

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«МЕЖОТРАСЛЕВОЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС
«МИКРОХИРУРГИЯ ГЛАЗА» ИМЕНИ АКАДЕМИКА С. Н. ФЕДОРОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ПИСЬМЕНСКАЯ ВИКТОРИЯ АДИЛЕВНА

**ПРИМЕНЕНИЕ КОЛЛАГЕНАЗЫ В ХИРУРГИЧЕСКОМ
ЛЕЧЕНИИ РЕГМАТОГЕННОЙ ОТСЛОЙКИ СЕТЧАТКИ,
ОСЛОЖНЕННОЙ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ
ВИТРЕОРЕТИНОПАТИЕЙ**

14.01.07 – глазные болезни

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор
Захаров В.Д.

Москва – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Молекулярная структура стекловидного тела.....	13
1.2. Структурная организация стекловидного тела.....	17
1.3. Витреоретинальные взаимоотношения.....	19
1.4. Проллиферативная витреоретинопатия как причина неудач в хирургическом лечении отслойки сетчатки.....	22
1.5. Современная тактика хирургического лечения отслойки сетчатки.....	23
1.6. Применение протеолитических ферментов в офтальмологии.....	26
1.7. Ферментный витреолиз.....	30
Глава 2. ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА КОЛЛАГЕНАЗЫ НА КОМПОНЕНТЫ СТЕКЛОВИДНОГО ТЕЛА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ).....	41
2.1. Исследование цитотоксичности различных концентраций препарата коллагеназы в зависимости от времени инкубации с культурой фибробластов мышы линии NIH 3T3.....	41
2.2. Результаты исследования цитотоксичности различных концентраций препарата коллагеназы в зависимости от времени инкубации с культурой фибробластов мышы линии NIH 3T3.....	44
2.3. Материалы и методы, использованные для определения в эксперименте минимальной эффективной дозы и экспозиции ферментного препарата коллагеназы, необходимой для деструкции кортикальных слоев стекловидного тела при интравитреальном введении.....	45
2.4. Результаты эксперимента по определению минимальной эффективной дозы и экспозиции ферментного препарата коллагеназы, необходимой для разрушения кортикальных слоев стекловидного тела при интравитреальном введении.....	48

Глава 3. КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ТЕХНИКА ОПЕРАЦИЙ.....	58
3.1. Общая характеристика клинического материала.....	58
3.2. Методы комплексного обследования пациентов.....	59
3.3. Техническое обеспечение хирургического лечения.....	61
3.4. Клиническая характеристика I (основной) группы пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией.....	62
3.5. Клиническая характеристика II (контрольной) группы пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией.....	65
3.6. Сравнительный анализ клинической характеристики I (основной) и II (контрольной) групп пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией.....	69
3.7. Предоперационная подготовка пациентов.....	71
3.8. Техника операции субтотальной витрэктомии с применением ферментного препарата коллагеназы в I (основной) группе пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией.....	73
3.9. Техника операции субтотальной витрэктомии во II (контрольной) группе пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией.....	75
Глава 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ОТСЛОЙКИ СЕТЧАТКИ, ОСЛОЖНЕННОЙ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ВИТРЕОРЕТИНОПАТИЕЙ.....	77
4.1. Течение раннего послеоперационного периода в I (основной) и II (контрольной) группах пациентов.....	77
4.2. Осложнения в интра- и послеоперационном периоде.....	78
4.3. Результаты лечения пациентов I (основной) группы с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией.....	81
4.4. Результаты лечения пациентов II (контрольной) группы с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией.....	83
4.5. Сравнительный анализ результатов хирургического лечения пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией.....	85

Рекомендации по применению метода	88
Заключение	89
Выводы	97
Список сокращений.....	99
Список литературы	100

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Частота встречаемости регматогенной отслойки сетчатки достигает в общей популяции от 6,1 до 17,9 случаев на 100 тыс. населения, причем большинство пациентов с данной патологией составляют люди трудоспособного возраста (Lane J.I. et al. 2003; Mitry D. et al., 2012).

Значительный прогресс хирургических технологий за последние годы позволил улучшить анатомические и функциональные результаты оперативного лечения отслойки сетчатки, а также уменьшить число осложнений. Тем не менее, по данным различных авторов, процент успешных хирургических вмешательств при использовании современных высокотехнологичных подходов составляет от 61,5 до 97,5% в зависимости от тяжести исходного состояния глаза (Heimann H., 2007; Kreissig I., 2010; Wilkinson C.P., Rice T.A., 1997).

Для лечения отслойки сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией, необходимо проведение интравитреального вмешательства. В последние годы особое значение придается максимально возможному удалению кортикальных слоев стекловидного тела в процессе витрэктомии, как фактору, непосредственно влияющему на результативность хирургического лечения (Charles S., 2006; Machemer R., 1988). Несмотря на постоянное усовершенствование хирургической техники и инструментария, по-прежнему невозможно полностью механически удалить кортикальные слои стекловидного тела с поверхности сетчатки. Хирургические манипуляции могут стать причиной разрывов сетчатки, кровотечения из ее сосудов, повреждения нервных волокон, в особенности у пациентов молодого возраста (Sebag J., 1991).

Прочность витреоретинального контакта обусловлена в зоне базиса стекловидного тела проникновением витреальных фибрилл во внутреннюю пограничную мембрану сетчатки, а центральное – наличием фибронектина и ламинина, являющихся основными адгезивными гликопротеинами

экстрацеллюлярного матрикса (Balazs E.A., 1964; Kohno t. Et al., 1987; Le Goff M.M., Bishop P.N., 2008; Wang et al., 2000).

Альтернативой механическому методу отделения задних кортикальных слоев стекловидного тела может служить биохимическая индукция отслойки кортикальных слоев стекловидного тела или «фармакологический витреолизис» (Sebag J., 2009).

Изученные на данный момент в экспериментальных работах витреолитические препараты включают гиалуронидазу, тканевой активатор пламиногена, хондроэтиназу, диспазу, плазмин и микроплазмин (Bishop P.N. et al., 1999; Bhisitkul R.B., 2001; Sebag J., 2009). Наиболее перспективными, безусловно, являются плазмин и микроплазмин, которые в определенных дозировках и при соответствующем времени инкубации могут вызывать терапевтическую заднюю отслойку стекловидного тела, но оба препарата не влияют на витрео-ретиальные взаимоотношения в зоне базиса стекловидного тела (Benz M.S. et al., 2010; Chen W. Et al., 2008; Gandofer A. et al., 2004; Sakuma T. Et al., 2005; de Smet M.D. et al., 2009). Данная особенность ограничивает применение этих препаратов в хирургии отслойки сетчатки, где от максимально полного удаления кортикальных слоев стекловидного тела с поверхности сетчатки в зоне базиса напрямую зависит успех операции (например, при наличии периферических разрывов сетчатки).

Помимо воздействия на белки экстрацеллюлярного матрикса, осуществляющие прикрепление коллагеновых фибрилл к поверхности внутренней пограничной мембраны сетчатки в зоне заднего полюса глаза и его экватора, можно воздействовать собственно на коллаген, обеспечивающий витреоретинальное сращение в зоне базиса стекловидного тела и являющийся основным компонентом фиброцеллюлярных пролиферативных мембран. Для этой цели препаратом выбора является коллагеназа.

Коллагеназа (кlostридопептидаза А) – протеолитический фермент, получаемый из бактериальной культуры *Clostridium histoliticum*. В медицинской практике коллагеназа используется в виде водных растворов,

которые готовятся непосредственно перед применением (ферментный препарат "Коллализин", выпускаемый Санкт-Петербургским НИИ вакцин и сывороток и разрешенный для интравитреального применения (регистрационный номер ЛСР-005615/09, дата регистрации 13.07.2009)

Впервые коллагеназа была получена Касавиной Б.С. с соавторами в 1969 году. Применение протеолитического фермента, обладающего субстратной специфичностью в отношении коллагена открыло новые возможности как в консервативном, так и в хирургическом лечении. О положительных результатах использования «Коллализина» при рубцах кожи и роговицы, симблефароне, стенозах слезоотводящих путей, увеитах с экссудатом в передней камере и задними синехиями, гемофтальме свидетельствуют сообщения многих авторов (Анджелова Д.В., 2010; Краснов М.М., 1995; Лебедев О.И., 1989; Макаров И.А., 2003; Нарбут Н.П., Нуриева С.М., 1998; Нахабина Т.П., 1990; Павленко О.А., 1986; Полунин Г.С., 2000; Черкасов И.С. с соавт., 1980; Якименко С.А., 1990).

Даниличев В.Ф. расширил спектр интравитреального применения коллагеназы. Положительные результаты были получены им при консервативном лечении гемофтальма при помощи предложенного им витреолизоперфузионного способа. Интравитреальное введение коллагеназы после завершения витрэктомии по поводу гемофтальма резко сокращало частоту развития послеоперационного преретинального фиброза и рецидивов отслойки сетчатки (Даниличев В.Ф., 1983, 1996, 2005). Существенно повысить безопасность интравитреального введения коллагеназы позволила разработанная Даниличевым В.Ф. техника регулируемого ферментного витреолиза, заключающаяся в интравитреальном введении фермента и одновременном внутривенном введении ингибиторов протеаз. Так как молекулы ингибиторов протеаз имеют низкую молекулярную массу, они легко преодолевают гематофтальмический барьер и, достигнув сосудистых структур глаза, защищают коллагенсодержащие ткани вне зоны действия препарата (Даниличев В.Ф., 1983, 1996, 2005).

Однако до настоящего момента не проводились исследования цитотоксичности для изучения воздействия различных концентраций ферментного препарата коллагеназы в зависимости от времени инкубации, не исследовалась возможность интраоперационного применения раствора коллагеназы для деструкции кортикальных слоев стекловидного тела в зоне его базиса.

В связи с вышеизложенным, **целью настоящей работы** явилась разработка новой методики хирургического лечения регматогенной отслойки сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией, с применением ферментного препарата коллагеназы в процессе интравитреального вмешательства для более полного удаления кортикальных слоев стекловидного тела и повышения эффективности витреоретинальной хирургии регматогенной отслойки сетчатки.

Для реализации цели работы **задачи** решали в следующем порядке:

1. В эксперименте *in vitro* исследовать цитотоксичность различных концентраций препарата коллагеназы в зависимости от времени инкубации с культурой фибробластов мыши линии NIH 3T3.
2. В эксперименте *in vitro* определить минимальную эффективную дозу препарата, вызывающую разрушение кортикальных слоев стекловидного тела при интравитреальном введении.
3. Разработать методику проведения субтотальной витрэктомии с применением ферментного препарата коллагеназы в клинике.
4. Оценить функциональные и анатомические результаты применения разработанной методики по сравнению со стандартной.
5. Определить показания и противопоказания к применению коллагеназы у пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией.

Научная новизна работы

1. В эксперименте *in vitro* на культуре фибробластов мышцы линии NIH 3T3 впервые исследована цитотоксичность различных концентраций препарата коллагеназы в зависимости от времени инкубации.

2. В эксперименте *in vitro* на кадаверных глазах человека определено, что доза коллагеназы 30 КЕ/мл при интраоперационном введении в витреальную полость с экспозицией в течение 10 мин. эффективно разрушает остаточный преретинальный слой стекловидного тела, не вызывая деструкции внутренней пограничной мембраны сетчатки.

3. Разработана новая методика проведения субтотальной витрэктомии с применением ферментного препарата коллагеназы в клинике.

Практическая значимость работы

1. Экспериментально определена доза ферментного препарата коллагеназы и необходимая экспозиция для интравитреального применения в ходе хирургического вмешательства, позволяющая эффективно разрушать остаточные преретинальные слои стекловидного тела, не вызывая деструкции внутренней пограничной мембраны.

2. Разработана новая методика проведения субтотальной витрэктомии с применением ферментного препарата коллагеназы, используемая в хирургическом лечении отслойки сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией и позволяющая добиться более высоких анатомических результатов, чем при применении стандартной методики.

3. Определены показания и противопоказания к применению коллагеназы у пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанная методика интраоперационного применения ферментного препарата коллагеназы позволяет более эффективно удалять кортикальные слои стекловидного тела в зоне базиса по сравнению с механическим их удалением, тем самым повышая эффективность хирургического лечения регматогенной отслойки сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией.

2. Минимальная эффективная доза препарата коллагеназы при интравитреальном введении, не обладающая цитотоксическим действием и вызывающая эффективное разрушение остаточного преретинального слоя стекловидного тела без деструкции внутренней пограничной мембраны сетчатки, составляет 30 КЕ/мл при экспозиции 10 мин.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены в виде докладов и обсуждены на научно-практических конференциях ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» (июнь 2011, ноябрь 2015); Всероссийской патологии (Москва, 2010); VIII Научно-практической конференции «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии» (Москва, 2010); «Неотложная помощь, реабилитация и лечение осложнений при травмах органа зрения и в чрезвычайных ситуациях (Москва, 2003).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 4 в журналах, рецензируемых ВАК. Получен патент на полезную модель Российской Федерации от 5.11.02, регистрационный номер 2238066.

Практическая реализация материалов работы

Основные положения работы включены в тематику лекций цикла повышения квалификации врачей офтальмологов «Витреоретинальная хирургия с тренажерными занятиями по системе WETLAB» в ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, а также в лекционный курс для обучения студентов, ординаторов и аспирантов на кафедре офтальмологии в ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; в клиническую практику отдела витреоретинальной хирургии и диабета глаза головной организации и отделения витреоретинальной хирургии Тамбовского филиала Федерального государственного автономного учреждения «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Минздрава России, офтальмологического отделения ФГБУ Клинической больницы Управления Делами Президента Российской Федерации.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 120 страницах и содержит введение, 4 главы (обзор литературы, экспериментальные исследования, клинические исследования и результаты исследований) и список литературы. Работа проиллюстрирована 9 рисунками и 23 таблицами. Список литературы включает 74 отечественных и 127 иностранных источников.

