

На правах рукописи

ТРОШИНА АННА АЛЕКСЕЕВНА

**ФАКТОР РОСТА НЕРВОВ И ГЛИАЛЬНЫЙ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ
ФАКТОР У БОЛЬНЫХ С ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ
ГЛАУКОМОЙ И ВОЗРАСТНОЙ КАТАРАКТОЙ**

3.1.5. – офтальмология

3.3.3. – патологическая физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2022

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

Научные руководители: **Шпак Александр Анатольевич**
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий отделом клинико-функциональной
диагностики ФГАУ «НМИЦ «МНТК
«Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.
Фёдорова» Минздрава России
Гуляева Наталия Валерьевна
доктор биологических наук, профессор,
руководитель лаборатории функциональной
биохимии нервной системы Института высшей
нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

Официальные оппоненты: **Курьшева Наталия Ивановна**
доктор медицинских наук, профессор,
заведующая кафедрой глазных болезней МБУ
ФМБА России, заведующая консультативно
диагностическим отделением центра
офтальмологии ФМБА России
Благонравов Михаил Львович
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой общей патологии и
патологической физиологии им. В.А. Фролова
медицинского института РУДН

Ведущая организация: ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
глазных болезней»

Защита состоится «5» сентября 2022 г. в ___ часов на заседании
диссертационного совета 21.1.021.01 при ФГАУ «НМИЦ «МНТК
«Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России по
адресу: 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, д.59А.

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

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

И.А. Мушкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. По данным Всемирной организации здравоохранения, глаукома является основным источником необратимой слепоты в мире; согласно недавнему метаанализу, к 2040 году число людей с глаукомой увеличится до 111,8 млн. человек (Tham Y. C., 2014).

Вопросы патогенеза первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ) до сих пор остаются окончательно не изученными, несмотря на многолетние усилия ученых. В настоящее время глаукома рассматривается как мультифакториальное нейродегенеративное заболевание, в процессе которого происходят повреждение и гибель ганглиозных клеток сетчатки (ГКС), проявляющиеся в виде прогрессирующей глаукомной оптической нейропатии (ГОН) и патологических изменений полей зрения (Аветисов С. Э., 2019, Егоров Е.А. и др., 2014).

В ряде крупных многоцентровых исследований последних лет убедительно показано, что одним из основных механизмов гибели ГКС при глаукоме, как и при других нейродегенеративных заболеваниях, является апоптоз (Cordeiro *et al.*, 2017; Kerrigan-Baumrind *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2007; Quigley *et al.*, 2011). Среди выявленных пусковых механизмов апоптоза ГКС выделяют снижение аксоплазматического транспорта нейротрофинов.

Нейротрофические факторы являются важными регуляторами роста, дифференцировки и функционирования нейронов (Гомазков О.А., 2011; Squire L. *et al.*, 2008). Среди других нейротрофических факторов, в последние годы большое внимание исследователей привлекают фактор роста нервов (ФРН) и глиальный нейротрофический фактор (ГНТФ).

Исследования данных нейротрофических факторов широко проводились при дегенеративных неврологических заболеваниях, таких как болезни Паркинсона и Альцгеймера (Россо, 2018; Sampaio TB, 2017; Garbayo E, 2011; Cuello *et al.*, 2010; Siegel, 2000) а также при психических расстройствах - шизофрении, депрессии и др. (Neugebauer *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2015; Tseng *et al.*, 2013). Активно изучаются

возможности терапевтического применения ФРН и ГНТФ при нейродегенеративных заболеваниях (Allen et al., 2013).

В офтальмологии исследования роли ФРН при патологии переднего отрезка глазного яблока обеспечили создание оригинального метода лечения нейротрофического кератита рекомбинантным ФРН (Cenergermin), выпускаемым в виде глазных капель Oxervate в США и Европе. Активно ведутся клинические исследования глазных капель с рекомбинантным ФРН у пациентов с глаукомой. На экспериментальных моделях глаукомы и повреждения зрительного нерва показана нейропротекторная роль ФРН и ГНТФ, выражавшаяся в повышении выживаемости ганглиозных клеток сетчатки (Colafrancesco et al., 2011; Lambiase et al., 2010; Flachsbarth et al., 2018; Dulz et al., 2020; Xiao et al., 2010).

В литературе представлены немногочисленные и противоречивые данные о содержании ФРН и ГНТФ в организме человека; в большинстве работ изучалось содержание данных нейротрофических факторов на системном уровне, преимущественно у пациентов с неврологической патологией. Ранее проводились исследования нейротрофического фактора головного мозга (НФГМ) и цилиарного нейротрофического фактора (ЦНТФ), показавшие их важную роль в патогенезе глаукомы (Шпак А.А. и соавт., 2006, 2017, 2018; Курышева Н.И., 2006). В настоящее время и для ФРН, и для ГНТФ остаются не изученными их концентрации во внутриглазных жидкостях в норме и при глаукоме, в том числе изменения их уровня по мере утяжеления глаукомы.

Основным способом изучения содержания нейротрофических факторов в глазу пациентов с глаукомой является анализ влаги передней камеры, полученной в ходе операции экстракции возрастной катаракты. Однако большие сложности представляет постановка диагноза глаукомы до операции у больных с помутнениями оптических сред глаза. В частности, требуют детального изучения и сравнения способы оценки степени помутнения сред и установление критериев, определяющих возможность

проведения таких исследований как оптическая когерентная томография (ОКТ) с целью диагностики глаукомы.

