемыми дренажами.

Образцы под номерами 3 и 4 характеризовались наиболее равномерным и постепенным высвобождением ЦсА без выраженных пиков концентрации препарата. Однако концентрация ЦсА, высвобождаемая из образца 4, уже к 6-му дню составляла, в среднем, 0,04 мкг/мл, что ниже терапевтических значений (0,05 мкг/мл). Концентрация ЦсА в образце под номером 3 сохранялась в пределах терапевтических значений в течение полных 7 дней и была достоверно больше в сравнении с образцом 4 в 1, 4 и с 6 по 8 дни наблюдения. Не было выявлено статистически достоверной разницы между концентрациями ЦсА, высвобождаемыми из образцов 1, 2 и 3 с 18 часов по 8-й день эксперимента, что свидетельствует об их сходной эффективности в данные сроки.

Микроволокнистый дренаж (образец 5) характеризовался достоверно большей скоростью десорбции ЦсА из своего материала и достигал концентраций ниже терапевтических уже через 3 дня от начала эксперимента. Данный срок действия препарата заведомо недостаточен для оказания антипролиферативного эффекта в зоне гипотензивного вмешательства.

### **3.3. Оценка способности дренажей к сорбции эверолимуса.**

Результаты насыщения биорезорбируемых дренажей на основе полилактида эверолимусом с помощью ультразвукового воздействия представлены в Таблице 8.

Таблица 8 – Количество эверолимуса, сорбируемого образцами дренажей при различных условиях насыщения, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

| Концентрация суспензии, % | Пористая модель      |                          | Микроволокнистая модель |                          |
|---------------------------|----------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                           | Время насыщения, мин | Сорбция эверолимуса, мкг | Время насыщения, мин    | Сорбция эверолимуса, мкг |
| 1%                        | 2                    | 131,6 (127,8; 135,3)     | 2                       | 108,9 (105,7; 110,5)     |
| 2%                        |                      | 154,3 (152,2; 156,8)     |                         | 134,2 (132,5; 136,8)     |
| 3%                        |                      | 165,8 (162,3; 167,2)     |                         | 138,1 (135,6; 140,3)     |
| 1%                        | 4                    | 155,3 (154,8; 158,9)     | 3                       | 152,1 (148,7; 154,1)     |
| 2%                        |                      | 223,3 (229,4; 227,8)     |                         | 182,3 (180,7; 183,4)     |
| 3%                        |                      | 240,2 (235,7; 241,7)     |                         | 182,1 (177,2; 182,7)     |
| 1%                        | 6                    | 215,3 (210,7; 216,4)     | 5                       | 155,2 (150,3; 156,8)     |
| 2%                        |                      | 244,5 (241,8; 245,3)     |                         | 186,9 (185,2; 187,5)     |
| 3%                        |                      | 248,2 (247,8; 250,6)     |                         | 186,7 (186,2; 187,1)     |
| 1%                        | 8                    | 240,2 (235,7; 242,8)     |                         |                          |
| 2%                        |                      | 245,3 (243,1; 247,5)     |                         |                          |
| 3%                        |                      | 247,3 (247,2; 249,1)     |                         |                          |

На основании полученных данных, которые характеризовались высокой воспроизводимостью, разработали математические модели зависимости количества сорбируемого эверолимуса от времени.

Уравнение регрессии для пористой модели ( $R^2=0,915$ ,  $p<0,001$ , Рисунок 9):

$$z = 313,294 - 61,762/y - 253,488/x$$

Уравнение регрессии для микроволокнистой модели ( $R^2=0,9814$ ,  $p<0,001$ ,

Рисунок 10):

$$z = 702,244 - 130,609 \cdot \log_{10}(y) - 138,514/y - 390,817 \cdot \log_{10}(x) - 678,916/x, \text{ где}$$

$z$  – количество сорбированного эверолимуса на дренаже,

$x$  – время воздействия ультразвуковых волн,

$y$  – концентрация суспензии эверолимуса.

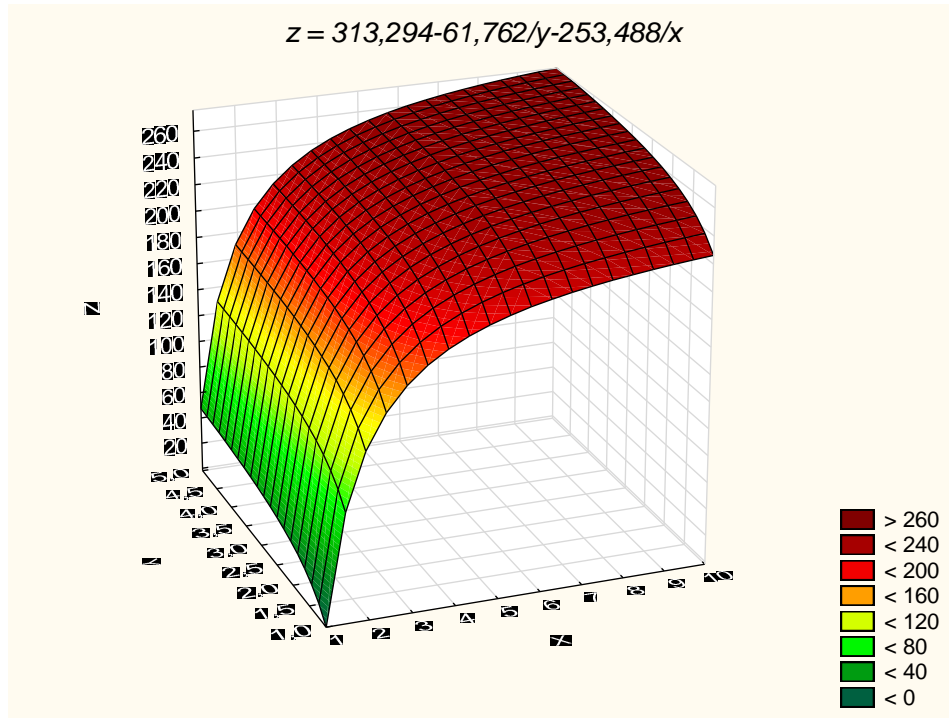


Рисунок 9 – 3D график зависимости количества сорбированного эверолимуса пористой моделью дренажа ( $z$ ) от концентрации суспензии ( $y$ ) и времени воздействия ультразвуковых волн частотой 22 кГц при мощности 630 Вт ( $x$ )

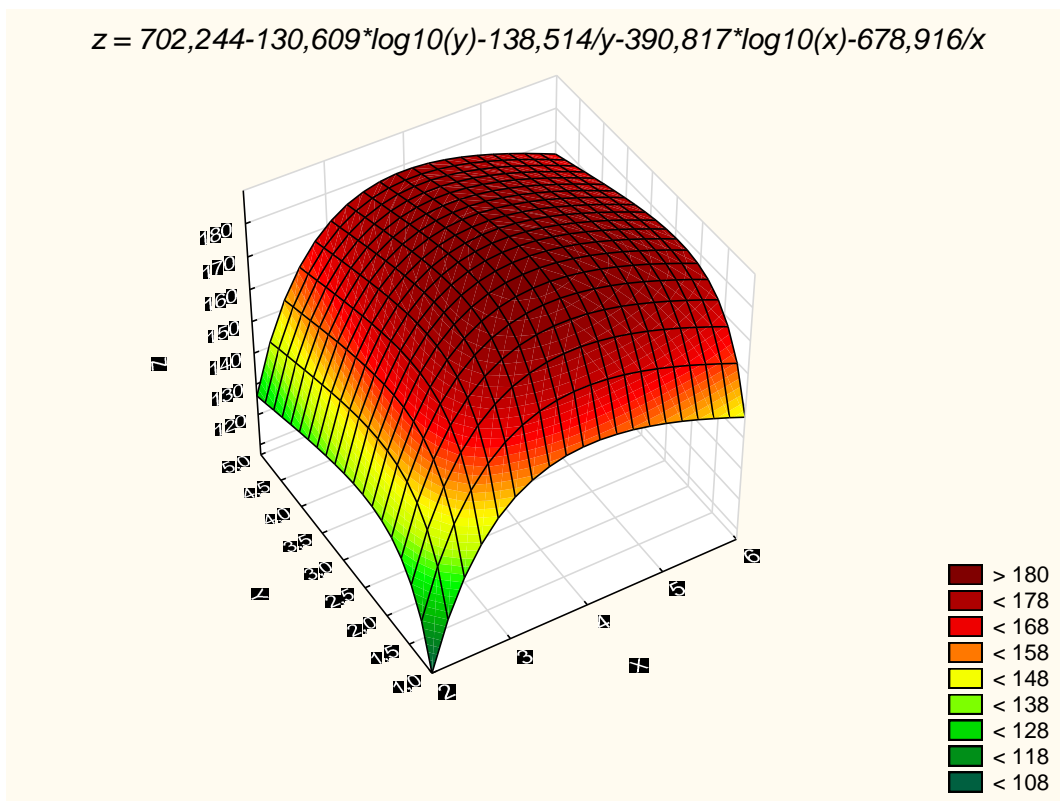


Рисунок 10 – 3D график зависимости количества сорбированного эверолимуса микроволокнистой моделью дренажа ( $z$ ) от концентрации суспензии ( $y$ ) и времени воздействия ультразвуковых волн частотой 22 кГц при мощности 630 Вт ( $x$ )

При насыщении биорезорбируемых дренажей на основе полилактида эверолимусом наблюдали нелинейное увеличение сорбции препарата с увеличением времени воздействия ультразвуковыми волнами (коэффициент корреляции Спирмена 0,83 для пористой модели и 0,66 для микроволокнистой) и концентрации суспензии, в которую помещали дренаж (коэффициент корреляции Спирмена 0,39 для пористой модели и 0,46 для микроволокнистой). Согласно полученной математической модели, максимальная сорбция эверолимуса происходила в течение первых 6 минут в случае насыщения пористых дренажей и 4 минут в случае микроволокнистых. Более продолжительное воздействие не приводило к увеличению количества сорбированного препарата. При этом максимально возможное количество иммунодепрессанта, сорбируемое микроволокнистой моделью, согласно полученной математической модели, составляло 191,9 мкг против 261,0 мкг, прогнозируемых для пористых дренажей (Приложение 2). Данные, полученные эмпирически, отличались от предсказанных моделью значений не более чем на 5%, что свидетельствует о высокой точности прогнозирования количества сорбируемого дренажами эверолимуса. Максимально возможная сорбция эверолимуса пористыми дренажами превосходила сорбцию микроволокнистыми на  $24,6 \pm 0,6\%$ .

### **3.4. Оценка динамики десорбции эверолимуса из дренажей**

Для анализа динамики десорбции эверолимуса из материала дренажа исследовали модели с максимальным накоплением препарата. Для анализа отбирали модели, сорбировавшие 160 и более мкг эверолимуса с шагом 40 мкг для пористой модели и сорбировавшие более 150 мкг с шагом 30 мг для микроволокнистой согласно расчетам, полученным в ходе предыдущего этапа исследования (Приложение 2).

Данным условиям соответствовали 3 варианта насыщения пористого дренажа и 2 – микроволокнистого. Исследовали по 5 образцов каждого варианта (Таблица 9).

Таблица 9 – Характеристики отобранных для анализа десорбции эверолимуса образцов дренажей

| Образец | Структура дренажа | Концентрация суспензии, % | Время насыщения, мин | Прогнозируемое кол-во эверолимуса, мкг | Исходное кол-во эверолимуса, мкг (Me (Q <sub>1</sub> ; Q <sub>3</sub> )) |
|---------|-------------------|---------------------------|----------------------|--|--|
| 1.      | Пористый          | 2%                        | 6                    | 240                                    | 244,5 (241,8; 245,3)   |
| 2.      | Пористый          | 1%                        | 5                    | 200                                    | 201,3 (200,2; 205,2)   |
| 3.      | Пористый          | 2,5%                      | 2                    | 160                                    | 162,4 (160,5; 164,1)   |
| 4.      | Волокнистый       | 2%                        | 4                    | 180                                    | 182,3 (180,7; 183,4)   |
| 5.      | Волокнистый       | 1%                        | 3                    | 150                                    | 150,2 (149,3; 151,2)   |

Все образцы дренажей обеспечивали длительную десорбцию препарата в течение 10-14 дней (Таблица 10, Рисунок 11). Длительность высвобождения эверолимуса, главным образом, зависела от исходного количества препарата на дренаже (коэффициент корреляции Спирмена 0,88).

Таблица 10 – Динамика изменения концентрации эверолимуса при его десорбции из дренажей, насыщенных в различных условиях.

| Срок  | Концентрация эверолимуса, мкг/мл, Me (Q <sub>1</sub> ; Q <sub>3</sub> ) |                   |                   |                   |                   |
|-------|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|       | 1   | 2                 | 3                 | 4                 | 5                 |
| 6 ч.  | 12,5 (12,1; 12,5)   | 11,6 (10,9; 12,0) | 12,0 (11,9; 12,0) | 13,6 (12,1; 13,7) | 12,1 (12,1; 12,8) |
| 12 ч. | 11,2 (11,1; 11,6)   | 12,3 (12,1; 12,3) | 12,1 (11,9; 12,8) | 13,5 (12,5; 13,5) | 11,6 (11,5; 11,9) |
| 18 ч. | 11,3 (11,2; 12,9)   | 12,0 (11,9; 12,1) | 10,9 (10,4; 12,0) | 11,6 (11,3; 13,5) | 10,7 (10,5; 11,3) |
| 24 ч. | 10,7 (10,1; 11,3)   | 11,6 (10,1; 11,7) | 10,7 (8,3; 10,8)  | 11,2 (10,7; 11,6) | 11,9 (10,5; 12,0) |
| 2 д.  | 9,0 (8,9; 9,1)  | 9,6 (9,5; 9,7)    | 8,2 (7,5; 8,3)    | 8,4 (8,3; 8,7)    | 7,0 (6,9; 7,4)*   |
| 3 д.  | 9,7 (9,1; 9,8)  | 8,2 (7,8; 8,6)    | 5,0 (4,8; 5,1)    | 8,8 (7,6; 8,9)    | 5,8 (5,7; 5,8)    |
| 4 д.  | 8,3 (7,3; 8,5)  | 7,9 (7,3; 8,1)    | 5,8 (5,5; 6,0)    | 6,4 (6,4; 6,4)    | 4,3 (4,3; 4,4)*   |
| 5 д.  | 8,1 (7,9; 8,1)  | 6,1 (5,9; 6,5)    | 3,9 (3,6; 4,4)    | 5,3 (4,9; 5,3)    | 4,5 (3,9; 4,5)    |
| 6 д.  | 7,5 (7,3; 7,6)  | 4,1 (4,0; 4,5)    | 3,6 (3,6; 3,9)    | 4,4 (4,3; 4,5)    | 3,6 (3,4; 3,7)    |
| 7 д.  | 5,1 (5,1; 5,3)  | 3,8 (3,7; 4,0)    | 3,6 (3,5; 3,7)    | 5,4 (4,9; 5,5)    | 3,7 (3,4; 4,3)    |
| 8 д.  | 5,1 (5,0; 5,8)  | 3,9 (3,3; 4,3)    | 3,3 (3,2; 3,9)    | 3,7 (3,5; 3,8)    | 3,6 (3,6; 3,6)    |
| 9д.   | 3,6 (3,4; 3,6)  | 3,6 (3,5; 3,7)    | 3,7 (3,5; 3,8)    | 3,1 (3,1; 3,5)    | 3,6 (3,6; 3,7)    |
| 10д.  | 3,3 (3,3; 4,0)  | 3,2 (3,2; 3,8)    | 3,1 (2,7; 3,2)    | 2,8 (2,5; 3,1)    | 2,4 (1,7; 2,4)    |
| 11д.  | 4,5 (3,9; 4,7)  | 2,6 (2,4; 2,7)    | 1,9 (1,7; 2,0)    | 0,0 (0,0; 0,0)    | 0,0 (0,0; 0,0)    |
| 12д.  | 3,6 (3,3; 4,1)  | 2,4 (2,3; 2,6)    | 0,0 (0,0; 0,0)    | 0,0 (0,0; 0,0)    | 0,0 (0,0; 0,0)    |
| 13д.  | 2,2 (1,8; 2,4)  | 0,0 (0,0; 0,4)    | 0,0 (0,0; 0,0)    | 0,0 (0,0; 0,0)    | 0,0 (0,0; 0,0)    |
| 14д.  | 0,0 (0,0; 0,0)  | 0,0 (0,0; 0,0)    | 0,0 (0,0; 0,0)    | 0,0 (0,0; 0,0)    | 0,0 (0,0; 0,0)    |

\* p<0,05 в сравнении с образцом №1

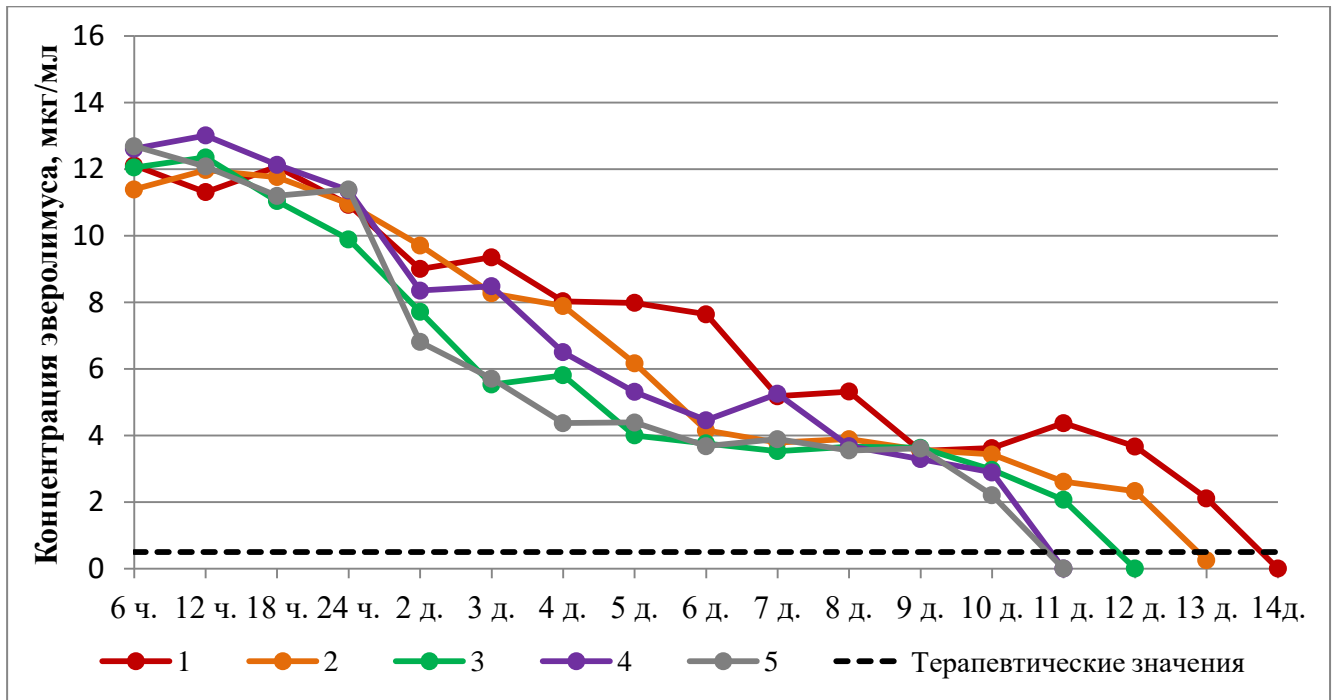


Рисунок 11 – Динамика десорбции эверолимуса из образцов дренажей. Вид и исходное содержание эверолимуса в дренажах (Mc): 1 – 3: пористые (1 - 244,5 мкг; 2 – 201,3 мкг; 3 – 162,4 мкг); 4 – 5: микроволокнистые (4 – 182,3 мкг; 5 – 150,2 мкг)

Более длительную десорбцию обеспечивали пористые дренажи в сравнении с микроволокнистыми: 12,0 (11,0; 13,0) против 10,0 (10,0; 10,0) дней ( $p < 0,05$ , коэффициент корреляции Спирмена 0,84), что было обусловлено не только их лучшей способностью к сорбции препарата, но и особенностями структуры дренажей, определяющими скорость высвобождения препаратов.

Все образцы пористых дренажей обеспечивали постепенную десорбцию препарата в пределах микромолярных концентраций, оказывающих антипролиферативный эффект (максимальная концентрация – 14,5 мкг/мл, минимальная – 1,7 мкг/мл). Наиболее продолжительную десорбцию эверолимуса в течение 13 дней обеспечивал образец №1, насыщенный эверолимусом в 2% суспензии препарата в течение 6 минут.

Таким образом, был разработан способ предоперационной подготовки биорезорбируемых антиглаукоматозных дренажей на основе полилактида, путем их насыщения циклоспорином А и эверолимусом. Полученные дренажи сохраняли свои физико-химические свойства, обеспечивающие их успешную имплантацию во время антиглаукоматозных операций.

Данный способ позволил получить дренажи, содержащие в своем составе стандартизированное хорошо прогнозируемое количество иммунодепрессантов. Построенные на основе анализа полученных данных математические модели с высокой точностью прогнозировали количество сорбируемых дренажами иммунодепрессантов в зависимости от условий насыщения. Пористые модели характеризовались лучшей способностью к сорбции как ЦсА, так и эверолимуса и накапливали в своей структуре на  $32,1 \pm 0,8\%$  и  $24,6 \pm 0,6\%$  иммунодепрессантов больше в сравнении с микроволокнистыми моделями соответственно.

Достигнуто постепенное высвобождение действующих веществ из материала дренажей в течение периода времени, достаточного для оказания антипролиферативного эффекта. При этом пористые модели обеспечивали более длительное высвобождение препаратов из своего материала: 7,0 против 3,0 дней в случае насыщения ЦсА в концентрациях 0,05-1,5 мкг/мл и 12,0 против 10,0 дней в случае насыщения эверолимусом в концентрациях 1,7-14,5 мкг/мл.

Для дальнейшего исследования были отобраны дренажи, характеризовавшиеся наиболее равномерным и длительным высвобождением препаратов – образцы, насыщенные в разведении концентрата ЦсА с BSS в соотношении 1:30 в течение 15 минут и насыщенные эверолимусом в 2% суспензии препарата с помощью ультразвукового воздействия в течение 6 минут.



## **ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ И ЦИТОТОКСИЧНОСТИ СЕЛЕКТИВНЫХ ИММУНОДЕПРЕССАНТОВ.**

Целью данной главы явилась экспериментальная оценка антипролиферативной активности и возможной цитотоксичности циклоспорина А и эверолимуса в концентрациях, полученных при десорбции данных препаратов из дренажей, в условиях *in vitro*.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

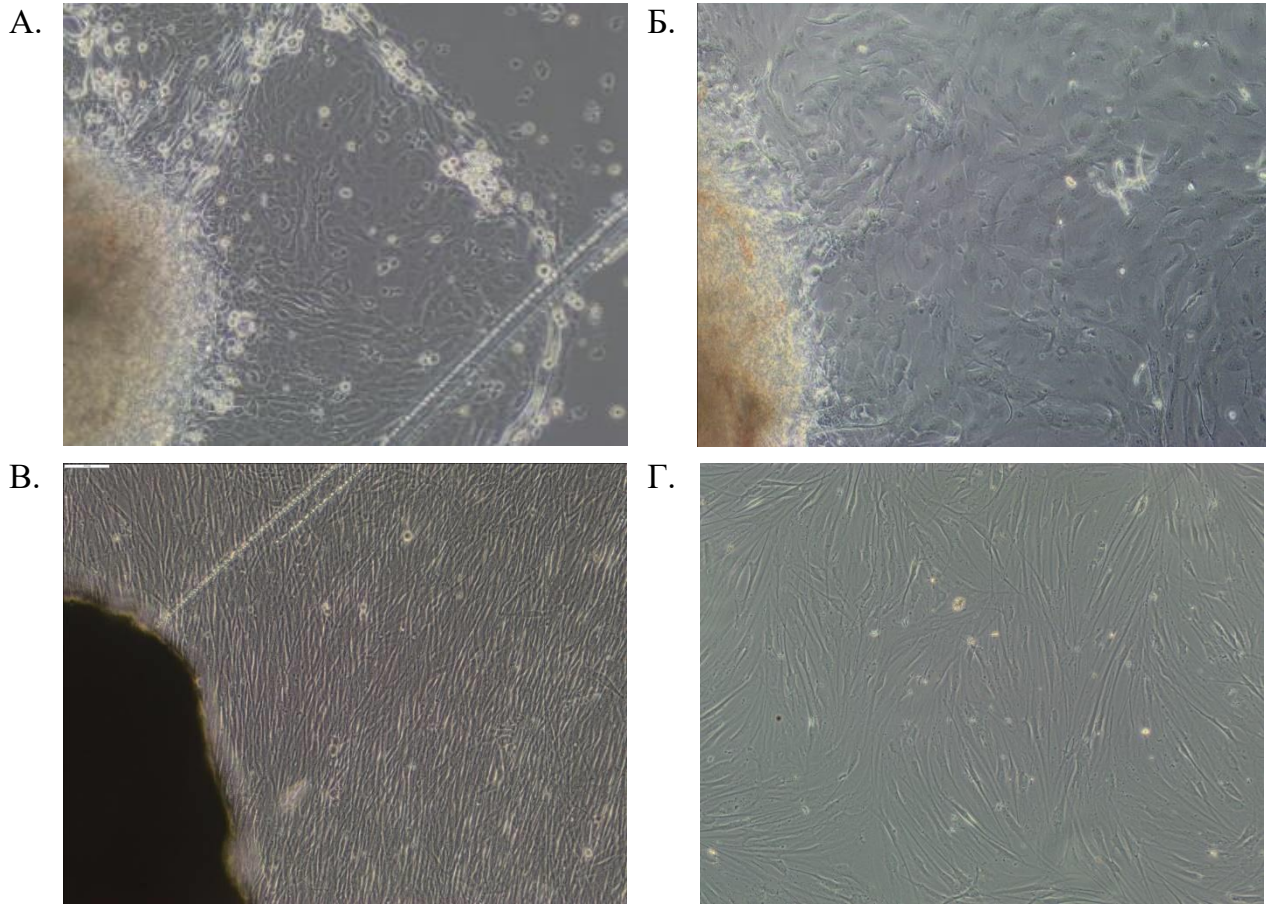
- Получить первичную культуру фибробластов теноновой капсулы человека из донорского материала;
- Определить антипролиферативную активность циклоспорина А в эксперименте на полученной культуре клеток;
- Произвести оценку цитотоксичности циклоспорина А *in vitro*;
- Определить антипролиферативную активность эверолимуса на культуре фибробластов теноновой капсулы человека;
- Произвести оценку цитотоксичности эверолимуса *in vitro*.

### **4.1. Результаты получения первичной культуры фибробластов теноновой капсулы человека**

Первичную культуру фибробластов теноновой капсулы человека получали из донорского материала пациентов, подвергшихся хирургическому лечению заболеваний глаз, после подписания добровольного информированного согласия и одобрения Комитетом по биоэтике при СамГМУ и локальным этическим комитетом ГБУЗ СОКОБ им. Т.И. Ерошевского согласно методике, описанной в разделе 2.3.1 главы 2 настоящей диссертации.

Через 48 часов после начала культивирования с краев материала наблюдали рост эпителиоподобных клеток в виде пласта. Клетки были полиморфными (треугольными, квадратными) и располагались очень близко друг к другу подобно «черепице» (Рисунок 12.А). На данном сроке в монослое обнаруживали клетки веретеновидной формы (фибробластоподобные клетки). В дальнейшем указанные клетки постепенно вытесняли

эпителий из монослоя, т.к. имели более высокую скорость роста и способность к миграции (Рисунок 12.Б). К 21-му дню культивирования в монослое преобладали фибробластоподобные клетки (Рисунок 12.В).



А. 48 часов культивирования. Рост преимущественно полиморфных эпителиоподобных клеток.

Б. 7-е сутки культивирования. Появление фибробластоподобных клеток вытянутой формы.

В. 21-е сутки культивирования. Преобладание фибробластоподобных клеток в монослое.

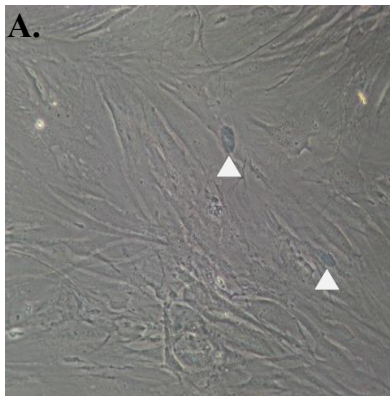
Г. 31-е сутки культивирования. 1-й пассаж.

Рисунок 12 – Нативная первичная культура клеток, полученная из теноновой капсулы человека. Инвертированный микроскоп. Фазовый контраст. Увеличение:  $\times 100$

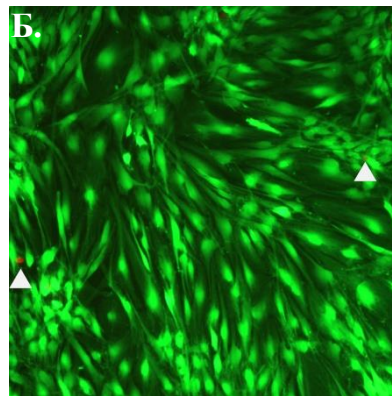
По достижении конfluenceнтности монослоя 80% производили первый пересев культуры. После снятия со дна культурального планшета эпителиальные клетки теряли свою адгезивную способность и при последующих посевах практически отсутствовали в монослое.

После пересева в монослой наблюдали фибробластоподобные клетки вытянутой формы, соединявшиеся между собой 2-3 отростками. Цитоплазма была гомогенная, ядра прозрачные, округлой формы, с ядрышками, границы клеток определялись хорошо (Рисунок 12.Г).

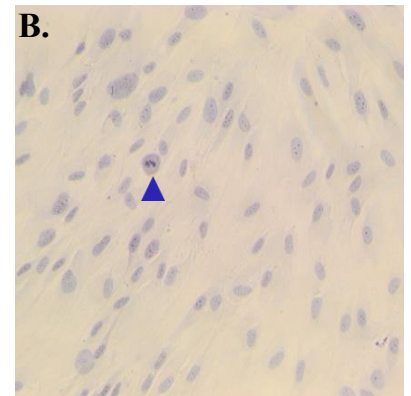
Была исследована жизнеспособность полученных клеток. При окрашивании трипановым синим отмечали единичные поврежденные клетки, диффузно окрашенные в синий цвет (Рисунок 13.А). При исследовании с помощью флуоресцентных красителей «Live/Dead Cell-Mediated Cytotoxicity Kit» по протоколу производителя выявлены единичные нежизнеспособные клетки (Рисунок 13.Б). При гистохимической окраске клеток суданом IV и гематоксилином на дне культурального пластика выявлен равномерный монослой, состоявший из фибробластоподобных клеток с четкими границами, соединявшихся между собой 2-3 отростками. Оболочка клеток была ровная, без деформаций, цитоплазма гомогенная, без липидных включений. В ядрах наблюдали 2-3 ядрышка. Выявлены делящиеся клетки (Рисунок 13.В). Пролиферативная активность фибробластоподобных клеток, полученных из теноновой капсулы человека, приведена в Таблице 11.



А. Окраска: трипановый синий. Увеличение  $\times 200$ .



Б. Окраска: «Live/Dead Cell-Mediated Cytotoxicity Kit». Увеличение:  $\times 100$ .



В. Окраска: судан IV, гематоксилин. Увеличение:  $\times 200$ . Инвертированный микроскоп.

$\triangle$  - поврежденные клетки;  $\blacktriangle$  - делящаяся клетка

Рисунок 13 – Исследование первичной культуры клеток на жизнеспособность

Таблица 11 – Пролиферативная активность первичной культуры фибробластов теноновой капсулы человека, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

| Срок эксперимента, сутки | Плотность монослоя, кл./мм <sup>2</sup> | PI, отн. ед.      | PDL, отн. ед.     | DT, ч.            |
|--------------------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| 0                        | 172 (172; 178)                          | -                 | -                 | -                 |
| 1                        | 152 (151; 155)                          | -                 | -                 | -                 |
| 3                        | 357 (298; 357)                          | 2,35 (1,92; 2,36) | -                 | 39,0 (38,7; 50,9) |
| 7                        | 445 (445; 448)                          | -                 | 1,55 (1,53; 1,56) | -                 |

PI – индекс пролиферации, PDL – количество удвоений культуры с 1 по 7 сутки, DT – время удвоения культуры

По итогам данного этапа получена жизнеспособная культура фибробластов теноновой капсулы человека, пригодная для проведения дальнейшего исследования.

## 4.2. Определение антипролиферативной активности и цитотоксичности циклоспорина А

### 4.2.1. Определение антипролиферативной активности циклоспорина А

Исходное значение медианы плотности монослоя, определенное при подсчете количества клеток на 1 мм<sup>2</sup> через 24 часа после пересева до внесения препаратов в питательную среду, составило 172 кл./мм<sup>2</sup>. Через 1 сутки после внесения ЦсА в культуральную среду значимых изменений характера монослоя отмечено не было. Клетки сохраняли хорошую адгезивную способность. Границы клеток оставались четкими, цитоплазма гомогенной. Ядра визуализировались. Клетки соединялись между собой с помощью 2-3 отростков, формируя равномерный монослой (Рисунок 14). Отмечали единичные клетки в фазе митоза. В концентрации 0,5 мкг/мл в монослое выявлены единичные округлые клетки с сохраненной адгезией ко дну культурального пластика. В более высоких концентрациях – 1,0 и 2,0 мкг/мл поврежденных клеток обнаружено не было. Через сутки культивирования в присутствии ЦсА наблюдали различия в плотности монослоя в исследуемых культурах. В некоторых группах происходило увеличение количества клеток, а в некоторых – незначительное уменьшение, что может быть связано с процессами адаптации клеток к новым условиям

культивирования, которые проходили по-разному в исследуемых культурах вне зависимости от концентрации препарата. Так, в контрольной культуре и культурах с концентрацией ЦсА 0,5 и 1,0 мкг/мл плотность монослоя незначительно снижалась, в то время как в культурах с концентрацией препарата 0,05, 0,2 и 2,0 мкг/мл наблюдали медленную пролиферацию клеток (Рисунок 14). Фаза логарифмического роста для всех исследуемых культур наступала по прошествии 24 часов после внесения препарата и длилась 2 суток. Именно в данный промежуток времени оценивали пролиферативную активность фибробластов и влияние ЦсА на нее, а оценку плотности монослоя различных групп производили в динамике.

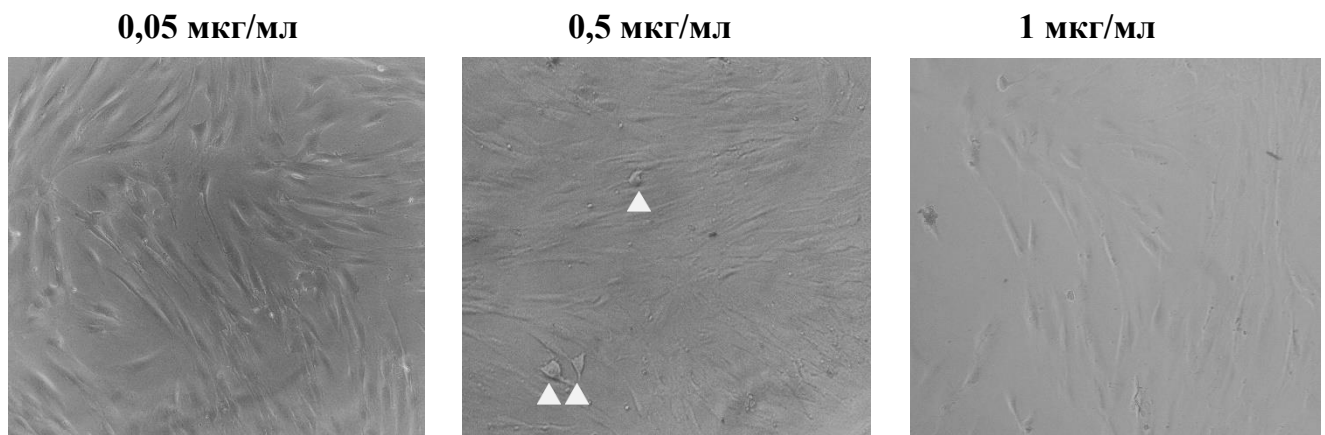


Рисунок 14 – Фибробласты теноновой капсулы человека в присутствии различных концентраций ЦсА через 24 часа после его внесения. Нативный препарат. Инвертированный микроскоп. Фазовый контраст. Увеличение  $\times 100$ .

$\triangle$  – округлые поврежденные клетки.

Увеличение плотности монослоя за фазу логарифмического роста культур находилось в обратной зависимости от концентрации ЦсА в питательной среде с высокой силой связи по шкале Чеддока (коэффициент корреляции Спирмена составил 0,90). Наибольший прирост плотности монослоя наблюдали в контрольной группе: на 159,0 (148,0; 193,0) кл/мм<sup>2</sup>; наименьший – при концентрации ЦсА 2,0 мкг/мл: на 51,5 (42,0; 68,0) кл/мм<sup>2</sup> (Рисунок 15).

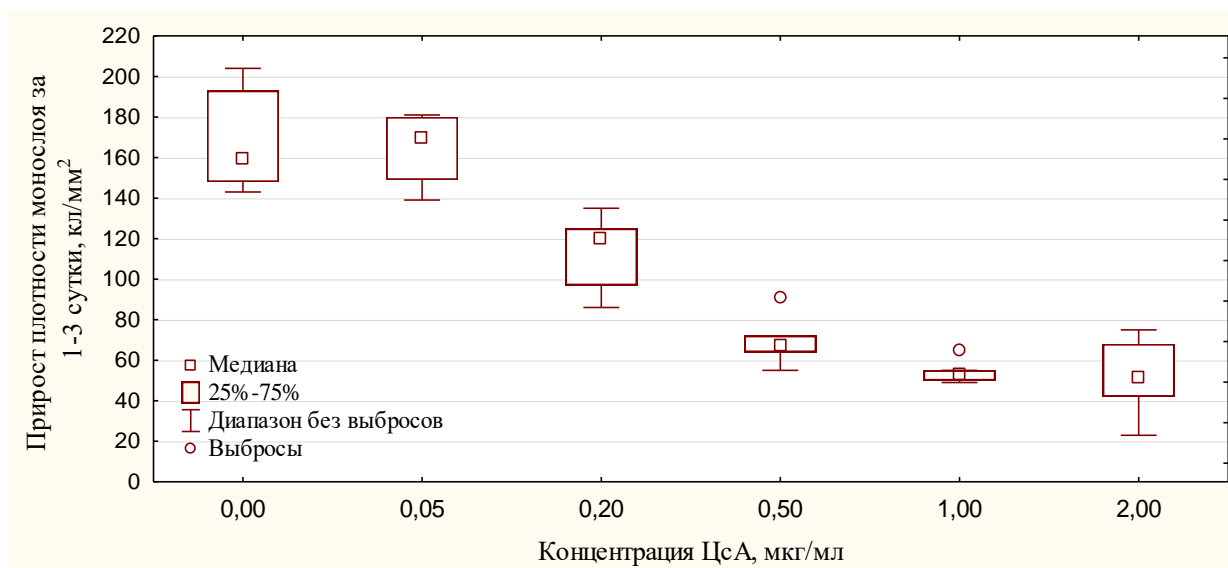


Рисунок 15 – График изменения ( $\Delta$ ) плотности монослоя фибробластов теноновой капсулы человека, культивируемых в различных концентрациях ЦсА с 1 по 3 сутки после добавления препарата в питательную среду

В концентрациях 0,05 и 0,2 мкг/мл плотность клеток статистически значимо не отличалась от плотности клеток контрольной группы. Монослой характеризовали как плотный с близким прилеганием клеток друг к другу практически без свободных пространств (Рисунок 16). В концентрациях 0,5-2,0 мкг/мл наблюдали достоверное снижение плотности клеток в сравнении с контрольной группой в данные сроки (Таблица 12). В концентрации 1,0 мкг/мл плотность монослоя была наименьшей. Клетки находились на большом расстоянии друг от друга, их отростки были укорочены, определяли много свободных пространств. (Рисунок 16).

