

# Изучение уровня про- и антиангиогенных факторов роста в стекловидной жидкости при неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации на фоне лечения

М.М. Архипова<sup>1</sup>В.Г. Лихванцева<sup>2,3</sup>А.С. Геворкян<sup>3</sup>С.И. Рычкова<sup>4</sup>, С.А. Сельков<sup>5</sup><sup>1</sup> Центральная клиническая больница Российской академии наук  
Литовский бульвар, 1а, Москва, 117588, Российская Федерация<sup>2</sup> ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — «Федеральный биофизический центр им. А.И. Бурназяна»  
Федерального медико-биологического агентства  
ул. Гамалеи, 15, Москва, 123098, Российская Федерация<sup>3</sup> Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской  
помощи и медицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства  
Волоколамское шоссе, 91, Москва, 125310, Российская Федерация<sup>4</sup> Медико-биологический университет инноваций и образования ФГБУ «Федеральный биофизический центр им. А.И. Бурназяна»  
Федерального медико-биологического агентства  
ул. Маршала Новикова, 23, Москва, 123098, Российская Федерация<sup>5</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии» им. Д.О. Отта  
Менделеевская линия, 3, Санкт-Петербург, 199034, Российская Федерация

## РЕЗЮМЕ

## Офтальмология. 2022;19(2):368–377

**Цель работы:** изучить уровень про- и антиангиогенных факторов роста в стекловидной жидкости глаз с неоваскулярной формой возрастной макулярной дегенерации (нВМД) на фоне антиангиогенной терапии. **Пациенты и методы.** Определяли концентрацию проангиогенных (IL-8, angiogenin, TNF- $\alpha$ , VEGF, bFGF) и антиангиогенных (IFN- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) факторов роста в стекловидной жидкости больных нВМД методом мультиплексной проточной цитометрии. В качестве групп сопоставления служили больные с сенильной катарактой без признаков ВМД и больные катарактой, отягощенные наивной (нелеченой) нВМД. **Результаты.** По сравнению с сенильной катарактой в стекловидной жидкости глаз с леченой нВМД чаще и на более высоком уровне присутствовали проангиогенные цитокины TNF- $\alpha$  (75 против 47,5 %,  $p < 0,05$ ;  $2,4 \pm 0,5$  против  $1,4 \pm 0,3$  пг/мл,  $p < 0,05$ ), ИЛ-8 (100 против 75 %,  $p < 0,01$ ;  $492,9 \pm 75,7$  против  $8,5 \pm 1,5$  пг/мл,  $p < 0,01$ ), ангиогенин ( $3822,4 \pm 498,6$  против  $2820,2 \pm 319,3$ ,  $p < 0,01$ ) и FGFb ( $58,3$  против  $26,7$  %,  $p < 0,05$ ;  $10,1 \pm 5,9$  против  $2,7 \pm 1,0$ ,  $p < 0,01$ ). В обеих группах больных практически не выявлены антиангиогенные факторы IFN- $\gamma$  и TGF- $\beta$ , но достоверно выше была концентрация IFN- $\alpha$  ( $6,4 \pm 1,7$  против  $4,4 \pm 0,4$ ,  $p < 0,01$ ). Уровни VEGF в обеих нозологических группах оказались практически идентичны:  $17,5 \pm 14,0$  (при нВМД) против  $18,4 \pm 3,2$  (н/д), при этом VEGF обнаружен в СТЖ в катарактальной группе достоверно чаще ( $68,2$  против  $17$  %,  $p < 0,01$ ). В порядке объяснения авторы предположили, что поскольку пациентам с нВМД ранее уже вводили антиангиогенный препарат ранибизумаб, то, возможно, продукция VEGF находилась под контролем препарата, то есть была подавлена или блокирована. **Заключение.** Повышенные уровни проангиогенных факторов роста IL-8, ангиогенина, TNF- $\alpha$  и bFGF в стекловидной жидкости при нВМД на фоне антиангиогенной терапии ранибизумабом позволяют говорить о наличии других, независимых от VEGF, действующих механизмов стимуляции ангиогенеза. Отсутствие антиангиогенных факторов роста IFN- $\gamma$  и TGF- $\beta$  в стекловидной жидкости дает возможность думать о наличии дефекта в контроле и регуляции ангиогенеза при нВМД. Редкое обнаружение VEGF в комплексе с достоверным снижением его концентрации по сравнению с сенильной катарактой на фоне лечения ранибизумабом глаз с нВМД демонстрирует целевое ингибирование на практике. На фоне лечения ангиостатическими препаратами происходит инверсия ангиогенного фенотипа с формированием новых обходных путей ангиогенеза, что, по-видимому, диктует необходимость подключения препаратов с другими механизмами действия.

**Ключевые слова:** возрастная макулярная дегенерация, факторы роста, стекловидная жидкость, ангиогенез, антиангиогенная терапия

**Для цитирования:** Архипова М.М., Лихванцева В.Г., Геворкян А.С., Рычкова С.И., Сельков С.А. Изучение уровня про- и антиангиогенных факторов роста в стекловидной жидкости при неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации. *Офтальмология*. 2022;19(2):368–377. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2022-2-368-377>

**Прозрачность финансовой деятельности:** Никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах

**Конфликт интересов отсутствует**



# Study of the Level of Pro- and Antiangiogenic Growth Factors in Vitreous Fluid in Neovascular Age-Related Macular Degeneration on the Background of Treatment

M.M. Arkhipova<sup>1</sup>, V.G. Likhvantseva<sup>2,3</sup>, A.S. Gevorgyan<sup>3</sup>, S.I. Rychkova<sup>4</sup>, S.A. Selkov<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Central Clinical Hospital of the Russian Academy of Sciences  
Litovsky blvd, 1a, Moscow, 117588, Russian Federation

<sup>2</sup> A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA of Russia  
Gamalei str., 15, Moscow, 123098, Russian Federation

<sup>3</sup> Academy of postgraduate education of FMBA of Russia  
Volokolamskoe highway 91, Moscow, 125371, Russian Federation

<sup>4</sup> Medical and biological university of innovation and continuing education A.I. Burnazyan FMBC of FMBA of Russia  
Marshal Novikov str., 23, Moscow, 123098, Russian Federation

<sup>5</sup> Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproduction named after D.O. Ott  
Mendeleevskaya Line, 3, St. Petersburg, 199034, Russian Federation