Работа выполнена в ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, генеральный директор – проф. Чухраёв А.М., под руководством профессора Захарова В.Д.

Экспериментальные исследования проводились (моделирование хирургического вмешательства) в условиях операционной Wetlab научно-образовательного центра ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» (зав. НОЦ – д.м.н. Туманян Э.Р.), а также на базе Межкафедральной

лаборатории электронной микроскопии МГУ (зав. лабораторией Давидович Г.Н.), под руководством и при непосредственном участии к.м.н. Лыскина П.В. Токсикологические исследования проводились на базе института медико-биологических исследований и технологий АНО «Имбиит» (зам.директора по научно-практической работе – д.б.н.Перова Н.В.)

Клиническая часть исследования выполнена на базе отдела витреоретинальной хирургии и диабета глаза ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» (зав. отделением – к.м.н. Горшков И.М.)

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**1.1. Молекулярная структура стекловидного тела**

Витреальный гель представляет собой вискоэластический высокогидратированный экстрацеллюлярный матрикс с содержанием воды 98-99,7% [163]. Следовательно, стекловидное тело (СТ) содержит сильно разведенный коллоидный раствор структурных макромолекул, включая гиалуроновую кислоту, протеогликаны, коллагены и неколлагеновые белки. Дополнительно СТ содержит неструктуризованные протеины, включающие компоненты сыворотки, которые, кроме железосодержащих белков (лактоферрин и трансферрин), представлены в нем в значительно меньшей концентрации, чем в сыворотке крови [88]. Клеточный состав представлен небольшим количеством гиалоцитов, располагающихся в пределах кортикальных слоев стекловидного тела и его базиса [59, 78].

Как правило, межклеточное вещество содержит два макромолекулярных компонента, которые осуществляют взаимодополняющие функции. Структурный каркас образован коллагеновыми волокнами, которые придают ткани механическую прочность и передают тракционное воздействие. Гиалуроновая кислота придает вискоэластичность, заполняет матрикс и пространство между отдельными фибриллами [139, 162]. Различные протеогликаны, гликопротеины и другие молекулы, например фибриллины, оптицин и вит¹ также могут принимать участие в организации двух главных макромолекул структуры в трехмерную сеть, что обеспечивает прозрачность структуры и ее амортизационные свойства [89].

Периферически расположенный кортекс стекловидного тела состоит из плотно упакованных фибрилл коллагена и содержит высокую концентрацию гиалуроновой кислоты [165].

В СТ человека гиалуроновая кислота распределяется неравномерно, наибольшая ее концентрация отмечается в задних слоях СТ и сравнительно

меньшая – в передних отделах [140]. Более того, отмечаются определенные изменения концентрации гиалуроновой кислоты в течение жизни человека – ее количество постепенно увеличивается к 20 годам, оставаясь относительно постоянным до достижения 70 лет [79].

Витреальный гель содержит низкую концентрацию коллагена, оцениваемую приблизительно в 60 мг/мл в СТ бычьих глаз и в 300 мг/мл в СТ человеческих глаз [80]. Концентрация коллагена неравномерна в пределах СТ, наиболее высокая концентрация отмечается в зоне базиса стекловидного тела. Затем его концентрация уменьшается по направлению к центру и задней части СТ, но увеличивается в периферических кортикальных слоях [80, 88, 81]. Также концентрация коллагена уменьшается в течение нескольких первых лет жизни человека, но, с учетом параллельного роста глазного яблока, общее количество коллагена меняется незначительно. Balazs E.A. в 1982 году высказал предположение, что так как общее количество коллагена не меняется в процессе роста глазного яблока или взросления, то не существует обновления коллагена СТ, и один и тот же пул коллагена существует в течение всей жизни человека [79]. Однако в 1994 году Bishop P.N. обнаружил проколлаген в СТ бычьих глаз, что дает основания предположить возможность активного обновления витреального коллагена в течение жизни [88, 90].

Диаметр большинства коллагеновых волокон, обнаруживаемых в СТ при помощи электронной микроскопии, варьируется от 10 до 20 нм [79, 81]. Эти коллагеновые фибриллы относительно тонкие, в сравнении с большинством коллагеновых волокон других тканей [79, 96].

В настоящее время идентифицировано по крайней мере 18 различных типов коллагена. Все молекулы коллагена состоят из трех полипептидных цепочек (альфа-цепей). Каждая из трех цепочек содержит участки, которые обладают характерной последовательностью аминокислот с глицином в каждом третьем положении (радикал), в то время как два других радикала часто представлены аминокислотами пролином и гидроксипролином. Три цепочки (каждая из которых имеет такую последовательность аминокислот)

обвиваются одна вокруг другой, формируя тройную коллагеновую спираль. Все молекулы коллагена также имеют участки, представленные короткими «телопептидами» на каждом из концов тройной спирали, но в таких молекулах, как 6-ой тип коллагена, подобные участки могут составлять более половины молекулярного веса молекулы коллагена [88].

Большинство коллагеновых фибрилл СТ гетеротипичны – содержат более одного типа коллагена и сформированы из коллагена 2, 5/11 и 9-го типов [89].

Коллаген 2-го и 5/11 типов – это фибриллярные коллагены, которые выстраиваются в шахматном порядке и затем образуют поперечные межмолекулярные связи, формируя длинные тонкие волокна [88, 89]. Напротив, 9-ый тип коллагена представлен в упорядоченной последовательности (D-периодическом распределении) вдоль поверхности основных (крупных) коллагеновых фибрилл [95, 199]. Так как коллаген 9-го типа располагается на поверхности фибрилл, то, скорее всего, именно при его участии осуществляется взаимодействие фибрилл коллагена с другими молекулами и, таким образом, он играет важную роль в поддержании гелеобразного состояния [95, 199].

Преобладающим типом коллагена СТ является 2-ой тип коллагена, на счет которого приходится приблизительно 70-80% общего количества коллагена. Он состоит из трех идентичных альфа1-цепей. Молекулы коллагена 2-го типа образуют ковалентные поперечные межмолекулярные связи, формируя основной объем большинства гетеротипичных фибрилл коллагена. Когда молекулы коллагена 2-го типа секретруются во внеклеточную среду, они находятся в растворимой форме предшественника коллагена – проколлагена. На концевых частях молекулы проколлагена имеются надставки, называемые N-пропептид и C-пропептид [88, 89].

Попав в экстрацеллюлярную среду, проколлаген «обрабатывается» специфическими ферментами, называемыми N- и C-протеиназами, которые отщепляют N- и C-пропептиды соответственно. Этот процесс уменьшает

растворимость коллагена и позволяет ему принимать участие в формировании фибрилл [88, 89, 90].

Большинство коллагеновых фибрилл СТ, предположительно, имеют сердцевину, состоящую из коллагена 5/11-го типа [144].

Третий тип молекул коллагена, найденный в большинстве коллагеновых фибрилл СТ – коллаген 9-го типа. Этот коллаген скомпонован из трех различных альфа-цепей: альфа1(9), альфа2(9) и альфа3(9). Коллаген 9-го типа имеет значительно более сложную структуру, чем вышеописанные, так как он обладает последовательностью трех коллагеновых участков (COL1, COL2 и COL3), вкрапленных между четырьмя неколлагеновыми участками (NC1, NC2, NC3 и NC4) [199]. В отличие от коллагена 2-го и 5/11-го типов, этот коллаген не имеет поперечных межмолекулярных связей внутри большинства гетеротипичных фибрилл, но через одинаковые промежутки распределен вдоль и образует межмолекулярные связи по поверхности фибриллы [86]. Предположительно, COL1 и COL2 участки уложены параллельно поверхности фибриллы коллагена, и COL2 обеспечивает участки поперечного межмолекулярного взаимодействия с молекулами коллагена 2-го типа альфа1(9) цепи [194].

Катаболизм коллагена наиболее активно изучается в последнее десятилетие. Специфические коллагенолитические ферменты были обнаружены в различных тканях (эпителиальных и мезенхимальных) и клетках (макрофаги, нейтрофилы, фибробласты) [116, 120, 188]. Процесс коллагенолиза в тканях запускается путем активации проколлагеназы при отщеплении части её молекулы протеазами. Тканевая коллагеназа в нейтральной среде расщепляет молекулу коллагена на два термолабильных фрагмента, которые при температуре тела теряют свою конфигурацию спирали. Затем образовавшиеся фрагменты полностью разрушаются неспецифическими протеазами, в частности лизосомальными. Процесс завершается при связывании активного фермента с α_2 -макрोगлобулином и другими сывороточными факторами [128].

Результаты некоторых исследований показали, что в биосинтезе и катаболизме коллагена важную роль играют фибробласты, поддерживая динамическое равновесие этих двух процессов [6, 57, 67]. Фибробласты фагоцитируют коллагеновые фибриллы и осуществляют их внутриклеточный лизис с помощью лизосом [5, 7, 68]. Активная резорбция коллагена также осуществляется нейтрофилами и макрофагами, которые продуцируют лизосомальные ферменты и коллагеназу в зонах воспалительной реакции [40, 68].

1.2. Структурная организация стекловидного тела

Топографически в стекловидном теле принято различать центральные и кортикальные отделы, а также передние и задние по отношению к зубчатой линии [10, 59].

Применение оригинальной методики введения красителя в изолированное стекловидное тело человека позволило впервые обнаружить существование в нем полостей, которые Worst J. назвал «цистернами» [196]. Цистерны располагаются по окружности относительно оптической оси глаза, распределяясь ассиметрично, их количество с височной стороны больше, чем с носовой [41, 42].

Выделяют три группы цистерн:

1. ретроцилиарные, которые находятся в непосредственной близости к цилиарному телу;
2. экваториальные – располагаются в области экватора;
3. петалиформные (лепестковые) – окружают специализированные структуры: премакулярную сумку и препапиллярное пространство.

Премакулярная сумка является замкнутым пространством, расположенным в области желтого пятна сетчатки. Препапиллярное пространство образуется за счет расширения канала, стенки которого фиксированы по окружности диска зрительного нерва (ДЗН). По направлению к заднему полюсу глаза отмечается истончение коркового вещества СТ, а в

проекция премакулярной сумки и препапиллярного пространства оно практически отсутствует [197, 198].

Передние отделы стекловидного тела связаны с премакулярной сумкой и препапиллярным пространством при помощи двух каналов. Центральный (лентико-макулярный) связывает премакулярную сумку с ретролентальным пространством, а препапиллярное пространство соединяется с ретроцилиарными цистернами посредством оптико-цилиарного канала [43, 44]. Описанные каналы имеют единственное анатомическое сообщение между собой в виде соединительного канальца в зоне премакулярной сумки и препапиллярного пространства, что указывает на функциональное взаимодействие данных структур и объясняет наблюдаемое в клинике сочетанное поражение центральных отделов сетчатки и ДЗН. Основной функцией каналов СТ является, по всей видимости, обменно-транспортная. Регулируемое направленное движение внутриглазной жидкости в СТ поддерживает как гидродинамический, так и метаболический баланс между передними и задними отделами глазного яблока [42, 59].

Махачевой З. А. с соавторами были впервые описаны патологические канальцы СТ, обнаруживающиеся в зонах ретинальных разрывов и хориоретинальных дистрофий [42, 43]. Патологические канальцы берут начало в ретроцилиарных цистернах и, проходя через кортикальные слои СТ, открываются на его поверхности в области патологических хориоретинальных очагов. Данные анатомические находки указывают на возможную роль СТ в патогенезе хориоретинальной дистрофии, разрывов и отслойки сетчатки. Появление в СТ полостей, наполненных жидкостью, является важным фактором патогенеза отслойки сетчатки, как и тракционное воздействие стекловидного тела при его инерционных смещениях, приводящее к возникновению и формированию ретинального разрыва [8].

Установлено также, что в основе синерезиса СТ, то есть его разделения на более плотную и жидкую фракции [25, 59], лежит процесс нарушения

гидродинамики СТ, проявляющийся растяжением «оводнением» цистерн и «полноводием» каналов [43].

Таким образом, полученные в исследованиях Worst J. и Махачевой З.А. с коллегами данные убедительно свидетельствуют о том, что СТ играет значительную роль в патогенезе хориоретинальных дистрофий, разрывов и отслойки сетчатки.

1.3. Витреоретинальные взаимоотношения

На современном этапе разработка новых, патогенетически ориентированных хирургических вмешательств невозможна без детального изучения патогенеза витреоретинального пролиферативного процесса. Многие исследователи указывают, что патогенез пролиферативной витреоретинопатии (ПВР) в значительной мере определяется анатомо-физиологическими особенностями строения и сетчатки и СТ [122, 123, 145, 167, 200].

Задние кортикальные слои СТ прилегают к внутренней поверхности сетчатки, наиболее плотно фиксируясь к ней в зоне базиса СТ, около диска зрительного нерва, вдоль крупных ретинальных сосудов и, подобно фасции, выстилают весь задний полюс глаза [28, 91, 166].

Zimmerman L.E. (1960) показал существование тонких фибрилл, осуществляющих связь между корой СТ и внутренней пограничной мембраной сетчатки, что является причиной тесного витреоретинального сообщения [201].

Внутренняя пограничная мембрана сетчатки (ВПМ) состоит из внутренней и наружной частей. Наружная часть ВПМ образована в основном базальной мембраной клеток Мюллера, а внутренняя – мукополисахаридами и витреальными волокнами [113, 123, 156].

По мнению Wolfe S. (2003), окончания клеток Мюллера вплетаются внутрь мембраны, но не образуют ее [194]. Морфологически эта структура представляет собой хаотично переплетающиеся волокна коллагена 4-го типа, ассоциированные с гликопротеинами [129]. Толщина ВПМ неоднородна. Наименьшая её толщина отмечается в фовеолярной зоне – 10-20 нм и над

крупными сосудами, также ВПМ тонкая на крайней периферии – 50 нм. Утолщается ВПМ в области экватора до 360 нм, а в перифовеаллярной области – до 1887 нм. ВПМ прилегает к головке диска зрительного нерва (ДЗН) и отсутствует над ним [110, 113, 156, 176].