Таким образом, исследование нейротрофических факторов у пациентов с глаукомой представляет большой интерес и в дальнейшем может быть полезным в разработке новых терапевтических стратегий лечения заболевания, в частности, путем их использования в целях нейропротекции. Актуальным является установление критериев, определяющих возможность диагностики глаукомы методом ОКТ у пациентов с помутнениями оптических сред глаза.

Цель: изучить содержание фактора роста нервов и глиального нейротрофического фактора во влаге передней камеры, слезной жидкости и сыворотке крови у больных с первичной открытоугольной глаукомой и возрастной катарактой.

Задачи:

1. Оценить влияние возрастной катаракты на качество измерений оптической когерентной томографии, используемых в диагностике первичной открытоугольной глаукомы.
2. Изучить содержание ФРН в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у пациентов с возрастной катарактой без глаукомы.
3. Изучить содержание ФРН в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой в сочетании с возрастной катарактой и характер его изменений по мере утяжеления глаукомы.
4. Изучить содержание ГНТФ в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у пациентов с возрастной катарактой без глаукомы.
5. Изучить содержание ГНТФ в слезной жидкости, влаге передней камеры и сыворотке крови у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой в сочетании с возрастной катарактой и характер его изменений по мере утяжеления глаукомы.

Научная новизна

1. Установлены оптимальные условия, необходимые для проведения качественных и информативных измерений методом ОКТ для диагностики ПОУГ у больных с возрастной катарактой.
2. Впервые изучено содержание ФРН в СЖ, ВПК и СК у пациентов с возрастной катарактой без глаукомы.
3. Впервые изучено содержание ФРН в СЖ, ВПК и СК у пациентов с ПОУГ в сочетании с возрастной катарактой; установлен характер его изменений по мере утяжеления глаукомы.
4. Впервые изучено содержание ГНТФ в СЖ, ВПК и СК у пациентов с возрастной катарактой без глаукомы.
5. Впервые изучено содержание ГНТФ в СЖ, ВПК и СК у пациентов с ПОУГ в сочетании с возрастной катарактой; установлен характер его изменений по мере утяжеления глаукомы.

Практическая значимость

Установленные показатели и соотношения концентраций ФРН и ГНТФ в исследуемых биологических жидкостях могут быть использованы в качестве нормативов для дальнейших исследований, проводимых по описанной методике.

Выявленные закономерности могут способствовать разработке новых подходов в диагностике и лечении ПОУГ, основанных на изучении роли нейротрофических факторов в патогенезе заболевания.

Разработаны рекомендации для проведения наиболее информативного обследования методом ОКТ для диагностики ПОУГ у пациентов с возрастной катарактой.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У пациентов с ПОУГ, сочетающейся с возрастной катарактой, существенно снижено содержание ГНТФ во ВПК, СЖ и СК в 1-2 стадиях заболевания, а также во ВПК и СЖ в 3-4 стадиях заболевания (по классификации Mills et al., 2006), при этом по мере развития

глаукомы концентрация ГНТФ во ВПК и СЖ постепенно повышается, оставаясь достоверно сниженной относительно пациентов без глаукомы.

2. ПОУГ не оказывает существенного влияния на содержание ФРН в СЖ, ВПК и СК у больных с возрастной катарактой.
3. Критериями надежности измерений структур глазного дна методом ОКТ, используемых в диагностике глаукомы у пациентов с возрастной катарактой, могут служить только собственные данные прибора (сила ОКТ-сигнала).

Внедрение в практику

Разработанные критерии измерений структур глазного дна методом ОКТ у пациентов с возрастной катарактой внедрены в практическую деятельность головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России и ГБУЗ «Научно-практический психоневрологический центр имени З.П. Соловьева» Департамента здравоохранения г. Москвы.

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы представлены на XV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы офтальмологии» в рамках XII съезда общества офтальмологов России (Москва, 2020); еженедельной научно-практической конференции ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России (Москва, 2021); ежегодных конференциях Ассоциации исследователей в области зрения и офтальмологии – ARVO (Балтимор, США, 2020; 2021).

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 7 научных работ, из них 3 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 2 – в иностранной печати.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, 4-х глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Список литературы включает 14 отечественных и 160 иностранных источников. Диссертация иллюстрирована 10 таблицами и 10 рисунками.

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Результаты клинико-функциональных и клинико-лабораторных методов исследования были изучены у 166 пациентов (166 глаз) с возрастной катарактой без ПОУГ и в сочетании с ПОУГ (Таблица 1).

Таблица 1 – Материал исследования

Раздел исследований	Пациенты с возрастной катарактой без ПОУГ	Пациенты с возрастной катарактой в сочетании с ПОУГ	Здоровые испытуемые	Всего
Отработка методик			11	11
Анализ ФРН	47	25		72
Анализ ГНТФ	47	30		77
Параметры ОКТ	83			83
Всего	123	32	11	166

Примечание: большинство испытуемых принимали участие в 2-3 разделах работы, в частности, исследования ФРН и ГНТФ в основном выполнялись у одних и тех же испытуемых.

