

# РЕЗУЛЬТАТЫ КОМБИНИРОВАННОГО АНТИАНГИОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА НОВООБРАЗОВАННЫЕ СОСУДЫ РОГОВИЦЫ. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

В.Р. Мамиконян, Т.М. Воеводина, А.А. Фёдоров, М.В. Будзинская, М.Л. Балаян  
ФГБУ НИИ глазных болезней РАМН, г. Москва

## Резюме

Приведены результаты сравнительного экспериментально-морфологического исследования влияния на новообразованные сосуды роговицы глаза кролика фотодинамической терапии с препаратом фотосенс и медикаментозной антиангиогенной терапии с препаратом авастин (бевацизумаб) в режиме монотерапии, а также их сочетанного применения. Лечение проводили в режимах: 1) фотодинамическая терапия с препаратом фотосенс (однократное внутривенное введение в дозе 0,3 мг/кг за 72 ч до лазерного облучения, плотность мощности лазерного облучения 500 мВт/см<sup>2</sup>, длина волны 675 нм); 2) медикаментозная антиангиогенная терапия с препаратом авастин (однократное субконъюнктивальное введение в дозе 1,25 мг); 3) фотодинамическая терапия с препаратом фотосенс (в указанном режиме) в сочетании с субконъюнктивальным введением препарата авастин в дозе 1,25 мг непосредственно перед проведением облучения.

Показано, что при сочетанном применении фотодинамической и антиангиогенной терапии можно добиться практически полной окклюзии во всех отделах новообразованного сосудистого русла роговицы, причем в более короткий промежуток времени по сравнению со временем лечения в монорежимах. В случае сохранения кровотока в крупных магистральных сосудах возможно проведение повторных курсов комбинированного лечения. Отсутствие побочного воздействия на окружающие ткани и восстановление оптических свойств роговицы возможно позволит в перспективе использовать предложенный метод в клинической практике.

**Ключевые слова:** фотодинамическая терапия, фотосенс, корнеальная неоваскуляризация, авастин (бевацизумаб).

## Введение

В настоящее время 45 миллионов человек в мире страдают слепотой, и эта цифра каждый год увеличивается на 1–2 миллиона [1]. Примерно в 10% случаев причиной слепоты являются стойкие помутнения роговицы, возникшие в результате травм, трансплантаций, тяжелых язвенных кератитов и дистрофических заболеваний, сопровождающихся неоваскуляризацией стромы [2].

Проблема васкуляризации роговицы является весьма актуальной в связи с увеличением числа заболеваний и различного рода воздействий экзогенных факторов, индуцирующих ангиогенез. Многочисленные традиционные методы лечения этой патологии не всегда эффективны. Одними из современных методов подавления ангиогенеза является фотодинамическая терапия (ФДТ) и медикаментозная антиангиогенная терапия.

Метод ФДТ основан на избирательной способности фотосенсибилизаторов накапливаться в опухолевых клетках и при воздействии света, длина волны которого соответствует пику их поглощения, генерировать синглетный кислород и другие активные радикалы. Токсическое действие фотосенсибилизаторов на новообразованные сосуды может проявляться в виде десквамации эндотелиальных клеток и окклюзии просвета сосуда, при этом уда-

ется добиться минимального воздействия на окружающие ткани.

Альтернативная медикаментозная антиангиогенная терапия в офтальмологии основана на применении препаратов, ингибирующих фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), которые в настоящее время находятся на различных стадиях клинических испытаний. Представителем этой группы является препарат авастин (бевацизумаб), представляющий собой рекомбинантное гиперхимерное гуманизированное моноклональное антитело, обладающее способностью селективно связываться со всеми изоформами человеческого VEGF (VEGF110, VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 и VEGF206) с высокой аффинностью, тем самым ингибируя адгезию к его рецепторам на поверхности эндотелиальных клеток, что препятствует развитию и способствует редукции новообразованных сосудов [2].