В 1964г. Wolter J. R. обратил внимание на наличие пор в ВПМ, располагающихся вдоль сосудов и обнаружил волокна стекловидного тела, вставляющиеся в эти поры [195]. Такое структурное строение было названо витреоретиноваскулярной лентой, именно оно объясняет прочную связь между СТ и сосудами сетчатки. Возможно, именно этим объясняется частое расположение ретинальных разрывов вдоль сосудов в случае отслойки сетчатки [142].

Прочность витреоретинального контакта обусловлена в зоне базиса СТ проникновением его фибрилл во внутреннюю пограничную мембрану сетчатки, а центральнее – наличием фибронектина и ламинина, являющихся основными адгезивными гликопротеинами экстрацеллюлярного матрикса [78, 134]. По мнению Sebag J., топография и прочность витреоретинальной связи в заднем полюсе обеспечиваются компонентами экстрацеллюлярного матрикса между ВПМ и корковым слоем СТ [163, 166, 168]. Le Goff M. M. и Bishop P. N. (2008) предположили, что основой витреоретинальной адгезии в области заднего полюса служит «молекулярный клей» в роли которого выступает оптицин, связывающий коллагеновые фибриллы СТ и протеогликаны ВПМ [139].

В зоне базиса СТ, его коллагеновые волокна непосредственно вплетаются в сетчатку, а по данным некоторых авторов, срез полученных препаратов СТ и сетчатки показывает, что фибриллы СТ пронизывают половину толщины ВПМ [77, 78, 81, 82, 109, 139].

С возрастом зона базиса СТ постепенно распространяется центральнее, что является следствием интравитреального синтеза коллагена. Вновь образующиеся коллагеновые волокна образуют слой на наружной поверхности ВПМ и через её дефекты проникают в витреальную полость, где при

взаимодействии с кортикальными слоями СТ, образуют новые зоны адгезии [139, 186].

Имеет значение также наличие патологических витреоретинальных сращений, которые проявляются более плотной фиксацией кортикальных слоев СТ к сетчатке.

С течением времени в структуре коллагеновых фибрилл СТ возникают структурные изменения, выражающиеся в частичной потере поверхностных цепочек коллагена 9-го типа, что приводит к агрегации фибрилл и впоследствии к ликвификации СТ [91]. В результате этих процессов с возрастом (после 50 лет) при ослаблении витреоретинальной адгезии возникает задняя отслойка СТ (ЗОСТ) [73]. В этом случае при биомикроскопии определяется относительно плотная мембрана, обозначаемая клиницистами как задняя гиалоидная мембрана (ЗГМ). При гистологическом исследовании ЗГМ представляет собой компактный слой коллагеновых фибрилл кортикальных слоев СТ с остатками внутренней пограничной мембраны сетчатки, образовавшимися при её расслоении [28]. Роль ЗОСТ в патогенезе ПВР неоднозначна. Установлено, что частичная ЗОСТ ведет к прогрессированию пролиферативного процесса и может способствовать возникновению частичного гемофтальма [9, 20, 169]. В то же время возникновение полной ЗОСТ стабилизирует течение патологического процесса и предотвращает развитие витреоретинальной пролиферации [55]. Одной из важных особенностей патологически измененной задней гиалоидной мембраны является ее контрактильная способность, за счет которой ЗГМ может оказывать тракционное воздействие на сетчатку и обуславливать возникновение ее отслойки, наряду с таким фактором, как наличие сокращающейся фиброваскулярной ткани [55, 56, 148]. Замечено, что форма тракционной ОС определяется конфигурацией отслойки ЗГМ, а ее распространенность зависит от площади фиброваскулярной ткани и площади сращения ее с внутренней поверхностью сетчатки [55, 56].

1.4 Прролиферативная витреоретинопатия как причина неудач в хирургическом лечении отслойки сетчатки

Значительный прогресс хирургических технологий за последние годы позволил улучшить анатомические и функциональные результаты оперативного лечения отслойки сетчатки, а также уменьшить число осложнений. Тем не менее, по данным различных авторов, процент успешных хирургических вмешательств при использовании современных высокотехнологичных подходов составляет от 61,5 до 97,5% в зависимости от тяжести исходного состояния глаза [125, 137, 193].

Одной из основных причин неудач хирургического лечения регматогенной отслойки сетчатки является возникновение и прогрессирование пролиферативной витреоретинопатии в послеоперационном периоде. Проведенные исследования показали, что развитие ПВР отмечается в 2,2-29,3% случаев, а частота развития рецидивов отслойки сетчатки при этом составляет от 2,2 до 20,0% [4, 63, 83, 94, 117, 125, 135, 193]. При этом значительное количество рецидивов отмечается в первые три месяца после операции. Возможно также возникновение локального пролиферативного процесса с формированием эпиретинальной мембраны в макулярной зоне, что приводит к значительному снижению функционального результата операции.

Развитие ПВР приводит к ряду структурных изменений, которые затрудняют проведение хирургического вмешательства и ухудшают анатомо-функциональные результаты лечения ОС [3, 11, 17, 31, 71]. Согласно результатам гистологических исследований, в формировании пролиферативных мембран принимают участие клетки пигментного эпителия сетчатки (РПЭ), глиальные клетки, фибробласты и лимфоциты при регулирующем воздействии макрофагов [132, 146, 179]. Существует сложная система межклеточных взаимоотношений, которая активирует целый комплекс патогенетических факторов, запускающих процессы пролиферации. Наиболее важную роль в развитии ПВР играют клетки пигментного эпителия вследствие их способности к миграции и пролиферации [19, 98, 127]. В процессе развития

регматогенной отслойки сетчатки происходит миграция клеток РПЭ в витреальную полость и на внутреннюю поверхность сетчатки, где они оседают и начинают пролиферировать [63, 133].

Образование фиброваскулярной ткани, которая обладает тракционными свойствами, приводит к возникновению локальной отслойки сетчатки, что усиливает нарушение гематофтальмического барьера [100, 121]. В свою очередь, это способствует дополнительной миграции клеточных элементов в витреальную полость, где они становятся источником таких стимулирующих факторов, как PDGF, VEGF, TGF- β . В зону патологического процесса привлекаются новые клетки и активно пролиферируют [100, 190, 191]. Таким образом, замыкается патологический круг, имеющий черты хронического воспаления [190, 191].

Несомненным остается тот факт, что основным компонентом фиброцеллюлярных пролиферативных мембран является коллаген. Соответственно, даже на начальной стадии развития пролиферативного процесса на поверхности сетчатки, целесообразно интравитреальное введение коллагенолитических препаратов с последующей витрэктомией и удалением пролиферативных мембран [31].

1.5 Современная тактика хирургического лечения отслойки сетчатки

Основным принципом в хирургическом лечении отслойки сетчатки является блокирование разрыва сетчатки.

В неосложненных случаях, при наличии свежей отслойки сетчатки с периферическим либо парапериферическим разрывом, размером не более 2-х диаметров ДЗН и отсутствии значительных изменений в СТ, методом выбора является эписклеральное пломбирование в сочетании с криопексией зоны разрыва [23]. Эффективность этой методики по данным различных авторов составляет от 53,4 до 94% [125, 137, 193]. К основным причинам неудач при эписклеральном пломбировании относятся: неблокирование разрыва, ятрогенный разрыв сетчатки, ее ущемление в склеротомическом отверстии при

выпускании субретинальной жидкости, кровоизлияние в стекловидное тело, а также развитие и прогрессирование ПВР, приводящее к возникновению новообразованных разрывов сетчатки, разгерметизации ранее разблокированного разрыва, образованию эпи- и субретинальных мембран и тяжей, вызывающих иммобилизацию сетчатки [35, 76, 125, 193].

Однако при наличии выраженных изменений в СТ, а также при парацентральной и центральной локализации разрыва, в случаях обнаружения гигантских разрывов и отрывов от зубчатой линии протяженностью более 90-градусов, эффективность методики эписклерального пломбирования ограничена [35, 36].

Для лечения отслойки сетчатки, осложненной ПВР, необходимо проведение интравитреального вмешательства.

В 1972 г. Machemer R. сообщил о первом опыте проведения закрытой задней витрэктомии [142]. В сотрудничестве с Helmut Buettner был создан хирургический инструмент - витреотом, обладающий способностью разрезать волокна СТ с одновременным его удалением и замещением ирригационным раствором. Разработанный авторами новый метод хирургического лечения был активно внедрен в клиническую практику.

В последние годы особое значение придается максимально возможному удалению кортикальных слоев СТ в процессе витрэктомии, как фактору, непосредственно влияющему на результативность хирургического лечения. Устранение тракционных сил, воздействующих на сетчатку, является важнейшей задачей витреоретинальной хирургии [37, 101, 143].

Несмотря на постоянное усовершенствование хирургической техники и инструментария, по-прежнему сложно полностью механически удалить кортикальные слои стекловидного тела с поверхности сетчатки. Хирургические манипуляции могут стать причиной разрывов сетчатки, кровотечения из ее сосудов, повреждения нервных волокон, в особенности у пациентов молодого возраста [164].

Удаление преретинальных слоев СТ зачастую представляет сложность вследствие их тесной связи с сетчаткой. Различными авторами были предложены разнообразные методы, способствующие снижению риска ятрогенных повреждений сетчатки. Nan D. с соавт. (1988) разработали способ для отслоения кортикальных слоев СТ. Эта методика используется после выполнения частичной витрэктомии в передних отделах СТ [118]. Необходимо расположить канюлю, подсоединенную к автоматической системе аспирации, у края ДЗН, вблизи сетчатки. Постепенно увеличивая параметры аспирации до 150 мм рт. ст., наконечником канюли выполняются небольшие по амплитуде тракционные движения до тех пор, пока в отверстие канюли не аспирируется часть коры СТ. Затем канюля медленно отодвигается от поверхности сетчатки с одновременным увеличением аспирации до максимальных параметров (400 мм рт. ст.). Эти манипуляции следует повторять до достижения полного отделения кортикальных слоев стекловидного тела от внутренней поверхности сетчатки. В 2002 г. Тахчиди Х. П. предложил использовать ретинальные шпатели для отделения ЗГМ. В случаях прочной фиксации ЗГМ к сетчатке, автор предложил дополнительно использовать введение перфторорганического соединения (ПФОС) для отслоения ЗГМ [61]. Для облегчения первичного удаления СТ с поверхности сетчатки также возможно использование атравматичной методики гидроинъекционной деяминации [24, 48, 177].

Несомненно, особые затруднения представляет выявление остаточного тонкого слоя коллагеновых волокон на внутренней поверхности сетчатки. Для облегчения визуализации кортикальных слоев СТ применяются различные красители: триамцинолона ацетонид (Triamcinolone acetonide), трипановый синий (Trypan blue), индоцианин зеленый (Indocyanine green), флюоресцеин, которые значительно облегчают задачу хирурга [97, 102, 108, 173, 175]. Однако интравитреальное использование красителей может оказывать токсическое влияние на структуры заднего сегмента глаза [75, 120, 160].

Даже при наличии ЗОСТ остатки заднего гиалоида служат основой для последующей клеточной пролиферации и фиброцеллюлярной контракции,

приводящей к формированию эпиретинальных мембран и развитию ПВР [111]. Избирательное и полное расщепление витрео-ретиальных соединений под воздействием биохимического препарата может стать как вспомогательным средством, так и альтернативой механической витрэктомии [170, 174]. Если витреальный гель подвергнется разжижению (ликвификации) или ферментный препарат – изолированно или в комбинации с витрэктомией – ослабит адгезию СТ к сетчатке, эти изменения значительно уменьшат риск хирургических осложнений [161]. В последние годы многие исследователи ставят своей целью разработку методики применения препарата, который при инъекции в СТ вызывает избирательный витреолиз в форме ЗОСТ или витреального разжижения. Однако некоторые авторы подчеркивают, что любая попытка вызвать ЗОСТ связана с риском, что витреальная ликвификация без ослабления витрео-ретиальной адгезии может вызвать серьезные проблемы, связанные с тангенциальными и другими витреоретиальными тракциями, что приведет к отслойке сетчатки, ПВР или макулярному разрыву [171, 182].

1.6. Применение протеолитических ферментов в офтальмологии

Ферменты представляют собой высокомолекулярные термолабильные белки, обладающие определенной молекулярной массой, соответствующей формой молекулы, стабильностью и электрофоретической подвижностью [12, 13, 14].

Для всех ферментов характерна субстратная специфичность, как важнейшее свойство, отличающее их от других катализаторов [13, 14].

Энзимы, как и все белки, состоят из определенной последовательности аминокислот, соединенных в полипептидную цепь. Каждая молекула фермента имеет на своей поверхности каталитический участок и контактную площадку. Каталитический участок молекулы принимает непосредственное участие в реакции катализа, то есть в преобразовании субстрата, на который воздействует фермент. Контактная площадка представляет собой особый участок, к которому

прикрепляется субстрат. Вместе каталитический участок и контактная площадка образуют активный центр фермента. Субстратная специфичность фермента объясняется совпадением пространственных конфигураций субстрата и активного центра фермента.

Действие фермента может зависеть от присутствия ингибитора или активатора. Активаторы ферментов – это химические факторы или вещества, способные увеличивать активность энзима вне зависимости от температуры, давления, ионов и концентрации субстрата. Ингибиторы же, напротив, снижают активность энзимов [12, 13, 52, 53].

Согласно международной классификации, протеолитические ферменты относят к классу гидролаз, в составе которого выделяют подкласс пептид-гидролаз. Пептид-гидролазы катализируют реакцию расщепления пептидной связи в белках [12, 13, 17].

