

На правах рукописи

Шамхалова Ханика Магомедовна

**РАЗРАБОТКА КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ
ПРОГНОЗИРОВАНИЯ И ОПТИМИЗАЦИЯ
ИММУНОСУПРЕССИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ ПРИ КЕРАТОПЛАСТИКЕ
ВЫСОКОГО РИСКА**

14.01.07 – Глазные болезни

14.03.09 – Клиническая иммунология и аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца» (директор института – Заслуженный деятель науки РФ, профессор академик РАН, д.м.н., профессор **В. В. Нероев**).

Научные руководители:

Нероев Владимир Владимирович, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор;
Балацкая Наталья Владимировна, кандидат биологических наук

Официальные оппоненты:

Рябцева Алла Алексеевна, профессор, доктор медицинских наук, руководитель отделения офтальмологии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф.Владимирского.

Ястребова Наталья Евгеньевна, профессор, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией иммунохимической диагностики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток» им.И.И.Мечникова.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им.акад. И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2021 года в часов на заседании диссертационного совета Д 208.042.01 при ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им.Гельмгольца» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (105062, г.Москва, ул.Садовая-Черногрозская, д.14/19).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им.Гельмгольца» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (105062, г.Москва, ул.Садовая-Черногрозская, д.14/19) и на сайте www.helmholtzeyeinstitute.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор медицинских наук

Филатова Ирина Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Несмотря на значительные успехи общей трансплантологии, совершенствование микрохирургической техники с тщательным отбором, подготовкой и защитой донорского трансплантата, разработанными схемами пред- и постоперационной терапии, частота неблагоприятных исходов пересадки роговицы все еще продолжает оставаться достаточно высокой (Оганесян О.Г., 2011; Кугушева А.Э., 2014).

Особенно неблагоприятны результаты трансплантации роговицы у пациентов группы «кератопластики высокого риска» (КПВР) с высоковаккуляризованными, поствоспалительными бельмами и повторными пересадками (Каспаров А.А., Аладинская И.В., 2002; Балаян Т.Г., 2008; Макаров П.В., 2003; Кугушева А.Э., 2014). Показано, что КП на патологически вакуляризованном ложе ведет к реакции отторжения в 50% случаев.

При этом накоплены данные, что активация лимфо- и ангиогенеза даже в условиях КП низкого риска является сильным провоцирующим фактором развития иммунологического отторжения роговичной ткани у экспериментальных животных и зависит от состояния системы про- и антиангиогенных факторов.

Известно, что роговица является иммунологически привилегированной аваскулярной тканью со слабой экспрессией молекул МНС, наличием факторов, строго регламентирующих миграцию иммунокомпетентных клеток в эпителии и иммуносупрессивных веществ (TGF β 1, PDL-1, IDO и др.) во влаге передней камеры глаза (ВПК) (Слепова О.С., 2000; Hori J., et al., 2006; Shen L. et al., 2007).

Действие повреждающих агентов (инфекции, травмы, в т.ч. хирургической и, особенно, повторной)) может привести к срыву иммунной привилегии – патологической активации локальных и системных иммунологических механизмов: усилению продукции лимфо – и ангиогенных факторов, хемоаттрактантных медиаторов, способствующих рекрутингу иммунокомпетентных клеток в очаг воспаления (Слепова О.С. и соавт., 2008; Sundmacher R., Reinhard T., 1994; Hill J.C., 1996).

Важнейшую роль в достижении успеха при пересадках аллогенных органов и тканей помимо решения вопросов совместимости донора и реципиента по антигенам МНС играет иммуносупрессирующая терапия (Каспаров А.А., Аладинская И.В. 2002; Балаян Т.Г. 2008; Кугушева А.Э. 2013; Scheer S, Touzeau O. 2003; Crawford AZ, Patel DV. 2013; Dohlman TH, Di Zazzo A. 2016).

Однако, системная иммунотерапия с циклоспорином А (ЦсА), кортикостероидные препараты, являясь традиционным средством выбора для лечения и профилактики болезни трансплантата в офтальмологической практике, зачастую не могут обеспечить прозрачного приживления донорской роговицы и предотвратить ее неоваскуляризацию (Балаян Т.Г., 2008; Кугушева А.Э. 2014; Труфанов С.В., Суббот А.М., Маложен С.А., Крахмалева Д.А., 2017).

Вместе с этим, в литературе имеются данные, свидетельствующие о перспективах использования микофенолата мофетил (ММФ) - иммуносупрессанта метаболического типа, который, по данным работ Reinhard T. и соавт., показал свою эффективность при КПВР (Reinhard T., Voiculescu A., Kutkuhn B., Godehardt E., Spelsberg H., 1999).

ММФ – предшественник активной субстанции микофеноловой кислоты, как и ЦсА, селективно подавляет пролиферацию Т- лимфоцитов, но в отличие от последнего, обладает более широким иммуносупрессивным действием (Allison A.C., Eugui E.M., 2005.).

Антиангиогенный и антифибротический эффекты препарата были продемонстрированы у больных с ревматоидным артритом и системной склеродермией (Ананьева Л.П., 2009).

В отечественной литературе о работы, посвященные оценке эффективности использования ММФ при пересадках роговицы, отсутствуют.

В связи с вышесказанным, целенаправленные комплексные исследования с оценкой иммунного статуса, локальной и системной продукции воспалительных, хемоаттрактантных и ангиогенных медиаторов при КПВР в условиях применения ММФ могут способствовать разработке клинико - иммунологических критериев для обоснованного выбора послеоперационной консервативной терапии, прежде всего – иммуносупрессивных средств.

Цель работы – определение клинико-иммунологических критериев прогнозирования и оценка воздействия иммуносупрессивного препарата микофенолата мофетил при кератопластике высокого риска.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить роль известных и малоизученных факторов ангиогенеза, провоспалительных и хемоаттрактантных цитокинов в формировании поствоспалительных бельм с васкуляризацией на основании исследования IL-2, IL-18, Eotaxin, IP-10, MCP-1, MIP-1 β , SDF-1 α , RANTES, HGF, PlGF-1, VEGF-A в слезной жидкости и сыворотке крови пациентов с КПВР.

2. Провести сравнительный анализ и дать клиническую характеристику течения раннего и отдаленного постоперационного периода у больных перенесших КПВР на фоне двух схем консервативной терапии:

а) стандартного лечения;

б) комплексного применения глюкокортикоидной терапии с иммуносупрессивным препаратом ММФ.

3. Изучить динамику показателей клеточного звена иммунитета, содержания факторов ангиогенеза, хемокинов и провоспалительных цитокинов в СК и СЖ пациентов с КПВР на фоне приема иммуносупрессивного препарата ММФ.

4. Выявить потенциально информативные параметры развития возможных осложнений КПВР на основании ретроспективного анализа.

5. Оптимизировать схему пред и постоперационного ведения пациентов с кератопластикой высокого риска.

Научная новизна. Впервые в отечественной офтальмологической практике проведен многофакторный скрининг и сравнительный анализ клинических и иммунологических показателей в динамике наблюдения больных с поствоспалительными васкуляризованными бельмами, после кератопластики высокого риска в условиях традиционного медикаментозного лечения и в комбинации с использованием иммуносупрессивного препарата Микофенолата мофетил. Впервые в условиях применения ММФ при кератопластике высокого риска изучена динамика провоспалительных (IL-2, IL-18) и хемоаттрактантных медиаторов (Eotaxin, IP-10, MCP-1, MIP-1 β , SDF-1 α , RANTES), факторов ангиогенеза (HGF/SF, PlGF-1, VEGF-A), а также клеточной составляющей иммунного статуса.

Представлена характеристика нарушений в различных звеньях иммунитета, учитывающая объем хирургического вмешательства, характер течения раннего и позднего послеоперационного периода и длительность применения ММФ.

Использование разработанных подходов к тактике ведения больных позволило повысить эффективность лечения при кератопластике высокого риска на 28,8 % в сроки более 1 года после операции, уменьшить риск отторжения и гибели роговичного трансплантата и оптимизировать функциональные результаты.