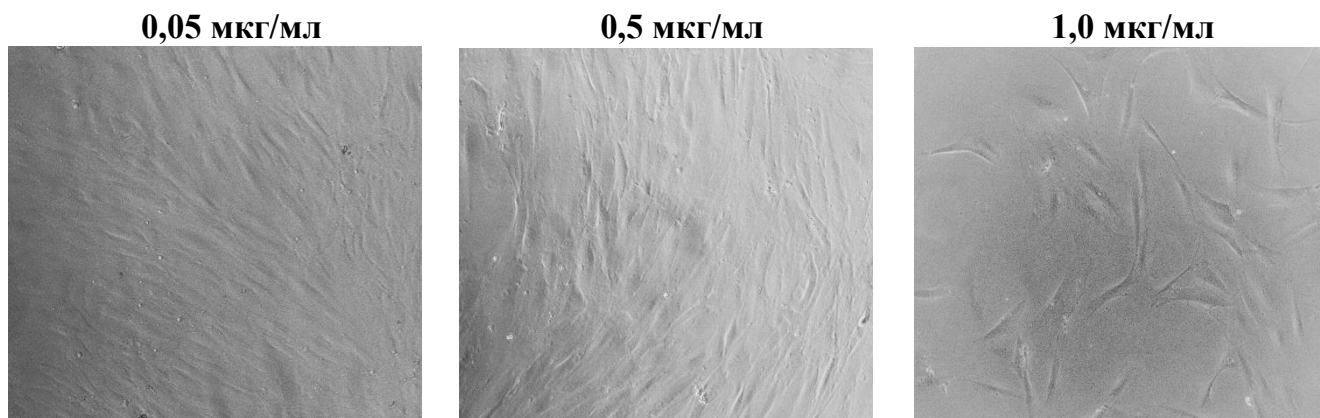


Рисунок 16 – Фибробласты теноновой капсулы человека в присутствии различных концентраций ЦсА через 72 часа после его добавления. Нативный препарат. Инвертированный микроскоп. Фазовый контраст. Увеличение  $\times 100$ .

Таблица 12 – Плотность монослоя при различных концентрациях ЦсА с 1 по 7 сутки после внесения в питательную среду препарата, Ме (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

|  | Плотность монослоя (кол-во клеток на 1 мм <sup>2</sup> ) |                 |                 |
|--|--|-----------------|-----------------|
| Концентрация, мкг/мл                       | 0,0 (контроль)   | 0,05 (ЦсА)      | 0,2 (ЦсА)       |
| 1 сутки                                    | 152 (151; 155)   | 240 (235; 244)* | 225 (220; 230)* |
| 3 сутки                                    | 357 (298; 357)   | 394 (384; 414)  | 350 (333; 350)  |
| 7 сутки                                    | 445 (445; 448)   | 473 (401; 481)  | 374 (372; 388)* |
| Концентрация, мкг/мл                       | 0,5 (ЦсА)  | 1,0 (ЦсА)       | 2,0 (ЦсА)       |
| 1 сутки                                    | 150 (146; 158)   | 137 (135; 138)* | 238 (230; 248)* |
| 3 сутки                                    | 222 (215; 222)*  | 190 (189; 191)* | 286 (281; 295)* |
| 7 сутки                                    | 229 (227; 230)*  | 75 (75; 78)*    | 391 (386; 396)* |
| * p<0,05 в сравнении с контрольной группой |  |                 |                 |

С 4 по 7 сутки после добавления в питательную среду ЦсА культуры переходили в стационарную фазу, в которую скорость увеличения плотности монослоя значительно замедлялась. В рамках эксперимента не наблюдали фазу торможения и гибели клеток, что было доказано при определении ядерно-цитоплазменного соотношения и количества поврежденных клеток с помощью витальных красителей (описано далее в разделе 4.2.2). На 7 сутки при малых концентрациях ЦсА (0,05-0,2 мкг/мл) наблюдали плотный монослой с близко расположенными клетками, соединяющимися между собой отростками. При более высоких концентрациях (0,5-2,0 мкг/мл) в монослое обнаруживали пространства, свободные от клеток. При этом отмечали некоторое укорочение отростков с сохранением адгезивной способности (Рисунок 17).

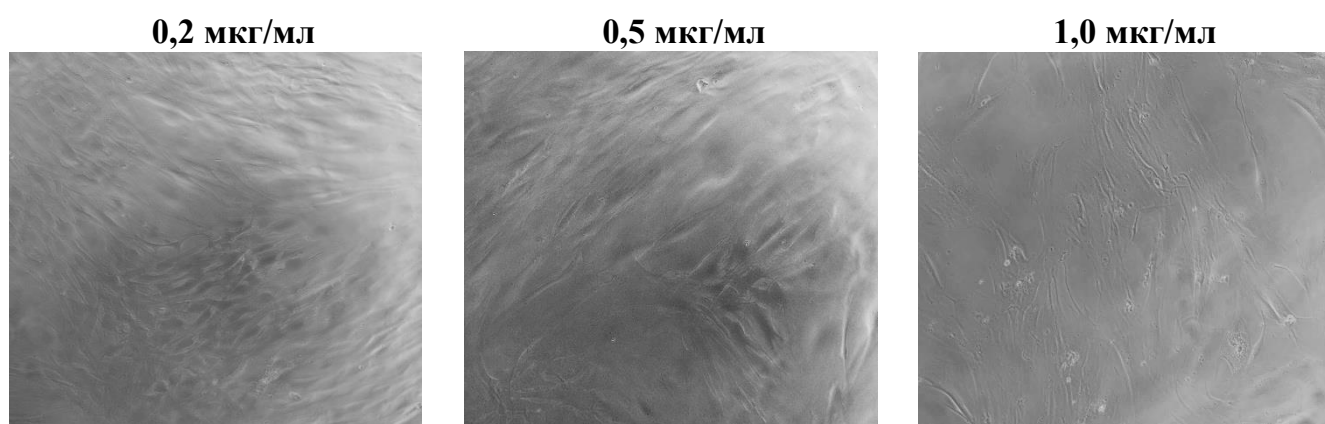


Рисунок 17 – Фибробласты теноновой капсулы человека в присутствии различных концентраций ЦсА через 7 суток культивирования. Нативный препарат. Инвертированный микроскоп. Фазовый контраст. Увеличение  $\times 100$ .

Для объективной оценки пролиферативной активности фибробластов определяли следующие показатели пролиферации: индекс пролиферации (PI), время удвоения культуры (DT) и количество удвоений культуры (PDL). Индекс пролиферации и время удвоения культуры определяли на 3 сутки эксперимента, когда исследуемые культуры находились в фазе логарифмического роста, и скорость деления клеток была наибольшей. Количество удвоений определяли за все время эксперимента. При анализе данных показателей наблюдали постепенное снижение индекса пролиферации в обратной зависимости от концентрации ЦсА в питательной среде. Корреляция между данными значениями характеризовалась как сильная, и коэффициент корреляции Спирмена составил -0,92. Также наблюдали дозозависимое увеличение времени пролиферации культур с добавлением ЦсА с коэффициентом корреляции 0,93. Время удвоения культур с иммунодепрессантом превышало данный показатель контрольной группы в 1,5-5,1 раз в прямой зависимости от концентрации ЦсА. Количество удвоений культуры за все время эксперимента также находилось в обратной зависимости от концентрации препарата с высоким коэффициентом корреляции: -0,78. При этом в концентрации ЦсА 1,00 мкг/мл удвоения культуры не зафиксировали. Значения вышеуказанных показателей достоверно отличались от значений контрольной группы во всех концентрациях (Таблица 13).

Таблица 13 – Показатели пролиферативной активности фибробластов теноновой капсулы человека, культивируемых в различных концентрациях ЦсА, Ме (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

| Концентрация,<br>мкг/мл | PI, отн. ед.        | DT, ч.                 | PDL, отн. ед.       |
|-------------------------|---------------------|------------------------|---------------------|
| <b>0,0</b>              | 2,35 (1,92; 2,36)   | 39,0 (38,7; 50,9)      | 1,55 (1,53; 1,56)   |
| <b>0,05</b>             | 1,70 (1,63; 1,75) * | 62,9 (59,5; 67,8) *    | 0,96 (0,91; 0,97) * |
| <b>0,2</b>              | 1,52 (1,41; 1,56) * | 79,2 (75,3; 96,6) *    | 0,75 (0,73; 0,76) * |
| <b>0,5</b>              | 1,46 (1,41; 1,48) * | 88,1 (84,9; 97,8) *    | 0,62 (0,54; 0,62) * |
| <b>1,0</b>              | 1,38 (1,37; 1,41) * | 102,4 (97,4; 107,0) *  | -                   |
| <b>2,0</b>              | 1,22 (1,17; 1,29) * | 182,5 (155,0; 208,7) * | 0,70 (0,55; 0,75) * |

\* p<0,05 в сравнении с контрольной группой, PI – индекс пролиферации, PDL – количество удвоений культуры с 1 по 7 сутки, DT – время удвоения культуры, «-» – удвоение отсутствует

Полученные данные свидетельствует о дозозависимом подавлении пролиферации фибробластов теноновой капсулы человека циклоспорином А в пределах концентраций 0,05-2,0 мкг/мл.



#### 4.2.2. Определение цитотоксичности циклоспорина А

Для определения возможной цитотоксичности ЦсА в пределах исследуемых концентраций и выявления клеток с поврежденными мембранами на 7 сутки эксперимента культуры клеток окрашивали трипановым синим, а также набором флуорофоров «Live/Dead Cell-Mediated Cytotoxicity Kit». Окраска суданом IV и гематоксилином позволяла более детально оценить морфологию клеток и выявить липидные включения в цитоплазме, свидетельствующие об изменении клеточного обмена.

Медиана и квантили  $Q_1$  и  $Q_3$  ядерно-цитоплазменных соотношений группы контроля составили 0,11 (0,07; 0,13) отн. ед., в то время как значения медиан в образцах, культивируемых с добавлением ЦсА, составили от 0,10 до 0,13 отн. ед. вне зависимости от концентрации препарата (Таблица 14).

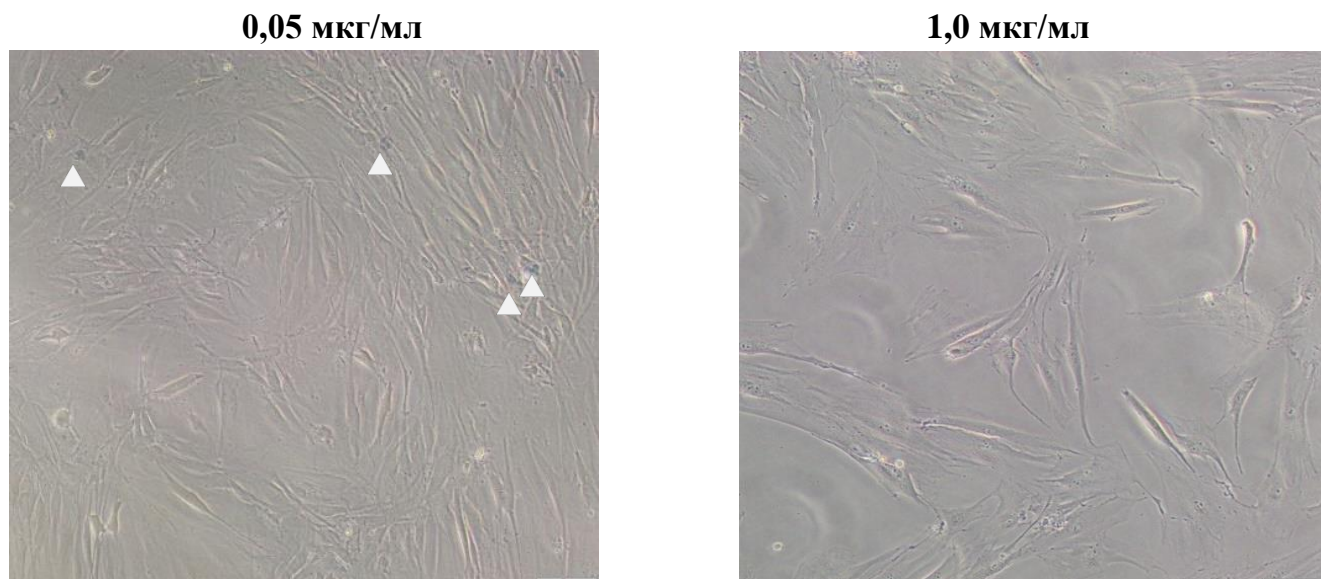
Таблица 14 - Ядерно-цитоплазменные соотношения (ЯЦС) в клетках культуры фибробластов теноновой капсулы человека в присутствии ЦсА на 7 сутки, Ме ( $Q_1$ ;  $Q_3$ )

| Концентрация ЦсА, мкг/мл                              | 0,00                 | 0,05                 | 0,2                  | 0,5                  | 1,0                  | 2,0                  |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| ЯЦС, отн. ед.   | 0,11<br>(0,07; 0,13) | 0,13<br>(0,10; 0,15) | 0,13<br>(0,11; 0,14) | 0,11<br>(0,08; 0,15) | 0,12<br>(0,08; 0,16) | 0,10<br>(0,10; 0,14) |
| p>0,05 в сравнении с контрольной группой (0,0 мкг/мл) |                      |                      |                      |                      |                      |                      |

Различия данного показателя между исследуемыми группами и контрольной группой не были достоверными. Полученные результаты свидетельствуют о том, что на 7-е сутки эксперимента все культуры клеток находились в стационарном состоянии, а сниженную плотность клеток в культурах с добавлением ЦсА наблюдали не за счет гибели клеток, а за счет торможения их пролиферации.

При обработке монослоя трипановым синим обнаруживали единичные клетки со слабоокрашенной цитоплазмой и ядром в образцах, культивируемых в питательной среде с содержанием ЦсА 0,05, 0,2 и 0,5 мкг/мл. При этом отмечали тенденцию к уменьшению количества окрашенных клеток с увеличением концентрации ЦсА, что может быть связано с большей подверженностью активно пролиферирующих клеток воздействию препарата в сравнении со стационарными клетками вне митоза (Рисунок

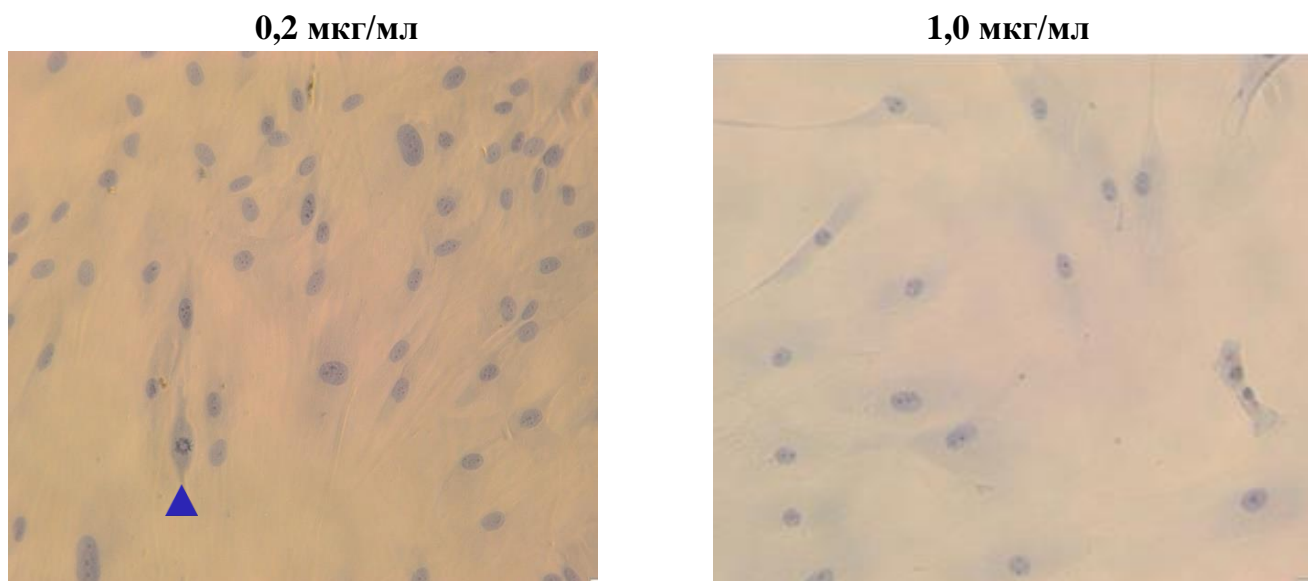
18). Не обнаруживали поврежденных клеток в образцах, культивируемых при концентрациях ЦсА 1,0 и 2,0 мкг/мл, что, вероятно, связано с практически полной остановкой пролиферации в данных культурах.



△ – поврежденные клетки.

Рисунок 18 – Фибробласты теноновой капсулы человека в присутствии ЦсА на 7 сутки эксперимента. Окраска трипановым синим. Инвертированный микроскоп. Фазовый контраст. Увеличение  $\times 200$ .

При анализе препаратов, окрашенных суданом IV и гематоксилином, не обнаруживали повреждения клеточных мембран. Границы клеток были четкими, цитоплазма гомогенной. Ядра были базофильными, содержали 2-4 ядрышка, расположенных эксцентрично. В концентрациях ЦсА 0,05 мкг/мл и 0,2 мкг/мл обнаруживали клетки в фазе деления. При концентрации 1,0 и 2,0 мкг/мл обращали на себя внимание большие расстояния между клетками (Рисунок 19).



▲ – делящаяся клетка

Рисунок 19 – Фибробласты теноновой капсулы человека в присутствии различных концентраций ЦсА на 7 сутки эксперимента. Окраска суданом IV и гематоксилином. Увеличение  $\times 200$ . Инвертированный микроскоп.

Анализ препаратов, окрашенных набором флуорофоров, позволил количественно оценить степень токсичности исследуемых концентраций препаратов. При визуальной оценке абсолютное большинство клеток во всех исследуемых концентрациях имели зеленое свечение, свидетельствующее об их жизнеспособности. Среди них обнаруживали единичные клетки с красными ядрами, что свидетельствовало о повреждении или повышении проницаемости мембран данных клеток (Рисунок 20).

В большинстве исследуемых образцов процент поврежденных клеток был меньше, чем в контрольной группе, и составлял от 0,0% до 6,4%. Доля поврежденных клеток в контрольной группе варьировала в пределах 1,4-6,4%. Статистически достоверной разницы в цитотоксичности не было обнаружено ни в одной из концентраций в сравнении с группой контроля (Таблица 15).

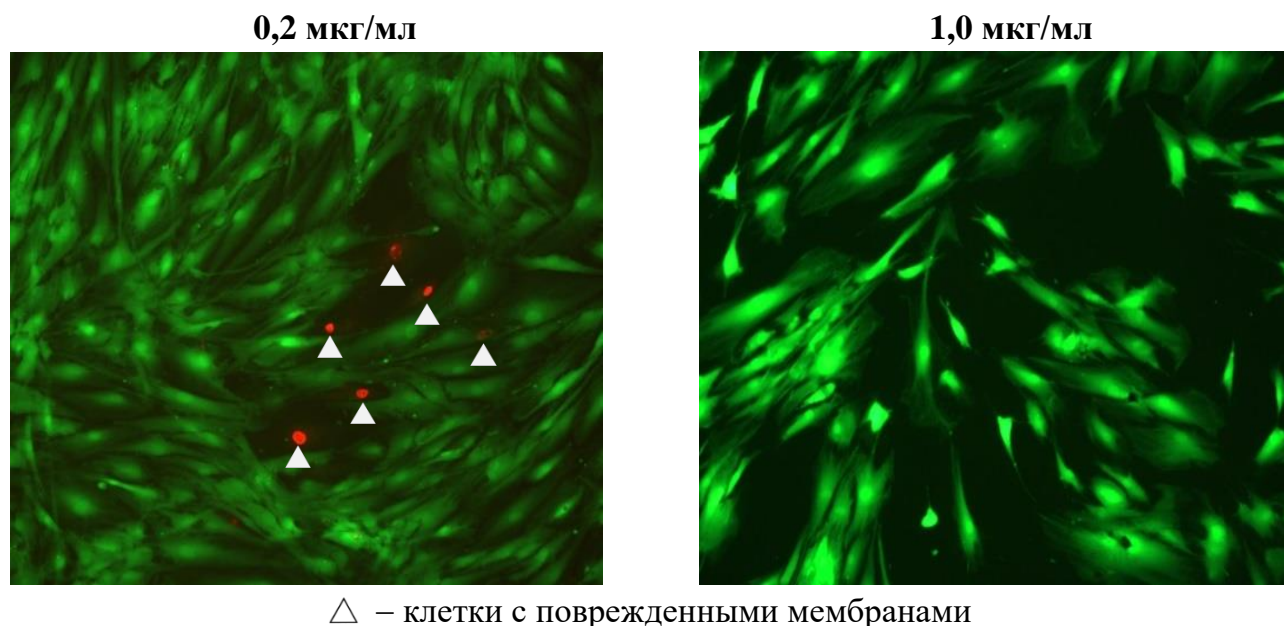


Рисунок 20 – Фибробласты теноновой капсулы человека в присутствии ЦсА на 7 сутки эксперимента. Люминесцентная микроскопия. Окраска набором флуорофоров («Live/Dead Cell-Mediated Cytotoxicity Kit»). Увеличение  $\times 100$ .

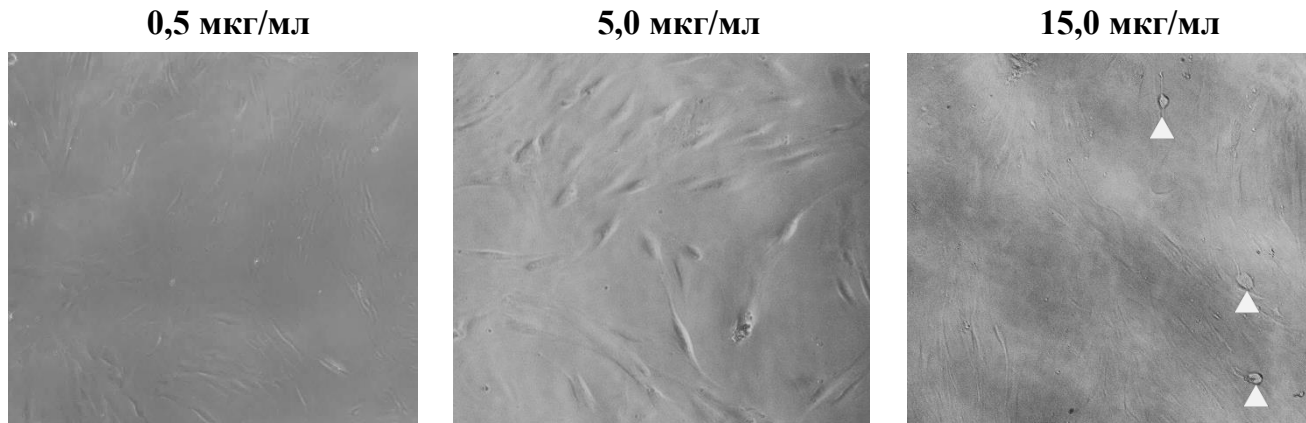
Таблица 15 – Соотношение живых и поврежденных клеток в культурах с различными концентрациями ЦсА на 7 сутки культивирования, Me ( $Q_1$ ;  $Q_3$ )

| Концентрация ЦсА, мкг/мл                              | 0,0              | 0,05           | 0,2              |
|---|------------------|----------------|------------------|
| Живые клетки, кл./мм <sup>2</sup>                     | 338 (331; 353)   | 396 (346; 424) | 312 (284; 340)   |
| Поврежденные клетки, кл./мм <sup>2</sup>              | 11,5 (5,0; 18,0) | 4,0 (1,0; 5,0) | 12,0 (9,0; 15,0) |
| Доля поврежденных клеток, %                           | 3,3 (1,5; 5,3)   | 1,0 (0,3; 1,2) | 3,5 (2,6; 4,5)   |
| Концентрация ЦсА, мкг/мл                              | 0,5              | 1,0            | 2,0              |
| Живые клетки, кл./мм <sup>2</sup>                     | 226 (201; 258)   | 158 (129; 174) | 163 (142; 164)   |
| Поврежденные клетки, кл./мм <sup>2</sup>              | 2,0 (0,0; 5,0)   | 1,5 (1,0; 4,0) | 4,5 (2,0; 7,0)   |
| Доля поврежденных клеток, %                           | 1,0 (0,0; 2,2)   | 1,0 (0,7; 2,1) | 3,0 (1,5; 4,3)   |
| p>0,05 в сравнении с контрольной группой (0,0 мкг/мл) |                  |                |                  |

### 4.3. Определение антипролиферативной активности и цитотоксичности эверолимуса

#### 4.3.1. Определение антипролиферативной активности эверолимуса

Исходная плотность монослоя через сутки после пересева практически не отличалась между группами и составила 172 (172; 178) кл/мм<sup>2</sup>. После внесения эверолимуса в питательную среду культуры в течение 24 часов находились в лаг-фазе из-за смены условий культивирования, и значительного изменения плотности монослоя не происходило: наблюдали либо слабовыраженное ее увеличение, либо незначительное снижение плотности вне зависимости от концентрации эверолимуса в питательной среде. Клетки находились на большом расстоянии друг от друга, сохраняли адгезивную способность. Границы клеток были четкими, цитоплазма гомогенной, ядра визуализировались. В концентрации 15 мкг/мл наблюдали единичные клетки округлой формы (Рисунок 21).



△ – поврежденные округлые клетки

Рисунок 21 – Фибробласты теноновой капсулы человека в присутствии различных концентраций эверолимуса через 24 часа культивирования. Нативный препарат. Инвертированный микроскоп. Фазовый контраст. Увеличение ×100.

Через 72 часа культивирования в присутствии эверолимуса количество клеток изменилось незначительно во всех концентрациях. В монослое обнаруживали много свободных от клеток пространств. Клетки характеризовались четкими границами, гомогенной цитоплазмой и наличием укороченных отростков. Адгезивная способность была сохранена (Рисунок 22).

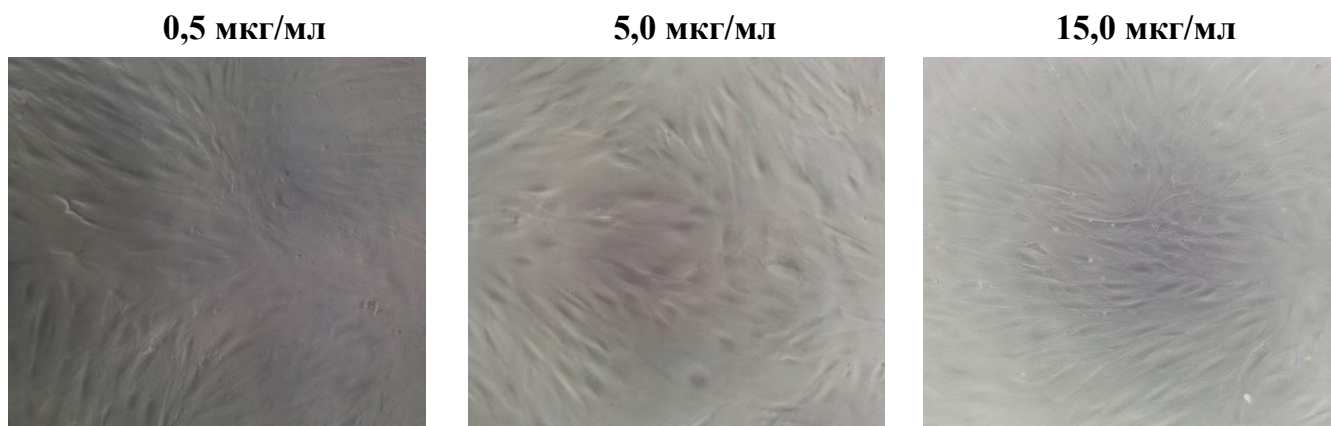


Рисунок 22 – Фибробласты теноновой капсулы человека в присутствии различных концентраций эверолимуса через 72 часа культивирования. Нативный препарат. Инвертированный микроскоп. Фазовый контраст. Увеличение  $\times 100$ .

Наибольший прирост плотности монослоя за фазу логарифмического роста культуры наблюдали в контрольной группе – 163 (158; 170) кл/мм<sup>2</sup>. В культурах других групп отмечали постепенное уменьшение прироста плотности монослоя в пределах концентраций эверолимуса от 0,5 мкг/мл до 5,0 мкг/мл до значений 26 (12; 32) кл/мм<sup>2</sup>. В пределах концентраций 10,0-20,0 мкг/мл происходило небольшое увеличение прироста плотности монослоя до 120 (91;126) кл/мм<sup>2</sup> (Рисунок 23). Однако во всех группах, культивируемых в присутствии эверолимуса, прирост плотности монослоя за фазу логарифмического роста был достоверно меньше прироста в группе контроля.

Через 7 суток плотность монослоя во всех исследуемых культурах с эверолимусом была достоверно меньше плотности культур контрольной группы (Таблицы 16). Морфофункциональные особенности клеток были сохранены, нарушений адгезивной способности не наблюдали (Рисунок 24).

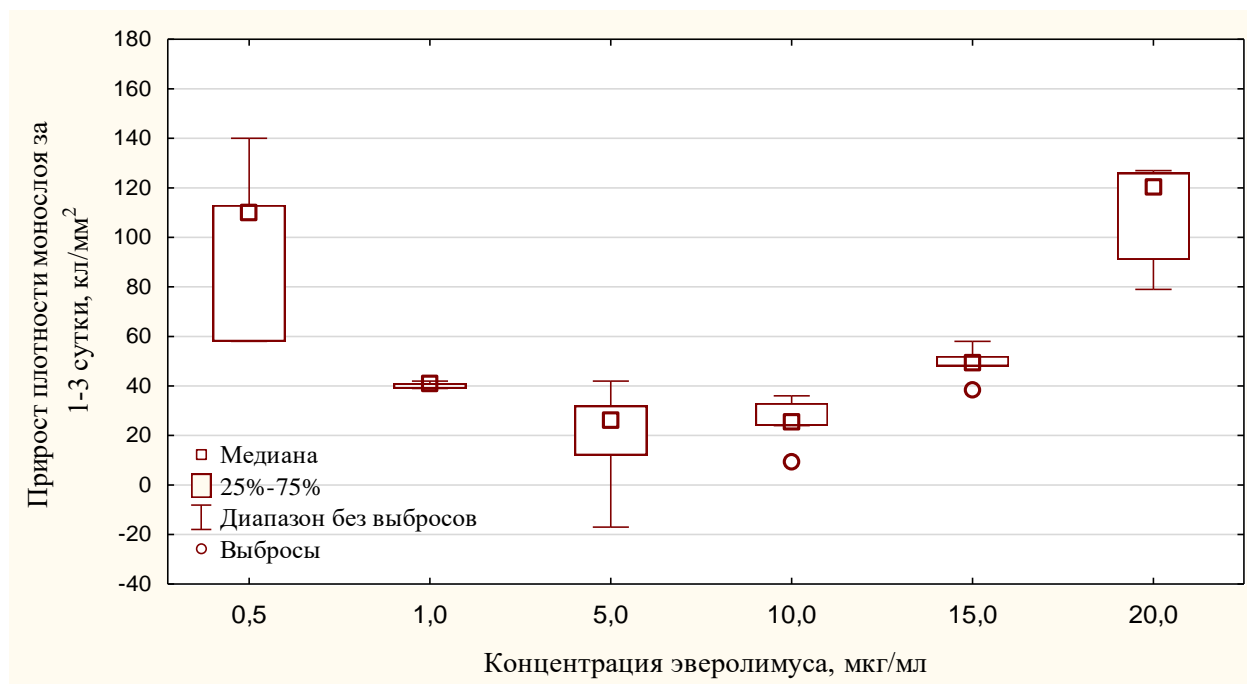


Рисунок 23 – График изменения ( $\Delta$ ) плотности монослоя фибробластов теноновой капсулы человека, культивируемых в различных концентрациях эверолимуса с 1 по 3 сутки после добавления препарата в питательную среду

Таблица 16 - Плотность клеток в монослое при различных концентрациях эверолимуса с 1 по 7 сутки эксперимента, Me ( $Q_1$ ;  $Q_3$ )

| Концентрация, мкг/мл | Плотность клеток (кол-во клеток на 1 мм <sup>2</sup> ) |                 |                 |                 |
|----------------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|
|                      | 0,0  | 0,5             | 1,0             |                 |
| 1 сутки              | 179 (159; 180)   | 256 (245; 277)* | 179 (179; 180)  |                 |
| 3 сутки              | 340 (319; 350)   | 358 (336; 366)  | 220 (219; 224)* |                 |
| 7 сутки              | 445 (445; 448)   | 379 (366; 405)* | 238 (236; 242)* |                 |
| Концентрация, мкг/мл | 5,0  | 10,0            | 15,0            | 20,0            |
| 1 сутки              | 152 (144; 165)   | 205 (200; 215)* | 170 (168; 170)  | 223 (217; 240)* |
| 3 сутки              | 178 (173; 181)*  | 230 (224; 236)* | 218 (216; 222)* | 334 (324; 348)  |
| 7 сутки              | 230 (225; 235)*  | 267 (254; 299)* | 278 (266; 289)* | 390 (376; 390)* |

\*  $p < 0,05$  в сравнении с контрольной группой

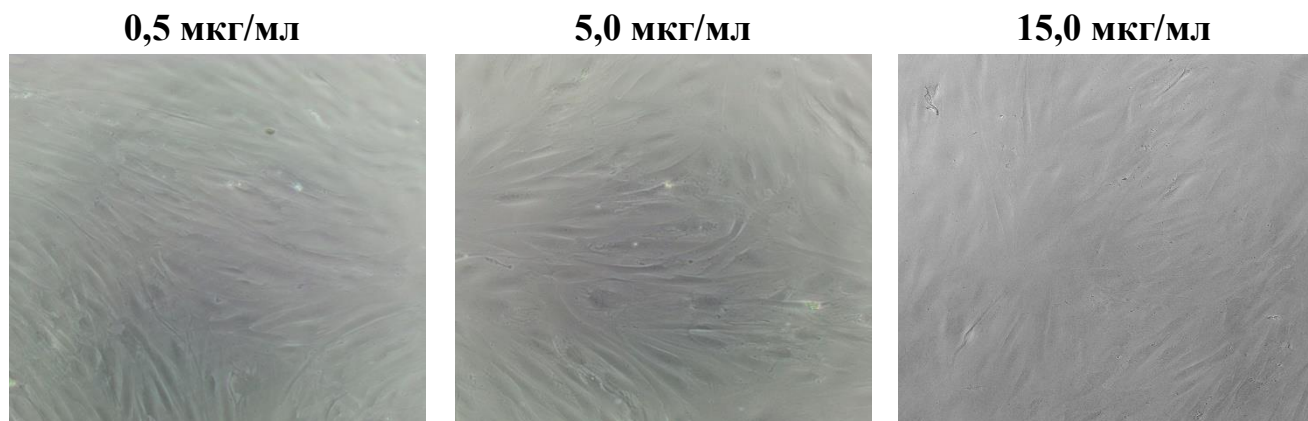


Рисунок 24 – Фибробласты теноновой капсулы человека в присутствии различных концентраций эверолимуса через 7 суток культивирования. Нативный препарат. Инвертированный микроскоп. Фазовый контраст. Увеличение  $\times 100$

Показатели интенсивности пролиферации в культуре – индекс пролиферации и время удвоения культур определяли в фазу логарифмического роста, когда происходило наиболее интенсивное деление клеток. Количество удвоений культуры рассчитывали по завершении всего эксперимента через 7 суток. Значения индекса пролиферации и количества удвоений культуры были достоверно ниже, а время пролиферации – достоверно выше значений, полученных для контрольной группы, во всех изучаемых концентрациях эверолимуса. Дозозависимость антипролиферативного эффекта от концентрации препарата в питательной среде прослеживали в пределах концентраций от 0,5 до 10,0 мкг/мл с высокой силой связи по шкале Чеддока (коэффициенты корреляции Спирмена -0,84 и 0,85 для индекса пролиферации и времени удвоения культуры соответственно). При оценке всего изучаемого диапазона концентраций дозозависимости выявлено не было. В присутствии эверолимуса отмечали замедление пролиферации фибробластов теноновой капсулы человека в 1,7-7,4 раз, наиболее выраженное в концентрации 10 мкг/мл. (Таблица 17).

В течение всего эксперимента наблюдали достоверное снижение пролиферативной активности фибробластов теноновой капсулы человека при их культивировании в присутствии эверолимуса в концентрации 0,5-20,0 мкг/мл.