Отбор пациентов осуществляли сплошным методом в период с сентября 2018 года по апрель 2021 года. Кроме того, на слезной жидкости 11

здоровых добровольцев проводили отработку методик определения содержания нейротрофических факторов. У каждого человека в анализ включали только один глаз, на котором проводилось хирургическое вмешательство.

В исследование вошли 32 пациента, у которых катаракта сочеталась с ПОУГ различной степени выраженности. Диагноз ПОУГ устанавливали по результатам комплексного обследования, включавшего наряду с традиционными специальными методами диагностики – ОКТ и компьютерную периметрию. Отдельным пациентам, которым не удавалось провести обследования до операции в полном объеме ввиду выраженного помутнения хрусталика, повторно проводили компьютерную периметрию и ОКТ не ранее, чем через два дня после ФЭК+ИОЛ. Стадию ПОУГ определяли по данным исследования центрального поля зрения по программе «24-2 SITA Standard» согласно классификации Mills et al. (2006), в которой продвинутая (далеко зашедшая) стадия разделяется на две с выделением стадии тяжелой глаукомы.

Длительность течения глаукомы от момента постановки диагноза составляла от 6- до 120 месяцев (в среднем $60,6 \pm 42,7$ месяцев). Микроинвазивная непроникающая глубокая склерэктомия была выполнена ранее у 20 пациентов, из них у 11 дополнена в дальнейшем лазерной десцеметогониопунктурой. У 7 пациентов в прошлом были выполнены лазерные антиглаукомные операции. Все операции были проведены не ранее, чем за 3 месяца до операции факоемульсификации катаракты с имплантацией интраокулярной линзы (ФЭК+ИОЛ). Гипотензивную терапию применяли 26 человек; из них 21 человек инстиллировал β -блокаторы, значительно меньшая доля (4 и 11 человек) – аналоги простагландинов и ингибиторы карбоангидразы соответственно. Из них 9 человек применяли два и более вида препаратов, в том числе комбинированные.

Также была проведена комплексная клинико-лабораторная диагностика 62 пациентов с возрастной катарактой, которым была выполнена операция ФЭК+ИОЛ.

Отдельным разделом данной работы было определение оптимальных критериев надежности результатов измерений количественных показателей ОКТ у пациентов с катарактой, с целью чего методом ОКТ было обследовано 83 пациента (83 глаза) с возрастной катарактой до и после ФЭК+ИОЛ.

Критериями включения для всех пациентов были: возраст старше 55 лет, длина глаза менее 26 мм, неосложненная операция ФЭК+ИОЛ, истинное ВГД не выше 21 мм рт.ст.

Критериями исключения были: глаукома или подозрение на глаукому, тяжелая сопутствующая глазная патология (дегенеративные заболевания сетчатки, увеиты, атрофия зрительного нерва и др.), рефракционные нарушения высоких степеней, офтальмологические вмешательства в последние 3 месяца перед операцией, а также соматические заболевания (сахарный диабет, бронхиальная астма, аутоиммунные, онкологические заболевания и другая серьезная соматическая патология), отсутствие которых подтверждалось опросом, исследованием соматического статуса и анализом данных медицинской документации. Допускались отдельные сопутствующие заболевания в начальных стадиях, такие как гипертоническая болезнь 1-2 стадии, мерцательная аритмия, стенокардия напряжения I-II функционального класса и т.п. У всех обследуемых лиц сопутствующая патология находилась в стадии компенсации.

Методы обследования. Всем пациентам, вошедшим в работу, проводили комплексное офтальмологическое обследование, включающее авторефрактометрию, визометрию без коррекции и с коррекцией, периметрию, тонометрию, биомикроскопию, офтальмоскопию, ультразвуковую эхобиометрию и В-сканирование, оптическую биометрию. Пациентам с ПОУГ проводили также тонографию, гониоскопию, компьютерную периметрию и спектральную ОКТ.

При оценке критериев надежности измерений ОКТ пациентам с возрастной катарактой дополнительно проводили спектральную ОКТ, Шаймпфлюг-томографию с денситометрией хрусталика, а также биомикроскопическую оценку степени плотности катаракты по упрощенной системе ВОЗ.

Статистическую обработку проводили с использованием программ Excel (Microsoft) и Statistica 13 (TIBCO Software Inc.). Для оценки нормальности распределения использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Все данные имели нормальное распределение и представлены в формате $M \pm \sigma$, где M – среднее арифметическое, σ – среднеквадратическое отклонение. Сравнение количественных признаков в двух группах выполняли с применением t-критерия Стьюдента для независимых выборок, в трех группах методом однофакторного дисперсионного анализа с последующим попарным сравнением с использованием критерия Тьюки для коррекции эффекта множественных сравнений.

Соотношения количественных признаков оценивали методами линейной регрессии и корреляционного анализа по Пирсону. Зависимость при коэффициенте корреляции r (по абсолютной величине) 0,2-0,39 считалась слабой, 0,4-0,59 – умеренной, 0,6-0,79 – сильной. Статистически значимым считали уровень $P < 0,05$.

Значение различных показателей как критериев надежности измерений определяли с помощью ROC-анализа. Для оценки характеристических (ROC) кривых рассчитывали площадь под ROC-кривой (area under the curve – AUC), которая может изменяться в диапазоне от 0,5 (полное отсутствие информативности показателя) до 1,0 (максимальная информативность). Также определяли оптимальную пороговую величину показателя (точку отсечения), соответствующую максимальным уровням чувствительности и специфичности.