## ABSTRACT

Ophthalmology in Russia. 2022;19(2):368-377

**Purpose:** to study the level of pro- and antiangiogenic growth factors in the vitreous fluid of the eyes with the neovascular form of age-related macular degeneration (nAMD) against the background of antiangiogenic therapy. **Patients and methods.** The concentration of proangiogenic (IL-8, angiogenin, TNF- $\alpha$ , VEGF, bFGF) and antiangiogenic (IFN- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) growth factors in the vitreous fluid of nAMD patients was determined by multiplex flow cytometry. Patients with senile cataracts without signs of AMD and cataract patients burdened with naive (untreated) nAMD were in the comparison groups. **Results.** Compared with senile cataracts, proangiogenic cytokines TNF- $\alpha$  were present more frequently and at a higher level in the vitreous fluid of the eyes with treated nAMD (75 % vs. 47.5 %,  $p < 0.05$ ; Msr  $\pm$  m:  $2.4 \pm 0.5$  vs.  $1.4 \pm 0.3$  pg/ml,  $p < 0.05$ ), IL-8 (100 % vs. 75 %,  $p < 0.01$ ;  $492.9 \pm 75.7$  vs.  $8.5 \pm 1.5$  pg/ml,  $p < 0.01$ ), angiogenin ( $3822.4 \pm 498.6$  vs.  $2820.2 \pm 319.3$ ,  $p < 0.01$ ) and FGFb ( $58.3$  % vs.  $26.7$  %,  $p < 0.05$ ;  $10.1 \pm 5.9$  vs.  $2.7 \pm 1.0$ ,  $p < 0.01$ ). In both groups of patients, antiangiogenic factors IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  were practically not detected, but the concentration of IFN- $\alpha$  was significantly higher ( $6.4 \pm 1.7$  versus  $4.4 \pm 0.4$ ,  $p < 0.01$ ). VEGF levels in both nosological groups were almost identical:  $17.5 \pm 14.0$  (with nAMD) versus  $18.4 \pm 3.2$  (n/a), while VEGF was found in vitreous fluid in the cataract group significantly more often ( $68.2$  % vs.  $17$  %,  $p < 0.01$ ). By way of explanation, the authors suggested that since patients with nAMD had previously been administered the anti-angiogenic drug Ranibizumab, it is possible that the VEGF production was under the control of the drug, that is, suppressed or blocked. **Conclusion.** Elevated levels of proangiogenic growth factors IL-8, angiogenin, TNF- $\alpha$  and bFGF in vitreous fluid with nAMD against the background of antiangiogenic therapy with ranibizumab suggest the presence of other, independent of VEGF, acting mechanisms for stimulating angiogenesis. The absence of antiangiogenic growth factors IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  in the vitreous fluid allows us to think about the presence of a defect in the control and regulation of angiogenesis in nAMD. The rare detection of VEGF in combination with a significant decrease in its concentration compared to senile cataracts against the background of treatment with ranibizumab of the eyes with nAMD demonstrates targeted inhibition in practice. Against the background of treatment with angiostatic drugs, an inversion of the angiogenic phenotype occurs with the formation of new workarounds of angiogenesis, which apparently dictates the connection of drugs with other mechanisms of action.

**Keywords:** age-related macular degeneration, growth factors, vitreous fluid, angiogenesis, antiangiogenic therapy

**For citation:** Arkhipova M.M., Likhvantseva V.G., Gevorgyan A.S., Rychkova S.I., Selkov S.A. Study of the Level of Pro- and Antiangiogenic Growth Factors in Vitreous Fluid in Neovascular Age-Related Macular Degeneration on the Background of Treatment. *Ophthalmology in Russia*. 2022;19(2):368-377. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2022-2-368-377>

**Financial Disclosure:** No author has a financial or property interest in any material or method mentioned

**There is no conflict of interests**

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) является ведущей причиной необратимой потери зрения и слепоты среди пожилых людей в развитых странах. Поздняя стадия ВМД имеет два клинических фенотипа: сухая и экссудативная или неоваскулярная (нВМД). Последняя без лечения приводит к потере центрального зрения в течение 2–5 лет. Маркером нВМД является неоваскуляризация (МНВ). Установлено, что источником новообразованных сосудов МНВ могут быть не только хориоидальные, но и сосуды глубокого ретинального сплетения [1]. Несмотря на достигнутые успехи в изучении патогенеза патологического процесса при нВМД, этот вопрос остается

до конца не изученным. Современные терапевтические технологии, имеющиеся в настоящее время в арсенале офтальмологов, направлены в основном на блокировку ключевого проангиогенного фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), которому принадлежит ведущая роль в развитии МНВ. Накопленный опыт офтальмологического сообщества и многочисленные клинические исследования, охватившие 43 страны и более 30 000 больных ВМД, свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале данной стратегии [2–4], что отражено и в российских Федеральных рекомендациях [5]. Наряду с этим установлено, что далеко не во всех случаях эта фармакологическая стратегия работает. В реальной клинической практике наблюдается непродолжительность

терапевтического эффекта узконаправленной (таргетной) терапии, которая требует частых визитов пациента и многократных инъекций препарата.

Кроме того, клиническая практика показывает, что даже при многолетних и многократных инъекциях анти-VEGF-препаратов в ряде случаев не удается достигнуть полного подавления роста МНВ и купирования развития заболевания [6]. Исследования свидетельствуют о присутствии в популяции МНВ больных с первичной резистентностью к анти-VEGF-препаратам [7–10]. Кроме того, выявлены случаи снижения ответа на вводимый препарат в течение первых 2-х лет и формирования вторичной резистентности и тахифилаксии [6–9, 11]. В связи с этим в мире происходит непрерывный поиск новых терапевтических мишеней. Развитие фармакологических стратегий сопровождается появлением все новых и новых препаратов с функциями одновременного подавления не только VEGF, но и некоторых других пролиферативных факторов, участвующих в развитии МНВ. Отсюда постоянное расширение арсенала анти-VEGF-препаратов и повышение требований к ним [12].

К настоящему времени неизвестны точные алгоритмы формирования резистентности и тахифилаксии. Первый шаг на пути к пониманию этого аспекта проблемы лежит в изучении сложного каскада процессов неоваскуляризации с выработкой различных про- и антиангиогенных факторов роста на фоне лечения. Целью настоящего исследования стало изучение некоторых про- и антиангиогенных факторов роста в стекловидной жидкости глаз у больных с нВМД на фоне проводимой антиангиогенной терапии, а также у больных без нВМД и у больных с нелеченой нВМД.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Наблюдали 72 пациентов, которые были разделены на 3 группы. Первая группа была представлена больными с нВМД ( $n = 24$ ), ранее получавшими две-три эндовитреальные инъекции препарата ранибизумаб. Вторая группа состояла из пациентов с сенильной катарактой без признаков ВМД ( $n = 38$ ). Третья группа включала больных с катарактой, осложненной наивной нВМД (нелеченой) ( $n = 10$ ).

Диагноз верифицировали методами офтальмоскопии, оптической когерентной томографии сетчатки и флуоресцентной ангиографии глазного дна.

Исследование было одобрено Этическим комитетом ЦКБ РАН. У всех пациентов получено информированное согласие на проведение операции и забор стекловидной жидкости, а также использование данных исследования в научных целях. Исследование имело проспективный поперечный (статичный) дизайн.

Стекловидную жидкость (СТЖ) забирали в объеме 50 мкл перед фактоэмульсификацией катаракты или перед очередным интравитреальным введением ингибитора ангиогенеза во избежание ятрогенных

эффектов, вызванных операцией. Пробы СТЖ помещали в пробирки эппендорфа и хранили в морозильной камере при температуре  $-40^{\circ}$  до момента проведения лабораторных исследований.

В образцах СТЖ больных определяли концентрацию 8 ключевых цитокинов и ростовых факторов, потенциально участвующих в ангиогенезе. Использовали тест-систему «BD Cytometric Bead Array» (BD, США) и восьмицветный проточный цитофлуориметр «FACS Canto II» (Beckton Dickinson, США). Технология BD Cytometric Bead Array (CBA) позволяет точно и быстро обнаружить большой спектр активных веществ в одном образце биологической жидкости малого объема (50 мкл). Концентрацию цитокинов определяли методом мультиплексной проточной цитометрии с помощью бус, покрытых антителами к цитокинам IL-8, ангиогенину, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , VEGF, bFGF, TGF- $\beta$ , в соответствии с инструкцией производителя (BD, США).