Сами по себе эти методы являются достаточно эффективными, но у каждого есть свои показания и противопоказания. Кроме того, важным условием для успешного лечения сложных случаев является необходимость повторения курсов выбранной терапии. В связи с этим нами было предложено сочетанное применение вышеуказанных методов в расчете на их синергидное

действие, что позволило бы уменьшить кратность повторных курсов лечения.

Цель настоящего экспериментального исследования – морфологическое изучение состояния новообразованных сосудов роговицы после проведения ФДТ с препаратом фотосенс, введения анти-VEGF препарата авастин и их сочетанного применения, а также иммуногистохимическое исследование фармакодинамики препарата авастин в тканях роговицы при субконъюнктивальном введении.

### Материалы и методы

Исследование проводилось на 36 кроликах породы серая шиншилла массой 2,5–3 кг, с моделированной корнеальной неоваскуляризацией (химический ожог 10%-ым раствором NaOH). Животные были разделены на четыре группы (в группах I–III по 8 голов, в IV контрольной – 12 голов). В I группе проводили сеанс ФДТ с помощью диодного лазера «БИОСПЕК» на длине волны 675 нм с использованием препарата фотосенс (внутривенное введение в дозе 0,3 мг/кг за 72 ч до лазерного облучения). Плотность мощности лазерного излучения составляла 500 мВт/см<sup>2</sup>. Кроликам во II группе однократно субконъюнктивально инъецировали препарат авастин в дозе 1,25 мг. В III группе животным проводили ФДТ с фотосенсибилизатором фотосенс в комбинации с антиангиогенным препаратом авастин, который вводили субконъюнктивально непосредственно перед проведением ФДТ (параметры лазерного облучения и дозировки препаратов соответствовали параметрам для животных групп I и II). Группа IV была контрольной (вместо препаратов вводили соответствующее количество физиологического раствора).

В работе применялись методы биомикроскопии и флуоресцентной ангиографии (ФАГ) переднего отдела глаза. Биомикроскопию осуществляли с помощью щелевой лампы ЩЛ-ЗГ ТУЗ 3.2438-91, использовалось фокальное боковое освещение. ФАГ проводили на фундус-камере Торсон (Япония) со встроенной цифровой камерой. В качестве возбуждающего фильтра использовали Baid Atomic B4, перед объективом видеокамеры устанавливали жёлтый барьерный фильтр ЖС-13, соответствующий по характеристике Kodak Wratten No15. В качестве контрастного вещества применяли 10%-ый флуоресцеин натрия (флуоресцид) производства фирмы Alcon (США), который вводили в ушную вену в количестве 2,0 мл в течение 2 с. Через 6–7 с от начала инъекции начинали серийную съёмку роговицы с неоваскуляризацией.

Морфологическое исследование осуществлялось с использованием световой и трансмиссионной электронной микроскопии. Гистологическое исследование роговицы проводили методами парафиновых и/или полутонких срезов (эпоксидная

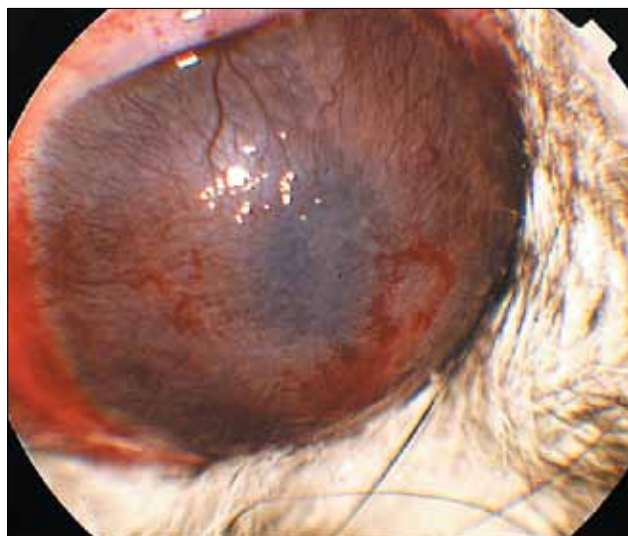
смола EPON 812), окрашенных гематоксилином и эозином или полихромным красителем, соответственно. Для электронной микроскопии срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу. Гистологические препараты исследовали на световом микроскопе Leica DM 2500. Фотографирование и морфометрический анализ изображений проводили с помощью цифровой камеры Leica DFC 320, программное обеспечение Image score color, M. Ультратонкие срезы исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе Opton EM-10C (Германия).

