

УДК 617.7:612.13-092.9-085

© Коллектив авторов, 2012.

## ВЛИЯНИЕ ИНТРАВИТРЕАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ РАНИБИЗУМАБА, ПЕГАПТАНИБА НАТРИЯ, БЕВАЦИЗУМАБА НА ГЕМОДИНАМИКУ ГЛАЗ КРОЛИКОВ

**А.Р. Король, И.Н. Михейцева, Т.Б. Кустрин, И.О. Насинник, Н.П. Грубник**

*Государственное учреждение «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины» (директор член-корреспондент НАМН Украины, профессор Н.В. Пасечникова), г. Одесса.*

### HEMODYNAMIC EFFECTS OF INTRAVITREAL INJECTIONS OF RANIBIZUMAB, PEGAPTANIB SODIUM, BEVACIZUMAB IN RABBITS EYES

A.R. Korol, I.N. Miheiceva, T.B. Kustrin, I.O. Nasinnik, N.P. Grubnik

#### SUMMARY

In this paper we compare results of reoophthalmography before and 1 month after intravitreal injections of ranibizumab, pegaptanib sodium, bevacizumab in 14 rabbits (28 eyes). Relative volume pulse increased by 39,4 % ( $p=0,0008$ ) after pegaptanib sodium administration. In the group with ranibizumab we noticed anacrotism decrease by 27,2% ( $p=0,047$ ).

### ВПЛИВ ІНТРАВІТРЕАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ РАНИБІЗУМАБУ, ПЕГАПТАНІБУ НАТРИЯ, БЕВАЦИЗУМАБУ НА ГЕМОДИНАМІКУ ОЧЕЙ КРОЛИКІВ

A.P. Korol, I.M. Miheiceva, T.B. Kustrin, I.O. Nasinnik, N.P. Grubnik

#### РЕЗЮМЕ

Проведено порівняння показників реоофтальмографії до та через 1 місяць після інтравітреального введення ранибізумаба, пегаптанібу натрія, бевацизумаба 14 кроликів (28 очей). Встановлено збільшення відносного об'ємного пульсу після введення пегаптанібу натрія на 39,4 % ( $p=0,0008$ ) в порівнянні з цим показником до введення. В групі кроликів з ранибізумабом через 1 місяць відмічено зменшення анакроті на 27,2% в порівнянні з даними до введення ( $p=0,047$ ).

**Ключевые слова:** ранибизумаб, пегаптаніб натрія, бевацизумаб, реоофтальмографія, інтравитральні ін'єкції.

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) играет важную роль в патогенезе различных неоваскулярных заболеваний глаза, таких как экссудативная возрастная дегенерация макулы, пролиферативная диабетическая ретинопатия, ретинопатия недоношенных и др. [4,10]. VEGF представляет собой пептидную молекулу, которая принимает активное участие в регуляции васкулогенеза, ангиогенеза и сосудистой проницаемости [9]. VEGF- семейство состоит из VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и плацентарного фактора роста (PlGF), которые имеют различную связывающую способность со своими рецепторами. VEGF-A имеет ряд изоформ, патологической из которых считается VEGF 165 [3,5,11, 13,14].

Разработка анти- VEGF терапии в последнее десятилетие привело к появлению нового направления в современной офтальмологии [4]. Именно ингибирование активности VEGF лежит в основе лечения

неоваскулярных заболеваний глаз [6]. В настоящее время в клинической практике для интравитреального введения применяются ранибизумаб (Люцентис), пегаптаніб натрія (Макуген) и бевацизумаб (Авастин) [4, 12].

Ранибизумаб (Люцентис) - фрагмент рекомбинантного моноклонального антитела (Fab), который связывается со всеми биологически активными изоформами VEGF-A и блокирует их действие. Он имеет только один антиген - связывающий домен [16]. В 2010 году препарат был разрешен для применения в лечении неоваскулярной формы возрастной дегенерации макулы в Украине.

Пегаптаніб натрія (Макуген) – модифицированный олигонуклеотид, который связывается с высокой специфичностью с внеклеточным VEGF<sub>165</sub> и блокирует его действие. Впервые пегаптаніб натрія был применен для лечения ВМД в США в 2004 году, в Украине разрешен к применению с 2009 года.

Бевацизумаб (Авастин) представляет собой полноразмерное антитело против всех изоформ VEGF-A. С 2004 года он активно используется в онкологии для лечения рака толстого кишечника и прямой кишки. В 2005 году американские исследователи Rosenfeld и Puliafito сообщили о первом опыте применения бевацизумаба у пациентов с экссудативной формой ВМД [8].