Для оценки положения бус использовали флуоресцентные красители APC и APC-Cy7, концентрацию антигена оценивали по интенсивности флуоресценции по каналу красителя PE. В основе метода лежит иммунная реакция антигена (АГ) с антителом (АТ). Микрочастицы определенной интенсивности флуоресценции имеют на своей поверхности АТ к определенному АГ. После инкубации биологического материала с микрочастицами проводили инкубацию с проявляющимися АТ. При проведении проточной цитометрии исследуемых образцов происходит разделение специфических биологически активных веществ, связанных с микрочастицами с дискретной флуоресценцией по трем каналам флуоресценции. Во избежание перекрывания бус по размерам цитокины были сгруппированы следующим образом:

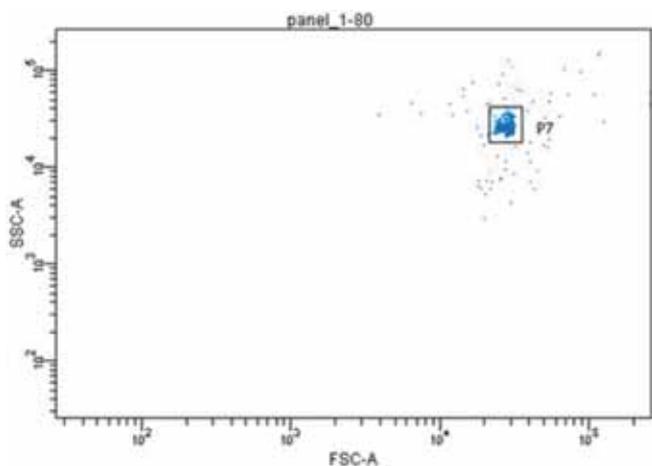
1. IL-8 (бусы А9), TNF- $\alpha$  (бусы С4), IFN- $\alpha$  бусы (В8);
2. VEGF (бусы В8), bFGF (бусы С5), ангиогенин (бусы С4);
3. IFN- $\gamma$  (бусы В8);
4. TGF- $\beta$  (бусы В6).

**Первая панель — анализ содержания IL-8 (А9), TNF- $\alpha$  (С4), IFN- $\alpha$  (В8):**

Измерение проводили на восьмицветном проточном цитофлуориметре «FACS Canto II» (Beckton Dickinson, США). Данные по прямому и боковому светорассеянию исследуемых бус отражались на двумерной гистограмме FSC/SSC (рис. 1), полученной с монитора цитофлуориметра. Затем выделяли облако бус гейтом P7, а затем события из гейта P7 отображали на двумерной гистограмме APC/APC-Cy7 (рис. 2). В каждом гейте измеряли интенсивность флуоресценции по каналу PE и определяли концентрацию цитокина по сравнению со стандартом, поставляемым производителем.

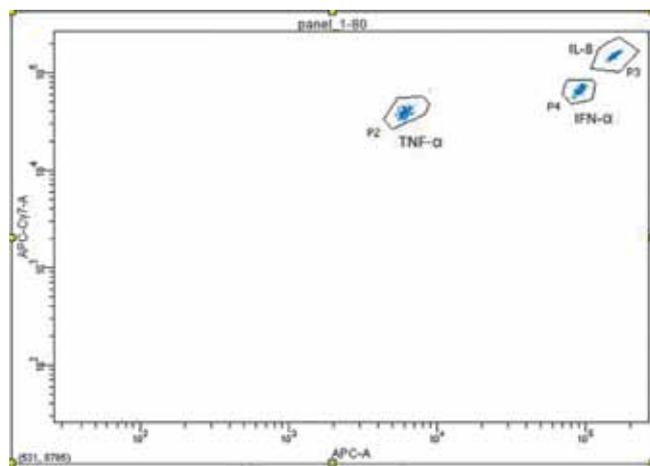
**Вторая панель — анализ содержания VEGF (В8), bFGF (С5), ангиогенин (С4):**

Данные по прямому и боковому светорассеянию исследуемых бус отражали на двумерной гистограмме



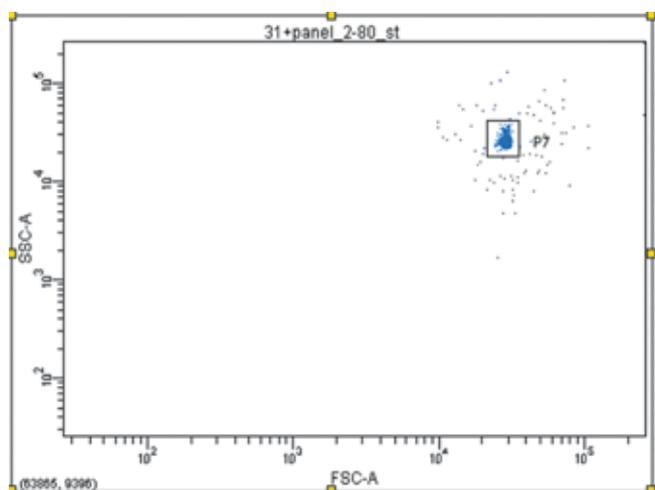
**Рис. 1.** Двумерная гистограмма в координатах FSC/SSC

**Fig. 1.** Two-dimensional histogram in FSC/SSC coordinates



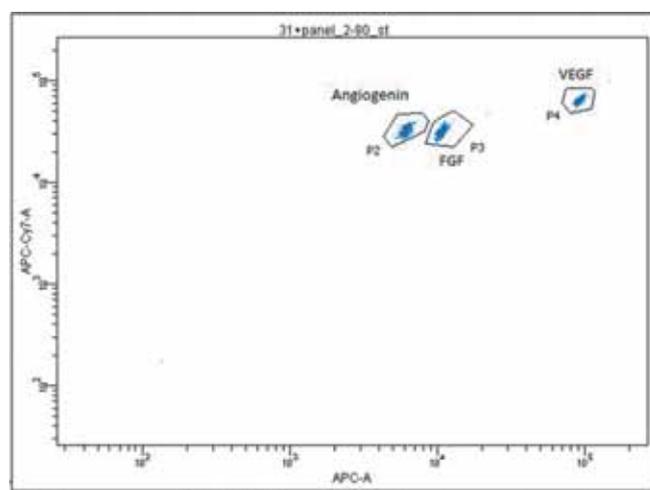
**Рис. 2.** Распределение бус из гейта P7 в координатах APC/APC-Cy7

**Fig. 2.** Distribution of beads from gate P7 in coordinates APC/APC-Cy7



**Рис. 3.** Двумерная гистограмма в координатах FSC/SSC

**Fig. 3.** Two-dimensional histogram in FSC/SSC coordinates



**Рис. 4.** Распределение бус из гейта P7 в координатах APC/APC-Cy7. Вторая панель

**Fig. 4.** Distribution of beads from gate P7 in coordinates APC/APC-Cy7. Second panel

FSC/SSC (рис. 3). Затем выделяли облако бус гейтом P7, а затем события из гейта P7 отображали на двумерной гистограмме APC/APC-Cy7 (рис. 4). В каждом гейте измеряли интенсивность флуоресценции по каналу PE для определения концентрации цитокина по сравнению со стандартом, поставляемым производителем.

#### Третья панель — анализ содержания IFN- $\gamma$ (B8):

Данные по напрямую и боковому светорассеянию исследуемых бус отражали на двумерной гистограмме FSC/SSC (рис. 5). Затем выделяли облако бус гейтом P7, а после события из гейта P7 отображали на двумерной гистограмме APC/APC-Cy7 (рис. 6). В каждом гейте измеряли интенсивность флуоресценции по каналу PE для определения концентрации цитокина по сравнению со стандартом, поставляемым производителем.

