

11. Nishi Y. et al. Lens refilling to restore accommodation // J. cataract refract. surg. – 2008. – Vol. 35. № 2. – P. 374–382.

12. Pasta J. et al. WIOL – accommodative full optics hydrophilic IOL; part II; clinical experience // Proceedings of the Congress of the ESCRS. – Munich, Germany. – September, 2003. – P. 102.

13. Woods Randall. Искусственный хрусталик глаза. Патент US 62176 BA (10.09.99) // Новое в офтальмологии. – 2003. – № 1. – С. 49.

Поступила 22.09.2010

*М. М. ШИШКИН, Н. М. ЮЛДАШЕВА, С. В. АНТОНЮК*

## **КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БЕЗОПАСНОСТИ ИНТРАВИТРЕАЛЬНЫХ ИНЪЕКЦИЙ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ КОЛЛАЛИЗИНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

*Национальный медико-хирургический центр им. Н. И. Пирогова,  
Россия, 105203, г. Москва, ул. Нижняя Первомайская, 70.  
E-mail: michael94@yandex.ru, nodira\_alieva@list.ru*

С целью изучения повреждающего действия коллаллизина на сетчатку 11 кроликам интравитреально вводили препарат в дозе 10 КЕ (правые глаза – I группа) и 15 КЕ (левые глаза – II группа). Группу III (контроль) составили 6 глаз 6 кроликов, которым вводили 0,1 мл раствора BSS. Методы исследования: биомикроскопия, оптическая когерентная томография, ФАГ и гистологическое исследование. Сроки наблюдения – 15 дней. При офтальмоскопии глаз группы II отмечены ретинальные геморрагии и отек сетчатки. В I группе подобных изменений не обнаружено. По данным ОКТ утолщение сетчатки различной степени выраженности регистрировали во всех группах наблюдения. Результаты гистологического исследования свидетельствуют о выраженных изменениях сетчатки при 15 КЕ дозе, которые, вероятно, носят необратимый характер. Те же исследования свидетельствуют о том, что при введении 10 КЕ коллаллизина изменения сетчатки также присутствуют, но они носят локальный и достоверно менее выраженный характер.

*Ключевые слова:* сетчатка, коллаллизин, оптическая когерентная томография, кролики.

***M. M. SHISHKIN, N. M. YULDASHEVA, S. V. ANTONYUK***

### **CLINICOPATHOLOGIC ASPECTS OF THE INTRAVITREAL INJECTIONS SECURITY FOR DIFFERENT COLLALISIN DOSES IN THE EXPERIMENT**

*National medico-surgical center named after N. I. Pirogov,  
Russia, 105203, Moscow, Nizhnaya Pervomayskaya st., 70.  
E-mail: michael94@yandex.ru, nodira\_alieva@list.ru*

To evaluate collalysin toxicity in neurosensory retina in pigmented rabbit eyes by means of histological studies, optical coherent tomography and fluorescent angiography. Twenty eighth eyes of eighteen rabbits were distributed into three groups: sham group (III), that received a 0,1 ml balanced saline solution (BSS) intravitreal injection (6 eyes); group I, that received a 10 KE (0,1 ml) collalysin intravitreal injection (11 eyes); and group II, that received a 15 KE (0,1 ml) collalysin intravitreal injection (10 eyes). Rabbits were sacrificed 15 days after the procedure and both eyes of each rabbit were enucleated. A histological examination of neurosensory retina was performed. Its morphological features and layer thickness were also analyzed. Ophthalmoscopy of the eyes of group II is noted retinal hemorrhage and a retinal edema. In I group of similar changes it is not revealed. According to OCT a retina thickening registered in all groups of supervision. Results of histological research testify to the expressed changes of a retina at 15 KE to a dose which possibly have irreversible character. The same researches testify that at introduction 10 KE collalysin, retina changes also are present, but they carry local and authentically less expressed character.

*Key words:* a retina, collalysin, an optical coherent tomography, rabbits.

