

ВЛИЯНИЕ ИНТРАВИТРЕАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ БЕВАЦИЗУМАБА НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С ТРОМБОЗОМ ВЕН СЕТЧАТКИ, ПРОТЕКАЮЩИМ НА ФОНЕ АНГИИТА

Проведена оценка влияния интравитреального введения Бевацизумаба на агрегацию тромбоцитов у больных с тромбозом вен сетчатки, протекающим на фоне ангиита. Обследованы 29 больных (29 глаз): 14 больным проводилось комплексное лечение тромбоза вен сетчатки на фоне ангиита, 15 больным помимо комплексного лечения интравитреально вводили Бевацизумаб по стандартной методике. Выявлена нормализация агрегационной активности тромбоцитов после интравитреального введения Бевацизумаба. Данные являются предварительными и требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: агрегация тромбоцитов, сосудистый эндотелиальный фактор роста, Бевацизумаб.

Актуальность

Тромбоз вен сетчатки — одно из наиболее распространенных заболеваний, которое составляет около 60% всей острой сосудистой патологии органа зрения, стоит на втором месте по тяжести поражения сетчатки и прогноза после диабетической ретинопатии, в 15% случаев является причиной инвалидности по зрению [1-6].

Очевидно, что для нормальной циркуляции крови в ретинальных венах ее реологические свойства имеют большое значение [7-10]. Многие авторы сообщают об изменении агрегационной активности тромбоцитов при тромбозах вен сетчатки, тем самым подчеркивая важную роль этого фактора в патогенезе заболевания. Priluck I. A. (1980) сообщил о развитии закупорки центральной вены сетчатки (ЦВС) у пациентки с повышенной агрегацией тромбоцитов. По мнению Тартаковской А. И. с соавт. (1981) и Hortsmluller A. J. et al. (1983) имеется взаимосвязь между гиперреактивностью тромбоцитов и тромбозами вен сетчатки. Беязо О. Е. (2000) указывает на повышение внутрисосудистой активации тромбоцитов при тромбозах вен сетчатки, что выражается в увеличении активных форм, появлении тромбоцитарных агрегатов, увеличении процента тромбоцитов в агрегатах. Deng Z. H. (1989) отметил, что в большинстве случаев кривая агрегации кровяных пластинок у пациентов с закупоркой вен сетчатки была выше, чем в контрольной группе, причем не было значимых различий между мужчинами и женщинами. Тульцева С. Н. (2009) исследовала активацию кровяных пластинок при ишемической и неишемической формах тромбоза ЦВС и выявила увеличение суммы активных

форм тромбоцитов и числа тромбоцитов в агрегатах более чем в 2,5 раза и 2 раза соответственно. Помимо этого, зарегистрировано большее участие в тромбоцитарном процессе средних и больших тромбоцитарных агрегатов.

Сосудистый эндотелиальный фактор роста (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF) – один из важнейших ангиогенных факторов в норме и при патологии, стимулирующих пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, а также фактор вазопроницаемости [11-12]. В сетчатке и хориоиде синтез VEGF осуществляют перicyты, эндотелиоциты, клетки пигментного эпителия, клетки Мюллера, глиальные клетки и ганглиозные клетки [13-14]. Также известно, что VEGF синтезируется в мегакариоцитах, впоследствии аккумулируется в α -гранулах тромбоцитов [16] и высвобождается из них во время агрегации [15, 17-18]; а ингибируя агрегацию тромбоцитов, можно снизить секрецию ими VEGF in vitro и in vivo [17].

Бевацизумаб (Авастин, Genentech, Inc, South San Francisco, CA) – рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело, которое селективно связывается с VEGF и нейтрализует его [19]. Бевацизумаб широко используется в лечении таких офтальмологических заболеваний, как хориоидальная неоваскуляризация, пролиферативная диабетическая ретинопатия, диабетическая макулопатия, тромбоз вен сетчатки, ретинопатия недоношенных [20].

Известно, что системное применение Бевацизумаба связано с повышенным риском развития венозных и артериальных тромбоэмболий [21-23].