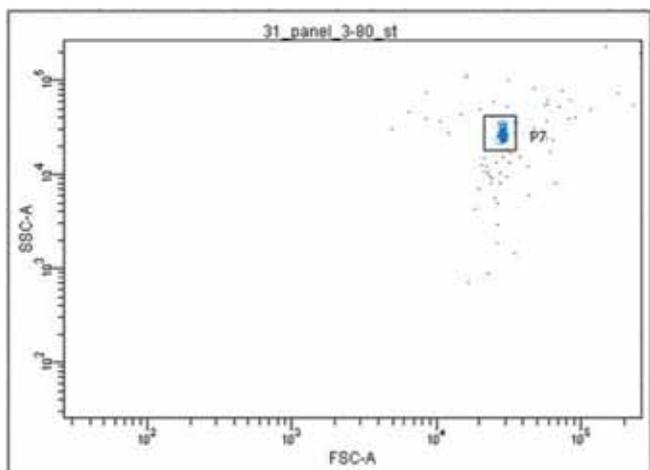
#### Четвертая панель — анализ содержания TGF- $\beta$ (B6):

Данные по напрямую и боковому светорассеянию исследуемых бус отражали на двумерной гистограмме

FSC/SSC (рис. 7). Затем выделяли облако бус гейтом P7, а затем события из гейта P7 отображали на двумерной гистограмме APC/APC-Cy7 (рис. 8). В каждом гейте измеряли интенсивность флуоресценции по каналу PE для определения концентрации цитокина по сравнению со стандартом, поставляемым производителем.

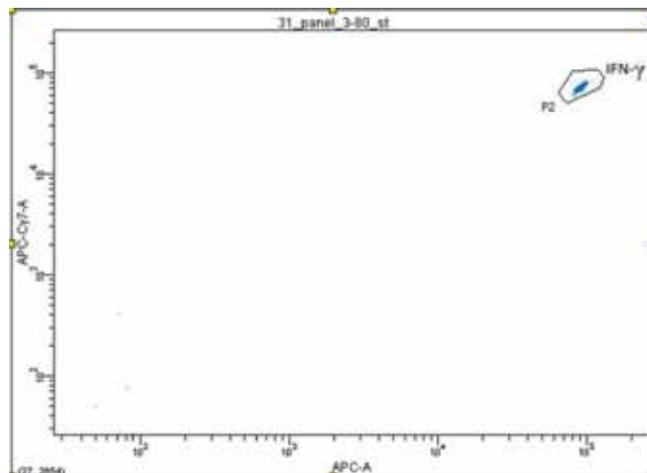
Исследования выполняли в лаборатории клинической иммунологии учреждения Российской академии медицинских наук «НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта» Северо-Западного отделения РАМН (рук. — профессор С.А. Сельков).

Статистический анализ полученных данных проводили при помощи компьютерной программы SPSS. Для сравнения показателей в разных группах пациентов использовали непараметрический критерий Манна — Уитни ( $U$ -test).



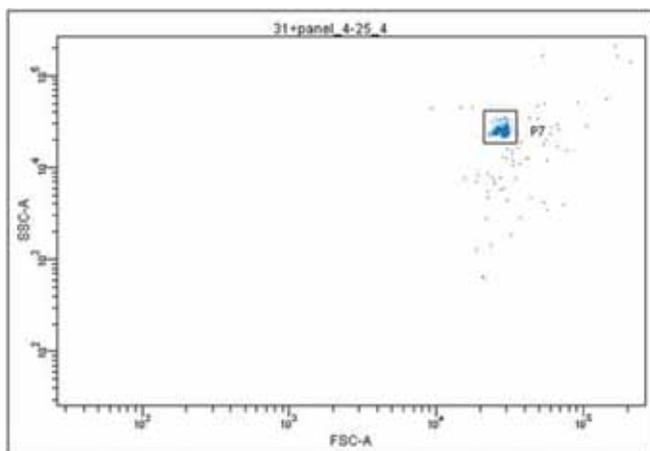
**Рис. 5.** Двумерная гистограмма в координатах FSC/SSC

**Fig. 5.** Two-dimensional histogram in FSC/SSC coordinates



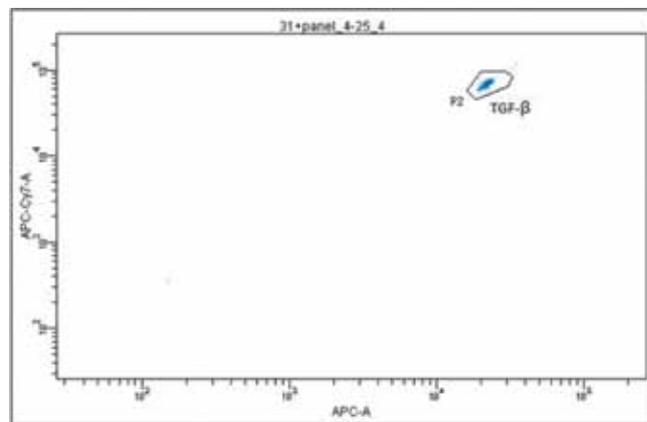
**Рис. 6.** Распределение бус из гейта P7 в координатах APC/APC-Cy7

**Fig. 6.** Distribution of beads from gate P7 in coordinates APC/APC-Cy7



**Рис. 7.** Двумерная гистограмма в координатах FSC/SSC

**Fig. 7.** Two-dimensional histogram in FSC/SSC coordinates



**Рис. 8.** Распределение бус из гейта P7 в координатах APC/APC-Cy7

**Fig. 8.** Distribution of beads from gate P7 in coordinates APC/APC-Cy7

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Поскольку у нас не было показателей абсолютно здоровых глаз (норма), то мы сравнивали показатели в интересующей нас группе 1 больных с леченой нВМД с группами сопоставления 2 и 3. Показатели группы 3, в которой катаракта осложнялась наивной нВМД, мы принимали за условно приближенные к тем, которые могли бы быть до лечения. В этой группе имелись клинические признаки МНВ. А показатели больных только катарактой в группе сопоставления 2 принимали за те, которых нужно достичь в ходе лечения, поскольку на их фоне отсутствовали признаки МНВ.

По сравнению с сенильной катарактой в СТЖ глаз с леченой нВМД чаще и на более высоком уровне присутствовали проангиогенные цитокины TNF- $\alpha$  (75 против 47,5 %,  $p < 0,05$ ;  $2,4 \pm 0,5$  против  $1,4 \pm 0,3$  пг/мл,  $p < 0,05$ ), ИЛ-8 (100 против 75 %,  $p < 0,01$ ;  $492,9 \pm 75,7$  против  $8,5 \pm 1,5$  пг/мл,  $p < 0,01$ ), ангиогенин ( $3822,4 \pm 498,6$  против  $2820,2 \pm 319,3$ ,  $p < 0,01$ )

и FGFb (58,3 против 26,7 %,  $p < 0,05$ ;  $10,1 \pm 5,9$  против  $2,7 \pm 1,0$ ,  $p < 0,01$ ). В обеих группах больных практически не выявляли антиангиогенные факторы IFN- $\gamma$  и TGF- $\beta$ , но достоверно выше была концентрация IFN- $\alpha$  ( $6,42 \pm 1,71$  против  $4,42 \pm 0,41$ ,  $p < 0,01$ ). Уровни VEGF в обеих нозологических группах оказались практически идентичны:  $17,5 \pm 14,0$  (при нВМД) против  $18,4 \pm 3,2$  при катаракте, при этом частота его обнаружения в катарактальной группе была достоверно выше (68,2 против 17 %,  $p < 0,01$ , табл. 1).

