

На правах рукописи

Вудс Екатерина Анатольевна

**ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
АНТИАНГИОГЕННОЙ ТЕРАПИИ ЭКССУДАТИВНОЙ ФОРМЫ
ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ**

14.01.07 — глазные болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2015

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук
кандидат биологических наук

Будзинская Мария Викторовна
Погода Татьяна Викторовна

Официальные оппоненты:

Лоскутов Игорь Анатольевич, доктор медицинских наук, Научный клинический центр ОАО «Российские железные дороги», заведующий офтальмологическим отделением.

Эскина Эрика Наумовна, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Институт повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства», профессор кафедры офтальмологии.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ.

Защита диссертации состоится «14» декабря 2015 г. В 14-00 на заседании диссертационного совета Д 001.040.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней», по адресу: 119021, г. Москва, ул. Россолимо, д.11, корп. А, Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.niigb.ru Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт глазных болезней».

Автореферат диссертации разослан «_____» _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

М.Н.Иванов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень её разработанности

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) является ведущей причиной потери центрального зрения среди людей старше 50 лет в развитых странах [Bressler NM, 2004; Rudnicka AR, 2015]. Развитию ВМД способствуют как факторы окружающей среды (возраст, атеросклероз и артериальная гипертензия, курение, избыточная масса тела, избыточное ультрафиолетовое облучение, несбалансированное питание, светлый цвет глаз), так и доказанные генетические факторы [Human L, 2000]. В 90% случаев ВМД представлена неэкссудативной («сухой») формой, и лишь у 10% больных с ВМД развивается экссудативная («влажная») форма, характеризующаяся наличием субретиальной неоваскулярной мембраны (СНМ). В 90% случаев слепоты вследствие ВМД причиной является именно экссудативная форма заболевания [Jager RD, 2008].

Методом выбора при лечении экссудативной формы ВДМ является эндовитреальное введение антиангиогенных препаратов. Несмотря на эффективность лечения, имеет место значительная вариабельность ответа у некоторых пациентов, особенно при антиангиогенной терапии [Menghini M, 2010]. Соответственно, есть вероятность, что на эффективность лечения влияют генетические факторы и этим определяется необходимость проведения фармакогенетических исследований.

Фармакогенетика представляет собой дисциплину, изучающую взаимодействие генотипа и фенотипа с целью объяснения причин различия ответа организма пациентов на лечение. Основными задачами фармакогенетики являются: определение генетических вариантов, влияющих на эффективность лечения, выделение пациентов, лучше отвечающих на терапию, и максимальное снижение риска побочных эффектов.

Недавние исследования показали связь между определенными генетическими вариантами и ответом на лечение антиангиогенными препаратами, такими как бевацизумаб («Авастин») и ранибизумаб («Люцентис»). Наиболее часто в фармакогенетических исследованиях изучают полиморфизмы риска

развития ВМД, такие как полиморфизм Y402H гена фактора комплемента H (*CFH* Y402H), полиморфизм 625A гена сериновой пептидазы *HTRA1* (*HTRA1* 625A) и др. [Brantley Jr. MA, 2007; Schwartz SG, 2011]. Кроме того, в работе М.В. Будзинской [Будзинская М.В., 2011] было показано влияние полиморфизма 251A гена интерлейкина-8 (*IL-8* 251A) на риск развития и клинические особенности экссудативной формы ВМД.

Однако в большинстве существующих исследований зависимой переменной служила острота зрения или количество требуемых инъекций за определенный период времени, в учет не принимались морфологические характеристики. У большинства фармакогенетических исследований антиангиогенной терапии имеется ряд недостатков: недостаточное количество исследований, причем в каждом отдельном случае – малая выборка, ретроспективный дизайн исследований, что не позволяет использовать четкие критерии включения/исключения для ограничения фенотипической гетерогенности. Результаты имеющихся исследований довольно противоречивы, что может быть следствием исходных генетических различий выборки, выбора разных зависимых переменных (острота зрения, морфологические характеристики, требуемое количество инъекций), разных статистических методов и других факторов. К тому же результаты исследования применимы в основном для пациентов с впервые выявленной СНМ, не получавших антиангиогенной терапии.

В России подобные фармакогенетические исследования не проводились вовсе, несмотря на высокую частоту встречаемости заболевания в популяции и возможные различия в генетической структуре населения. Поэтому изучение влияния генетических факторов на эффективность лечения антиангиогенными препаратами является актуальной, чрезвычайно важной клинической и экономической проблемой.

Цель работы

Изучить влияние однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) *CFH* Y402H, *HTRA1* 625A и *IL-8* 251A на эффективность антиангиогенной терапии экссудативной формы возрастной макулярной дегенерации.

Задачи исследования:

1. Оценить особенности течения экссудативной формы ВМД в зависимости от генетической карты пациента на большом клиническом материале.
2. Изучить влияние полиморфизмов *CFH* Y402H, *HTRA1* 625A и *IL-8* 251A на выраженность терапевтического ответа.
3. Определить клинические особенности терапевтического ответа в зависимости от наличия полиморфизмов *CFH* Y402H, *HTRA1* 625A и *IL-8* 251A.
4. Выявить совместное влияние полиморфизмов *CFH* Y402H, *HTRA1* 625A и *IL-8* 251A.
5. Разработать подходы к прогнозированию эффективности антиангиогенной терапии экссудативной формы ВМД на основе генетического скрининга.

Научная новизна

Впервые на большом клиническом материале с использованием современных, высокотехнологичных методов обследования проведен фармакогенетический анализ пациентов с экссудативной формой ВМД, проживающих на территории Российской Федерации.

Выявлено влияние однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) генов *CFH* (фактора комплемента H), *HTRA1* (сериновой пептидазы) и *IL-8* (интерлейкина-8, или гена *CXCL8*) не только на исходную клиническую картину, но и на эффективность анти-VEGF терапии.

Впервые выявлена связь между полиморфизмом 625A гена *HTRA1* в обоих копиях гена (генотип AA) и развитием отслойки пигментного эпителия (ОПЭ).

Впервые описана клиническая картина у редко встречающихся пациентов, гомозиготных по изучаемым аллелям риска развития ВМД генов: *CFH*, *HTRA1* и *IL-8* (*CFH* HH + *HTRA1* AA + *IL-8* AA), характеризующаяся ранним началом, большой площадью поражения и резистентностью к интравитреальным инъекциям ранибизумаба.