Таблица 17 – Показатели пролиферативной активности фибробластов теноновой капсулы человека, культивируемых в различных концентрациях эверолимуса, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

| Концентрация, мкг/мл | PI, отн. ед.        | DT, ч.                 | PDL, отн. ед.       |
|----------------------|---------------------|------------------------|---------------------|
| 0,0                  | 1,96 (1,94; 1,99)   | 49,6 (48,2; 50,0)      | 1,32 (1,31; 1,49)   |
| 0,5                  | 1,43 (1,21; 1,46) * | 93,1 (87,7; 175,0) *   | 0,63 (0,40; 0,67) * |
| 1,0                  | 1,23 (1,22; 1,23) * | 162,1 (161,3; 168,8) * | 0,41 (0,41; 0,42) * |
| 5,0                  | 1,17 (1,07; 1,22) * | 188,3 (145,5; 342,3) * | 0,51 (0,51; 0,60) * |
| 10,0                 | 1,13 (1,12; 1,14) * | 279,7 (262,3; 289,1) * | 0,41 (0,32; 0,54) * |
| 15,0                 | 1,29 (1,28; 1,31) * | 129,3 (124,7; 133,8) * | 0,73 (0,65; 0,79) * |
| 20,0                 | 1,54 (1,37; 1,59) * | 77,1 (72,2; 104,6) *   | 0,85 (0,68; 0,87) * |

\* p<0,05 в сравнении с контрольной группой, PI – индекс пролиферации, PDL – количество удвоений культуры с 1 по 7 сутки, DT – время удвоения культуры

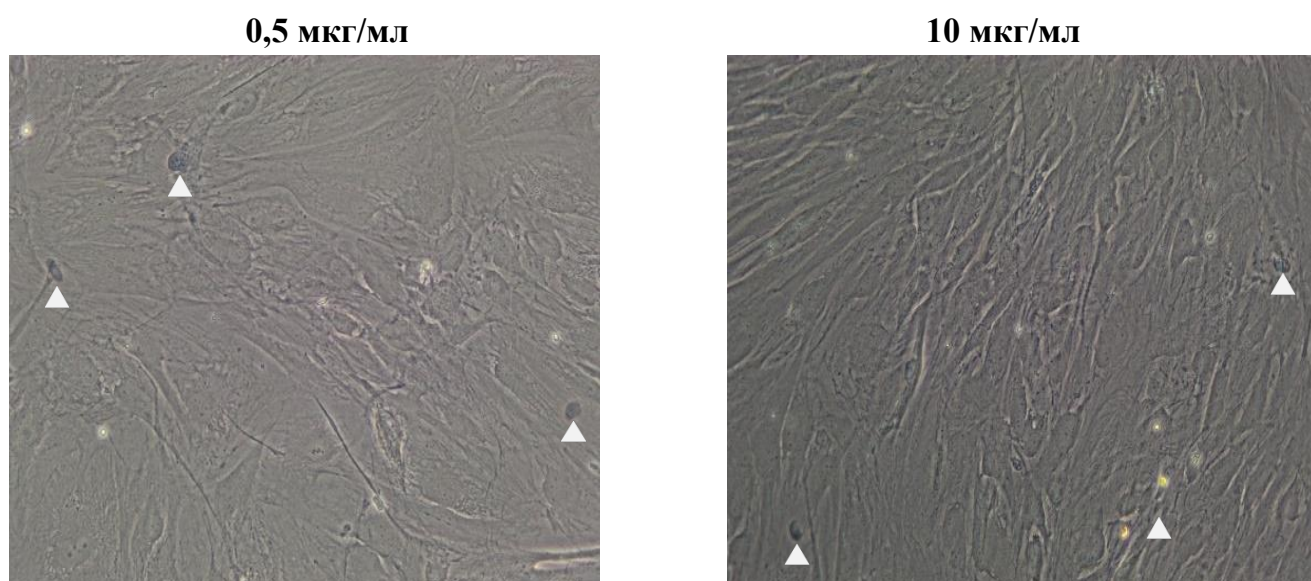
#### 4.3.2. Определение цитотоксичности эверолимуса

Согласно данным определения ЯЦС в культурах клеток, значения медианы и квартилей Q<sub>1</sub> и Q<sub>3</sub> группы контроля составили 0,14 (0,07; 0,15) отн. ед., в то время как данные значения медиан в образцах, культивируемых с добавлением эверолимуса, составили от 0,10 до 0,15 отн. ед. Статистически достоверных различий между исследуемыми группами и группой контроля не было (Таблица 18). Присутствие в питательной среде эверолимуса не оказывало цитотоксического влияния на фибробласты теноновой капсулы человека в исследуемых концентрациях, и на 7 день эксперимента все культуры находились в стационарной фазе вне активной пролиферации. При этом торможение пролиферации в группе эверолимуса происходило за счет ее замедления, а не за счет гибели клеток.

При окраске монослоя трипановым синим отмечали единичные клетки с поврежденными мембранами, диффузно окрашенные в синий цвет во всех концентрациях эверолимуса (Рисунок 25).

Таблица 18 – Ядерно-цитоплазменные соотношения (ЯЦС) в клетках культуры фибробластов теноновой капсулы человека в присутствии эверолимуса, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

| Концентрация эверолимуса (мкг/мл)     | 0,0                  | 0,5                  | 1,0                  |                      |
|---------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| ЯЦС, отн. ед.                         | 0,14<br>(0,07; 0,15) | 0,11<br>(0,09; 0,16) | 0,11<br>(0,10; 0,16) |                      |
| Концентрация эверолимуса (мкг/мл)     | 5,0                  | 10,0                 | 15,0                 | 20,0                 |
| ЯЦС, отн. ед.                         | 0,11<br>(0,06; 0,13) | 0,14<br>(0,12; 0,18) | 0,10<br>(0,06; 0,13) | 0,15<br>(0,09; 0,17) |
| p>0,05 в сравнении с группой контроля |                      |                      |                      |                      |

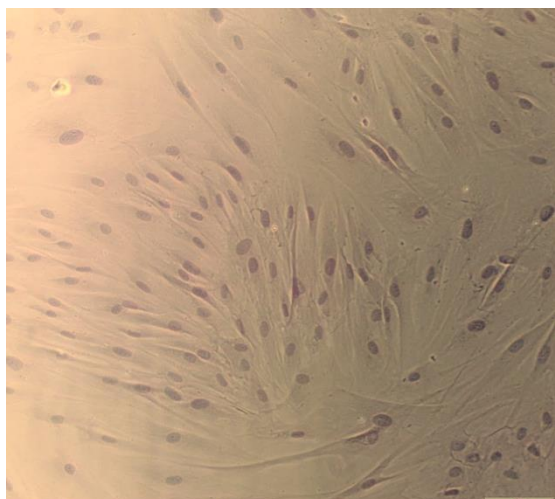


△ – клетки с поврежденными мембранами

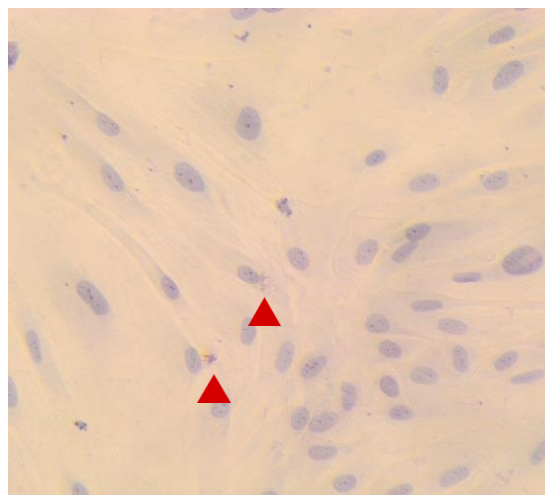
Рисунок 25 – Фибробласты теноновой капсулы человека в присутствии различных концентраций эверолимуса на 7 сутки эксперимента. Окраска трипановым синим. Инвертированный микроскоп. Фазовый контраст. Увеличение ×200.

При окраске суданом IV и гематоксилином отмечали сохранение морфофункциональных особенностей фибробластов во всех изученных концентрациях эверолимуса. Границы клеток оставались четкими, цитоплазма – гомогенной. Ядра имели базофильную окраску, хорошо визуализировались ядрышки. В концентрациях 1,0 мкг/мл и 20 мкг/мл обнаруживали единичные клетки с липидными включениями, окрашенными в красный цвет (Рисунок 26).

10 мкг/мл



20 мкг/мл

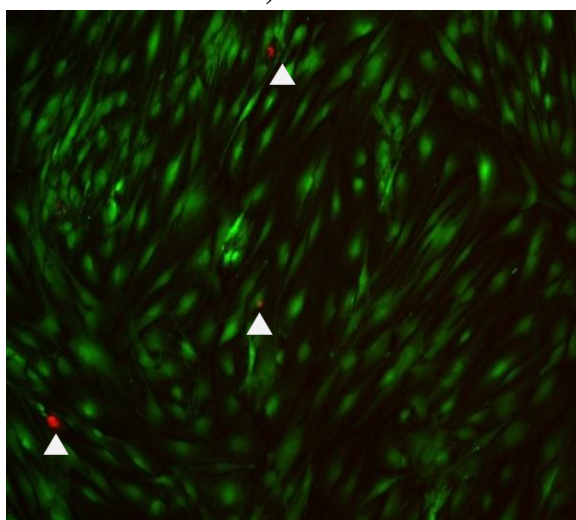


▲ – клетки с липидными включениями

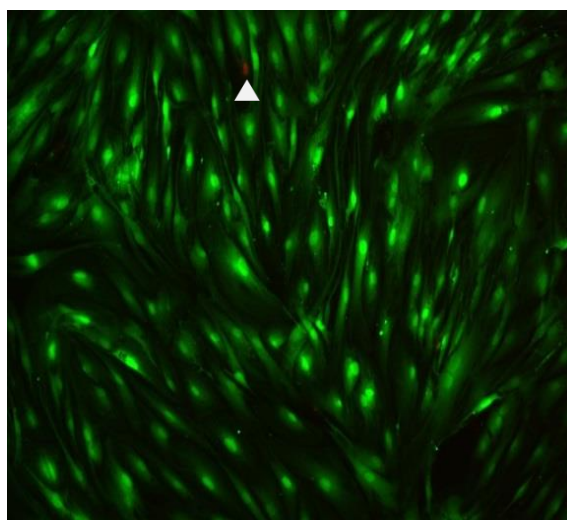
Рисунок 26 – Фибробласты теноновой капсулы человека в присутствии эверолимуса на 7 сутки эксперимента. Окраска суданом IV и гематоксилином. Увеличение  $\times 200$ .  
Инвертированный микроскоп

Окраска набором флуорофоров («Live/Dead Cell-Mediated Cytotoxicity Kit») выявила единичные поврежденные клетки с ядрами, окрашенными в красный цвет, во всех концентрациях препарата без дозозависимого эффекта (Рисунок 27). Во всех исследуемых концентрациях эверолимуса доля поврежденных клеток значимо не отличалась в сравнении с контрольной группой и не превышала 5,3% против максимального значения 6,4% в группе контроля (Таблица 19).

0,5 мкг/мл



5 мкг/мл



△ – клетки с поврежденными мембранами

Рисунок 27 – Фибробласты теноновой капсулы человека в присутствии эверолимуса на 7 сутки эксперимента. Люминесцентная микроскопия. Окраска набором флуорофоров («Live/Dead Cell-Mediated Cytotoxicity Kit»). Увеличение  $\times 100$ .

Таблица 19 – Соотношение живых и поврежденных клеток в культурах с различными концентрациями эверолимуса на 7 сутки культивирования, Ме (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

| Концентрация ЦсА, мкг/мл                   | 0,0              | 0,5              | 1,0             |                 |
|--|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| Живые клетки, кл./мм <sup>2</sup>          | 338 (331; 353)   | 111 (98; 125)*   | 252 (228; 266)* |                 |
| Поврежденные клетки, кл./мм <sup>2</sup>   | 11,5 (5,0; 18,0) | 4,0 (3,0; 5,5)*  | 3,0 (2,0; 5,0)* |                 |
| % поврежденных клеток                      | 3,3 (1,5; 5,3)   | 3,7 (2,5; 5,2)   | 1,2 (0,9; 1,9)  |                 |
| Концентрация ЦсА, мкг/мл                   | 5,0              | 10,0             | 15,0            | 20,0            |
| Живые клетки, кл./мм <sup>2</sup>          | 278 (271; 278)*  | 206 (193; 245)*  | 207 (185; 228)* | 62 (58; 106)*   |
| Поврежденные клетки, кл./мм <sup>2</sup>   | 2,0 (1,0; 2,0)*  | 3,0 (0,0; 10,0)* | 4,5 (1,0; 9,0)  | 1,0 (0,0; 3,0)* |
| % поврежденных клеток                      | 0,7 (0,3; 1,0)   | 1,5 (0,0; 4,1)   | 2,2 (0,5; 5,1)  | 1,7 (0,0; 2,8)  |
| * p<0,05 в сравнении с контрольной группой |                  |                  |                 |                 |

Таким образом, и циклоспорин А, и эверолимус оказывали прямой антипролиферативный эффект на фибробласты теноновой капсулы человека в эксперименте *in vitro*, замедляя скорость пролиферации клеток в 1,5-5,1 раз и 1,7-7,4 раз соответственно.

При этом антипролиферативный эффект циклоспорина А имел выраженный дозозависимый характер в пределах изучаемых концентраций от 0,05 до 2,0 мкг/мл в отличие от эверолимуса, при добавлении которого в питательную среду культур клеток происходило замедление клеточной пролиферации, не связанное с концентрацией препарата в пределах 0,5-20,0 мкг/мл.

Ни циклоспорин А, ни эверолимус не оказывали цитотоксического эффекта на фибробласты теноновой капсулы человека в концентрациях, высвобождаемых дренажами, при культивировании в течение 7 дней, что свидетельствует о достаточном уровне безопасности местного применения данных препаратов.

## **ГЛАВА 5. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ СЕЛЕКТИВНЫХ ИММУНОДЕПРЕССАНТОВ В ГИПОТЕНЗИВНОЙ ХИРУРГИИ *IN VIVO*.**

Цель данной главы состояла в экспериментальном обосновании пролонгированного применения селективных иммунодепрессантов в хирургии глаукомы *in vivo*.

Для достижения данной цели были сформулированы следующие задачи:

- В эксперименте *in vivo* изучить влияние конъюнктивальных инстилляций комбинированного консервант-содержащего гипотензивного препарата на состояние тканей глазной поверхности лабораторных животных;
- Изучить влияние имплантации антиглаукоматозных дренажей, насыщенных циклоспорином А либо эверолимусом, на воспаление и репарацию в операционной ране после выполнения проникающего гипотензивного вмешательства на основании гистологического анализа;
- Произвести оценку клинико-функционального эффекта хирургических вмешательств с применением антиглаукоматозных дренажей, насыщенных циклоспорином А либо эверолимусом.

### **5.1. Результаты исследования влияния антиглаукоматозного препарата на состояние тканей глазной поверхности лабораторных животных**

Для исследования влияния антиглаукоматозного препарата на состояние тканей глазной поверхности лабораторных животных производили сравнительную офтальмологическую и гистологическую оценку состояния конъюнктивы и роговицы кроликов, подвергшихся инстилляциям консервант-содержащего гипотензивного препарата (группа 1) либо физиологического раствора (группа 2).

### 5.1.1. Результаты офтальмологического обследования глазной поверхности лабораторных животных

Изначально конъюнктивальная гиперемия отсутствовала у животных обеих групп и соответствовала оценке «0». У большинства животных группы 1 наблюдали увеличение выраженности конъюнктивальной гиперемии до слабой и, в некоторых случаях, средней степени в течение 1 месяца. В дальнейшем наблюдали достоверное увеличение выраженности данного признака, и через 3 месяца у большинства кроликов данной группы степень гиперемии соответствовала оценке «2 балла», достигая оценки «3» у некоторых животных (Рисунки 28-30). При этом отмечали статистически достоверные различия между выраженностью гиперемии в группе 1 в сравнении с группой 2 в течение всего периода наблюдения, начиная с 14 дней. Также статистически достоверным было увеличение выраженности гиперемии в данной группе в сравнении с исходными значениями с 14 дней до 3 месяцев после начала эксперимента (Таблица 20).

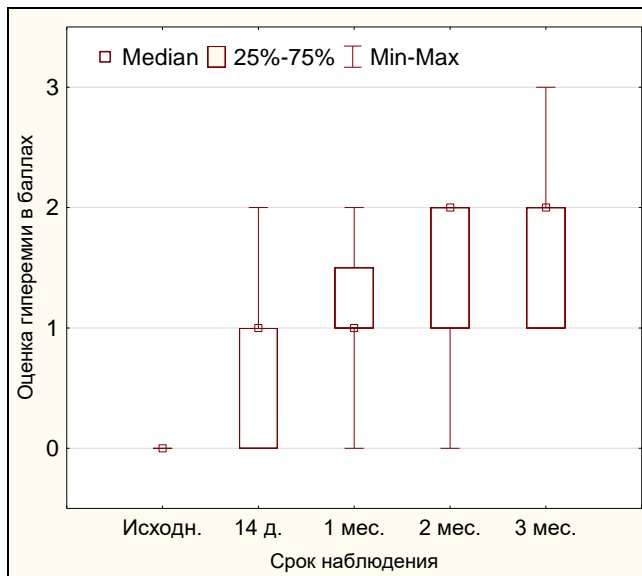


Рисунок 28 – Динамика изменения медиан уровня гиперемии в баллах в группе 1

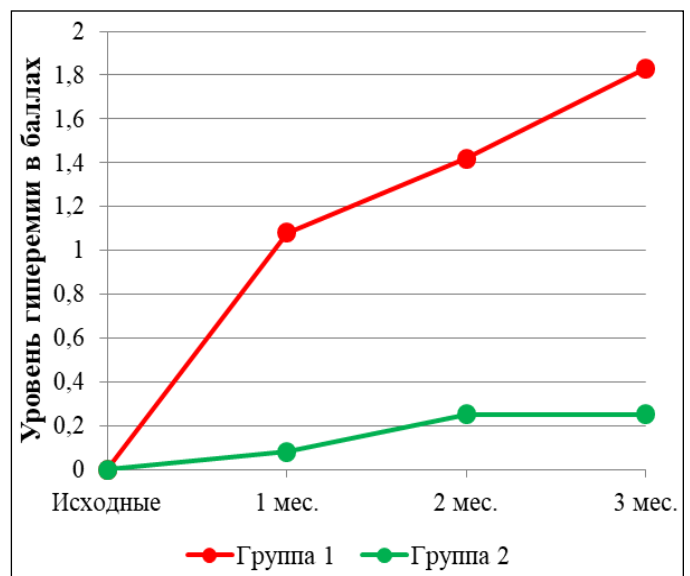
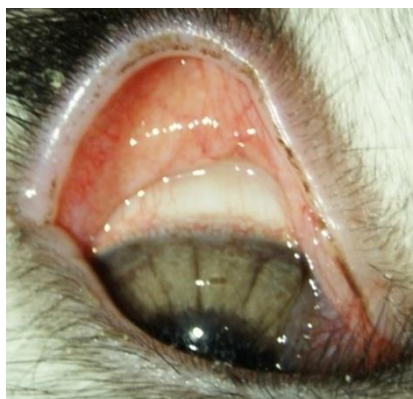


Рисунок 29 – Динамика изменения средних значений уровня гиперемии в баллах в исследуемых группах

Группа 2. 3 месяца



Группа 1. 1 месяц



Группа 1. 3 месяца

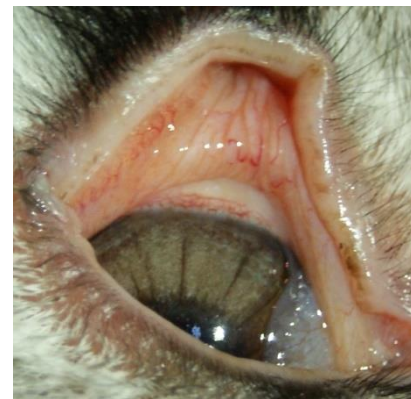


Рисунок 30 – Выраженность конъюнктивальной гиперемии у кроликов

Таблица 20 – Оценка конъюнктивальной гиперемии у кроликов исследуемых групп в динамике, в баллах, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

| Группа   | Срок           |                               |                               |                               |                               |
|----------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|          | 1 день         | 14 дней                       | 1 месяц                       | 2 месяца                      | 3 месяца                      |
| Группа 1 | 0,0 (0,0; 0,0) | 1,0 (0,0; 1,0) <sup>1,2</sup> | 1,0 (1,0; 1,5) <sup>1,2</sup> | 2,0 (1,0; 2,0) <sup>1,2</sup> | 2,0 (1,0; 2,0) <sup>1,2</sup> |
| Группа 2 | 0,0 (0,0; 0,0) | 0,0 (0,0; 0,0)                | 0,0 (0,0; 0,0)                | 0,0 (0,0; 0,5)                | 0,0 (0,0; 0,5)                |

<sup>1</sup> p<0,05 для группы 1 по отношению к группе 2  
<sup>2</sup> p<0,05 по отношению к исходным значениям внутри группы

У 55% животных группы 1 через 1 месяц после начала эксперимента появились признаки повреждения эпителия роговицы. В данные сроки при окраске роговицы флуоресцеином у большинства животных с поврежденным эпителием наблюдали следы окрашивания, соответствующие оценке «1» по шкале Эфрона. При биомикроскопии через 2 месяца уже у 85% животных группы 1 отмечали повреждение роговичного эпителия. Медиана составила 2,0 балла по шкале Эфрона. Через 3 месяца признаки повреждения роговичного эпителия выявляли у 87,5% животных группы 1. Окрашивание раствором флуоресцеина выявляло как точечные, так и сливные очаги повреждения эпителия (Рисунки 31-33, Таблица 21).

При выполнении биомикроскопии животным группы 2 каких-либо изменений переднего отрезка глаза выявлено не было, поверхность роговицы была гладкая и не окрашивалась флуоресцеином в течение всего периода наблюдения ни у одного животного (Рисунки 32,33).

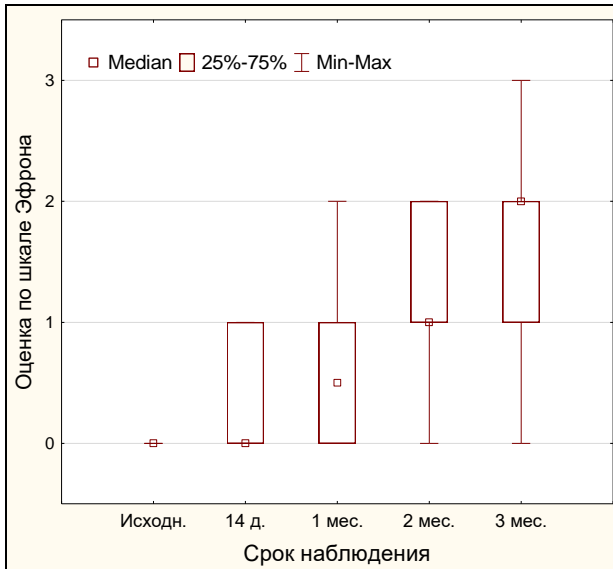


Рисунок 31 – Динамика изменения медиан степени повреждения роговицы в баллах по Эфрону в группе 1

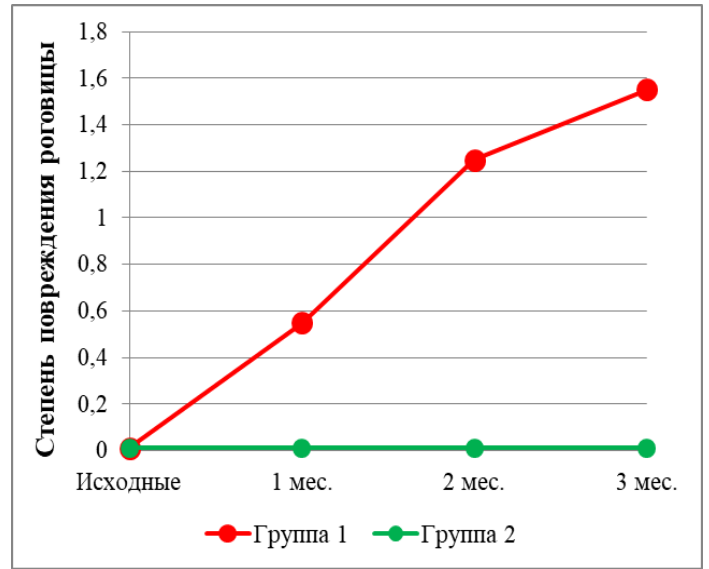


Рисунок 32 – Динамика изменения значений степени повреждения роговицы в баллах по Эфрону в исследуемых группах.

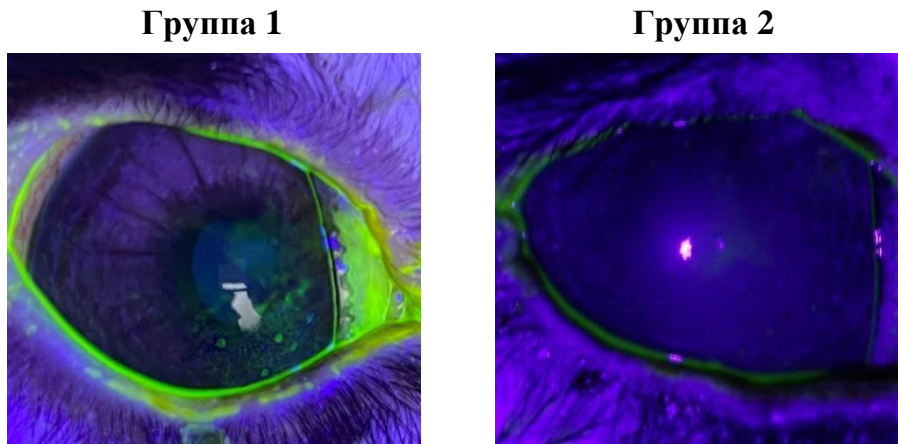


Рисунок 33 – Окрасивание роговицы флуоресцеином, исследование в синем свете. Срок: 3 месяца

Таблица 21 – Оценка выраженности повреждения эпителия роговицы у кроликов исследуемых групп в динамике, в баллах по шкале Эфрона, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

| Группа   | Срок           |                             |                               |                               |                               |
|----------|----------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|          | 1 день         | 14 дней                     | 1 месяц                       | 2 месяца                      | 3 месяца                      |
| Группа 1 | 0,0 (0,0; 0,0) | 0,0 (0,0; 1,0) <sup>2</sup> | 0,5 (0,0; 1,0) <sup>1,2</sup> | 1,0 (1,0; 2,0) <sup>1,2</sup> | 2,0 (1,0; 2,0) <sup>1,2</sup> |
| Группа 2 | 0,0 (0,0; 0,0) | 0,0 (0,0; 0,0)              | 0,0 (0,0; 0,0)                | 0,0 (0,0; 0,0)                | 0,0 (0,0; 0,0)                |

<sup>1</sup> p<0,05 для группы 1 по отношению к группе 2  
<sup>2</sup> p<0,05 по отношению к исходным значениям внутри группы



У животных группы 1 уже через 14 дней тест Ширмера I показал достоверное снижение слезопродукции в сравнении с исходными значениями. Статистически достоверную разницу в результатах теста Ширмера между двумя группами наблюдали в сроки от 1 месяца до конца данного этапа эксперимента. Через 1 месяц значения теста Ширмера I у животных группы 1 снизились с исходных значений 12-16 мм до 11-14 мм. При этом у большинства кроликов данной группы результаты теста Ширмера составляли 12 мм (35% глаз). У животных группы 2 не наблюдали статистически значимого снижения результатов теста Ширмера, и через 1 месяц его значения составили 13-16 мм. Наибольшее снижение слезопродукции наблюдали через 3 месяца после начала эксперимента. У животных группы 1 результаты теста Ширмера I варьировали от 9 до 13 мм, в то время как в группе контроля его значения находились в пределах 14-16 мм. Результаты теста Ширмера I представлены в Таблице 22.



Рисунок 34 – Проведение пробы Ширмера I у кроликов

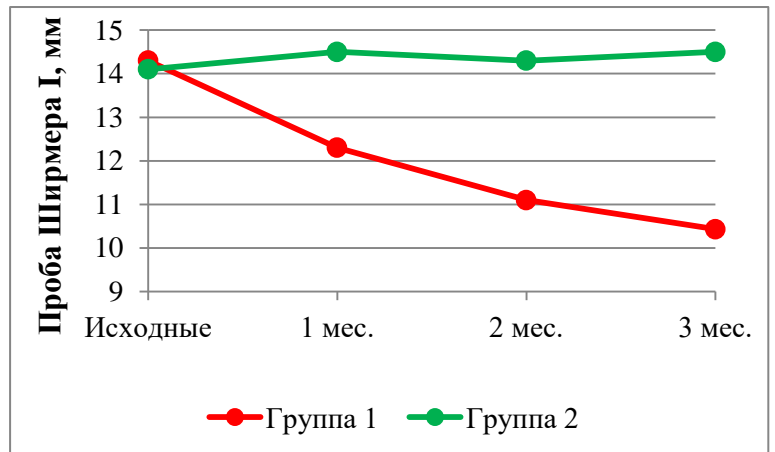


Рисунок 35 – Динамика изменения значений пробы Ширмера I в сравнении

Таблица 22 – Оценка слезопродукции у кроликов исследуемых групп в динамике согласно результатам пробы Ширмера I, мм, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

| Группа  | Срок              |                                  |                                  |                                  |                                 |
|---|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
|   | Исходный          | 14 дней                          | 1 месяц                          | 2 месяца                         | 3 месяца                        |
| Группа 1  | 14,0 (14,0; 15,0) | 14,0 (13,0; 14,0) <sup>1,2</sup> | 12,0 (12,0; 13,0) <sup>1,2</sup> | 11,0 (10,0; 12,0) <sup>1,2</sup> | 10,0 (9,5; 11,0) <sup>1,2</sup> |
| Группа 2  | 14,0 (13,5; 14,5) | 14,0 (13,5; 15,0)                | 15,0 (14,0; 15,0)                | 14,0 (14,0; 15,0)                | 14,0 (14,0; 15,0)               |
| <sup>1</sup> p<0,05 для группы 1 по отношению к группе 2            |                   |                                  |                                  |                                  |                                 |
| <sup>2</sup> p<0,05 по отношению к исходным значениям внутри группы |                   |                                  |                                  |                                  |                                 |

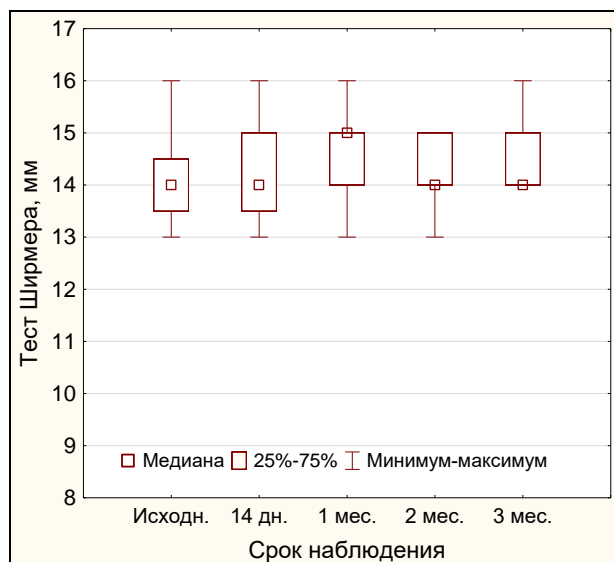


Рисунок 36 – Динамика изменения медиан результатов теста Ширмера I в группе 2 (контрольной)

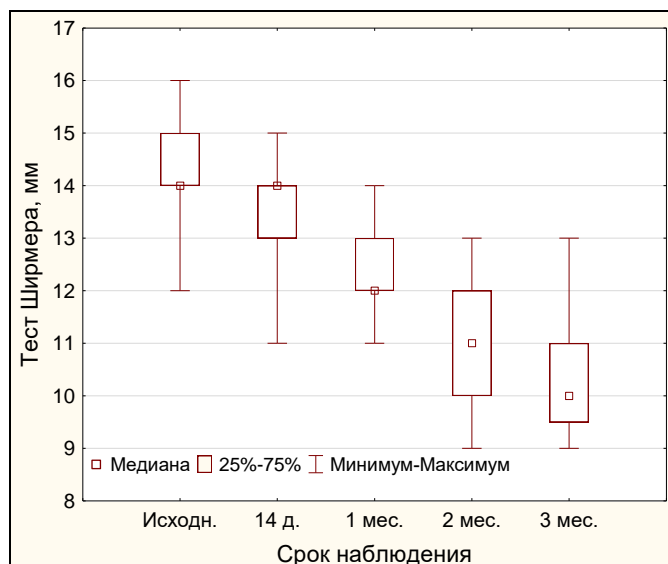


Рисунок 37 – Динамика изменения медиан результатов теста Ширмера I в группе 1

### 5.1.2. Результаты гистологического исследования

На гистологических препаратах, полученных после выведения животных из эксперимента по истечении 3 месяцев, наблюдали повреждение эпителия роговицы в виде расслоения и слущивания верхних слоев в группе 1 (Рисунок 38). В группе 2 эпителий роговицы полностью сохранял свою структуру (Рисунок 39).

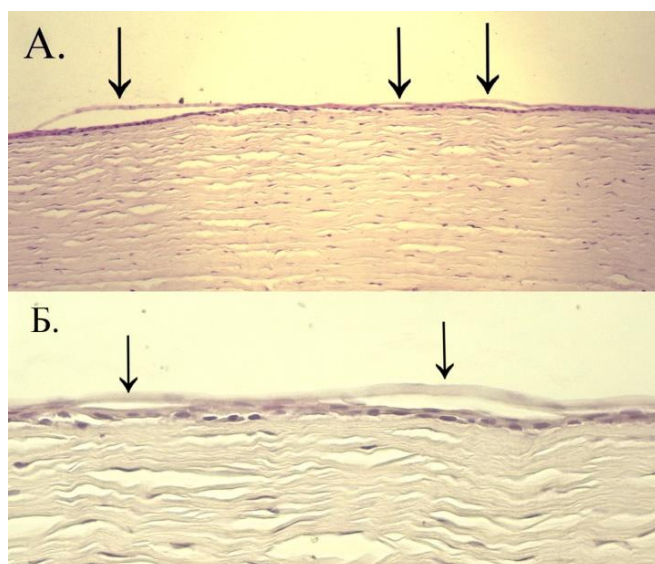


Рисунок 38 – Роговица кролика группы 1.  
Окраска: гематоксилин, эозин.  
Увеличение: А.  $\times 100$ . Б.  $\times 400$ . Расслоение и слущивание верхних слоев эпителия (черные стрелки).

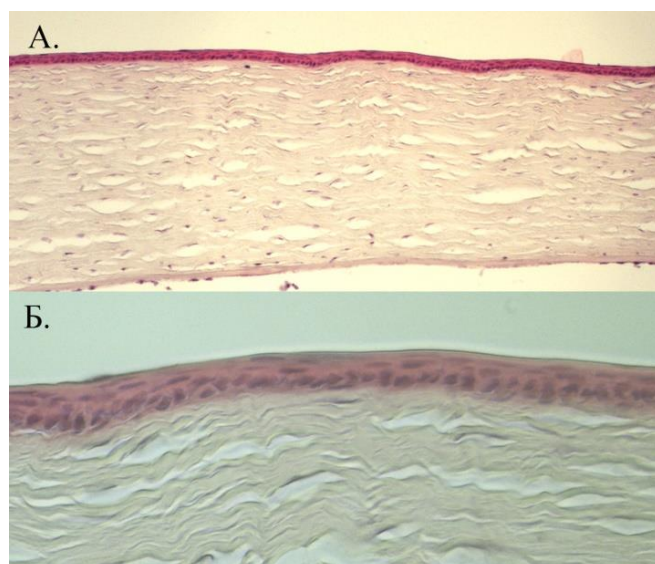


Рисунок 39 – Роговица кролика группы 2.  
Окраска: гематоксилин, эозин.  
Увеличение: А.  $\times 100$ . Б.  $\times 400$ . Повреждение эпителия отсутствует.

У кроликов группы 1 наблюдали изменения конъюнктивы, выразившиеся в увеличении ее общей толщины и количества слоев эпителия с нарушением их архитектоники, увеличением плотности бокаловидных клеток, разрастании соединительной ткани и новообразованных сосудов, повышенной инфильтрации фибробластами и мононуклеарами (Рисунки 40, 42). В группе 2 конъюнктивa характеризовалась меньшей толщиной, правильным послойным строением эпителия, отсутствием грубых тяжей соединительной ткани с новообразованными сосудами, умеренной инфильтрацией мононуклеарами. (Рисунок 41, 43).

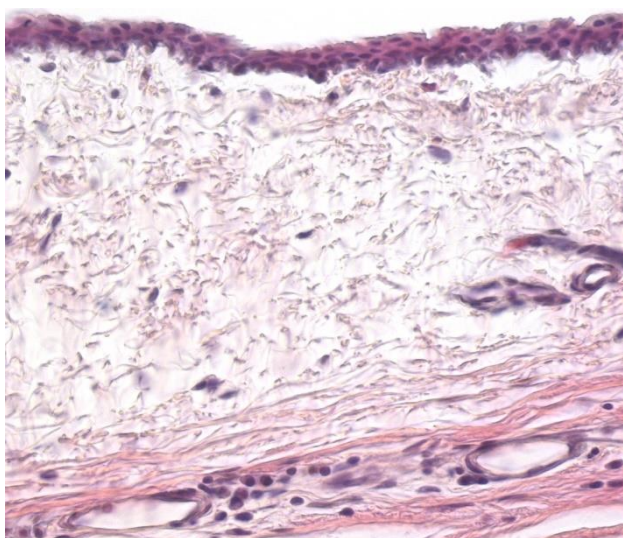


Рисунок 40 – Конъюнктивa кролика группы 1. Окраска: гематоксилин, эозин. Увеличение:  $\times 400$

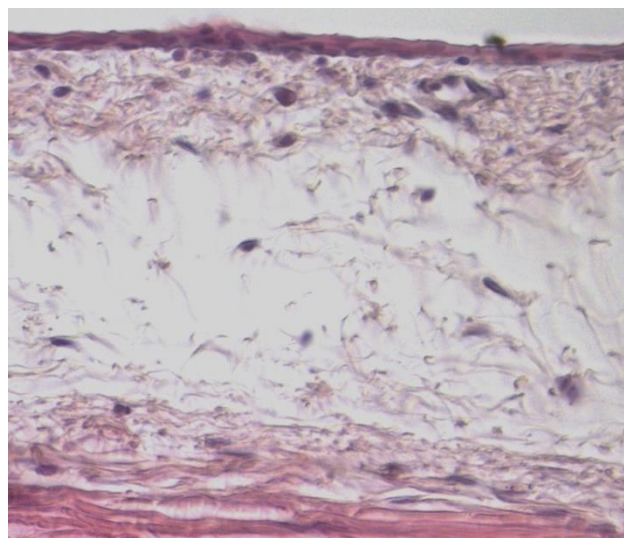


Рисунок 41 – Конъюнктивa кролика группы 2. Окраска: гематоксилин, эозин. Увеличение:  $\times 400$

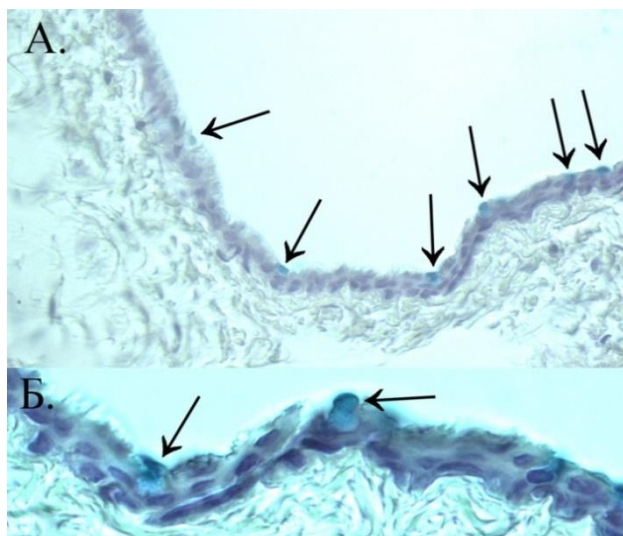


Рисунок 42 – Эпителий конъюнктивы кролика группы 1. Окраска: альциановый синий, гематоксилин Майера. Увеличение: А.  $\times 400$ . Б.  $\times 1000$ , иммерсия. Стрелками указаны бокаловидные клетки.