Процесс расщепления полипептидной цепи белка с образованием пептидов и свободных аминокислот называется протеолизом [12, 13, 52, 53, 60]. Различают общий и ограниченный протеолиз [58]. В процессе общего протеолиза происходит расщепление полипептидной цепи молекулы белка на многих участках с образованием низкомолекулярных продуктов. Примером общего протеолиза может служить воздействие на белок пепсина, химотрипсина, трипсина, или комплекса бактериальных протеаз. В случае ограниченного протеолиза в молекуле белка разрушаются единичные пептидные связи. При этом молекула приобретает новое функциональное качество. Так происходит, например, превращение неактивной формы фермента (профермента) в активную (трипсиногена в трипсин, протромбина в тромбин, фибриногена в фибрин и т.д.) [14, 18, 60].

К наиболее важным характеристикам энзимов, определяющим возможность их применения в практике, относят необходимый уровень рН среды, оптимальную температуру действия и субстратную специфичность.

Протеиназы бактериального происхождения по эффективности действия заметно превосходят синтетические аналоги и составляют около половины

производства препаратов на мировом рынке. Они обладают высокой субстратной специфичностью и катализируют строго определённые химические реакции без образования побочных продуктов. Кроме того, они действуют в водных растворах при физиологических значениях pH и температуры.

Широкое использование растворов как среды, обуславливается тем, что в растворе обеспечиваются следующие характеристики процесса: равномерное распределение реагентов по всему объёму, ионно-молекулярная степень дисперсности растворённых веществ, преодоление кинетической заторможенности многих реакций благодаря высокой скорости диффузии компонентов или относительной легкости введения катализаторов, возможность проведения реакций с необходимой скоростью при условиях, близких к стандартным. Растворы не отстаиваются и сохраняются все время однородными [45].

Для изучения возможности локализованного воздействия протеолитических ферментов на определённые структуры глаза с минимальным его влиянием на пограничные структуры глазного яблока, Даниличевым В. Ф. были проведены исследования, в основе которых лежало сравнение процента максимального накопления меченого фермента в различных тканях глаза в зависимости от метода его введения [12, 13]. В рамках исследования также был изучен предел возможности увеличения дозы при местном применении ферментов; также было проведено изучение местного раздражающего протеолитического действия ферментов на ткани глаза в зависимости от дозы энзима с целью выявления осложнений в случае превышения допустимой дозы [18].

В результате проведенных исследований, автором был сделан вывод, что протеолитические ферменты при местном применении должны быть строго дозированы, так как обладают заметным раздражающим действием вследствие их протеолитических свойств [12, 18]. Именно появление местного раздражающего действия ограничивает применяемую дозу протеолитического

фермента. В клинической практике необходимо четко следовать инструкции по применению ферментного препарата, оценивая его количество в единицах специфической протеолитической активности, а не в весовых единицах [18].

В СТ максимальное накопление фермента наблюдалось только при интравитреальных инъекциях и составило через сутки при ретролентальных – 52,1% и при премакулярных – 51,4% от введенной дозы. Через 4 суток накопление фермента в витреальной полости составляло лишь 12,8%. В случае интравитреальных инъекций через 2-е суток отмечалось проникновение фермента в такие структуры, как хрусталик (7-9,3%), цилиарное тело (7,8-10,1%), сетчатку и сосудистую оболочку глаза (12,4-13,2%) [12, 13, 14, 15].

Но когда требуется изолированное воздействие на СТ (ферментный витреолиз), необходимо защитить от протеолиза все вышеперечисленные структуры. Для защиты сетчатки и других оболочек структур O Neil R. и Shea M. (1973) предлагали через 24-72 часа после введения в СТ бактериальной коллагеназы вводить внутривенно ингибиторы: ЭДТА, цистин или цистеин [155].

Учитывая низкую молекулярную массу ингибитора, благодаря чему он способен преодолевать гематофтальмический барьер, Даниличевым В. Ф. с соавторами было высказано предположение о целесообразности сочетанного введения двух препаратов: фермента в СТ, а его ингибитора в венозное русло. Ингибитор, достигнув сосудистых структур глаза и проникнув через гематофтальмический барьер во внутриглазную жидкость, защитит от воздействия ферментного препарата сетчатку, хрусталик и другие структуры. Автор методики подтвердил свои предположения путем эксперимента *in vivo* [12, 13, 14, 15].

Ткани организма защищены от действия протеаз ингибиторами протеолиза. Ингибиторы протеолиза выполняют важные физиологические функции, задерживая преждевременную активацию протеолитических ферментов, защищая ткани от протеолиза микробными ферментами, регулируя свертывающую систему крови и фибринолиз, влияя на артериальное давление и проницаемость сосудов.

Общим свойством всех белковых ингибиторов является способность образовывать с ферментами устойчивые комплексы, лишенные ферментативной и ингибиторной активности. В зависимости от степени связывания с ферментом ингибиторы подразделяют на ингибиторы с временным, прогрессирующим и перманентным ингибированием. Для последних характерно достижение равновесия ингибирования в течение нескольких секунд или минут и сохранение его на этом уровне на протяжении нескольких дней. Скорость достижения равновесия не зависит от температуры. Соединение ингибитора с ферментом необратимо. К группе ингибиторов с перманентным ингибированием относится альфа2-макроглобулин, связывающий коллагеназу [15].

1.7. Ферментный витреолиз

Изученные на данный момент витреолитические препараты включают гиалуронидазу, тканевой активатор плазминогена, хондроэтиназу, диспазу, плазмин и микроплазмин [92, 170, 171, 172].

Исследования, посвященные воздействию гиалуронидазы, показали, с одной стороны, безопасность её применения, но с другой – низкую эффективность с целью индукции ЗОСТ. Вызывая деградацию молекул гиалуроновой кислоты, препарат не влияет на витреоретинальные взаимоотношения [115, 126, 172, 187].

Хондроэтиназа является ферментом, обладающим субстратной специфичностью в отношении хондроитинина сульфата (гликопротеина, играющего роль в поддержании гелеобразного состояния СТ). Исследования возможности применения этого препарата показали, что данный фермент при его введении в допустимой, не токсичной концентрации не вызывает ЗОСТ [158].

Многие авторы посвятили свои работы исследованию ферментного протеолиза с использованием диспазы, нейтральной бактериальной протеазы, выделяемой *Bacillus polymyxa*. Однако несмотря на обнадеживающие

результаты первых работ, впоследствии было доказано, что препарат оказывает токсическое воздействие на сетчатку [131, 154, 181].

Несомненно, наибольшего внимания заслуживает плазмин - это неспецифическая сывороточная протеаза, являющаяся промежуточным звеном фибринолитического процесса [87]. Плазмин гидролизует различные гликопротеиды, включая ламинин и фибронектин, которые поддерживают прикрепление коллагеновых фибрилл задних кортикальных слоев СТ к ВПМ сетчатки. Благодаря расщеплению этих соединений становится возможным создать терапевтическую ЗОСТ [87, 183]. В 2001 году Gandofer A. с соавторами произвел серию экспериментов на трупных свиных глазах, отличающихся особо плотной адгезией кортикальных слоев СТ к поверхности сетчатки. В результате была подобрана такая дозировка инъецируемого в витреальную полость плазмина, которая после 60-ти минутной инкубации вызывала полную ЗОСТ, что подтверждалось результатами световой и электронной микроскопии. При этом морфология ВПМ и клеточная анатомия сетчатки не изменились. Однако было отмечено, что в зоне базиса кортекс СТ сохранял плотную фиксацию к поверхности сетчатки [111]. Позднее, на этапе клинических испытаний, многие исследователи отмечали, что процесс получения аутологичного плазмина из сыворотки крови пациента требует значительного времени (около 8-ми дней) и довольно дорог [161]. Несмотря на то, что ведутся работы, целью которых является сокращение сроков приготовления препарата (S. Rizzo et al., 2006), аутологичный сывороточный плазмин имеет, как и другие препараты, являющиеся производными крови человека, один существенный недостаток – он может содержать бактериальные и вирусные частицы [159, 161].

Перспективным представляется изучение возможностей интраоперационного применения миниплазмина для ферментативной индукции ЗОСТ. Миниплазмин получен российскими учеными ФГБУ «РКНПК» Минздрава России. Группой авторов, Шкворченко Д. О., Шарафетдиновым И. Х. и Норманн К. С., ведущих в настоящее время активное изучение возможностей применения нового препарата. Установлено, что

миниплазмин в дозе 180 мкг при экспозиции 60 минут вызывает индукцию ЗОСТ в глазах экспериментальных животных, не оказывая токсического влияния на структуры глазного яблока [72].

В 2005 году Sacuma с соавторами предложил использовать для производства ферментного витреолиза микроплазмин – рекомбинантный протеин, являющийся частицей человеческого плазмина, сохраняющей протеазную активность, и продуктом генной инженерии, соответственно лишенным недостатков аутологичного плазмина. После инъекции микроплазмина в витреальную полость глаза кролика проводилось наблюдение и обследование, включающее В-сканирующую ультразвунографию и сканирующую электронную микроскопию. Исследователями была отмечена следующая закономерность: если В-сканирование выявляло полную ЗОСТ, при электронной микроскопии отсутствовали фибриллы коллагена на поверхности сетчатки, а при обнаружении частичной ЗОСТ электронная микроскопия обнаруживала наличие коллагеновых фибрилл, в особенности над ретинальными сосудами. Кроме того, во всех случаях (в экспериментальной и в контрольной группах) было сохранено прикрепление кортикальных слоев СТ к сетчатке в зоне базиса [161].

По мнению Gandofer и соавторов, причина избирательности воздействия плазмина состоит в отличии природы витрео-ретиальных соединений в зоне базиса СТ, что связано с перпендикулярным расположением коллагеновых фибрилл к поверхности сетчатки в этой области, а не параллельным, как в зоне заднего полюса глаза и экватора [111, 114, 167]. Также это подтверждает, что непрямая активация коллагеназы не входит в число эффектов, вызываемых воздействием плазмина [111].

Таким образом, можно утверждать, что плазмин и микроплазмин могут в определенных дозировках и при соответствующем времени инкубации вызывать терапевтическую ЗОСТ, но оба препарата не влияют на витрео-ретиальные взаимоотношения в зоне базиса СТ [86, 107, 112, 161, 178]. Данная особенность ограничивает применение этих препаратов в хирургии отслойки

сетчатки, где от максимально полного удаления кортикальных слоев СТ с поверхности сетчатки в зоне базиса напрямую зависит успех операции (например, при наличии периферических разрывов сетчатки или отрыва от зубчатой линии).

Если в хирургии отслойки сетчатки принципиальным моментом является полнота витрэктомии, то ферментный витреолиз должен обеспечить максимальный успех операции. Помимо воздействия на белки экстрацеллюлярного матрикса, осуществляющие прикрепление коллагеновых фибрилл к поверхности ВПМ в зоне заднего полюса глаза и его экватора, можно воздействовать собственно на коллаген, что позволит подвергнуть ферментному витреолизу полный объем СТ. Для этой цели препаратом выбора является ферментный препарат коллагеназа.

Коллагеназа - («Коллализин», клостридопептидаза А) – протеолитический фермент, получаемый из бактериальной культуры *Clostridium histolyticum*. В медицинской практике коллагеназа используется в виде водных растворов, которые готовятся непосредственно перед применением.

Впервые коллагеназа была получена Касавиной Б. С. с соавторами в 1969 году [26].

В 1972 году были опубликованы результаты первого опыта применения «Коллализина» в офтальмологической практике. В своей работе Морозов В. И. отмечал положительный эффект применения коллагеназы при воспалительных заболеваниях роговицы. По его мнению, помимо коллагенолитического, ферментный препарат оказывает и выраженное противовоспалительное действие [46].

Как известно, при различной офтальмопатологии происходит избыточное образование коллагена, составляющего основу соединительной ткани, например, при рубцах роговицы, задних синехиях, организовавшемся гемофтальме и т.д. Применение протеолитического фермента, обладающего субстратной специфичностью в отношении коллагена, открыло новые

возможности как в консервативном, так и в хирургическом лечении. О положительных результатах использования коллалазина при рубцах кожи и роговицы, симблефароне, стенозах слезоотводящих путей, увеитах с экссудатом в передней камере и задними синехиями, гемофтальме свидетельствуют сообщения многих авторов [1, 2, 29, 33, 39, 49, 50, 54, 66, 74].

В 1973 году О Neil R. и Shea M. в экспериментальной работе показали эффективность бактериальной коллагеназы в отношении разжижения СТ при интравитреальном введении на кроличьих глазах [155]. Они отметили опасность применения фермента, связанную с возможным протеолитическим воздействием на пограничные по отношению к СТ неизмененные структуры. К числу возможных эффектов, по их мнению, относились: лизис цинновой связки, деструкция задней капсулы хрусталика и внутренних слоев сетчатки. О Neil R. впервые предложил в целях защиты сетчатки и других пограничных структур интравитреально вводить ингибиторы (цистин, ЭДТА, цистеин) через 24-72 часа после введения «Коллалазина» в полость СТ. Очевидный недостаток предложенной им методики состоял в необходимости повторных пункций оболочек глаза, что могло привести к кровоизлияниям и другим осложнениям [155].

В 1978 году Замыслова Т. И. изучила биологические и физико-химические свойства лечебного препарата коллагеназы, отметив при этом, что препарат производства США уступает по качеству отечественному ферментному препарату "Коллализин", производимому Ленинградским НИИ Вакцин и Сывороток и содержит в своем составе побочные ферменты – протеиназу и гиалуронидазу [21].

В 1981 году Круглев А. А. отметил высокую эффективность «Коллалазина» в лечении гемофтальма и его последствий методом электрофореза с коллалазином [32].