### Результаты и обсуждение

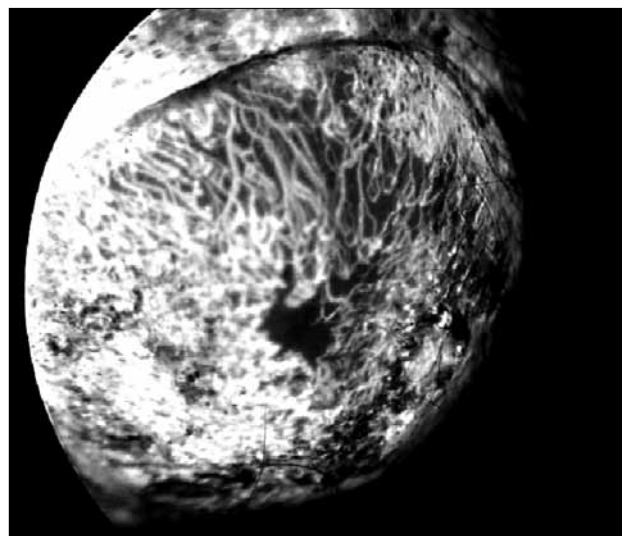
Результаты биомикроскопического исследования и ФАГ показали, что через три недели после химического ожога во всех группах животных новообразованные сосуды формировали многослойное сплетение, расположенное преимущественно в передней трети толщи стромы роговицы (рис. 1 а, б). В контрольной группе такая картина сохранялась в течение всего срока наблюдения за животными.

При гистологическом исследовании сагиттальных срезов роговицы обнаруженные на периферии и в центральных отделах новообразованные сосуды магистрального типа располагались главным образом в поверхностных стромальных слоях роговицы, имели вид тонкостенных сосудистых сплетений, выстланных слоем плоских эндотелиальных клеток и единичными гладкомышечными клетками по периметру базальной мембраны. Их отличала повышенная проницаемость стенки, на что указывало наличие в периваскулярных пространствах лейкоцитов, в том числе эозинофилов. Особенности новообразованных сосудов по сравнению с нормальными – истонченность стенки и гипотонность миоцитов и эндотелиоцитов, ядра которых были уплощены. Базальная мембрана и гладкомышечная оболочка имели неравномерную толщину, особенно в проекции безъядерной части эндотелиальных клеток, что лишь в малой степени отличало сосуды артериолярного типа от веноулярных.

После проведения ФДТ на гистологических препаратах отмечали развитие тромбоза артериолярных и веноулярных магистральных сосудов и частичную или полную облитерацию их просвета. При этом наблюдали отек прилежащей стромы вокруг дилатированных капилляров, признаков экстравазации и видимых изменений окружающей роговичной ткани не наблюдалось. На более поздних сроках наблюдения в поверхностной строме обнаруживалась фибропластическая реакция, вызывавшая уплотнение коллагенового матрикса и спадение новообразованных капилляров (рис. 2 а). Антиангиогенное действие ФДТ проявлялось сразу после воздействия, постепенно нарастая ко второй неделе наблюдения, но уже через 1 мес. диагностировалось уменьшение терапевтического эффекта.



