

*на правах рукописи*

Рейн Денис Алексеевич

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ И МЕТОДЫ ПРОФИЛАКТИКИ  
ФИБРОТИЗАЦИИ ДАКРИОСТОМЫ.**

3.1.5. - Офтальмология (медицинские науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**

Диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2023 год

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова».

**Научный руководитель:** доктор медицинских наук **Атькова Евгения Львовна**

**Официальные оппоненты:**

**Гришина Елена Евгеньевна**, доктор медицинских наук, профессор, ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф.Владимирского», главный научный сотрудник отделения офтальмологии.

**Филатова Ирина Анатольевна**, доктор медицинских наук, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, начальник отдела пластической хирургии и глазного протезирования.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ

Защита состоится 9 октября 2023 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.174.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней им. М.М. Краснова» по адресу: 119021, Москва, ул. Россолимо, д.11, корп. А, Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте [www.niigb.ru](http://www.niigb.ru) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт глазных болезней им. М.М. Краснова».

Автореферат диссертации разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

Иванов М.Н.

## Общая характеристика работы

### Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Дакриоцисториностомия (ДЦР), выполненная наружным или эндоназальным доступом, является в настоящее время основным методом лечения облитерации вертикального отдела слезоотводящих путей (СОП). Тем не менее, рецидивирование заболевания после ДЦР наблюдают в 6-35% случаев [S. Leong, 2010; В.А. Ободов, 2011]. Одна из основных причин неудачного исхода ДЦР – заращение дакриостомы вследствие избыточного рубцевания после хирургического лечения.

На клеточном уровне основными агентами, отвечающими за формирование рубца, являются миофибробласты – клетки, сочетающие в себе особенности как фибробластов, так и гладкомышечных клеток [G. Gabbiani и соавт., 1971; В. Hinz и соавт., 2012]. Миофибробласты отличаются от фибробластов, которые являются их основной клеткой-предшественником, экспрессией актина гладких мышц  $\alpha$  ( $\alpha$  smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA). Активность этих клеток, продолжающаяся после завершения нормального процесса заживления, считается основной причиной избыточного рубцевания в организме [G.G. Gauglitz и соавт., 2011; J.S. Verhoekx и соавт., 2013; J. Davis и J.D. Molkenin, 2014].

Процесс трансформации миофибробластов из клеток-предшественников, их жизнедеятельности и апоптоза регулируется большим количеством белковых регуляторов-цитокинов. Одними из основных цитокинов, вовлеченных в процесс фиброза, являются белки суперсемейства TGF- $\beta$  (transforming growth factor, трансформирующий фактор роста), их кофактор фактор роста соединительной ткани (connective tissue growth factor, CTGF) и антагонист основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor, bFGF, FGF-2) [A. Desmoulière и соавт., 1993; Y. Akasaka и соавт., 2007; M.C. Cushing и соавт., 2008; D.R. Brigstock, 2010; Q. Wang и соавт., 2011; V. Kumar и соавт., 2015].

Таким образом, ввиду высокой значимости избыточного рубцевания в исходе ДЦР, поиск и анализ факторов, предрасполагающих к фиброзу зарращению дакриостомы, является актуальной задачей в современной дакриологии.

В настоящее время одним из наиболее распространенных методов медикаментозной профилактики рецидива после ДЦР является использование Митомицина С. Однако, не существует единой методики и дозировки применения данного препарата, а результативность его значительно варьирует в исследованиях различных авторов [G. Zilelioğlu и соавт., 1998; В.Г. Белоглазов и соавт., 1999; Т. Prasannaraj и соавт., 2010; Т. Aruhan и соавт., 2011; М. Qadir и соавт., 2014; S. Kamal с соавт., 2014; А.О. Роот и соавт., 2017]. Изучение других методов предотвращения рубцевания с использованием химиотерапевтических препаратов после ДЦР проведено не было. Тем не менее, ряд авторов, исследовавших рубцевание при других видах хирургических вмешательств, указывают на результативность ингибирования нескольких профибротических факторов для предотвращения фиброза [N.C. Henderson и соавт., 2013; С. Yu-Wai-Man и соавт., 2014; Р.Т. Khaw и соавт., 2020; D. Peng и соавт., 2022].

Следовательно, поиск и испытание новых перспективных препаратов неспецифического антифибротического действия при ДЦР остается актуальным. К ним можно отнести низкомолекулярный препарат пирфенидон, продемонстрировавший высокую эффективность в терапии идиопатического фиброза легких (К. Meuer и соавт., 2017). Несмотря на то, что механизм действия препарата остается не до конца изученным, известно, что он оказывает ингибирующее действие на ряд цитокинов и факторов роста, вовлеченных в процесс фиброза [Iyer SN и соавт., 1999; J. Wang и соавт., 2013]. Таким образом, определение эффективности препарата пирфенидон в предотвращении избыточного рубцевания в области дакриостомы, а также

разработка эффективного и безопасного способа его применения и дозирования, является актуальным.

### **Цель исследования**

Изучение патогенетических факторов фибротизации дакриостомы и методов ее профилактики.