Впервые описана клиническая картина у пациентов, гомозиготных по аллелям дикого типа (без изучаемых полиморфизмов). Течение экссудативной

формы ВМД было относительно благоприятным: площадь поражения была минимальной и не наблюдалось развития ОПЭ как до, так и во время лечения.

Обосновано и доказано проведение генетического скрининга у пациентов с экссудативной формой ВМД.

Теоретическая и практическая значимость работы

Исследования показали высокую теоретическую и практическую информативность генетического скрининга однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) генов *CFH* (фактора комплемента H), *HTRA1* (сериновой пептидазы) и *IL-8* (интерлейкина-8, или гена *CXCL8*) у пациентов с экссудативной формой ВМД, позволяющего адекватно оценить факторы риска развития и прогрессирования заболевания.

Генетический скрининг у пациентов с ВМД дает возможность оценить степень развития и прогрессирования хориоидальной неоваскуляризации, вероятность развития кистовидного отека (КО) и выраженного рубцевания на глазном дне.

Анализ однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) генов *CFH* (фактора комплемента H), *HTRA1* (сериновой пептидазы) и *IL-8* (интерлейкина-8, или гена *CXCL8*) позволяет прогнозировать эффективность анти-VEGF терапии и рекомендовать его широкое применение в практическом здравоохранении.

Методология и методы диссертационного исследования

Методологической основой диссертации явилось применение комплекса методов научного познания. Работа выполнена в дизайне проспективного открытого сравнительного исследования с использованием клинических, аналитических и статистических методов.

Положения, выносимые на защиту:

1. При исходной остроте зрения от 0,10 до 0,51 наличие неблагоприятного для развития экссудативной ВМД генотипа (гомозиготы по полиморфизму rs1061170) ассоциируется с худшим результатом лечения (по остроте зрения) как после одной, так и после трех интравитреальных инъекций ранибизумаба.

2. После трех инъекций процент больных с полной резорбцией КО и с генотипом УН по гену *CFH* в 2 раза больше, чем с генотипом НН (80,0 и 48,6%).

3. Пациенты, гетерозиготные (УН) по Y402H, имеющие только один аллель rs1061170, достигают наилучшего результата лечения по остроте зрения после третьей инъекции.

4. Клиническая картина ВМД при наличии полиморфизма 625A гена *HTRA1* в обоих копиях гена (генотип AA) характеризуется развитием ОПЭ с относительно высокой остротой зрения, что часто является первым и единственным признаком заболевания.

5. На центральную толщину сетчатки (ЦТС) после проведенного лечения влияет не только количество инъекций ранибизумаба, но и генотип по *IL-8* ($p < 0,05$).

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности результатов исследования определяется достаточным и репрезентативным объемом выборок, использованием современных методов исследования и подтверждена в процессе статистической обработки материала. Анализ результатов исследования и статистическая обработка выполнены с применением современных методов сбора и обработки научных данных. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, аргументированы и логически вытекают из системного анализа результатов клинических и лабораторных исследований.

Основные положения диссертации доложены на конференции «Здоровье и образование в XXI веке; концепции болезней цивилизации: инновационные технологии в биологии и медицине» (Москва, Россия, 2009), итоговой научной конференции молодых исследователей с международным участием «Татьянин день» (Москва, Россия, 2010), V Всероссийской научной конференции молодых ученых (Москва, Россия, 2010), ARVO 2011 Visionary Genomics (Fort Lauderdale USA, 2011), EURETINA 2011, (London, UK, 2011), V Всероссийском семинаре - «круглый стол» «Макула – 2012» (Ростов-на-Дону, Россия, 2012), EURETINA 2012 (Milan, Italy, 2012), научно-практической конференции по

офтальмохирургии с международным участием «Восток-Запад – 2013» (Уфа, Россия, 2013), EURETINA 2013 (Hamburg, Germany, 2013).

Внедрение результатов работы: результаты работы внедрены в клиническую практику ФГБНУ «НИИГБ».

Личный вклад автора в проведенное исследование. Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в планировании и проведении данного исследования, апробации результатов, подготовке публикаций и докладов по теме работы. Вся обработка и интерпретация полученных результатов выполнена лично автором.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, из них 5 в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, определенных Высшей аттестационной комиссией.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, изложенных в 4 главах, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 182 источника (26 отечественных и 156 зарубежных авторов). Диссертация иллюстрирована 60 таблицами и 53 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Исследование включало 352 человека (376 глаз) с экссудативной формой ВМД (мужчин 104, женщин 248). Срок наблюдения за пациентами составил 3 месяца.

Критерии включения: возраст пациента 50 лет и старше; наличие подтвержденной экссудативной формы ВМД; локализация СНМ в макулярной зоне; активность СНМ по результатам флуоресцентной ангиографии глазного дна (ФАГД) и оптической когерентной томографии (ОКТ) (наличие одного из следующих признаков: субретинального кровоизлияния,

субретинальной/интратретинальной экссудации и потери остроты зрения более чем на 0,2 за последние 3 мес.).

Критериями исключения являлись возраст пациента менее 50 лет; наличие СНМ, вызванной причинами, не связанными с ВМД; невозможность проведения ОКТ и офтальмоскопии; наличие некомпенсированной глаукомы; интраокулярные хирургические вмешательства на исследуемом глазу за последние 3 мес.; витреоретинальные операции и операции пломбирования на исследуемом глазу в анамнезе; наличие в анамнезе лечения СНМ лазерными методами (лазерной фотокоагуляции и фотодинамической терапии) или антиангиогенными препаратами в исследуемом глазу за последние 2 года; любые глазные заболевания, кроме ВМД, которые могут повлиять на изменение остроты зрения и анализ результатов; наличие острых или некомпенсированных системных, онкологических и других заболеваний; наличие психических заболеваний и ментальных расстройств, мешающих пониманию пациентом условий участия в исследовании, проведению необходимых исследований и проверке остроты зрения.