Moorhead L. C. с соавт. в 1980 году предложил использовать субстратспецифичный фермент коллагеназу в целях уменьшения ретракционной способности сокращающейся коры СТ путем воздействия на

коллагеновые фибриллы, которые являются основным структурным элементом СТ и новообразованной фиброзной ткани [150]. Он же ввел термин "ферментная витрэктомия" - enzyme-assisted vitrectomy (Moorhead et al, 1983) [151]. Благодаря узкой специфичности действия коллагеназы можно прицельно воздействовать на фибриллы СТ без выраженного побочного действия на неколлагеновые ткани. В 1985 г. Moorhead L. С. и Radtke N. опубликовали результаты шести операций витрэктомии у больных диабетической ретинопатией, ПВР и ретинопатией недоношенных с обширной фиброцеллюлярной пролиферацией. По их данным, инкубация в течение 15 минут с последующей ирригацией из витреальной полости раствора коллагеназы существенно облегчала проведение витрэктомии и удаление грубых фиброзных тканей. Авторы не наблюдали побочных интра- и послеоперационных эффектов введения: помутнения или дислокации хрусталика, кровотечений [152].

В 1986 году Павленко О. А. с соавторами сообщил о своем опыте применения «Коллализина» в виде подконъюнктивальных инъекций и электрофореза для рассасывания экссудатов, кровоизлияний в переднюю камеру и СТ, возникших в послеоперационном периоде или сопровождающих инфекционно-аллергический иридоциклит. В результате лечения отмечалось полное и быстрое рассасывание экссудата и купирование явлений иридоциклита [51].

В 1990 году Краснов М. М. с соавторами изучили эффективность применения протеолитических ферментов при проведении экстракапсулярной экстракции катаракты. Коллализин в разведении 15 КЕ в 1 мл физиологического раствора при экспозиции в течение 10 минут не оказывал повреждающего воздействия на цинновы связки и капсулу хрусталика. После проведения экстракапсулярной экстракции катаракты, переднюю камеру заполняли воздухом, после чего вводили препарат к зоне экватора капсульного мешка. Авторами было отмечено, что применение Коллализина в ходе экстракапсулярной экстракции катаракты упрощает процесс ирригации-

аспирации и является достаточно эффективным средством профилактики вторичной катаракты [30].

В. Ф. Даниличев расширил спектр интравитреального применения коллагеназы [16, 17, 18]. Положительные результаты были получены им при оперативном удалении внутриглазных инородных тел, лечении гемофтальма при помощи предложенного им витреолизоперфузионного способа. Интравитреальное введение коллагеназы после завершения витрэктомии по поводу гемофтальма резко сокращало частоту развития послеоперационного преретинального фиброза и рецидивов отслойки сетчатки [18]. Существенно повысить безопасность интравитреального введения коллагеназы позволила разработанная В. Ф. Даниличевым техника регулируемого ферментного витреолиза, заключающаяся в интравитреальном введении фермента и одновременном внутривенном введении ингибиторов протеаз. Так как молекулы ингибиторов протеаз имеют низкую молекулярную массу, они легко преодолевают гематофтальмический барьер и, достигнув сосудистых структур глаза, защищают коллагенсодержащие ткани вне зоны действия препарата [18].

Дальнейшее развитие метод получил, в частности, работах Лыскина П. В. и Лозинской О. Л. по лечению идиопатических макулярных разрывов сетчатки методом субтотальной витрэктомии с интраоперационным введением раствора ферментного препарата "Коллализин" для воздействия на макулярную зону сетчатки [34, 38, 62].

Исследования В. Ф. Даниличева с соавт. показали, что активность фермента, введенного в витреальную полость, сохраняется в течение 3-х суток [17]. На этом основаны рекомендации по интравитреальному введению коллагеназы: 1 коллагеназная единица (КЕ) интравитреально каждые три дня. Одна коллагеназная единица (1КЕ) – то минимальное количество фермента, которое полностью растворяет проколлагеновую пленку площадью 2 мм² в течение 2-х суток при температуре 37°С. Возможно подобрать такие условия, при которых большее количество фермента за меньший промежуток времени

гидролизует такое же количество субстрата (в данном случае коллагена), что 1 КЕ гидролизует за 72 часа. Искомая доза коллагеназы при соответствующем времени экспозиции будет эквивалентна дозе, рекомендованной в инструкции по применению препарата. Для определения эквивалентной дозы был проведен сравнительный полуколичественный анализ продуктов гидролиза коллагена IV типа, полученных при различном времени гидролиза различными концентрациями препарата "Коллализин". В результате проведенного Лыскиным П. В. и Лозинской О. Л. исследования, было установлено, что дозе препарата «Коллализин» в 1 КЕ при инкубации 72 часа (то есть дозе, рекомендованной в инструкции по применению) по выходу продуктов гидролиза эквивалентна доза 27 КЕ при инкубации 30 мин. [62].

Эти работы создали новый стимул для изучения возможности применения ферментного препарата коллагеназы в витреоретинальной хирургии.

Определенный интерес представляют результаты экспериментальных исследований, опубликованных Назаренко К. А., Запускаловым И. В. и Кочмала О. Б. [47, 27]. Авторами было произведено исследование субстратной специфичности «Коллализина» в эксперименте *in vitro*. В ходе первого этапа эксперимента, для подтверждения субстратной специфичности ферментного препарата «Коллализин», авторы использовали сухожилия крупного рогатого скота. Авторы отметили, что полученные результаты эксперимента подтвердили субстратную специфичность коллагеназы. Целью второго эксперимента, проведенного на СТ свиных глаз, было определить оптимальную терапевтическую дозировку «Коллализина», выбранную из рекомендованных в литературе для интравитреального введения: от 2-х до 14-ти КЕ. Авторами изучалось изменение объёмной пропускной способности СТ под воздействием коллагеназы. По их мнению, объёмная пропускная способность СТ может служить объективным показателем витреолиза, растворения белкового остова стекловидного тела. Авторы отметили прямую зависимость между увеличением дозы вводимого ферментного препарата «Коллализин» и возрастанием

объёмной пропускной способности СТ. В результате проведенного эксперимента авторы сделали вывод, что терапевтически оптимальной дозировкой коллагеназы является 10 КЕ. При введении от 1-ой до 10-ти КЕ повышение витреолиза было в два раза меньше, чем при повышении дозы коллагеназы с 10-ти до 14-ти КЕ. При дозировке «Коллализина» выше 10-ти КЕ, по мнению авторов, воздействие препарата может выйти за пределы СТ, что может привести к повреждению пограничных со СТ нормальных структур и тканей глаза. В ходе гистологических исследований Назаренко К. А., Запускаловым И. В. и Кочмала О. Б. выявлены следующие изменения: нормальное строение сетчатки сохранялось во всех случаях введения коллализина в дозе от 1 до 10-ти КЕ. При увеличении дозировки от 11-ти до 14-ти КЕ отмечались нарушения в структуре внутренних слоев сетчатки в виде истончения, деструкции и даже выпадения внутреннего ядерного и нейросенсорного слоев сетчатой оболочки. Авторы отмечают, что выявленные изменения в структуры сетчатки могли быть вызваны лизирующим действием используемого протеолитического препарата. Однако условия проведенного эксперимента с предварительной экспозицией коллагеназы, составляющей 1 час, не дают возможности экстраполировать его результаты случаи его кратковременного применения.

В 2006 году Запускалов И. В. с соавторами сообщили о первых успешных результатах применения коллагеназы в хирургическом лечении пролиферативной диабетической ретинопатии [22]. Авторами была предложена методика предоперационного интравитреального введения 10КЕ коллализина: под контролем бинокулярной офтальмоскопии иглу шприца проводили к зоне эпиретинального фиброза, что позволяло осуществлять локальное воздействие. В процессе витрэктомии, через 1 час после инъекции препарата, отмечалось размягчение волокон СТ, эпиретинальных мембран, шварт. Авторы не отмечали осложнений, связанных с воздействием ферментного препарата на пограничные со СТ структуры.

По нашему мнению, такая методика сопряжена с определенным риском, как связанным с необходимостью проведения дополнительной интравитреальной инъекции, так и с жесткими требованиями к соблюдению временного промежутка от момента произведения интравитреальной инъекции до начала хирургического вмешательства, что значительно усложняет процесс организации операционного дня.

Таким образом, проведенный анализ литературы позволяет заключить, что в последние годы особое значение придается максимально возможному удалению кортикальных слоев СТ в процессе витрэктомии, как фактору, непосредственно влияющему на результативность хирургического лечения. Несмотря на постоянное усовершенствование хирургической техники и инструментария, по-прежнему сложно полностью механически удалить кортикальные слои СТ с поверхности сетчатки. В отечественной и иностранной литературе описаны различные методики отделения кортикальных слоев СТ, предлагаются специальные инструменты, а также способы фармакологической индукции ЗОСТ. Тем не менее, существующие методики имеют свои недостатки, что сохраняет необходимость поиска новых возможностей решения этой важной проблемы.

Альтернативой механическому методу отделения задних кортикальных слоев стекловидного тела может служить биохимическая индукция отслойки кортикальных слоев стекловидного тела или «фармакологический витреолизис». Однако даже наиболее перспективные из изучаемых на данный момент препаратов в определенных дозировках и при соответствующем времени инкубации могут вызывать терапевтическую ЗОСТ, но не влияют на витрео-ретиальные взаимоотношения в зоне базиса СТ.

Прочность витреоретинального контакта обусловлена в зоне базиса стекловидного тела проникновением витреальных фибрилл во внутреннюю пограничную мембрану сетчатки, а центральное – наличием фибронектина и ламинина, являющихся основными адгезивными гликопротеинами экстрацеллюлярного матрикса.

Помимо воздействия на белки экстрацеллюлярного матрикса, осуществляющие прикрепление коллагеновых фибрилл к поверхности ВПМ в зоне заднего полюса глаза и его экватора, можно воздействовать собственно на коллаген, обеспечивающий витреоретинальное сращение в зоне базиса СТ и являющийся основным компонентом фиброцеллюлярных пролиферативных мембран.

На данный момент не изучена возможность интраоперационного применения коллагеназы в качестве субстратспецифичного фермента для деструкции кортикальных слоев СТ в зоне его базиса с целью повышения эффективности витреоретинальной хирургии регматогенной отслойки сетчатки.

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА КОЛЛАГЕНАЗЫ НА КОМПОНЕНТЫ СТЕКЛОВИДНОГО ТЕЛА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ)

2.1 Исследование цитотоксичности различных концентраций препарата коллагеназы в зависимости от времени инкубации с культурой фибробластов мыши линии NIH 3T3

Исследования Даниличева В. Ф. с соавторами (1994) показали, что активность фермента, введенного в витреальную полость, сохраняется в течение 3-х суток [17]. На этом основаны рекомендации по интравитреальному введению коллагеназы: 1 КЕ интравитреально каждые три дня.

Для изучения возможности интравитреального ведения больших доз ферментного препарата кратковременно были проведены токсикологические исследования.

В эксперименте исследовали цитотоксичность различных концентраций препарата «Коллализин», выпускаемого Санкт-Петербургским НИИ вакцин и сывороток, в зависимости от времени инкубации с культурой фибробластов мыши линии NIH 3T3. Исследования проводились на базе института медико-биологических исследований и технологий АНО «Имбиит».

Была исследована цитотоксичность раствора «Коллализина» в концентрации 5 КЕ/мл, 15КЕ/мл и 30КЕ/мл при времени экспозиции 10мин., 20мин., и 30 мин. Большой отрезок времени не рассматривался, так как задачей было максимально возможное сокращение времени воздействия фермента в ходе операции.

Схема эксперимента

Клетки (фибробластов мыши линии NIH 3T3) высевались в культуральные плоскодонные планшеты, инкубировались 24 ч. во влажной атмосфере при содержании уровня CO₂ 5 ± 1% до образования клетками 80 ±

10 % монослоя. Затем в культуру вносили исследуемый препарат в различных концентрациях. На каждую концентрацию – не менее 3 лунок.

После инкубации в течение 10 мин., 20 мин., 30 мин. при температуре 37°C во влажной атмосфере, содержащей $5 \pm 1\%$ CO₂, оценивалась морфология и лизис клеток. В качестве отрицательного контроля использовалась среда F-12 без сыворотки. Положительным контролем служил раствор цинка в азотной кислоте (Zn 1-2 wt.% HNO₃, разбавление 1:100 физиологическим раствором).

Лунки, содержащие различные концентрации препарата «Коллализин» были промаркированы соответственно (таблица 1).

Таблица 1

Маркировка лунок культурального планшета

№/№	Концентрация в лунке, к.е.	Маркировка
1	5	5
2	15	15
3	30	30

Подготовка клеток

1. Клетки удалялись из культурального флакона методом трипсинизации и ресуспендировались культуральной средой, содержащей сыворотку.

2. Изготавливалась суспензия клеток, содержащая их в концентрации 1–2x10⁵ кл/мл. Количество клеток в суспензии определялось с использованием гемоцитометра (камеры Горяева).

3. Клетки высевались в культуральные плоскодонные планшеты. Затем в каждую лунку добавлялось по 100 мкл суспензии необходимой концентрации.

4. Культуральные планшеты инкубировались в течение 24 ч при температуре 37°C во влажной атмосфере, содержащей $5 \pm 1\%$ CO₂, до образования клетками 80±10 % монослоя.

5. Уровень конfluenceности монослоя оценивался при помощи бинокулярного инвертированного микроскопа Биолам П-1 (Россия) при увеличении $\times 100$.

Контакт с образцами

1. Через 24 ч в лунки вносились испытываемые препараты в необходимых концентрациях и среды положительного и отрицательного контроля в объеме 100 мкл/лунку.

2. Культуральные планшеты инкубировались 10 мин., 20 мин., 30 мин. при температуре 37°C во влажной атмосфере, содержащей $5\pm 1\%$ CO_2 .

Критерии оценки цитотоксичности экстрактов (метод витальной окраски)

1. Через 10 мин., 20 мин., 30 мин. инкубации из культуральных планшетов с препаратом удалялось содержимое, с последующим промыванием фосфатным буфером.