### **Задачи исследования:**

1. Определить концентрацию цитокинов, участвующих в процессе фиброза, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, CTGF, FGF-2 в образцах слизистой оболочки полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей и изучить их влияние на уровень фибротизации дакриостомы после эндоскопической эндоназальной дакриоцистиностомии.
2. Провести гистологическое исследование образцов тканей полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей и определить интенсивность миофибробластной инфильтрации.
3. Исследовать связь выраженности гистологических изменений в слизистой оболочке полости носа, характерных для хронического воспаления, с неблагоприятным исходом эндоскопической эндоназальной дакриоцистиностомии у пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей.
4. Изучить антифибротическую активность препарата пирфенидон в зависимости от его концентрации на клеточной культуре фибробластов слизистой оболочки полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей *in vitro*.
5. Изучить антифибротическую активность препарата пирфенидон в эффективной концентрации, определенной в исследовании *in vitro*,

на экспериментальной модели эндоназальной эндоскопической дакриоцистиностомии у кроликов *in vivo*.

**Научная новизна:**

1. Определена концентрация цитокинов TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, FGF-2, CTGF, принимающих участие в процессе фиброза, в образцах слизистой оболочки полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей.
2. Впервые изучена корреляция концентрации цитокинов TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, FGF-2, CTGF в слизистой оболочке полости носа и фибротизации дакриостомы после эндоназальной эндоскопической дакриоцистиностомии у пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей.
3. Впервые в результате гистологического исследования образцов тканей полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей определена интенсивность миофибробластной инфильтрации и коэффициент хронического воспаления и их влияние на процесс фибротизации дакриостомы после эндоназальной эндоскопической дакриоцистиностомии.
4. Определена эффективная доза препарата Пирфенидон в ингибировании пролиферации фибробластов на основании исследования на клеточной культуре тканей полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей *in vitro*.
5. Доказана эффективность препарата Пирфенидон в предотвращении избыточного рубцевания дакриостомы в экспериментальной модели эндоназальной эндоскопической дакриоцистиностомии у кроликов *in vivo* в концентрации, определенной в исследовании *in vitro*.

## **Теоретическая и практическая значимость:**

1. Доказанное повышение концентрации цитокина CTGF в образцах слизистой оболочки полости носа пациентов с заращением дакриостомы после эндоназальной эндоскопической дакриоцистиностомии дает основание считать его прогностическим фактором фибротизации дакриостомы у пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей после данного хирургического вмешательства.
2. Данные, полученные при гистологическом исследовании прижизненных биоптатов тканей слизистой оболочки полости носа дают объективное подтверждение наличия хронического воспаления и его влияния на процесс избыточного рубцевания в области дакриостомы у пациентов после эндоназальной эндоскопической дакриоцистиностомии.
3. Выявленные в исследовании факторы риска избыточного рубцевания в области дакриостомы после эндоскопической эндоназальной дакриоцистиностомии дают основание для разработки методов специфической профилактики ее фибротизации.
4. Проведенное исследование на клеточной культуре тканей полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей *in vitro* позволило определить наименее токсичную и эффективную дозу антифибротического препарата Пирфенидон.
5. Доказанная высокая эффективность препарата Пирфенидон в предотвращении рубцового заращения дакриостомы в сочетании с отсутствием побочных явлений в эксперименте на лабораторных животных *in vivo* в дозах, определенных в исследовании *in vitro*, указывает на возможность дальнейшего изучения данного препарата в условиях клиники.

## **Методология и методы диссертационного исследования.**

Методологической основой диссертационной работы явилось применение комплекса методов научного познания. Диссертационное исследование выполнено в соответствии с принципами научного исследования. Работа реализована в дизайне ретроспективного когортного исследования, а также в дизайне проспективного экспериментального открытого одноцентрового сравнительного исследования с использованием клинических, инструментальных, лабораторных, аналитических и статистических методов.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Высокая концентрация цитокина CTGF в образцах слизистой оболочки полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей свидетельствует о более высоком риске избыточного рубцевания дакриостомы после дакриоцисториностомии у данных пациентов.
2. Наличие выраженных признаков хронического воспаления в образцах слизистой оболочки полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей, выявленное при гистологическом исследовании, является фактором риска неблагоприятного исхода дакриоцисториностомии в результате рубцового заращения дакриостомы.
3. Антифибротический препарат Пирфенидон в наименее токсичной дозе, определенной в исследовании *in vitro*, является препаратом, обладающим выраженным ингибирующим действием на пролиферацию фибробластов слизистой оболочки полости носа.
4. Пирфенидон, в дозе, определенной в эксперименте *in vitro*, является эффективным и безопасным антифибротическим препаратом по данным экспериментального исследования модели дакриоцисториностомии на лабораторных животных *in vivo* и дает



основание для продолжения его исследования у пациентов с риском избыточного рубцевания дакриостомы после дакриоцистиностомии.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования.**

Степень достоверности результатов проведенных исследований определяется достаточным количеством клинических наблюдений и стандартизацией условий исследования, а также использованием современных высокоточных объективных методов исследования и подтверждена в процессе статистической обработки материала. Сформулированные в диссертации научные положения, выводы и практические рекомендации аргументированы и логически вытекают из системного анализа результатов клинических и инструментальных исследований.