В большинстве крупных исследований, посвященных лечению Ранибизумабом, критерием включения является острота зрения от 0,05-0,1 до 0,5, что обычно формирует более-менее однородную выборку пациентов по остроте зрения и величине отека сетчатки. В НИИ глазных болезней лечение проходили пациенты с различной величиной остроты зрения, поэтому выборка по исходной остроте зрения оказалась не достаточно однородной. По этой причине, в целях дальнейшего анализа пациенты в зависимости от исходной остроты зрения были разделены на следующие группы:

1-я группа – 113 (32,1 %) пациентов (117 глаз) с остротой зрения до 0,1, средний возраст $74,9 \pm 7,2$;

2-я группа - 221 (62,8 %) пациент (240 глаз) с остротой зрения от 0,11 до 0,5, средний возраст $72,5 \pm 8,2$;

3-я группа - 18 (5,1 %) пациентов (19 глаз) с остротой зрения выше 0,51, средний возраст $72,8 \pm 5,1$.

Офтальмологические методы обследования включали в себя визометрию, рефрактометрию, тонометрию, биомикроскопию, офтальмоскопию в условиях максимального мидриаза с 3-зеркальной линзой Гольдмана. ФАГД проводили стандартным методом на фундус-камере FF 450 plus (ФФ 450 плюс) «Карл Цейс» (Германия) и Heidelberg Retinal Angiograph 2 (Германия). ОКТ выполняли всем пациентам на томографе OCT Stratus «Carl Zeiss» (Германия) и Spectralis OCT «Heidelberg Engineering» (Германия). Изучали анатомо-топографическое соотношение слоев сетчатки и ее толщину в макулярной зоне. Для анализа использовали следующие параметры: ЦТС в фовеа (в мкм) и общий макулярный объем (ОМО) (в мм³). Опираясь на данные, полученные в результате проведения ФАГД и ОКТ, оценивали признаки поражения: одно- или двусторонняя неоваскуляризация; площадь поражения (до 1,5 ДЗН, от 1,5 ДЗН до аркад, за аркадами); характер рубцевания (легкая степень рубцевания, выраженное рубцевание, гиперрубцевание) и его динамика; наличие и динамика отслойки нейроэпителера (ОНЭ) и наличие эпиретинального фиброза; тип (куполообразная средняя, куполообразная высокая, плоская, более 2 отслоек) и локализация (субфовеолярно или вне центра) ОПЭ в динамике; наличие и тип кистовидного отека (умеренный, гигантские кисты экстрафовеолярно, субфовеолярные кисты) в динамике.

Метод проведения антиангиогенной терапии

В рамках исследования пациентам эндовитреально вводился препарат «Луцентис» (ранибизумаб) 3 раза с перерывом в 1 месяц. Международное непатентованное название: ранибизумаб. Регистрационный номер: ЛСР-004567/08, 16.06.08.

Методы генетических исследований

Генетические исследования проводили на базе Научно-исследовательского института физико-химической медицины под руководством к.б.н. Т.В. Погоды и д.б.н. Э.В. Генерозова. Выделение ДНК производили из 5 мл венозной крови с помощью набора «Wizard® Genomic DNA Purification Kit» (фирма «Промега», США) согласно инструкции, генотипирование полиморфизмов - с помощью

MALDI-TOF минисеквенирования. Изучали однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs) Y402H гена *CFH*, 625A гена *HTRA1* и 251A гена *IL-8* (табл. 1).

Таблица 1. Изучаемые однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs) генов *CFH*, *HTRA1* и *IL-8*

	Ген		
	<i>CFH</i> , фактор комплемента H	<i>HTRA1</i> , сериновая пептидаза	<i>IL-8/CXCL8</i> , интерлейкин-8
Изучаемый SNP	Y402H	625A	251A
Генотипы	<p>YY: генотип дикого типа, без полиморфизма <i>CFH</i> Y402H</p> <p>YH: гетерозигота по <i>CFH</i> Y402H</p> <p>HH: гомозигота по <i>CFH</i> Y402H</p>	<p>GG: генотип дикого типа, без полиморфизма <i>HTRA1</i> 625A</p> <p>GA: гетерозигота по <i>HTRA1</i> 625A</p> <p>AA: гомозигота по <i>HTRA1</i> 625A</p>	<p>TT: генотип дикого типа, без полиморфизма <i>IL-8</i> 251A</p> <p>AT: гетерозигота по <i>IL-8</i> 251A</p> <p>AA: гомозигота по <i>IL-8</i> 251A</p>

Математическая и статистическая обработка полученных в ходе исследований данных проводилась с использованием стандартных пакетов программ (Excel; SPSS 19.0). Статистическая обработка исследуемого материала включала обработку всей базы данных с частотным анализом полей с дискретными непрерывными значениями (N , $M \pm m$, δ , минимальные и максимальные значения, асимметрия и эксцесс, где N - число наблюдений, M - среднее арифметическое, m - ошибка средней арифметической, δ - среднее квадратическое отклонение).

Для оценки статистической значимости различий количественных признаков был применен критерий t Стьюдента и критерий F Фишера. При использовании критерия t Стьюдента предварительно производилась проверка соответствия распределения выборочных значений закону нормального распределения с помощью критерия Колмогорова – Смирнова. По критерию Стьюдента производили сравнение средних значений для параметрических показателей, а по критерию U Манна - Уитни – для непараметрических данных. Анализ статистической значимости различий качественных признаков, а также количественных признаков, не соответствующих закону нормального

распределения, проведен с помощью критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йетса. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным меньше 0,05 ($p < 0,05$). Для исследования зависимости остроты зрения, ЦТС, ОМО от генотипов по исследуемым генам использовался одно- и многофакторный дисперсионный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате настоящего фармакогенетического исследования было выявлено влияние изучаемых полиморфизмов в отдельности и совместно на количественные и качественные клинические признаки у пациентов с экссудативной формой ВМД при лечении ранибизумабом (табл. 2). Влияния изучаемых генетических факторов на развитие и динамику ОНЭ и эпиретинального фиброза не выявлено.

Таблица 2. Статистически значимые эффекты полиморфизмов Y402H гена *CFH*, 625A гена *HTRA1* и 251A гена *IL-8* до лечения и после 3 инъекций ранибизумаба у пациентов с экссудативной формой ВМД

Генотип		Острота зрения		ЦТС		ОМО		КО		ОПЭ	
		а	б	а	б	а	б	а	б	а	б
<i>CFH</i>	YY										
	YH										
	HH		Н (2)					Б ¹	Н		
<i>HTRA1</i>	GG						Н (3)				Н
	GA										
	AA	Б (1)				Н	Б (3)			Н	Б
<i>IL-8</i>	TT	Б (1)		Н							
	TA	Н (1)	Н (2)								
	AA		Н (2)								

Примечание. а – до лечения; б – после 3 инъекций; Б – благоприятное влияние; Н – неблагоприятное влияние; () – характерно только для одной группы по исходной остроте зрения (номер группы в скобках); **жирным** шрифтом выделены аллели риска развития ВМД; **серым фоном** выделены гомозиготы по аллелям риска.