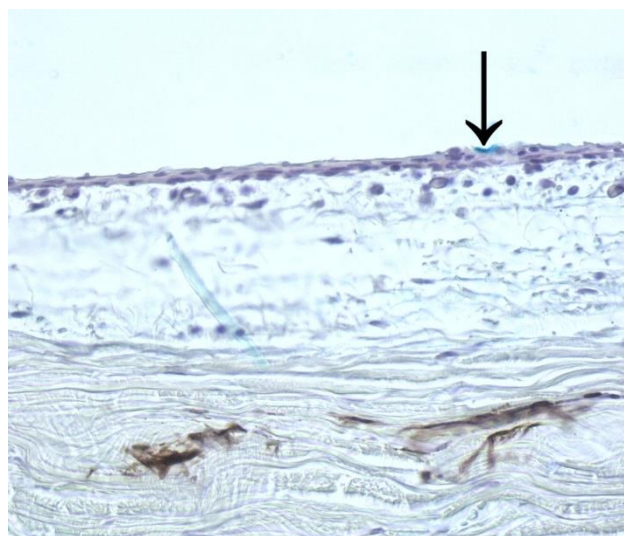


Рисунок 43 – Эпителий конъюнктивы кролика группы 2. Окраска: альциановый синий, гематоксилин Майера. Увеличение:  $\times 400$ . Единичные бокаловидные клетки (стрелка).

Таким образом, полученные изменения глазной поверхности лабораторных животных соответствовали представленным в литературе сведениям о состоянии переднего отрезка глаза, наблюдаемом при длительном лечении консервант-содержащими гипотензивными препаратами. У животных группы 1 наблюдали клиническую картину хронического воспаления по типу ССГ с явлениями конъюнктивальной гиперемии, эпителиопатии и снижением слезопродукции. Гистологическое исследование также подтвердило наличие хронического воспаления с явлениями фиброза, характерного для ССГ, у данной группы животных.

Хроническое воспаление по типу ССГ наблюдается у большинства пациентов, направляемых на хирургическое лечение по поводу глаукомы, вследствие длительного применения консервант-содержащих гипотензивных препаратов. Поэтому полученное состояние глазной поверхности лабораторных животных позволило в дальнейшем оценить влияние исследуемых препаратов на процесс избыточного рубцевания в хирургии глаукомы в условиях, наиболее приближенных к реальной практике.

## **5.2. Результаты гистологического исследования зоны операции**

Для изучения влияния имплантации антиглаукоматозных дренажей, насыщенных циклоспорином А либо эверолимусом, на воспаление и репарацию в операционной ране после проникающего гипотензивного вмешательства выполняли гистологическое исследование зоны операции в сроки 7 дней, 1 и 6 месяцев.

### **Гистологическое исследование через 7 дней после операции**

Согласно данным гистологического анализа, у животных всех групп на 7 день после операции наблюдали умеренно выраженное воспаление.

Дренажи были инфильтрованы гранулоцитами без статистически достоверной разницы между группами. В группе контроля наблюдали умеренное количество мононуклеаров, среди которых отмечали единичные макрофаги (Рисунок 44). В группах ЦсА и эверолимуса количество мононуклеаров было достоверно ниже (Таблица 23). В дренажах группы контроля обращало на себя внимание присутствие небольшого количества гигантских клеток инородных тел (ГКИТ) (Рисунок 45), которые полностью

отсутствовали в группе эверолимуса и встречались как единичные экземпляры в группе ЦсА (Рисунок 46). Дренажи группы эверолимуса, особенно в центральной их части, отличались наличием большого количества клеток в состоянии апоптоза (фибробластов, гранулоцитов и мононуклеаров). При этом признаков нарушения жизнеспособности клеток, окружающих дренаж, выявлено не было (Рисунок 47). В дренажах группы контроля и циклоспорина А наблюдали фибробласты в широком диапазоне значений: от единичных клеток до плотной инфильтрации. Однако согласно данным статистического анализа, в среднем, выраженность инфильтрации фибробластами была достоверно меньше в группе циклоспорина А (Таблица 23).

Таблица 23 – Морфологический анализ клеточной реакции на имплантацию дренажей, в баллах по шкале от 0 до 5, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

| Группа              | Контроль       | Циклоспорин А               | Эверолимус                    |
|---------------------|----------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Гранулоциты         | 2,0 (1,5; 2,0) | 2,0 (1,0; 2,5)              | 1,0 (1,0; 2,0)                |
| Мононуклеары        | 2,0 (2,0; 2,0) | 1,0 (0,5; 2,0) <sup>1</sup> | 0,0 (0,0; 1,0) <sup>1</sup>   |
| ГКИТ                | 1,0 (0,5; 2,5) | 0,0 (0,0; 0,5) <sup>1</sup> | 0,0 (0,0; 0,0) <sup>1</sup>   |
| Фибробласты         | 3,0 (2,5; 3,0) | 2,0 (2,0; 2,5) <sup>1</sup> | 0,0 (0,0; 0,5) <sup>1,2</sup> |
| Коллаген            | 2,0 (1,5; 3,0) | 1,0 (0,5; 2,0) <sup>1</sup> | 0,0 (0,0; 0,0) <sup>1,2</sup> |
| Капсула             | 3,0 91,5; 4,0) | 1,0 (1,0; 1,5) <sup>1</sup> | 0,0 (0,0; 1,5) <sup>1</sup>   |
| Сосуды              | 1,0 (0,0; 2,0) | 0,0 (0,0; 0,0)              | 0,0 (0,0; 0,0) <sup>1</sup>   |
| Фильтрующие полости | 2,0 (1,0; 2,0) | 2,0 (1,5; 3,0)              | 1,5 (1,0; 2,0)                |

<sup>1</sup> p<0,05 в сравнении с контрольной группой; <sup>2</sup> p<0,05 в сравнении с группой ЦсА

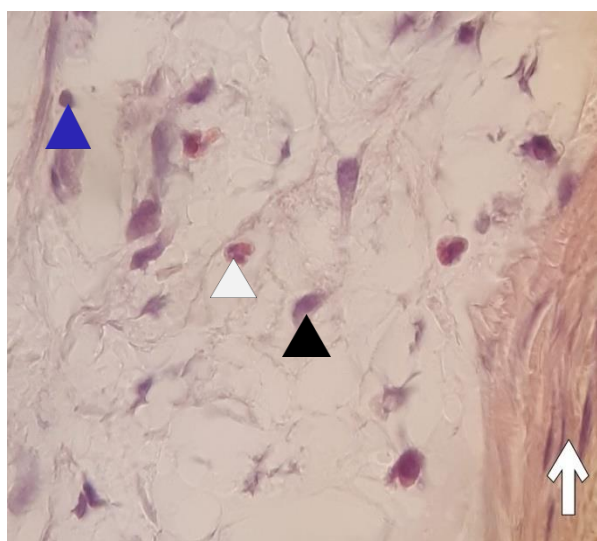


Рисунок 44 – Клеточный состав внутри дренажа группы контроля. Срок: 7 дней. Окраска: гематоксилин, эозин. Увеличение ×630. Иммерсия.

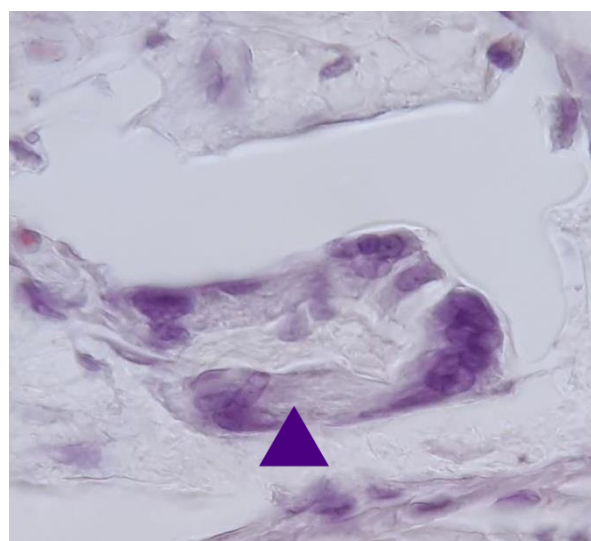


Рисунок 45 – Гигантская клетка инородных тел в материале дренажа группы контроля. Срок: 7 дней. Окраска: гематоксилин, эозин. Увеличение ×630. Иммерсия

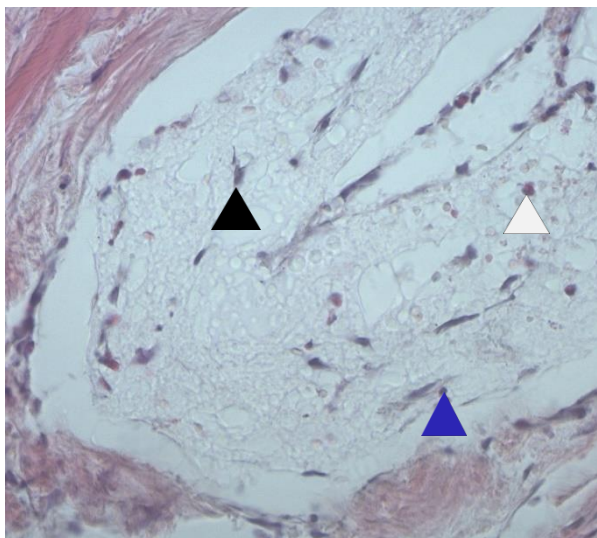


Рисунок 46 – Клеточный состав внутри дренажа группы ЦсА. Срок: 7 дней.

Окраска: гематоксилин, эозин.

Увеличение  $\times 400$ .

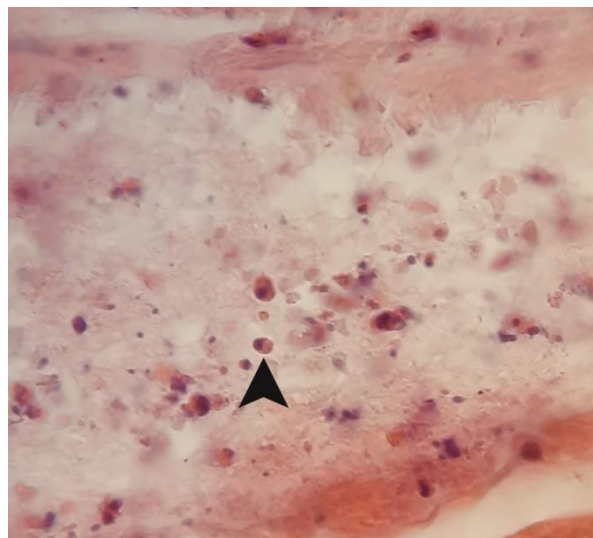


Рисунок 47 – Клеточный состав внутри дренажа, насыщенного эверолимусом.

Срок: 7 дней. Окраска: гематоксилин, эозин. Увеличение  $\times 630$ . Иммерсия.

Черный указатель - апоптозные тельца.

↑ - капсула, ▲ - мононуклеары, △ - гранулоциты, ▲ - фибробласты, ▲ - ГКИТ

На 7 день после операции в исследуемых срезах отмечали формирование соединительнотканной капсулы вокруг дренажей. Капсулы дренажей, насыщенных иммунодепрессантами, либо отсутствовали (Рисунок 53), либо характеризовались меньшей толщиной и были представлены молодыми фибробластами, расположенными в 1-3 ряда (Рисунки 50-52). Среди дренажей контрольной группы встречали как образцы, окруженные толстым слоем коллагенового матрикса, так и дренажи, окруженные слабовыраженной капсулой (Рисунок 48). Исследование количества сосудов в зоне вмешательства не показало статистически достоверных различий между группами ЦсА и контроля, в то время как новообразованные сосуды в зоне имплантации дренажа полностью отсутствовали на гистологических срезах группы эверолимуса (Таблица 23).

С помощью окраски гематоксилином и пикросириусом красным изучали интенсивность синтеза коллагена внутри дренажа (Таблица 23). Наибольшее количество коллагеновых волокон в материале дренажа обнаруживали у животных группы контроля (Рисунок 49), средние показатели были характерны для группы ЦсА (Рисунок 51). Признаки коллагенообразования в дренажах группы эверолимуса отсутствовали в данные сроки (Рисунок 53).

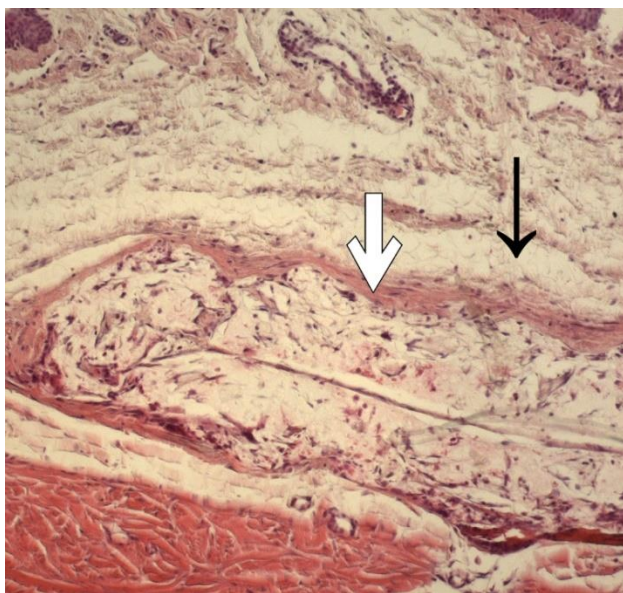


Рисунок 48 – Срез через зону имплантации дренажа группы контроля. Срок: 7 дней. Окраска: гематоксилин, пикрофуксин. Увеличение  $\times 100$ .

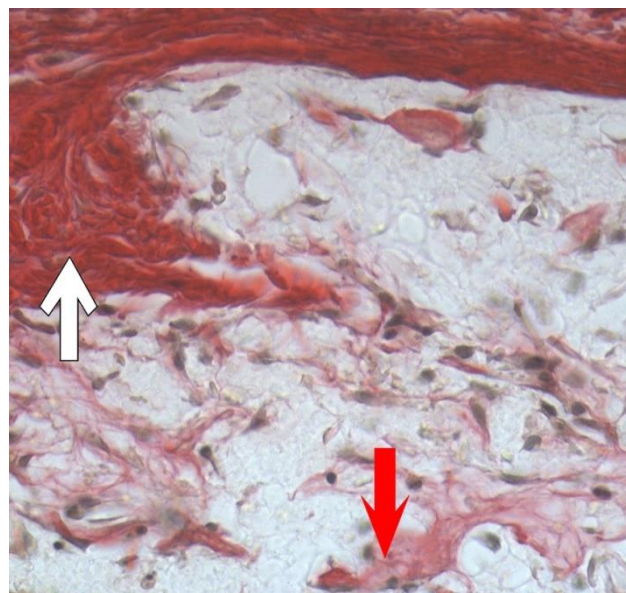


Рисунок 49 – Дренаж группы контроля. Срок: 7 дней. Окраска: гематоксилин, пикросириус красный. Увеличение  $\times 400$ .

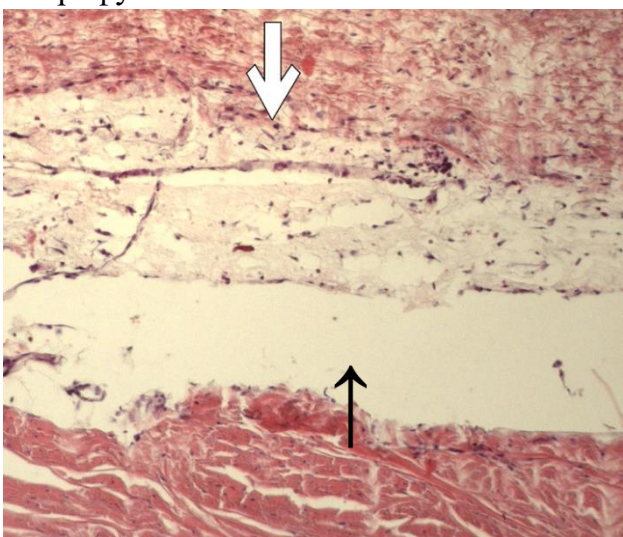


Рисунок 50 – Срез через зону имплантации дренажа группы ЦсА. Срок: 7 дней. Окраска: гематоксилин, пикрофуксин. Увеличение  $\times 100$ .

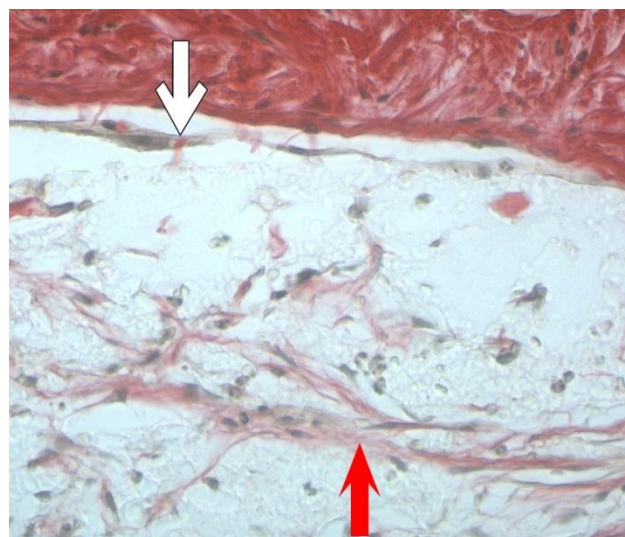


Рисунок 51 – Дренаж группы ЦсА. Срок: 7 дней. Окраска: гематоксилин, пикросириус красный. Увеличение  $\times 400$ .

↑ - капсула, ↑ - фильтрующие пространства, ↑ - коллаген

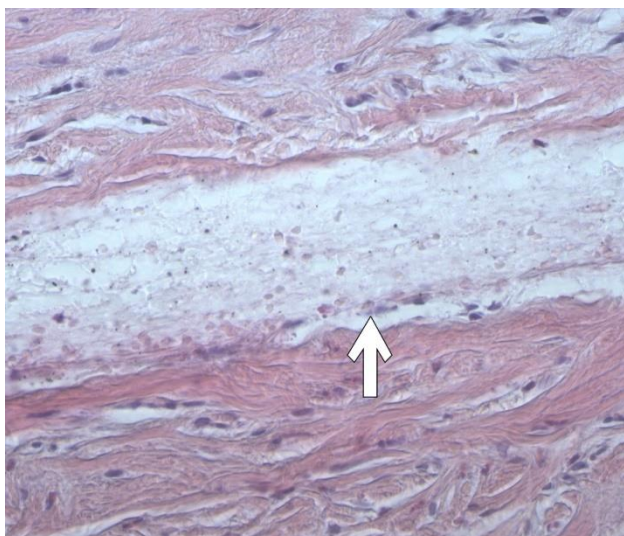


Рисунок 52 – Срез через зону имплантации дренажа группы эверолимуса. Срок: 7 дней. Окраска: гематоксилин, эозин. Увеличение  $\times 100$ .

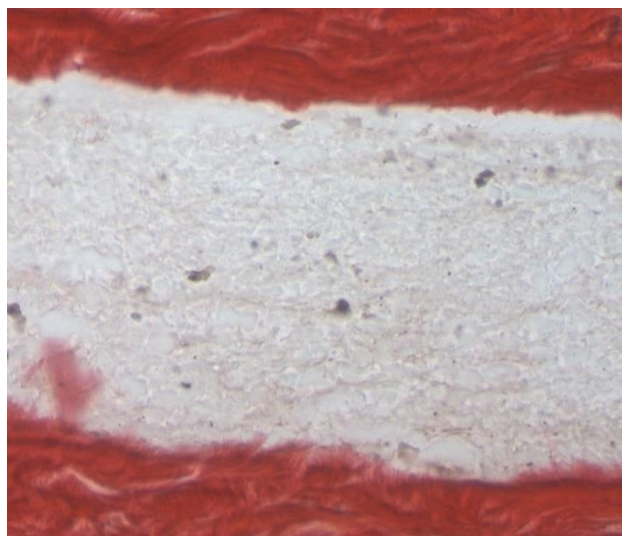


Рисунок 53 – Дренаж группы эверолимуса. Срок: 7 дней. Окраска: гематоксилин, пикросириус красный. Увеличение  $\times 400$ . Коллаген внутри дренажа отсутствует. Капсулы нет.

↑ - капсула, ↑ - фильтрующие пространства, ↑ - коллаген

Также следует отметить, что в данные сроки дренажи групп контроля и ЦсА в большинстве случаев свободно располагались в слоях склеры, а также между эписклерой и конъюнктивой с хорошо выраженными полостями вокруг. Для дренажей группы эверолимуса в данные сроки было характерно более плотное прилегание окружающих тканей. На 7 день после операции конъюнктив большинства животных характеризовалась рыхлым расположением волокон, которые визуальнo были обводнены.

### **Гистологическое исследование через 1 месяц после операции**

К сроку 1 месяц после операции дренажи подвергались частичной резорбции. Внутри дренажей в группах контроля и эверолимуса отмечали небольшое количество гранулоцитов, в группе ЦсА – единичные клетки. Количество мононуклеаров было наиболее значительным в группе контроля, чуть меньшее их количество наблюдали в группе ЦсА. В группе эверолимуса выявляли единичные мононуклеары. В группах контроля и ЦсА присутствовали ГКИТ от умеренного количества до выраженной инфильтрации (Рисунки 54-56), в то время как в дренажах группы эверолимуса были



лишь единичные ГКИТ (Рисунок 57, Таблица 24). В инкапсулированных дренажах группы контроля наблюдали выраженную инфильтрацию гранулоцитами и мононуклеарами.

Таблица 24 – Морфологический анализ зоны имплантации дренажей через 1 месяц после вмешательства, в баллах по шкале от 0 до 5, Ме (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

| Группа       | Контроль       | Циклоспорин А               | Эверолимус                    |
|--------------|----------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Гранулоциты  | 1,0 (0,5; 1,5) | 0,0 (0,0; 0,5) <sup>1</sup> | 1,0 (0,0; 1,0)                |
| Мононуклеары | 4,0 (3,5; 4,0) | 2,0 (2,0; 3,0) <sup>1</sup> | 1,0 (1,0; 1,0) <sup>1,2</sup> |
| ГКИТ         | 3,5 (2,0; 4,0) | 3,5 (3,0; 5,0)              | 0,5 (0,0; 1,0) <sup>1,2</sup> |
| Фибробласты  | 3,5 (2,0; 4,0) | 1,5 (1,0; 2,5) <sup>1</sup> | 2,0 (1,0; 2,0) <sup>1</sup>   |
| Коллаген     | 3,0 (2,5; 3,5) | 1,0 (0,0; 2,5) <sup>1</sup> | 2,5 (2,0; 4,0)                |
| Капсула      | 3,0 (2,5; 3,5) | 2,0 (1,0; 2,5) <sup>1</sup> | 0,5 (0,0; 1,0) <sup>1</sup>   |
| Сосуды       | 2,5 (2,0; 3,0) | 2,9 (1,0; 2,5)              | 0,5 (0,0; 1,0) <sup>1</sup>   |
| ФП           | 1,0 (0,5; 2,5) | 3,0 (3,0; 3,5) <sup>1</sup> | 3,0 (2,5; 3,5) <sup>1,2</sup> |

<sup>1</sup> p<0,05 в сравнении с контрольной группой, <sup>2</sup> p<0,05 в сравнении с группой циклоспорина А

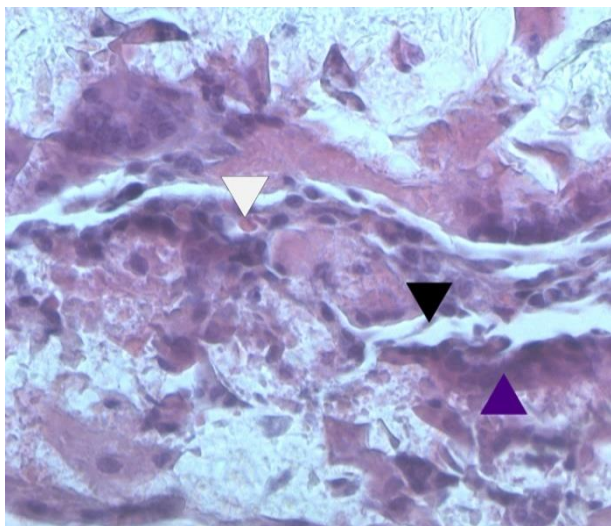


Рисунок 54 – Клеточный состав дренажа группы контроля. Срок: 1 месяц.  
Окраска: гематоксилин, эозин.  
Увеличение ×400.

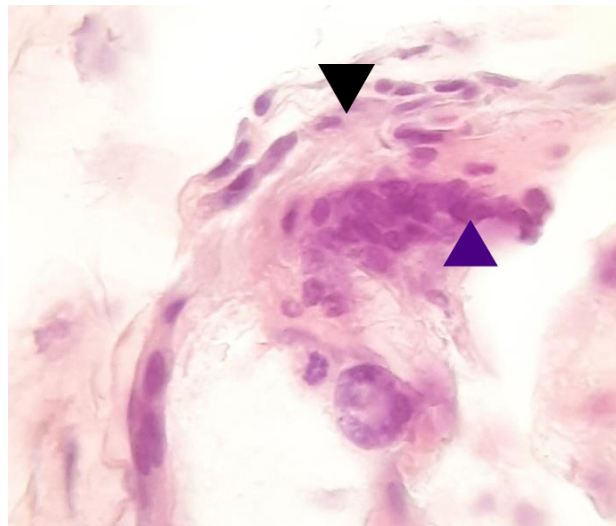


Рисунок 55 – Ряд фибробластов над ГКИТ (группа контроля). Окраска: гематоксилин, эозин. Увеличение ×630. Иммерсия.

△ - гранулоциты, ▲ - фибробласты, ▲ - ГКИТ

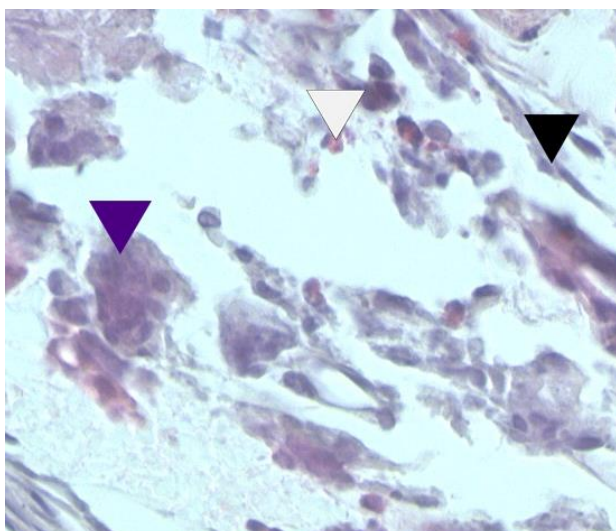


Рисунок 56 – Клеточный состав дренажа группы ЦсА. Срок: 1 месяц. Окраска: гематоксилин, эозин. Увеличение  $\times 400$ .

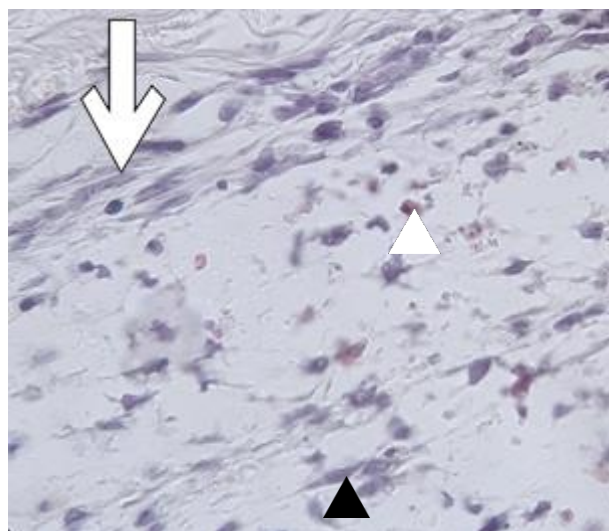


Рисунок 57 – Клеточный состав дренажа, насыщенного эверолимусом. Срок: 1 месяц. Окраска гематоксилин, эозин. Увеличение  $\times 630$ . Иммерсия. Белой стрелкой указана рыхлая капсула

△ - гранулоциты, ▲ - фибробласты, ▲ - ГКИТ

Достоверно большее число фибробластов наблюдали в дренажах группы контроля в сравнении с образцами, насыщенными иммунодепрессантами. Высокой плотности фибробластов соответствовала и более высокая интенсивность синтеза коллагена внутри дренажей в группе контроля в сравнении с остальными группами (Рисунки 60, 62, 64). Количество кровеносных сосудов было ниже в группе эверолимуса и ЦсА в сравнении с группой контроля, однако статистически достоверная разница по данному показателю была обнаружена лишь между группами контроля и эверолимуса (Таблица 24).

В срок 1 месяц после операции наблюдали особенности формирования соединительнотканых капсул вокруг дренажей. Достоверной разницы между толщиной капсул групп контроля и эверолимуса не было. Однако в группе контроля в отличие от группы эверолимуса четко прослеживалось двойная стенка капсулы – со стороны окружающих дренаж тканей и непосредственно на поверхности дренажа (Рисунок 58). При этом фибробласты, образующие капсулу на поверхности дренажа, располагались над ГКИТ, которые, предположительно, инициировали миграцию фибробластов и стимулировали их пролиферативную и коллагенсинтетическую активность (Рисунок 55). Достоверно более тонкие капсулы формировались вокруг дренажей,

насыщенных ЦсА. Капсула в данной группе формировалась преимущественно, со стороны окружающих тканей, с сохранением хорошо выраженных пространств внутри дренажа (Рисунок 60). Наиболее выраженный синтез коллагена наблюдали в дренажах группы контроля (Рисунок 59). В группах ЦсА и эверолимуса коллаген располагался в виде тонких тяжей внутри дренажа (Рисунки 61, 63). Характерной особенностью зон операции с имплантацией дренажей, насыщенных эверолимусом, было формирование над ними выраженных фильтрующих полостей, ограниченных 1-3 рядами фибробластов (Рисунок 62). В конъюнктиве группы ЦсА также прослеживали формирование полостей для оттока ВГЖ (Рисунок 60). Фильтрующие пространства в группе контроля были выражены в наименьшей степени либо отсутствовали (Рисунок 58, Таблица 24).

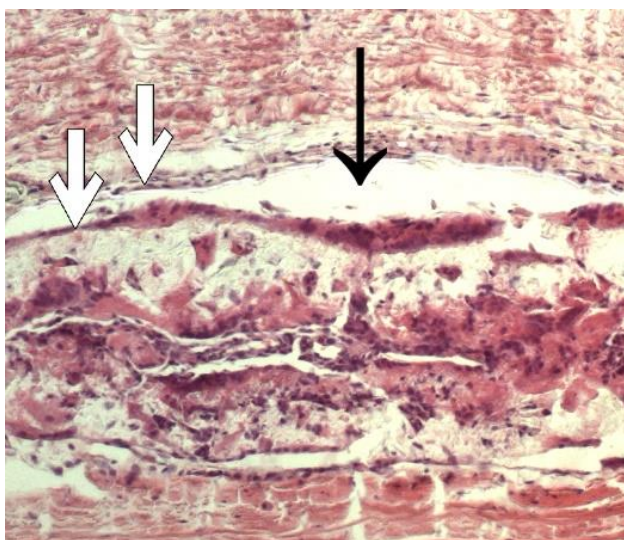


Рисунок 58 – Срез через зону имплантации дренажа группы контроля. Срок: 1 месяц. Окраска: гематоксилин, эозин. Увеличение  $\times 100$ .

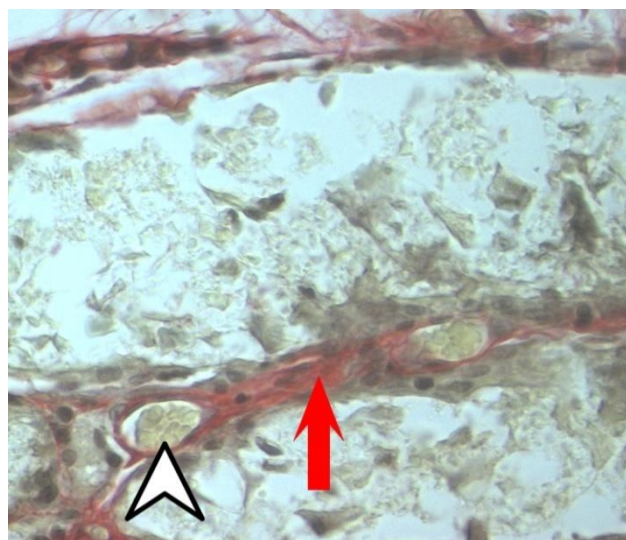


Рисунок 59 – Дренаж группы контроля через 1 месяц после операции. Окраска: гематоксилин, пикросириус красный. Увеличение  $\times 400$ .

↑ - капсула, ↑ - фильтрующие пространства, ↑ - коллаген, △ - сосуды

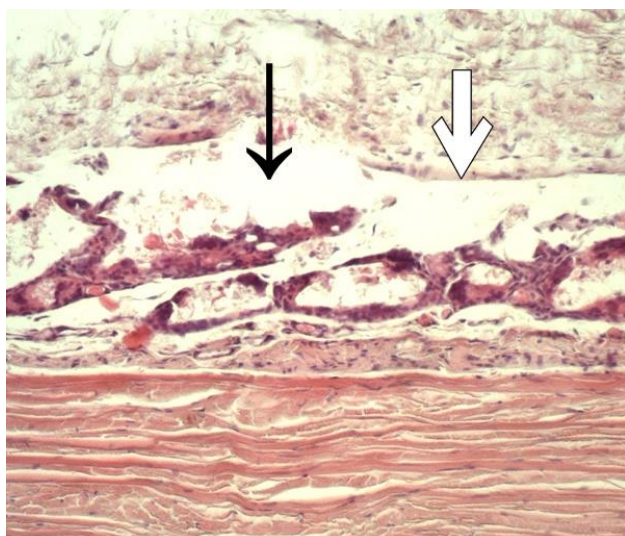


Рисунок 60 – Срез через зону имплантации дренажа группы ЦсА через 1 месяц после операции. Окраска: гематоксилин, эозин. Увеличение  $\times 100$ .

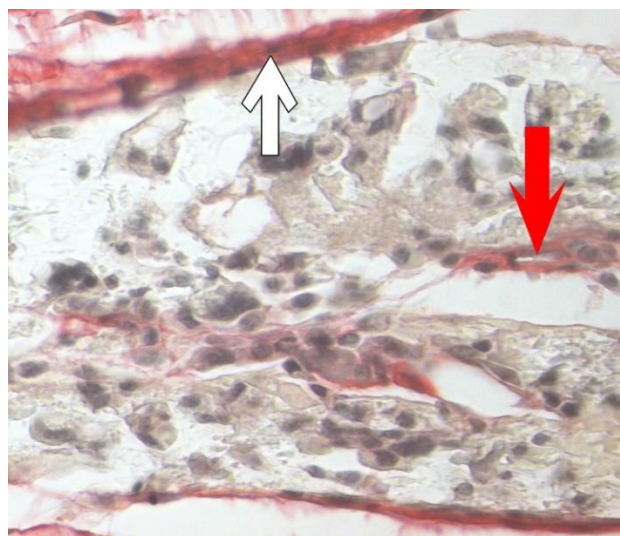


Рисунок 61 – Дренаж группы ЦсА через 1 месяц после операции. Окраска: гематоксилин, пикросириус красный. Увеличение  $\times 400$ .

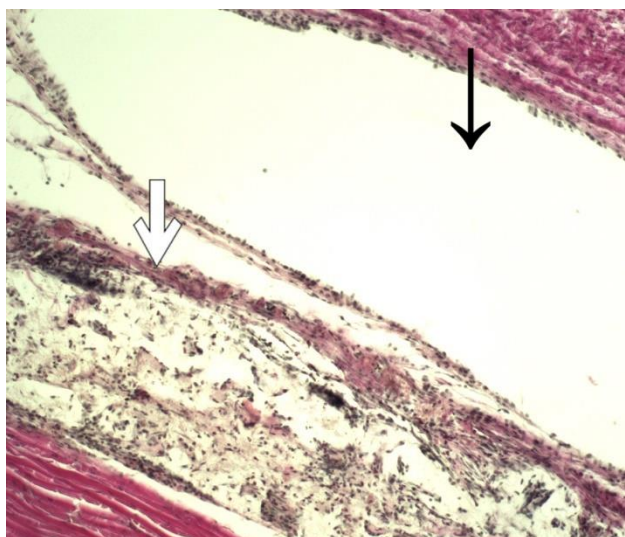


Рисунок 62 – Срез через зону имплантации дренажа группы эверолимуса через 1 месяц после операции. Окраска: гематоксилин, пикрофуксин. Увеличение  $\times 100$ .

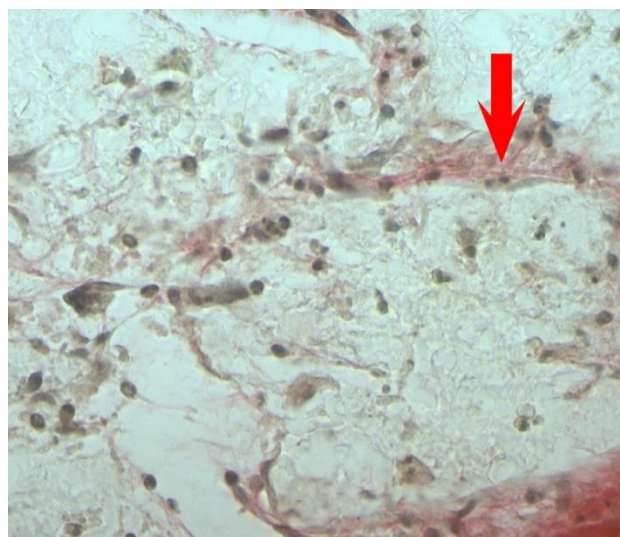


Рисунок 63 – Дренаж группы эверолимуса через 1 месяц после операции. Окраска: гематоксилин, пикросириус красный. Увеличение  $\times 400$ .