а



б

**Рис. 1.** Модель неоваскуляризации роговицы кролика через 3 недели после химического ожога 10%-ым раствором NaOH:

а – биомикроскопия;

б – флуоресцентная ангиография переднего отдела глаза

В первые же часы после однократного субконъюнктивального введения авастина наблюдались изменения в виде отека ядер эндотелиоцитов, резкого уменьшения просвета и снижения кровотока в конечных отделах новообразованных сосудов (рис. 2б). На фоне редукции новообразованного сосудистого русла происходил спазм магистральных артериол, нередко сопровождавшийся тромбозом и снижением экстравазации (рис. 2в). Через две недели отмечалась относительная гиперцеллюлярность субэпителиальной стромы. Спустя 1 мес. антиангиогенный эффект несколько снижался, появлялись признаки ревазуляризации стромы.

В III группе после проведения ФДТ с одновременным введением препарата авастин редукция новообразованных сосудов наступала быстрее и сохранялась до конца эксперимента за счет суммирования процессов спазмирования и тромбообразования в магистральных сосудах, а также отека эндотелиоцитов и спадения стенок капиллярного русла (рис. 2г).

По данным ультрамикроскопического исследования, механизм ангиотропного действия комбинированного лечения проявлялся в отеке (рис. 3а) и десквамации эндотелиальной выстилки капилляров (рис. 3б), спадении их стенок, выключении из общего кровотока и последующей редукции. Гемодинамические нарушения в капиллярных звеньях сопровождались спазмом артериол (рис. 3в) и тромбообразованием в венах (рис. 3г).

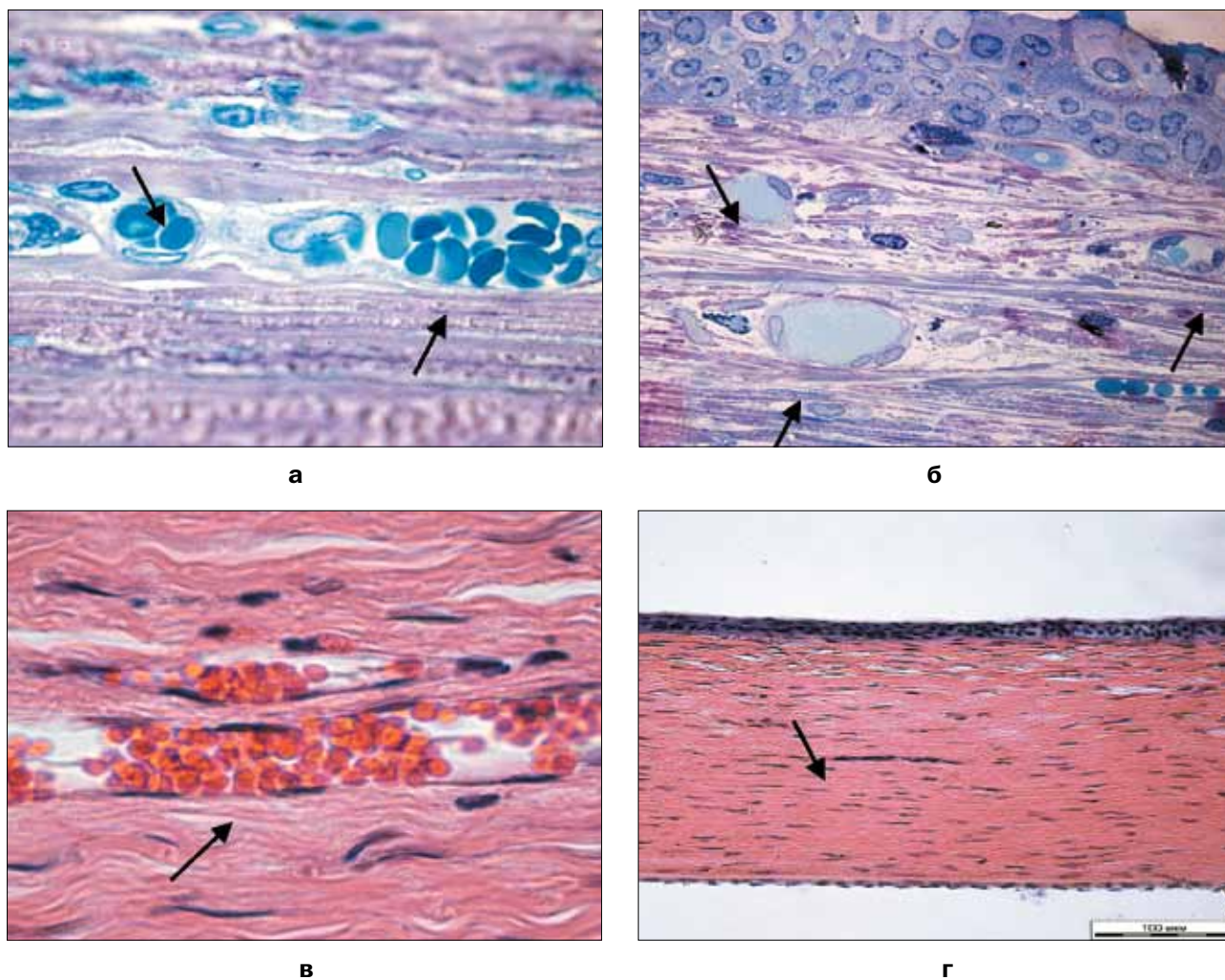
Новообразованной сосудистой сети в строме роговицы присуща многоуровневая архитектура. Сосуды образуют 3–4-слойное сплетение