¹ КО возникает реже, но, как правило, с гигантскими и субфовеолярными кистами.

CFH. На основании результатов анализа влияния полиморфизма Y402H гена *CFH* на эффект лечения ранибизумабом можно сделать вывод, что наилучшей остроты зрения в общей выборке после 3-й инъекций удастся добиться у пациентов, гетерозиготных по полиморфизму 402H (генотип YH) гена *CFH* (табл. 2). На рис. 1 графически представлено влияние генотипа по *CFH* на остроту зрения. У пациентов с генотипом YH средняя острота зрения статистически значимо ($p < 0,015$) отличается от средней остроты пациентов с остальными генотипами. Пациенты с генотипом YH достигают наилучшего результата лечения по остроте зрения после 3-й инъекции.

Во 2-й группе уже после 1-й инъекции острота зрения выше у больных с генотипом YH и YY по сравнению с аналогичным показателем при генотипе HH (рис. 2). После трех инъекций во 2-й группе имеются достоверные различия между показателями при всех генотипах: наилучшая острота зрения ассоциируется с генотипом YH, затем – с YY, а наименьшая – с HH.

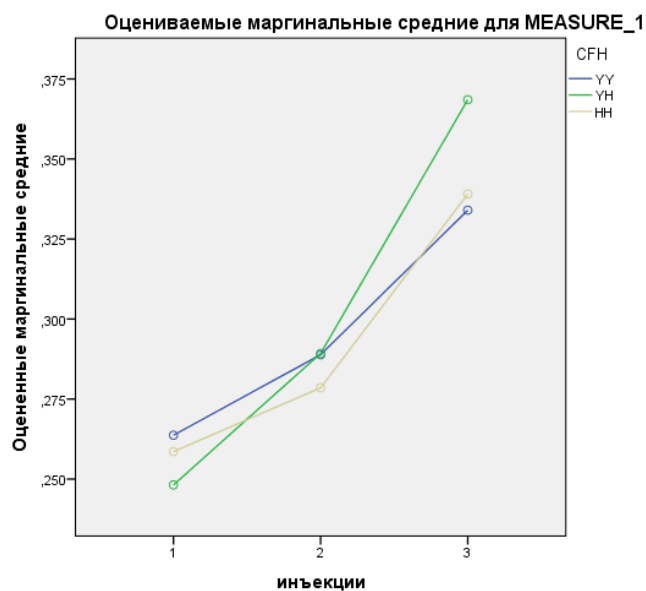


Рис. 1. График средних значений остроты зрения до лечения, после 1-й и 3-й инъекций для трех генотипов по *CFH*.

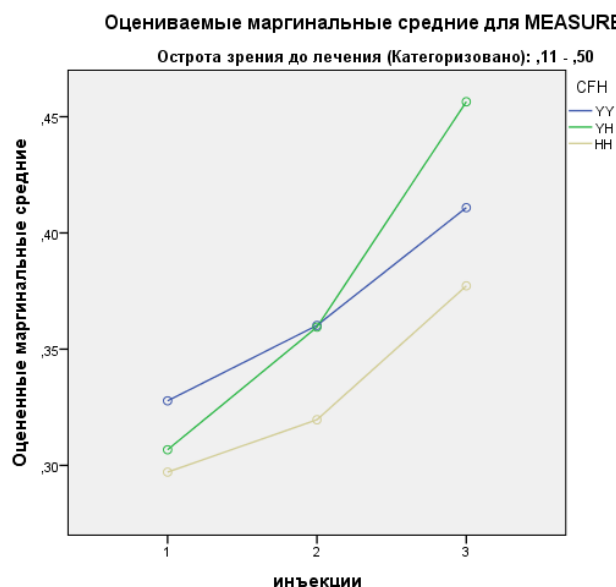


Рис. 2. График средних значений остроты зрения до лечения, после 1-й и 3-й инъекций для 2-й группы для трех генотипов по *CFH*.

По клиническим признакам, достоверные связи были получены только по КО. У пациентов с генотипом *CFH* HH реже всего встречается КО (табл. 3), но если у такого пациента КО развивался, то он, как правило, был более деструктивен (гигантские и субфовеолярные кисты) и намного хуже поддавался лечению (после трех инъекций КО полностью резорбируется в менее половины случаев по сравнению с 80 и 76,7% случаев для генотипов YH и YY соответственно) (табл. 4).

Таблица 3. Распределение (в %) пациентов по наличию КО до лечения в зависимости от генотипа по *CFH*

Генотип по <i>CFH</i>	Пациенты с КО, %
YY	40,2
YH	36,9
HH	25

Таблица 4. Распределение (в %) пациентов с полной резорбцией КО после 3-й инъекции в зависимости от генотипа по *CFH*

Генотип по <i>CFH</i>	Пациенты с полной резорбцией КО, %
YY	76,7
YH	80,0
HH	48,6

HTRA1. Для полиморфизма 625A гена *HTRA1* влияния на остроту зрения и ЦТС на протяжении всего периода лечения не выявлено (табл. 2). Однако в 1-й группе до лечения средняя острота зрения у больных с генотипом GG была ниже (рис. 3), чем таковая при генотипе AA, на 0,021 ($p < 0,05$). При этом, по данным докторской диссертации М.В. Будзинской, генотип AA ассоциируется с ускоренным рубцеванием. Поэтому можно предположить, что давность заболевания пациентов с вариантом GG была намного больше (без быстрого развития рубцевания), что и привело к худшей зрительной функции.