Теоретическая и практическая значимость. Впервые разработаны клинко-иммунологические критерии для назначения Микофенолата мофетил при кератопластике высокого риска.

Определены потенциально информативные иммунологические параметры возможных осложнений в постоперационном периоде у пациентов с КПВР.

Взаимосвязи, выявленные в результате проведения исследования, расширяют представления о патогенезе осложнений при КПВР и оптимизируют выбор схемы послеоперационной терапии.

Методология и методы исследования. Методологической основой диссертационной работы явилось последовательное применение методов научного познания. Работа выполнена в дизайне ретроспективного и проспективного исследования с использованием клинических, инструментальных и статистических методов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Применение микофенолата мофетил у пациентов с высоким риском отторжения трансплантата позволило повысить (по сравнению с традиционной глюкокортикоидной терапией) частоту прозрачного и полупрозрачного приживления трансплантата на 28,8% по сравнению с группой пациентов, получавших стандартную глюкокортикоидную терапию.

2. Формирование поствоспалительных васкуляризированных бельм в роговице ассоциируется с изменением общего иммунологического статуса, локальным и системным дисбалансом провоспалительных, ангиогенных и хемоаттрактантных медиаторов.

3. Дано научное обоснование широкого иммуносупрессивного, противовоспалительного и антиангиогенного воздействия ММФ при КПВР.

4. Выявлен ряд потенциально информативных иммунологических параметров для прогнозирования развития возможных осложнений КПВР и мониторинга иммуносупрессивной терапии, рекомендованный для проведения целенаправленных исследований их диагностической значимости.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Степень достоверности полученных результатов исследований определяется достаточным и репрезентативным объемом выборок исследований и использованием современных методов обследования. Методы статистической обработки полученных результатов адекватны поставленным задачам.

Основные положения диссертации доложены: на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием – X, XII Российский общенациональный офтальмологический форум (Москва, 2018, 2019), XXVI Международном офтальмологическом конгрессе «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2020), VI Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2020), Кашкинские чтения 2020.

Апробация диссертационной работы состоялась 14 октября 2020 года на объединенной научной конференции отделений ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России.

Внедрение результатов работы в практику. Результаты настоящего исследования внедрены в клиническую практику Отдела травматологии и реконструктивной хирургии ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России. Материалы диссертации включены в программы лекций для клинических интернов и ординаторов, на курсах повышения квалификации специалистов, сертификационных циклах последипломного образования для врачей-офтальмологов, проводимых на базе ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца».

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 работы, 4 в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 115 страницах машинописи; иллюстрирована 19 таблицами, 12 рисунками. Список литературы включает 188 источников, 21 отечественных и 167 иностранных. Диссертация состоит из введения, четырех глав, включая обзор литературы, материалы и методы,

результаты собственных клинических и иммунологических исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа выполнена в ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России» в отделе травматологии, реконструктивной хирургии и глазного протезирования (начальник отдела профессор, д.м.н. Ченцова Е.В.) и в отделе иммунологии и вирусологии (начальник отдела к.б.н. Балацкая Н.В.).

В период с 2017 по 2020 год под наблюдением находились 106 пациентов (49 женщин и 57 мужчин) (106 глаз, случаев) с бельмами III–IV категории, сформировавшиеся вследствие перенесенного кератита – 106 случаев (100%), поступившие для плановой кератопластики. В основном это были пациенты трудоспособного возраста (от 18 до 40 лет) – 61 случай (57,5%). Больных от 40 до 60 лет было 32 человека (30,2%), пожилые люди (старше 60 лет) составили 12,3 % (13 случаев).

Васкуляризированные бельма, сформировавшиеся вследствие воспалительных процессов роговицы имели место в 50 случаях (47,0%). Повторная кератопластика была проведена 52 больным (49%) (таблица 1).

Таблица 1 – Распределение больных по этиологии и категории бельма

Этиология бельма	Категория бельма	Кол-во больных	
		п	%
Кератиты герпесвирусной этиологии	III	37	35%
	IV	69	65%
	<i>Из них повторная КПЛ</i>	52	
	ВСЕГО	106	100

Примечание: п – количество больных.

По тяжести клинического течения, все наблюдавшиеся пациенты были отнесены к категории «кератопластика высокого риска».

У 52 пациентов (49%) при поступлении острота зрения на обследуемом глазу составляла от неправильной светопроекции до счета пальцев у лица, у 54 пациентов (51%) была в пределах 0,02–0,05. Внутриглазное давление в большинстве случаев было в пределах нормы (пальпаторно).

В зависимости от показаний и цели операции проводили послойную (25 случаев; 23,6%) или сквозную (81 случай; 76,4%) кератопластику. Использовали традиционную хирургическую технику. Операцию завершали наложением мягкой контактной линзы (МКЛ).

В 66 случаях операция была ограничена непосредственно КП, у 42 пациентов (39,6%) потребовалось проведение дополнительных манипуляций, в том числе реконструкция передней камеры (10 случаев, 23,8%), экстракция катаракты (15 случаев, 35,7 %), имплантация ИОЛ (7 случаев, 16,7%), удаление ИОЛ (10 случаев, 23,8%).

Методы обследования больных включали традиционные офтальмологические: визометрия с коррекцией, при отсутствии предметного зрения исследовалась светопроекция; тонометрия (в большинстве случаев измерение ВГД проводили пальпаторно); осмотр при боковом (фокальном) освещении; биомикроскопия (размер дефекта роговицы определялся флюоресциновой пробой); офтальмоскопия.

Функциональное состояние сетчатки и зрительных путей оценивали по результатам определения электрической пороговой чувствительности сетчатки и лабильности зрительного нерва, по признаку возникновения критической частоты исчезновения мелькающего фосфена. Исследования проводились в лаборатории клинической физиологии зрения им. С.В. Кравкова ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» (начальник – д.б.н., профессор М.В. Зуева).

Ультразвуковые методы исследования применяли для оценки состояния преломляющих сред, положения внутренних оболочек, размеров глазного яблока. Использовали А- и В-методы эхографии (с помощью отечественного эхоофтальмографа ЭХО-21 и ультразвукового сканера Е-100 фирмы Торсон (Япония). Исследования проводили на базе лаборатории ультразвуковых исследований ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» (начальник – д.м.н., профессор Т.Н. Киселева).

Иммунологические исследования проводили на базе Отдела иммунологии и вирусологии (начальник – к.б.н. Балацкая Н.В.).

Тест-пробами служили: слезная жидкость (СЖ) и сыворотка крови (СК), цельная кровь.

Сроки обследования: перед операцией, через 1-2 мес. до 6 мес. после КП, затем в отдаленные сроки наблюдения – от 6 мес. до 2,5 лет.

Анализ зависимости исходов КПВР от иммунологических показателей проводился ретроспективно. Сроки наблюдения большинства пациентов составили от 6 мес. – 2,5 лет (90 случаев, 85%).

Нами были проведены следующие исследования:

1. Оценку клеточного звена иммунитета пациентов проводили методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре (BD FACS CantoII) с использованием меченных моноклональных антител Multitest 6-Color TBNK Reagent («Vector Dickinson», США) в пробирках BD TruCount согласно инструкции производителя.

2. Уровень системной (в сыворотке крови) и локальной (в слезной жидкости) продукции иммуномедиаторов определяли методом мультиплексного анализа на платформе xMAP (мультиплексный анализатор MAGPIX) набором ProcartaPlex (eBioscience, Австрия) согласно инструкции производителя.

3. Определение маркеров вирусной инфекции.

Учитывая возможность обострения хронических инфекций в условиях иммуносупрессивной терапии, определяли сывороточные маркеры активации вирусов группы герпеса (IgG, IgM – антитела к ВПГ I и II типа, ЦМВ); тест-системы для ИФА «Вектор- Бест». Обследование проводили до КП, далее каждые 2 мес на фоне приема ММФ и ПВТ.

Все обследованные больные были инфицированы ВПГ (IgG ВПГ I + II типа) (таблица 2).

Таблица 2 – Показатели инфицированности больных вирусами герпеса (перед операцией).