2. В каждую лунку добавлялся 0,1% раствор витального красителя трипанового синего на фосфатном буфере.

3. По истечении 1-2 мин из лунок удалялся краситель, лунки промывались при помощи фосфатного буфера. Сразу после этого производилась микроскопическая оценка культуры с целью выявления морфологических изменений и/или уменьшения плотности клеток монослоя. Трипановым синим окрашивались клетки, подвергшиеся лизису и/или клетки с поврежденными клеточными мембранами.

Полученные результаты цитотоксической реакции культуры фибробластов мыши линии NIH 3T3 интерпретировались с использованием таблицы степени ответной реакции клеток (таблица 2).

Степень ответной реакции клеток

Степень реакции	Реакция	Наблюдения	
0	Отсутствует	Единичные интрацитоплазматические гранулы	Нет лизиса
1	Незначительная	Не больше 20% клеток круглые, слабо прикрепленные, без интрацитоплазматических гранул	Лизис не больше 20%
2	Нерезкая	Не больше 50% клеток круглые, не имеющие интрацитоплазматических гранул	Лизис не больше 50%
3	Умеренная	Не больше 70% монослоя содержат круглые клетки	Лизис не больше 70%
4	Резкая	Практически полностью разрушенный монослой	Лизис больше 70%

2.2 Результаты исследования цитотоксичности различных концентраций препарата коллагеназы в зависимости от времени инкубации с культурой фибробластов мышцы линии NIH 3T3

Проведенные испытания показали, что все исследуемые концентрации препарата коллагеназы («Коллализин») в условиях данного эксперимента не оказывают цитотоксического действия на культуру фибробластов мышцы линии NIH 3T3 через 10 мин. и 20 мин. после инкубации. Через 30 мин. концентрации препарата 5КЕ и 15КЕ не оказывают цитотоксического действия на культуру фибробластов, а концентрация 30 КЕ оказывает незначительное цитотоксическое действие на фибробласты. При воздействии концентрации коллагеназы в 30КЕ/лун после инкубации 30 минут наблюдается нерезкая цитотоксичность, которая выражается в лизисе не больше 20% клеток; не больше 20% клеток круглые, слабо прикрепленные, не имеющие интрацитоплазматических гранул (таблица 3).

Степень ответной реакции фибробластов мышцы линии NIH 3T3 после контакта с различными концентрациями препарата коллагеназы

Период инкубации	Концентрация в лунке, к.е.		
	5	15	30
10 мин.	0	0	0
20 мин.	0	0	0
30 мин.	0	0	1

2.3 Материалы и методы, использованные для определения в эксперименте минимальной эффективной дозы и экспозиции ферментного препарата коллагеназы, необходимой для деструкции кортикальных слоев стекловидного тела при интравитреальном введении

Исследование для определения минимальной эффективной дозы и минимального времени экспозиции препарата «Коллализин», выпускаемого Санкт-Петербургским НИИ вакцин и сывороток, для деструкции остаточных волокон эпиретинального стекловидного тела было проведено на 17 кадаверных глазах 9 доноров. В эксперименте использовали глаза, прошедшие тестирование в глазном банке ФГАУ "МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова". Средний возраст доноров составил 50,3 лет. Время, прошедшее от момента смерти до энуклеации составило в среднем $5,3 \pm 0,8$ ч., период от момента смерти до операции – в среднем $10,2 \pm 0,6$ часа. До начала хирургического вмешательства производился тщательный осмотр донорского материала для выявления наличия каких-либо повреждений, следов ранее перенесенных операций. Производилась офтальмоскопия донорского материала для исключения наличия офтальмопатологии. Причины смерти, возраст и пол доноров представлены в таблице 4.

Распределение трупных глаз по возрасту, полу и причине смерти

Количество глаз	Возраст	Пол	Причина смерти
2	25	Ж	Суицид
2	62	М	ИБС
2	43	М	Отравление этиловым спиртом
2	57	М	Инфаркт миокарда
2	45	М	Черепно-мозговая травма
2	53	М	Переохлаждение
2	52	Ж	ИБС
2	55	М	Переохлаждение
1	61	М	Инфаркт миокарда

Изучению подвергались по два парных глаза на каждую дозу и время экспозиции, дополнительно один глаз служил контролем.

Так как коллагеназу планировалось применять интраоперационно, время ограничили теоретически максимальным периодом нахождения раствора в витреальной полости во время операции – 20 минут. Экспозиция составляла 10 и 20 минут соответственно. Больше время экспозиции нами не рассматривалось, так как нашей задачей было максимально возможное увеличение дозы вводимого фермента при ограничении экспозиции. Применяли 5 КЕ/мл, 10 КЕ/мл, 15 КЕ/мл и 30 КЕ/мл коллагеназы, в 4 мл физиологического раствора, то есть доза фермента не превышала безопасных значений, полученных при исследовании цитотоксичности.

Моделирование хирургического вмешательства проводили в условиях экспериментальной операционной Wetlab научно-образовательного центра ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова». При проведении экспериментальных операций, нашей задачей было воссоздание условий, максимально приближенных к условиям планируемого хирургического вмешательства, соблюдение разработанной методики. Все операции выполнялись под офтальмологическим операционным микроскопом с коаксиальным освещением фирмы OPTON «Universal S3B» (Германия) с использованием широкоугольной системы фирмы EBIS (Möller Wedel, США).

Витрэктомия производилась с помощью витреотома «Accurus» (Alcon, США). Донорские глаза фиксировали в специальном держателе, обеспечивая адекватный офтальмотонус. Операцию начинали с установки 3 портов для витрэктомии 23G на 2, 3 и 10 часах в 4 мм от лимба. Хирургическое вмешательство проводилось следующим образом: осуществлялась максимально возможная витрэктомия. Так как разрабатываемая методика операции предполагала создание интраоперационной протекции центральных отделов сетчатки, то при проведении экспериментального хирургического вмешательства производилось введение в витреальную полость ПФОС до уровня проекции выхода вортикозных вен. Затем прекращалась подача физиологического раствора, в витреальную полость вводился раствор ферментного препарата коллагеназы в объеме 4 мл. Глаза помещали в термостат при температуре 37 °С. После соответствующей экспозиции раствор коллагеназы аспирировали, витреальную полость промывали физиологическим раствором.

На контрольном глазу проводили субтотальную витрэктомия по стандартному протоколу. Техника операции отличалась от изложенной выше отсутствием этапа применения фермента.

Для проведения последующей сканирующей электронной микроскопии глаза фиксировали в растворе глутаральдегида, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в целлоидин. Готовили образцы для сканирующей электронной микроскопии. Зафиксированный в целлоидине цельный препарат разрезали во фронтальной плоскости в 3,5 мм от лимба, затем производили дополнительные сечения по 8 меридианам. Изучению подвергали парапериферические отделы сетчатки. Образцы промывали в ацетоне и высушивали в вакуумной камере, затем напыляли золотом. Подготовленные препараты исследовали на сканирующем электронном микроскопе Cam Scan S-2 (Cambridge Instruments, Великобритания) при от x30-до x30 000-кратном увеличении с последующим фотографированием. По препаратам оценивали наличие остатков СТ, сохранность ВПМ, поверхность сетчатки.

2.4 Результаты эксперимента по определению минимальной эффективной дозы и экспозиции ферментного препарата коллагеназы, необходимой для разрушения кортикальных слоев стекловидного тела при интравитреальном введении

На препарате заднего отрезка глаза, полученного при воздействии ферментного препарата коллагеназы в дозе 5КЕ/мл и времени экспозиции 10мин. и 20 мин., было видно, что вся поверхность сетчатки на периферии была покрыта тонким сплошным слоем достаточно плотно упакованных коллагеновых фибрилл. Поверхность внутренней пограничной мембраны не просматривалась (рис. 1).

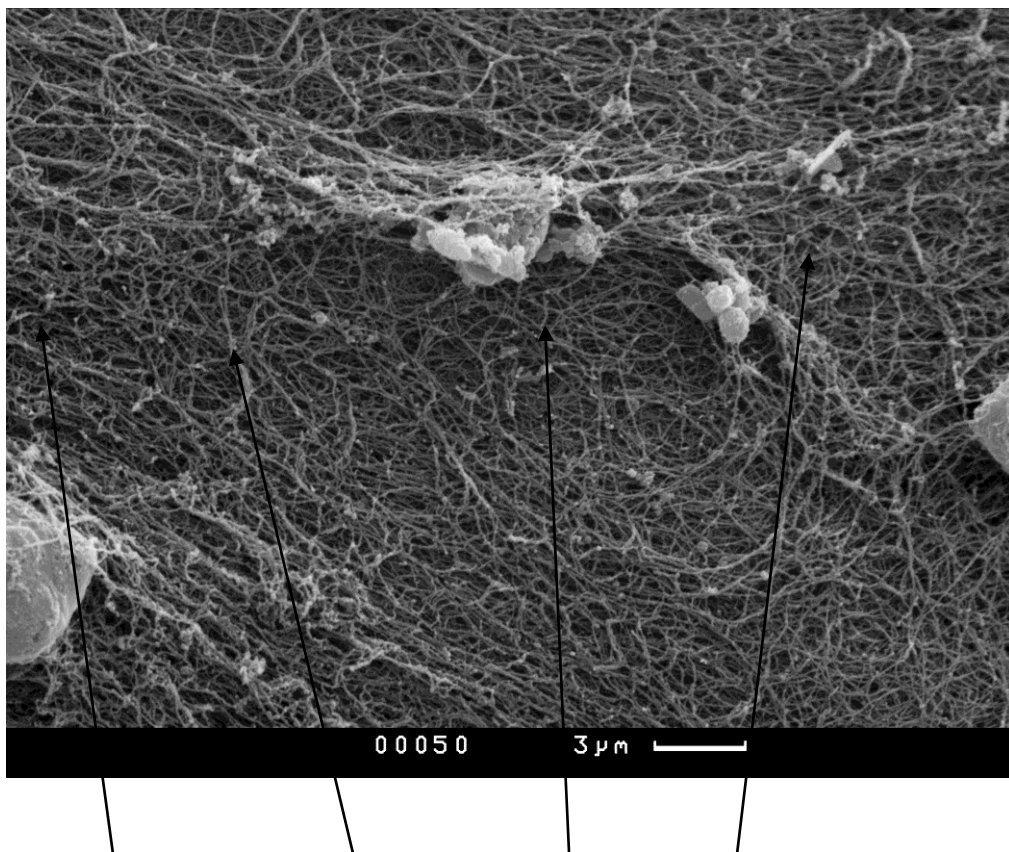


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия препарата сетчатки и стекловидного тела. Воздействие ферментного препарата коллагеназы в дозе 5КЕ/мл и времени экспозиции 20 мин. Поверхность сетчатки покрыта тонким сплошным слоем плотно упакованных коллагеновых фибрилл (указано стрелками), (увеличение – х4000).

Полученная картина практически не отличалась от контрольных препаратов.

При увеличении дозы фермента до 10КЕ/мл и времени экспозиции 10 минут в полученных препаратах определялись зоны разрежения и частичной деструкции коллагеновых волокон в слое эпиретинального стекловидного тела (рис. 2).

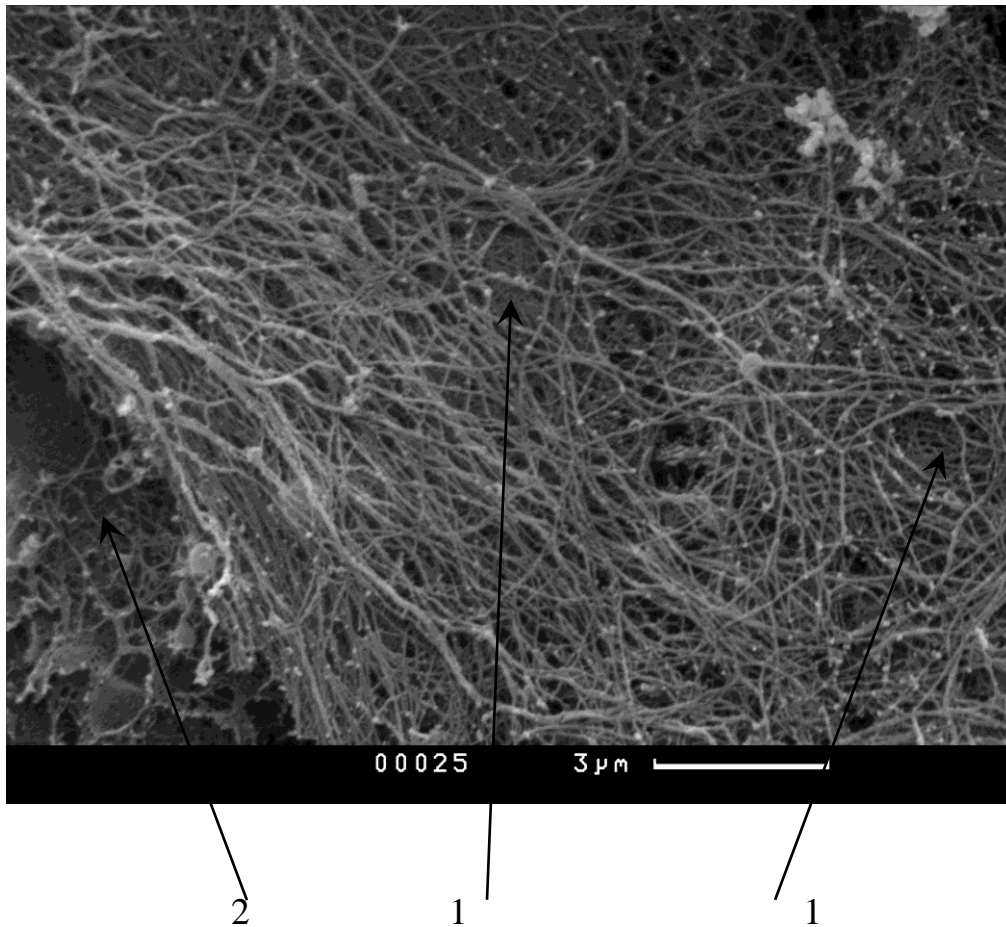


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия препарата сетчатки и стекловидного тела. Воздействие ферментного препарата коллагеназы в дозе 10 КЕ/мл и времени экспозиции 10 мин. Стрелками указаны зоны разрежения (1) и частичной деструкции (2) коллагеновых волокон в слое эпиретинального стекловидного тела (увеличение – х4000).