В отечественной литературе пионерские работы по интравитреальному применению ферментов, а именно коллаллизина, принадлежат В. Ф. Даниличеву. На кафедре офтальмологии Военно-медицинской академии г. Санкт-Петербурга в 1983 г. им была разработана и внедрена в практику методика регулируемого ферментного витреолизиса. Метод заключался в интравитреальном введении коллаллизина с целью витреолизиса на фоне внутривенной инъекции его ингибиторов. При этом согласно исследованиям авто-

ра доза 1 КЕ при интравитреальном введении была признана безопасной для интраокулярных структур [1]. Введение ингибиторов фермента, по мнению В. Ф. Даниличева, было необходимо с целью дополнительной защиты пограничных со стекловидным телом структур. Уже в наши дни в отечественной литературе появились работы, в которых коллаллизин вводят интравитреально для оптимизации техники удаления пролиферативных мембран с поверхности сетчатки, а также для ускорения лизиса витреальных кровоиз-

лияний. Доза коллализина, применяемого с подобной целью, уже значительно выше и достигает 10–16 КЕ [2, 3, 4]. Однако исследованиям, посвященным структурным изменениям сетчатки при интравитреальном введении различных доз данного препарата, уделяется мало внимания. Авторы не всегда считают необходимым проводить защиту ретиальной ткани, так как удаляют остатки препарата спустя 2–24 часа в ходе витрэктомии [3, 4]. В зарубежной литературе, несмотря на большое количество работ, направленных на изучение возможности фармакологического витреолизиса, публикаций, посвященных применению коллализина, практически нет [8].

Цель работы – изучить в эксперименте потенциально повреждающую дозу коллализина для сетчатки при его интравитреальном введении.

### Материалы и методы

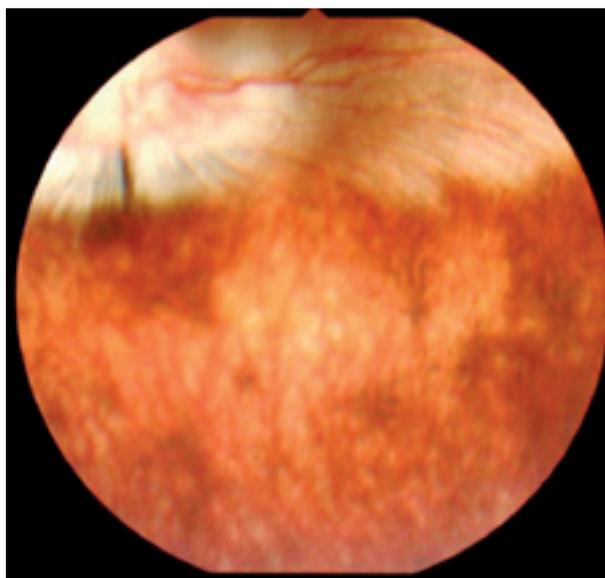
Объектом исследования были выбраны 17 кроликов породы шиншилла, половозрелого возраста (13–17 мес.), весом 2,7–3,2 кг, серо-черной окраски. В зависимости от дозы интравитреально вводимого препарата были сформированы две основные группы. Группа I – правые глаза 11 кроликов, в которые интравитреально вводили 10 КЕ коллализина (0,1 мл), группа II – левые глаза этих же 11 кроликов, в которые интравитреально вводили 15 КЕ коллализина (0,1 мл). Группу III (контрольная) составили правые глаза 6 кроликов, в которые интравитреально вводили 0,1 мл раствора BSS.

Клинические методы исследования включали: тонометрию, биомикроскопию, офтальмоскопию (60 D) и фоторегистрацию глазного дна на 1-е, 3-е и 15-е сутки от начала эксперимента. Оптическую когерентную томографию (ОКТ) и флюоресцентную ангиографию (ФАГ) выполняли до введения препарата и на 3-е сутки после инъекции. При проведении ОКТ регистрировали толщину сетчатки в двух зонах: А – ниже зрительного нерва и Б – назальнее медуллярной лучистости. Статистическую обработку данных проводили средствами программ «AnalysSoft Biostat 2007».