Результаты диссертационной работы освещены и доложены на научной конференции офтальмологов с международным участием «Невские горизонты 2018» (Санкт-Петербург, Россия, 27-28 апреля 2018 г.), на XIII Всероссийской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы офтальмологии» (Москва, Россия, 20 июня 2018 г.), на междисциплинарном конгрессе «Проблемы диагностики и лечения заболеваний слезной системы» (Казань, Россия, 27 – 28 сентября 2018 г.).

### **Личный вклад автора.**

Автором определены цель и задачи исследования, проведен ретроспективный анализ историй болезни, проведено обследование и лечение пациентов, а также осуществлен послеоперационный мониторинг результатов лечения. Проанализированы и обобщены результаты исследования, проведена статистическая обработка полученных данных. Автором осуществлена подготовка публикаций и докладов по теме настоящей работы.

### **Внедрение результатов работы.**

Результаты настоящего исследования внедрены в клиническую практику ФГБНУ «НИИ глазных болезней».

### **Публикации.**

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 6 работ в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования РФ для публикации основных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, из них 6 входят в базу цитирования Scopus.

### **Структура и объем диссертационной работы.**

Диссертация изложена на 128 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материала и методов исследования, заключения, выводов и указателя литературы. Работа иллюстрирована 27 рисунками и 7 таблицами. Библиографический указатель содержит 238 источник (13 отечественных и 225 зарубежных).

### **Содержание работы**

#### **Материал и методы исследования**

#### **Общая характеристика материала**

В настоящее исследование были включены 83 пациента (83 случая) с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей, подтвержденной данными стандартного офтальмологического обследования, а также определением степени выраженности слезотечения по шкале Мунка, проб Ширмера и Норна, лакримальной менискометрии при помощи оптической когерентной томографии (ОКТ), «цветных» канальцевой и носовой проб, промывания СОП, мультиспиральной компьютерной томографии СОП с их контрастированием.

Из исследования были исключены пациенты с посттравматическими изменениями СОП, новообразованиями СОП, заболеваниями полости носа и околоносовых пазух, требующими лечения. В исследование не вошли пациенты с облитерирующей формой дакриоцистита, пациенты, ранее перенесшие хирургическое лечение патологии СОП, а также пациенты,

которым на завершающем этапе операции СОП были интубированы лакримальным имплантатом.

Всем пациентам была выполнена эндоназальная эндоскопическая ДЦР (ЭЭДЦР) по методике Wormald одним хирургом на базе ФГБНУ «НИИ Глазных болезней». Во время выполнения операции из области среднего носового хода были получены полнослойные тканевые биоптаты слизистой оболочки, которые затем делили на две части: первую – помещали в стерильный фосфатный буферный раствор для передачи на иммуноферментный анализ с целью выявления концентраций цитокинов; вторую часть фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина в стерильных одноразовых емкостях для передачи на гистологическое исследование. После взятия материала операцию завершали стандартным образом.

Срок послеоперационного наблюдения за пациентами составил шесть месяцев. Контрольные осмотры осуществляли в срок 7, 14, 28 дней, 3 и 6 месяцев после оперативного вмешательства. По данным выраженности слезотечения по шкале Munk, изменения глубины слезного мениска, «цветных проб», промывания СОП, наличия или отсутствия отделяемого из СОП, а также эндоскопической картины состояния дакриостомы результат хирургического лечения определяли как «выздоровление», «улучшение», «рецидив». «Выздоровление» или «улучшение» считали положительным исход операции, «рецидив» – отрицательным.

На основании исхода оперативного вмешательства пациенты были разделены на 2 группы:

- Группа 1 (10 пациентов, 10 случаев) – с рецидивом.
- Группа 2 (73 пациента, 73 случая) – с положительным исходом оперативного вмешательства.

#### **Методы изучения образцов слизистой оболочки полости носа**

Образцы, помещенные во флаконы с стерильным фосфатным буферным раствором использовали для определения концентрации цитокинов TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, CTGF, FGF-2 в слизистой оболочке полости носа. После гомогенизации и центрифугирования надосадочную часть отбирали и делили на 6 частей, одну из которых использовали для определения общего белка реакцией с пирогаллоловым красным, остальные замораживали при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  до исследования.

Перед исследованием образцы размораживали при комнатной температуре. Содержание цитокинов TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, CTGF, FGF-2 в образцах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием готовых наборов производства Cusabio Life Sciences (КНР). Результаты регистрировали на планшетном спектрофотометре Яхонт 01 (Россия). Каждый образец исследовали в дуплетах, в качестве итогового показателя результата концентрации исследуемого вещества использовали среднее арифметическое рассчитанной концентрации в двух лунках. Полученные результаты нормализовали по содержанию общего белка в гомогенизате ткани.

Проводили сравнительный анализ результатов определения концентрации цитокинов TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, CTGF, FGF-2 в образцах тканей полости носа, полученных во время хирургического вмешательства и исходов оперативного лечения пациентов.