В других исследованиях обнаружено, что VEGF и VEGF-рецепторы являются медиаторами агрегации тромбоцитов [24-25] и, возможно, через взаимодействие с ними Бевацизумаб принимает участие в первичном гемостазе. Уже доказано наличие VEGF-R матричной РНК и мембранная локализация VEGF на тромбоцитах [26-27]. В дополнение продемонстрировано наличие и функционирование VEGF-R1 и VEGF-R2 на тромбоцитах. *In vitro* VEGF стимулирует тромбин-индуцированную активацию тромбоцитов. Это означает, что эндогенно секретируемый тромбоцитарный VEGF может функционировать как регулятор активации тромбоцитов по принципу положительной обратной связи [24]. Теоретически, взаимодействие Бевацизумаба с VEGF, секретируемым тромбоцитами в процессе их активации, может привести к снижению агрегационной активности тромбоцитов, замедленному первичному гемостазу и к повышению риска появления геморрагий.

Другие исследователи изучали активацию тромбоцитарных FcγRIIIa рецепторов и индукцию агрегации тромбоцитов на трансгенных мышцах [25]. В присутствии нефракционированного гепарина формировались иммунные комплексы, состоящие из Бевацизумаба, VEGF и самого гепарина, которые активировали тромбоциты через FcγRIIIa рецепторы. Однако, без гепарина активации тромбоцитов не происходило; ни VEGF, ни Бевацизумаб, ни их сочетание не индуцировали агрегацию тромбоцитов [25, 28].

Таким образом, взаимосвязь VEGF и анти-VEGF с одной стороны и агрегации тромбоцитов с другой является малоизученной.

Цель работы

Оценить влияние интравитреального введения Бевацизумаба на агрегацию тромбоцитов у больных с тромбозом вен сетчатки, протекающим на фоне ангиита.

Материалы и методы

Обследованы 29 больных (29 глаз) с тромбозами вен сетчатки на фоне ангиита: мужчин – 17, женщин – 12, в возрасте от 25 до 81 лет (средний возраст – 53,7 лет). Тромбоз ЦВС диагностирован у 16 больных, тромбоз ветви ЦВС – у 13.

Все пациенты были разделены на 2 группы. I группу составили 14 больных, которым проводилось комплексное консервативное лечение

тромбоза вен сетчатки на фоне ангиита. Пациентам II группы (15 больных) помимо комплексного консервативного лечения интравитреально вводили Бевацизумаб по стандартной методике: под локальной анестезией, в проекции pars plana на 6 часах, в дозе 0,05 мл. Перед интравитреальным вмешательством со всеми пациентами была проведена беседа о возможных осложнениях в ходе и после процедуры и было взято информированное согласие на off-label применение препарата.

Стандартное офтальмологическое обследование включало визометрию, тонометрию, биомикроскопическое исследование, прямую и обратную офтальмоскопию, осмотр глазного дна с помощью 3-х зеркальной линзы Гольдмана, флюоресцентную ангиографию глазного дна (Retina Angiograph 2 фирмы «Heidelberg»), оптическую когерентную томографию сетчатки (Stratus OCT 3000 фирмы «Zeiss»), цветное фотографирование глазного дна. Всем больным были проведены клинический анализ крови, исследование тромбоцитарного звена гемостаза.

Тромбоцитарное звено гемостаза определяли методом измерения агрегационной активности тромбоцитов с помощью лазерного двухканального анализатора агрегации НПФ БИО-ЛА (Россия) по турбидометрическому методу, основанному на анализе флуктуаций светопропускания (ФСП-метод), вызванных случайным изменением числа частиц в оптическом канале. Относительная дисперсия таких флуктуаций пропорциональна среднему размеру агрегатов и используется для исследования кинетики агрегации [29-30]. Метод отличается высокой чувствительностью, что делает его пригодным для исследования спонтанной агрегации, агрегации под действием низких концентраций индукторов, а также агрегации субклеточных частиц и макромолекул. Метод основан на графическом отображении измерения коэффициента пропускания исследованной плазмы, богатой тромбоцитами, обусловленного уменьшением общей рассеивающей поверхности клеток в результате их склеивания друг с другом. Определение агрегационной активности тромбоцитов проводили в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП), стабилизированной антикоагулянтом цитратом натрия в соотношении 1:9. Для приготовления ОТП цельную кровь центрифугировали при 200 g в течение 17 мин. За-