	ВПГ I+II (IgG)	ВПГ I+II (IgM)	ВПГ I (IgG к предраннему антигену)	ВПГ II (IgG к предраннему антигену)	ЦМВ (IgG к предраннему антигену)
n	106/106	0/25	52/106	35/106	19/106
%	100	0	49	33	17,9

Примечание: n – число пациентов.

Системное применение Микофенолата мофетил сопровождалось контролем за общим состоянием пациентов, ежемесячно проводили исследование общего клинического и биохимического анализа крови, общего анализа мочи.

Все 106 пациентов после операции получили традиционное медикаментозное лечение, включающее: в инстилляциях и инъекциях – антибактериальные препараты, стероидные и нестероидные противовоспалительные препараты, антиоксиданты, стимуляторы регенерации и заменители слезной жидкости. При развитии реакции отторжения трансплантата в ранние сроки (10–28 сутки) в стационаре назначали «пульс-терапию» (внутривенное введение метипреда). Схема глюкокортикоидной иммуносупрессивной терапии представлена в (табл.3).

Таблица 3 – Схема традиционной глюкокортикоидной терапии после пересадки роговицы у пациентов «кератопластики высокого риска»

Препарат	Путь введения		
	инстилляции	парабульбарные инъекции	внутривенные инъекции
<u>Метипред</u> ампулы по 250 мг (при реакции отторжения трансплантата)			«Пульс-терапия»: 1000мг, 500 мг, 250 мг на 100,0 мл физ. р-ра через день №3
<u>Дексаметазон</u> глазные капли, ампулы по 4 мг	3-6 раз в день в течение 6-12 мес.	2 мг ежедневно №7-10 в день и первые дни после операции	8 мг ежедневно №4 в день и первые дни после операции
<u>Пренацид</u> глазные капли	3 раза в день в течение 6-12 мес.		
<u>Дипроспан</u> ампулы по 7 мг		5 мг 1 раз в 10-14 дней № 3-6 (первая инъекция в день выписки)	

В I-ой группе (группа сравнения) (50 человек) иммуносупрессивную терапию проводили с помощью глюкокортикоидных препаратов (дексаметазон, пренацид, дипроспан, метипред).

Во II-ой группе (основная группа) (56 человек), на фоне традиционного лечения назначали пероральный прием селективного иммуносупрессора – Микофенолата мофетил с первого дня после операции в дозировке 2 г в сутки –6 месяцев. В процессе исследовательской работы в схему вносили индивидуальные изменения в зависимости от клинико-иммунологического мониторинга.

Препарат «СеллСепт», действующее вещество микофенолата мофетил, зарегистрирован на территории Российской Федерации для использования в общей трансплантологии, владелец регистрационного свидетельства – F. Hoffmann-LaRoche, Ltd. (Швейцария), код по МКБ Z94 (наличие трансплантированных органов и тканей).

Исследование выполнено с разрешения локального этического комитета ФГБУ НМИЦ глазных болезней им.Гельмгольца. Выписка из протокола №43/3 от 07.06.2019.

Пациенты обеих групп были сопоставимы по возрасту, полу, общему состоянию организма, характеру и тяжести основной патологии, объему хирургического вмешательства.

Клиническую оценку эффективности лечения больных проводили по следующим критериям: степень воспалительной реакции (отсутствует, умеренная, выраженная), характер течения послеоперационного периода (наличие или отсутствие осложнений), острота зрения и состояние роговичного трансплантата при выписке и в отдаленные сроки после операции. Благоприятным исходом кератопластики считали прозрачное и полупрозрачное приживление, неблагоприятным – помутнение и отторжение трансплантата. Сроки наблюдения пациентов составили от 1 до 2,5 лет (средний срок наблюдения составил 18 мес).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ результатов комплексного лечения с использованием глюкокортикоидной терапии и традиционной глюкокортикоидной схемы с пероральным приемом иммуносупрессивного препарата Микофенолата мофетил

Сравнительный анализ результатов лечения контрольной и основной групп.

Сравнительный анализ результатов лечения двух наблюдавшихся групп больных, перенесших кератопластику показал, что применение Микофенолата мофетил при кератопластике высокого риска снижало степень реактивной воспалительной реакции в раннем послеоперационном периоде, что способствовало купированию воспаления в дальнейшем. У пациентов отсутствовал роговичный синдром, не было характерного для больных, не получавших ММФ, нарастающего

реактивного отека трансплантата в первые дни после операции. Следует отметить, что ММФ не оказывал негативного действия на регенерацию эпителия трансплантата. У большинства пациентов, принимавших ММФ, первичная эпителизация завершалась в течение 7–10 дней, а главными причинами персистенции эпителиальных дефектов трансплантата была, по-видимому, декомпенсация синдрома сухого глаза, однако нельзя исключить и роли иммунологических и/или инфекционных факторов.

При сравнительном анализе групп также стоит отметить, что у пациентов, поступивших на первичную кератопластику прозрачное приживление было достигнуто на 23,1% больше в группе пациентов, получавших микофенолат мофетил. Мутное приживление наблюдали только в группе, получавших традиционную глюкокортикоидной терапию (таблица 4).

Таблица 4 – Анализ состояния трансплантата после первичной пересадки, в зависимости от схемы лечения

СКП по счету	Состояние трансплантата (исход)			Всего n (%)
	Прозрачный	Полупрозрачный	Мутный	
Первая КП (гр сравнения)	14 (50%)	8 (28,6%)	6 (21,4%)	28 (100%)
Первая КП (основная группа)	19 (73,1%)	7 (26,9%)	–	26 (100%)

Сравнительная оценка состояния трансплантата в основной и контрольной группах показала, что на момент выписки прозрачное приживление трансплантата в основной группе достигнуто на 31% больше чем в контрольной, мутное – на 27% меньше. В отличие от контрольной группы, где наблюдали 2 случая (4%) отторжения трансплантата, в основной группе случаев реакции отторжения трансплантата отмечено не было (таблицы 5–6).

Таблица 5- Характеристика состояния трансплантата в контрольной и основной группах при выписке

Группы	Состояние трансплантата			
	Прозрачный, %	Полупрозрачный, %	Мутный, %	Реакция отторжения, %
Контрольная (n=50)	21 (42%)	12 (24%)	15 (30%)	2 (4%)
Основная (n=56)	36 (64,3%)	20 (35,7%)	-	–

Таблица 6 – Характеристика состояния трансплантата в контрольной и основной группах в отдаленные сроки (1,5-2 года)

Группы	Состояние трансплантата			
	Прозрачный, %	Полупрозрачный, %	Мутный, %	Реакция отторжения, %
Контрольная (n=50)	20 (40%)	12 (24%)	12 (24%)	6 (12%)
Основная (n=56)	36 (64,2%)	16 (28,6%)	4 (7,2%)	–

Примечание: n – число глаз.

Сравнительный анализ отдаленных результатов приживления трансплантата в двух наблюдавшихся группах показал, что прозрачное и полупрозрачное приживление в группе сравнения получено в 32 случаях (64 %), в основной – 52 случая (92,8%), мутное приживление – 12 случаев (24%) и 4 (7,1%) соответственно. В группе сравнения наблюдали 6 случаев отторжения трансплантата. В основной группе реакцию отторжения трансплантата не наблюдали.

Результаты иммунологических исследований.

Всем пациентам в пред и послеоперационном периоде было проведено исследование клеточной составляющей общего иммунологического статуса, а также содержания провоспалительных, лимфо- и ангиогенных медиаторов в сыворотке крови и в слезной жидкости пациентов.

В ходе работы для более детального понимания иммунологических механизмов формирования васкуляризированных бельм пациенты были распределены на 2 группы, в зависимости от количества кератопластик в анамнезе, а также в зависимости от наличия васкуляризации роговицы и кератотрансплантата. Результаты динамики клеточного звена иммунитета представлены в рисунках 1–2.