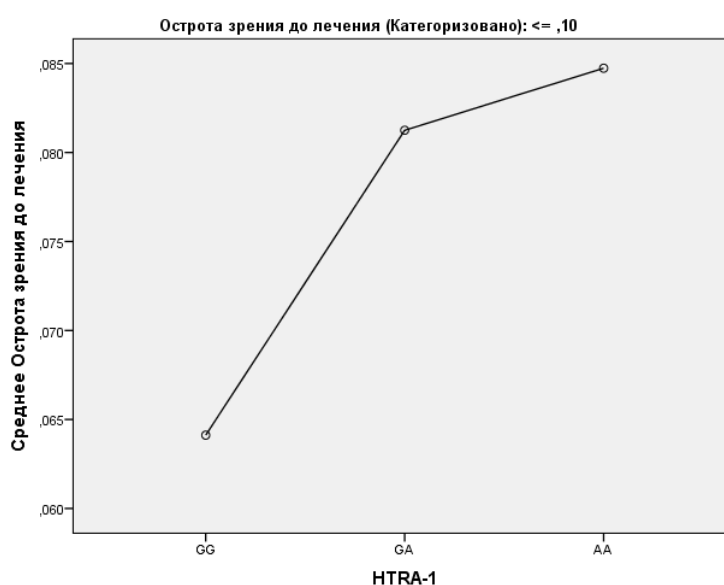


Рис. 3. График средней исходной остроты зрения в зависимости от генотипа по *HTRA1* в 1-й группе.

Средние значения ОМО для генотипов по *HTRA1* значимо различались до лечения. Носители одной и двух копий полиморфизма 625A отличались большей величиной центрального отека сетчатки, при этом среднее значение ОМО для генотипов GA и AA составило 9,957 и 9,776 мм³ соответственно, а для генотипа GG - 9,434 мм³. Но после 1-й и 3-й инъекции различия величины ОМО уже не значимы (рис. 4). Это говорит о том, что пациенты с генотипами GA и AA имеют хороший ответ на терапию ранибизумабом.

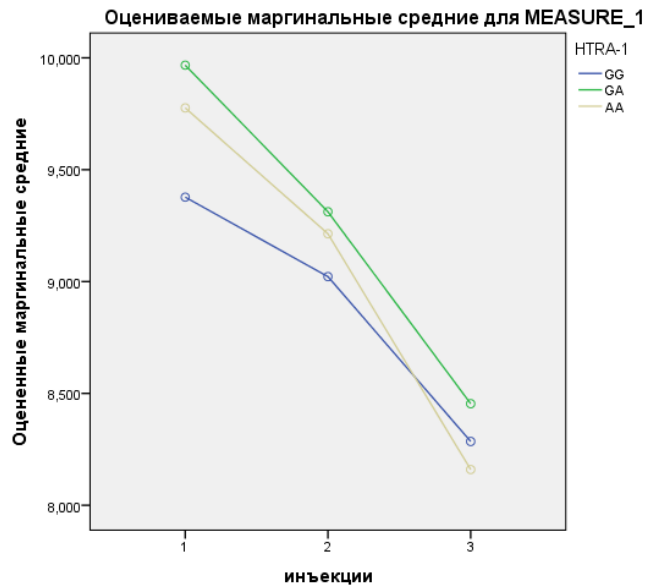


Рис. 4. График средних значений ОМО до лечения, после 1-й и 3-й инъекций в зависимости от генотипа по *HTRA1*.

В 3-й группе пациенты с полиморфизмом 625А в двух копиях гена *HTRA1* до лечения и после 1-й инъекции имели наибольший средний ОМО, но после трех инъекций у таких больных средний ОМО оказался наименьшим ($p < 0,05$) (рис. 5).

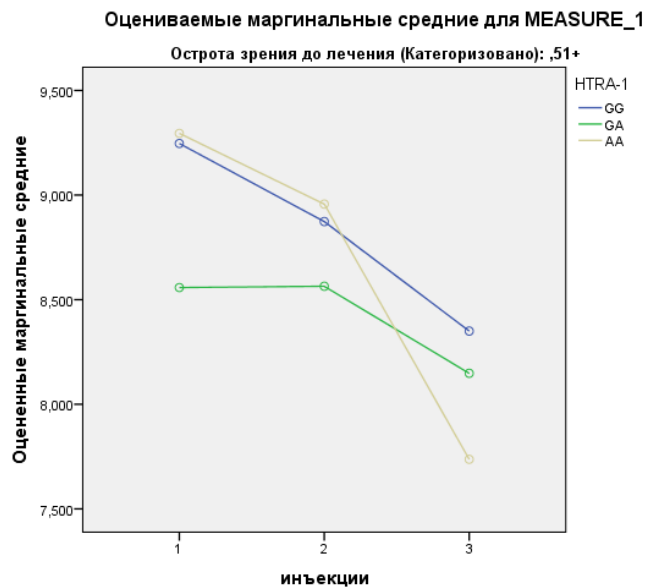


Рис. 5. График средних значений ОМО до лечения, после 1-й и 3-й инъекций в 3-й группе в зависимости от генотипа по *HTRA1*.

По клиническим признакам достоверные различия были показаны для ОПЭ. У пациентов с генотипом AA до лечения ОПЭ наблюдали чаще, чем у пациентов с GG (54,8 и 39,2% соответственно) ($p < 0,05$). То есть у 54,8% пациентов с двумя

копиями полиморфизма 625А в гене *HTRA1* развивается ОПЭ (табл. 5), причем часто у таких больных с относительно высокой остротой зрения ОПЭ была первым и единственным признаком экссудативной формы ВМД.

Таблица 5. Распределение (в %) пациентов по наличию ОПЭ до лечения в зависимости от генотипа по *HTRA1*

Генотип по <i>HTRA1</i>	Пациенты с ОПЭ до лечения, %
GG	39,2
GA	45,7
GA	54,8

При этом после трех инъекций ОПЭ реже поддавалась лечению у больных с генотипом GG по сравнению с пациентами с генотипом AA (41,2% против 17,9% соответственно) (табл. 6). То есть у пациентов с полиморфизмом GG ОПЭ наблюдали редко, но они были резистентна к лечению в 41,2% случаев. А у гомозигот по полиморфизму 625А гена *HTRA1* ОПЭ встречается очень часто (более, чем в половине случаев), но поддается лечению лучше, чем у пациентов с генотипами GG и GA.