тем из пробирки отбирали верхний слой, так называемой, богатой тромбоцитами плазмы. Для исследования агрегации тромбоцитов рекомендуется доводить концентрацию тромбоцитов ОТП до 200 тыс./мкл. Полученную ОТП разливали по 0,3 мл в кюветы для агрегометра. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали растворы АДФ («Serva») в конечной концентрации 0,1 мкМ, 1,0 мкМ и 5,0 мкМ. После калибровки агрегометра в кювету с образцом ОТП объёмом 0,3 мл вносили магнитную мешалку и перед измерением прогревали в течение 3 мин. Весь процесс измерения проводили при температуре 37°C и постоянной скорости перемешивания 800 оборотов/мин. Кювету устанавливали в измерительный канал агрегометра и на 10-ой секунде измерения вносили 10,0 мкл раствора АДФ соответствующих концентраций. Время записи агрегации составляло 4 мин. Способность к образованию агрегатов малого размера (от 3 до 100 клеток) оценивали по спонтанной и индуцированной 0,1 мкмоль АДФ агрегации. Образование агрегатов среднего и большого размера (свыше 100 клеток) оценивали по индуцированной 1,0 и 5,0 мкмоль АДФ агрегации. Результаты измерения фиксировали при помощи компьютерной программы в виде агрегационной кривой.

Для исследований использовали венозную и капиллярную кровь. Весь материал был взят до начала лечения, по завершению лечения и через 1, 3, 6 месяцев после лечения.

Результаты и обсуждение

Статистический анализ, произведенный по точному критерию Фишера и коэффициенту Пирсона, не обнаружил достоверных различий в обеих группах.

Анализ состояния тромбоцитарного звена гемостаза у пациентов I группы до начала лечения выявил повышенную агрегационную активность тромбоцитов у 43%, а нормальную и пониженную активность — у 57%. Достоверного повышения агрегации тромбоцитов в ходе лечения у больных I

группы не выявлено, однако имелась тенденция к ее повышению (табл. 1).

Анализ состояния тромбоцитарного звена гемостаза у пациентов II группы до начала лечения выявил повышенную агрегационную активность тромбоцитов у 73%, а нормальную и пониженную активность — у 24%. Достоверного снижения агрегации тромбоцитов в ходе лечения у больных II группы не выявлено, однако имелась отчетливая тенденция к ее снижению через 1 месяц после введения с последующей ее нормализацией к 3-му месяцу после введения (табл. 2).

Таким образом, интравитреальное введение Бевацизумаба оказывает положительный эффект на одно из основных звеньев патогенеза тромботического процесса — на агрегацию тромбоцитов, приводит к ее нормализации. Следовательно, можно ожидать более высоких функциональных результатов от лечения. Механизм данного эффекта не совсем ясен. Взаимодействие Бевацизумаба с VEGF, секретируемым тромбоцитами в процессе их активации,

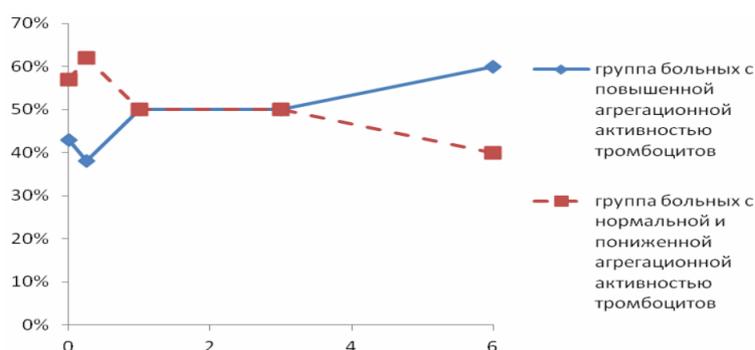


Таблица 1. Уровень агрегационной активности тромбоцитов больных с тромбозом вен сетчатки, протекающим на фоне ангиита, в зависимости от сроков проведения комплексной консервативной терапии без интравитреального введения Бевацизумаба

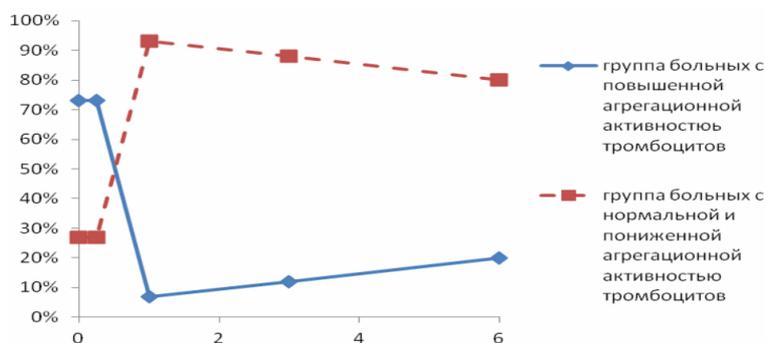


Таблица 2. Уровень агрегационной активности тромбоцитов больных с тромбозом вен сетчатки, протекающим на фоне ангиита, в зависимости от сроков проведения комплексной консервативной терапии в сочетании с интравитреальным введением Бевацизумаба

может привести к снижению агрегационной активности.