Клинико-лабораторные методы исследования

Для определения нейротрофических факторов в сыворотке крови использовали периферическую кровь, взятую натощак из локтевой вены в стерильных условиях в количестве 5 мл. Для получения сыворотки образцы крови центрифугировали со скоростью 3000 об/мин в течение 15 минут, затем сыворотку аликвотировали в стерильные пробирки типа эппендорф в объеме не менее 500 мкл, замораживали и хранили при температуре ниже -30 °С до проведения иммуноферментного анализа. Непосредственно перед анализом все исследуемые образцы и компоненты тест-системы прогревали до комнатной температуры.

Для определения нейротрофических факторов в СЖ использовали стимулированную слезу, взятую в день перед операцией в количестве 100-150 мкл из нижнего конъюнктивального свода пипеточным дозатором.

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

Образцы СЖ и ВПК помещали в стерильные пробирки типа эппендорф, замораживали и хранили при температуре ниже -30 °С до проведения лабораторного анализа.

Непосредственно перед проведением лабораторного тестирования биологический материал размораживали, прогревали до комнатной температуры, центрифугировали в течение 10 минут со скоростью 4000 об/мин., а затем разводили в 4 раза раствором PBS, поскольку собранное у пациентов количество СЖ и ВПК не всегда было достаточным для полноценного иммуноферментного анализа (ИФА) образцов выбранными тест-системами.

Концентрацию ФРН в исследуемых образцах СК, СЖ, ВПК определяли в дубле методом твердофазного ИФА с использованием тест-системы QuantikineElisa (Cloud-Clone corp., США) на автоматическом анализаторе

ChemWell 2910 (Awareness Technology Inc., США) согласно инструкции, предложенной фирмой производителем тест-системы.

Для построения калибровочного графика использовали разведения стандартного образца ФРН в концентрациях: 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2 и 15,6 пг/мл. Чувствительность метода (минимальная определяемая концентрация ФРН в образце) по данным фирмы-производителя составляла 5,4 пг/мл.

При разведении СЖ и ВПК в 4 раза, значения концентрации ФРН попадали в линейную область калибровочного графика. Полученные результаты умножали на коэффициент разведения биологического материала.

Определение концентрации ГНТФ в исследуемых образцах СК, СЖ, ВПК определяли в дубле методом твердофазного ИФА с использованием тест-системы RayBio® Human GDNF ELISA (Ray Biotech, США) на автоматическом анализаторе ChemWell 2910 (Awareness Technology Inc., США) согласно инструкции, предложенной фирмой производителем тест-системы.

С целью увеличения содержания свободной формы ГНТФ в вышеуказанном биологическом материале и повышения его доступности для определения методом твердофазного ИФА проводили предварительную кислотную обработку образцов по методике, предложенной Okragly, Naak-Frendscho (1997).

Для построения калибровочного графика использовали разведения стандартного образца ГНТФ в концентрациях: 2000, 666,7, 222,2, 74,07, 24,69, 8,23 и 2,74 пг/мл. Чувствительность метода составляла 4 пг/мл. Воспроизводимость калибровочных кривых и контрольных материалов соответствовала показателям, заявленным производителем. При разведении СЖ и ВПК в 4 раза, значения концентрации ГНТФ попадали в линейную область калибровочного графика. Полученные результаты умножали на коэффициент разведения биологического материала.

Результаты исследований

В данном исследовании крайне важным являлся тщательный отбор пациентов и уточнение диагноза глаукомы на дооперационном этапе для исключения проведения в дальнейшем неоправданных исследований – забора слезной жидкости, влаги передней камеры и сыворотки крови, лабораторной диагностики и т. д.

Как известно, в настоящее время ОКТ является важным методом диагностики глаукомы, особенно на ранних стадиях, когда дефекты поля зрения могут быть не столь выраженными или отсутствовать. Также данная методика позволяет исключить сопутствующие патологические состояния глазного дна, способные повлиять на содержание нейротрофических факторов в биологических жидкостях и тем самым внести погрешность при дальнейшем анализе.

Учитывая, что катаракта оказывает существенное влияние на качество измерения перипапиллярного слоя нервных волокон сетчатки (пСНВС) и других параметров, требует уточнения степень помутнения хрусталика, допускающая получение достаточно надежных измерений ОКТ.

В связи с вышеизложенным, первым этапом исследования явилось определение оптимальных критериев надежности измерений количественных показателей ОКТ у пациентов с возрастной катарактой. Для решения поставленной задачи было выполнено сравнение нескольких показателей оптической плотности хрусталика, а именно силы сигнала ОКТ, определяемой самим прибором (Cirrus HD-OCT), данных денситометрии и биомикроскопии.

Проведено обследование 83 пациентов (83 глаз) до и после операции ФЭК+ИОЛ. Критерием включения была возрастная катаракта, позволяющая получить ОКТ-изображения структур глазного дна. Критериями исключения были неустойчивая фиксация, серьезная сопутствующая офтальмологическая и соматическая патология. У всех пациентов оценивали только один глаз с

наибольшей плотностью катаракты, на котором проводили ФЭК+ИОЛ в первую очередь.