Вторую половину материала, полученную при выполнении ЭЭДЦР 83 включенным в исследование пациентам, передавали на гистологическое исследование. После фиксации в 10% растворе нейтрального формалина образцы высушивали и парафинизировали, а затем изготавливали срезы толщиной 4 мкм.

Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином в автомате для окрашивания срезов HMS 70 (Thermo Fisher Scientific, Германия).

Для выявления миофибробластной инфильтрации было использовано коммерческое моноклональное антитело Actin, Smooth Muscle (клон 1A4) производства Cell Marque (США) в разведении 1:400. На последнем этапе препараты докрашивали гематоксилином Майера (Dako Denmark A/S, Дания) и заключали в синтетическую смолу Shandon-Mount (Thermo Fisher Scientific, Германия). Срезы, окрашенные гематоксилином-эозином и иммуногистохимическим методом по  $\alpha$ -SMA, анализировали на микроскопе AxioImager Z1 (Carl Zeiss AG, Германия).

При морфологическом анализе оценивали явления хронического воспаления в ткани: состояние поверхностного эпителия слизистой оболочки полости носа, наличие, характер и состав инфильтратов собственной пластинки слизистой оболочки, наличие и степень выраженности субэпителиального фиброза, наличие и выраженность плоскоклеточной (сквамозной) метаплазии поверхностного эпителия. Кроме того, для количественной оценки интенсивности хронического воспаления использовали коэффициент хронического воспаления (КХВ), определяемый по методике О. Озер и соавт. (2011) на основании выраженности воспалительных изменений, фибротических изменений и явлений капиллярной пролиферации. В соответствии с этим, КХВ каждого образца составлял от 3 до 9 в зависимости от выраженности каждого из перечисленных явлений.

Определение количественной характеристики миофибробластной инфильтрации осуществляли на основании подсчета среднего количества  $\alpha$ -SMA-позитивных клеточных элементов на 1 мм<sup>2</sup> образца. Для увеличения специфичности результатов подсчет проводили на отдалении от крупных сосудистых элементов, а также использовали усредненные показатели подсчета в нескольких полях зрения.

**Оценка эффективности и безопасности антифибротического препарата пирфенидон на основании исследования *in vitro***

Для получения культуры клеток фибробластов слизистой оболочки полости носа образцы ткани были взяты у трех случайно выбранных пациентов, которым выполняли ЭЭДЦР по методике, описанной выше.

Предварительно измельченные фрагменты образцов помещали в чашки Петри (Corning Inc., США) с площадью ростовой поверхности 10 см<sup>2</sup> и культивировали в ростовой среде Gibco DMEM (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением антибиотиков (пенициллин 100 ед/мл; стрептомицин 100 мкг/мл, Thermo Fisher Scientific, США), 2 мМ GlutaMax (Thermo Fisher Scientific, США) и 10% фетальной сыворотки теленка (HyClone, США) во влажной атмосфере при температуре 37° С и 5% содержанием СО<sub>2</sub>. На 5-е сутки культивирования клетки начинали мигрировать из фрагментов ткани на пластик. Спустя 14 суток культивирования эксплантаты удаляли, диссоциировали клетки при помощи 0,05% раствора Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific, США) и осуществляли пассаж с коэффициентом рассева 1:4. Для подтверждения полученной клеточной культуры использовали окрашивание на специфические маркеры фибробластов – CD90 и виментин.

Для получения отдельных концентраций препарата пирфенидон ((5-метил-1-фенил-2-(1H)-пиридон, P2116-10MG, Sigma-Aldrich Co. LLC) его порошковую форму растворяли в ростовой среде Gibco DMEM.

Для определения токсичности препарата использовали MTS-тест, для которого использовали набор CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent (Promega Corporation, США). Через 24 ч культивирования в лунки вносили исследуемый препарат в концентрациях 0,01; 0,1; 0,2; 0,3 и 0,5 мг/мл. После 24 и 48 ч инкубации с препаратом в каждую лунку к 100 мкл ростовой среды добавляли 20 мкл MTS-реагента. В качестве положительного контроля были приняты лунки с клетками без добавления препарата. Бланком служили лунки, не содержащие клеток и заполненные ростовой средой. Тест был поставлен в 3 повторах. Количество жизнеспособных клеток рассчитывали по формуле:

$$\text{Количество живых клеток} = (A_0 - A_б) / (A_к - A_б) \times 100\%,$$

где  $A_0$  — среднее значение оптической плотности в образце,  $A_б$  — в бланке,  $A_к$  — в контроле.

На основании полученных значений проводили построение графика зависимости количества живых клеток от концентрации препарата.

Для оценки ингибирующего действия препарата пирфенидон на пролиферацию фибробластов слизистой оболочки полости носа использовали модель раны монослоя. Для нанесения раны монослоя использовали наконечник для дозатора. Ширину раны монослоя фотофиксировали, затем ростовую среду заменяли на содержащую препарат в концентрациях 0,15 и 0,3 мг/мл. В контрольную лунку препарат не вносили. Степень восстановления монослоя фиксировали через 24 ч инкубации клеток с препаратом.