Вполне ожидаемо, что по сравнению с показателями группы сопоставления 3 ( $M_{ср} \pm m$ :  $26,7 \pm 0,9$  пг/мл,  $p < 0,01$ , табл. 1) в интересующей нас группе 1 на фоне двух-трех эндовитреальных инъекций ангиостатика были снижены уровни ключевого проангиогенного фактора, запускающего ангиогенез — VEGF, с приближением к уровням больных с катарактой (рис. 9).

Это отражалось и на концентрации VEGF, и на частоте его выявления (17 % в группе 1 против 100 % в группе 3,

**Таблица 1.** Концентрация проангиогенных и антиангиогенных цитокинов в стекловидной жидкости при катаракте и неоваскулярной форме ВМД**Table 1.** Concentration of proangiogenic and antiangiogenic cytokines in vitreous fluid in cataracts and neovascular AMD

Нозологическая группа / Nosological group	Показатели / Indicators	Концентрация, пг/мл / Concentration pg/ml							
		TNF	IFN $\alpha$	IL-8	Angiogenin	VEGF	FGFb	IFN- $\gamma$	TGFb
ВМД / AMD (n = 24)	Средние / Average, $M \pm m$	2,4 $\pm$ 0,5* <sup>†</sup>	6,4 $\pm$ 1,7** <sup>†</sup>	92,9 $\pm$ 75,7*** <sup>†</sup>	3822,4 $\pm$ 498,6*** <sup>†</sup>	17,5 $\pm$ 14,0	10,1 $\pm$ 5,9**	24,0	-
	Станд. отклонение / Standard deviation ( $\sigma$ )	1,6	6,0	265,3	1745,5	48,9	20,8	-	-
	Me [Q1; Q3]	2,6 [0,6; 3,3]	5,2 [4,0; 7,8]	12,9 [5,4; 22,9]	3408,2 [4506,8; 2542,1]	2,7 [0; 2,7]	10,8 [0; 10,8]	-	-
	Коридор значений / Value corridor	0,0–5,7	0–24,4	4,6–972,4	1535,0–7530,0	0,0–163,9	0,0–76,8	0,0–24,0	-
	Частота выявления / Frequency of detection	75 %	83 %	100 %	100 %	17 %	58,3 %	8,3 %	-
Катаракта / Cataract (n = 38)	Средние / Average, $M \pm m$	1,4 $\pm$ 0,3	4,4 $\pm$ 0,4	8,5 $\pm$ 1,5	2820,2 $\pm$ 319,3	18,4 $\pm$ 3,2	2,7 $\pm$ 1,0	-	206,3
	Станд. отклонение / Standard deviation ( $\sigma$ )	1,4	1,8	6,7	1404,9	14,2	4,6	-	-
	Me [Q1; Q3]	0,9 [0; 2,67]	4,8 [3,77; 5,28]	6,9 [4,39; 10,14]	2471,1 [1549,6; 3855,37]	17,8 [5,44; 30,2]	9,3 [0; 9,27]	-	-
	Коридор значений / Value corridor	0,0–3,3	0,0–6,8	0,0–27,7	848,4–6194,6	0,0–36,7	0,0–11,4	-	0,0–206,3
	Частота выявления / Frequency of detection	47,5 %	74,3 %	74,3 %	100 %	68,2 %	26,7 %	0,0 %	5,3 %
Катаракта + ВМД / Cataract + AMD (n = 10)	Средние / Average, $M \pm m$	3,5 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 1,1	5,3 $\pm$ 0,4	5715,8 $\pm$ 697,6	26,7 $\pm$ 0,9	9,3	-	-
	Станд. отклонение / Standard deviation ( $\sigma$ )	0,5	2,2	0,7	1395,2	1,8	-	-	-
	Me [Q1; Q3]	3,6 [2,93; 4,02]	4,8 [1,16; 5,29]	5,2 [6,07; 4,59]	4540,1 [4501,6; 7423,6]	27,4 [24,48; 29,1]	-	-	-
	Коридор значений / Value corridor	3,4–4,1	0–5,4	4,6–6,2	4506,8–7988,8	23,8–28,1	0–9,3	-	-
	Частота выявления / Frequency of detection	100 %	66,6 %	100 %	100 %	100 %	10 %	-	-

Примечание: \* достоверность различий от группы 2;  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; <sup>†</sup> — достоверность различий от группы 3;  $p < 0,05$ ; <sup>††</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>†††</sup>  $p < 0,001$ . Me — медиана; квантили Q1; Q3.  
Note: \* is the confidence of the differences from group 2;  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; <sup>†</sup> — reliability of differences from group 3;  $p < 0,05$ ; <sup>††</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>†††</sup>  $p < 0,001$ . Me — mediana; quartiles Q1; Q3.

$p < 0,001$ ). В порядке объяснения можно предположить, что поскольку пациентам с нВМД ранее уже вводили антиангиогенный препарат ранибизумаб, то, вероятно, продукция VEGF находилась под контролем препарата (была подавлена).

Одновременно зафиксированы достоверно более низкие (по сравнению с 3-й группой) концентрации и других проангиогенных факторов: ангиогенина (3822,4  $\pm$  498,6 против 5715,8  $\pm$  697,6 пг/мл,  $p < 0,05$ ; рис. 10) и TNF (2,4  $\pm$  0,5 против 3,5  $\pm$  0,3 пг/мл,  $p < 0,05$ ; рис. 11).

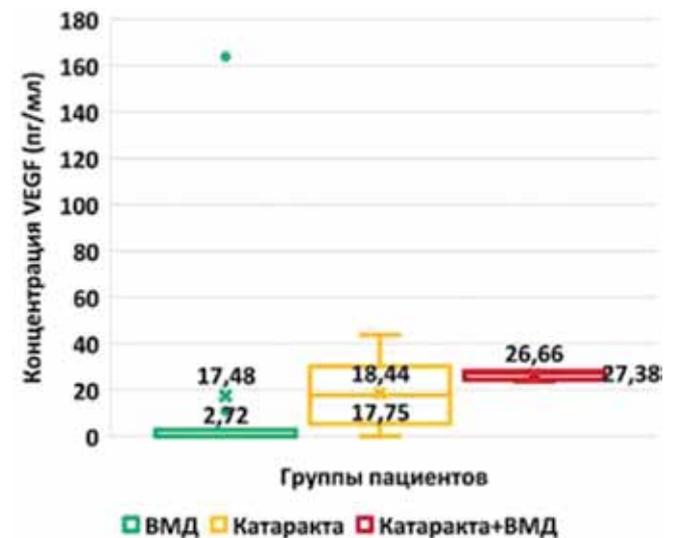
Уровень этих двух факторов роста (ангиогенин и TNF) приблизился к показателям больных с катарактой, но не достиг их значений. Межгрупповые различия и здесь оказались статистически значимы ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  соответственно).

Заметим, при этом на фоне инъекций ангиостатика оказалась повышенной концентрация плюрипотентных цитокинов с проангиогенными и провоспалительными свойствами, в частности, IFN $\alpha$  ( $p = 0,05$ , рис. 12) и IL-8 ( $p = 0,11$ ; различия оказались недостоверными из-за значительного разброса значений, поэтому были расценены как сильная тенденция; рис. 13).

Разброс значений IL8 был еще больше, достигая в ряде случаев 972 пг/мл.