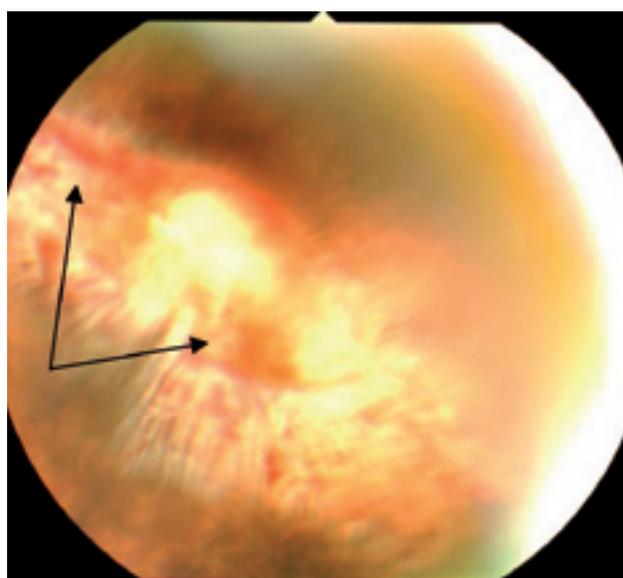
**Методика интравитреального введения фермента.** Животных анестезировали внутримышечным введением 30 мг/кг кетамина гидрохлорида и местными инстилляциями 0,5%-ного алкаина. Непосредственно перед введением стерильный сухой порошок коллализина (400 КЕ в ампуле; производство «Биопрепарат», Москва) разводили в изотоническом растворе хлорида натрия для получения соответствующих доз 10 и 15 КЕ в 0,1 мл. В условиях стерильной операционной под контролем операционного микроскопа препарат вводили интравитреально через прокол склеры в области плоской части цилиарного тела в 4,0 мм от лимба в одном из косых меридианов. В контрольной группе животным по вышеописанной методике интравитреально вводили 0,1 мл раствора BSS. Вывод животных из эксперимента осуществляли поэтапно передозировкой наркотического анальгетика «наркотан» на 3-й (5 животных) и 15-й (6 животных) день от начала эксперимента (в группах I и II), в контрольной группе – на 3-й и 15-й день по 3 кролика на каждый срок наблюдения. Работу с животными выполняли согласно требованиям нормативного документа «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР от 12.08.77 № 755). Животных содержали в виварии согласно «Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник» (утвержденными главным государственным санитарным врачом СССР, от 06.04.1973 № 1045-73).

### Метод гистологического исследования

После выведения животных из эксперимента их глаза энуклеировали и целиком фиксировали в 2,5%-ном растворе глутаральдегида на фосфатном буфере в течение 12 часов. Забор материала осуществляли из центральных и периферических отделов сетчатки. Образцы тканей обезживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в среду аралдит-М. Полутонкие срезы (1 мкм)