### **Оценка эффективности и безопасности антифибротического препарата пирфенидон на экспериментальной модели дакриоцисториностомии**

Изучение препарата пирфенидон было проведено на экспериментальной модели ЭЭДЦР у кроликов на базе Центрального вивария ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). В ходе исследования было выполнено 18 экспериментальных ДЦР 18 кроликам породы шиншилла весом от 2 до 2,5 кг.

Для использования в экспериментальной модели ДЦР препарат пирфенидон разводили в дистиллированной воде, нагревая получившийся раствор на водяной бане до 60°C в течении 30 мин. В эксперименте были использованы концентрации пирфенидона 0,15 мг/мл и 0,3 мг/мл.

После премедикации и адекватного обезболивания всем животным выполняли ДЦР справа по следующей методике: слезную точку и слезный каналец расширяли коническими зондами Зихеля возрастающего диаметра,

далее перфорировали костную стенку коническим зондом наибольшего диаметра. Контроль положения зонда осуществляли с помощью эндоскопа Karl Storz (Германия) диаметром 2,7 мм, с углом обзор 30°. Вводя специально разработанный трепан вдоль зонда, формировали костное «окно». Костные и мягкотканые фрагменты удаляли щипцами эндоназально под контролем эндоскопа. По краям сформированной дакриостомы в 5 точек специальной иглой вводили по 0,2 мл в каждую точку (суммарно 1 мл) раствор пирфенидона. Животным контрольной группы препарат не вводили.

Экспериментальные животные были разделены на 3 группы в зависимости от введенной дозы пирфенидона:

- 1-ая группа – 6 животным (6 СОП) пирфенидон вводили в концентрации 0,15 мг/мл
- 2-ая группа – 6 животным (6 СОП) пирфенидон вводили в концентрации 0,3 мг/мл
- 3-я группа (контрольная) – 6 животным (6 СОП) препарат не вводили.

Результат хирургического лечения считали отрицательным, если СОП были непроходимы при их промывании при контрольном осмотре на 1, 3, 7, 14, 28 день после хирургического вмешательства или просвет дакриостомы был закрыт рубцовой тканью при осмотре материала после вывода животного из эксперимента.

Животных выводили из эксперимента на 7 (6 кроликов), 14 (6 кроликов) и 28 день (6 кроликов) после хирургического вмешательства. Материал для гистологического исследования получали из области дакриостомы, фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и передавали для гистологического исследования. Подготовку срезов для гистологического исследования осуществляли способом, описанным выше.

Среднее количество  $\alpha$ -SMA-позитивных клеток на 1 мм<sup>2</sup> определяли,



подсчитывая их в нескольких полях зрения и вычисляя среднее значение. Методика подсчета не отличалась от описанной выше.

### **Методы статистического анализа данных**

Статистический анализ полученных данных выполнен в пакете программ IBM SPSS Statistics v23 (IBM Corporation, США). Для определения характера распределения в выборке использовали критерий Колмогорова-Смирнова и Лилиефорса для нормальности. Распределение считали отличным от нормального при  $p < 0,05$ , в противном случае распределение считали нормальным. Для определения корреляционных зависимостей между значениями выборок использовали критерии хи-квадрат Пирсона, ранговой корреляции Спирмена, U-тест Манна-Уитни. Статистические гипотезы принимали как значимые при  $p < 0,05$ . Количественные данные представлены в виде средних значений (M)  $\pm$  стандартное отклонение (SD).

### **Результаты собственных исследований**

#### **Результаты исследования образцов слизистой оболочки полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей**

Из 83 случаев ЭЭДЦР положительный исход наблюдали в 73 случаях (87,9%), из которых 59 (71,1%) были классифицированы как "выздоровление" и 14 (16,9%) – как "улучшение". "Рецидив" наблюдали у 10 пациентов (12,1%). Причиной для всех случаев неблагоприятного исхода хирургического лечения послужило рубцовое заращение дакриостомы.

На основании исследования методом ELISA были получены данные о концентрации цитокинов TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, CTGF, FGF-2 в образцах тканей полости носа, представленные в **табл. 1**.

**Таблица 1. Средние значения исследованных цитокинов в группах пациентов.**

	Кол-во случаев	FGF-2 (пг/мл)	CTGF (пг/мл)	TGF-β1 (пг/мл)	TGF-β2 (пг/мл)	TGF-β3 (пг/мл)
<b>Группа 1</b>	10	1,58±2,87	46,49±37,95	4093,21±1031,13	40,36±36,41	108,54±80,58
<b>Группа 2</b>	73	1,71±3,03	22,12±26,41	4433,36±2357,36	45,17±26,54	147,25±155,72
<b>P*</b>		0,901	0,015	0,661	0,647	0,456

Примечание: \* при вычислении коэффициента ранговой корреляции Спирмена

У 9 из 10 пациентов группы 1 концентрация CTGF в образцах слизистой оболочки полости носа превышала средние значения концентрации в группе 2. Корреляция между уровнем CTGF и рубцовым заращением соустья после ЭЭДЦР была признана статистически достоверной ( $p < 0,05$ ).