↑ - капсула, ↑ - фильтрующие пространства, ↑ - коллаген, △ - сосуды

### Гистологическое исследование через 6 месяцев после операции

Через 6 месяцев после операции дренажи животных всех групп подвергались практически полной резорбции. Характерной была инфильтрация дренажей мононуклеарами, преимущественно, макрофагами, и ГКИТ. Наибольшее количество

мононуклеаров и ГКИТ отмечали в зоне имплантации дренажей группы контроля. Наименьшие значения наблюдали в группе эверолимуса. Группа ЦсА занимала промежуточное положение по данным показателям (Таблица 25, Рисунки 61-66). В группе контроля также наблюдали большое количество фибробластов в зоне имплантации дренажей. Достоверно меньшее количество данных клеток наблюдали в дренажах, насыщенных иммунодепрессантами. В данные сроки характерным для всех групп было разрастание кровеносных сосудов в зоне операции, однако в группах дренажей, насыщенных иммунодепрессантами, их число было меньше (Таблица 25).

Таблица 25 – Морфологический анализ зоны имплантации дренажей через 6 месяцев после вмешательства, в баллах по шкале от 0 до 5, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

| Группа  | Контроль                    | Циклоспорин А               | Эверолимус                    |
|---|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Мононуклеары  | 3,5 (2,5; 4,0)              | 2,0 (2,0; 3,0) <sup>1</sup> | 1,0 (1,0; 2,0) <sup>1,2</sup> |
| ГКИТ  | 4,0 (3,5; 4,0)              | 2,0 (1,0; 2,0) <sup>1</sup> | 1,0 (0,0; 1,0) <sup>1,2</sup> |
| Фибробласты   | 3,5 (3,0; 4,0)              | 2,0 (1,0; 2,0) <sup>1</sup> | 2,0 (1,0; 2,0) <sup>1</sup>   |
| Капсула   | 3,5 (3,0; 4,0)              | 1,0 (0,0; 1,0) <sup>1</sup> | 2,0 (1,5; 3,0) <sup>1,2</sup> |
| Сосуды  | 3,5 (3,0; 4,0)              | 3,0 (2,5; 3,0) <sup>1</sup> | 3,0 (2,0; 3,0) <sup>1</sup>   |
| Фиброз конъюнктивы  | 3,5 (3,0; 4,5)              | 1,5 (1,0; 2,0) <sup>1</sup> | 0,0 (0,0; 1,0) <sup>1,2</sup> |
| Фильтрующие полости   | 2,0 (2,0; 2,5) <sup>1</sup> | 2,0 (2,0; 2,5) <sup>1</sup> | 2,0 (2,0; 2,5) <sup>1</sup>   |
| <sup>1</sup> p<0,05 в сравнении с контрольной группой, <sup>2</sup> p<0,05 в сравнении с группой циклоспорино А |                             |                             |                               |

В конъюнктиве животных групп контроля и ЦсА отмечали фиброз конъюнктивы в поверхностных слоях. Особенно интенсивное разрастание соединительной ткани с новообразованными сосудами отмечали в группе контроля (Рисунок 65.А). Интенсивность фиброза в группе ЦсА была достоверно меньше. Практически не наблюдали рубцевания конъюнктивы в группе эверолимуса.

Зоны имплантации дренажей всех групп были окружены соединительнотканскими капсулами, наиболее выраженными в контрольной группе. Чуть меньше были выражены капсулы в группе эверолимуса, однако капсулы данной группы отличались более рыхлым строением в сравнении с капсулами группы контроля. Наименее выраженные капсулы были сформированы вокруг дренажей группы ЦсА.

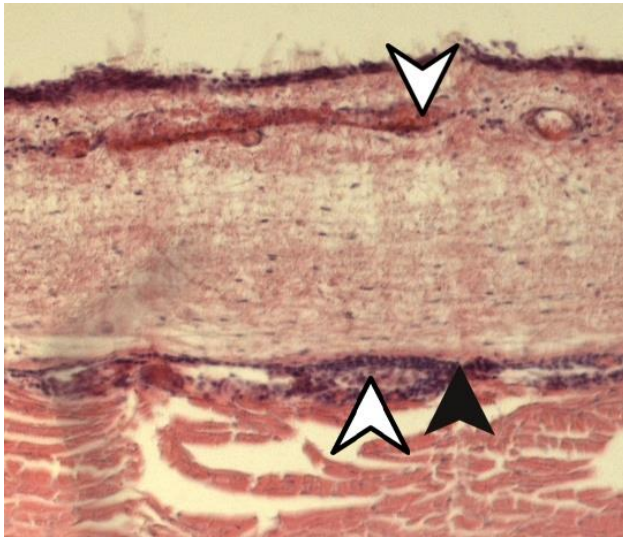


Рисунок 64 – Срез через зону имплантации дренажа группы контроля. Срок: 6 месяцев. Окраска: гематоксилин, эозин. Увеличение  $\times 100$ .

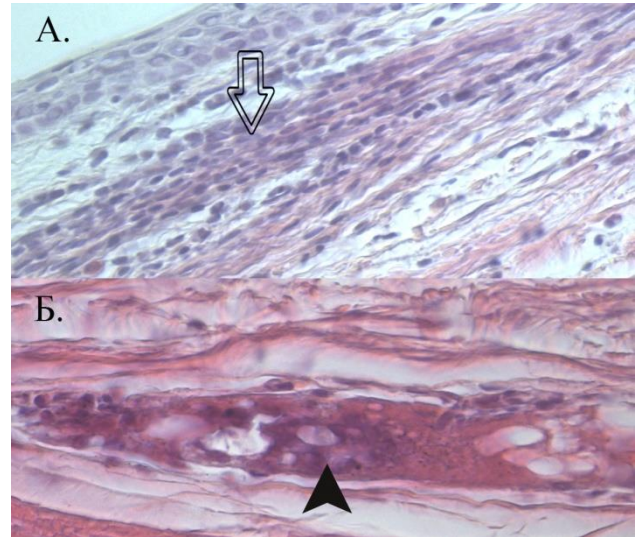


Рисунок 65.А – Конъюнктура глаза группы контроля. Срок: 6 месяцев. Окраска: гематоксилин, эозин.

Увеличение  $\times 400$ .

Рисунок 65.Б – Зона установки дренажа группы контроля. Окраска: гематоксилин, эозин. Увеличение  $\times 400$ .

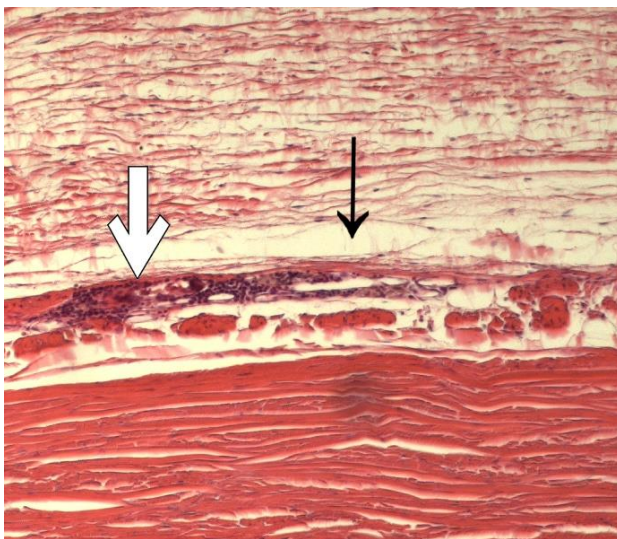


Рисунок 66 – Срез через зону имплантации дренажа группы ЦсА. Срок: 6 месяцев. Окраска: гематоксилин, эозин. Увеличение  $\times 100$ .

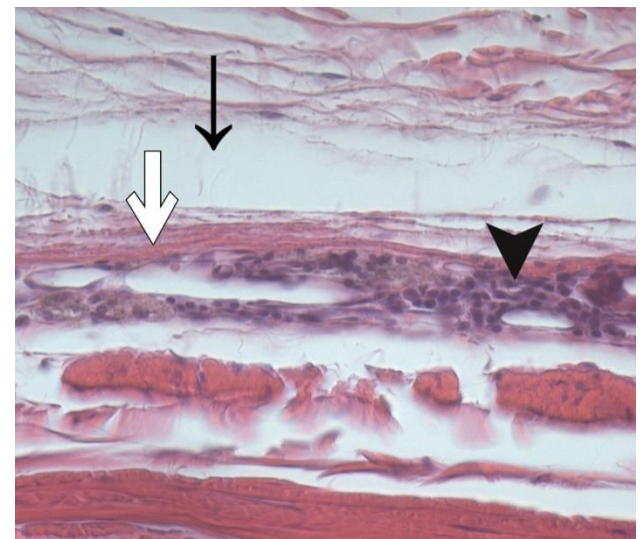







Рисунок 67 – Зона имплантации дренажа группы ЦсА. Срок: 6 месяцев. Окраска: гематоксилин, эозин. Увеличение  $\times 400$ .

 - капсула,  - фильтрующие пространства,  - сосуды,  - зона фиброза,  
 - зона инфильтрации мононуклеарами, ГКИТ, фибробластами

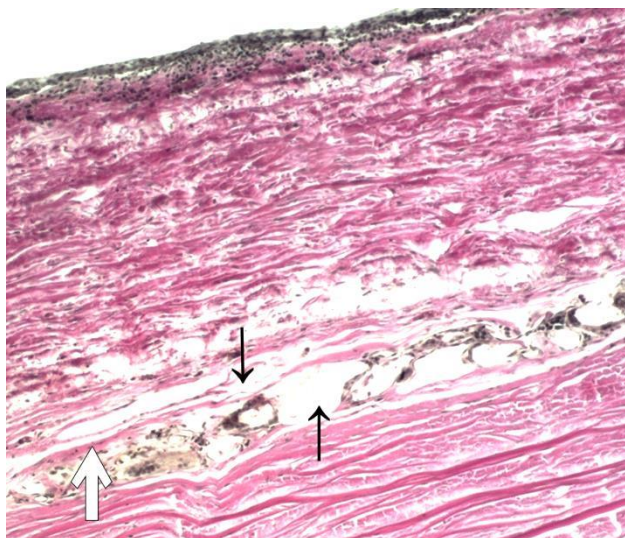


Рисунок 68 – Срез через зону имплантации дренажа группы эверолимуса. Срок: 6 месяцев. Окраска: гематоксилин, пикрофуксин. Увеличение  $\times 100$ .

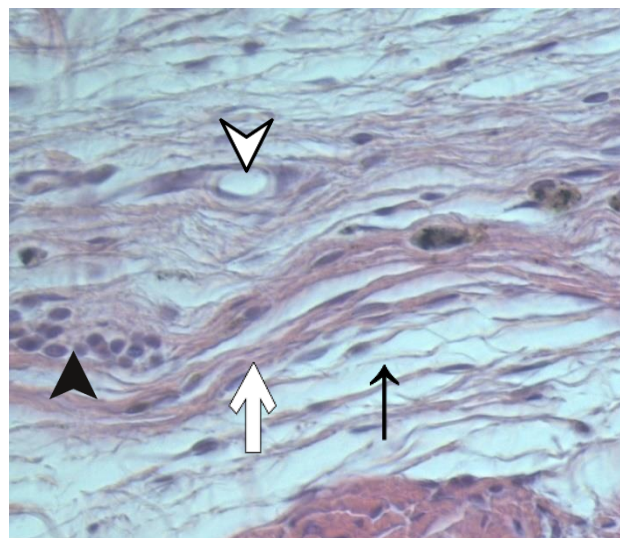


Рисунок 69 – Зона имплантации дренажа группы эверолимуса. Срок: 6 месяцев. Окраска: гематоксилин, эозин. Увеличение  $\times 400$ .

- капсула,  - фильтрующие пространства,  - сосуды,  - зона фиброза,  
 - зона инфильтрации мононуклеарами, ГКИТ, фибробластами

В группах дренажей, насыщенных иммунодепрессантами, сохранялись полости для оттока ВГЖ в зоне операции. В группе ЦсА фильтрующие полости наблюдали преимущественно в конъюнктиве, где они были слабо отграничены тонкими коллагеновыми волокнами (Рисунок 66). В группе эверолимуса частично внутри дренажей, а также над ними сохранялись полости, отграниченные тонкой проницаемой капсулой (Рисунок 68). В конъюнктиве над зоной имплантации дренажа отмечали рыхлое расположение волокон (Рисунок 65). В контрольной группе полостей, через которые могла бы происходить фильтрация ВГЖ, практически не наблюдали (Рисунок 64, Таблица 25).

Таким образом, уже в ранние сроки после операции наблюдали различную интенсивность клеточной пролиферации в исследуемых группах. В группах животных, прооперированных с применением иммунодепрессантов, наблюдали меньшее количество фибробластов и коллагена внутри и вокруг материала дренажа. Кроме того, применение иммунодепрессантов уменьшало интенсивность реакции тканей глаза на

инородное тело, что выражалось в достоверном снижении количества ГКИТ, которые полностью отсутствовали в группе эверолимуса.

Полученные данные свидетельствуют о том, что применение иммунодепрессантов может сдерживать активирующее влияние факторов роста и цитокинов ВГЖ на активацию и пролиферацию фибробластов и образование ГКИТ, в результате чего было выявлено снижение их плотности в зонах имплантации дренажей, насыщенных циклоспорином А или эверолимусом.

Дренажи, насыщенные иммунодепрессантами, сохраняли хорошую фильтрующую способность как в ранние, так и в отдаленные сроки после операции. Дренажи контрольной группы обладали меньшей способностью к фильтрации за счет образования вокруг них двойной капсулы. При этом выраженных фильтрующих полостей вокруг дренажа не наблюдали.

Через 6 месяцев инфильтрация зоны имплантации дренажей мононуклеарами, преимущественно, макрофагами и ГКИТ свидетельствовала о продолжающейся реакции на инородное тело, выраженной в наименьшей степени в группе эверолимуса. Только в группах ЦсА и эверолимуса наблюдали сохранение полостей, выраженных в достаточной степени для оттока ВГЖ.

Данные гистологического исследования подтвердили снижение интенсивности воспаления и репарации в зоне операции после выполнения проникающего гипотензивного вмешательства с применением селективных иммунодепрессантов.

### **5.3. Клинико-функциональные результаты гипотензивных вмешательств, выполненных *in vivo***

Для определения клинико-функционального эффекта хирургических вмешательств с применением антиглаукоматозных дренажей, насыщенных циклоспорином А, эверолимусом либо не насыщенных какими-либо препаратами, в эксперименте *in vivo* выполняли офтальмологическое обследование животных в послеоперационном периоде со сравнительной оценкой морфологии фильтрационных подушек по классификации IBAGS, состояния глазной поверхности и количества осложнений. Также с помощью тонометрии выполняли сравнительный анализ гипотензивного эффекта операций.



### 5.3.1. Результаты офтальмологического обследования животных

#### Ранние результаты (1-7 дней).

Общая конъюнктивальная инъекция на следующий день и в течение 3 дней после вмешательства в большинстве случаев носила умеренный характер на глазах животных всех групп без статистически достоверной разницы. В дальнейшем общая гиперемия ослабевала вплоть до ее исчезновения к 7-му дню после операции в группах контроля и ЦсА. Чуть дольше держалась гиперемия в группе эверолимуса, и на 7-е сутки легкая гиперемия присутствовала на 4-х глазах данной группы.

Сразу после и на следующий день после вмешательства фильтрационные подушки (ФП) хорошо функционировали у животных всех групп. Не было выявлено статистически достоверных различий в высоте ФП между группами на 1 и 3 дни после операции. На 7 день средняя высота ФП была достоверно выше в группе эверолимуса в сравнении с контрольной группой. При этом разница в высоте ФП группы эверолимуса и ЦсА, а также ЦсА и группы контроля не была достоверной. ФП обеих исследуемых групп характеризовались большей шириной в сравнении с группой контроля с первых дней после операции (Таблица 26, Рисунки 70-75).

Таблица 26 – Данные оценки общей конъюнктивальной инъекции и морфологии фильтрационных подушек в первые 7 дней после операции, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

| Группа   | Срок после операции         |                             |                               |
|--|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
|  | 1 день                      | 3 дня                       | 7 дней                        |
| <b>Общая гиперемия (в баллах по шкале от 0 до 3)</b>                 |                             |                             |                               |
| Контроль   | 2,0 (1,0; 2,0)              | 1,0 (1,0; 1,0)              | 0,0 (0,0; 0,0)                |
| Циклоспорин А  | 2,0 (1,0; 2,0)              | 1,0 (1,0; 1,0)              | 0,0 (0,0; 0,0)                |
| Эверолимус   | 1,5 (1,0; 2,0)              | 1,0 (1,0; 1,0)              | 0,0 (0,0; 1,0) <sup>1,2</sup> |
| <b>Высота ФП (в баллах по классификации IBAGS от 0 до 3)</b>         |                             |                             |                               |
| Контроль   | 2,0 (1,0; 2,0)              | 2,0 (1,0; 2,0)              | 1,0 (0,0; 1,5)                |
| Циклоспорин А  | 1,5 (1,0; 2,0)              | 1,5 (1,0; 2,0)              | 1,5 (1,0; 2,0)                |
| Эверолимус   | 2,0 (1,0; 2,0)              | 2,0 (1,0; 2,0)              | 2,0 (1,5; 2,0) <sup>1</sup>   |
| <b>Ширина ФП (в баллах по классификации IBAGS от 0 до 3)</b>         |                             |                             |                               |
| Контроль   | 2,0 (1,5; 2,0)              | 2,0 (1,0; 2,0)              | 1,0 (1,0; 2,0)                |
| Циклоспорин А  | 3,0 (2,0; 3,0) <sup>1</sup> | 3,0 (2,0; 3,0) <sup>1</sup> | 2,0 (2,0; 3,0) <sup>1</sup>   |
| Эверолимус   | 3,0 (2,0; 3,0) <sup>1</sup> | 2,5 (2,0; 3,0) <sup>1</sup> | 2,5 (2,0; 3,0) <sup>1</sup>   |
| <b>Васкуляризация ФП (в баллах по классификации IBAGS от 0 до 4)</b> |                             |                             |                               |
| Контроль   | 3,0 (2,0; 3,0)              | 2,0 (2,0; 3,0)              | 2,0 (1,5; 2,0)                |
| Циклоспорин А  | 3,0 (2,0; 3,0)              | 2,5 (2,0; 3,0)              | 2,0 (1,0; 2,0)                |
| Эверолимус   | 2,5 (2,0; 3,0)              | 3,0 (3,0; 3,0) <sup>1</sup> | 2,0 (2,0; 2,0) <sup>1</sup>   |
| <b>Проба Зейделя (в баллах по классификации IBAGS от 0 до 2)</b>     |                             |                             |                               |
| Контроль   | 0,0 (0,0; 0,0)              | 0,0 (0,0; 0,0)              | 0,0 (0,0; 0,0)                |
| Циклоспорин А  | 0,0 (0,0; 0,0)              | 0,0 (0,0; 0,0)              | 0,0 (0,0; 0,0)                |
| Эверолимус   | 0,0 (0,0; 0,0)              | 0,0 (0,0; 0,0)              | 0,0 (0,0; 0,0)                |

<sup>1</sup> p<0,05 в сравнении с контрольной группой, <sup>2</sup> p<0,05 в сравнении с группой ЦсА



Рисунок 70 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза.  
Группа контроля. Срок: 1 день



Рисунок 71 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза.  
Группа контроля. Срок: 7 дней



Рисунок 72 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза.

Группа ЦсА. Срок: 1 день



Рисунок 73 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза.

Группа ЦсА. Срок: 7 дней



Рисунок 74 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза.

Группа эверолимуса. Срок: 1 день



Рисунок 75 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза.

Группы эверолимуса. Срок: 7 дней

Васкуляризацию ФП характеризовали как умеренную или выраженную на следующий день после операции, а также в течение последующих 3-4 суток на глазах всех групп. В дальнейшем происходило уменьшение выраженности васкуляризации до нормальных значений в течение 7-10 дней после операции. Васкуляризация ФП группы эверолимуса в ранние сроки имела более выраженный характер в сравнении с группой контроля, но значительно не отличалась от группы ЦсА (Таблица 26, Рисунки 70-75).

Проба Зейделя была отрицательной в течение всего периода наблюдения у всех животных. Наблюдали по 1 случаю расхождения краев разреза конъюнктивы без явлений наружной фильтрации в группах эверолимуса и ЦсА (Рисунок 76). Роговица была прозрачной в течение всего периода наблюдения у всех животных за исключением 1 случая локального отека роговицы в зоне операции в группе эверолимуса, вызванного расслоением слоев роговицы во время вмешательства (Рисунок 77). Отек купировался самостоятельно в течение 2 недель без остаточных явлений.



Рисунок 76 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза. Группа ЦсА. Срок: 3 дня. Расхождение краев конъюнктивального разреза.



Рисунок 77 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза. Группа эверолимуса. Срок: 7 дней. Локальный отек роговицы

В течение всего периода наблюдения глубина передней камеры оставалась средней на всех глазах. На следующий день после операции в передней камере некоторых животных наблюдали образование сгустков фибрина, что является распространенной особенностью реакции глаза кролика на проникающие вмешательства [198]. Статистической разницы в частоте образования сгустков фибрина между группами не выявлено. Сгустки подвергались самостоятельному рассасыванию в течение 3-4 дней без дополнительного лечения. В 1 случае в группе ЦсА наблюдали гифему высотой 1 мм, разрешившуюся самостоятельно в течение 3 дней. При анализе критерия  $\chi^2$  достоверной разницы в частоте развития осложнений между группами не выявлено (Рисунок 78). Изменений в цвете и структуре радужной оболочки за весь

период наблюдения выявлено не было, в зоне операции визуализировали хирургическую колобому. Зрачок имел круглую форму с живой реакцией на свет. Хрусталик сохранял прозрачность. При офтальмоскопии: диск зрительного нерва бледно-розовый с четкими границами. Каких-либо изменений на глазном дне в течение всего периода наблюдения обнаружено не было.

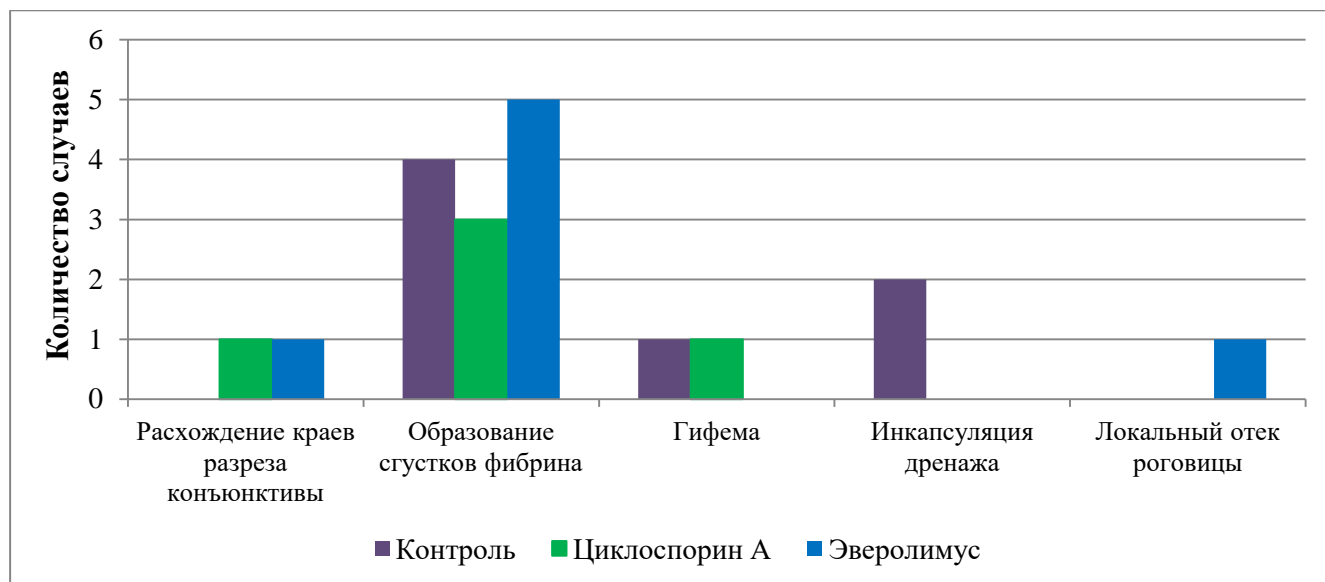


Рисунок 78 – Осложнения гипотензивной хирургии в исследуемых группах ( $p > 0,05$ )

Согласно полученным данным, послеоперационный период протекал закономерно у животных всех групп без статически значимых различий за исключением показателей ширины ФП, которые были достоверно выше в случае применения дренажей, насыщенных иммунодепрессантами, с первых дней после вмешательства. Насыщение дренажей циклоспорином А не приводило к увеличению воспалительной реакции в отличие от дренажей, насыщенных эверолимусом, имплантация которых сопровождалась увеличением продолжительности конъюнктивальной гиперемии и небольшим, но статистически значимым увеличением степени васкуляризации ФП в ранние сроки после операции. При этом статистически значимых различий в количестве осложнений во всех трех группах обнаружено не было.

### Отдаленные результаты (7 дней – 1 месяц)

По прошествии 1 недели после операции общую конъюнктивальную инъекцию наблюдали только на некоторых глазах группы эверолимуса. При этом степень инъекции характеризовали как легкую. К 10-му дню после операции гиперемиию

конъюнктивы в группе эверолимуса не наблюдали ни в одном случае. Глаза, прооперированные с имплантацией дренажей, насыщенных ЦсА, и глаза группы контроля оставались спокойными в течение всего последующего периода наблюдения.

Фильтрационные подушки продолжали функционировать во всех группах. Однако уже с 14 дня наблюдали достоверную разницу в показателях высоты и ширины ФП. В группе контроля уже по истечении 2 недель выявляли склонность к отграничению ФП и появлению первых признаков склеро-склеральных и склеро-конъюнктивальных сращений, которые постепенно снижали функциональную активность ФП. Высота ФП в группе контроля была достоверно ниже в сравнении с группами ЦсА и эверолимуса, как в срок 14 дней после операции, так и через 1 месяц, когда высоту ФП характеризовали в 50% случаев как Н0 и в 50% – как Н1 согласно классификации IBAGS. Высоту ФП в группе ЦсА в 50% случаев оценивали, как Н1 и в 50% – как Н2. В группе эверолимуса частота встречаемости данных показателей составила 25% и 75% соответственно. Однако статистически достоверной разницы между показателями высоты ФП групп ЦсА и эверолимуса обнаружено не было (Таблица 27, Рисунки 80-82).

В течение 1 месяца после вмешательства также наблюдали постепенное отграничение ФП группы контроля по ширине. В срок наблюдения 1 месяц на 75% глаз ширину ФП характеризовали как Е0. В группах ЦсА и эверолимуса данный показатель не был выявлен ни в одном случае. В группе ЦсА ширину ФП в 50% случаев описывали как Е2 и по 25% – как Е1 или Е3. В группе эверолимуса распределение по ширине ФП выглядело следующим образом: Е1 – 12,5%, Е2 – 37,5%, Е3 – 50%. Признаков отграничения и рубцевания ФП в случаях насыщения дренажей иммунодепрессантами не было (Таблица 27, Рисунки 80-82).

Статистически достоверных различий в показателях васкуляризации ФП между группами не было. ФП группы контроля характеризовались умеренной васкуляризацией в сроки от 1 недели до 1 месяца после вмешательства с оценками по IBAGS от V2 (75% случаев) до V3 (25%). Аналогичное распределение показателей васкуляризации ФП наблюдали в группе ЦсА. В группе эверолимуса изначально более выраженная васкуляризация в сравнении с группами контроля и ЦсА быстро ослабевала в течение первых двух недель и через 1 месяц уже характеризовалась меньшими значениями в сравнении с остальными группами, но без статистической достоверности: V2 в 87,5%

случаев и V1 в 12,5%. Проба Зейделя продолжала оставаться отрицательной в течение всего периода наблюдения на глазах всех групп (Таблица 27).



Рисунок 79 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза. Инкапсуляция дренажа.  
Группа контроля. Срок: 14 дней.



Рисунок 80 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза.  
Группа контроля. Срок: 1 месяц.



Рисунок 81 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза.  
Группа ЦсА. Срок: 1 месяц.



Рисунок 82 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза.  
Группа эверолимуса. Срок: 1 месяц.

Таблица 27 – Данные оценки общей конъюнктивальной инъекции и морфологии фильтрационных подушек в сроки 2 недели – 1 месяц после операции, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

| Группы   | Срок после операции |                 |
|--|---------------------|-----------------|
|  | 14 дней             | 1 месяц         |
| <b>Общая гиперемия (средний балл по шкале от 0 до 3)</b>             |                     |                 |
| Контроль   | 0,0 (0,0; 0,0)      | 0,0 (0,0; 0,0)  |
| Циклоспорин А  | 0,0 (0,0; 0,0)      | 0,0 (0,0; 0,0)  |
| Эверолимус   | 0,0 (0,0; 0,0)      | 0,0 (0,0; 0,0)  |
| <b>Высота ФП (средний балл по классификации IBAGS от 0 до 3)</b>     |                     |                 |
| Контроль   | 0,5 (0,0; 1,0)      | 0,5 (0,0; 1,0)  |
| Циклоспорин А  | 1,5 (1,0; 2,0)*     | 1,0 (1,0; 2,0)* |
| Эверолимус   | 2,0 (1,0; 2,0)      | 2,0 (1,5; 2,0)  |
| <b>Ширина ФП (средний балл по классификации IBAGS от 0 до 3)</b>     |                     |                 |
| Контроль   | 0,5 (0,0; 1,0)      | 0,0 (0,0; 0,5)  |
| Циклоспорин А  | 2,0 (2,0; 3,0)*     | 2,0 (1,5; 2,5)* |
| Эверолимус   | 2,5 (2,0; 3,0)*     | 2,5 (2,0; 3,0)* |
| <b>Васкуляризация ФП (ср. балл по классификации IBAGS от 0 до 4)</b> |                     |                 |
| Контроль   | 2,0 (2,0; 2,5)      | 2,0 (2,0; 2,5)  |
| Циклоспорин А  | 2,0 (2,0; 2,5)      | 2,0 (2,0; 2,0)  |
| Эверолимус   | 2,0 (1,5; 2,0)      | 2,0 (2,0; 2,0)  |
| <b>Проба Зейделя (средний балл по классификации IBAGS от 0 до 2)</b> |                     |                 |
| Контроль   | 0,0 (0,0; 0,0)      | 0,0 (0,0; 0,0)  |
| Циклоспорин А  | 0,0 (0,0; 0,0)      | 0,0 (0,0; 0,0)  |
| Эверолимус   | 0,0 (0,0; 0,0)      | 0,0 (0,0; 0,0)  |
| * p<0,05 в сравнении с контрольной группой                           |                     |                 |

На 2 глазах группы контроля в срок от 2 недель до 1 месяца после вмешательства выявили инкапсуляцию дренажа с полным отсутствием функциональной активности ФП (Рисунок 79). Других осложнений в сроки от 7 дней до 1 месяца во всех трех группах не наблюдали.

Глубина передней камеры всех животных была средней, влага прозрачной. Изменений других структур глаз в данные сроки обнаружено не было.

В отдаленные сроки после операции не наблюдали воспалительной реакции на хирургическое вмешательство ни в одной группе. Однако уже в данные сроки отмечали признаки снижения функциональной активности ФП группы контроля, дренажи которой не были насыщены лекарственными препаратами. Для морфологии ФП данной



группы было характерно снижение таких показателей, как высота и ширина. При биомикроскопии обнаруживали признаки отграничения и рубцевания, а в 2 случаях была выявлена инкапсуляция дренажа. Функциональная активность ФП группы ЦсА и эверолимуса не вызывала сомнения, т.к. ФП данной группы сохраняли хорошие показатели высоты и ширины, визуально отмечали хорошую фильтрацию ВГЖ в данных группах. При этом интенсивной васкуляризации ФП не наблюдали ни в одном случае. Изначально увеличенная степень васкуляризации ФП в группе эверолимуса была сопоставима с показателями других групп уже через 2 недели, а через месяц была даже ниже в сравнении с ними.

### **Поздние результаты (1-6 месяцев)**

В поздние сроки после операции глаза животных всех групп оставались спокойными, гиперемии конъюнктивы не наблюдали.

На большинстве глаз контрольной группы в сроки 3 месяца и более отмечали признаки склеро-конъюнктивальных сращений без грубого рубцевания, за исключением 1 случая, сопровождавшегося рубцовым отграничением дренажа и разрастанием новообразованных сосудов (Рисунок 83).

Васкуляризация остальных ФП данной группы характеризовалась как слабая. Статистической разницы в значениях васкуляризации между группами обнаружено не было. Показатели высоты и ширины ФП были достоверно ниже в группе контроля сравнении с группами ЦсА и эверолимуса: через 3 месяца 50% ФП характеризовались высотой N0 по IBAGS, а 50% - N1. Ширину ФП в группе контроля в срок 3 месяца характеризовали как E0 в 75% случаев и как E1 – в 25%. К концу срока наблюдения (6 месяцев) все ФП характеризовали как плоские (N0) и ограниченные (E0) без сохранения функциональной активности (Таблица 28, Рисунки 84, 85).



Рисунок 83 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза.

Группа контроля. Срок: 45 дней.

Рубцевание зоны операции с грубым разрастанием новообразованных сосудов.

Таблица 28 – Данные оценки морфологии фильтрационных подушек в сроки 3-6 месяцев после операции, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

| Группа   | Срок            |                 |
|--|-----------------|-----------------|
|  | 3 месяца        | 6 месяцев       |
| <b>Высота ФП (средний балл по классификации IBAGS от 0 до 3)</b>     |                 |                 |
| Контроль   | 0,5 (0,0; 1,0)  | 0,0 (0,0; 0,0)  |
| Циклоспорин А  | 2,0 (1,5; 2,0)* | 1,5 (1,0; 2,0)* |
| Эверолимус   | 2,0 (1,5; 2,0)* | 2,0 (1,5; 2,0)* |
| <b>Ширина ФП (средний балл по классификации IBAGS от 0 до 3)</b>     |                 |                 |
| Контроль   | 0,5 (0,0; 1,0)  | 0,0 (0,0; 0,0)  |
| Циклоспорин А  | 2,0 (1,5; 2,0)* | 1,5 (1,0; 2,0)* |
| Эверолимус   | 2,5 (1,5; 3,0)* | 2,5 (1,5; 3,0)* |
| <b>Васкуляризация ФП (ср. балл по классификации IBAGS от 0 до 4)</b> |                 |                 |
| Контроль   | 2,0 (2,0; 3,5)  | 2,0 (2,0; 3,0)  |
| Циклоспорин А  | 2,0 (2,0; 2,0)  | 2,0 (2,0; 2,0)  |
| Эверолимус   | 2,0 (2,0; 2,0)  | 2,0 (2,0; 2,0)  |
| * p<0,05 в сравнении с контрольной группой                           |                 |                 |

Фильтрационные подушки групп ЦсА и эверолимуса сохраняли свою функциональную активность. Через 3 месяца ФП групп ЦсА и эверолимуса характеризовались одинаковой высотой: в 25% случаев – Н1 и в 75% случаев – Н2 согласно классификации IBAGS. К концу периода наблюдения в группе эверолимуса

наблюдали неизменные показатели высоты ФП: Н1 – 25% и Н2 – 75%. Чуть меньшие значения были в группе ЦсА: Н1 – 50%, Н2 – 50%. Статистической достоверности в разнице высоты ФП в данных группах обнаружено не было. Также статистически незначимо отличались между собой показатели ширины ФП в группах дренажей, насыщенных иммунодепрессантами. Ширина ФП в группе ЦсА в 25% случаев была описана как Е1, и в 75% случаев – как Е2. В группе эверолимуса 50% ФП описывали как Е3, и по 25% - как Е1 и Е2 (Таблица 28, Рисунки 86-89). Проба Зейделя была отрицательной у животных всех групп. Поздних послеоперационных осложнений не наблюдали ни в одном случае.



Рисунок 84 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза.  
Группа контроля. Срок: 3 месяца.



Рисунок 85 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза.  
Группа контроля. Срок: 6 месяцев.



Рисунок 86 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза.  
Группа ЦсА. Срок: 3 месяца.

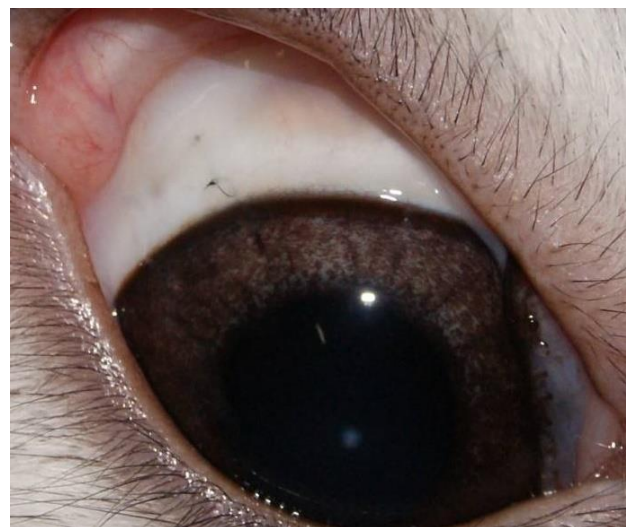


Рисунок 87 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза.  
Группа ЦсА. Срок: 6 месяцев.



Рисунок 88 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза.  
Группа эверолимуса. Срок: 3 месяца.



Рисунок 89 – Фоторегистрация переднего отрезка глаза.  
Группа эверолимуса. Срок: 6 месяцев.

### **5.3.2. Гипотензивная эффективность вмешательств с применением дренажей, насыщенных селективными иммунодепрессантами**

Исходный уровень ВГД до начала эксперимента значительно не различался среди животных, и разброс его значений составил 17-20, 15-20 и 16-20 в группах контроля, ЦсА и эверолимуса, соответственно. По истечении 3 месяцев терапии консервант-содержащими комбинированными гипотензивными препаратами ВГД достоверно снизилось у всех кроликов, и его значения в вышеперечисленных группах составили 11-15, 11-15 и 12-15 мм рт. ст., соответственно. Предоперационные значения внутриглазного давления во всех группах были сопоставимы и достоверно не различались. На следующий день после операции наблюдали достоверное снижение ВГД во всех группах: в контрольной группе – на 3-6 мм рт. ст., в группе ЦсА – на 2-7 мм рт. ст., в группе эверолимуса – на 3-7 мм рт. ст.

В дальнейшем в контрольной группе наблюдали тенденцию к росту ВГД. Так, через неделю после операции в этой группе значения ВГД находились в пределах от 9 до 14 мм рт. ст., через 3 месяца – от 16 до 18 мм рт. ст. Через 6 месяцев медиана уровня ВГД в данной группе составила 17,5 мм рт. ст. (Рисунки 90-92).