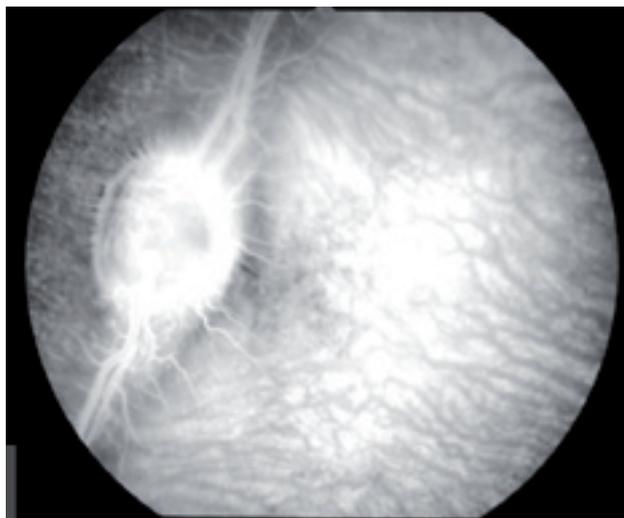
а



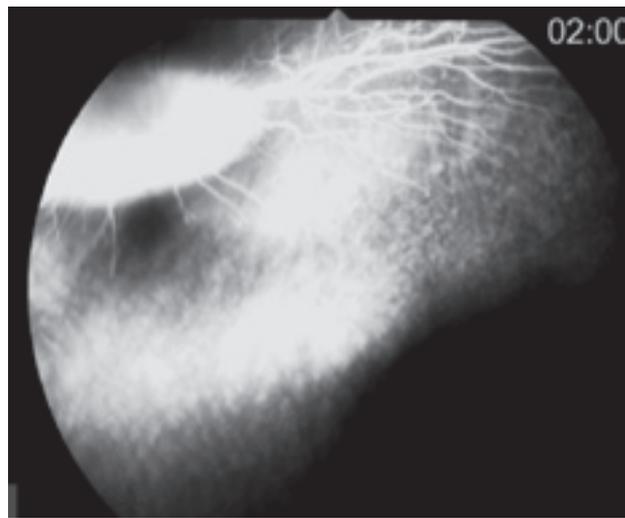
б

Рис. 1. Фото глазного дна экспериментальных животных:

а – на 3-е сутки после введения 10 КЕ коллализина, б – на 3-е сутки после введения 15 КЕ коллализина



а



б

**Рис. 2. Флюоресцентная ангиография здорового животного (а) и кролика из группы I на 3-и сутки после введения 10 KE коллализина (б)**

готовили на ультрамикротоме LKB-4800 (Швеция) и окрашивали основным фуксином и метиленовым синим (163 срез).

### Результаты и обсуждение

На 1–3-е сутки во II группе при офтальмоскопии во всех случаях были зарегистрированы единичные геморрагии на поверхности зрительного нерва и медуллярной лучистости, волокна последней выглядели ступеванными, а сетчатка других отделов глазного дна отечной (рис. 1б). На 15-й день наблюдения кровоизлияния сохранялись. В I группе во всех наблюдениях в эти же сроки отмечали невыраженное полнокровие вен в зоне медуллярной лучистости, отека сетчатки и кровоизлияний не обнаружили ни в одном случае (рис. 2б).

Введение флюоресцеина сопровождалось во II группе во всех случаях выраженным выходом его в стекловидное тело, что делало невозможным фотографирование глазного дна. В I группе выхода красителя из кровеносного русла не зарегистрировано ни в одном случае, в 7 наблюдениях отмечено умеренное полнокровие сосудов в области медуллярной лучистости (рис. 2б).

Сравнительный анализ результатов ОКТ показал достоверные изменения структуры сетчатки во всех трех группах на третьи сутки после интравитреальной инъекции. Характерно, что и в III группе после введения BSS нами было отмечено увеличение толщины сетчатки в среднем до  $167,4 \pm 6,12$  мкм в зоне А и до  $217,3 \pm 24,8$  мкм в зоне Б (рис. 3б), что несколько превышало исходные показатели (средняя толщина сетчатки в зоне А составляла  $140,7 \pm 6,47$  мкм, а в зоне Б –  $196,1 \pm 23,4$  мкм). Преретинальные слои стекловидного тела в этой группе выглядели на сканограммах во всех случаях оптически прозрачными. У животных I группы на 3-и сутки наблюдения по данным ОКТ зарегистрировано более выраженное увеличение толщины сетчатки, чем в группе III, что составило  $173,6 \pm 7,12$  мкм в зоне А и  $221,8 \pm 31,6$  мкм в зоне Б. Кроме того, в 9 наблюдениях в преретинальном пространстве были отмечены слабо рефлективные включения, свидетельствовавшие, на наш взгляд, о локальной деструк-