Одним из осложнений интравитреального введения неселективных ингибиторов VEGF (бевацизумаба, ранибизумаба) является нарушение кровообращения в сосудах глаза. При проведении цветной доплерографии после интравитреального введения бевацизумаба отмечалось снижение скорости кровотока в центральной артерии сетчатки и в задней цилиарной артерии. Также наблюдалось повышение коэффициента сопротивления в центральной артерии сетчатки и в задней цилиарной артерии в раннем послеоперационном периоде, который восстанавливался через 1 месяц [7, 15].

Реофтальмография - метод исследования циркуляции крови в сосудистой системе увеального тракта, основанный на регистрации изменений сопротивления участка исследуемой ткани глаза проходящему через нее переменному электрическому току. Реофтальмография позволяет количественно оценить глазной кровоток, скорость движения крови в сосудах, а также эласто-тональные свойства сосудов глаза [2].

Нами не выявлены работы по сравнительному изучению влияния на глазной кровоток и эласто-тональные свойства сосудов препаратов, ингибирующих VEGF, при их интравитреальном введении.

Цель исследования: изучить влияние интравитреального введения ранибизумаба, пегаптана натрия и бевацизумаба на гемодинамику глаз кроликов.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование проводилось на 28 глазах 14 здоровых кроликов породы шиншилла, которые были разделены на 3 группы. Кроликам трех групп было выполнено интравитреальное введение препаратов в оба глаза через плоскую часть цилиарного тела под местной анестезией. В первой группе 4 кроликам (8 глаз) было введено 0,025 мл ранибизумаба (Люцентиса). Во второй группе 5 кроликам (10 глаз) было введено 0,05 мл пегаптана натрия (Макугена). Пяти кроликам третьей группы (10 глаз) было введено 0,25 мг (0,025 мл) бевацизумаба (Авастина). Дозировки вводимых препаратов соответствовали клинически применяемым дозировкам в перерасчете на объем глаза кроликов.

Для изучения кровообращения в глазах экспериментальных животных использовался метод рео-

офтальмографии. Реофтальмографическое исследование проводили на реографе РГЧ-02. В качестве записывающего устройства использовали энцефалограф ЧЭЭГ-4. Для регистрации реофтальмограмм применяли электрод с присосочной конструкции И.К. Чибирене. Запись проводили при калибровочном сигнале 0,25 Ом и при скорости протяжения ленты 30 мм/с.

Для оценки кровообращения глаза изучались временные и объемные показатели кровотока глаза. Временные показатели позволяли судить об эласто-тональных свойствах сосудов, объемные – о количестве крови, поступающей в глаз.

Среди временных характеристик определяли: длительность анакроты  $\alpha$  – изменение гемодинамики глаза в момент систолы, по которой судили о степени растяжимости сосудистой стенки;  $(\alpha/T)100\%$  - отношение длительности анакроты к длительности всей волны, позволяющее учесть частоту сердечных сокращений; показатель эластичности (растяжимости) сосудистой стенки за единицу времени  $(A/\alpha)$ .

В качестве объемных реографических показателей изучали: реографический коэффициент RQ, который показывает количество крови, поступившее в сосудистый тракт глаза в течение одного сердечного цикла; относительный объемный пульс PP, характеризующий количество крови, поступившее в глаз за единицу времени.

Исследования проводились до введения препарата и через 1 месяц после инъекции каждого препарата.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью компьютерной программы Statistica 7.0. Результаты исследования представлены как среднее значение выборки (M) и стандартное отклонение (SD). Для оценки статистической значимости различий данных в экспериментальных группах до и после введения препаратов использовался критерий Ньюмана-Кейсла.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные реофтальмограмм трех групп кроликов до и после интравитреального введения изучаемых препаратов представлены в таблице 1.

Исследования показали, что через 1 месяц после введения препарата ранибизумаба отмечено статистически значимое изменение временной характеристики реофтальмограммы. Наблюдалось снижение длительности анакроты на 27,2% в сравнении с данными до введения ( $p=0,047$ ). Снижение этого показателя реограммы может свидетельствовать об улучшении эластичности стенок сосудов глаза. Изменения других показателей в этой группе были статистически незначимы. Однако на данной выборке отмечена тенденция снижения объема поступающей в глаз крови: рео-

Таблица 1

Показатели реофтальмографии у кроликов до и через 1 месяц после интравитреального введения ранибизумаба, пегаптаниба натрия, бевацизумаба