Таблица 6. Распределение (в %) пациентов с ОПЭ, резистентной к лечению, после 3 инъекций в зависимости от генотипа по *HTRA1*

Генотип по <i>HTRA1</i>	Пациенты с ОПЭ, резистентной к лечению, %
GG	41,2
GA	29,1
GA	17,9

Сериновая пептидаза *HTRA1* (ген *HTRA1*) участвует в лизисе белков межклеточного матрикса (МКМ), а наличие полиморфизма 625А может влиять на уровень данного фермента и, следовательно, вызывать усиленный лизис в МКМ и приводить к более частому возникновению ОПЭ.

IL-8. При анализе влияния полиморфизмов гена *IL-8* на эффективность лечения ранибизумабом было выявлено, что до лечения в 1-й группе у пациентов с генотипом TT острота зрения была выше на 0,016 по сравнению с аналогичным показателем у пациентаов с генотипом AT ($p < 0,05$) (табл. 2, рис. 6). После трех

инъекций значимые различия были обнаружены только во 2-й группе: острота зрения у больных с вариантом ТТ была на 0,05 выше, чем таковая при генотипах ТА и АА с $P < 0,05$ (рис. 7). Также в зависимости от определенного генотипа *IL-8* у пациентов различалась исходная ЦТС. У пациентов с генотипами АТ и ТТ она была значимо больше, чем у пациентов с генотипом АА ($p < 0,05$). Разница между средней ЦТС у пациентов с генотипом ТТ и АА гена *IL-8* составила 35,039 мкм.

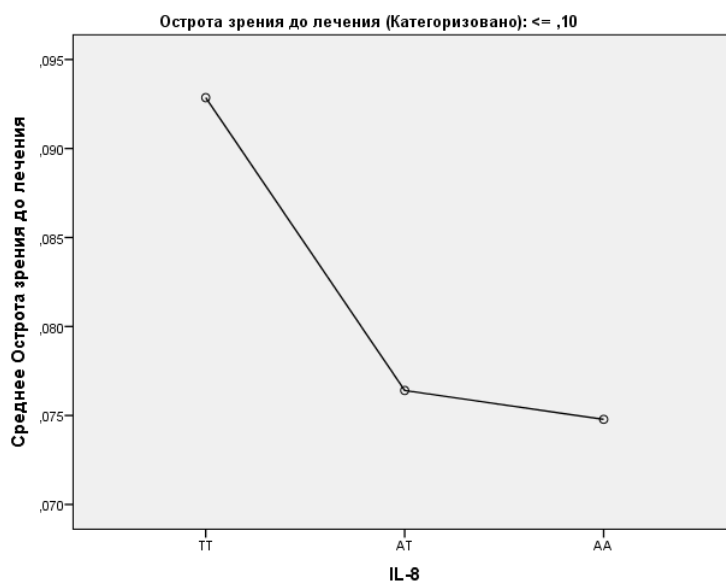


Рис. 6. График средней исходной остроты зрения в 1-й группе в зависимости от генотипа по *IL-8*.

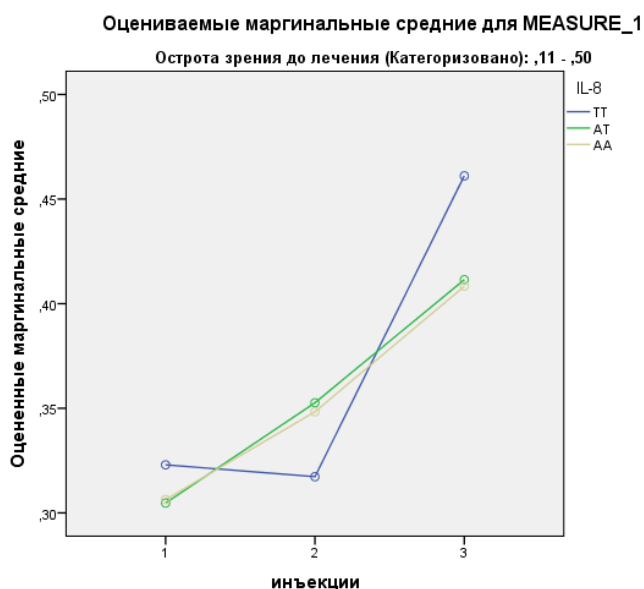


Рис. 7. График средних значений остроты зрения во 2-й группе в зависимости от генотипа по *IL-8* до лечения, после 1-й и 3-й инъекций.

Совместное влияние генов. У пациентов, гомозиготных сразу по трем аллелям риска Y402H гена *CFH*, 625A гена *HTRA1* и 251A гена *IL-8*, экссудативная форма ВМД развивается в более раннем возрасте, характеризуется большой площадью поражения сетчатки ($p < 0,05$), более высоким риском развития ОПЭ и, как правило, резистентна к лечению (табл. 7). Однако по величине уменьшения ОМО после 3 инъекций у них наблюдали лучший ответ на лечение. У пациентов, гомозиготных по аллелям дикого типа (без изучаемых полиморфизмов), течение экссудативной формы ВМД было относительно благоприятным: площадь поражения сетчатки была минимальной и не наблюдалось развития ОПЭ как до, так и во время лечения.

Таблица 7. Эффекты совместного влияния полиморфизмов Y402H гена *CFH*, 625A гена *HTRA1* и 251A гена *IL-8* до лечения и после 3 инъекций ранибизумаба у пациентов с экссудативной формой ВМД

Комбинации генотипов		Возраст	Площадь поражения	ОМО		ОПЭ		Рубцевание	
				а	б	а	б	а	б
<i>CFH+HTRA1+IL-8</i>	3А		Б*			Б	-		
	3Б								
	3В	ранний*	Н*		Б*	Н	Н		
<i>CFH+HTRA1</i>	2А		Б*			Б	Б	Б	Б
	2Б					Н			
	2В	ранний*	Н*			Н	Н	Н	Н

Примечание. а – до лечения; б – после 3 инъекций; **Б** – благоприятное влияние; **Н** – неблагоприятное влияние; серым фоном выделены гомозиготы по аллелям риска; 3А – гомозиготы по дикому аллелю по трем генам, т.е. без аллелей риска (*CFH* YY + *HTRA1* GG + *IL-8* TT), 3Б - другие комбинации генотипов по трем генам, 3В - гомозиготы по аллелям риска по 3-м генам (*CFH* HH + *HTRA1* AA + *IL-8* AA); 2А – гомозиготы по дикому аллелю по двум генам, т.е. без аллелей риска (*CFH* YY + *HTRA1* GG); 2Б - другие комбинации генотипов по двум генам, 2В - гомозиготы по аллелям риска по 2-м генам (*CFH* HH + *HTRA1* AA).