в верхней трети толщи стромы. Средний калибр новообразованных сосудов в строме роговицы уменьшался в направлении от поверхностных к глубоким ее слоям. Результаты морфометрического анализа свидетельствовали о том, что спустя 1 мес. в III группе животных после проведения ФДТ в комбинации с субконъюнктивальным введением авастина плотность новообразованных сосудов, начиная с уровня прекапилляров, снижалась по сравнению с плотностью в контрольной группе. Параллельно отмечалось уменьшение калибра магистральных сосудов. Наблюдалось достоверное уменьшение диаметра преимущественно магистральных сосудов по сравнению с сосудами у животных в I группе (ФДТ), а во II группе животных наблюдалось уменьшение прекапилляров, посткапиллярных венул и капилляров. Результаты морфометрического анализа отображены в таблице.

### **Заключение**

Экспериментально установлено, что в I группе животных (ФДТ) развивался тромбоз в магистральных новообразованных сосудах преимущественно венозного отдела, что сопровождалось выраженным отеком стромы роговицы. Во II группе (субконъюнктивальное введение авастина) медикаментозная антиангиогенная терапия приводила к нарушению кровотока, главным образом в микроциркуляторных звеньях новообразованной сосудистой сети, в результате отека и последующей атрофии клеточных элементов стенки капилляров. В случае комбинированной терапии (III группа) отмечали синергизм антиангиогенных процессов, причем без клинически