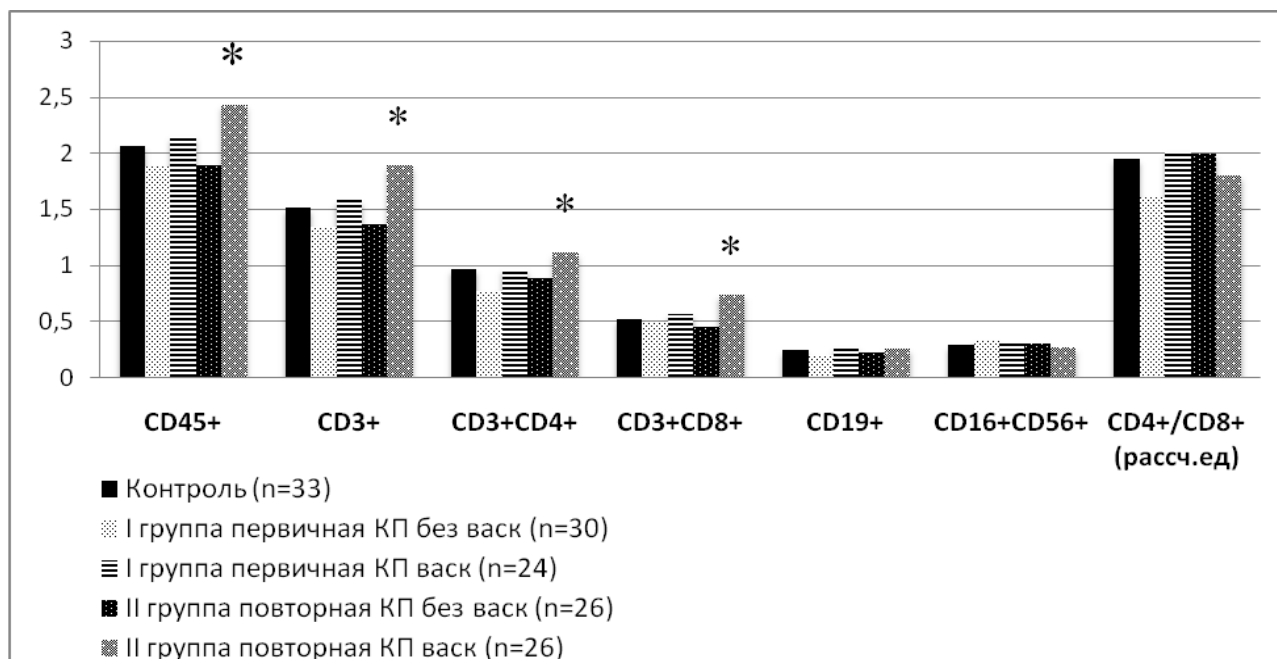


Рисунок 1– Динамика клеточного звена иммунитета у пациентов в зависимости от количества КП в анамнезе и наличия васкуляризации перед операцией (По оси ординат: абсолютное количество клеток: $\times 10^9/\text{л}$). Примечание: *- $p < 0,05$

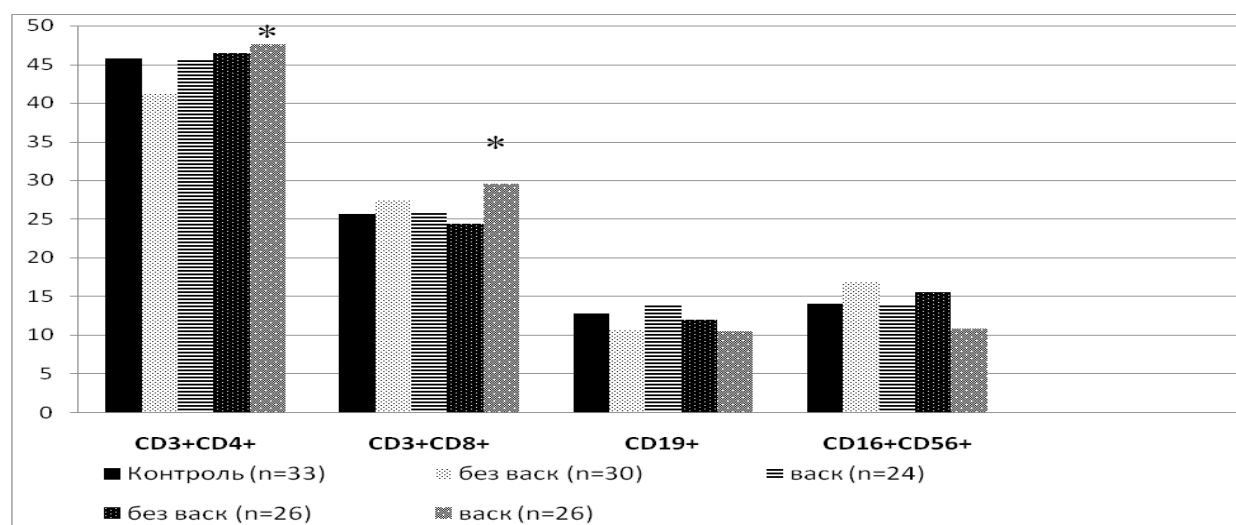


Рисунок 2 –Динамика клеточного звена иммунитета пациентов в зависимости от количества КП в анамнезе и наличия васкуляризации перед операцией (По оси ординат: относительное количество клеток: %). Примечание: *- $p < 0,05$

Достоверное повышение общего количества CD45+ лимфоцитов (главным образом за счет увеличения как относительного (%), так и абсолютного ($10^9/\text{л}$) числа Т-лимфоцитов (CD3+)) наблюдалось в крови пациентов, поступивших на повторную кератопластику с наличием васкуляризованного трансплантата.

В повышение общего количества Т-клеток в этой группе внесли обе основные популяции CD3+ лимфоцитов: наблюдается увеличение абсолютного количества в

циркуляции как Т-хелперов, так и Т-цитотоксических клеток. При этом в крови пациентов с первичной КП и васкуляризованными бельмами (I группа) также отмечалось достоверное повышение числа CD3+CD4+ лимфоцитов по сравнению с таковым у больных без васкуляризации бельма. Обнаруженное достоверное увеличение абсолютного количества Т-хелперов у больных с отягощенным клиническим анамнезом (наличием васкуляризации и повторными трансплантациями) согласуется с имеющимися данными отечественных и зарубежных работ в области общей трансплантологии, демонстрирующими подобную динамику Т-хелперов при пересадках солидных органов (Носик А.В., Коротков С.В., Смольникова В.В., и соавт. 2018).

Результаты исследования содержания цитокинов различного биологического действия в СК и СЖ пациентов с КПВР представлены на рис. 3-4.

В СК контрольной группы практически здоровых людей из 12 исследуемых медиаторов определялись 9, среди которых в 70–100% проб обнаруживались MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11, IP-10/CXCL10, SDF-1 α /CXCL12, PlGF-1, HGF/SF, а также VEGF-A в норме, как известно, выполняющие гомеостатические функции; при этом отсутствовали IL-18 и IL-2.

В СК пациентов с КПВР выявлялись 11 цитокинов; при этом с частотой 27 и 92% случаев в их пробах обнаруживались IL-18 и IL-2, непосредственно принимающих участие в иммунном ответе (рисунок 3).