Изучаемые показатели M (SD)	Группа с ранибизумабом		Группа с пегаптанибом натрия		Группа с бевацизумабом	
	До	Через 1 мес.	До	Через 1 мес.	До	Через 1 мес.
RQ	4,0 (0,3)	3,65 (0,28)	4 (0,14)	3,75 (0,55)	3,99 (0,28)	3,93 (0,25)
PP	15,6 (3,8)	15,28 (2,18)	14,41(1,79)	20,1 (4,52)	15,25 (2,25)	13,83 (1,47)
A	0,125 (0,044)	0,091 (0,01)	0,104 (0,015)	0,079 (0,019)	0,11 (0,01)	0,107 (0,02)
$\alpha/T \times 100\%$	45,8 (8,0)	38,62 (8,34)	36,63 (3,38)	41,52 (8,97)	43,45 (8,27)	37,08 (7,98)
A $\alpha$	282 (86)	340 (72,58)	321,8 (42,5)	394 (124,36)	294,3 (31,3)	321,5 (65,6)

графический коэффициент уменьшился на 8,8%, относительный объемный пульс – на 2 %.

Анализ данных показателей реограмм в группе с пегаптанибом натрия показал, что через 1 месяц после введения наблюдалось статистически значимое повышение глазного кровотока. Отмечалось увеличение относительного объемного пульса на 39,4% в сравнении с измерением до инъекции ( $p=0,0008$ ). В то же время изменения реографического коэффициента не были значимы. Также, не смотря на то, что характеристики тонуса сосудов реофтальмограмм в этой группе заметно менялись через 1 месяц (длительность анакроты уменьшилась на 24%; показатель эласто-тональных свойств сосудов увеличился на 13%; показатель растяжимости сосудистой стенки увеличился на 22%), статистической значимости этих изменений выявлено не было.

В настоящем исследовании по результатам реофтальмографии не отмечено статистически значимых изменений как объемных, так и тональ-

ных характеристик глазного кровотока у кроликов через 1 месяц после интравитреального введения бевацизумаба. Отмечена тенденция к снижению глазного кровотока - относительный объемный пульс уменьшился на 9%; и тонуса сосудов в глазу - показатель эласто-тональных свойств сосудов снизился на 15,4% ( $p>0,05$ ).

На рисунке 1 представлены данные относительного объемного пульса в трех экспериментальных группах кроликов до введения и через 1 месяц после введения препаратов.

При сравнении реографических показателей через 1 месяц после введения препаратов между группами с бевацизумабом и ранибизумабом статистически значимые различия не найдены. Статистически значимое увеличение относительного объемного пульса было отмечено после интравитреального введения пегаптаниба натрия по сравнению с бевацизумабом ( $p=0,0005$ ) и ранибизумабом ( $p=0,0026$ ).

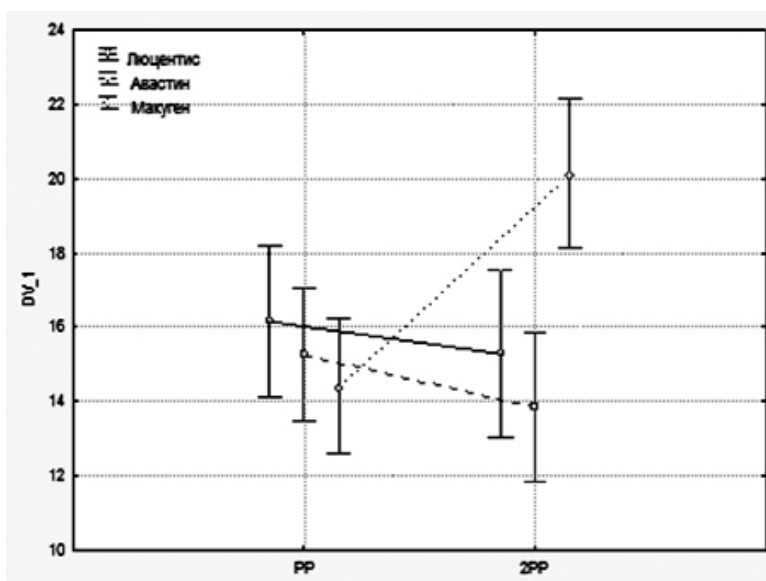


Рис.1 Относительный объемный пульс в реофтальмограммах трех групп кроликов. PP - относительный объемный пульс до интравитреального введения препаратов, и 2PP- через 1 мес. Люцентис (ранибизумаб), Макуген (пегаптаниб натрия), Авастин (бевацизумаб).