* статистически значимые различия.

Для увеличения количества пациентов в сравниваемых группах провели другой анализ, исключив ген *IL-8*, так как, по данным литературы, основным

генетическим фактором риска развития ВМД является наличие полиморфизмов генов *CFH* и *HTRA1*. У пациентов, гомозиготных по двум аллелям риска Y402H гена *CFH* и 625A гена *HTRA1*, заболевание также наблюдали в более молодом возрасте, ОПЭ и КО отличались резистентностью к лечению, а проведение трех инъекций чаще, чем у других, приводило к развитию чрезмерного рубцевания. У пациентов, гомозиготных по аллелям дикого типа, отмечали небольшую площадь поражения сетчатки, лучший исход лечения ОПЭ и КО и низкую активность процессов рубцевания.

Таким образом, в ходе данного фармакогенетического исследования было выявлено влияние полиморфизмов Y402H гена *CFH*, 625A гена *HTRA1* и 251A гена *IL-8* на клиническую картину, динамику и ответ на лечение ранибизумабом у пациентов с экссудативной формой ВМД, причем как на остроту зрения, ЦТС, ОМО, так и на динамику ОПЭ и КО. При прогнозе эффективности лечения у пациентов следует учитывать результаты генетического скрининга, а также величину исходной остроты зрения.

ВЫВОДЫ

1. Впервые на репрезентативном материале (352 пациента с экссудативной формой возрастной макулярной дегенерации) выявлено влияние однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) генов *CFH* (фактора комплемента H), *HTRA1* (сериновой пептидазы) и *IL-8* (интерлейкина-8, или ген *CXCL8*) на различные анатомо-функциональные показатели (остроту зрения, площадь и характер роста субретинальной неоваскуляризации, характер рубцевания, формы отслойки ретинального пигментного эпителия и макулярного отека).

2. У пациентов, гомозиготных (НН) по полиморфизму rs1061170с (ген *CFH*), при развитии кистовидного отека наблюдается более тяжелое течение процесса с формированием гигантских и субфовеолярно расположенных кист.

3. В результате проведения фармакогенетического исследования выявлено, что при экссудативной возрастной макулярной дегенерации на остроту зрения влияет не только количество инъекций ранибизумаба, но и тип полиморфизма Y402H гена *CFH* ($p < 0,05$). Наличие полиморфизма Y402H в двух

копиях гена *CFH* (генотип НН) ассоциируется с худшей резорбцией, а иногда и с увеличением кистовидного отека после трех инъекций по сравнению с случаями, ассоциированными с генотипами УН и УУ ($p < 0,015$).

4. По данным генетического скрининга, у пациентов, гомозиготных по полиморфизму 625А гена *HTRA1* (генотип АА), отслойка ретинального пигментного эпителия развивалась чаще, чем у пациентов, гомозиготных без полиморфизма, с генотипом GG (54,8 и 39,2% соответственно).

5. После трех интравитреальных инъекций ранибизумаба у пациентов с генотипом ТТ гена *IL-8* (гомозигот без полиморфизма rs4073 или 251А), расположенного в промоторном участке гена интерлейкина-8), острота зрения значительно лучше ($p = 0,012$), чем у больных с генотипами АТ и АА (наличие полиморфизма хотя бы в одной копии).

6. Установлено, что у пациентов, гомозиготных по трем изучаемым аллелям риска развития ВМД генов *CFH*, *HTRA1* и *IL-8*, заболевание развивается значительно раньше, характеризуется большой площадью новообразованных сосудов ($p < 0,05$), часто сочетающейся с обширной отслойкой ретинального пигментного эпителия.

7. Разработаны подходы к прогнозированию терапевтического ответа при антиангиогенной терапии экссудативной формы возрастной макулярной дегенерации в зависимости от генетической карты пациента.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

На основании проведенного фармакогенетического исследования антиангиогенной терапии ранибизумабом при экссудативной форме ВМД можно сформулировать следующие рекомендации практикующим врачам:

1. Пациентам с впервые выявленной ВМД рекомендуется проводить генетический скрининг для определения риска перехода ВМД в экссудативную форму и развития осложнений, что особенно актуально для пациентов относительно молодого возраста.

2. Пациентам с двумя аллелями риска хотя бы по одному из генов *CFH*, *HTRA1* и *IL-8* необходимо чаще проводить осмотры офтальмологом и ОКТ:

пациентам без признаков макулярной патологии – 1 раз в год, с сухой формой ВМД – 1 раз в полгода, с экссудативной формой ВМД – по необходимости проведения инъекций антиангиогенного препарата, а при стабилизации процесса – желательны более частые визиты к офтальмологу. Пациенты, гомозиготные по двум аллелями риска развития ВМД, как правило, чаще резистентны к терапии. Родственникам пациентов с повышенным риском развития ВМД рекомендуется осмотр офтальмологом и проведение генетического анализа.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Болбас З.В., Василевская Н.А., Чикун (Вудс) Е.А. Перспективные методы лечения возрастной макулярной дегенерации // Здоровье и образование в XXI веке; концепции болезней цивилизации: инновационные технологии в биологии и медицине, 2009. – с. 23-24.
2. Чикун (Вудс) Е.А. Факторы роста пигментного эпителия сетчатки: роль в патогенезе неоваскуляризации при возрастной макулярной дегенерации. // Тезисы итоговой научной конференции молодых исследователей с международным участием «Татьянин день». Открытый конкурс на лучшую научную работу студентов 2009 года по естественным, техническим и гуманитарным наукам по разделу «Медицинские и фармацевтические науки» в высших учебных заведениях Российской Федерации. – М.: Издательский дом «Бионика», 2010. – с. 188.
3. Чикун (Вудс) Е.А. Анализ мутаций генов CNF, HTRA и IL-8 у пациентов с субретинальной неоваскулярной мембраной. // Тезисы итоговой научной конференции молодых исследователей с международным участием «Татьянин день». Открытый конкурс на лучшую научную работу студентов 2009 года по естественным, техническим и гуманитарным наукам по разделу «Медицинские и фармацевтические науки» в высших учебных заведениях Российской Федерации. – М.: Издательский дом «Бионика», 2010. – с. 188.
4. Чикун (Вудс) Е.А., Будзинская М.В., Погода Т.В., Генерозов Э.В., Щеголева И.В. Изучение мутаций генов CNF, HTRA и IL-8 у пациентов с субретинальной неоваскулярной мембраной. // Актуальные проблемы офтальмологии: V Всерос. науч. конф. Молодых ученых: Сб. науч. работ / Под ред. Х.П. Тахчиди. – М.: Изд-во «Офтальмология», 2010. – с. 228.
5. З.В. Болбас, Н.А. Василевская, Е.А. Чикун (Вудс). Возрастная макулярная дегенерация: фактор роста эндотелия сосудов VEGF, шаперон RPT65 и рецепторы семейства PPAR как перспективные мишени лекарственной терапии // **Российские медицинские вести. - 2010 . - Том 15, N 3 . - с. 37-45.**