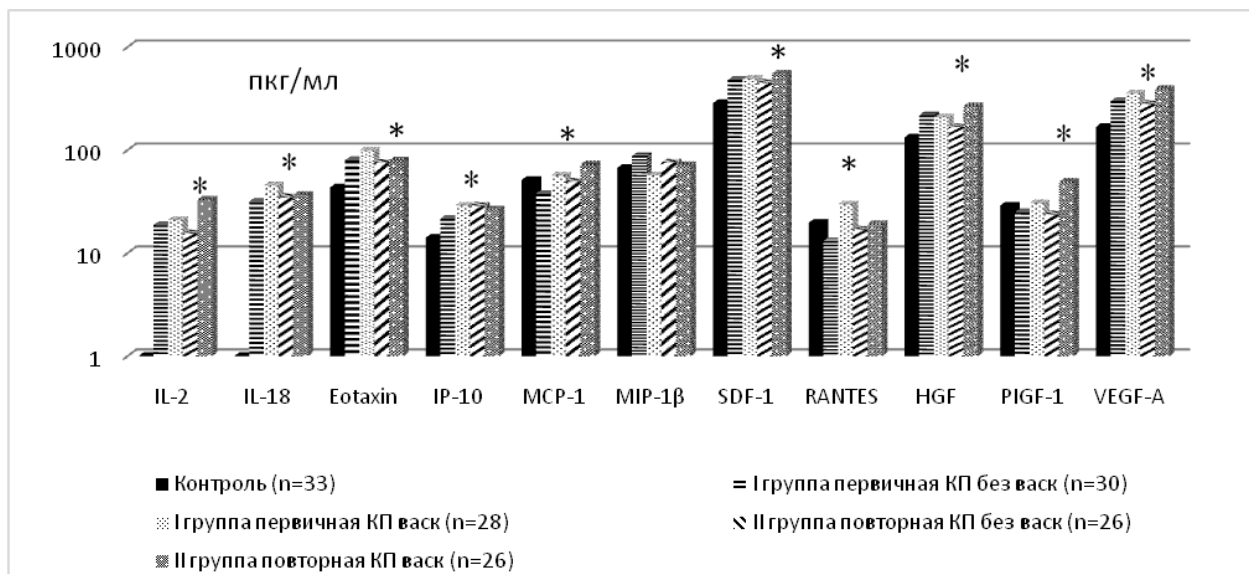


Рисунок 3 – Содержание провоспалительных и ангиогенных медиаторов в СК у больных с КПВР. Примечание: *- $p < 0,05$

Исключительно важную роль в реализации механизмов адаптивного иммунитета играет IL-2, продуцентами которого являются, как правило, Т-наивные лимфоциты и Т-хелперы первого порядка. Помимо участия IL-2 в дифференцировке и пролиферации Т-клеток, этот цитокин значительно повышает активность НК-клеток, а также усиливает секрецию интерферона – γ Т-лимфоцитами.

Обнаруженный в подавляющем количестве тест-проб пациентов с КПВР IL-2 (от 62 до 92%), а также повышение в крови этой группы абсолютного количества Т-лимфоцитов и их основных субпопуляций свидетельствуют о доминировании системных механизмов специфического иммунного ответа.

При исследовании системной продукции иммуномедиаторов в группах больных были выявлены достоверные изменения концентраций 8 цитокинов: повышение содержания в СК хемокинов: MCP-1/ CCL2, RANTES/ CCL5, Eotaxin/ CCL11, IP-10/ CXCL10, SDF-1 α /CXCL12, ангиогенных факторов VEGF-A и HGF/SF по сравнению с таковыми в контроле (рис 3). Анализ качественного и количественного состава цитокинов в зависимости от количества проведенных пересадок роговиц в анамнезе не показал значимых отличий между группами.

В группе первичной КПВР при наличии васкуляризации отмечалось статистически значимое изменение системной продукции 4 изучаемых цитокинов: повышение продукции IL-18, хемокинов RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11 при снижении концентрации MIP-1 β /CCL4 ($p < 0,05$). Васкуляризация трансплантата при повторных (от 2 и выше) пересадках роговицы (II группа) ассоциировалась с достоверным увеличением в СК IL-2 (обнаруженного в 92% тест-проб) – цитокина иммунного ответа, сосудистых факторов роста PIGF-1 и HGF/SF ($p < 0,05$).

Анализ содержания цитокинов в СЖ пациентов с повторной КПВР и васкуляризированным трансплантатом показал статистически значимое увеличение концентрации IP-10/CXCL10, MCP-1/CCL2, SDF-1 α /CXCL12 и VEGF-A (рис.4).

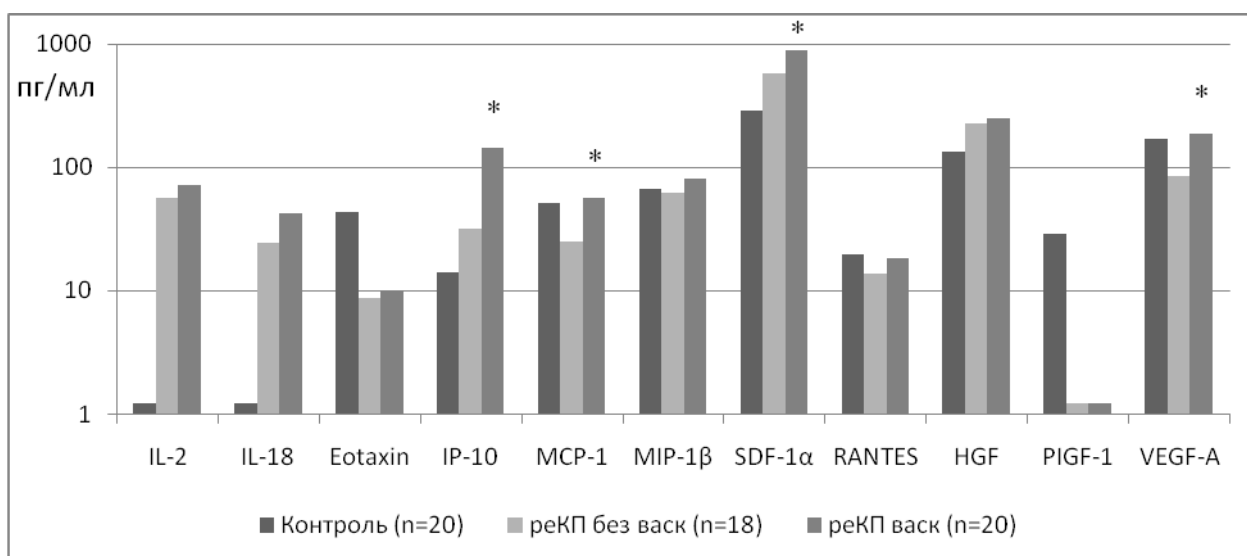


Рисунок 4 – Содержание провоспалительных и ангиогенных медиаторов в СЖ у больных с КПВР. Примечание: *- $p < 0,05$

Для более детального понимания патогенеза осложнений при трансплантации роговицы был проведен ретроспективный анализ системной продукции основных провоспалительных, противовоспалительных и ангиогенных медиаторов в зависимости от исходов КП (рис.5). С этой целью было выделено 3 подгруппы больных. В 1 подгруппу вошли 16 пациентов с абсолютно благополучным послеоперационным периодом, у 14 больных 2 подгруппы выявлены осложнения в виде персистирующей эрозии (ПЭР), переднего увеита (ПУ), отека кератотрансплантата (ОТ), которые купировались усилением глюкокортикоидной терапии с сохранением прозрачности трансплантата. Подгруппу 3 составили 10 пациентов с развившейся реакцией отторжения, помутнением трансплантата.