При гистологическом исследовании во всех образцах были выявлены явления длительно протекающего хронического воспаления. Среднее количество α-SMA-позитивных клеточных элементов во всех образцах составило 4447±1481. Корреляционная зависимость умеренной силы (0,392) между количеством α-SMA-позитивных клеточных элементов и возникновением рецидива дакриоцистита была статистически достоверной ( $p < 0,05$ ). Количественная характеристика миофибробластной инфильтрации в образцах слизистой оболочки полости носа в группе 1 и 2 представлена в **табл. 2.**

**Таблица 2. Количественная характеристика миофибробластной инфильтрации в образцах слизистой оболочки полости носа**

Группа пациентов	N	Количество $\alpha$ -SMA-позитивных клеточных элементов	Стандартное отклонение	p*
1	10	6026,38	1944,29	0,02
2	73	4120,39	1160,08	

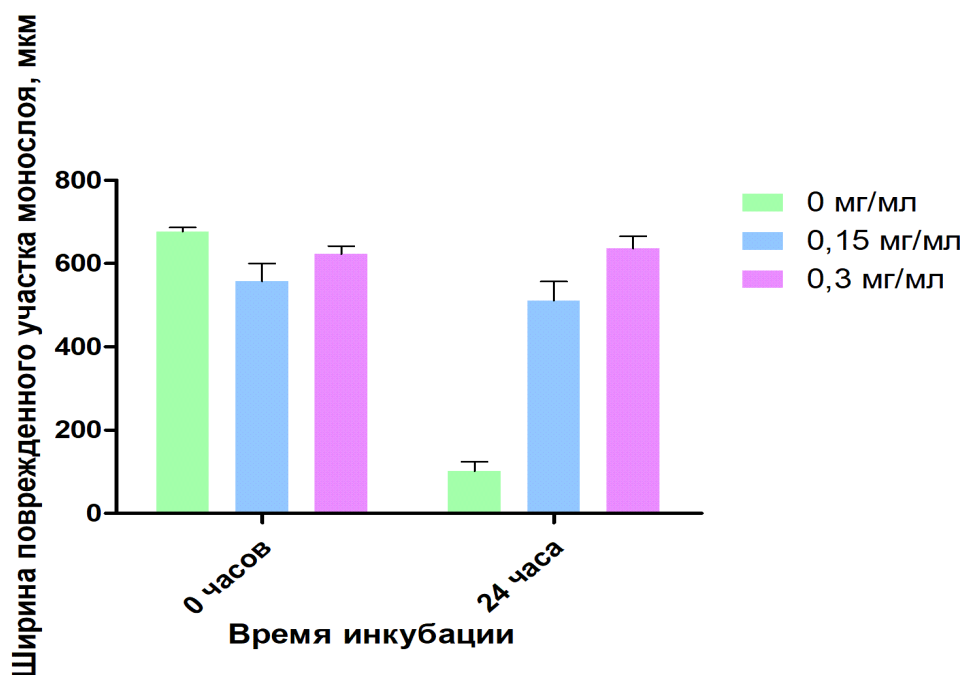
\* - согласно коэффициенту ранговой корреляции Спирмена

Среднее значение КХВ во всех образцах составило 6,17, в образцах, полученных у пациентов группы 1 – 8,33, в образцах, полученных у пациентов группы 2 – 5,72. Кроме того, для образцов слизистой оболочки полости носа, полученных у пациентов группы 2, была характерна меньшая, чем у пациентов группы 1, выраженность воспалительной инфильтрации и сквамозной метаплазии поверхностного эпителия.

### **Результаты исследования эффективности и безопасности препарата пирфенидон**

При определении доли жизнеспособных клеток в культуре клеток фибробластов слизистой оболочки полости носа после инкубации с добавлением препарата перфенидон различной концентрациями: 0,01 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,3 мг/мл и 0,5 мг/мл было выявлено, что доля жизнеспособных клеток по истечении 24 часов инкубации при указанных концентрациях препарата составила 100%, 97,1%, 92,3%, 85,7% и 76,4% соответственно; после 48 часов инкубации – 100%, 86,1%, 86,2%, 88,4% и 81,1% соответственно. Полученные результаты позволили сделать заключение, что исследуемый препарат обладает низкой степенью цитотоксичности. При исследовании ингибирующего эффекта пирфенидона на пролиферацию фибробластов в модели раны монослоя были

получены следующие результаты: в контрольной группе после 24 часов инкубации восстановление клеточного монослоя произошло практически полностью (на  $84,88 \pm 4,80\%$ ); в группе с добавлением препарата в концентрации 0,15 мг/мл рост монослоя составил  $8,26 \pm 6,09\%$ ; в группе с добавлением препарата в концентрации 0,3 мг/мл препарата было отмечено незначительное увеличение, а не уменьшение ширины поврежденного участка монослоя, которое составило  $2,10 \pm 2,69\%$ . Изменение ширины поврежденного участка в каждой из групп статистически достоверно отличалось в сравнении с другими группами ( $p < 0,05$ ). Сравнительные данные о ширине поврежденного участка через 24 часа культивирования с различными концентрациями препарата представлены на **рис. 1**.



**Рис. 1.** Зависимость ширины поврежденного участка монослоя от концентрации препарата после 24 часов инкубации с клетками.