Помимо традиционных методов обследования, за 1-2 дня до операции выполняли спектральную ОКТ по общепринятой методике на приборе Cirrus HD-OCT (Carl Zeiss Meditec). Исследование области диска зрительного нерва выполняли по протоколу «Optic Disc Cube 200x200» с обработкой данных по протоколу «ONH and RNFL OU Analysis». Наибольшее значение придавали средней толщине пСНВС (Average RNFL Thickness). Сканирование макулярной области осуществляли по протоколу «Macular Cube 512x128» с последующим анализом толщины сетчатки «Macular Thickness Analysis». Наибольшее значение придавали средней толщине сетчатки в фовеальной зоне диаметром 1 мм.

Дооперационное измерение считали надежным, если отличие от послеоперационного измерения не превышало предел повторяемости / воспроизводимости, который по литературным данным, для средней толщины пСНВС составляет 4-5 $\mu\text{м}$, для фовеальной зоны – 7-8 $\mu\text{м}$. В настоящей работе как допустимый использовали предел повторяемости / воспроизводимости 5 $\mu\text{м}$ для пСНВС и 8 $\mu\text{м}$ для фовеальной зоны.

Выраженность помутнения хрусталика оценивали по силе сигнала ОКТ, определяемой самим прибором Cirrus HD-OCT (Carl Zeiss Meditec), данным Шаймпфлюг-томографии (денситометрии) и биомикроскопии.

Денситометрию хрусталика у всех пациентов выполняли после расширения зрачка за 1 сутки до операции на приборе Pentacam HR (Oculus). С помощью данного метода проводили оценку средней и максимальной оптической плотности хрусталика на основе встроенного программного обеспечения по шкале от 0 (отсутствие помутнения) до 100 (полностью непрозрачный хрусталик), а также стадии катаракты (Pentacam Nucleus Staging, от 0 до 5) на основе значений денситометрии в трех измерениях.

После операции всем пациентам также выполняли спектральную ОКТ по той же методике, что и до операции.

Проведенный ROC-анализ выявил существенные преимущества показателя силы сигнала, определяемого самим прибором, по сравнению с другими изученными критериями. Так, для толщины пСНВС, величина AUC составила 0,815 (95% доверительный интервал (ДИ): 0,720-0,909). При этом наилучшее пороговое значение силы сигнала прибора, позволяющее получать надежные данные пСНВС, составило 5,5 (чувствительность 0,640, специфичность 0,848).

Для измерения толщины сетчатки в фовеальной зоне значение AUC силы ОКТ-сигнала составило 0,756 (95% ДИ: 0,632-0,880). Оптимальный порог силы ОКТ-сигнала для корректного измерения сетчатки в фовеальной зоне составил 4,5 (чувствительность 0,893, специфичность 0,555). Учитывая, что сила сигнала измеряется только в целых числах, на практике наименьшее значение силы сигнала прибора, позволяющее получать достоверные данные, составляет 6 для пСНВС и 5 для толщины сетчатки в фовеальной зоне.

Остальные изученные параметры как для пСНВС, так и для толщины сетчатки в фовеальной зоне имели AUC менее 0,6, что было близким к уровню случайности. Следует особо отметить, что биомикроскопия хрусталика не позволяет с достаточной точностью прогнозировать возможность надежного проведения измерений методом ОКТ (AUC для всех параметров был близок к 0,5) и на нее нельзя ориентироваться при оценке результатов ОКТ. Определенным исключением служит только выраженная (3 балла) заднекапсулярная катаракта. Этот тип помутнения характеризуется особой плотностью и расположением в оптическом центре, что ухудшает светопропускание в большей степени, чем при других типах помутнения хрусталика. В настоящей работе было обнаружено, что заднекапсулярные катаракты значительно снижают надежность измерений ОКТ, особенно в фовеальной области. Из 7 таких глаз измерения толщины сетчатки в фовеальной зоне не были надежными в 5 случаях, измерения пСНВС – в трех.

Таким образом, у пациентов с возрастной катарактой критериями надежности измерений структур глазного дна методом ОКТ могут служить только собственные данные прибора (сила ОКТ-сигнала). Наименьшее значение силы сигнала, позволяющее получать надежные данные на приборе Cirrus HD-OCT, составляет 6 для пСНВС и 5 для толщины сетчатки в фовеальной зоне. Показатели денситометрии хрусталика на приборе Pentacam HR и клиническая оценка степени помутнения хрусталика мало информативны в качестве критериев надежности измерений ОКТ. Исключением является обнаружение при биомикроскопии выраженной заднекапсулярной катаракты, что будет указывать на ненадежность измерений ОКТ при обследовании данным методом.

Результаты исследования нейротрофических факторов.

Основной материал исследования составили пациенты, у которых катаракта сочеталась с ПОУГ различных стадий (32 человека). В качестве контроля были взяты пациенты с возрастной катарактой (62 человека). Ранее при сравнении больных с катарактой и здоровых испытуемых было установлено, что возрастная катаракта не оказывает существенного влияния на концентрации в СЖ и СК двух других нейротрофических факторов – цилиарного (ЦНТФ) и нейротрофического фактора головного мозга (НФГМ), что предположительно связано с отсутствием выраженных воспалительных и иммунных изменений при данной патологии. Учитывая эти результаты, для ФРН и ГНТФ сравнение содержания в СЖ или в СК у больных с катарактой и здоровых лиц не проводилось.