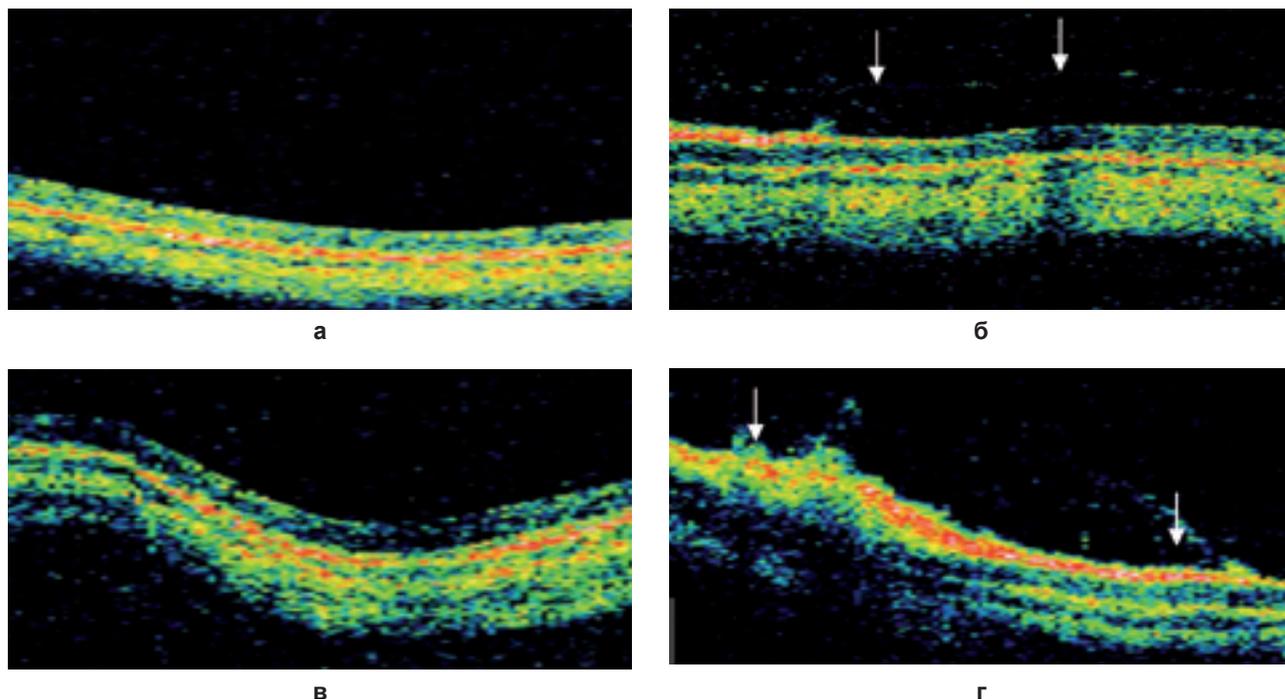
ции преретинально расположенных отделов стекловидного тела (рис. 3в).

Подобные изменения во II группе носили еще более выраженный характер. Толщина сетчатки в зоне А составила  $181,8 \pm 31,5$  мкм, а зоне Б –  $239,2 \pm 27,8$  мкм. Значительным, на наш взгляд, является появление на сканограммах в группе II зон гиперрефлективности, свидетельствующих о тракционном воздействии СТ на сетчатку, чего не было выявлено ни в одном случае при введении 10 KE препарата. Данные изменения могут свидетельствовать о значительном повреждении внутренних слоев сетчатки и кортикальных слоев СТ в ответ на интравитреальное введение 15 KE коллализина (рис. 3г).

### Гистологическое исследование

Анализ гистологической картины срезов сетчатки после введения коллализина в дозе 10 KE (группа I) показал сохранность архитектоники сетчатки и её слоистости в указанные сроки исследования. При этом не выявлено признаков повреждения наружных слоев, в частности, слоя палочек и колбочек, наружного ядерного и наружного плексиформного слоев. Во внутренних ретинальных слоях, в частности в плексиформном слое, зарегистрирован небольшой мелкокистозный отек (рис. 4а-1). На некоторых препаратах подобный отек захватывал и слой нервных волокон в виде небольших инвагинаций (рис. 4а-2). Целостность внутренней пограничной мембраны была зарегистрирована на всех срезах. Во внутреннем ядерном слое изменения были представлены небольшими очагами перинуклеарного отека. Вышеописанные изменения в основном были выявлены при изучении образцов, забранных из центральных отделов сетчатки (рис. 4а). В препаратах из периферических отделов сетчатки этой группы подобные изменения были значительно менее выраженными и представлены лишь небольшой вакуолизацией во внутреннем плексиформном слое и точечными очагами перинуклеарного отека во внутреннем ядерном слое (рис. 4б).