При проведении электронной микроскопии сосудистой и сетчатой оболочек кроликов через 1 месяц после интравитреального введения макугена, обнаружены расширение сосудов сосудистой оболочки, отек межуточной ткани, слабо выраженная фенестрации эндотелия; после интравитреального введения бевацизумаба наблюдались расширение сосудов, хорошо выраженная фенестрации эндотелия, отек эндотелия с ультраструктурными изменениями [1].

#### ВЫВОДЫ

Через 1 месяц после однократного интравитреального введения препаратов пегаптаниба натрия у кроликов отмечалось статистически значимое увеличение относительного объемного пульса на 39,4% по сравнению с измерением до инъекции ( $p=0,0008$ ), что может свидетельствовать о повышении глазного кровотока. Через 1 месяц после интравитреального введения ранибизумаба у кроликов наблюдалось снижение длительности анакроты на 27,2% по сравнению с данными до введения ( $p=0,047$ ), что может свидетельствовать об улучшении эластичности стенок сосудов глаза. Влияние бевацизумаба на гемодинамику глаз здоровых кроликов в настоящем исследовании было статистически не достоверно.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Думброва Н.Е. Структурные изменения хориоидеи и сетчатки кроликов при интравитреальном введении селективных и неселективных ингибиторов факторов роста эндотелия сосудов / Н.Е. Думброва, А.Р. Король, И.О. Насинник // Офтальмологический журнал.- 2012.- №3.- с.68-72.
2. Лазаренко В.И. Функциональная реография глаза. – Красноярск, «Растр». – 2000. - 160с.
3. Bauer S.M. Vascular endothelial growth factor-C promotes vasculogenesis, angiogenesis, and collagen constriction in three-dimensional collagen gels / S.M. Bauer, R.J. Bauer, Z.J. Liu// Journal of Vascular Surgery.- 2005.-Vol. 41(4). - P.699–707.
4. Bhisitkul R.B. Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments / R.B. Bhisitkul // British Journal of Ophthalmology. - 2006. -Vol. 90(12). - P.1542–1547.
5. Boyd S.R. Correlation of increased vascular endothelial growth factor with neovascularization and permeability in ischemic central vein occlusion / S.R. Boyd, I. Zachary, U. Chakravarthy// Archives of Ophthalmology.- 2002.- Vol. 120 (12). - P. 1644–1650.
6. Ciulla T. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for neovascular ocular diseases other than age-related macular degeneration / T. Ciulla, P. Rosenfeld // Current Opinion in Ophthalmology. – 2009. -Vol. 20 (3). - P.166–174.
7. Dimitrova G. Colour Doppler Imaging of Ocular and Orbital Blood Vessels in Retinal Diseases / G. Dimitrova // European Ophthalmic Review.- 2011.- Vol. 5(1). - P.16-19.
8. Ferrara N., Henzel W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells / N. Ferrara, W.J. Henzel // Biochemical and Biophysical Research Communications.- 1989.-Vol. 161 (2). - P. 851–858.
9. Ishida S. VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina/ S. Ishida, T. Usui, K. Yamashiro// Investigative Ophthalmology and Visual Science. – 2003. -Vol. 44 (5).- P. 2155–2162.
10. Keane P.A. Development of Anti-VEGF Therapies for Intraocular Use: A Guide for Clinicians / P.A. Keane, S.R. Sadda // J Ophthalmol.-2012.-483034. – Dec. 18.
11. Noma H. Intravitreal levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 are correlated with macular edema in branch retinal vein occlusion / H. Noma, A. Minamoto, H. Funatsu // Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. - 2006. - Vol. 244 (3). - P. 309–315.
12. Ng E.W. Targeting angiogenesis, the underlying disorder in neovascular age-related macular degeneration / E.W. Ng, A.P. Adamis // Canadian Journal of Ophthalmology. – 2005. - Vol. 40 (3). - P. 352–368.
13. Rakic J. Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization / J.M. Rakic, V. Lambert, L. Devy // Investigative Ophthalmology and Visual Science.- 2003. - Vol. 44 (7). - P. 3186–3193.
14. Storkbaum E. VEGF: a critical player in neurodegeneration / E. Storkbaum, P. Carmeliet // Journal of Clinical Investigation. -2004. - Vol. 113 (1). - P.14–18.
15. Short-term effects of intravitreal bevacizumab (Avastin®) on retrobulbar hemodynamics in patients with neovascular age-related macular degeneration / Y. Toklu, H.B. Cakmak, S. Raza [et al] // Acta Ophthalmol.- 2011.- Vol.89.- Issue 1.- P. 41-45.
16. Zarbin M. Current Treatment of Age-Related Macular Degeneration / M. Zarbin, B. Szirth // Optom Vis Sci.- 2007. - Vol.84 - P. 559–72.