Из 18 включенных в эксперимент животных положительный результат оперативного вмешательства на момент вывода из эксперимента наблюдали у 14 (77,7%). Неблагоприятный исход вмешательства, связанный с рубцовым заращением дакриостомы наблюдали у 4 кроликов контрольной группы, выведенных из эксперимента на 14 и 28 день. Благоприятный исход ДЦР

наблюдали у всех животных, получивших инъекции пирфенидона в концентрациях 0,15 мг/мл и 0,3 мг/мл, вне зависимости от времени вывода животного из эксперимента, а также у 2 кроликов контрольной группы, выведенных из эксперимента на 7 день после оперативного вмешательства.

При гистологическом исследовании образцов слизистой оболочки полости носа, полученных у лабораторных животных во всех образцах отмечали явления фиброза, наиболее выраженные в группе 3 на 14 и 28 день после ДЦР, и явления воспалительной инфильтрации, наиболее выраженные в образцах всех групп животных, полученных на 7 день после хирургического вмешательства.

Средние значения количества клеточных элементов, положительно окрашенных по  $\alpha$ -SMA в образцах, полученных от лабораторных животных, представлены в **табл. 3**. Количественная характеристика миофибробластной инфильтрации для группы животных 1 и 2 статистически достоверно отличалась от контрольной, а также между собой ( $p < 0,05$ ). Средние значения количества  $\alpha$ -SMA-позитивных клеточных элементов в образцах также различались в зависимости от времени их получения, достигая пика на 14 день после вмешательства, что было особенно выражено в контрольной группе.

**Таблица 3. Количественная характеристика миофибробластной инфильтрации в образцах, полученных от лабораторных животных**

Группа животных	N	Количество $\alpha$ -SMA-позитивных клеточных элементов	Стандартное отклонение	Количество неблагоприятных исходов ДЦР
Группа 1	6	4811,83	357,56	0
Группа 2	6	4216,67	90,65	0
Группа 3 (контрольная)	6	6735,00	941,41	4 (66,6%)

## Выводы

1. На основании изучения концентрации цитокинов, участвующих в процессе фиброза, сравнительного анализа результатов гистологического исследования образцов слизистой оболочки полости носа 83 пациентов (83 случая) с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей и результатов их хирургического лечения установлен ряд патогенетических факторов фибротизации дакриостомы после дакриоцисториностомии и определены возможные методы ее профилактики.
2. Оценка концентрации цитокинов, принимающих участие в процессе фиброза (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, FGF-2, CTGF) в образцах слизистой оболочки полости носа у 83 пациентов (83 случая) с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей позволила доказать, что концентрация цитокина CTGF у 10 пациентов (10 случаев) с заращением дакриостомы после эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии статистически достоверно выше ( $46,49 \pm 37,95$  пг/мл), чем у пациентов с положительным исходом эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии ( $22,12 \pm 26,41$  пг/мл) ( $p=0,015$ ), что подтверждает влияние медиатора фиброза CTGF на исход оперативного лечения.
3. Проведенный корреляционный анализ между количественной характеристикой миофибробластной инфильтрации, полученной в результате гистологического исследования образцов ткани слизистой оболочки полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей и результатами их хирургического лечения показал, что у пациентов с заращением дакриостомы после эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии миофибробластная инфильтрация статистически достоверно выше ( $6026,38 \pm 1944,29$ ), чем у пациентов с положительным исходом

эндоназальной эндоскопической дакриоцистиностомии ( $4120,39 \pm 1160,08$ ) ( $p=0,02$ ), что объясняет патологическое заживление дакриостомы после вмешательства.

4. По данным гистологического исследования образцов ткани слизистой оболочки полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей была выявлена большая выраженность воспалительной инфильтрации, субэпителиального фиброза и сквамозной метаплазии поверхностного эпителия слизистой оболочки (признаки хронического воспаления) у пациентов с заращением дакриостомы после эндоназальной эндоскопической дакриоцистиностомии. Коэффициент хронического воспаления у данной группы пациентов был достоверно выше (средний коэффициент хронического воспаления – 8,33), чем у пациентов с положительным исходом эндоназальной эндоскопической дакриоцистиностомии (средний коэффициент хронического воспаления – 5,72), что подтверждает влияние хронического воспаления на результат хирургического лечения.
5. На основании изучения восстановления монослоя фибробластов после повреждения при исследовании на клеточной культуре тканей полости носа пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей *in vitro* определена наиболее эффективная доза антифибротического препарата Пирфенидон - 0,15 мг/мл и 0,3 мг/мл. При культивации с добавлением препарата в концентрации 0,15 мг/мл рост монослоя фибробластов составил  $8,26 \pm 6,09\%$ , при культивации с добавлением препарата в концентрации 0,3 мг/мл отмечено слабо выраженное увеличение раны монослоя фибробластов на  $2,10 \pm 2,69\%$ .
6. Доказана низкая степень токсичности препарата Пирфенидон в дозах 0,15 мг/мл и 0,3 мг/мл (доля жизнеспособных клеток после культивации с препаратом в этих дозах отличалась незначительно и

составила 85,7%, 76,4% соответственно через 24 часа после добавления препарата и 88,4%, 81,1% соответственно через 48 часов).