Гистологический анализ образцов ретинальной ткани после интравитреального введения коллализина-

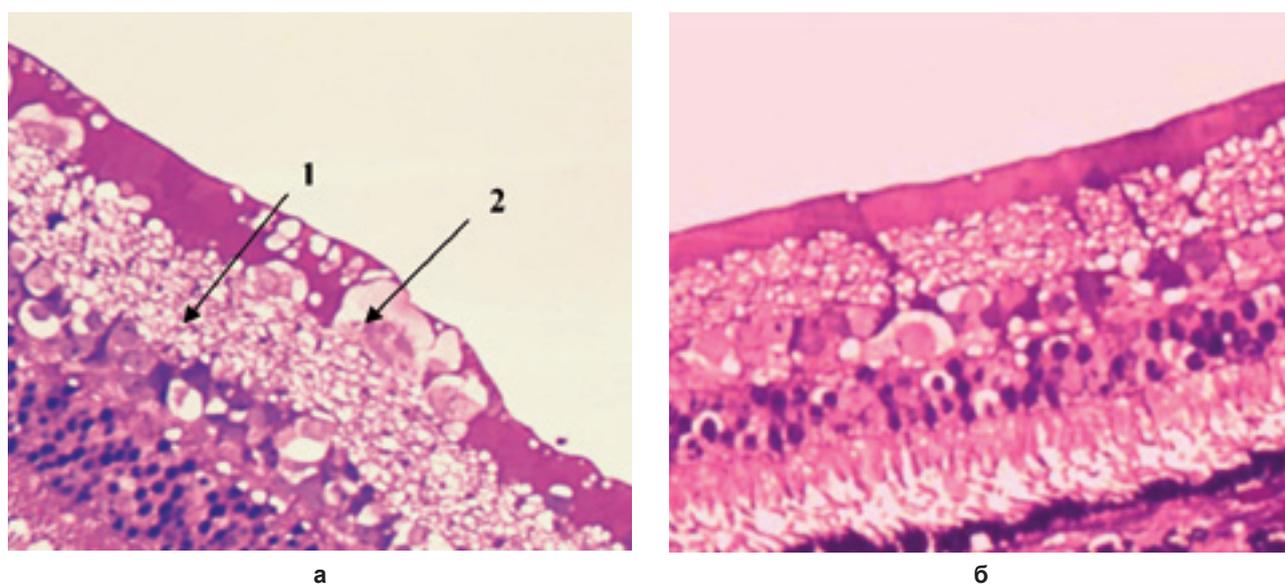


**Рис. 3.** Оптическая когерентная томография сетчатки животных до введения препарата и на 3-и сутки после введения препарата: а – до введения препарата; б – после введения раствора BSS; в – после введения раствора коллалазина в дозе 10 KE (стрелками отмечена ЗОСТ); г – после введения коллалазина в дозе 15 KE (стрелками отмечены зоны фиксации)

на в дозе 15 KE (группа II) выявил значительные изменения во всех слоях сетчатки. В каждом исследуемом препарате отмечали очаги лизиса наружных и внутренних сегментов фоторецепторов. Во внутреннем плексиформном слое сетчатки выявили отек в виде мелких вакуолей, значительно распространившийся на слой нервных волокон (рис. 5а-1). Местами отмечены слияние вакуолей и формирование гигантских полостей с выбуханием внутренней пограничной мембраны (рис. 5а-2) и резким её истончением. Изменения в ганглиозных клетках были представле-

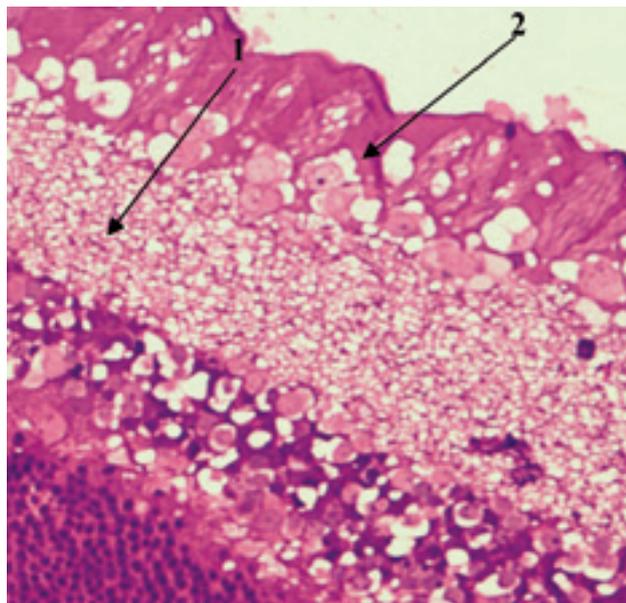
ны набуханием ядер. Во внутреннем зернистом слое отмечали отек, преимущественно перинуклеарной локализации. Вышеописанные повреждения были характерны для центральных отделов сетчатки. Аналогичные изменения, зарегистрированные на периферии сетчатки, носили несколько менее выраженный характер (рис. 5б).