Заключение:

1. Принимая во внимание данные нашей работы, можно предположить, что при интравитреальном введении Бевацизумаба при окклюзиях ретинальных вен, протекающих на фоне анги-

та, имеется тенденция к снижению агрегации тромбоцитов с последующей ее нормализацией.

2. Учитывая полученные данные, можно судить о том, что местное (интравитреальное) введение Бевацизумаба оказывает системное влияние на агрегацию тромбоцитов.

3. Мы оцениваем эти данные как предварительные, требующие дальнейшего изучения.

14.02.2013

Список литературы:

1. Танковский В.Э. Тромбозы вен сетчатки. М.: Воениздат. – 2000. – 262с.
2. Тарасова Л.Н., Киселева Т.Н., Фокин А.А. Глазной ишемический синдром. М.: Медицина. – 2003. – 172 с.
3. Киселева Т.Н., Кошева О.П., Будзинская М.В., Щеголева И.В., Кравчук Е.А. Значение цветового доплеровского картирования в диагностике окклюзионных поражений вен сетчатки // Вестн. офтальмологии. – 2006. – №5. – С. 4-7.
4. Central Vein Occlusion Study Group: A randomized clinical trial of early panretinal photocoagulation for ischemic central vein occlusion: The Central Vein Occlusion Study Group N report // Ophthalmology. – 1995. – Vol. 102. – P. 1434-1444.
5. Старков Г.Л. Эпидемиология ретинальной патологии и диспансеризация старших возрастных групп городского населения // Офтальмологический журнал. – 1987. – №2. – С. 69-72;
6. Jalkh A.E., Trempe C.L. Macular edema in branch retinal vein occlusion: types and treatment // Ophthalmic Surg. – 1989. – Vol. 20 – №1. – P. 26-32.
7. Кацнельсон Л.А., Форофонов Т.И., Бунин А.Я. Сосудистые заболевания глаз. М.: Медицина. – 1990. – 270 с.
8. Давыдова Н.Г., Муха А.И., Аннамедов Г.А. Результаты применения тиклида для лечения больных с посттромботической ретинопатией // Вестн. Офтальмологии. – 1992. – №2. – С. 22-24.
9. Bandello F, D'Angelo S.V., Parlovecchia M. et al. Hypercoagulability and high lipoprotein(a) levels in patients with central retinal vein occlusion // Thromb. Haemost. – 1994. – Vol. 72. – №7. – P. 9-43.
10. Abe S., Shiono T. Retinohoroidal circulatory disturbances and blood component abnormalities // Nippon Gakkai Zasshi. – 1995. – Vol. 99. – №3. – P. 255-261.
11. Shima D., Adamis A.P., Ferrara N. et al. Hypoxic induction of endothelial cell growth factor in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen // Mol. Med. – 1995. – Vol. 1. – №2. – P. 182-193.
12. Aiello L.P., Avery R.L., Arrigg P.G. et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders // N Engl J Med. – 1994;331:1480-1487;
13. Hoch R.V., Soriano P. Roles of PDGF in animal development // Development. – 2003. – №130. – P. 4769-4784;
14. Adamis A.P., Miller J., Bernal M. et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy // Am J Ophthalmol. – 1994. – Vol. 118. – №4. – P. 445-450.
15. Yogi A., O'Connor S.E., Callera G.E. et al. Receptor and nonreceptor tyrosine kinases in vascular biology of hypertension // Curr Opin Nephrol Hypertens. – 2010. – №19(2). – P. 169-176.
16. Mohle R., Green D., Moore M.A., Nachman R.L., Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. // Proc Natl Acad Sci USA. – 1997. – 94: P. 663-668.
17. Solanilla A., Villeneuve J., Auguste P., Hugues M., Alioum A., Lepreux S., Ducroix J., Duhaut P., Conri C., Viallard J., Nurden A.T., Constans J., Ripoche J. The transports of high amounts of vascular endothelial growth factor by blood platelets underlines their potential contribution in systemic sclerosis angiogenesis // Rheumatology. – 2009. – 48: P. 1036-1044.
18. Banks R.E., Forbes M.A., Kinsey S.E. et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology // Br J Cancer. – 1998. – 77: P. 956-964.
19. Ferrara N., Hillan K.J., Gerber H.P., Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. // Nat Rev Drug Discov. – 2004. – 3: P. 391-400.
20. Collet L., Larson T.A., Bakri S.J. Bevacizumab for Ophthalmic Disease // US Ophthalmic Review. – 2007. – P. 20-24.
21. Nalluri S.R., Chu D., Kerszetes R., Zhu X., Wu S. Risk of venous thromboembolism with the angiogenesis inhibitor bevacizumab in cancer patients // JAMA. – 2008. – 300(19): P. 2277-2285.
22. Scappaticci F.A., Skillings J.R., Holden S.N., Gerber H.P., Miller K., Kabbinnar F. et al. Arterial thromboembolic events in patients with metastatic carcinoma treated with chemotherapy and bevacizumab // J Natl Cancer Inst. – 2007. – 99(16): P. 1232-1239.
23. Schutz F.A.B., Je Y., Azzi G.R., Nguyen P.L., Choueiri T.K. Bevacizumab increases the risk of arterial ischemia: a large study in cancer patients with a focus on different subgroup outcomes // Ann Oncol. Nov 29. 2010 [Epub ahead of print].
24. Selheim F., Holmsen H., Vassbotn F.S. Identification of functional VEGF receptors on human platelets // FEBS Lett. – 2002. – 512(1-3): P. 107-110.
25. Meyer T., Robles-Carillo L., Robson T., Langer F., Desai H., Davila M. et al. Bevacizumab immune complexes activate platelets and induce thrombosis in FCGR2A transgenic mice // J Thromb Haemost. – 2009. – 7(1): P. 171-181.
26. Salgado R., Benoy I., Bogers J., Weytjens R., Vermeulen P., Dirix L. et al. Platelets and vascular endothelial growth factor (VEGF): A morphological and functional study // Angiogenesis. – 2001. – 4(1): P. 37-43.
27. Katoh O., Tauchi H., Kawaishi K., Kimura A., Satow Y. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptic cell death caused by ionizing radiation // Cancer Res. – 1995. – 55(23): P. 5687-5692.
28. Fehr M., Catscheg S., Reinhart W.H., Madon J., Asmis L., Cathomas R., von Moos R. The influence of bevacizumab on platelet function // Swiss Med Wkly. – 2011. – 141: w13243
29. Born G., Hume M. Effects of the numbers and sizes of platelet aggregates on the optical density of plasma // Nature. – 1967. – 215(5105): P. 1027-1029.
30. Gabbasov Z., Popov E., Gavrilov I., Pozin E. Platelet aggregation: the use of optical density fluctuations to study microaggregate formation in platelet suspension // Thromb Res. – 1989. – 54(3): P. 215-223.