7. На основании анализа количественной характеристики миофибробластной инфильтрации в образцах, полученных после эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии у кроликов в эксперименте *in vivo* на различных сроках наблюдения доказана эффективность Пирфенидона на пролиферацию миофибробластов: в препаратах группы животных, получивших Пирфенидон (в дозах, определенных при исследовании *in vitro* – 0,15 мг/мл и 0,3 мг/мл) среднее значение миофибробластной инфильтрации было достоверно ниже ( $4811,83 \pm 357,56$  и  $4216,67 \pm 90,65$  соответственно), чем в образцах группы контроля ( $6735,00 \pm 941,41$  ( $p < 0,05$ )).

### **Практические рекомендации**

1. Повышение концентрации цитокина CTGF в образцах слизистой оболочки полости носа у пациентов с облитерацией вертикального отдела слезоотводящих путей может являться предиктором зарращения дакриостомы после эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии, что диктует необходимость применения профилактических мер в интра – и послеоперационный периоде.
2. Для снижения риска возникновения облитерации слезоотводящих путей и в последующем избыточного рубцевания в области дакриостомы после эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии необходимо проводить лечение пациентов с хроническим воспалением слизистой оболочки полости носа.
3. Пирфенидон является эффективным препаратом в ингибировании пролиферации клеток, играющих одну из основных ролей в процессе фиброобразования. Наиболее эффективной и малотоксичной дозой Пирфенидона для предотвращения избыточного рубцевания является 0,15 мг/мл и 0,3 мг/мл.



4. Дальнейшее изучение антифибротического препарата Пирфенидон должно быть направлено на экспериментальное обоснование применения наиболее оптимальной из вышеуказанных доз, определение целесообразного способа введения препарата, что даст основание для последующего исследования его в условиях клиники с целью предотвращения зарращения дакриостомы у пациентов с облитерацией слезоотводящих путей после дакриоцисториностомии.

#### **Список опубликованных работ по теме диссертации:**

1. Атькова Е.Л., Рейн Д.А., Ярцев В.Д., Суббот А.М. Влияние цитокина TGF- $\beta$  и других факторов на процесс регенерации / // **Вестник офтальмологии.** – 2017. – Т. 133. – № 4. – С. 89-96.
2. Рейн Д.А., Атькова Е.Л., Раменская Г. В., Ярцев В.Д., Роот А.О., Жуков О.В. О перспективах применения современных антифибротических препаратов в дакриологии // **Экспериментальная и клиническая фармакология.** – 2018. – Т. 81. – № 6. – С. 36-40.
3. Рейн Д.А., Атькова Е.Л. Прогнозирование исхода эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии на основе изучения медиаторов фиброза // **Современные технологии в офтальмологии.** – 2018. – № 4. – С. 218-220.
4. Атькова Е.Л., Суббот А.М., Краховецкий Н.Н., Ярцев В.Д., Рейн Д.А. Анализ действия антифибротического препарата пирфенидон на фибробласты *in vitro* // **Российский общенациональный офтальмологический форум.** – 2018. – Т. 2. – С. 429-431.
5. Атькова Е.Л., Краховецкий Н.Н., Ярцев В.Д., Суббот А.М., Габашвили А.Н., Рейн Д.А., Нестерова Т.В. Изучение антифибротических свойств препарата пирфенидон на клеточной культуре фибробластов слизистой оболочки полости носа // **Вестник Российской академии медицинских наук.** – 2018. – Т. 73. – № 1. – С. 23-29.
6. Атькова Е.Л., Астраханцев А.Ф., Федоров А.А., Рейн Д.А., Краховецкий Н.Н., Ярцев В.Д. Состояние слизистой оболочки полости носа и результаты дакриоцисториностомии // **Архив патологии.** – 2019. – Т. 81. – № 2. – С. 24-28.
7. Атькова Е.Л., Суббот А.М., Краховецкий Н.Н., Ярцев В.Д., Рейн Д.А. Влияние медиаторов фиброза на результаты эндоназальной эндоскопической дакриоцисториностомии // **Вестник офтальмологии.** – 2019. – Т. 135. – № 4. – С. 19-26.

8. Рейн Д.А., Атькова Е.Л. Изучение антифибротической активности пирфенидона при дакриоцисториностомии (экспериментальное исследование) // Современные технологии в офтальмологии. – 2021. – № 2(37). – С. 224-227.

9. Атькова Е.Л., Федоров А.А., Астраханцев А.Ф., Рейн Д.А., Краховецкий Н.Н. Экспериментальное обоснование эффективности пирфенидона в предотвращении рубцового зарращения искусственного соустья после дакриоцисториностомии // Вестник офтальмологии. – 2021. – Т. 137. – № 5. – С. 31-39.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:**

ДЦР – дакриоцисториностомия.

КХВ – коэффициент хронического воспаления

ОКТ – оптическая когерентная томография

СОП – слезоотводящие пути

ЭЭДЦР – эндоскопическая эндоназальная дакриоцисториностомия

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

FGF-2 – основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor)

TGF- $\beta$  – трансформирующий фактор роста (transforming growth factor  $\beta$ )

$\alpha$ -SMA – гладкомышечный актин  $\alpha$  ( $\alpha$  smooth muscle actin)