Ферментотерапия занимает особое место в лечении пациентов с патологией сетчатки и стекловидного тела уже достаточно давно [12]. На начальных этапах ферменты вводили в СТ для лизиса

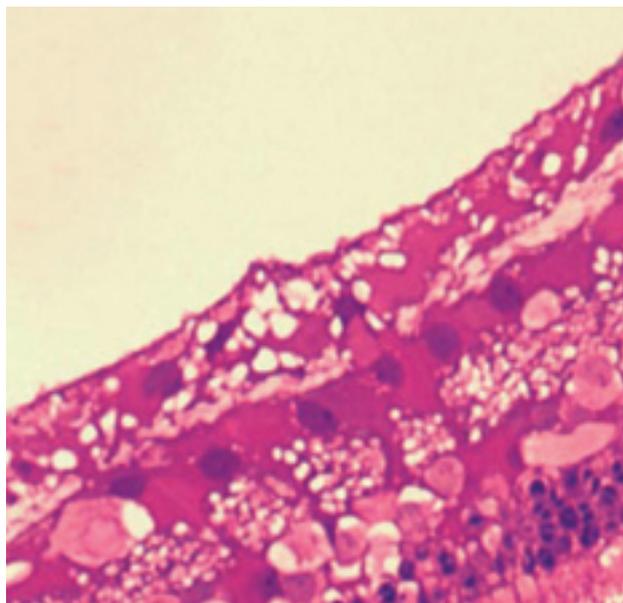


**Рис. 4.** Световая микроскопия полутонких срезов тканей глаза кролика на 15-е сутки после интравитреального введения коллалазина в дозе 10 KE: а – сетчатка центральных отделов, увеличение X320; б – сетчатка периферических отделов, увеличение X320.

Окраска: основной фуксин и метиленовая синь



а



б

**Рис. 5. Световая микроскопия полутонких срезов тканей глаза кролика на 15-е сутки после интравитреального введения коллалазина в дозе 15 КЕ: а – сетчатка центральных отделов, увеличение X320; б – сетчатка периферических отделов, увеличение X320.**

**Окраска: основной фуксин и метиленовая синь**

кровоизлияний. В дальнейшем их применение в витреальной хирургии было направлено на разрушение связи корковых слоев СТ и сетчатки с целью индуцирования задней отслойки СТ [6, 11]. Развитие научных исследований в этом направлении связано с новым пониманием биомеханической роли СТ в иницировании патологических процессов в зоне витреоретинального интерфейса, в первую очередь в области макулы и зрительного нерва [5, 7, 11]. Применение оптической когерентной томографии позволило прижизненно визуализировать структуру витреоретинального интерфейса – пространства, не видимого при традиционных методах исследования [10, 13].

При интравитреальном введении коллалазина ожидается его специфическое воздействие на коллагеновую структуру СТ, особенно в области витреоретинального контакта [9]. Однако наличие коллагена в структуре внутренней пограничной мембраны и базальной мембраны сосудов сетчатки может стать причиной и их повреждения. Как видно из результатов проведенного исследования, интравитреальное введение препарата в дозе 10 КЕ вызывает умеренно выраженные обратимые изменения структуры сетчатки с кистозным отеком внутреннего плексиформного слоя. Важным аспектом представляется отсутствие повреждений внутренней пограничной мембраны. В отличие от 10КЕ при интравитреальном введении 15 КЕ отмечены выраженные изменения сетчатки. При этом кистозный отек плексиформного слоя распространяется и на внутренний зернистый слой, где преобладает перинуклеарный отек. В слое нервных волокон отмечен выраженный отек в слое ганглиозных клеток и лизис ядер этих клеток. Большое количество сливных кист в слое нервных волокон обусловило появление многочисленных выбуханий внутренней пограничной мембраны и её истончение. Введение 15 КЕ препарата

вызывало повреждение и наружных слоев сетчатки, а именно лизис наружных и внутренних сегментов фоторецепторов.