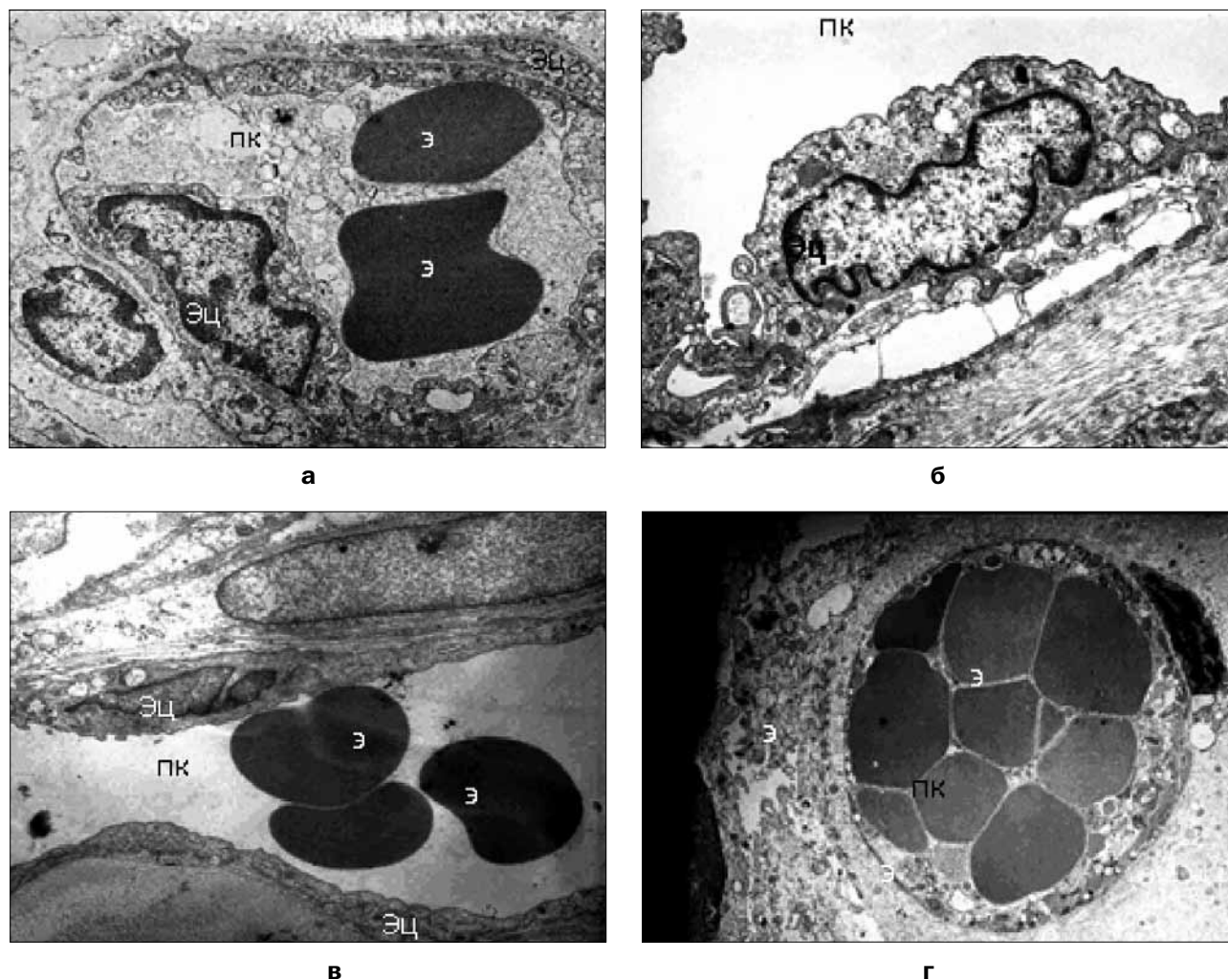


**Рис. 2.** Светооптическая картина новообразованных сосудов (†) роговицы:  
 а – уплотнение коллагенового матрикса и спазм капилляров;  
 б – белые тромбы в венулах;  
 в – красный тромб в магистральной артериоле;  
 г – редуцированный капилляр на фоне гиперцеллюлярности и компактизации стромы роговицы  
 (а, б – полутонкие срезы, окрашенные полихромным красителем, х 640;  
 в, г – парафиновые срезы, окрашенные Г-Э, х 400, х 200)

**Таблица**

Диаметр звеньев новообразованного сосудистого русла роговицы кролика через 1 мес. эксперимента (p = 0,05)

Тип сосуда	Диаметр сосудов у кроликов, мкм, по группам			
	I (ФДТ)	II (Авастин)	III (ФДТ+Авастин)	IV (Контроль)
Артериолы	14,46±1,37	20,11±1,17	13,11±1,21	22,53±1,47
Капилляры	8,64±0,71	6,17±0,84	5,01±0,86	9,77±0,34
Венулы	18,97±1,69	15,04±1,71	14,47±1,36	18,23±1,91



**Рис. 3.** Ангиотропное действие комбинированной терапии на микроциркуляторное русло новообразованных сосудов роговицы кролика. Электронограммы срезов, контрастированных уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу. Увеличение: а – х 5000, б – х 6300, в – х 2500, г – х 4000.