В группах ЦсА и эверолимуса наблюдали достоверно сниженное ВГД в сравнении с исходным в течение всего периода наблюдения. В группе ЦсА происходило медленное постепенное увеличение значений ВГД до 9-11 мм рт. ст. через 1 месяц после

операции. В ходе дальнейшего периода наблюдения медленный рост ВГД в группе ЦсА продолжился до значений 12-14 мм рт. ст. (медиана 13 мм рт. ст.) через 6 месяцев после операции (Рисунки 90-92).

В течение первого месяца рост ВГД в группе эверолимуса был сходным с группой ЦсА: с 7-9 мм рт. ст. в 1-й день после операции до 9-12 мм рт. ст. в срок 1 месяц (Рисунок 90). В дальнейшем рост ВГД в группе эверолимуса происходил чуть медленнее в сравнении с группой ЦсА, но без статистически достоверной разницы. К концу периода наблюдения значения ВГД в данной группе составили 10-13 мм рт. ст. (медиана 12 мм рт. ст., Рисунки 91,92).

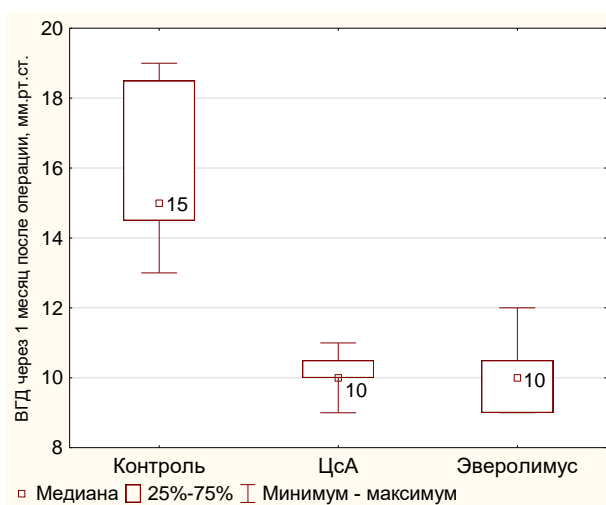


Рисунок 90 – Медиана значений ВГД в группах через 1 месяц после операции

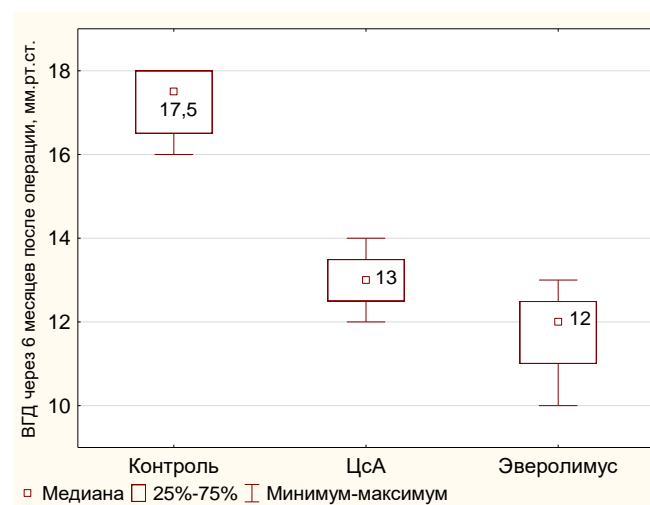


Рисунок 91 – Медиана значений ВГД в группах через 6 месяцев после операции

При сравнении показателей ВГД между группами наблюдали статистически достоверную разницу ВГД между группой контроля и группами ЦсА и эверолимуса уже с 3-го дня после операции до конца периода наблюдения. Статистически значимых отличий в значениях ВГД групп ЦсА и эверолимуса выявлено не было (Таблица 29)

Таблица 29 – Динамика изменения ВГД в исследуемых группах, Ме (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

| Срок после операции | ВГД, мм рт. ст.                |                                  |                                  |
|---------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|                     | Контроль                       | Циклоспорин А                    | Эверолимус                       |
| Исходное            | 17,0 (17,0; 18,0)              | 17,0 (16,0; 18,0)                | 17,5 (16,0; 18,0)                |
| До операции         | 13,0 (12,0; 14,0) <sup>2</sup> | 13,0 (12,5; 14,0) <sup>2</sup>   | 13,0 (12,0; 13,5) <sup>2</sup>   |
| 1 день              | 8,0 (7,5; 9,5) <sup>2</sup>    | 8,0 (7,5; 8,5) <sup>2</sup>      | 8,0 (7,0; 8,5) <sup>2</sup>      |
| 3 дня               | 9,0 (9,0; 10,0) <sup>2</sup>   | 8,0 (8,0; 9,0) <sup>1,2</sup>    | 8,0 (8,0; 8,5) <sup>1,2</sup>    |
| 7 дней              | 10,5 (10,0; 11,0) <sup>2</sup> | 9,0 (8,0; 9,5) <sup>1,2</sup>    | 9,0 (8,0; 9,0) <sup>1,2</sup>    |
| 14 дней             | 12,5 (12,0; 15,0)              | 10,0 (9,0; 10,5) <sup>1,2</sup>  | 9,0 (8,0; 10,0) <sup>1,2</sup>   |
| 1 месяц             | 15,0 (14,5; 18,5)              | 10,0 (10,0; 10,5) <sup>1,2</sup> | 10,0 (9,0; 10,5) <sup>1,2</sup>  |
| 2 месяца            | 16,5 (15,5; 17,0)              | 12,0 (11,5; 12,5) <sup>1,2</sup> | 10,5 (10,0; 11,5) <sup>1,2</sup> |
| 3 месяца            | 16,5 (16,0; 17,5)              | 12,5 (11,5; 13,0) <sup>1,2</sup> | 11,0 (10,5; 11,5) <sup>1,2</sup> |
| 6 месяцев           | 17,5 (16,5; 18,0)              | 13,0 (12,5; 13,5) <sup>1,2</sup> | 12,0 (11,0; 12,5) <sup>1,2</sup> |

<sup>1</sup> p < 0,05 в сравнении с группой контроля  
<sup>2</sup> p < 0,05 в сравнении с исходными значениями ВГД в пределах группы

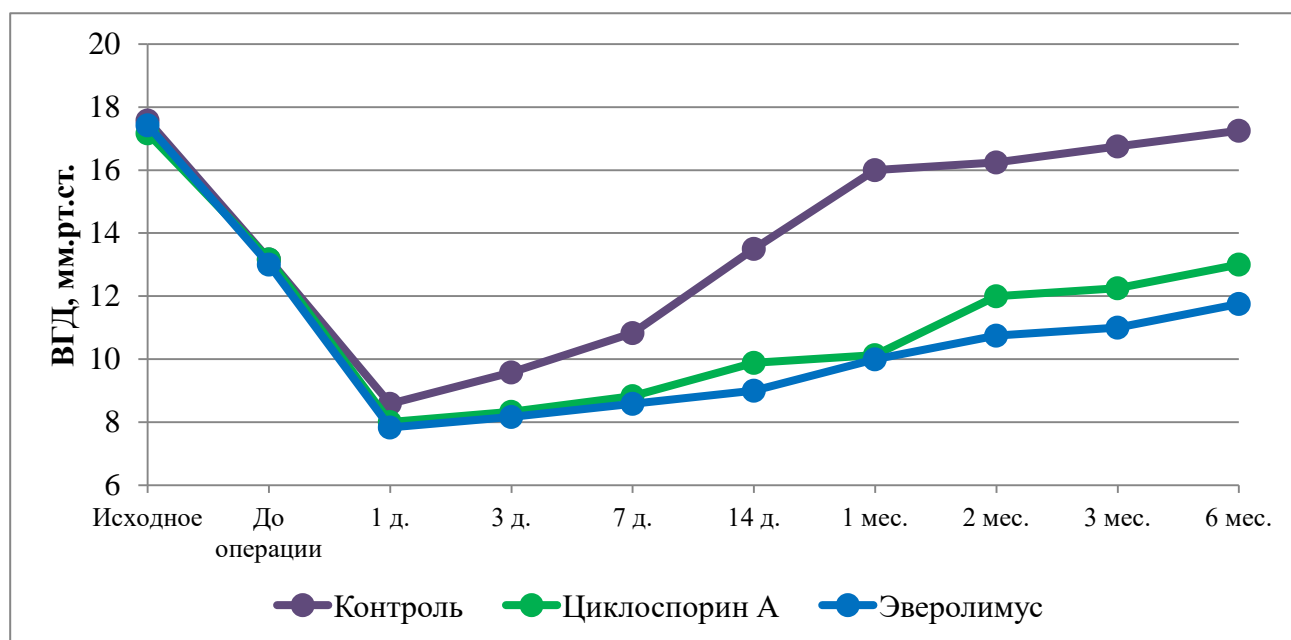


Рисунок 92 – Динамика изменения средних значений ВГД в ходе эксперимента до и после операции

Таким образом, имплантация во время гипотензивного вмешательства дренажей, насыщенных селективными иммунодепрессантами, способствовала улучшению функционирования ФП без признаков ограничения и рубцевания в течение длительного периода времени (до 6 месяцев).

Постепенное высвобождение иммунодепрессантов из материала дренажей не

оказывало клинически заметного токсического эффекта на структуры глаза и не приводило к достоверному увеличению количества послеоперационных осложнений. Пролонгированное применение селективных иммунодепрессантов также не вызывало формирования неблагоприятных в прогностическом отношении аваскулярных или кистозных ФП, характерных для вмешательств с применением митомицина С или ингибиторов VEGF.

Также имплантация дренажей, насыщенных селективными иммунодепрессантами, способствовала более длительному сохранению гипотензивного эффекта операции в сравнении с группой контроля, прооперированной без применения данных препаратов. Статистически достоверной разницы между уровнями ВГД групп ЦсА и эверолимуса выявлено не было, что свидетельствует о сходной гипотензивной эффективности исследуемых иммунодепрессантов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одной из актуальных задач современной офтальмологии является повышение эффективности хирургического лечения глаукомы – заболевания, являющегося одной из лидирующих причин необратимой слепоты [195]. Ведущей причиной снижения эффективности гипотензивной хирургии как в ранние, так и поздние сроки после операции, являются процессы избыточного рубцевания в зоне вмешательства. Несмотря на многообразие предложенных способов коррекции послеоперационного рубцевания в виде совершенствования техники операций, применения дренажей, имплантов, различных медикаментозных препаратов, а также сочетания вышеперечисленных методов, до сих пор не найдено универсального, эффективного, но в то же время безопасного пути решения данной проблемы [20, 66, 170, 201, 220]. Перспективной стратегией является разработка способов применения веществ, избирательно воздействующих на различные звенья каскада послеоперационного воспаления. К таким веществам относят, в том числе, иммунодепрессанты с избирательным механизмом действия.

Для исследования коррекции послеоперационного рубцевания в хирургии глаукомы были выбраны 2 препарата из данной группы – циклоспорин А и эверолимус. Выбор обусловлен тем, что ингибиторы mTOR, к группе которых относится эверолимус, обладают наиболее выраженным среди селективных иммунодепрессантов антипролиферативным потенциалом благодаря их непосредственному участию в процессах клеточного роста и пролиферации [33, 46, 109, 160]. ЦсА также может оказывать как опосредованное, так и прямое действие на пролиферацию иммунокомпетентных клеток и фибробластов [132, 165, 171, 203].

Одной из сложностей применения данных препаратов является необходимость их пролонгированного присутствия в зоне вмешательства в терапевтических концентрациях ввиду того, что клетки-мишени вышеуказанных иммунодепрессантов хоть и обнаруживают в операционной ране в незначительных количествах с момента ее возникновения, достигают пика своей концентрации лишь спустя 5-7 дней после вмешательства [107, 113]. Данный факт объясняет невысокую эффективность однократной местной аппликации данных препаратов во время операции.



Целью настоящего исследования стала разработка способа пролонгированного применения селективных иммунодепрессантов для коррекции избыточного рубцевания в хирургии глаукомы и его экспериментальное обоснование.

Для достижения данной цели необходимо было разработать способ предоперационной подготовки антиглаукоматозных дренажей на основе полимолочной кислоты путем их насыщения селективными иммунодепрессантами (циклоспорином А либо эверолимусом). Для обоснования эффективности и безопасности предложенного способа следовало определить антипролиферативную активность и цитотоксичность циклоспорина А и эверолимуса в эксперименте на культуре фибробластов теноновой капсулы человека. Также в эксперименте *in vivo* требовалось изучить влияние длительных инстилляций комбинированного гипотензивного препарата на состояние тканей глазной поверхности лабораторных животных, произвести оценку клинко-функционального эффекта и явлений воспаления и репарации в операционной ране после выполнения хирургических вмешательств с применением антиглаукоматозных дренажей, насыщенных селективными иммунодепрессантами по предложенному способу.

В ходе исследования был разработан способ предоперационной подготовки биорезорбируемых антиглаукоматозных дренажей на основе полимолочной кислоты для повышения их антипролиферативной эффективности.

Была выявлена хорошая способность пористой и микроволокнистой моделей дренажей на основе полилактида к сорбции циклоспорина А из раствора, которая зависела в большей степени от времени насыщения, чем от исходной концентрации (коэффициент корреляции Спирмена 0,76 против 0,18 для пористой модели и 0,74 против 0,40 для микроволокнистой). Построенные на основе эмпирических данных математические модели позволили осуществить прогнозирование количества сорбируемого препарата в зависимости от условий насыщения с высокой степенью точности ( $R^2=0,97$  пористой модели и  $R^2=0,98$  для микроволокнистой). Согласно полученным моделям, максимально прогнозируемое насыщение дренажей ЦсА происходило в течение 22 и 23 минут соответственно при отсутствии последующего достоверного прироста количества сорбируемого препарата с увеличением времени насыщения. При этом максимально возможная сорбция циклоспорина А пористыми дренажами была на  $32,1 \pm 0,8\%$  больше, чем микроволокнистыми.

Согласно данным анализа кривых десорбции ЦсА из материала дренажей с содержанием ЦсА 3,5-5,0 мкг/мл, пористые дренажи, насыщенные ЦсА в количестве 4,0 мкг и более обеспечивали пролонгированное высвобождение иммунодепрессанта в концентрациях, превышающих нижнее терапевтическое значение (0,05 мкг/мл), в течение 7 суток. При этом максимально зафиксированная концентрация ЦсА составила 1,5 мкг/мл. Для микроволокнистых дренажей максимальный период высвобождения препарата составил 3 дня, что заведомо недостаточно для коррекции избыточного рубцевания при местном применении.

Полученные результаты соответствуют представленным в литературе данным, свидетельствующим о том, что импланты на основе полимолочной кислоты обеспечивают пролонгированное высвобождение циклоспорина А [120, 155]. Однако ранее не было описано способа насыщения антиглаукоматозных дренажей на основе данного полимера циклоспорином А *ex tempore*. Тем не менее, насыщение *ex tempore* имеет неоспоримые преимущества в клинической практике благодаря простоте выполнения и возможности получения антиглаукоматозных дренажей с антипролиферативными свойствами непосредственно в ходе выполнения гипотензивного вмешательства. Тот факт, что длительность десорбции ЦсА из дренажей, насыщенных *ex tempore*, уступает длительности высвобождения препарата в случае насыщения имплантов путем непосредственного добавления препарата в исходный раствор полилактида [120, 155], не является недостатком разработанного способа, т.к. обеспечиваемый при насыщении *ex tempore* срок высвобождения ЦсА перекрывает во времени пик концентрации Т-лимфоцитов, являющихся основными клетками-мишенями данного препарата [107, 113, 132]. Дальнейшее присутствие ЦсА в зоне операции не является необходимым, т.к. через 14 дней после повреждения тканей включаются регуляторные механизмы, ограничивающие репарацию, и происходит переключение от активирующей к ингибирующей роли Т-лимфоцитов в заживлении раны [107]. Следовательно, ингибирование их функции в данные сроки не является необходимым.

Исследуемые модели дренажей обладали хорошей способностью к сорбции эверолимуса, накапливая его в своей структуре в значительных количествах при насыщении с помощью ультразвуковых волн мощностью 630 Вт частотой 22 кГц в суспензии эверолимуса. При этом количество сорбируемого препарата также имело

прямую нелинейную зависимость от времени насыщения и, в меньшей степени, от концентрации суспензии (коэффициент корреляции Спирмена 0,83 против 0,39 для пористой модели и 0,66 против 0,46 для микроволокнистой). Аналогично эксперименту с ЦсА, были построены математические модели, позволившие прогнозировать количество сорбируемого на дренажах эверолимуса в зависимости от условий насыщения. Согласно полученной модели, максимальная сорбция эверолимуса происходила в течение первых 6 минут в случае насыщения пористых дренажей ( $R^2=0,91$ ) и 4 минут в случае микроволокнистых ( $R^2=0,98$ ). При этом максимально прогнозируемая сорбция эверолимуса составила 191,9 мкг для микроволокнистой модели и 261,0 мкг для пористой. Данные, полученные эмпирически, отличались от предсказанных моделью значений не более чем на 5%. Максимальная способность пористых дренажей сорбировать эверолимус превышала возможности микроволокнистой модели на  $24,6 \pm 0,6\%$ .

Согласно данным анализа динамики десорбции эверолимуса из материала дренажей, пористые образцы с содержанием иммунодепрессанта 160-240 мкг обеспечивали высвобождение препарата в концентрациях 1,7-14,5 мкг/мл в течение 11-13 дней. Микроволокнистые дренажи с содержанием препарата 150-180 мкг обеспечивали высвобождение терапевтических концентраций эверолимуса в течение 10 дней. Следовательно, обе модели дренажа с содержанием эверолимуса 150 мкг и более обеспечивали пролонгированное высвобождение иммунодепрессанта в течение периода времени, необходимого для оказания антипролиферативного эффекта.

Достигнутый срок высвобождения дренажами эверолимуса является оптимальным, т.к. перекрывает время интенсивной активации и пролиферации фибробластов и пик концентрации Т-лимфоцитов, но не захватывает период, когда включаются регуляторные иммунные процессы, ограничивающие рубцевание [107].

Полученные результаты соответствуют представленным в литературе данным о способности полилактида к пролонгированному высвобождению эверолимуса, что широко используется при производстве стентов с лекарственным покрытием [34, 174]. Насыщение антиглаукоматозных дренажей эверолимусом ранее не описано. Опубликовано единственное исследование, изучавшее применение пленки на основе полилактида, насыщенной сиролимусом – ближайшим аналогом эверолимуса, в

хирургии глаукомы. Однако не был проведен эксперимент по определению длительности десорбции препарата из материала пленки [217].

Ввиду неоднозначности данных о концентрациях исследуемых иммунодепрессантов, оказывающих антипролиферативное действие, а также об их цитотоксичности при местном применении во время гипотензивного вмешательства по поводу глаукомы, следующим этапом проводили эксперимент на культурах клеток фибробластов теноновой капсулы человека, которые были получены из биоптатов 7 доноров. Согласно литературным данным, цитотоксичность циклоспорина А в отношении глазных структур изучена на культурах клеток переднего и заднего эпителия роговицы, клеток стромы роговицы, клеток Chang конъюнктивы, а также ретинального пигментного эпителия, и проявлялась при концентрациях препарата более 5 мкг/мл [136, 180, 193]. При изучении десорбции ЦсА из дренажей максимально зарегистрированная концентрация препарата составила 1,5 мкг/мл, что заведомо меньше опубликованных токсических значений. Тем не менее, при применении иммунодепрессантов в зоне гипотензивного вмешательства основной мишенью воздействия является теноновая капсула, которая служит источником фибробластов, синтезирующих компоненты соединительной ткани в послеоперационном периоде [197], что обусловило необходимость изучения препаратов на культуре данных клеток. В результате выполнения эксперимента *in vitro* также были получены результаты, доказывающие возможность прямого ингибирования пролиферации фибробластов циклоспорином А при сохранении их жизнеспособности в концентрациях 0,05-2,0 мкг/мл. При этом антипролиферативный эффект ЦсА в отношении фибробластов теноновой капсулы человека выявлен впервые. Культивирование фибробластов теноновой капсулы человека в присутствии ЦсА приводило к замедлению пролиферации клеток в 1,5-5,1 раза в сравнении с группой контроля, культивируемой в стандартной питательной среде, в прямой зависимости от дозировки препарата. Значения индекса пролиферации в логарифмическую фазу роста культуры находились в обратной зависимости от концентрации препарата в культуре с высокой силой связи по шкале Чеддока (коэффициент корреляции -0,92). Количество удвоений культур с добавлением ЦсА за весь срок эксперимента было достоверно меньше данного показателя в группе контроля. При этом в концентрации ЦсА 1,0 мкг/мл наблюдали отсутствие удвоения культуры. Полученные результаты свидетельствуют о том, что антипролиферативный эффект ЦсА

на фибробласты теноновой капсулы человека имел дозозависимый характер в пределах концентраций 0,05-2,0 мкг/мл. В изученном диапазоне концентраций не наблюдали снижения жизнеспособности фибробластов. Доля поврежденных клеток в культурах с добавлением ЦсА находилась в пределах от 0,0% до 6,4% против 1,4-6,4% в контрольной группе. Статистически достоверной разницы в цитотоксичности не было обнаружено ни в одной концентрации в сравнении с группой контроля. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии цитотоксичности препарата в концентрациях, высвобождаемых дренажом.

Описанный в литературе механизм действия ЦсА предполагает оказание лишь опосредованного антипролиферативного эффекта на фибробласты [132]. Тем не менее, согласно исследованиям М. Viveiros (2016) и А. Leonardi (2001) ЦсА все же может оказывать прямой антипролиферативный эффект на фибробласты в изолированной культуре клеток [165, 203], что также было подтверждено результатами данной диссертационной работы. Механизм подобного прямого действия ЦсА на фибробласты на настоящий момент остается неизученным.

Литературные данные о терапевтических и токсических концентрациях эверолимуса оказались весьма противоречивыми с большим разбросом значений в различных исследованиях [98, 104, 112, 153]. Доказано, что в микромолярных концентрациях эверолимус приводит к остановке клеточного цикла в фазе G1, в то время как в наномолярных концентрациях происходит его замедление [214]. Поскольку для эффективного ингибирования процессов рубцевания предпочтительнее полная остановка клеточного цикла, нами были изучены концентрации эверолимуса, превышающие 0,5 мкг/мл.

Согласно полученным результатам, эверолимус оказывал антипролиферативный эффект на фибробласты теноновой капсулы человека во всех изученных концентрациях (0,5-20 мкг/мл) и вызывал замедление их пролиферации в 1,7-7,4 раз в фазу логарифмического роста культуры без выраженного дозозависимого эффекта в сравнении с группой контроля. Индекс пролиферации культур с добавлением эверолимуса в питательную среду находился в пределах значений от 0,9 до 1,6 против 1,8-2,0 в группе контроля. Количество удвоений культуры также было достоверно меньше в образцах, культивируемых в присутствии эверолимуса. При этом дозозависимого эффекта не наблюдали. В качестве терапевтических концентраций были

определены значения 0,5-20,0 мкг/мл. Признаков цитотоксичности препарата в данных концентрациях обнаружено не было. Доля поврежденных клеток в культурах с эверолимусом достоверно не отличалась от контрольных культур и не превышала 5,3% против максимального значения 6,4% в группе контроля.

Дренажи, насыщенные по разработанному способу, обеспечивали пролонгированное высвобождение селективных иммунодепрессантов в концентрациях, оказывающих антипролиферативный эффект на фибробласты теноновой капсулы человека, без цитотоксического эффекта. Поскольку не было достоверной разницы в высвобождаемых дренажами концентрациях ЦсА с 18 ч по 8 дни эксперимента, а также в длительности высвобождения препарата при условии изначального содержания ЦсА на дренаже 4 мкг и более, для дальнейшего исследования *in vivo* выбрали образец, обеспечивавший наиболее равномерное высвобождение препарата. Данный образец был насыщен в разведении концентрата с BSS в соотношении 1:30 в течение 15 минут. Все дренажи, насыщенные эверолимусом, обеспечивали постепенное высвобождение препарата, поэтому для дальнейшего исследования выбрали образец, обеспечивавший наиболее длительную десорбцию иммунодепрессанта – дренаж, насыщенный в 2% суспензии эверолимуса в физиологическом растворе при воздействии ультразвуковых волн мощностью 630 Вт частотой 22 кГц в течение 6 минут.

Этап экспериментального исследования *in vivo* проведен на 52 глазах кроликов породы советская шиншилла. Предварительно было изучено влияние консервант-содержащего гипотензивного препарата на состояние тканей глазной поверхности лабораторных животных. У кроликов, которые ежедневно получали комбинированный препарат, содержащий  $\beta$ -блокатор, аналог простагландина и бензалкония хлорид в качестве консерванта, наблюдали достоверное увеличение степени конъюнктивальной гиперемии (медиана 2,0 балла против 0,0 в группе контроля), снижение слезопродукции (медиана 10,0 мм против 14,0 мм в группе контроля) и повреждение роговичного эпителия по типу эпителиопатии (медиана 2,0 балла против 0,0 в группе контроля) в сроки от 1 до 3 месяцев. Анализ гистологических препаратов кроликов исследуемой группы выявил наличие хронического воспаления тканей глазной поверхности по типу ССГ вследствие длительной терапии консервант-содержащим гипотензивным препаратом: утолщение конъюнктивы и конъюнктивального эпителия с нарушением его архитектоники, участки фиброза с разрастанием новообразованных сосудов и

повышенную инфильтрацию фибробластами и мононуклеарами, увеличение количества бокаловидных клеток на единицу площади, а также участки расслоения эпителия роговицы. Полученное состояние глазной поверхности лабораторных животных соответствовало описанным в литературе изменениям, наблюдаемым у большинства пациентов, страдающих глаукомой [1, 37, 53, 62, 100], и в дальнейшем позволило оценить влияние исследуемых препаратов на процесс избыточного рубцевания в хирургии глаукомы в условиях, наиболее приближенных к реальной практике.

На следующем этапе исследования *in vivo* на 36 глазах выполняли модель гипотензивного вмешательства проникающего типа с имплантацией пористых биорезорбируемых дренажей на основе полимолочной кислоты, насыщенных циклоспорином А (группа ЦсА), эверолимусом (группа эверолимуса) или не насыщенных какими-либо препаратами (группа контроля).

Несмотря на то что в раннем послеоперационном периоде у животных групп ЦсА и эверолимуса наблюдали несколько повышенные значения общей гиперемии и васкуляризации фильтрационных подушек в сравнении с контрольной группой, в дальнейшем ФП данной группы отличались хорошими показателями высоты и ширины без склонности к отграничению в течение всего периода наблюдения. Напротив, первые признаки склеро-конъюнктивальных сращений в группе контроля наблюдали уже через 2 недели после вмешательства. Через 1 месяц уже 50%, а через 6 месяцев – 100% ФП контрольной группы характеризовали как плоские без сохранения функциональной активности. В группах ЦсА и эверолимуса происходило медленное постепенное уплощение ФП с сохранением их функционирования до конца периода наблюдения. При этом группа эверолимуса отличалась чуть лучшими показателями высоты и ширины ФП в сравнении с группой ЦсА, но без статистически значимых различий. В течение всех 6 месяцев ни в одном случае в данных группах не было выявлено плоских ФП. Также не наблюдали формирования неблагоприятных в прогностическом отношении полностью аваскулярных и кистозных ФП, являющихся частым осложнением применения ММС и анти-VEGF препаратов в качестве антипролиферативных агентов [97, 110]. Медианы значений высоты ФП (согласно классификации IBAGS) групп ЦсА и эверолимуса через 6 месяцев после операции составляли 1,5 и 2,0 балла соответственно против 0,0 баллов в группе контроля, а ширины – 1,5 и 2,5 балла соответственно против 0,0 баллов в группе контроля. Частота

осложнений после вмешательств, проведенных с применением иммунодепрессантов, статистически не отличалась от контрольной группы и не превышала общий уровень осложнений проникающей хирургии глаукомы согласно данным литературы. Имплантация во время гипотензивного вмешательства дренажей, насыщенных селективными иммунодепрессантами, способствовала более длительному сохранению ФП без признаков отграничения и рубцевания без оказания клинически заметного токсического эффекта на структуры глаза.

Данные тонометрии позволили оценить гипотензивный эффект вмешательств. Наиболее стабильное и продолжительное снижение ВГД наблюдали в группе эверолимуса, в которой значения ВГД находились в пределах 10-13 мм рт. ст. через 6 месяцев после операции. Хороший гипотензивный эффект отмечали и в группе ЦсА при отсутствии статистически достоверной разницы с группой эверолимуса. В данной группе значения ВГД к концу периода наблюдения составили 12-14 мм рт. ст. В группе контроля послеоперационные значения ВГД приблизились к дооперационным уже через 1 месяц после операции и были достоверно выше значений двух других групп уже начиная с 3 дня после операции и до конца периода наблюдения, когда уровень ВГД составил 16-18 мм рт. ст.

Наблюдаемое улучшение клинико-функционального эффекта операции при пролонгированном применении циклоспорина А соответствовало результатам единственного опубликованного исследования, изучавшего пролонгированное применение ЦсА в хирургии глаукомы. Однако предложенная в данном исследовании система доставки ЦсА представляла собой трубчатый дренаж, сам по себе способствующий наиболее выраженному снижению ВГД в сравнении с другими типами дренажей и имплантов [2, 18, 19, 48, 64, 162]. Результаты, полученные в ходе исследования *in vivo*, свидетельствуют о повышении эффективности гипотензивной хирургии, которого не наблюдали ранее при послеоперационном местном применении ЦсА в виде капель [130, 158, 178], что свидетельствует о большей целесообразности пролонгированного применения ЦсА непосредственно в зоне вмешательства для коррекции избыточного рубцевания в хирургии глаукомы. Аналогичное предложенному в данной работе применению ЦсА на эксплантодренаже не описано в литературе.

Улучшение функционирования ФП и увеличение гипотензивного эффекта операции ранее наблюдали при пролонгированном применении пленок, насыщенных



сиролимусом [217] и при интраоперационной аппликации эверолимуса [112]. Однако срок наблюдения в данных исследованиях был непродолжительным – до 28 дней. Пролонгированное применение эверолимуса в зоне операции ранее изучено не было. В данной работе было показано повышение эффективности хирургического лечения глаукомы при пролонгированном применении ЦсА и эверолимуса в сроки до 6 месяцев *in vivo*.

Анализ гистологических препаратов позволил выявить механизмы улучшения оттока ВГЖ при имплантации насыщенных иммунодепрессантами дренажей. Так, уже начиная с ранних сроков после операции (7 дней) и до конца периода наблюдения в дренажах группы контроля отмечали повышенную плотность клеточных элементов, в частности, мононуклеаров, ГКИТ и фибробластов, а также коллагеновых волокон, что свидетельствовало о большей интенсивности воспаления, репарации и реакции тканей глаза на инородное тело. Наименьшую плотность клеточных элементов с минимальным количеством коллагеновых волокон отмечали в группе эверолимуса. Несмотря на наблюдаемый апоптоз мигрировавших клеток внутри дренажей данной группы, вокруг имплантированного материала не отмечали признаков нарушения жизнеспособности клеток, что подтверждает отсутствие токсического эффекта тех концентраций препарата, которые вымываются из дренажа с током ВГЖ и за счет возможной диффузии в окружающие ткани. На протяжении всего периода наблюдения прослеживались особенности формирования соединительнотканной капсулы вокруг дренажей различных групп. В группе контроля отмечали раннее образование капсулы, которая в отличие от других групп, была четко представлена двумя слоями: первый слой непосредственно прилегал к материалу дренажа, а второй формировался со стороны окружающих тканей. С увеличением срока после операции наблюдали уплотнение и слияние данных слоев капсулы. Капсулы вокруг дренажей группы эверолимуса характеризовались отсроченным формированием, при этом капсула окружала дренаж, а вокруг нее обнаруживали выраженные широкие пространства для оттока ВГЖ. Наиболее тонкие капсулы в течение всего периода наблюдения обнаруживали в группе ЦсА. К концу эксперимента в группе контроля зона имплантации дренажа представляла собой рубец, инфильтрированный мононуклеарами и гигантскими клетками инородных тел. В группе ЦсА ток жидкости происходил преимущественно вокруг дренажа через

тонкую проницаемую капсулу, а в группе эверолимуса – как через зону имплантации дренажа, так и вокруг него.

Хотя по многим изучаемым параметрам, не было выявлено статистически достоверной разницы между исследуемыми иммунодепрессантами, их применение имело некоторые особенности, имеющие практическое значение. Они указаны в Приложении 3.

Таким образом, был разработан способ пролонгированного применения как циклоспорина А, так и эверолимуса для коррекции избыточного рубцевания в хирургии глаукомы. Оба иммунодепрессанта показали хорошую эффективность и высокую степень безопасности при местном пролонгированном применении как в эксперименте на культурах фибробластов теноновой капсулы человека, так и *in vivo*. Выполнение гипотензивного вмешательства с имплантацией антиглаукоматозных дренажей на основе полимолочной кислоты, насыщенных ЦсА либо эверолимусом, способствовало длительному сохранению вновь созданных путей оттока ВГЖ и ослаблению процесса послеоперационного рубцевания, что было доказано в эксперименте *in vivo*. Постепенное высвобождение исследуемых иммунодепрессантов из материала дренажа не оказывало токсического эффекта на структуры глаза и не приводило к увеличению количества интра- и послеоперационных осложнений в сравнении с дренажной гипотензивной хирургией без применения лекарственных препаратов.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан и экспериментально обоснован способ коррекции послеоперационного рубцевания путем пролонгированного применения селективных иммунодепрессантов при хирургическом лечении глаукомы.

2. Разработан способ предоперационной подготовки биорезорбируемых антиглаукоматозных дренажей на основе полимолочной кислоты, позволяющий усилить их антипролиферативный эффект за счет насыщения циклоспорином А либо эверолимусом. Точное прогнозирование способности дренажей к сорбции иммунодепрессантов в зависимости от условий насыщения осуществлено с помощью разработанных математических моделей. Достигнуто пролонгированное высвобождение дренажами циклоспорина А в течение 7 дней в концентрациях 0,05-1,50 мкг/мл и эверолимуса в течение 13 дней в концентрациях 1,7-14,5 мкг/мл.

3. Исследуемые иммунодепрессанты оказывают антипролиферативный эффект на фибробласты теноновой капсулы человека в эксперименте *in vitro* в пределах концентраций, обеспечиваемых при их десорбции из дренажей. Циклоспорин А замедляет пролиферацию фибробластов теноновой капсулы человека в 1,5-5,1 раз с высокой дозозависимостью в пределах концентраций 0,05-2,00 мкг/мл. Эверолимус замедляет их пролиферацию в 1,7-7,4 раза в пределах концентраций 0,5-20 мкг/мл без выраженной зависимости от концентрации препарата. В пределах изученных концентраций ни циклоспорин А, ни эверолимус не оказывают цитотоксического действия на фибробласты теноновой капсулы человека, что доказано в эксперименте *in vitro*.

4. В эксперименте *in vivo* ежедневные инстилляции комбинированного консервант-содержащего гипотензивного препарата в течение 3 месяцев приводили к формированию хронического воспаления тканей глазной поверхности у кроликов по типу синдрома сухого глаза, что позволило оценить влияние изучаемых иммунодепрессантов на процессы избыточного рубцевания в гипотензивной хирургии в условиях, наиболее приближенных к реальной клинической практике.

5. Имплантация в ходе гипотензивного вмешательства биорезорбируемых антиглаукоматозных дренажей на основе полилактида, насыщенных циклоспорином А либо эверолимусом, способствует ослаблению интенсивности процессов

послеоперационного рубцевания и длительному (не менее 6 месяцев) сохранению созданных во время вмешательства путей оттока внутриглазной жидкости, что было доказано в ходе экспериментально-морфологического исследования *in vivo*.

6. Пролонгированное применение циклоспорина А и эверолимуса в зоне фильтрующего вмешательства способствует повышению эффективности операции, который выражается в более длительном функционировании фильтрационных подушек и более стойком гипотензивном эффекте: 11,5 (10,5; 12,5) и 13,5 (12,5; 14,0) мм рт. ст. в группах эверолимуса и циклоспорина А соответственно против 17,5 (16,5; 18,0) мм рт. ст. в группе контроля через 6 месяцев после операции.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Оптимальным способом, обеспечивающим пролонгированную доставку циклоспорина А либо эверолимуса к зоне гипотензивной операции, является насыщение антиглаукоматозных дренажей на основе полимолочной кислоты данными препаратами. При этом предпочтительнее использовать пористую модель, которая обеспечивает лучшее насыщение и наиболее постепенное и длительное высвобождение лекарственных препаратов в сравнении с микроволокнутой.

2. Оптимальной технологией насыщения антиглаукоматозного дренажа на основе полилактида циклоспорином А является его выдерживание в разведении концентрата препарата с содержанием действующего вещества 50 мг/мл со сбалансированным солевым раствором в соотношении 1:30 в течение 15 минут.

3. Насыщение дренажей циклоспорином А возможно *ex tempore* в операционной непосредственно при выполнении гипотензивного вмешательства. При необходимости сокращения времени насыщения возможно использование других разведений концентрата до достижения сорбции дренажом 4-5 мкг циклоспорина А в соответствии с таблицей в Приложении 1 диссертационной работы.

4. Насыщение биорезорбируемых дренажей на основе полимолочной кислоты эверолимусом следует производить в 2% суспензии препарата при помощи ультразвукового воздействия частотой 22 кГц мощностью 630 Вт в течение 6 минут.

5. Насыщение дренажей эверолимусом рекомендовано производить в лабораторных условиях при их изготовлении перед стерилизацией.

6. При выполнении вмешательств с имплантацией биорезорбируемых дренажей на основе полимолочной кислоты, насыщенных циклоспорином А либо эверолимусом, необходимо уделять особое внимание тщательному герметичному ушиванию операционного разреза конъюнктивы и теноновой капсулы для сведения к минимуму вероятности расхождения краев операционной раны.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Пролонгированное применение селективных иммунодепрессантов является перспективным направлением коррекции избыточного рубцевания в хирургии глаукомы.

Полученные в настоящем исследовании результаты позволяют рассмотреть следующие перспективы дальнейшей разработки данной темы:

1. Для оценки целесообразности и безопасности применения предложенного способа коррекции избыточного рубцевания в практической офтальмологии необходимо проведение дополнительных доклинических, а затем – клинических исследований.

2. Возможно исследование предложенного способа коррекции послеоперационного рубцевания при других типах хирургического вмешательства по поводу глаукомы, в частности, при выполнении операций непроникающего типа.

3. В настоящем исследовании способ насыщения дренажей циклоспорином А рассматривали с точки зрения удобства применения *ex tempore* в условиях операционной. Возможна разработка способа насыщения дренажей порошком циклоспорино А в лабораторных условиях при изготовлении дренажа и дальнейшее его исследование.