Сведения об авторах:

Нероев В.В., директор ФГБУ «МНИИ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава РФ», руководитель отдела патологии сетчатки и зрительного нерва, профессор, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой глазных болезней ФПДО МГМСУ, заслуженный деятель науки РФ

Танковский В.Э., доктор медицинских наук, старший научный сотрудник отдела патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ «МНИИ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава РФ»

Григорьев А.В., кандидат медицинских наук, научный сотрудник отделения патофизиологии и биохимии ФГБУ «МНИИ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава РФ»

Серебрякова О.Е., научный сотрудник отделения патофизиологии и биохимии ФГБУ «МНИИ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава РФ»

Уракова Н.А., очный аспирант кафедры глазных болезней ФПДО МГМСУ
105062, Москва, ул. Садовая-Черногрязская, 14/19, e-mail: nataliya.urakova@mail.ru

UDC 617.735:616.145.154-005.6

Neroev V.V., Tankovskiy V.E., Grigoriev A.V., Serebryakova O.E., Urakova N.A.

E-mail: nataliya.urakova@mail.ru

THE CHANGES OF PLATELET AGGREGATION IN PATIENTS WITH RETINAL VEIN OCCLUSION DUE TO ANGIITIS AFTER THE INTRAVITREAL INJECTION OF BEVACIZUMAB

The study reports an evaluation of changes of platelet aggregation in patients with retinal vein occlusion due to angiitis after the intravitreal injection of Bevacizumab. 29 patients (29 eyes) were observed: 14 patients were given the complex treatment for retinal vein occlusion due to angiitis, 15 patients were given the intravitreal injection of Bevacizumab besides the complex treatment. The platelet aggregation activity was found to be normalized after the intravitreal injection of Bevacizumab. The data needs to be further investigated.

Key words: platelet aggregation, VEGF, Bevacizumab.