Наряду с этим практически у каждого второго пациента в СТЖ появлялся FGFb. Справедливости ради надо отметить вариабельность значений этого

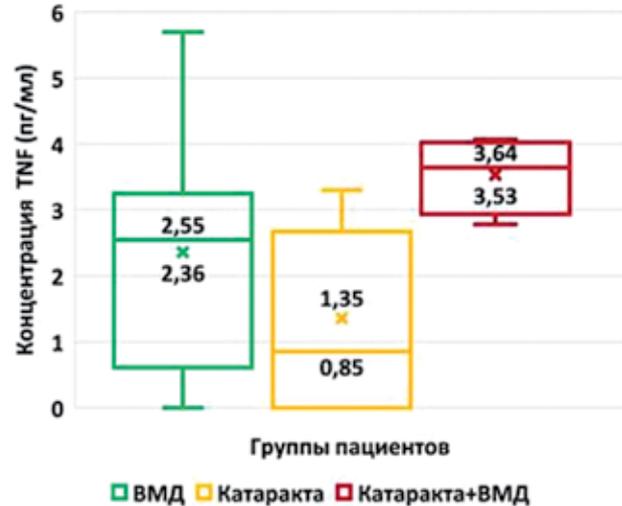
мощного индуктора как воспаления, так и ангиогенеза. В то же время в группе сопоставления пациентов с катарактой и наивной нВМД этот фактор роста обнаружен только в одной из десяти проб и на низком уровне.

**Рис. 9.** Диаграмма сравнения концентраций VEGF в группах 1 (нВМД), 2 (катаракта) и 3 (катаракта + нВМД)**Fig. 9.** Comparison chart of VEGF concentrations in groups 1 (nBDM), 2 (cataracts) and 3 (cataracts + nAMD)



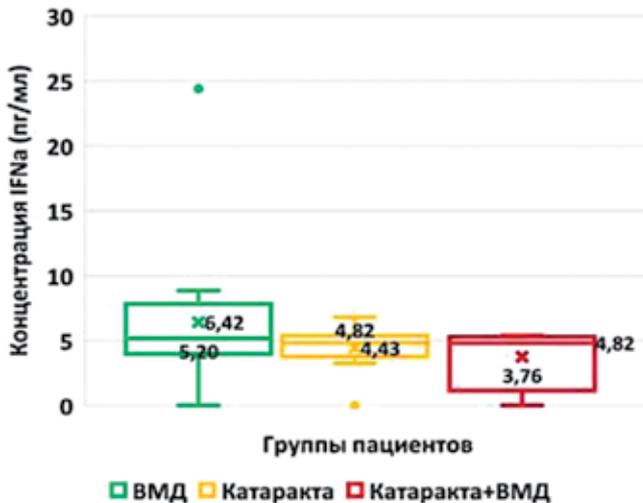
**Рис. 10.** Диаграмма с демонстрацией сравнительного уровня ангиогенина в группах 1 (ВМД), 2 (катаракта), 3 (катаракта + ВМД)

**Fig. 10.** Diagram showing comparative angiogenin levels in groups 1 (AMD), 2, (cataract), 3 (cataract + AMD)



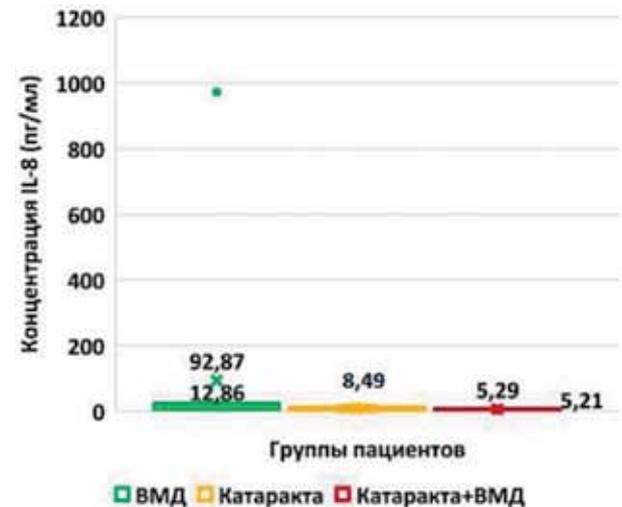
**Рис. 11.** Диаграмма с демонстрацией сравнительного уровня TNF в группах 1 (ВМД), 2 (катаракта), 3 (катаракта + ВМД)

**Fig. 11.** Diagram showing the comparative level of TNF in groups 1 (AMD), 2 (cataracts), 3 (cataracts + AMD)



**Рис. 12.** Диаграмма с демонстрацией сравнительного уровня IFNα в группах 1 (ВМД), 2 (катаракта), 3 (катаракта + ВМД)

**Fig. 12.** Diagram showing the comparative level of IFNα in groups 1 (AMD), 2 (cataract), 3 (cataract + AMD)



**Рис. 13.** Диаграмма с демонстрацией сравнительного уровня IL-8 в группах 1, (ВМД), 2 (катаракта), 3 (катаракта + ВМД)

**Fig. 13.** Diagram showing comparative levels of IL-8 in groups 1 (AMD), 2 (cataracts), 3 (cataract + AMD)

## ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что маркером нВМД является неовангиогенез в различных его проявлениях. Триггером неовангиогенеза служит гипоксия тканей. Патологический процесс состоит из нескольких сменяющих друг друга этапов: воспаления, пролиферации и протеолиза. Эти этапы контролируются определенными воспалительными и пролиферативными факторами, секретируемыми как самими эндотелиальными клетками (ЭК), так и клетками микроокружения, включая микроглию сетчатки, ретикулярный пигментный эпителий (РПЭ), перициты, клетки Мюллера, макрофаги и др. [11–15]. Процесс

неовангиогенеза регулируется проангиогенными и антиангиогенными молекулами. Основными проангиогенными факторами являются семейство фактора роста эндотелия сосудов VEGF (VEGF-A, -B, -C, -D, -E), основной фактор роста фибробластов (bFGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста (TGFβ), ангиопоэтины 1, 2 (Ang-1, -2), ангиогенин, плацентарный фактор роста, интерферон α (IFN-α) и др. Кроме того, проангиогенным эффектом обладает ряд воспалительных молекул, наиболее значимые из них: матричные металлопротеиназы (ММП), молекулы системы комплемента (C2, C3, C5), молекулы адгезии и миграции моноцитов (MCP-1, IL-1b, IL-18, IL-8) и др.

Каждый из цитокинов или факторов роста обладает своими контрольно-регуляторными функциями. Спектр их активности может перекрываться и регулироваться другими цитокинами или свободнорадикальными молекулами, такими как оксид азота (NO) и др. Биологические эффекты цитокинов носят дозозависимый характер. В низких концентрациях провоспалительный цитокин TNF- $\alpha$  индуцирует миграцию и пролиферацию ЭК и формирование сосудоподобных структур [12, 13]. Повышенная продукция макрофагами TNF- $\alpha$  при активной МНВ приводит к стимуляции синтеза VEGF клетками РПЭ и активации неоангиогенеза. bFGF оказывает прямой проангиогенный эффект, стимулируя миграцию, пролиферацию и протеолитическую активность ЭК [12, 14]. Кроме того, bFGF способствует выживанию ЭК, защищая их от апоптоза. В низких и умеренных концентрациях IL-8 оказывает выраженное влияние на миграцию и пролиферацию ЭК, не влияя на другие его функции [15, 16]. Однако в высоких концентрациях ИЛ-8 является мощным провоспалительным цитокином и хемоаттрактантом иммунокомпетентных клеток, секретирующих большой спектр других активных цитокинов, обладающих уже проангиогенным действием. На поздних стадиях ангиогенеза клетки-продуценты микроокружения секретируют антиангиогенные факторы, тормозящие миграцию и пролиферацию ЭК, не снижая их жизнеспособность.