4. Поскольку при системном применении обнаруживают синергизм в действии циклоспорино А и эверолимуса, возможна разработка способа комбинированного насыщения антиглаукоматозных дренажей данными препаратами и проведение соответствующих доклинических и клинических испытаний.

5. Полученные терапевтические и токсические концентрации препаратов в эксперименте на культуре клеток фибробластов теноновой капсулы человека обуславливают возможность разработки систем доставки лекарств с циклоспорином А и эверолимусом для коррекции других состояний, кроме хирургии глаукомы, сопровождающихся фиброзом конъюнктивы.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

5-ФУ – 5-фторурацил

АПК – аппаратно-программный комплекс

ВГД – внутриглазное давление

ВГЖ – внутриглазная жидкость

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматомасс-спектрометрия

ГКИТ – гигантские клетки инородных тел

ГКС – глюкокортикостероиды

ДМСО - диметилсульфоксид

ИЛ – интерлейкин

ИФН – интерферон

КСФ – колониестимулирующие факторы

ММС – митомицин С

ПОУГ – первичная открытоугольная глаукома

ССГ – синдром сухого глаза

ФП – фильтрационная подушка

ЦсА – циклоспорин А

ЦфА – циклофилин А

ЯЦС – ядерно-цитоплазменное соотношение

4EВР1 – связывающий белок 1 эукариотического фактора инициации трансляции 4Е (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1)

АКТ (protein kinase B) – протеинкиназа В

BSS – сбалансированный солевой раствор (balanced salt solution)

СТGF – фактор роста соединительной ткани (connective tissue growth factor)

DT – время удвоения культуры (doubling time)

EGF – эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor)

eIF– эукариотический фактор инициации (eukaryotic initiation factor)

FGF – фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor)

FKBP – FK-связывающий белок (FK-binding protein)

HIF – факторы, индуцируемые гипоксией (hypoxia-inducible factor)

IBAGS – оценочная шкала фильтрационных подушек университета Индианы (The Indiana Bleb Appearance Grading Scale)

IGF – инсулиноподобный фактор роста (insulin-like growth factor)

MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа (mitogen-activated protein kinase)

MMP – матриксная металлопротеиназа (matrix metalloproteinase)

mTOR – механистическая мишень рапамицина (mechanistic target of rapamycin)

mTORC – комплекс механистической мишени рапамицина (mechanistic target of rapamycin complex)

NFAT – ядерный фактор активированных Т-клеток (nuclear factor of activated T-cells)

PDGF – тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor)

PDL – количество удвоений культуры клеток (population doubling level)

PI – индекс пролиферации (proliferation index)

PI3K – фосфоинозитид-3-киназы (phosphoinositide 3-kinases)

PlGF – плацентарный фактор роста (placental growth factor)

S6K – Рибосомальная протеинкиназа S6 (ribosomal protein S6 kinase)

SMA – антитела к гладкой мускулатуре (smooth muscle antibodies)

TGF – трансформирующий фактор роста (transformation growth factor)

TNF – фактор некроза опухолей (tumor necrosis factor)

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor)



**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абышева, Л.Д. Влияние местной гипотензивной терапии глаукомы на развитие и прогрессирование синдрома "сухого глаза" / Л.Д. Абышева, Р.В. Авдеев, А.С. Александров [и др.] // РМЖ. Клиническая офтальмология. – 2017, №17 (2). – С. 74–82.
2. Аванесова, Т.А. Опыт применения дренажей Ahmed в хирургическом лечении рефрактерной глаукомы / Т.А. Аванесова, Н.В. Гурьева, С.А. Жаворонков [и др.] // Клиническая офтальмология. – 2010. – № 2. – С. 55–58.
3. Азнабаев, Б.М. Инвалидность вследствие глаукомы в Республике Башкортостан. / Б.М. Азнабаев, А.Ш. Загидуллина, Д.Р. Рашитова. // Национальный журнал глаукома. – 2017. – №16(2). – С. 48-56.
4. Алексеев, И.Б. Российский опыт антиглаукоматозной хирургии с применением имплантата Глаутекс / И.Б. Алексеев, Е.В. Абросимова, О.А. Адлейба [и др.] // РМЖ Клиническая Офтальмология. – 2014. – №4(14). – С. 193–197.
5. Анисимов, С.И. Дренажные устройства в хирургии рефрактерной глаукомы / С.И. Анисимов, С.Ю. Анисимова, Л.Л. Арутюнян [и др.] // Российский офтальмологический журнал. – 2019 – № 12(3). – С. 85 –93.
6. Анисимов, С.И. Морфологические исследования коллагенового дренажа, используемого при антиглаукоматозных операциях после его имплантации в ткани глаза кролика / С.И. Анисимов, С.Ю. Анисимова, Е.В. Ларионов [и др.] // Российские мед. вести. – 2006. – № 2. – С. 69–72.
7. Анисимов, С.И. Патофизиологические аспекты использования нового биологического материала ксенопласт в хирургическом лечении глаукомы / С.И. Анисимов, С.Ю. Анисимова, Г.А. Дроздова [и др.] // Глаукома. – 2008. – №2. – С. 40–45.
8. Анисимова, С.Ю. Морфологические исследования после имплантации антиглаукоматозного коллагенового дренажа / С.Ю. Анисимова, С.И. Анисимов, Г.Г. Ларионов // Российские медицинские вести. – 2005. – №3. – С. 53–56.
9. Анисимова, С.Ю. Новый не рассасываемый коллагеновый дренаж для повышения эффективности непроникающей глубокой склерлимбэктомии / С.Ю. Анисимова, С.И. Анисимов, И.В. Рогачева [и др.] // Глаукома. – 2003. – №1. – С. 19–23.
10. Анисимова, С.Ю. Отдаленные результаты хирургического лечения рефрактерной глаукомы с использованием стойкого к биодеструкции коллагенового

дренажа / С.Ю. Анисимова, С.И. Анисимов, И.В. Рогачева // Глаукома. – 2011. – №2. – С. 28–33.

11. Анисимова, С.Ю. Экспериментальное и клиническое обоснование применения нового биологического дренажа для повышения эффективности антиглаукоматозных операций / С.Ю. Анисимова, С.И. Анисимов, И.В. Рогачева [и др.] // Материалы научно–практической конф. «Современные технологии лечения глаукомы»: сб. ст. – Москва, 2003. – С. 156–158.

12. Антонов, А.А. Максимальная медикаментозная терапия глаукомы — что есть в нашем арсенале? / А.А. Антонов, И.В. Козлова, А.А. Витков // Национальный журнал глаукома. – 2020. – №19(2). – С. 51-58.

13. Асратян, Г. К. Разработка дифференцированного подхода к дренажной хирургии первичной открытоугольной глаукомы: дис... к– та мед. наук / Г.К.Асратян – М., 2015. – 112 с.

14. Бабушкин А.Э. Трабекулэктомия: профилактика избыточного рубцевания (обзор литературы). / А.Э. Бабушкин // Точка зрения. Восток-Запад. – 2017. – №4. – С. 128–31.

15. Бикбов, М.М. Анализ гипотензивного эффекта дренажа «Репегель» при рефрактерной глаукоме / М.М. Бикбов, И.И. Хуснитдинов // Медицинский вестник Башкортостана. – 2017. – №2. – С. 78–81.

16. Бикбов, М.М. Анализ эффективности фистулизирующих операций с дренажом Глаутекс / М.М. Бикбов, И.И. Хуснитдинов // РМЖ. Клиническая офтальмология. –2017. – № 17 (2). – С. 82–85.

17. Бикбов, М.М. Гидрогели на основе гиалуроновой кислоты и хитозана в качестве носителя люцентиса при антиглаукомных операциях / М.М. Бикбов, И.И. Хуснитдинов, Р.Р. Вильданова [и др.] // Практическая медицина. – 2017. – № 1 (9 (110)). – С. 125–128.

18. Бикбов, М.М. Отдаленные клиничко–функциональные результаты хирургического лечения неоваскулярной глаукомы с применением дренажа «Глаутекс» и клапана Ahmed / М.М. Бикбов, И.И. Хуснитдинов // Офтальмология. – 2017. – № 14(1). – С. 47–52.

19. Бикбов, М.М. Послеоперационные осложнения имплантации клапана Ahmed / М.М. Бикбов, И.И. Хуснитдинов // РМЖ. Клиническая офтальмология. – 2016. – № 17 (2). – С. 103–107.
20. Бикбов, М.М. Современные возможности профилактики избыточного рубцевания после антиглаукомных операций с использованием антимацетоболитов / М.М. Бикбов, А.Э. Бабушкин, О.И. Оренбуркина // Национальный журнал глаукома. – 2019. – № 18(3). – С. 55–60.
21. Бржеский, В.В., Синдром «сухого глаза» и заболевания глазной поверхности: клиника, диагностика, лечение / В.В. Бржеский, Г.Б. Егорова, Е.А. Егоров – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2016. – 464 с
22. Вильданова, Р.Р. Интерполиэлектролитные гидрогели на основе хитозана и пектина / Р.Р. Вильданова, Н.Н. Сигаева, Е.А. Фаянова [и др.] // Вестник Башкирского университета. – 2017. – № 22 (1). – С. 72–76.
23. Волков А.В. Синтетические биоматериалы на основе полимеров органических кислот в тканевой инженерии / А.В. Волков // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005. – №2. – С. 43-45
24. Волова Л.Т. Исследование биосовместимости и цитотоксичности персонифицированных костных имплантатов с применением клеточных технологий / Л.Т. Волова, Д.А. Трунин, Ю.В. Пономарева [и др.] // Вестник медицинского института «Реавиз»: реабилитация, врач и здоровье. – 2017. – №5 (29). – С. 32-39
25. Волова Л.Т. Значение тестирования на культуре клеток для выявления малотоксического эффекта средств медицинского назначения / Л.Т. Волова, Ю.В. Пономарева, А.Ю. Розенбаум // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2012. – №1(13). – С. 48-51.
26. Гаврилова, Т.В. Наш опыт использования современных дренажей в хирургии глаукомы / Т.В. Гаврилова, К.С. Любимов, С.Н. Мухамадеева [и др.] // Российский офтальмологический журнал. – 2020. – № 13(1). – С. 71–76.
27. Гаврилова, Т.В. Опыт применения коллагенового дренажа ксенопласт при антиглаукомных операциях / Т.В. Гаврилова, С.Н. Мухамадеева, К.С. Любимов [и др.] // Отражение. – 2018. – №1(6). – С. 79–83.

28. Гладкова, О.В. Мягкая контактная линза, насыщенная Циклоспорином А / О.В. Гладкова, Т.Н. Сафонова, И.А. Новиков [и др.] // Современные технологии в офтальмологии. - 2016. - № 4. - С. 60–62.
29. Глаукома. Национальное руководство / под ред. Е.А. Егорова. М., 2014. – 824 с.
30. Горбунова, Н.Ю. Отдаленные результаты применения сетчатого дренажа из дигеля в хирургическом лечении рефрактерных глауком / Г.К. Асратян, Н.П. Паштаев // Визит к офтальмологу. – 2006. – № 7. – С. 2–7.
31. ГОСТ ISO 10993-6-2011. Межгосударственный стандарт. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации. МКС 11.100.20. М.: Стандартиформ. – 2013.
32. Гринберг К.Н. Методы культивирования клеток. / К.Н. Гринберг, В.И. Кухаренко [и др]. – Л., 1987. – С. 250-257.
33. Грюкова, А.А. Старение стволовых клеток человека в контексте mTOR–сигналинга: магистерская дис. по биологии / А.А. Грюкова. – СПб, – 2017. – 73 с.
34. Дыгай, А.М. К вопросу об антипролиферативном покрытии коронарных стентов / А.М. Дыгай // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2018. – № 22(2). – С. 22–29.
35. Егоров Е.А. ТонOMETрическое внутриглазное давление у взрослого населения: популяционное исследование. / Е.А. Егоров, С.Ю. Петров, В.В. Городничий [и др.] // Национальный журнал глаукома. – 2020. – №19(2). – С. 39-50.
36. Егорова Э.В. Особенности иммунного реагирования у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой с использованием дренажных имплантов / Э.В. Егорова, С.А. Борзенко, И.Л. Еременко [и др.] // Офтальмохирургия. – 2015. – №3. – С. 13-18.
37. Еричев, В.П. Бесконсервантная терапия глаукомы / В.П. Еричев, А.В. Волжанин // Национальный журнал глаукома. – 2020. – № 19(1). – С. 69–78.
38. Еричев, В.П. Гипотоническая макулопатия после глаукомной хирургии: механизмы развития, методы профилактики и терапии / В.П. Еричев, С.Ю. Петров, Н.А. Орехова [и др.] // РМЖ. Клиническая офтальмология. – 2020. – № 1(20). – С. 26–31.

39. Еричев, В.П. Клиническая оценка эффективности азоксимера бовгиалуронидазы в профилактике избыточного рубцевания после хирургического лечения глаукомы / В.П. Еричев, С.Ю. Петров, А.С. Макарова // Национальный журнал глаукома. – 2018. – №17(1). – С. 86–100.

40. Жигальская, Т.А. Влияние интраоперационной аппликации циклоспорина а на регенерацию тканей переднего отрезка глаза при экспериментально индуцированной глаукоме / Т.А.Жигальская, О.И. Кривошеина, А.Н. Дзюман // Саратовский научно–медицинский журнал. – 2018. – №14 (4). – С. 833–837.

41. Жигальская, Т.А. Гистологические особенности конъюнктивы и склеры глазного яблока при интраоперационной аппликации 0,05% раствора Циклоспорина а / Т.А.Жигальская // Медицинский вестник Башкортостана. – 2018. – № 13 (2 (74)). – С. 51–54.

42. Жигальская, Т.А. Патоморфологические особенности регенерации конъюнктивы и склеры на фоне интраоперационной аппликации раствора циклоспорина А / Т.А.Жигальская, О.И. Кривошеина, А.Н. Дзюба [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. –№ 18 (3). – С. 46–52.

43. Зайчик, А.Ш. Патофизиология. Том 1. Общая патофизиология с основами иммунопатологии: учебник / А.Ш. Зайчик, Л.П. Чурилов. – СПб: ЭЛБИ–СПб, 2008. – 656 с.

44. Захидов, А.Б. Интраоперационное применение антиметаболитов в хирургии глаукомы / А.Б.Захидов, А.В. Селезнев, И.Р. Газизова [и др.] // Национальный журнал глаукома. – 2020. – № 19(1). – С. 40–45.

45. Золотарев А.В. Организация помощи больным глаукомой в Самарской области / А.В. Золотарев, Ф.С. Галеева, Е.В. Карлова [и др.] // Ерошевские чтения: Всерос. науч.-практич. конф. : тез. докл. - Самара, 2017. – С. 16-23

46. Зубова, С.Г. TOR–центрическая концепция регуляции митогенных, метаболических и энергетических сигнальных путей в клетке / С.Г. Зубова, Ж.В. Шитикова, Т.В. Поспелова // Цитология. – 2012. – №54 (8). – С. 589–602.

47. Калинина, А.А. Циклофилин а: строение и функции / А.А. Калинина, Л.М. Хромых, Д.Б. Казанский // Успехи молекулярной онкологии. – 2017. – № 4 (4). – С. 17–23.

48. Карлова, Е.В. Клапанные и бесклапанные дренажные системы в хирургическом лечении рефрактерной глаукомы / Е.В. Карлова, М.В. Радайкина // Офтальмология. – 2019 № 16(1S). – С. 123–126.
49. Ковеленова, И.В. Наш опыт применения биodeградируемого дренажа при глаукоме / И.В. Ковеленова, П.В. Библаев, А.Д. Шайдуллина // Новости глаукомы. – 2019. – № 1(49). – С. 57–59.
50. Коломейцев, М.Н. Поверхностный механизм резорбции дренажей как фактор, способствующий повышению гипотензивной эффективности антиглаукоматозных операций / М.Н. Коломейцев, Н.С. Ходжаев, А.В. Сидорова // Современные технологии в офтальмологии. – 2018. – №4. – С. 119–122.
51. Красюк, Е.Ю. Опыт применения биodeградируемого дренажа в комбинации с традиционной синустрабекулэктомией / Е.Ю. Красюк, О.Г. Носкова, С.И. Акулов [и др.] // Саратовский научно–медицинский журнал. – 2018. – №4(14). – С. 633–638.
52. Куроедов А.В. Целесообразность применения дифференцированных («ступенчатых») стартовых подходов к лечению больных с разными стадиями глаукомы / А.В. Куроедов, А.Ю. Брежнев, Д.Н. Ловпаче [и др.] // Национальный журнал глаукома. – 2018. – №17(4). – С. 27-54.
53. Куроедов, А.В. Влияние различных инстилляционных гипотензивных режимов на развитие и прогрессирование синдрома «сухого глаза» / А.В.Куроедов, З.М. Нагорнова, А.В. Селезнев [и др.] // Национальный журнал глаукома. – 2017. – №16(3). – С. 71–80.
54. Любимов, К.С. Первый опыт использования дренажа «Глаутекс» при проведении антиглаукомных операций / К.С. Любимов, Т.В. Гаврилова, С.Н. Мухамадеева [и др.] // Точка зрения. Восток – запад. – 2018. – № 3. – С. 27–29
55. Макогон, С.И. Особенности первичной и повторной инвалидности вследствие глаукомы у лиц старше трудоспособного возраста в Алтайском крае / С.И. Макогон, А.С. Макогон // Российский офтальмологический журнал. – 2017. – №10(3). – С. 42-48.
56. Максимова, Н.В. Патofизиологические аспекты процесса заживления ран в норме и при синдроме диабетической стопы / Н.В. Максимова, А.В. Люндуп, Р.О. Любимов [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2014. – №11-12(69). – С. 110-117.

57. Малюгин Б.Э. Морфологическое исследование биосовместимости интракорнеальных полимерных линз с роговицей человека в эксперименте *in vitro* / Б.Э. Малюгин, С.А. Борзенко, И.А. Мушкова [и др.] // Офтальмохирургия. – 2016. – №4. – С. 51-60.
58. Мамиконян, В.Р. Оценка состояния фильтрационных подушек после введения ранибизумаба в послеоперационном периоде синустрабекулэктомии / В.Р. Мамиконян, Ю.В. Мазурова, С.Ю. Петров [и др.] // Медицина. – 2016. – № 3(15). – С. 136–163.
59. Мамиконян, В.Р., Ингибиторы VEGF в глаукомной хирургии / В.Р. Мамиконян, С.Ю. Петров, Д.М. Сафонова // Офтальмологические ведомости. – 2016. – № 9(1). С. 47–55
60. Мамиконян, В.Р., Послеоперационное применение ранибизумаба в повышении эффективности синустрабекулэктомии / В.Р. Мамиконян, С.Ю. Петров, Ю.В. Мазурова [и др.] // Национальный журнал глаукома. – 2016. – № 15 (2). – С. 61–73.
61. Маянский, Д.Н. Лекции по клинической патологии: руководство для врачей / Д.Н. Маянский. – Москва : ГЭОТАР-Медиа. – 2007. – 464 с.
62. Нагорнова, З.М. Влияние местной гипотензивной терапии на состояние тканей глазной поверхности и исход антиглаукомных операций у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой / З.М. Нагорнова, А.В. Куроедов, С.Ю. Петров [и др.] // Национальный журнал глаукома. – 2019. – № 18(4). – С. 96–107.
63. Нероев, В.В. Влияние приверженности к лечению на прогрессирование первичной открытоугольной глаукомы у пациентов в условиях клинической практики / В.В.Нероев, А.В. Золотарев, Е.В. Карлова [и др.] // Вестник офтальмологии. – 2019. – № 6. – С. 49–57.
64. Павлова, О.Г. Имплантация клапана Ahmed: интраоперационные и ранние послеоперационные осложнения / О.Г. Павлова, В.П. Николаенко, Л.М. Константинова // Офтальмологические ведомости. – 2014. – № 4 (7). – С. 10–12.
65. Петров, С.Ю. Влияние местной гипотензивной терапии на состояние тканей переднего отрезка глаза и исход фистулизирующей хирургии глауком / С.Ю. Петров, Д.Н. Ловпаче, И.А. Лоскутов [и др.] // Офтальмологические ведомости. – 2017. – № 10 (4). – С. 41–47.

66. Петров, С.Ю. Современная концепция борьбы с избыточным рубцеванием после фистулизирующей антиглаукомной операции. Факторы риска и антимиетаболитические препараты / С.Ю. Петров // Офтальмология. – 2017. – №14 С. 5–11.
67. Петров, С.Ю. Современная концепция борьбы с избыточным рубцеванием после фистулизирующей хирургии глаукомы. Противовоспалительные препараты и новые тенденции / С.Ю. Петров // Офтальмология. – 2017. – № 14(2). – С. 99–105.
68. Петров, С.Ю. Современная концепция избыточного рубцевания в хирургии глаукомы / С.Ю. Петров, Д.М. Сафонова // Офтальмология. – 2015. – №12(4). – С. 9–17.
69. Петров, С.Ю. Современная микроинвазивная хирургия глауком / С.Ю.Петров, С.В. Вострухин, А.Э. Асламазова [и др.] // Вестник офтальмологии. – 2016. – №132(3). – С. 96–102.
70. Платэ, Н.А. Дренаж для лечения глаукомы: патент РФ на изобретение № 1444988 / Н.А. Платэ, Л.И. Валуев, В.А. Синани [и др.].
71. Пупышев, А.Б. Эффекты и механизмы действия рапамицина на экспериментальную нейродегенерацию / А.Б. Пупышев, Т.А.Короленко, М.А. Тихонова // Нейрохимия. – 2018. – № 4.– С. 338–350.
72. Самко, А.Н. Рестеноз: причины и механизмы развития при различных видах эндоваскулярного лечения / А.Н. Самко, Е.В. Меркулов, В.М. Власов [и др.] // Атеросклероз и дислипидемии. – 2014. – № 1. – С. 5–8.
73. Серов, В.В. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология) / В.В. Серов, А.Б. Шехтер. – Москва : Медицина, 1981. – 312 с
74. Слонимский, А.Ю. Новые возможности профилактики избыточного рубцевания в хирургии глауком / А.Ю. Слонимский, И.Б. Алексеев, С.С. Долгий // Офтальмология. – 2012. – № 9(3) С. 36–40.
75. Слонимский, А.Ю. Новый биodeградируемый дренаж «Глаутекс» в хирургическом лечении глаукомы / А.Ю. Слонимский, И.Б. Алексеев, С.С. Долгий [и др.] // Глаукома. – 2012. – №4. – С. 55–59.
76. Степанов, А.В. Дренажная хирургия глаукомы / А.В.Степанов, У.Ш.Гамзаева // Российская педиатрическая офтальмология. – 2016. – № 11 (3). – С. 158–164.
77. Струков А.И., Серов В.В. Патологическая анатомия. – М.: Литера, 2011. – 848 с.



78. Тахчиди, Х.П. Дренаж для хирургического лечения глаукомы: патент РФ на изобретение № 2304946 / Х.П. Тахчиди, Т.В. Соколовская, С.В. Новиков [и др.].

79. Тахчиди, Х.П. Результаты лечения пациентов с вторичной оперированной открытоугольной глаукомой с использованием гидрогелевого дренажа, оснащенного гликозаминогликанами и дексазоном / Х.П. Тахчиди, В.Ю. Чеглаков, И.Э. Иошин // Офтальмология. – 2007. – № 2. – С. 29–32.

80. Тахчиди, Х.П. Результаты лечения пациентов с рефрактерной открытоугольной глаукомой с использованием гидрогелевого дренажа, оснащённого бетаметазоном / Х.П. Тахчиди, В.Ю. Чеглаков // Глаукома: теории, тенденции, технологии: VI Международный конф. науч.–практ. конф.: сб. науч. ст. – М., 2008. – С. 593–597.

81. Тахчиди, Х.П. Способ хирургического лечения рефрактерной глаукомы: патент РФ на изобретение №2385694 / Х.П. Тахчиди, В.Ю. Чеглаков.

82. Тахчиди, Х.П., Интраоперационная профилактика рубцевания при моделировании непроникающей глубокой склерэктомии в эксперименте *in vivo* / Х.П. Тахчиди, Е.Х. Тахчиди, С.В. Новиков [и др.] // Офтальмохирургия. – 2012. – № 4. – С. 556–560.

83. Фролов, М.А. Микроинвазивная дренажная хирургия глаукомы / М.А. Фролов, А.М. Фролов, К.А. Казакова [и др.] // Точка зрения. Восток–запад. – 2019. – №2. – С. 108–111.

84. Ходжаев, Н.С. Микроинвазивный способ хирургического лечения открытоугольной глаукомы. Патент РФ на изобретение №2316299 / Н.С.Ходжаев, Ю.Э. Нерсесов, С.В. Новиков [и др.].

85. Ходжаев, Н.С. Экспериментальное исследование различных типов фибриллярно–структурированных дренажей для хирургического лечения глаукомы / Н.С. Ходжаев, А.В.Сидорова, М.Н. Коломейцев [и др.] // Офтальмология. – 2018. – № 15(2S). – С. 211–219.

86. Ходжаев, Н.С. Экспериментально–морфологическое исследование механизма резорбции фибриллярно структурированных дренажей для антиглаукоматозных операций / Н.С. Ходжаев, А.В. Сидорова, В.В. Молчанов [и др.] // Офтальмохирургия. – 2017. – №2. – С. 48–52.

87. Ходжаев, Н.С., Базовые характеристики антиглаукоматозных дренажей / Н.С. Ходжаев, А.В. Сидорова, М.Н. Коломейцев // Офтальмохирургия. – 2017. – № 4. – С. 80–86.
88. Хуснитдинов, И.И. Доставка и пролонгирование действия ранибизумаба в составе гидрогелевого дренажа при антиглаукомных операциях / И.И. Хуснитдинов // Медицинский вестник Башкортостана. – 2018. – № 13 (1 (73)). – С. 93–98.
89. Хуснитдинов, И.И. Эффективность хирургического лечения глаукомы с применением различных видов дренажа «Глаутекс» / И.И. Хуснитдинов, А.Э. Бабушкин // Офтальмология. – 2019. – № 16(1S). – С. 91–95.
90. Черешнев, В.А. Молекулярные механизмы воспаления: учебное пособие / под ред. В.А. Черешнева. – Екатеринбург: УрО РАН, 2010. – 262 с.
91. Черных, В.В. Содержание цитокинов и факторов роста во внутриглазной жидкости у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой // В.В. Черных, В.И. Коненков, О.В. Ермакова [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – № 18(1). – С. 257–265.
92. Четина, Е.В. Сигнальные пути нутриентов и ревматические заболевания / Е.В. Четина // Научно–практическая ревматология. – 2013. – № 51 (3). – С. 313–323.
93. Чупров, А.Д. Опыт применения дренажа "Глаутекс" при непроникающей глубокой склерэктомии / А.Д. Чупров, Ж.Х. Санеева, Ю.И. Лановская // Практическая медицина. – 2018. – № 16 (3). – С. 197–199.
94. Шацких, А.В. Перспективность использования естественных регуляторов для профилактики избыточного рубцевания при антиглаукомных операциях / А.В. Шацких, Х.П. Тахчиди, Е.Х. Тахчиди [и др.] // Практическая медицина. – 2012. – № 4–1(59). – С. 150–153.
95. Шехтер, А.Б. Морфология коллагеновых матриц для тканевой инженерии (биосовместимость, биодegradация, тканевая реакция) / А.Б. Шехтер, А.Е. Гуллер, Л.П. Истранов // Архив патологии. – 2015. – № 6. – С. 29–38.
96. Шмырева В.Ф. Причины снижения отдаленной гипотензивной эффективности антиглаукоматозных операций и возможности ее повышения / В.Ф. Шмырева, С.Ю. Петров, А.С. Макарова // Глаукома. – 2010. – №2. – С. 43-49.

97. Andrés–Guerrero, V. Current Perspectives on the Use of Anti–VEGF Drugs as Adjuvant Therapy in Glaucoma / V. Andrés–Guerrero, L. Perucho–González, J. García–Feijoo [et al.] // *Advances in Therapy*. – 2016. – № 34 (2). P. 378–95.
98. Aono, J. Telomerase Inhibition by Everolimus Suppresses Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointima Formation Through Epigenetic Gene Silencing / J. Aono, E. Ruiz-Rodriguez, H. Qing [et al.] // *JACC: Basic To Translational Science*. – 2016. – №1(1-2). – P 49-60.
99. Averous, J. Regulation of cyclin D1 expression by mTORC1 signaling requires eukaryotic initiation factor 4E–binding protein 1 / J. Averous, B. Fonseca, C. Proud // *Oncogene*. – 2007. - № 27(8). – P. 1106–1113.
100. Banitt, M. Ocular Surface Disease in the Glaucoma Patient / M. Banitt, H. Jung // *Int Ophthalmol Clin*. – 2018. – № 58 (3). – P. 23–33.
101. Barbul, A. The effect of in vivo T helper and T suppressor lymphocyte depletion on wound healing / A. Barbul, R.J. Breslin, J.P. Woodyard [et al.] // *Annals of surgery*. – 1989. – № 209 (4). – P. 479–483.
102. BenEzra, D. Ocular penetration of cyclosporin A. III: The human eye / D. BenEzra, G. Maftzir, C. de Courten [et al.] // *Br J Ophthalmol*. – 1990. – №74(6). – P. 350-352 [published correction appears in *Br J Ophthalmol*. – 1992. – №76(5). – P. 320].
103. Ben–Sahra, I. mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth / I. Ben–Sahra, B.D. Manning // *Curr Opin Cell Biol*. – 2017. - № 45. – P. 72-82.
104. Böhm, M. The mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus suppresses proliferation, metabolic activity and collagen synthesis of human fibroblasts in vitro and exerts antifibrogenic effects in vivo / M. Böhm, A. Stegemann, D. Metze [et al.] // *British Journal Of Dermatology*. – 2017. – №4(177). – e130-e132.
105. Boimer, C. Preservative exposure and surgical outcomes in glaucoma patients: The PESO study // C. Boimer, C.M. Birt // *J Glaucoma*. – 2013. – №22(9). – P. 730-735.
106. Castilho, R.M. Exploiting PI3K/mTOR signaling to accelerate epithelial wound healing / R.M. Castilho, C.H. Squarize, J.S. Gutkind // *Oral Dis*. – 2013. - № 19 (6). – P. 551-558.

107. Chang, L. The role of the immune system in conjunctival wound healing after glaucoma surgery / L. Chang, J.G. Crowston, M.F. Cordeiro [et al.] // *Surv Ophthalmol.* – 2000. – № 45(1). – P.49–68.
108. Chang, R. An emerging treatment option for glaucoma: Rho kinase inhibitors / R. Chang, S. Wang // *Clinical Ophthalmology.* – 2014. – № 8. – P. 883–890.
109. Chatterjee, A. Rapamycin-induced G1 cell cycle arrest employs both TGF- $\beta$  and Rb pathways / A. Chatterjee, S. Mukhopadhyay, K. Tung [et al.] // *Cancer Lett.* – 2015. - № 360 (2). – P. 134-140.
110. Cheng, J.W. Anti-vascular endothelial growth factor for control of wound healing in glaucoma surgery / J.W. Cheng, S.W. Cheng, R.L. Wei [et al.] // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2016. - № 4. - Article ID CD009782.
111. Chihara, E. Effects of Trilast on Filtering Blebs: A Pilot Study / E. Chihara, J. Dong, H. Ochiai [et al.] // *Journal of Glaucoma.* – 2002. – № 11(2). – P. 127–133.
112. Cinik, R. The Effect of Everolimus on Scar Formation in Glaucoma Filtering Surgery in a Rabbit Model / R. Cinik, N. Yüksel, D. Pirhan [et al.] // *Curr Eye Res.* – 2016. - № 41 (11). – P. 1438-1446.
113. Clark, R.A.F. The molecular and cellular biology of wound repair., 2nd edition / R.A.F. Clark, P.M. Henson. – New York: Plenum Press, 1996. – 611 p.
114. Crabtree, G.R. Calcium, calcineurin, and the control of transcription / G.R. Crabtree // *J Biol Chem.* – 2001. – № 276 (4). – P. 2313–2319.
115. Csősz, É. Comparative analysis of cytokine profiles of glaucomatous tears and aqueous humour reveals potential biomarkers for trabeculectomy complications / É. Csősz, E. Deák, N. Tóth [et al.] // *FEBS Open Bio.* – 2019. - № 9(5). – P. 1020-1028.
116. Csősz, É. Wound-Healing Markers Revealed by Proximity Extension Assay in Tears of Patients following Glaucoma Surgery / É. Csősz, N. Tóth, E. Deák [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2018. - №19 (12). – P. 4096.
117. Cumurcu, T. Use and Complications in Ophthalmology / T. Cumurcu, C. Mitomycin // *Int J Clin Exp Ophthalmol.* – 2017. -№ 1. – P. 29–32.
118. Cvenkel, B. Inflammatory molecules in aqueous humour and on ocular surface and glaucoma surgery outcome / B. Cvenkel, A.N. Kopitar, A. Ihan // *Mediators of inflammation.* – 2010. – Article ID 939602.

119. Dai, J. Negative regulation of PI3K/AKT/mTOR axis regulates fibroblast proliferation, apoptosis and autophagy play a vital role in triptolide-induced epidural fibrosis reduction / J. Dai, Y. Sun, D. Chen [et al.] // *Eur J Pharmacol.* – 2019. - № 864. – P.:172724 - 172734.
120. Dai, Z. Development of a novel CsA-PLGA drug delivery system based on a glaucoma drainage device for the prevention of postoperative fibrosis / Z. Dai, X. Yu, J. Hong [et al.]// *Mater Sci Eng C Mater Biol.* – 2016. -№ 66. – P. 206–214.
121. de Faria, N. Conjunctival changes and inflammatory aspects in rabbits' conjunctivas induced by fixed combinations of prostaglandin analogues and timolol maleate / N. de Faria, H. Russ, P. Rose [et al.] // *J Ophthalmic Inflamm Infect.* – 2013. – № 3 (1). – P. 22.
122. Dean, P. Wound-healing complications after kidney transplantation: a prospective, randomized comparison of sirolimus and tacrolimus / P. Dean, W. Lund, T. Larson [et al.] // *Transplantation.* - 2004. - № 77 (10). P. 1555–1561.
123. Dobashi, Y. Mammalian target of rapamycin: a central node of complex signaling cascades / Y. Dobashi, Y. Watanabe, C. Miwa [et al.] // *Int J Clin Exp Pathol.*- 2011. - № 4 (5). – P. 476-495.
124. Doersch, K. The contribution of interleukin-2 to effective wound healing / K. Doersch, D. DelloStritto, M. Newell-Rogers // *Experimental Biology and Medicine.* – 2016. – № 242(4). – P. 384–396.
125. Dou, F. Aloe-Emodin Ameliorates Renal Fibrosis Via Inhibiting PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway In Vivo and In Vitro / F. Dou, Y. Liu, L. Liu [et al.] // *Rejuvenation Res.* – 2019. - № 22(3). – P. 218-229.
126. Driscoll, D.R. mTORC2 Signaling Drives the Development and Progression of Pancreatic Cancer / D.R. Driscoll, S.A. Karim, M. Sano [et al.] // *Cancer Res.* – 2016. - № 76 (23). – P. 6911-6923.
127. Eming, S. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation / S. Eming, P. Martin, M. Tomic-Canic // *Sci Transl. Med.* – 2014. – № 6 (265). – P. 265.
128. Eren, K. The Suppression of Wound Healing Response with Sirolimus and Sunitinib Following Experimental Trabeculectomy in a Rabbit Model / K. Eren, B. Turgut, M. Akin [et al.] // *Curr Eye Res.* – 2015. - № 41 (3). – P. 367-376.

129. European Glaucoma Society Terminology and Guidelines for Glaucoma, 5th Edition. 2020., 172 p.
130. Fakhraie, G, Effects of postoperative cyclosporine ophthalmic emulsion 0.05% (Restasis) following glaucoma surgery / G. Fakhraie, J.F. Lopes, G.L Spaeth [et al.] // *Clinical and Experimental Ophthalmology*. – 2009. – № 37 (9). – P. 842–848.
131. Fan Gaskin, J. Wound Healing Modulation in Glaucoma Filtration Surgery—Conventional Practices and New Perspectives: The Role of Antifibrotic Agents (Part I) / J. Fan Gaskin, D. Nguyen, G. Ang [et al.] // *Current Journal of Glaucoma Practice with DVD*. – 2014. – № 8. – P. 37–45.
132. Faulds, D. Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders / D. Faulds, K.L. Goa, P. Benfield // *Drugs*. – 1993. – № 45(6). – P. 953–1040.
133. Fingar, D. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression / D. Fingar, J. Blenis // *Oncogene*. – 2004. - № 23. – P. 3151–3171.
134. Finnson, K. Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring / K. Finnson, S. McLean, G. Di Guglielmo [et al.] // *Adv Wound Care (New Rochelle)*. – 2013. – № 2 (5). – P. 195–214.
135. Friedlander, M. Fibrosis and diseases of the eye / M. Friedlander // *Journal of Clinical Investigation*. – 2007. – № 117(3). – P. 576–586.
136. Garweg, J.G. Effects of daunorubicin, mitomycin C, azathioprine and cyclosporin A on human retinal pigmented epithelial, corneal endothelial and conjunctival cell lines / J.G. Garweg, M. Wegmann–Burns , D. // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. – 2006. - № 244 (3). – P. 382–389.
137. Guilbeau, J. Delayed Wound Healing with Sirolimus after Liver Transplant / J. Guilbeau // *Annals of Pharmacotherapy*. – 2002. № 36 (9). P. 1391–1395.
138. Hill, L. Decorin treatment for reversing trabecular meshwork fibrosis in open–angle glaucoma / L. Hill, Z. Ahmed, A. Logan // *Neural Regeneration Research*. – 2016. – № 11 (6). – P. 922–923.
139. Hogan, P.G. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT / P.G. Hogan, L. Chen , J. Nardone [et al.] // *Genes Dev*. – 2003. – № 17. – P. 2205–2232.