**Примечание:**

- а – отек эндотелиоцитов, перекрывающих просвет капилляра;
  - б – десквамация эндотелиоцита в неперфузируемом капилляре;
  - в – спазм и неравномерный диаметр артериолы;
  - г – тромбоз вены
- (Э – эритроцит, Эц – эндотелиоцит, пк – просвет капилляра)

значимого отека роговицы. В контрольной (IV) группе картина неоваскуляризации стромы роговицы не только сохранялась, но и усиливалась к концу срока наблюдения.

По результатам экспериментально-морфологического исследования можно сделать вывод, что ФДТ с фотосенсибилизатором фотосенс в комбинации с анти-VEGF препаратом авастин приводит практически к полной непроходимости всех отделов новообразованного сосудистого русла роговицы. Причем данный эффект регистриру-

ется в короткий промежуток времени от начала лечения и сохраняется на протяжении всего эксперимента в отличие от лечения, примененного в I и II группах. Возможно проведение повторных курсов комбинированного лечения в случае сохранения кровотока в крупных магистральных сосудах. Отсутствие побочных воздействий на окружающие ткани и восстановление оптических свойств роговицы после проведенного лечения предполагают перспективность внедрения предложенного метода в клиническую практику.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Prokofyeva E., Zrenner E. Epidemiology of major eye diseases leading to blindness in Europe: A literature review // Ophthalmic Res. – 2012. – Vol. 47. – P. 171-188.
2. Tombren-Tink J., Barnstable C.J. Ocular Angiogenesis: Diseases, mechanisms, and therapeutics. – Humana press. – 2006. – 412 p.

# Results of combined ANTIANGIOGENIC ACTIVITY ON CORNEAL NEOVASCULARIZATION. EXPERIMENTAL AND MORPHOLOGICAL STUDY

V.R. Mamikpnyan, T.M. Voevodina, A.A. Fyodorov, M.V. Budzinskaya, M.L. Balayan  
Research institute of eye diseases of RAMS, Moscow

Results of comparative experimental and morphological study of activity on corneal neovascularization in rabbit's eye of photodynamic therapy with Photofocus and antiangiogenic therapy with Avastin (bevacizumab) alone, and in its combination are represented. The treatment was performed in regimens: 1) photodynamic therapy with Photofocus (single intravenous injection in dose of 0.3 mg/kg 72 h prior to laser irradiation, power density of irradiation 500 mW/cm<sup>2</sup>, wavelength 675 nm); 2) drug antiangiogenic therapy with Avastin (single subconjunctival introduction at dose of 1.25 mg); 3) photodynamic therapy with Photofocus (in described regimen) in combination with subconjunctival introduction of Avastin at dose of 1.25 mg immediately prior to irradiation.

Combined photodynamic therapy with antiangiogenic therapy allows to obtain almost complete occlusion in all regions of corneal neovascular bed with shorter time interval comparing with those for monoregimens. In case of blood flow retention in great vessels courses of combined modality treatment may be repeated. The absence of side-effects on surrounding tissues and the recovery of optical characteristics of cornea may allow to use this upcoming method in clinical practice.

**Keywords:** photodynamic therapy, Photofocus, corneal neovascularization, Avastin (bevacizumab).

**Контакты:** Будзинская М.В. E-mail: m\_budzinskaya@mail.ru