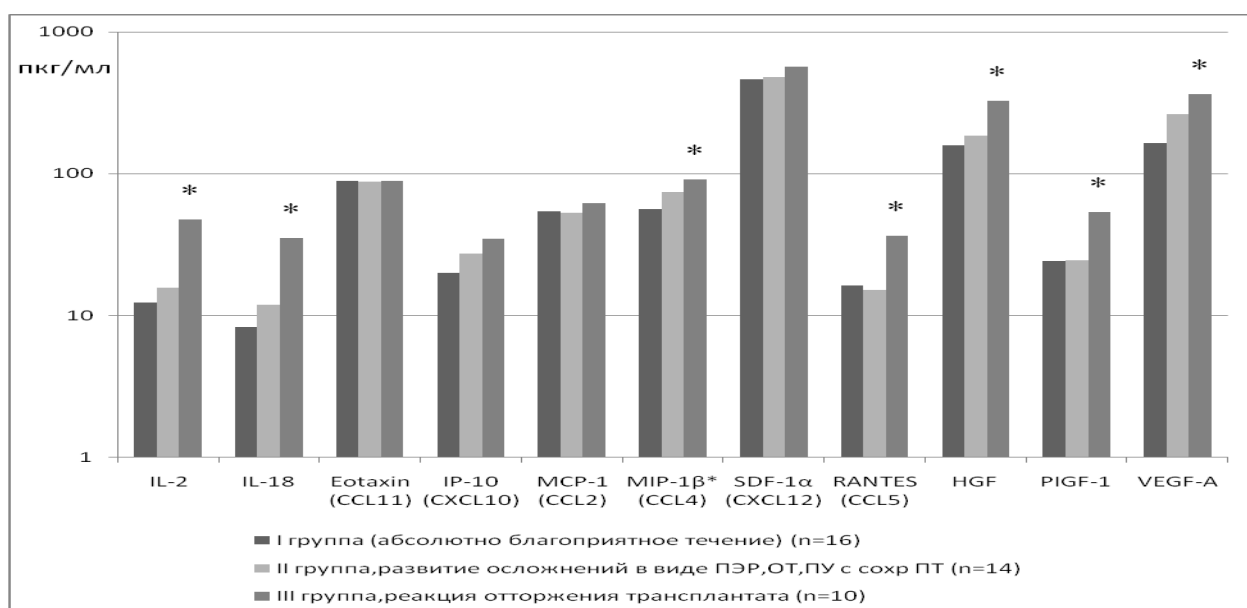


Рисунок 5 – Ретроспективный анализ содержания цитокинов в СК пациентов в зависимости от исходов КП. Примечание: *- $p < 0,05$

Результаты ретроспективного анализа показали, что в СК пациентов 3 подгруппы с развившейся в дальнейшем реакцией отторжения трансплантата исходно до операции были выявлены сдвиги 7 из 11 изученных цитокинов по сравнению с таковыми, определенными в крови пациентов с абсолютно благополучным течением постоперационного периода: на фоне усиления системной продукции IL-2, IL-18 отмечалось достоверное повышение концентрации хемокинов с ангиогенной активностью RANTES/CCL5, MIP-1 β /CCL4, а также сосудистых факторов роста VEGF-A, PlGF, HGF/SF ($p < 0,05$) (рис. 5).

Данные анализа динамики клеточного звена иммунитета больных КПВР с применением различных схем иммуносупрессивного лечения представлены на рис. 6-7. Сравнительный анализ результатов показал статистически значимое увеличение абсолютного количества лимфоцитов (CD45+) (за счет Т-лимфоцитов (CD3+) и их субпопуляций, а также NK- клеток) в крови пациентов, получавших стандартную глюкокортикоидную терапию.

В повышение общего количества Т-клеток в этой группе внесли обе основные популяции CD3+ лимфоцитов: наблюдается существенное увеличение абсолютного количества в циркуляции как Т-хелперов, так и Т-цитотоксических клеток.

Известно, что доминирование как популяции CD3+CD4+, так и CD3+CD8+лимфоцитов способствует развитию эффекторных механизмов трансплантационного иммунного ответа. Отторжение трансплантата осуществляется посредством аллореактивных Т-клеток, поэтому значительное достоверное повышение абсолютного количества Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов в крови пациентов с КПВР, получавших стандартную терапию, по сравнению с этими показателями до начала лечения и группы контроля, может свидетельствовать о недостаточной иммуносупрессии и не исключает риска неблагоприятного исхода кератопластики (Рис.6).

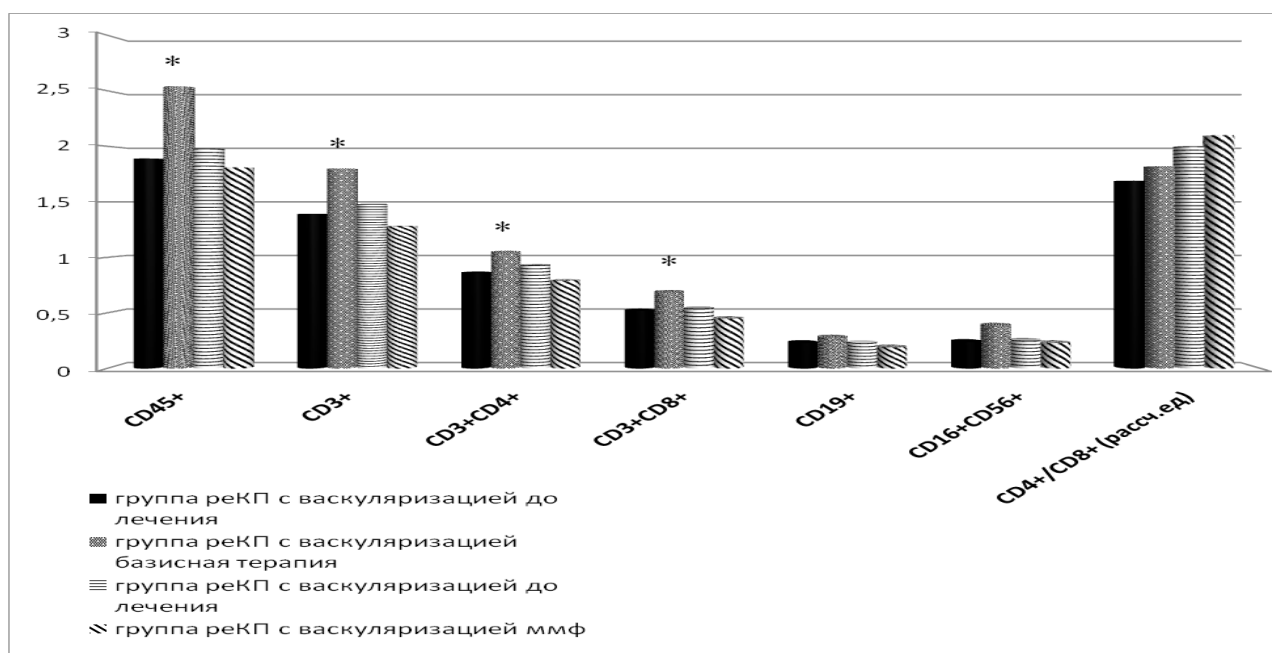


Рисунок 6 – Динамика клеточного звена иммунитета пациентов с КПВР в зависимости от проводимой схемы иммуносупрессивной терапии (По оси ординат: абсолютное количество клеток: $\times 10^9/\text{л}$). Примечание: * - $p < 0,05$

Напротив, в основной группе больных, принимавших ММФ, после лечения выявлено достоверное умеренное снижение абсолютного количества всех популяций иммунокомпетентных клеток в крови (по сравнению с таковым у пациентов после традиционной терапии), что отразилось на содержании общего числа циркулирующих лимфоцитов и свидетельствовало о иммуносупрессивном действии препарата. При этом анализ иммунологических параметров, проведенный после лечения основной группы КПВР (с ММФ), не показал статистически значимых различий с группой здоровых. Понижение общего числа лимфоцитов не повлияло на динамику показателей общего клинического анализа крови и общий соматический статус пациентов (рис.6-7).

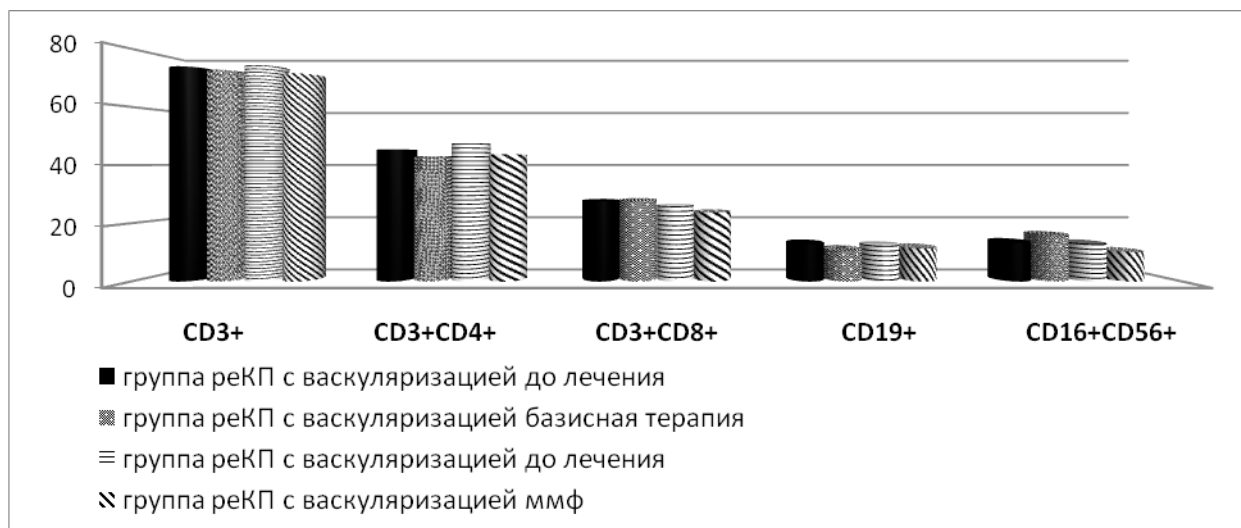


Рисунок 7 – Динамика клеточного звена иммунитета пациентов с КПВР в зависимости от проводимой схемы иммуносупрессивной терапии (По оси ординат: относительное количество клеток: %)

Динамика уровней цитокинов в СК и СЖ пациентов с реКП в условиях различных схем иммуносупрессивной терапии представлена на рис. 8-9.