Вторым этапом данного исследования было изучение содержания ФРН в СЖ, ВПК и СК у пациентов с возрастной катарактой.

Для установления нормативов содержания ФРН в указанных средах было проведено клиничко-лабораторное обследование 47 пациентов (47 глаз), оперированных по поводу возрастной катаракты. Средний возраст больных составил $73,2 \pm 7,8$ лет (от 57 до 86 лет), из них 19 мужчин и 28 женщин. Длина переднезадней оси оперированных глаз составила в среднем

23,49±0,80 (от 21,94 до 25,41) мм. Всем пациентам была выполнена операция ФЭК+ИОЛ по стандартной методике; интра- и послеоперационные осложнения отсутствовали. Согласно результатам данного этапа исследования, содержание ФРН было наиболее высоким в слезной жидкости - 85,3±23,3 пг/мл; концентрации ФРН в СК и ВПК были более чем в три раза ниже и составляли 27,6±12,8 и 23,2±8,9 пг/мл соответственно. При этом уровень ФРН во ВПК достоверно коррелировал только с его содержанием в СЖ: коэффициент корреляции Пирсона $r=0,526$, $P<0,000$. Корреляция концентраций ФРН в СК и ВПК была в 2 раза слабее ($r=0,251$) и не значима.

Далее было изучено содержание ФРН в СЖ, ВПК и СК у пациентов с ПОУГ. Для этого была выполнена комплексная клиничко-лабораторная диагностика 25 пациентов (25 глаз) с ПОУГ, сочетавшейся с возрастной катарактой (основная группа). В качестве группы сравнения были взяты обследованные ранее 47 пациентов с возрастной катарактой (47 глаз).

В ходе данного этапа исследования был также проведен анализ изменений изученных показателей в зависимости от стадии глаукоматозного процесса (Таблица 2). Ввиду небольшого объема материала были объединены пациенты с 1 и 2 и с 3 и 4 стадиями заболевания.

Таблица 2 - Концентрация фактора роста нервов в изучаемых биологических жидкостях (пг/мл) у больных с катарактой без и в сочетании с ПОУГ, $M\pm\sigma$ (Мин-Макс)

№№	Группа	СЖ	ВПК	СК
1	Основная группа ПОУГ 1-2 (n=9)	79,0±25,3* (44,2-125,4)	29,6±16,2 (6,1-65,4)	25,1±7,0 (11,8-32,0)
2	Основная группа ПОУГ 3-4 (n=16)	87,7±20,9 (52,7-140,1)	29,2±13,1 (11,8-58,4)	23,5±11,7 (11,2-54,6)
3	Группа сравнения (n=47)	85,3±23,3** (36,6 - 135,9)	27,6±12,8 (2,7 - 56,1)	23,2±8,9 (5,9 - 41,6)

Отличия подгрупп от группы сравнения и между собой недостоверны

* n=8 ** n=46

Как видно из таблицы, не было выявлено статистически достоверных различий уровня ФРН в изучаемых биологических средах между группами пациентов с 1-2 и с 3-4 стадиями глаукомы. Данные больных с глаукомой достоверно не отличались и от приведенных выше показателей больных с возрастной катарактой группы сравнения ($p>0,05$).

Отсутствие значимых изменений содержания ФРН по мере утяжеления глаукомного процесса подтверждалось и тем, что не было установлено достоверной зависимости содержания ФРН в изученных биологических жидкостях от периметрического индекса VFI у больных основной группы. Предположительно, приведенные результаты могут свидетельствовать об отсутствии значимой роли ФРН в патогенезе ПОУГ.

Дальнейшим этапом работы стало изучение содержания другого нейротрофического фактора – ГНТФ – в СЖ, ВПК и СК у пациентов с возрастной катарактой без и в сочетании с ПОУГ. В первую очередь было проведено клиничко-лабораторное обследование 47 пациентов (47 глаз), оперированных по поводу возрастной катаракты.

По результатам проведенного анализа, содержание ГНТФ во ВПК у пациентов с возрастной катарактой было относительно невысоким: концентрация ГНТФ во ВПК составила $88,9\pm 46,9$ пг/мл и была более, чем в 2 раза ниже, чем в СК и почти в 4 раза ниже, чем в СЖ.

Методом корреляционного анализа было установлено, что уровни ГНТФ в исследуемых биологических средах не показали достоверной корреляции между собой. Была выявлена только недостоверная тенденция к корреляции между концентрациями ГНТФ в СЖ и СК: коэффициент корреляции Пирсона $r=0,271$, $P=0,07$. Важным результатом данного раздела настоящей работы являются впервые установленные количественные показатели содержания ГНТФ в слезе и ВПК человека. Ранее проводились лишь качественные исследования наличия или отсутствия ГНТФ и его рецепторов.

Одной из наиболее значимых задач данного исследования было изучение содержания ГНТФ в СЖ, ВПК и СК у больных с ПОУГ. В ходе выполнения поставленной задачи было проведено комплексное клиничко-лабораторное обследование 30 пациентов (30 глаз) с ПОУГ, сочетающейся с возрастной катарактой (основная группа). В качестве группы сравнения были взяты обследованные на предыдущем этапе 47 пациентов с возрастной катарактой (47 глаз). В таблице 3 представлены концентрации ГНТФ в изучаемых средах у пациентов основной группы и группы сравнения. Ввиду небольшого объема материала были объединены пациенты с 1 и 2 и с 3 и 4 стадиями заболевания.