140. Holló, G. Wound Healing and Glaucoma Surgery: Modulating the Scarring Process with Conventional Antimetabolites and New Molecules / G. Holló // *Glaucoma Surgery*. – 2017. – № 59. – P. 80–89.
141. Houghton, P. Everolimus / P. Houghton // *Clinical Cancer Research*. – 2010. - № 16 (5). – P. 1368–1372.
142. Hu, X. Activation of mTORC1 in fibroblasts accelerates wound healing and induces fibrosis in mice / X. Hu, H. Zhang, X. Li [et al.] // *Wound Repair Regen*. – 2020. - № 28 (1). – P. 6-15.
143. Huang, H. Impaired wound healing results from the dysfunction of the Akt/mTOR pathway in diabetic rats / H. Huang, W. Cui, W. Qiu [et al.] // *J Dermatol Sci*. – 2015. - № 79 (3). – P. 241–251.
144. Ismailos, G. Unusual solubility behaviour of cyclosporin A in aqueous media / G. Ismailos, C. Reppas, , J.B. Dressman [et al.] // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 1991. - № 43. – P. 287–289.
145. Jere, S.W. Role of the PI3K/AKT (mTOR and GSK3 $\beta$ ) signalling pathway and photobiomodulation in diabetic wound healing / S.W. Jere, N.N. Houreld, H. Abrahamse // *Cytokine Growth Factor Rev*. – 2019. - № 50. – P. 52-59.
146. Karar, J. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis / J. Karar, A. Maity // *Front Mol Neurosci*. – 2011. - № 4. – Article ID 51.
147. Khan, S. The Timing of Stimulation and IL–2 Signaling Regulate Secondary CD8 T Cell Responses / S. Khan, M.G. Martin Starbeck–Miller [et al.] // *PLoS Pathog*. – 2015. – № 11 (10). – Article ID 1005199.
148. Khaw, P. A Phase III Study of Subconjunctival Human Anti–Transforming Growth Factor  $\beta$ 2 Monoclonal Antibody (CAT–152) to Prevent Scarring after First–Time Trabeculectomy / P. Khaw, F. Grehn, G. Holló [et al.] // *Ophthalmology*. – 2007. – № 114(10). – P. 1822–1830.
149. Khaw, P.T. Advances in glaucoma surgery: evolution of antimetabolite adjunctive therapy / P.T. Khaw // *J Glaucoma*. – 2001. – № 10 (5 Suppl 1). – P. S81-S84.
150. Kim, S. Critical Role of mTORC2–Akt Signaling in TGF– $\beta$ 1–Induced Myofibroblast Differentiation of Human Pterygium Fibroblasts / S. Kim, H. Kim, B. Thapa [et al.] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2019. - № 60(1). – P. 82-92.

151. Knagenhjelm, S.K. Toxicological evaluation of cyclosporine eyedrops / S.K. Knagenhjelm, K. Frøyland, A. Ringvold [et al.] // *Acta Ophthalmol Scand.* – 1999. - № 77 (2). – P. 200–203.
152. Kumar, V. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 9th Edition / V. Kumar, A.K. Abbas, N. Fausto [et al.]. – Italy: Elsevier Saunders, 2014. – 1408 p.
153. Kuo, H. Evaluation of the Effect of Everolimus on Retinal Pigment Epithelial Cells and Experimental Proliferative Vitreoretinopathy / H. Kuo, Y. Chen, Y. Kuo [et al.] // *Curr Eye Res.* - 2017. - № 43 (3). - P. 333–339.
154. Kuppahally, S. Wound Healing Complications with De Novo Sirolimus Versus Mycophenolate Mofetil–Based Regimen in Cardiac Transplant Recipients / S. Kuppahally, A. Al–Khaldi, D. Weisshaar [et al.] // *American Journal of Transplantation.* – 2006. - № 6(5p1). – P. 986–992.
155. Lallemand, F. Cyclosporine A delivery to the eye: A comprehensive review of academic and industrial efforts / F. Lallemand, M. Schmitt, J. Bourges [et al.] // *European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics.* – 2017. – № 117. – P 14-28.
156. Lan, R.Y. The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin–2 (IL–2) / R.Y. Lan, C. Selmi, M.E. Gershwin // *J Autoimmun.* – 2008. – № 31 (1). – P. 7-12.
157. Laplante, M. mTOR Signaling in Growth Control and Disease / M. Laplante D. Sabatini // *Cell.* – 2012. - № 149 (2). – P. 274–293.
158. Lattanzio, F.A. Cyclosporin as an Adjunct to Glaucoma Filtration Surgery / F.A. Lattanzio, E.R. Crouch, P.V. Mitrev J [et al.] // *Glaucoma.* – 2005. – № 14 (6). – P. 441–447.
159. Lavigne, M.C. Antirestenotic mechanisms of everolimus on human coronary artery smooth muscle cells: inhibition of human coronary artery smooth muscle cell proliferation, but not migration / M.C. Lavigne, J.L. Grimsby, M.J. Eppihimer // *J Cardiovasc Pharmacol.* – 2012. - № 59 (2). – P. 165-174.
160. Law, M. Rapamycin disrupts cyclin/cyclin–dependent kinase/p21/proliferating cell nuclear antigen complexes and cyclin D1 reverses rapamycin action by stabilizing these complexes / M. Law, E. Forrester, A. Chytil [et al.] // *Cancer Res.* – 2006. - № 66 (2). – P. 1070-1080.



161. Lawrence, J. The Role of the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Pulmonary Fibrosis / J. Lawrence, R. Nho // *Int J Mol Sci.* - 2018. - № 19 (3). – Article ID 778.
162. Lee, C.K. Long-term clinical outcomes of Ahmed valve implantation in patients with refractory glaucoma / C.K. Lee, K.T. Ma, Y.J. Hong [et al.] // *PLoS One.* – 2017. - № 12 (11). - Article ID 0187533.
163. Lee, K. Bevacizumab and Rapamycin Can Decrease Corneal Opacity and Apoptotic Keratocyte Number following Photorefractive Keratectomy / K. Lee, D. Ko, E. Kim [et al.] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* – 2012. - № 53 (12). – P. 7645-7653.
164. Leibovich, S. J. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum / S.J. Leibovich, R. Ross // *The American journal of pathology.* – 1975. – № 78(1). – P. 71–100.
165. Leonardi, A. Effects of Cyclosporin A on Human Conjunctival Fibroblasts / A. Leonardi, G. DeFranchis, I.A. Fregona [et al.] // *Arch Ophthalmol.* – 2001. – №119(10). – P. 1512–1517.
166. Li, G. ILK–PI3K/AKT pathway participates in cutaneous wound contraction by regulating fibroblast migration and differentiation to myofibroblast / G. Li, Y.Y. Li, J.E. Sun [et al.] // *Lab Invest.* – 2016. - № 96 (7). – P. 741-751.
167. Liao W. Modulation of cytokine receptors by IL–2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages / W. Liao, J.X. Lin, L. Wang [et al.] // *Nat Immunol.* – 2011. – № 12 (6). – P. 551-559.
168. Luo, Y–H. Rosiglitazone Inhibits TGF– $\beta$  1 Induced Activation of Human Tenon Fibroblasts via p38 Signal Pathway / Y–H. Luo, P–B. Ouyang, J. Tian // *Public Library of Science (PLoS).* – 2014. – № 9(8). – Article ID 105796.
169. Martorana, G.M. Sequential Therapy with Saratin, Bevacizumab and Ilomastat to Prolong Bleb Function following Glaucoma Filtration Surgery in a Rabbit Model / G.M. Martorana, J.L. Schaefer, M.A. Levine [et al.] // *PLOS ONE.* – 2015. – № 10(9). – Article ID 0138054.
170. Masoumpour, M. Current and Future Techniques in Wound Healing Modulation after Glaucoma Filtering Surgeries / M. Masoumpour, , M. Nowroozzadeh, M. Razeghinejad // *Open Ophthalmol J.* – 2016. – №10 (Suppl 1: M5). – P. 68–85.

171. Matsuda S. Mechanisms of action of cyclosporine / S. Matsuda, S. Koyasu // *Immunopharmacology*. – 2000. – №47 (2–3). – P. 119–125.
172. Mietz, H. Suramin inhibits wound healing following filtering procedures for glaucoma / H. Mietz, P. Chevez–Barrios, R.M. Feldman, [et al.] // *British Journal of Ophthalmology*. – 1998. – № 82 (7). – P. 816–820.
173. Milani, B. Rapamycin Inhibits the Production of Myofibroblasts and Reduces Corneal Scarring After Photorefractive Keratectomy / B. Milani, F. Milani, D. Park [et al.] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2013. - № 54 (12). – P. 7424-7430.
174. Moreno, R. Everolimus–eluting coronary stents / R. Moreno // *Medical Devices: Evidence and Research*. - 2010. - № 3. – P. 51-56.
175. Nuzzi, R. Conjunctiva and subconjunctival tissue in primary open–angle glaucoma after long–term topical treatment: an immunohistochemical and ultrastructural study / R. Nuzzi, A. Vercelli, C. Finazzo [et al.] // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. – 1995. – № 233 (3). – P. 154-162.
176. Park, C.K. Pirfenidone inhibits fibrosis in foreign body reaction after glaucoma drainage device implantation / C.K. Park, K.I. Jung // *Drug Design, Development and Therapy*. – 2016. – № 10. – P. 1477–1488.
177. Park, J. Understanding the role of immune regulation in wound healing / J. Park, A. Barbul // *The American Journal of Surgery*. – 2004. – № 187(5). – P. S11–S16.
178. Park, K.H. Topical cyclosporine and glaucoma drainage implant surgery in rabbits / K.H. Park, D.M. Kim, D.H. Youn // *Ophthalmic Surg Lasers*. –1996. – № 27(6). – P. 452–458.
179. Park, S. Rapamycin–resistant and torin–sensitive mTOR signaling promotes the survival and proliferation of leukemic cells / S. Park, H. Sim, K. Lee // *BMB Rep*. – 2016. - № 49 (1). – P. 63-68.
180. Pérez–Rico, C. Effect of topical 0.05% cyclosporine A on corneal endothelium in patients with dry eye disease / C. Pérez–Rico, F. Germain , M. Castro–Rebollo [et al.] // *Int J Ophthalmol*. – 2013. - № 18 (4). – P. 471–474.
181. Peterson, J.M. Significance of T–lymphocytes in wound healing / J.M. Peterson, A. Barbul, R.J. Breslin [et al.] // *Surgery*. – 1987. – № 102 (2). – P. 300-305.
182. Riva, I. Ahmed glaucoma valve implant: surgical technique and complications / I. Riva, G. Roberti, F. Oddone [et al.] // *Clin Ophthalmol*. – 2017. - №11. – P. 357-367.

183. Rusnak F. Calcineurin: form and function / F. Rusnak, P. Mertz // *Physiol Rev.* – 2000. – № 80 (4). – P.1483–521.
184. Russ, H.H. Conjunctival changes induced by prostaglandin analogues and timolol maleate: a histomorphometric study / H.H. Russ, V.P. Costa, F.M. Ferreira [et al.] // *Arq Bras Oftalmol.* – 2007. – № 70 (6). –P. 910-916.
185. Sabatini, D. Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth / Sabatini, D. // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2017. - № 114(45). – P. 11818–11825.
186. Salas-Prato, M. Inhibition by rapamycin of PDGF- and bFGF-induced human tenon fibroblast proliferation in vitro / M. Salas-Prato, A. Assalian, A.Z. Mehdi [et al.] // *J Glaucoma.* – 1996. - № 5 (1). – P. 54-59.
187. Saxton, R.A. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease / R.A. Saxton, D.M. Sabatini // *Cell.* – 2017. - №168(6). – P. 960-976.
188. Schäffer, M. Sirolimus impairs wound healing / M. Schäffer, R. Schier, M. Napirei [et al.] // *Langenbecks Arch Surg.* – 2007. - № 392 (3). – P. 297–303.
189. Seet, L.-F. SPARC Deficiency Results in Improved Surgical Survival in a Novel Mouse Model of Glaucoma Filtration Surgery / L.-F. Seet, R. Su, V.A. Barathi, [et al.] // *PLoS ONE.* – 2010. – № 5 (2). – Article ID 9415.
190. Shin, Y. Chemical Injury-Induced Corneal Opacity and Neovascularization Reduced by Rapamycin via TGF- $\beta$ 1/ERK Pathways Regulation / Y. Shin, J. Hyon, W. Choi [et al.] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* – 2013. - № 54 (7). P. 4452-4458.
191. Simpson, D. The neutrophilic leukocyte in wound repair / D. Simpson, R. Ross // *Journal of Clinical Investigation.* – 1972. – № 51(8). – P. 2009–2023.
192. Stahl, A. Rapamycin reduces VEGF expression in retinal pigment epithelium (RPE) and inhibits RPE-induced sprouting angiogenesis in vitro / A. Stahl, L. Paschek, G. Martin [et al.] // *FEBS Lett.* – 2008. - № 582 (20). – P. 3097-3102.
193. Tang-Liu, D.D. Ocular pharmacokinetics and safety of ciclosporin, a novel topical treatment for dry eye / D.D. Tang-Liu, A. Acheampong // *Clin Pharmacokinet.* – 2005. - № 44 (3). – P. 247–261.
194. Tatlipinar, S. Topical ciclosporin in the treatment of ocular surface disorders / S. Tatlipinar, E.K. Akpek // *Br J Ophthalmol.* – 2005. – № 89. – P. 1363–1367.

195. Tham, Y.C. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis / Y.C. Tham, X. Li, T.Y. Wong [et al.] // *Ophthalmology*. – 2014. – №121(11). – P. 2081-90.
196. Tong, J. Evidence for the Involvement of RhoA Signaling in the Ethanol-Induced Increase in Intestinal Epithelial Barrier Permeability / J. Tong, Y. Wang, B. Chang [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2013. - № 14 (2). – P. 3946–3960.
197. Trelford, CB. The Pro-Fibrotic Behavior of Human Tenon's Capsule Fibroblasts in Medically Treated Glaucoma Patients / C.B. Trelford, J.T. Denstedt, J.J. Armstrong [et al.] // *Clin Ophthalmol*. – 2020. - № 14. – P. 1391–1402.
198. Tsonis, A. *Animal Models In Eye Research* / A. Tsonis. - San Diego: Academic Press, 2008 – 215 p.
199. Turaçlı, M.E. Topical cyclosporine as a possible new antimetabolite in trabeculectomy / M.E. Turaçlı, K. Gündüz, G. Aktan [et al.] // *Ophthalmic surgery and lasers*. –1996. – № 27 (6). – P. 438–444.
200. Turgut, B. Topical infliximab for the suppression of wound healing following experimental glaucoma filtration surgery / B. Turgut, K. Eren, T. Demir [et al.] // *Drug Design, Development and Therapy*. – 2014. – № 8. –P. 421–430.
201. Van Bergen, T. Improving patient outcomes following glaucoma surgery: state of the art and future perspectives / T. Van Bergen, S. Van de Velde, E. Vandewalle [et al.] // *Clinical Ophthalmology*. – 2014. – № 8. – P. 857–867.
202. Van Bergen, T. Inhibition of placental growth factor improves surgical outcome of glaucoma surgery / T. Van Bergen, B. Jonckx, K. Hollanders, [et al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2013. – № 17 (12). – P. 1632–1643.
203. Viveiros, M.M.H. In vitro study of cyclosporine A 0.05 % on primary and recurrent pterygium fibroblasts / M.M.H. Viveiros, F.Y. Kakizaki, L.A. Hércules [et al.] // *Int Ophthalmol*. – 2016. – №36. – P. 237–242.
204. Wang, P. The cyclophilins / P. Wang, J. Heitman // *Genome Biol*. –2005. – № 6 (7). – P. 226.
205. Wang, X. Anti-proliferative effect of olmesartan on Tenon's capsule fibroblasts / X. Wang, Y.Z. Fan, L. Yao, [et al.] // *Int J Ophthalmol*. – 2016. – № 9. – P. 669–676.

206. Watanabe, R. mTOR Signaling, Function, Novel Inhibitors, and Therapeutic Targets / R. Watanabe, L. Wei, J. Huang // *Journal of Nuclear Medicine*. - 2011. - № 52 (4). – P. 497-500.
207. Webber L. Topical delivery of mTOR inhibitor halts scarring / L. Webber, B. Yip, C. Nascimento Filho [et al.] // *J Dermatol Sci*. – 2019. - № 95 (2). – P. 76–79.
208. Wei, X. Roles of mTOR Signaling in Tissue Regeneration / X. Wei, L. Luo, J. Chen // *Cells*. – 2019. - № 8 (9). – P. 1075.
209. Wen, R. Rapamycin inhibits choroidal neovascularization. Poster presented at: Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology / R. Wen, Z. Wang, Y. Song [et al.]. - Fort Lauderdale, Fla, May 7, 2003.
210. Wong, T. The Singapore 5-Fluorouracil Trabeculectomy Study / T. Wong, P. Khaw, T. Aung [et al.] // *Ophthalmology*. – 2009. – № 116(2). P. 175–184.
211. Wynn, T. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis / T. Wynn, K. Vannella // *Immunity*. – 2016. – № 44(3). –P. 450–462.
212. Xiao, W. Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway / W. Xiao, H. Tang, M. Wu [et al.] // *Biosci Rep*. – 2017. - № 37 (6). – BSR20170658.
213. Xiao, Y. SB-431542 Inhibition of Scar Formation after Filtration Surgery and Its Potential Mechanism / Y. Xiao, K. Liu, J. Shen [et al.] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2009. – № 50 (4). – P. 1698–1706.
214. Xie, J. mTOR inhibitors in cancer therapy / J. Xie, X. Wang, C.G. Proud // *F1000Res*. – 2016. - № 5. - Article ID 2078.
215. Xu, H. Natural plant extract Berbamine is a potent inhibitor of cell growth and survival of human Tenon's fibroblasts / H. Xu, Y. Kong, Y. Chen [et al.] // *Ophthalmic Res*. – 2020. - № 63. – P. 555-563.
216. Yamanaka, O. Pathobiology of wound healing after glaucoma filtration surgery / O. Yamanaka, A. Kitano–Izutani, K. Tomoyose [et al.] // *BMC Ophthalmology*. – 2015. – № 15 (suppl. 1). – P. 19–27.
217. Yan, Z.C.. Anti-proliferation effects of Sirolimus sustained delivery film in rabbit glaucoma filtration surgery / Z.C. Yan, Y.J. Bai, Z. Tian, [et al.] // *Mol Vis*. – 2011. - № 17. – P. 2495-2506.

218. Yang, H. mTOR kinase structure, mechanism and regulation / H. Yang, D.G. Rudge, J.D. Koos [et al.] // *Nature*. – 2013. - № 497(7448). - P. 217–223.
219. Yellen, P. High-dose rapamycin induces apoptosis in human cancer cells by dissociating mTOR complex 1 and suppressing phosphorylation of 4E-BP1 / P. Yellen, M. Saqcena, D. Salloum [et al.] // *Cell Cycle*. – 2011. – №10(22). – P. 3948-3956.
220. Zada, M, Modulation of Fibroblasts in Conjunctival Wound Healing / M. Zada, U. Pattamatta, A. White // *Ophthalmology*. – 2018. – № 125(2). – P. 179–192.
221. Zhao, X.R. Expression of mTOR in Primary Pterygium and its Correlation with  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin / X.R. Zhao, M.C. Zhang, H.T. Xie [et al.] // *Eur J Ophthalmol*. – 2017. - № 27 (6). – P. 664-669.
222. Zhou, J. Role of mammalian target of rapamycin in regulating HIF-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor signals in glaucoma / J. Zhou, F. Chen, A. Yan [et al.] // *Arch Physiol Biochem*. – 2019.– P. 1–7.
223. Zhu, X. Evaluation of Chitosan / Aptamer Targeting TGF- $\beta$  Receptor II Thermo-Sensitive Gel for Scarring in Rat Glaucoma Filtration Surgery / X. Zhu, D. Xu, X. Zhu [et al.] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2015. – № 56 (9). – P 54–65.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1А – Прогнозируемое количество циклоспорина А, сорбируемого пористой моделью биорезорбируемого дренажа на основе полимолочной кислоты в различных разведениях концентрата ЦсА (50 мг/мл) с BSS в зависимости от времени (мин.)

| Разведение<br>Концентрат:BSS | Время насыщения (мин.) |                         |      |      |      |                           |      |      |      |                         |      |      |      |                           |      |      |      |           |  |
|------------------------------|------------------------|-------------------------|------|------|------|---------------------------|------|------|------|-------------------------|------|------|------|---------------------------|------|------|------|-----------|--|
|                              | 22                     | 21                      | 20   | 19   | 18   | 17                        | 16   | 15   | 14   | 13                      | 12   | 11   | 10   | 9                         | 8    | 7    | 6    | 5         |  |
| 1:7                          | 5,07                   | 5,07                    | 5,04 | 4,99 | 4,93 | 4,84                      | 4,73 | 4,59 | 4,42 | 4,23                    | 4,00 | 3,74 | 3,45 | 3,12                      | 2,77 | 2,39 | 2,04 | 1,76      |  |
| 1:8                          | 5,07                   | 5,06                    | 5,04 | 4,99 | 4,93 | 4,84                      | 4,73 | 4,59 | 4,42 | 4,23                    | 4,00 | 3,74 | 3,44 | 3,12                      | 2,76 | 2,39 | 2,04 | 1,76      |  |
| 1:9                          | 5,06                   | 5,06                    | 5,03 | 4,98 | 4,92 | 4,83                      | 4,72 | 4,58 | 4,41 | 4,22                    | 3,99 | 3,73 | 3,44 | 3,11                      | 2,76 | 2,38 | 2,03 | 1,75      |  |
| 1:10                         | 5,05                   | 5,04                    | 5,02 | 4,97 | 4,91 | 4,82                      | 4,71 | 4,57 | 4,40 | 4,21                    | 3,98 | 3,72 | 3,42 | 3,10                      | 2,74 | 2,37 | 2,01 | 1,74      |  |
| 1:11                         | 5,03                   | 5,03                    | 5,00 | 4,95 | 4,89 | 4,80                      | 4,69 | 4,55 | 4,38 | 4,19                    | 3,96 | 3,70 | 3,41 | 3,08                      | 2,73 | 2,36 | 2,00 | 1,72      |  |
| 1:12                         | 5,01                   | 5,01                    | 4,98 | 4,94 | 4,87 | 4,78                      | 4,67 | 4,53 | 4,36 | 4,17                    | 3,94 | 3,68 | 3,39 | 3,06                      | 2,71 | 2,34 | 1,98 | 1,70      |  |
| 1:13                         | 4,99                   | 4,98                    | 4,96 | 4,91 | 4,85 | 4,76                      | 4,65 | 4,51 | 4,34 | 4,15                    | 3,92 | 3,66 | 3,37 | 3,04                      | 2,68 | 2,31 | 1,96 | 1,68      |  |
| 1:14                         | 4,97                   | 4,96                    | 4,93 | 4,89 | 4,82 | 4,74                      | 4,62 | 4,49 | 4,32 | 4,12                    | 3,90 | 3,64 | 3,34 | 3,02                      | 2,66 | 2,29 | 1,93 | 1,66      |  |
| 1:15                         | 4,94                   | 4,94                    | 4,91 | 4,87 | 4,80 | 4,71                      | 4,60 | 4,46 | 4,30 | 4,10                    | 3,87 | 3,61 | 3,32 | 2,99                      | 2,64 | 2,27 | 1,91 | 1,63      |  |
| 1:16                         | 4,92                   | 4,91                    | 4,88 | 4,84 | 4,77 | 4,69                      | 4,57 | 4,43 | 4,27 | 4,07                    | 3,85 | 3,59 | 3,29 | 2,96                      | 2,61 | 2,24 | 1,88 | 1,61      |  |
| 1:17                         | 4,89                   | 4,88                    | 4,86 | 4,81 | 4,75 | 4,66                      | 4,55 | 4,41 | 4,24 | 4,05                    | 3,82 | 3,56 | 3,26 | 2,94                      | 2,58 | 2,21 | 1,86 | 1,58      |  |
| 1:18                         | 4,86                   | 4,86                    | 4,83 | 4,78 | 4,72 | 4,63                      | 4,52 | 4,38 | 4,21 | 4,02                    | 3,79 | 3,53 | 3,24 | 2,91                      | 2,55 | 2,18 | 1,83 | 1,55      |  |
| 1:19                         | 4,83                   | 4,83                    | 4,80 | 4,76 | 4,69 | 4,60                      | 4,49 | 4,35 | 4,19 | 3,99                    | 3,76 | 3,50 | 3,21 | 2,88                      | 2,53 | 2,16 | 1,80 | 1,52      |  |
| 1:20                         | 4,81                   | 4,80                    | 4,77 | 4,73 | 4,66 | 4,57                      | 4,46 | 4,32 | 4,16 | 3,96                    | 3,73 | 3,47 | 3,18 | 2,85                      | 2,50 | 2,13 | 1,77 | 1,49      |  |
| 1:21                         | 4,78                   | 4,77                    | 4,74 | 4,70 | 4,63 | 4,54                      | 4,43 | 4,29 | 4,13 | 3,93                    | 3,70 | 3,44 | 3,15 | 2,82                      | 2,47 | 2,10 | 1,74 | 1,46      |  |
| 1:22                         | 4,75                   | 4,74                    | 4,71 | 4,67 | 4,60 | 4,51                      | 4,40 | 4,26 | 4,10 | 3,90                    | 3,67 | 3,41 | 3,12 | 2,79                      | 2,44 | 2,07 | 1,71 | 1,43      |  |
| 1:23                         | 4,71                   | 4,71                    | 4,68 | 4,64 | 4,57 | 4,48                      | 4,37 | 4,23 | 4,07 | 3,87                    | 3,64 | 3,38 | 3,09 | 2,76                      | 2,41 | 2,04 | 1,68 | 1,40      |  |
| 1:24                         | 4,69                   | 4,68                    | 4,65 | 4,61 | 4,54 | 4,45                      | 4,34 | 4,20 | 4,04 | 3,84                    | 3,61 | 3,35 | 3,06 | 2,73                      | 2,38 | 2,01 | 1,65 | 1,37      |  |
| 1:25                         | 4,65                   | 4,65                    | 4,62 | 4,57 | 4,51 | 4,42                      | 4,31 | 4,17 | 4,00 | 3,81                    | 3,58 | 3,32 | 3,03 | 2,70                      | 2,34 | 1,97 | 1,62 | 1,34      |  |
| 1:26                         | 4,62                   | 4,61                    | 4,59 | 4,54 | 4,48 | 4,39                      | 4,28 | 4,14 | 3,97 | 3,78                    | 3,55 | 3,29 | 3,00 | 2,67                      | 2,31 | 1,94 | 1,59 | 1,31      |  |
| 1:27                         | 4,59                   | 4,59                    | 4,56 | 4,51 | 4,45 | 4,36                      | 4,25 | 4,11 | 3,94 | 3,75                    | 3,52 | 3,26 | 2,97 | 2,64                      | 2,29 | 1,92 | 1,56 | 1,28      |  |
| 1:28                         | 4,56                   | 4,55                    | 4,52 | 4,48 | 4,41 | 4,32                      | 4,21 | 4,07 | 3,91 | 3,71                    | 3,49 | 3,22 | 2,93 | 2,60                      | 2,25 | 1,88 | 1,52 | 1,24      |  |
| 1:29                         | 4,53                   | 4,52                    | 4,50 | 4,45 | 4,38 | 4,30                      | 4,18 | 4,05 | 3,88 | 3,68                    | 3,46 | 3,20 | 2,90 | 2,58                      | 2,22 | 1,85 | 1,49 | 1,22      |  |
| 1:30                         | 4,49                   | 4,49                    | 4,46 | 4,42 | 4,35 | 4,26                      | 4,15 | 4,01 | 3,84 | 3,65                    | 3,42 | 3,16 | 2,87 | 2,54                      | 2,19 | 1,82 | 1,46 | 1,18      |  |
|                              |                        | ≈5 мкг<br>4,75-5,07 мкг |      |      |      | ≈4,5 мкг<br>4,25-4,74 мкг |      |      |      | ≈4 мкг<br>3,74-4,25 мкг |      |      |      | ≈3,5 мкг<br>3,25-3,74 мкг |      |      |      | <3,25 мкг |  |

Приложение 1Б – Прогнозируемое количество циклопорина А, сорбируемого микроволокнистой моделью биорезорбируемого дренажа на основе полимолочной кислоты в различных разведениях концентрата ЦсА (50 мг/мл) с BSS в зависимости от времени (мин.)

| Разведение<br>Концентрат:BSS | Время насыщения (мин.) |       |       |       |                           |       |       |           |       |       |       |       |       |       |
|------------------------------|------------------------|-------|-------|-------|---------------------------|-------|-------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                              | 23,00                  | 22,00 | 21,00 | 20,00 | 19,00                     | 18,00 | 17,00 | 16,00     | 15,00 | 14,00 | 13,00 | 12,00 | 11,00 | 10,00 |
| 1:7                          | 3,71                   | 3,72  | 3,70  | 3,67  | 3,62                      | 3,54  | 3,44  | 3,32      | 3,17  | 2,99  | 2,78  | 2,55  | 2,29  | 2,01  |
| 1:8                          | 3,66                   | 3,67  | 3,66  | 3,63  | 3,57                      | 3,50  | 3,40  | 3,27      | 3,12  | 2,94  | 2,74  | 2,50  | 2,25  | 1,97  |
| 1:9                          | 3,62                   | 3,63  | 3,61  | 3,58  | 3,53                      | 3,45  | 3,35  | 3,23      | 3,08  | 2,90  | 2,69  | 2,46  | 2,20  | 1,92  |
| 1:10                         | 3,57                   | 3,58  | 3,57  | 3,54  | 3,49                      | 3,41  | 3,31  | 3,19      | 3,03  | 2,85  | 2,65  | 2,42  | 2,16  | 1,88  |
| 1:11                         | 3,53                   | 3,54  | 3,53  | 3,50  | 3,44                      | 3,37  | 3,27  | 3,14      | 2,99  | 2,81  | 2,61  | 2,37  | 2,11  | 1,84  |
| 1:12                         | 3,49                   | 3,50  | 3,48  | 3,45  | 3,40                      | 3,32  | 3,22  | 3,10      | 2,95  | 2,77  | 2,56  | 2,33  | 2,07  | 1,79  |
| 1:13                         | 3,44                   | 3,45  | 3,44  | 3,41  | 3,36                      | 3,28  | 3,18  | 3,06      | 2,90  | 2,73  | 2,52  | 2,29  | 2,03  | 1,75  |
| 1:14                         | 3,40                   | 3,41  | 3,40  | 3,37  | 3,31                      | 3,24  | 3,14  | 3,01      | 2,86  | 2,68  | 2,48  | 2,24  | 1,99  | 1,71  |
| 1:15                         | 3,36                   | 3,37  | 3,36  | 3,33  | 3,27                      | 3,20  | 3,10  | 2,97      | 2,82  | 2,64  | 2,44  | 2,20  | 1,94  | 1,67  |
| 1:16                         | 3,32                   | 3,33  | 3,31  | 3,28  | 3,23                      | 3,15  | 3,05  | 2,93      | 2,78  | 2,60  | 2,39  | 2,16  | 1,90  | 1,62  |
| 1:17                         | 3,28                   | 3,29  | 3,27  | 3,24  | 3,19                      | 3,11  | 3,01  | 2,89      | 2,74  | 2,56  | 2,35  | 2,12  | 1,86  | 1,58  |
| 1:18                         | 3,23                   | 3,24  | 3,23  | 3,20  | 3,15                      | 3,07  | 2,97  | 2,85      | 2,69  | 2,52  | 2,31  | 2,08  | 1,82  | 1,54  |
| 1:19                         | 3,19                   | 3,20  | 3,19  | 3,16  | 3,11                      | 3,03  | 2,93  | 2,80      | 2,65  | 2,47  | 2,27  | 2,04  | 1,78  | 1,50  |
| 1:20                         | 3,15                   | 3,16  | 3,15  | 3,12  | 3,06                      | 2,99  | 2,89  | 2,76      | 2,61  | 2,43  | 2,23  | 1,99  | 1,74  | 1,46  |
| 1:21                         | 3,11                   | 3,12  | 3,11  | 3,07  | 3,02                      | 2,95  | 2,85  | 2,72      | 2,57  | 2,39  | 2,18  | 1,95  | 1,69  | 1,42  |
| 1:22                         | 3,07                   | 3,08  | 3,06  | 3,03  | 2,98                      | 2,90  | 2,80  | 2,68      | 2,53  | 2,35  | 2,14  | 1,91  | 1,65  | 1,37  |
| 1:23                         | 3,03                   | 3,03  | 3,02  | 2,99  | 2,94                      | 2,86  | 2,76  | 2,64      | 2,49  | 2,31  | 2,10  | 1,87  | 1,61  | 1,33  |
| 1:24                         | 2,99                   | 2,99  | 2,98  | 2,95  | 2,90                      | 2,82  | 2,72  | 2,60      | 2,45  | 2,27  | 2,06  | 1,83  | 1,57  | 1,29  |
| 1:25                         | 2,94                   | 2,95  | 2,94  | 2,91  | 2,86                      | 2,78  | 2,68  | 2,56      | 2,40  | 2,23  | 2,02  | 1,79  | 1,53  | 1,25  |
| 1:26                         | 2,90                   | 2,91  | 2,90  | 2,87  | 2,82                      | 2,74  | 2,64  | 2,51      | 2,36  | 2,18  | 1,98  | 1,75  | 1,49  | 1,21  |
| 1:27                         | 2,87                   | 2,87  | 2,86  | 2,83  | 2,78                      | 2,70  | 2,60  | 2,48      | 2,33  | 2,15  | 1,94  | 1,71  | 1,45  | 1,17  |
| 1:28                         | 2,82                   | 2,83  | 2,82  | 2,79  | 2,73                      | 2,66  | 2,56  | 2,43      | 2,28  | 2,10  | 1,89  | 1,66  | 1,40  | 1,13  |
| 1:29                         | 2,78                   | 2,79  | 2,78  | 2,75  | 2,70                      | 2,62  | 2,52  | 2,40      | 2,24  | 2,07  | 1,86  | 1,63  | 1,37  | 1,09  |
| 1:30                         | 2,74                   | 2,75  | 2,74  | 2,70  | 2,65                      | 2,57  | 2,47  | 2,35      | 2,20  | 2,02  | 1,81  | 1,58  | 1,32  | 1,04  |
|                              |                        |       |       |       | ≈3,5 мкг<br>3,25-3,74 мкг |       |       | <3,25 мкг |       |       |       |       |       |       |



Приложение 2 – Прогнозируемое количество эверолимуса, сорбируемого пористой и микроволокнистой моделями биорезорбируемого дренажа на основе полимолочной кислоты при воздействии ультразвуковых волн мощностью 630 Вт частотой 22кГц на дренаж в суспензии эверолимуса в различных концентрациях в зависимости от времени

| Концентрация суспензии (%) | Время ультразвукового воздействия (мин.) |                            |        |                            |        |        |                         |                            |        |          |        |
|----------------------------|--|----------------------------|--------|----------------------------|--------|--------|-------------------------|----------------------------|--------|----------|--------|
|                            | Пористая модель                          |                            |        |                            |        |        | Микроволокнистая модель |                            |        |          |        |
|                            | 8,00                                     | 7,00                       | 6,00   | 5,00                       | 4,00   | 3,00   | 2,00                    | 5,00                       | 4,00   | 3,00     | 2,00   |
| 3,0                        | 261,02                                   | 256,49                     | 250,46 | 242,01                     | 229,33 | 208,21 | 165,96                  | 186,23                     | 190,89 | 181,55   | 137,22 |
| 2,5                        | 256,90                                   | 252,38                     | 246,34 | 237,89                     | 225,22 | 204,09 | 161,85                  | 187,21                     | 191,87 | 182,53   | 138,20 |
| 2,0                        | 250,73                                   | 246,20                     | 240,17 | 231,72                     | 219,04 | 197,92 | 155,67                  | 185,29                     | 189,95 | 180,61   | 136,28 |
| 1,5                        | 240,43                                   | 235,91                     | 229,87 | 221,42                     | 208,75 | 187,62 | 145,38                  | 177,57                     | 182,23 | 172,89   | 128,56 |
| 1,0                        | 219,85                                   | 215,32                     | 209,28 | 200,83                     | 188,16 | 167,04 | 124,79                  | 155,35                     | 160,01 | 150,67   | 106,34 |
|                            |  | ≈240 мкг<br>220-261<br>мкг |        | ≈200 мкг<br>180-219<br>мкг |        |        |                         | ≈160 мкг<br>140-179<br>мкг |        | <140 мкг |        |

Приложение 3 – Сравнительная характеристика применения биорезорбируемых дренажей на основе полимолочной кислоты, насыщенных циклоспорином А либо эверолимусом, в проникающей гипотензивной хирургии

|   |   | Циклоспорин А                             | Эверолимус  |
|---|---|---|---|
| <b>Общая характеристика иммунодепрессантов</b>                                |   |   |   |
| Фармакологическая группа  |   | Ингибитор кальцинейрина                   | Ингибитор mTOR  |
| Клетки-мишени   |   | T-лимфоциты (CD4+)                        | T-лимфоциты, гладкомышечные клетки сосудов, фибробласты и др. |
| Главный эффект  |   | Противовоспалительный, иммунодепрессивный | Антипролиферативный, иммунодепрессивный                       |
| Механизм антипролиферативного действия  |   | Опосредованный/прямой*                    | Прямой и опосредованный                                       |
| <b>Особенности насыщения биорезорбируемых дренажей на основе полилактоида</b> |   |   |   |
| Предпочтительная модель дренажа   |   | Пористая                                  | Пористая  |
| Кол-во иммунодепрессанта на дренаже   |   | 3,93 (3,85; 4,01) мкг                     | 244,5 (241,8; 245,3) мкг                                      |
| Время насыщения   |   | 15 мин                                    | 6 мин   |
| Необходимое оборудование  |   | -   | ультразвуковой диспергатор                                    |
| Длительность десорбции  |   | 7 сут.                                    | 13 сут.   |
| <b>Действие на фибробласты теноновой капсулы человека</b>                     |   |   |   |
| Антипролиферативный эффект  |   | + (0,05-2,00 мкг/мл)                      | + (0,5-20,0 мкг/мл)   |
| Замедление времени пролиферации   |   | в 1,5-5,1 раз                             | в 1,7-7,4 раза  |
| Дозозависимость   |   | +   | -   |
| Цитотоксичность   |   | - (0,05-2,00 мкг/мл)                      | - (0,5-20,0 мкг/мл)   |
| <b>Результаты проникающей хирургии</b>  |   |   |   |
| Характеристики ФП через 6 мес. (IBAGS)  | Высота                                  | 1,5 (1,0; 2,0)                            | 2,0 (1,5; 2,0)  |
|   | Ширина                                  | 1,5 (1,0; 2,0)                            | 2,5 (1,5; 3,0)  |
|   | Васкуляризация                          | 2,0 (2,0; 2,0)                            | 2,0 (2,0; 2,0)  |
| ВГД через 6 мес., мм рт. ст.  |   | 13,0 (12,5; 13,5)                         | 12,0 (11,0; 12,5)   |
| Осложнения  | Отек роговицы                           | 0   | 1   |
|   | Гифема                                  | 1   | 0   |
|   | Расхождение краев конъюнктивальной раны | 1   | 1   |
|   | Фибрин в передней камере                | 3   | 5   |

\* По данным A.Leonardi et al., 2001 и M. Viveiros et al., 2016, а также согласно полученным *in vitro* результатам; механизм не изучен