На фоне приема ММФ отмечалось достоверное снижение системной продукции IL-2 по сравнению с группой стандартного лечения.

Учитывая, что IL-2 играет важную роль в реализации механизмов адаптивного иммунитета, толерантности, то его снижение в крови пациентов после КП на фоне терапии ММФ свидетельствует об иммуносупрессивном действии препарата, ослаблении иммунного ответа и может способствовать благоприятному приживлению трансплантата роговицы.

После стандартной глюкокортикоидной терапии в СК пациентов выявлено достоверное повышение IP-10/CXCL10 (ключевого участника в механизме развития реакции гиперчувствительности замедленного типа) по сравнению с нормой и, напротив, снижение его концентрации наблюдалось после применения ММФ.

В СК пациентов группы сравнения также было обнаружено достоверное повышение концентрации хемоаттрактанта MIP-1 β /CCL4, в то время как после терапии ММФ в крови пациентов отмечалось его значительное снижение, что позволяет думать об ослаблении хемотаксиса и снижении рекрутинга мононуклеарных клеток в очаг поражения.

Также после применения стандартного лечения в крови больных наблюдалось достоверное повышение уровня VEGF-A, что позволяет думать о недостаточной

активности глюкокортикоидной терапии в отношении процессов неоваскуляризации(рис.8).

В СК больных, получавших ММФ, напротив, наблюдалось достоверное снижение концентрации этого цитокина.

Аналогичная динамика отмечалась и для HGF/SF – фактора роста с доказанным проангиогенным действием.

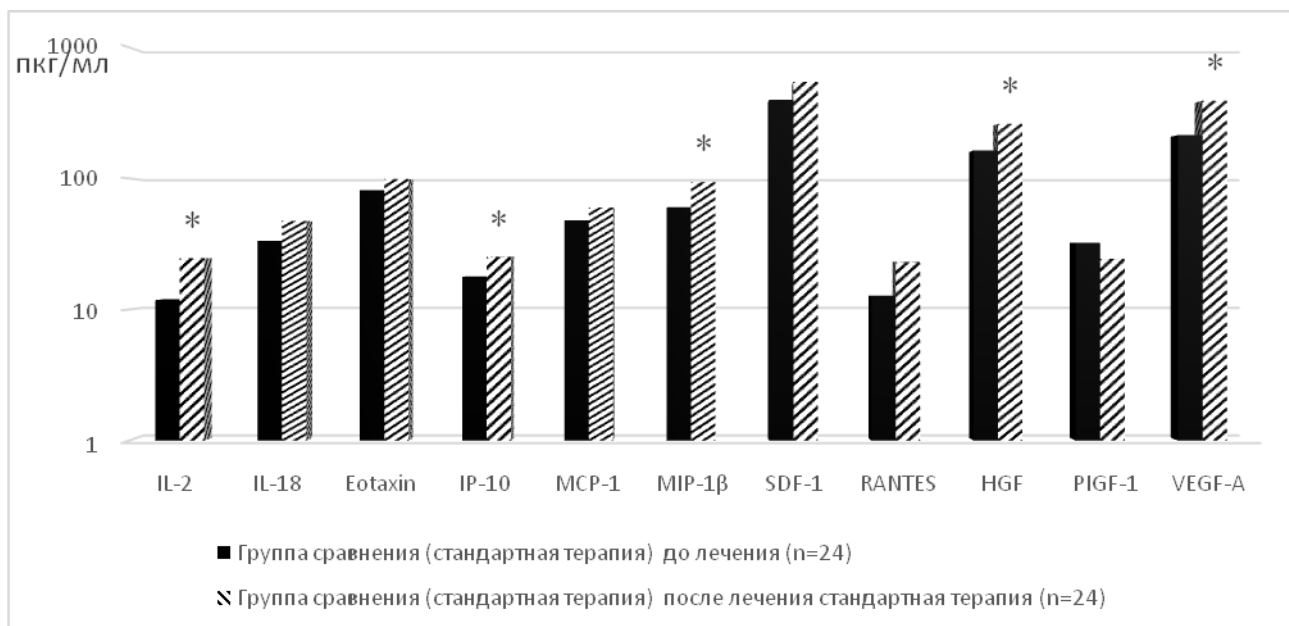


Рисунок 8 – Изменение уровней цитокинов в СК пациентов с реКП в условиях стандартной схемы глюкокортикоидной терапии. Примечание: *- $p < 0,05$

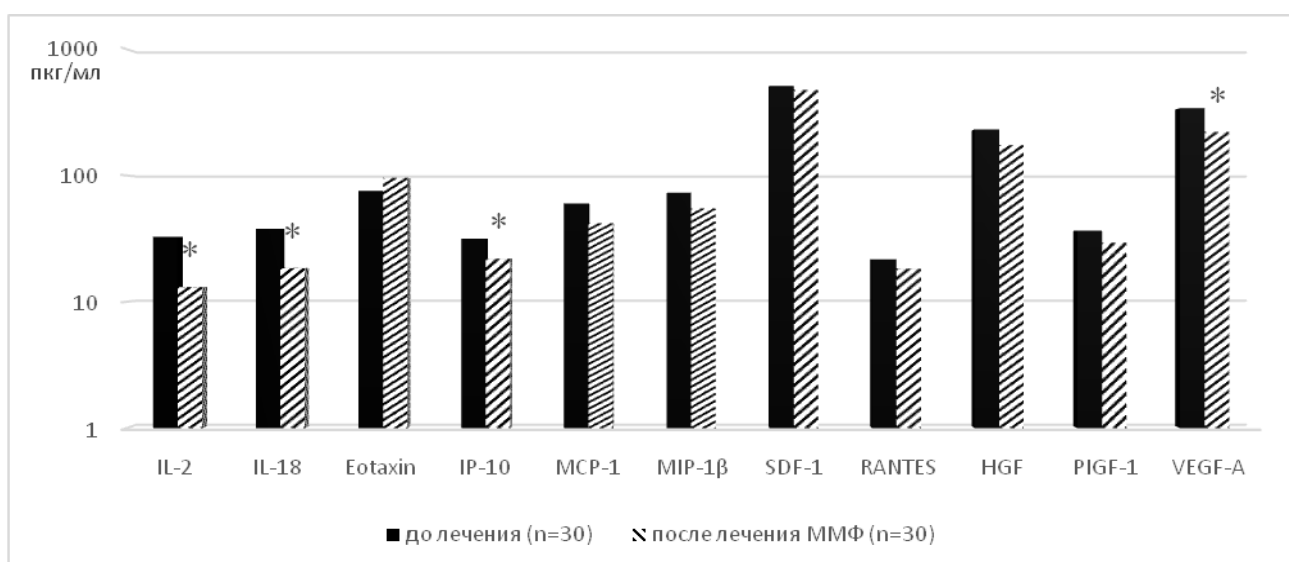


Рисунок 9 – Изменение уровней цитокинов в СК пациентов с реКП в условиях применения ММФ в комплексе со стандартной схемой глюкокортикоидной терапии. Примечание: *- $p < 0,05$

Таким образом, помимо иммуносупрессирующего эффекта, подтвержденного в ходе мониторинга снижением показателей иммунологического статуса и уровня IL-2 в крови больных группы высокого риска, получены доказательства, что препарат ММФ обладает противовоспалительным и антиангиогенным действием, о чем свидетельствовало ослабление системной продукции факторов воспаления, хемоаттрактантных и вазоактивных медиаторов IL-18, MIP-1 β /CCL4, IP-10/CXCL 10, VEGF-A, HGF/SF ($p<0,05$)(рис.9).