Таблица 3 – Концентрация глиального нейротрофического фактора (ГНТФ) в изучаемых биологических жидкостях (пг/мл) у больных с катарактой без и в сочетании с ПОУГ, $M \pm \sigma$ (Мин-Макс)

№№	Группа	СЖ	ВПК	СК
1	Основная группа ПОУГ 1-2 (n=13)	176,1±99,2 (60,5-385,0)	40,0±25,7 (4,4-77,4)	164,9±42,5 (106,4-230,4)
2	Основная группа ПОУГ 3-4 (n=17)	257,7±90,5 (141,4-487,2)	51,1±34,7 (4,4-106,6)	216,6±55,3 (149,6-316,6)
3	Группа сравнения (n=47)	343,6±133,7 (172,8-683,0)	88,9±46,9 (2,0-212,5)	201,1±44,6 (103,2-287,2)
	p*	<0,000	<0,000	0,012
	p 1-3**	<0,000	0,001	0,042
	p 2-3**	0,037	0,006	-
	p 1-2**	-	-	0,010

* Однофакторный дисперсионный анализ ** апостериорное попарное сравнение с использованием критерия Тьюки

Примечание: для СЖ в группе сравнения n=46

Было установлено, что у пациентов с ПОУГ в начальных стадиях (стадии 1-2 по классификации Mills et al., 2006) отмечается наиболее выраженное снижение концентрации ГНТФ во всех изученных биологических жидкостях, особенно в СЖ и ВПК. Концентрация ГНТФ у пациентов с 1-2 стадией глаукомы была достоверно ($p < 0,05$) ниже, чем в

группе сравнения во всех биологических жидкостях. В более продвинутых 3-4 стадиях заболевания уровни ГНТФ в СЖ и ВПК несколько (недостаточно) повышаются, не достигая нормальных значений, достоверно увеличивается и нормализуется только содержание ГНТФ в СК.

Выявленные особенности изменений содержания ГНТФ в изучаемых биологических жидкостях подтверждались также их корреляцией с периметрическим индексом VFI: для СЖ коэффициент корреляции Пирсона $r=-0,4653$ ($P=0,010$), для СК $r=-0,399$ ($P=0,029$). Для уровня ГНТФ во ВПК была выявлена только недостаточная тенденция к отрицательной корреляции ($r=-0,289$, $P=0,122$).

По данным литературы, сходную динамику демонстрировал другой нейротрофин, НФГМ, содержание которого в изученных биологических жидкостях максимально снижалось в начальной стадии ПОУГ, а затем повышалось, не достигая нормальных значений.

Сложно судить, является ли выявленное снижение уровня ГНТФ и НФГМ в начальных стадиях ПОУГ одной из причин или следствием возникновения заболевания. Для решения этого вопроса необходимы дальнейшие углубленные исследования.

Повышение уровней ГНТФ и НФГМ в более продвинутых стадиях ПОУГ, вероятно, может быть обусловлено наличием компенсаторных механизмов восстановления, которые начинают действовать только на поздних стадиях нейродегенерации. Существование подобных механизмов было предположено в исследованиях, оценивающих уровни нейротрофинов в сыворотке крови пациентов с болезнью Альцгеймера.

В настоящей работе впервые представлены количественные данные о содержании ФРН и ГНТФ в структурах глаза у пациентов с глаукомой. Впервые было установлено, что начальные стадии глаукомного процесса сопровождаются выраженным снижением концентрации ГНТФ как внутри глаза, так и во всем организме, что несомненно указывает на одну из ключевых ролей данного нейротрофического фактора в патогенезе глаукомы.

Несмотря на то, что в данной работе было обнаружено отсутствие значимых отличий уровня ФРН в изучаемых средах между группами пациентов с катарактой без и в сочетании с ПОУГ, нельзя не учитывать его выраженный нейропротекторный эффект в отношении ганглиозных клеток сетчатки, доказанный в многочисленных экспериментальных работах. Отсутствие достоверных изменений ФРН у больных с разными стадиями глаукомы не исключает возможности его применения с целью нейропротекции. Безусловно, для верификации полученных результатов требуется проведение дальнейших углубленных исследований.