К естественным ингибиторам ангиогенеза относят следующие цитокины: фактор пигментного эпителия (PEDF), ангиостатин, эндостатин, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  и все тот же TNF- $\alpha$ , который при длительном воздействии на ЭК тормозит их пролиферацию и в итоге запускает их апоптоз [11, 15, 17]. Трансформирующий фактор  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) — многофункциональная молекула, секретируемая многими клетками глаза: РПЭ, клетками Мюллера, ЭК, перипитами, фоторецепторами, астроцитами и выполняющая в глазу различные функции, касающиеся регуляции роста, пролиферации, миграции, апоптоза, нейропротекции, иммунной привилегированности глаза и многого другого [18]. Что касается неоангиогенеза, то TGF- $\beta$  может выполнять как про-, так и антиангиогенную роль. При естественных условиях TGF- $\beta$  регулирует синтез VEGF опосредовано через нейротрофины (NGF) и через регуляцию тирозинкиназных рецепторов связывания VEGF с мембраной клеток, не допуская избыточной пролиферации ЭК. Однако при патологических состояниях, таких как МНВ или пролиферативная диабетическая ретинопатия, продукция TGF- $\beta$  может увеличиваться, способствуя активному неоангиогенезу. В то же время очень низкая концентрация TGF- $\beta$  или полное его отсутствие может привести к активации других мембранных рецепторов, помимо VEGFR-1, -2, активирующих неоангиогенез опосредованным путем. Подавление продукции TGF- $\beta$  приводит к апоптозу нейрональных клеток и прогрессированию нейродегенерации.

Цель нашего исследования состояла в изучении уровня некоторых про- и антиангиогенных факторов

роста в СТЖ глаз с нВМД на фоне уже выполненных двух-трех эндовитреальных инъекций ангиостатика ранибизумаба. К сожалению, не представлялось возможным оценить эти показатели в динамике у одних и тех же больных, а также изучить и другие не менее важные про- и антипролиферативные факторы. И это является серьезным ограничением работы. Тем не менее исследований подобного плана, представленных в доступных источниках (с таким спектром факторов роста и на фоне лечения), практически нет. Наше исследование, по существу, было первым, касающимся этого аспекта, что позволило нам понять, как быстро и каким путем происходит реверсия ангиогенного фенотипа исходной формы нВМД на фоне лечения с формированием таких феноменов, как рефрактерность, толерантность и тахифилаксия, к ангиостатическому препарату. Это серьезный шаг на пути освоения и продвижения фармакологических интервенционных стратегий.

Результаты показали, что реверсия ангиогенного фенотипа практически выявляется уже после 2–3-й инъекции. В условиях подавления основного пролиферативного фактора VEGF формируются новые пути неоангиогенеза с новыми «игроками». Это — цитокины IL-8 и IFN- $\alpha$  (в качестве промотеров и воспаления, и ангиогенеза) и FGFb. По нашим неопубликованным данным, при сравнении проангиогенных эффектов одинаковой концентрации VEGF и FGFb, полученным *in vitro* на культуре ЭК, биологический эффект FGFb превышал аналогичный эффект VEGF в 20–40 раз (в зависимости от стадии ангиогенеза).

Следует подчеркнуть, что у всех пациентов отсутствовали сколько-нибудь значимые уровни природных ангиостатических цитокинов — IFN- $\gamma$  и TGFb. Полученные данные позволяют говорить о том, что на фоне терапии ранибизумабом МНВ действительно происходит блокирование уровня ключевого индуктора ангиогенеза — VEGF, что клинически проявляется в подавлении активности МНВ [1]. В пользу этого утверждения говорит более редкая частота выявления этого цитокина в СТЖ и его сниженная (по сравнению с показателями группы 3) концентрация, сопоставимая с концентрацией больных катарактой (группа 2).

Почти у всех наших больных мы не обнаружили такого важного для нормального функционирования глаза фактора, как TGF- $\beta$ . Возможное объяснение нам представляется следующим. Все наши пациенты имели те или иные возрастные заболевания глаз: ВМД и катаракту, здоровые глаза мы не обследовали. Низкие уровни или полное отсутствие TGF- $\beta$  свидетельствует о серьезных нарушениях в иммунной системе органа зрения, что клинически проявляется в развитии нейродегенерации, атрофии клеток РПЭ, сетчатки, а также, возможно, клиникой продолжающейся макулярной неоваскуляризации.

Повышенные концентрации проангиогенных факторов TNF- $\alpha$ , bFGF, IL-8 и ангиогенина на фоне лечения

ранибизумабом свидетельствуют о продолжающейся стимуляции ангиогенеза другими механизмами и путями, не зависящими от VEGF. При этом собственные антиангиогенные ресурсы — цитокины TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  — практически отсутствовали, что говорит, по-видимому, о локальном дефекте контроля регуляции неоангиогенеза. Принимая во внимание условия проведения наших исследований, вполне очевидно, что эти механизмы запускаются уже на ранних этапах лечения пациентов с помощью анти-VEGF-препаратов через 2–3 инъекции. Это говорит о том, что механизмы рефрактерности к анти-VEGF-препаратам могут проявляться рано. И это означает, что продолжение выбранной терапии может быть малоэффективным. Более разумно в такой ситуации принимать решение о переключении на альтернативные антиангиогенные препараты, например с более широким антиангиогенным действием или с другим механизмом действия.

Другой стороной этого аспекта стал примечательный факт выявления нами группы больных с нВМД, у которых отсутствовали повышенные уровни одного из цитокинов (TNF- $\alpha$ , bFGF, IL-8). И именно в этой группе больных клинически наблюдали более выраженный терапевтический эффект от ранибизумаба. Полагаем, что именно эти пациенты, у которых механизмы неоангиогенеза подавлялись эффективно с помощью анти-VEGF-препаратов и альтернативные пути еще не активировались, и являются хорошими респондентами в отношении таргетной блокады только VEGF-A.

Полагаем, что будущие исследования в области про- и антиангиогенных факторов у пациентов с нВМД позволят лучше понять этот сложный процесс и выработать терапевтические стратегии с целью создания

антиангиогенных препаратов с более широким терапевтическим эффектом.

## ВЫВОДЫ

Повышенные уровни проангиогенных факторов роста IL-8, ангиогенина, TNF- $\alpha$  и bFGF в стекловидной жидкости при нВМД на фоне антиангиогенной терапии Ранибизумабом позволяют говорить о наличии других, не зависящих от VEGF, действующих механизмов стимуляции ангиогенеза.

Отсутствие антиангиогенных факторов роста IFN- $\gamma$  и TGF- $\beta$  в стекловидной жидкости позволяет думать о наличии дефекта в контроле и регуляции ангиогенеза при нВМД и прогрессировании нейродегенерации.

Редкое обнаружение VEGF в комплексе с достоверным снижением его концентрации по сравнению с сенильной катарактой на фоне лечения ранибизумабом глаз с нВМД демонстрирует целевое ингибирование на практике.

Хороший ответ на анти-VEGF-терапию имеется при выявлении низких уровней всех проангиогенных факторов.

На фоне лечения ангиостатическими препаратами происходит инверсия ангиогенного фенотипа с формированием новых обходных путей ангиогенеза, что, по-видимому, диктует необходимость подключения препаратов с другими механизмами действия.