ВЫВОДЫ

1. Применение ММФ при КПВР способствовало ослаблению реактивной воспалительной реакции в раннем послеоперационном периоде, препятствуя развитию роговичного синдрома и нарастающего реактивного отека трансплантата, характерных при традиционном лечении, позволило повысить частоту прозрачного и полупрозрачного приживления донорской роговичной ткани на 28,8% по сравнению с группой пациентов КПВР, получавших стандартную глюкокортикоидную терапию, снизить риск отторжения и гибели кератотрансплантата.

2. Независимо от количества перенесенных КП в анамнезе, основные сдвиги в субпопуляционном составе лимфоцитов крови больных вызваны изменениями в Т-звене иммунитета: достоверным увеличением общего количества CD3+ лимфоцитов и Т-хелперов ($p<0,05$); процесс формирования васкуляризированного бельма ассоциируется с усилением системной продукции IL-18, увеличением концентрации хемокинов с ангиогенной активностью RANTES/CCL5 и Eotaxin/CCL11 в крови пациентов с КПВР ($p<0,05$); при васкуляризации трансплантата при повторной КП в СК и СЖ больных наблюдается однонаправленное повышение уровней IL-2 (цитокина адаптивного иммунного ответа), вазоактивного хемокина MCP-1/CCL2, сосудистых факторов роста VEGF-A и HGF/SF ($p<0,05$).

3. Высокие концентрации IL-2, IL-18, RANTES/CCL5, MIP- β /CCL4, VEGF-A HGF/SF ($p<0,05$), обнаруженные в СК пациентов перед операцией, свидетельствуют об активации патологического ангиогенеза на фоне воспаления и доминирования адаптивного иммунного ответа и являются факторами риска развития осложнений КПВР.

4. На фоне применения ММФ отмечалась положительная динамика к восстановлению нарушений в иммунологическом статусе пациентов группы КПВР: нормализация содержания общего пула лимфоцитов (CD45+), статистически значимые сдвиги параметров Т-звена иммунитета, вошедших в диапазон нормы: абсолютного количества Т-клеток, основных регуляторных субпопуляций CD3+CD4+ (Т-хелперов) и CD3+CD8+ (Т-цитотоксических лимфоцитов) ($p < 0,05$).

5. Помимо иммуносупрессирующего эффекта, подтвержденного в ходе мониторинга снижением уровня IL-2 в крови больных группы высокого риска, препарат ММФ обладает противовоспалительным и антиангиогенным действием, о чем свидетельствовало ослабление системной продукции факторов воспаления, хемоаттрактантных и вазоактивных медиаторов IL-18, IP-10/CXCL 10, MIP-1 β /CCL4, VEGF-A, HGF/SF ($p < 0,05$).

6. Впервые в отечественной практике разработана и научно обоснована схема до- и постоперационного ведения пациентов с КПВР, основанная на применении иммуносупрессивного препарата микофенолата мофетил, позволившая значительно улучшить функциональные результаты лечения. В группе пациентов, получавших ММФ, острота зрения от 0,02–0,5 была достигнута на 17% больше, чем в группе пациентов, получавших стандартную глюкокортикоидную терапию.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При кератопластике высокого риска показана стандартная схема глюкокортикоидной иммуносупрессивной терапии в комбинации с пероральным применением микофенолата мофетил 2 г в сутки в течение 6 месяцев. Дальнейший курс корректируется в зависимости от результатов клинико-иммунологического мониторинга.

2. Учитывая возможность активации ГВИ, рекомендован прием противовирусных препаратов (валацикловир, валтрекс) на весь период приема микофенолата мофетил.

3. При решении вопроса о назначении и продолжении приема микофенолата мофетила необходимо иммунологическое обследование больного перед операцией, через 1–2 месяца после кератопластики, далее каждые 3 месяца одновременно с контролем активности ГВИ.

4. Наиболее информативными критериями для выбора схемы иммуносупрессивной терапии при иммунологическом исследовании являются: уровни провоспалительных и ангиогенных цитокинов (IL-2, IL-18, RANTES/CCL5, MIP- β /CCL4, VEGF-ANGF/SF) в СК и СЖ пациентов, которые свидетельствуют об активации патологического ангиогенеза на фоне воспаления и доминирования адаптивного иммунного ответа и являются факторами риска развития осложнений КПВР.

5. При наличии диспепсических явлений (тошнота, рвота, боли в эпигастрии, изжога) рекомендовано кратковременное снижение дозировки на 1–3 дня. При повышении артериального давления компенсация достигалась усилением гипотензивной терапии без отмены микофенолата мофетил. При сохранении жалоб необходима консультация терапевта.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Нероев, В.В. Механизмы иммунорегуляции и трансплантационный иммунитет при пересадках роговицы / В.В. Нероев, Н.В. Балацкая, Е.В. Ченцова, **Х.М. Шамхалова** // **Медицинская иммунология**. – 2020. – Т. 4, № 1. – С. 61-76.

2. Нероев, В.В. Клиническое значение оценки субпопуляционного состава лимфоцитов крови пациентов с поражением роговицы при кератопластике высокого риска / В.В. Нероев, Н.В. Балацкая, Е.В. Ченцова, И.Г. Куликова, **Х.М. Шамхалова** // **Российский офтальмологический журнал**. – 2020. – Т. 13, № 3. – С. 30-35.

3. Шамхалова, Х.М. Оценка иммунного статуса у пациентов с инфекционным поражением роговицы при кератопластике высокого риска / **Х.М. Шамхалова**, Н.В. Балацкая, И.Г. Куликова // **Медицинская микология**. – 2020. – Т. 22, № 3. – С. 148.

4. Нероев, В.В. Особенности локальной и системной продукции провоспалительных, хемоаттрактантных медиаторов и ангиогенных факторов роста у пациентов с поствоспалительными васкуляризированными бельмами при кератопластике высокого риска / В.В. Нероев, Н.В. Балацкая, Е.В. Ченцова, И.Г. Куликова, **Х.М. Шамхалова** // **Имунопатология аллергология инфектология**. – 2020. № 3. – С. 14-32.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВГД – внутриглазное давление

ВПГ 1,2 – вирус простого герпеса 1 и 2 типов

ВПК – влага передней камеры

ВЭБ – вирус Эпштейна-Барр

ГВИ – герпесвирусная инфекция

ИОЛ – интраокулярная линза

КПВР – кератопластика высокого риска

КП – кератопластика

МКЛ – мягкая контактная линза

ММФ – микофенолата мофетил

ПВТ – противовирусная терапия

ПЭР – персистирующая эрозия роговицы

ПУ – передний увеит

СК – сыворотка крови

СЖ – слезная жидкость

СКП – сквозная кератопластика

ЦМВ – цитомегаловирус

ЦсА – циклоспорин А

IL-2 – интерлейкин-2

IL-18 – интерлейкин-18

PlGF-1 – плацентарный фактор роста

HGF/SF – фактор роста гепатоцитов или фактор рассеивания

IP-10/CXCL10 – интерферон гамма индуцированный белок 10

MCP-1/CCL2 – моноцитарный хемотаксический фактор-1

MIP-1 β /CCL4 – макрофагальный белок воспаления

SDF-1 α /CXCL12 – фактор стромальных клеток

VEGF-A – васкулоэндотелиальный фактор роста кровеносных сосудов

VEGF-D – васкулоэндотелиальный фактор роста лимфатических сосудов