6. Chikun (Woods) E.A., Budzinskaya M.V., Pogoda T.V. The Effects of CFH, HTRA1 and IL-8 Genes Polymorphism on Clinical Picture of Choroid Neovascular Membrane. // Annual Meeting Scientific Abstracts, ARVO 2011 Visionary Genomics, May 2011, Fort Lauderdale, Florida, USA
7. С.Э. Аветисов, М.В.Будзинская, Т.В.Погода, Э.В.Генерозов, И.В.Щеголева, Е.А.Чикун (Вудс), Э.Э. Казарян. Влияние мутаций генов CFH, HTRA, IL-8, VEGF на клиническую картину субретинальной неоваскуляризации. Сообщение 1. // **Вестник офтальмологии. - 2011. - № 4. - с. 3-8.**
8. С.Э. Аветисов, М.В.Будзинская, Т.В.Погода, Э.В.Генерозов, И.В.Щеголева, Е.А.Чикун (Вудс), Э.Э. Казарян. Влияние мутаций генов CFH, HTRA, IL-8, VEGF на клиническую картину субретинальной неоваскуляризации. Сообщение 2. // **Вестник офтальмологии. - 2011. - № 4. - с. 9-16.**
9. M. Budzinskaya, I. Schegoleva, E. Chikun (Woods), T. Pogoda. Analysis of VEGFA Gene Polymorphisms in Patients with Choroid Neovascular Membrane // EURETINA 2011, September 2011, London, UK
10. Будзинская М.В., Погода Т.В., Чикун (Вудс) Е.А., Генерозов Э.В., Гурова И.В., Кузнецов А.В., Щеголева И.В. Роль генетических полиморфизмов в «терапевтическом ответе» при экссудативной форме возрастной макулярной дегенерации. // Тезисы докладов V Всероссийского семинара - «круглый стол» «Макула – 2012» / Под ред. Ю. Иванишко, Ростов-на-Дону, 2012. – с. 66-71.
11. E.A. Chikun (Woods) , M.V. Budzinskaya , T.V. Pogoda ,I.V. Andreeva , A.A. Plukhova , I.V. Shchegoleva. Interleukin-8 and T(-251)A polymorphism of its gene in choroid neovascular membrane. // EURETINA 2012, September 2012, Milan, Italy
12. Аветисов С.Э., Еричев В.П., Будзинская М.В., Карпилова М.А., Гурова И.В., Щеголева И.В., Чикун (Вудс) Е.А. Возрастная макулярная дегенерация и глаукома: мониторинг внутриглазного давления после интравитреальных инъекций. // **Вестник офтальмологии. - 2012. - № 6.- с.3-5.**
13. С.Э. Аветисов, В.П. Еричев, М.В. Будзинская, М.А. Карпилова, Т.В. Смирнова, И.В. Гурова, Е.А. Чикун (Вудс), О.А. Жабина, А.В. Кузнецов. Возможность эндовитреального введения ранибизумаба у пациентов с возрастной макулярной дегенерацией и глаукомой. // XII Всероссийская школа офтальмолога, Москва. – 2013
14. Будзинская М.В., Погода Т.В., Генерозов Э.В., Чикун (Вудс) Е.А., Гурова И.В., Щеголева И.В., Сизова М.В. Современные фармакогенетические подходы к лечению возрастной макулярной дегенерации // **Вестник офтальмологии. - 2013. - 5. - с. 128-135.**
15. Будзинская М.В., Погода Т.В., Генерозов Э.В., Чикун (Вудс) Е.А., Гурова И.В., Щеголева И.В., Сизова М.В. Влияние полиморфизма А(-251)Т гена интерлейкина-8 на клиническую картину и терапевтический ответ пациентов с экссудативной формой возрастной макулярной дегенерации. Научно-практическая конференция по офтальмохирургии с международным участием «Восток-Запад – 2013», Уфа. - 2013

16. Budzinskaya M.V., Pogoda T.V., Generazov E.V., Chikun (Woods) E.A., Gurova I.V., Shchegoleva I.V., Sizova M.V. A(-251)T polymorphism of Interleukin-8 gene in clinical appearance and treatment response in patients with wet age-related macular degeneration. // EURETINA 2013, September 2013, Hamburg, Germany

СПИСОК ПРИМЕНЯЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВМД – возрастная макулярная дегенерация
ДЗН – диск зрительного нерва
КО – кистовидный отек
МКМ - межклеточный матрикс
ОМО – общий макулярный объем
ОНЭ – отслойка нейроэпителия (сетчатки)
ОПЭ – отслойка пигментного эпителия (сетчатки)
ОКТ – оптическая когерентная томография (сетчатки)
ПЦР - полимеразная цепная реакция
РПЭ – ретинальный пигментный эпителий
СНМ – субретинальная неоваскулярная мембрана
СРБ – С-реактивный белок
ФАГД - флюоресцентная ангиография глазного дна
ФГБНУ НИИ ГБ - Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт глазных болезней»
ЦТС – центральная толщина сетчатки
ARMS2 - ген предрасположенности к возрастной макулопатии 2
CFH – фактор комплемента Н
HIF-1 - гипоксия-индуцированный фактор
HTRA1 - ген сериновой пептидазы *Htra1*
IL-8 – интерлейкин-8
MAP - киназный митогенактивирующий механизм
PEDF - тромбоцитарный фактор роста
SCRs - короткие тандемные повторы, или микросателлиты
SNP – однонуклеотидный полиморфизм
VEGF - фактор роста эндотелия сосудов