При увеличении времени экспозиции до 20 мин. при воздействии дозы фермента 10КЕ/мл в полученных препаратах определялись зоны разрежения и значительной деструкции коллагеновых волокон в остаточном слое эпиретинального стекловидного тела (рис. 3).

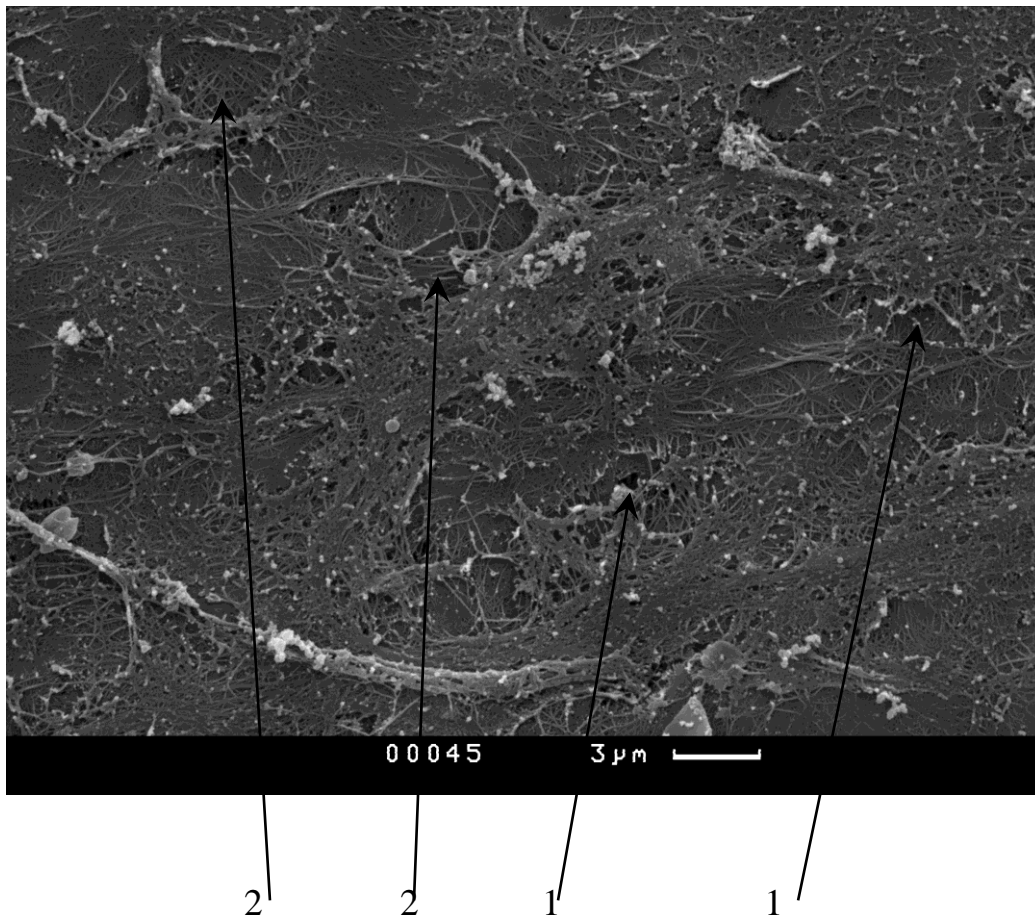


Рис. 3. Сканирующая электронная микроскопия препарата сетчатки и стекловидного тела. Воздействие ферментного препарата коллагеназы в дозе 10 КЕ/мл и времени экспозиции 20 мин. Стрелками указаны зоны разрежения (1) и значительной деструкции (2) коллагеновых волокон в слое эпиретинального стекловидного тела (увеличение – х4000).

На препаратах, полученных при воздействии раствора ферментного препарата коллагеназы в дозе 15КЕ/мл при времени экспозиции 10 мин. отмечалось разрушение остова стекловидного тела, деструкция коллагеновых волокон (рис. 4).

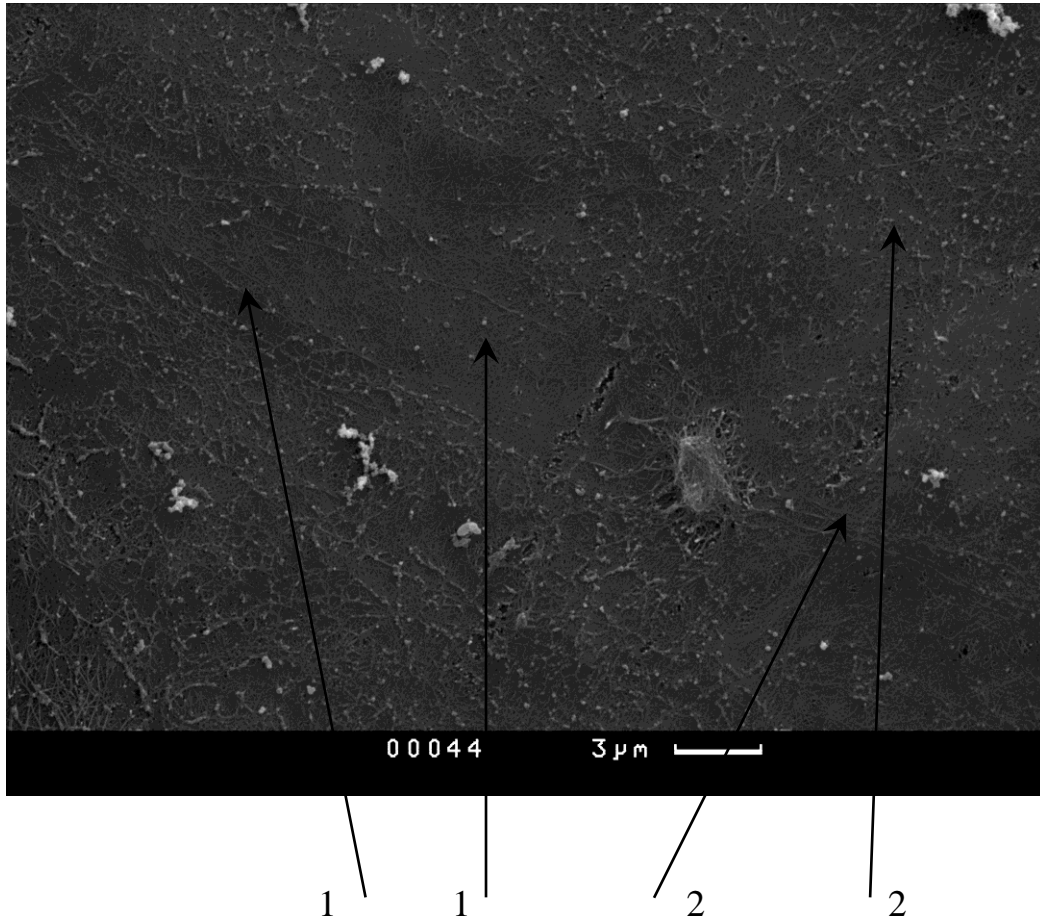


Рис. 4. Сканирующая электронная микроскопия препарата сетчатки и стекловидного тела. Воздействие ферментного препарата коллагеназы в дозе 15 КЕ/мл и времени экспозиции 10 мин. Стрелками указаны зоны разрушения остова стекловидного тела (1) и деструкция коллагеновых волокон (2) (увеличение – $\times 4000$).

При увеличении времени экспозиции раствора ферментного препарата коллагеназы в дозе 15КЕ до 20 мин. наблюдалось разрушение остова стекловидного тела, однако поверхность сетчатки по-прежнему была покрыта остаточным эпиретинальным слоем, отчетливо визуализировались отдельные волокна (рис. 5).

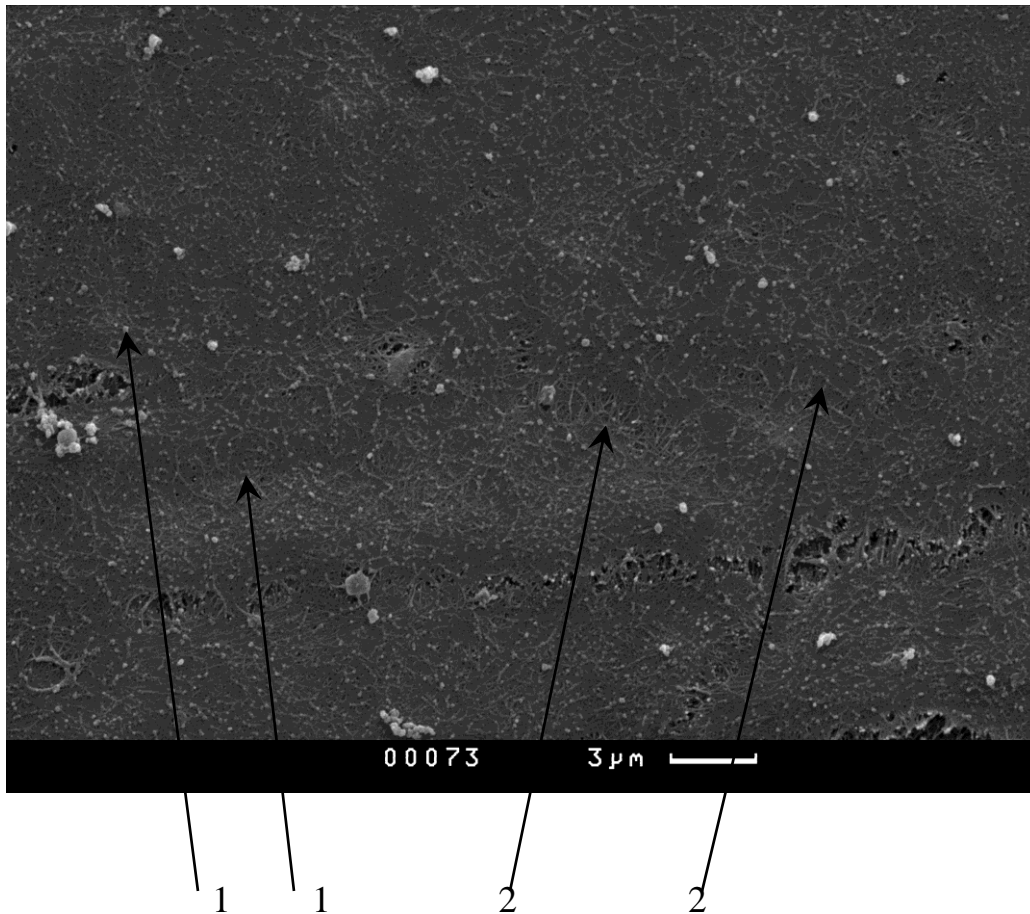


Рис. 5. Сканирующая электронная микроскопия препарата сетчатки и стекловидного тела. Воздействие ферментного препарата коллагеназы в дозе 15 КЕ/мл и времени экспозиции 20 мин. Стрелками указан остаточный эпиретинальный слой стекловидного тела (1) и сохраняющиеся отдельные коллагеновые волокна (2) (увеличение – х4000).

Картина поверхности сетчатки, полученная в препаратах с использованием дозы 30 КЕ и временем экспозиции 10 мин. заметно отличалась: стекловидное тело было подвергнуто выраженной деструкции, на поверхности ВПМ - волокна практически не определялись (рис. 6).

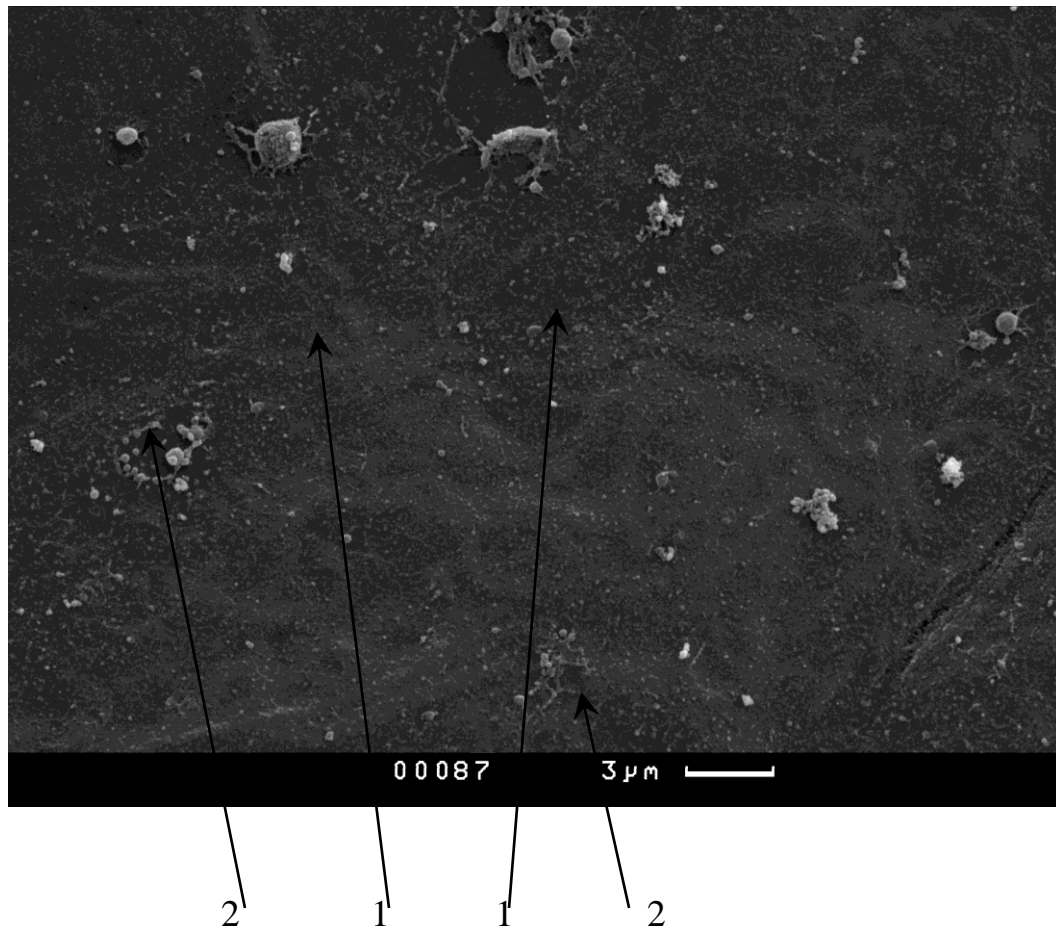


Рис. 6. Сканирующая электронная микроскопия препарата сетчатки и стекловидного тела. Воздействие ферментного препарата коллагеназы в дозе 30 КЕ/мл и времени экспозиции 10 мин. Стрелками указана поверхность ВПМ (1), на которой обозначены остатки волокон СТ (2) (увеличение – $\times 4000$).