Характер повреждений стенки сосудов при инъекции дозы 10 КЕ носил минимальный характер в виде периваскулярного отека. Введение же 15 КЕ коллалазина сопровождалось частичным лизисом стенки сосудов не только с выпотом плазмы (периваскулярный отек), но и выходом уже форменных элементов крови, которые мы видим при биомикроскопии в виде преретинальных кровоизлияний. Результаты флюоресцентной ангиографии подтверждали это и свидетельствовали о нарушении гематофтальмического барьера при введении 15 КЕ коллалазина, чего не было отмечено при введении 10 КЕ препарата.

Интравитреальные инъекции 15 КЕ коллалазина сопровождалось выраженными изменениями как в центральных, так и в периферических отделах сетчатки.

### **Заключение**

Предварительные результаты исследований показали, что интравитреальное введение коллалазина в дозе 15 КЕ сопровождается выраженными повреждениями сетчатки, которые, вероятно, могут носить необратимый характер. Изменения при применении 10 КЕ коллалазина носят достоверно менее выраженный, локальный характер и затрагивают только внутренние слои сетчатки. Гистологическая картина этих изменений дает возможность предполагать их обратимость.

Дальнейшие наблюдения за динамикой морфологических изменений сетчатки и зрительного нерва в отдаленном периоде после интравитреального введения различных доз коллалазина в эксперименте позволят сделать более обоснованные выводы о возможной безопасной дозе данного препарата.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Даниличев В. Ф. Патология глаз. Ферменты и ингибиторы. – СПб, 1996 – 103 с.
2. Запускалов И. В. с соавт. Индукция ферментного витреолиза в эксперименте // Сборник тезисов «Федоровские чтения» 2009».
3. Лыськин П. В., Письменская В. А., Лозинская О. Л. Применение ферментного препарата «коллализин» в хирургическом лечении отслойки сетчатки // Современ. технологии лечения витреоретинальной патологии. – М., 2010. – С. 567.
4. Тахчиди Х. П., Лыськин П. В., Лозинская О. Л. и др. Ферментная витректомия в лечении идиопатических макулярных разрывов // Современ. технологии лечения витреоретинальной патологии. – 2009.
5. Шишкин М. М., Бойко Э. В., Ирхина А. В. Щадящая витреоретинальная хирургия при витреомакулярном тракционном синдроме // Всероссийский семинар «Макула-2004». – Ростов-на-Дону. – С. 23–24.
6. Gandorfer A. Pharmacology and vitreoretinal surgery // Dev ophthalmol. – Basel, Karger, 2009 – P. 187.
7. Glaser B. M., Cardin A., Biscqе B. The Mechanism of development of vitreoretinal traction // Ophthalmology. – 1987. – № 94. – P. 327–332.
8. Moorhead L. C., Radtke N. Enzyme-assisted vitrectomy with bacterial collagenase. Pilot human studies // Retina. – 1985. – Vol. 5. № 2. – P. 98–100.
9. Sebag J., Bolazs E. Morphology and ultrastructure of Human Vitreous fibers // Invest. ophthalm. vis. sci. – 1989. – Vol. 30. № 8. – P. 227–231.
10. Sebag J. Imaging vitreous // Eye. – 2002. – № 16. – P. 429–439.
11. Sebag J., Wang M. Y., Nguyen D. Vitreopapillary adhesion in macular diseases // Trans. am. ophthalm. soc. – 2009. – № 107. – P. 35–46.
12. Siliato F. Fibrinolytic enzyme in the treatment of venous thrombosis of the retina // Ann. ottalmol. clin. ocul. – 1953. – Vol. 79. № 4. – P. 223–236.
13. Worst J., Los L. Cisternal anatomy of the vitreous. – Amsterdam: Kugler, 1995. – P. 150.

Поступила 21.09.2010