Таким образом, изучение нейротрофических факторов у пациентов с глаукомой представляет большой интерес и в дальнейшем может оказаться полезным в разработке новых терапевтических стратегий лечения данного заболевания, в частности, путем использования ГНТФ и ФРН наряду с другими нейротрофическими факторами в целях нейропротекции.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с возрастной катарактой критериями надежности измерений структур глазного дна методом ОКТ, используемых для диагностики глаукомы, могут служить только собственные данные прибора (сила ОКТ-сигнала). Наименьшее значение силы сигнала, позволяющее получать надежные данные на приборе Cirrus HD-OCT, составляет 6 для пСНВС и 5 для толщины сетчатки в фовеальной зоне.
2. У пациентов с возрастной катарактой наиболее высокий уровень ФРН определяется в СЖ, концентрации его в СК и ВПК более чем в три раза ниже; у пациентов с возрастной катарактой содержание ФРН во ВПК значимо коррелирует с его концентрацией в СЖ ($r=0,526$, $P<0,000$).
3. У пациентов с ПОУГ отсутствуют достоверные отличия содержания ФРН в СЖ, ВПК и СК в зависимости от стадии заболевания и по сравнению с пациентами без глаукомы.
4. У пациентов с возрастной катарактой концентрация ГНТФ во ВПК более чем в 2 раза ниже, чем в СК, и почти в 4 раза ниже, чем в СЖ. Концентрации ГНТФ в СЖ, ВПК и СК значимо не коррелируют между собой.
5. У пациентов с ПОУГ выявлено существенное снижение содержания ГНТФ во ВПК, СЖ и СК в 1-2 стадиях заболевания (по классификации Mills et al., 2006) и несколько менее выраженное во ВПК и СЖ в 3-4 стадиях. По мере развития заболевания наблюдается постепенное повышение концентрации ГНТФ во ВПК и СЖ, тем не менее, уровень ГНТФ в данных средах остается достоверно сниженным относительно пациентов без глаукомы. Установлена обратная корреляция содержания ГНТФ в СЖ ($r=-0,465$; $P=0,01$) и СК ($r=-0,399$; $P=0,029$) с периметрическим индексом VFI, а также прямая корреляция уровней ГНТФ в СК и ВПК ($r=0,468$; $P=0,009$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДЦИИ

1. У пациентов с возрастной катарактой критериями надежности измерений структур глазного дна методом ОКТ, используемых для диагностики глаукомы, могут служить только собственные данные прибора (сила ОКТ-сигнала).
2. Наименьшее значение силы сигнала, позволяющее получать надежные данные на приборе Cirrus HD-OCT, составляет 6 для пСНВС и 5 для толщины сетчатки в фовеальной зоне.
3. На приборах других производителей критериями надежности измерений являются соответствующие показатели качества скана (для него используют разные названия) на приборах Optovue не менее 39 из 100, на приборах Heidelberg Engineering – не менее 15 из 40, на приборах Topcon – не менее 45 из 100.
4. Установленные показатели и соотношения концентраций ФРН и ГНТФ в исследуемых биологических жидкостях могут быть использованы в качестве нормативов для дальнейших исследований, проводимых по описанной методике.
5. Полученные результаты могут быть использованы в разработке новых методов лечения ПОУГ путем использования ГНТФ и ФРН в целях нейропротекции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Шпак А.А., Коробкова М.В., **Трошина А.А.** Влияние интраокулярной коррекции на показатели оптической когерентной томографии при миопии // Вестн. офтальмол. - 2019.- N 4.- С. 3-9.
2. Шпак А.А., Гехт А.Б., Дружкова Т.А., **Трошина А.А.**, Гуляева Н.В. Фактор роста нервов у пациентов с возрастной катарактой // Офтальмохирургия. – 2020. – № 3. – С. 40-44.
3. Шпак А.А., **Трошина А.А.** Критерии надежности измерений оптической когерентной томографии у пациентов с возрастной катарактой // Офтальмохирургия. – 2021. –№ 4. – С. 6-11.

Прочие публикации

4. Шпак А.А., Виговский А.В., Коробкова М.В., **Трошина А.А.** Влияние экстракции катаракты с имплантацией интраокулярной линзы у пациентов с близорукостью на толщину слоя нервных волокон сетчатки // Современные технологии в офтальмологии. – 2019. – №1. – С.339-342.
5. Shpak A.A., Guekht A.B., Druzhkova T., **Troshina A.**, Gulyaeva N.V. Nerve growth factor in patients with age-related cataract // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2020. – Vol.61. – N 7.- P.38.
6. Шпак А.А., Гехт А.Б., Дружкова Т.А., **Трошина А.А.**, Гуляева Н.В. Фактор роста нервов у пациентов с возрастной катарактой // Современные технологии в офтальмологии. – 2020. – №3. – С. 43.
7. Shpak A., Guekht A., Druzhkova T., **Troshina A.**, Gulyaeva N. Glial cell-line derived neurotrophic factor in patients with primary open-angle glaucoma and age-related cataract // Molecular Vision. – 2022. – №28. – P.39-47.

Биографические данные

Трошина Анна Алексеевна, 1992 года рождения, в 2016 году с отличием окончила Курский государственный медицинский университет по специальности «Лечебное дело».

В период с 2016 по 2018 гг. продолжила обучение в очной ординатуре на базе головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова». В 2018 году поступила в очную аспирантуру ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. С 2018 по 2021 гг. выполняла научные исследования по теме «Фактор роста нервов и глиальный нейротрофический фактор у больных первичной открытоугольной глаукомой и возрастной катарактой» в отделе клинико-функциональной диагностики ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова».

Победитель (1 место) XV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы офтальмологии» в рамках XII съезда общества офтальмологов России (Москва, 2020).

Автор 7 печатных работ, из них 3 – в журналах, рецензируемых ВАК РФ, 2 – в зарубежной печати.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГНТФ (GDNF – англ.) – глиальный нейротрофический фактор

ВГД – внутриглазное давление

ВПК – влага передней камеры

ОКТ – спектральная оптическая когерентная томография

ПОУГ – первичная открытоугольная глаукома

СЖ – слезная жидкость

СК – сыворотка крови

пСНВС – перипапиллярный слой нервных волокон сетчатки

ФРН (NGF – англ.) – фактор роста нервов

ФЭК+ИОЛ – фактоэмульсификация катаракты с имплантацией интраокулярной линзы