## УЧАСТИЕ АВТОРОВ:

Архипова М.М. — сбор материала, написание статьи;  
Лихванцева В.Г. — осмысление и интерпретация результатов, редактирование текста;  
Геворкян А.С. — сбор данных и оформление библиографии;  
Рычкова С.И. — статистический анализ результатов, подготовка графиков;  
Сельков С.А. — контроль выполнения и сбор данных лабораторных исследований, участие в расшифровке результатов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Spaide R.F., Jaffe G.J., Sarraf D., Freund K.B. Consensus Nomenclature for Reporting Neovascular Age-Related Macular Degeneration Data. *Ophthalmology*. 2020 May;127(5):616–636. doi: 10.1016/j.ophtha.2019.11.004.
- Brawn D., Michels M., Kaiser P. Ranibizumab versus Verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology*. 2009;116:57–65. DOI: 10.1016/j.ophtha.2008.10.018
- Rofagha S., Bhisitkul R.B., Boyer D.S. SEVEN-UP Study Group Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: a multicenter cohort study (SEVEN-UP). *Ophthalmology*. 2013;120(11):2292–2299. DOI: 10.18240/ijo.2017.01.14.
- Holz F.G., Figueroa M.S., Bandello F. LUMINOUS, Ranibizumab treatment in treatment-naïve neovascular age-related macular degeneration. Results From LUMINOUS, a Global Real-World Study. *RETINA*. 2020;40:1673–1685. DOI: 10.1097/IAE.0000000000002670
- Федеральные клинические рекомендации. Возрастная макулярная дегенерация. Москва: 2017. [Age-related macular degeneration. Moscow: 2017 (In Russ.)]. <https://www.oor.ru/vracham/klrek/klinicheskie-rekomendatsii-utverzhdennye-mz-rf/>
- Slakter J.S. What to do when anti-VEGF therapy fails. *Retin Physician*. 2010. <https://www.retinalphysician.com/issues/2010/june-2010/what-to-do-when-anti-vegf-therapy-fails>
- Amoaku W.M., Chakravarthy U., Gale R., Gavin M., Ghanchi F. Defining response to anti-VEGF therapies in neovascular AMD. *Eye (Lond)*. 2015;29(6):721–731. DOI: 10.1038/eye.2015.48
- Krebs I., Glittenberg C., Ansari-Shahrezaei S. Non-responders to treatment with antagonists of vascular endothelial growth factor in age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 2013;97:1443–1446. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2013-303513
- Barış M.E., Menteş J., Afrashi F. Subgroups and Features of Poor Responders to Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment in Eyes with Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Turk J Ophthalmol*. 2020;50(5):275–282. DOI: 10.4274/tjo.galenos.2020.38488
- Лихванцева В.Г., Трубилин В.Н., Капкова С.Г., Геворкян А.С. К вопросу о терминологии, экспертных критериях оценки эффективности антиангиогенной терапии и распространенности рефрактерных форм неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации. *Офтальмология*. 2021;18(3):389–398. [Likhvantseva V.G., Trubilin V.N., Kapkova S.G., Gevorikyan A.S. On the question of terminology, expert criteria for assessing the effectiveness of antiangiogenic therapy and the prevalence of refractory forms of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology in Russia = Ophthalmologia*. 2021;18(3):389–398 (In Russ.)]. DOI: 10.18008/1816-5095-2021-3-389-398
- Shiqi Yang, Jingke Zhao, Xiaodong Sun. Resistance to anti-VEGF therapy in neovascular age-related macular degeneration: a comprehensive review. *Drug Design, Development and Therapy*. 2016;10:1857–1867. DOI: 10.2147/DDDT.S97653
- Dugel P.U. HAWK and HARRIER: Phase 3, Multicenter, Randomized, Double-Masked Trials of Brolicizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology*. 2020;127:72–84. DOI: 10.1016/j.ophtha.2019.04.017
- Rajappa M., Saxena P., Kaur J. Ocular angiogenesis: mechanisms and recent advances in therapy. *Adv Clin Chem*. 2010;50:103–121.
- Dreyfuss J.L., Giordano R.J., Regatieri C.V. Ocular Angiogenesis. *J Ophthalmol*. 2015;2015:892043. DOI: 10.1155/2015/892043
- Casey R., Li W.W. Factors controlling ocular angiogenesis. *Am J Ophthalmol*. 1997;124(4):521–529. DOI: 10.1016/s0002-9394(14)70868-2
- Distler J.H., Hirth A., Kurowska-Stolarska M., Gay R.E., Gay S., Distler O.Q. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *J Nucl Med*. 2003;47(3):149–161.
- de Groot H., Schmit-Eilenberger V., Kirchhof J., Augustin A.J. Dev. Angiostatic and angiogenic factors. *Ophthalmol*. 2010;46:1–3. DOI: 10.1159/000320005
- Schlecht A., Vallon M., Wagner N., Ergün S., Braunger B.M. TGF- $\beta$ -Neurotrophin Interactions in Heart, Retina, and Brain. *Biomolecules*. 2021;11(9):1360.

**СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ**

Центральная клиническая больница Российской академии наук  
Архипова Марина Маратовна  
кандидат медицинских наук, врач-офтальмолог отделения оперативной клинической офтальмологии  
Литовский бульвар, 1а, Москва, 117588, Российская Федерация  
<https://orcid.org/0000-0003-3889-1112>

ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — «Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства  
Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства  
Лихванцева Вера Геннадьевна  
доктор медицинских наук, профессор, консультант клинко-диагностического центра офтальмологии  
ул. Гамалеи, 15, Москва, 123098, Российская Федерация  
Волоколамское шоссе, 91, Москва, 125310, Российская Федерация  
<https://orcid.org/0000-0002-3175-9592>

Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства  
Геворкян Армине Сейрановна  
соискатель кафедры офтальмологии  
Волоколамское шоссе, 91, Москва, 125310, Российская Федерация

Медико-биологический университет инноваций и образования ФГБУ «Федеральный биофизический центр им. А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства  
Рычкова Светлана Игоревна  
доцент кафедры офтальмологии  
ул. Гамалеи, 15, Москва, 123098, Российская Федерация

ФГБУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии» им. Д.О. Отта  
Сельков Сергей Алексеевич  
заведующий отделом иммунологии и межклеточных взаимодействий  
Менделеевская линия, 3, Санкт-Петербург, 199034, Российская Федерация

**ABOUT THE AUTHORS**

Central Clinical Ophthalmology Center of the Russian Academy of Sciences  
Arkhipova Marina M.  
PhD, ophthalmologist of the Department of operative clinical ophthalmology  
Litovsky blvd, 1a, Moscow, 117588, Russian Federation  
<https://orcid.org/0000-0003-3889-1112>

Burnazyan Federal Biophysical Center of FMBA of Russia  
Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of FMBA of Russia  
Likhvantseva Vera G.,  
MD, Professor of the Ophthalmology department, consultant of Academy of Postgraduate Education of the Federal Scientific  
Gamalei str., 15, Moscow, 123098, Russian Federation  
Volokolamskoe highway, 91, Moscow, 125371, Russian Federation  
<https://orcid.org/0000-0002-3175-9592>

Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of FMBA of Russia  
Gevorgyan Armine S.  
postgraduate of the Ophthalmology department  
Volokolamskoe highway, 91, Moscow, 125371, Russian Federation

Medical and biological university of innovation and continuing education A.I. Burnazyan FMBC of FMBA of Russia  
Rychkova Svetlana I.  
Associate Professor  
Marshal Novikov str., 23, Moscow, 123098, Russian Federation

Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproduction named after D.O. Ott  
Selkov Sergey A.  
head of the Department of immunology and intercellular interactions  
Mendeleevskaya line, 3, St. Petersburg, 199034, Russian Federation