На препаратах, полученных с использованием дозы 30 КЕ и временем экспозиции 20 мин., наблюдалось незначительное увеличение площади свободной поверхности внутренней пограничной мембраны сетчатки. Поверхность ВПМ сплошная, однородная (рис. 7).

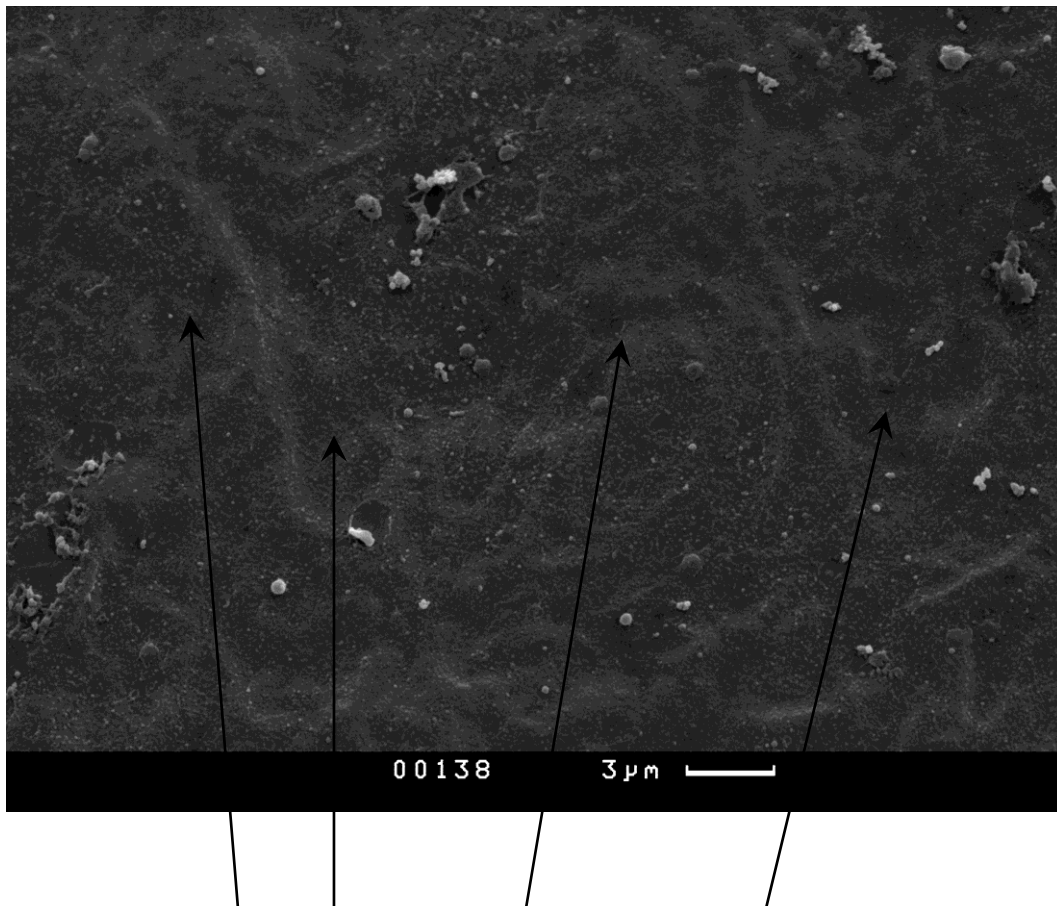


Рис. 7. Сканирующая электронная микроскопия препарата сетчатки и стекловидного тела. Воздействие ферментного препарата коллагеназы в дозе 30 КЕ/мл и времени экспозиции 20 мин. Стрелками указана поверхность ВПМ (увеличение – $\times 4000$).

Проведение сканирующей электронной микроскопии полученных препаратов заднего отрезка глаза показало, что при воздействии ферментного препарата коллагеназы в дозе 5КЕ/мл и времени экспозиции 10мин. и 20 мин. вся поверхность сетчатки на периферии была покрыта тонким сплошным слоем достаточно плотно упакованных коллагеновых фибрилл. Поверхность ВПМ не просматривалась. Не было выявлено принципиальных отличий между препаратами, полученными при воздействии ферментного препарата коллагеназы в дозе 5КЕ/мл и времени экспозиции 10мин. и 20 мин. от контрольных. При увеличении дозы коллагеназы до 10КЕ/мл и времени экспозиции 10 минут в полученных препаратах определялись зоны разрежения и частичной деструкции коллагеновых волокон в слое эпиретинального стекловидного тела. Увеличение времени экспозиции до 20 мин. при воздействии дозы фермента 10КЕ/мл приводило к формированию значительной деструкции коллагеновых волокон в остаточном слое эпиретинального стекловидного тела. На препаратах, полученных при воздействии раствора коллагеназы в дозе 15КЕ/мл при времени экспозиции 10 мин. и 20 мин., отмечалось разрушение остова стекловидного тела, однако поверхность сетчатки по-прежнему оставалась покрытой остаточным эпиретинальным слоем СТ, отчетливо визуализировались отдельные волокна, поверхность ВПМ не просматривалась. Заметно отличалась картина поверхности сетчатки, полученная в препаратах с использованием дозы 30 КЕ и временем экспозиции 10мин.: СТ было подвергнуто выраженной деструкции, на поверхности ВПМ – волокна СТ практически не определялись. На препаратах, полученных с использованием дозы 30 КЕ и временем экспозиции 20мин., наблюдалось незначительное увеличение площади свободной поверхности ВПМ сетчатки, поверхность её была сплошная, однородная. Полученные данные свидетельствуют о том, что минимальной эффективной дозой ферментного препарата коллагеназы является 30КЕ при минимальной экспозиции в 10мин.

Таким образом, проведенные исследования цитотоксичности различных концентраций препарата коллагеназы (5, 15, и 30 КЕ) в зависимости от времени инкубации (10, 20 или 30 мин.) с культурой фибробластов мыши линии NIH 3T3 показали, что все исследуемые концентрации препарата в условиях данного эксперимента не оказывают цитотоксического действия на культуру фибробластов мыши линии NIH 3T3 через 10 мин. и 20 мин. после инкубации. При воздействии концентрации коллагеназы в 30КЕ/лун. после инкубации 30 минут наблюдается нерезкая цитотоксичность, которая выражается в лизисе не более 20% клеток; не более 20% клеток круглые, слабо прикрепленные, не имеющие интрацитоплазматических гранул.

Исследование для определения минимальной эффективной дозы и минимального времени экспозиции препарата коллагеназы для разрушения остаточных волокон эпиретинального СТ было проведено на 17 кадаверных глазах 9 доноров. При проведении экспериментальных операций задачей было воссоздание условий, максимально приближенных к условиям планируемого хирургического вмешательства, соблюдение разработанной методики.

Применяли 5 КЕ/мл, 10 КЕ/мл, 15 КЕ/мл и 30 КЕ/мл коллагеназы в 4 мл физиологического раствора, то есть доза фермента не превышала безопасных значений, полученных при исследовании цитотоксичности. Экспозиция составляла 10 и 20 минут соответственно.

На основании данных сканирующей электронной микроскопии, можно сделать вывод, что доза коллагеназы 30 КЕ/мл при интраоперационном введении в витреальную полость с экспозицией в течение 10 мин. эффективно разрушает остаточный преретинальный слой СТ, не вызывая деструкции ВПМ сетчатки. Таким образом, в качестве минимальной эффективной дозы ферментного препарата коллагеназы выбрана концентрация 30 КЕ при минимальной экспозиции в 10мин.

Хотя раствор ферментного препарата коллагеназы в концентрации 30 КЕ при экспозиции 20 мин. эффективно расщепляет остатки СТ на поверхности сетчатки, её использование в клинической практике не может быть

рекомендовано. Эта концентрация является "пограничной" и при незначительном увеличении времени воздействия оказывает цитотоксическое влияние, что нежелательно.

Полученные в результате серии экспериментов результаты позволили нам перейти к этапу применения разработанной методики интраоперационного применения исследуемого ферментного препарата в клинике.

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ТЕХНИКА ОПЕРАЦИЙ

3.1. Общая характеристика клинического материала

Учитывая теоретические предпосылки и результаты экспериментальной работы, в соответствии с задачей разработать методику проведения субтотальной витрэктомии с применением ферментного препарата коллагеназы, были проведены клинические исследования.

В настоящей работе представлены результаты лечения 214-ти глаз у 214-ти пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной ПВР, находившихся на стационарном лечении в отделе витреоретинальной хирургии и диабета глаза ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» в период с 2003 по 2010 г.

Критериями отбора пациентов для проведения исследования служили: регматогенная отслойка сетчатки длительностью существования до 6 месяцев (либо возникший в эти сроки рецидив ОС после проведения эписклерального пломбирования), с наличием пролиферативной витреоретинопатии С-D1 стадии. Стадия ПВР оценивалась в соответствии с международной классификацией, принятой Retina Society Terminology Committee (1983). Среди пролеченных пациентов 86 женщин и 128 мужчин. Распределение по возрасту представлено в таблице 5.

Таблица 5

Распределение пациентов по возрасту

Возраст пациентов (годы)	23-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	Всего
Количество пациентов (абс.)	17	30	34	93	21	19	214
Количество пациентов (%)	7,9	14,0	15,9	43,5	9,8	8,9	100

В исследуемую группу не включались пациенты, страдающие сахарным диабетом, глаза, имеющие признаки глаукомы, либо степень выраженности катаракты которых приводила к значительному затруднению визуализации внутриглазных структур.

По виду проводимого лечения все пациенты были разделены на две группы – основную и контрольную. В основной группе (116 глаз) всем пациентам было проведено хирургическое лечение отслойки сетчатки с интраоперационным применением ферментного препарата коллагеназы, в контрольной группе (98 глаз) – пациентам производилась витрэктомия по стандартной методике с использованием технологии 25G.

3.2. Методы комплексного обследования пациентов

Все больные в обеих группах были обследованы с применением следующих методик: визометрии, биомикроскопии переднего отрезка глаза, обратной бинокулярной офтальмоскопии, тонометрии, периметрии, ультразвукового А- и В- офтальмосканирования, электроретинографии, определения порогов электрической чувствительности и электрической лабильности зрительного нерва.

Исследования проводились у больных в динамике – до оперативного вмешательства, непосредственно в ходе хирургического вмешательства и в раннем послеоперационном периоде – ежедневно. Затем через 1 месяц после операции и спустя 3 месяца после оперативного вмешательства (для определения сроков удаления силиконового масла или необходимости проведения повторной ревизии). После завершения курса хирургического лечения удалением силикона, наблюдение проводилось в сроки 1, 3, 6, 12 и 24 месяца после операции.

Острота зрения исследовалась без коррекции и с максимальной коррекцией при помощи пробных сферических и цилиндрических линз на фороптере фирмы «Торсон» (Япония). При наличии мидриаза максимально

возможную остроту зрения определяли с применением диафрагмы диаметром 3,0 мм.

Рефрактометрия и кератометрия выполнялись на автокераторефрактометрах фирм «Nidek», «Topcon» и «Humphry» (Япония).

Для проведения тонометрии использовались пневмотонометр «Reichert AT 555» (США) и апланационный тонометр А. Н. Маклакова с грузом 10,0 гр по общепринятой методике.

Периметрия проводилась на проекционном аппарате ПРП-60 через каждые 30°, использовались объекты белого цвета разной величины и яркости.

Ультразвуковое офтальмосканирование проводили на аппаратах «Sonomed» (США) с резонансной частотой ультразвука 10 МГц. С помощью этой методики определяли параметры глазного яблока и состояние оболочек.

Биомикроскопическое исследование переднего отрезка глаза производилось при помощи щелевой лампы фирмы «Opton» (Германия).

Для проведения бинокулярной офтальмоскопии в обратном виде в условиях миопии использовался офтальмоскоп Schepens фирмы «Keeler» (Великобритания) и асферические линзы «Nikon» (Япония) силой 20 и 28 диоптрий. Фотографирование глазного дна проводилось с помощью фундус-камеры фирмы «KOWA» (Япония).

Электроретинография и электрофизиологические исследования проводились по стандартной методике с использованием электродиагностической системы фирмы «Amplaid» (Италия) и фосфен-тестера (Россия).

Спектральную оптическую когерентную томографию производили на аппарате «Cirrus HD-OCT 4000» фирмы «Carl Zeiss Meditech AG» (Германия).

Объем проводимых исследований определялся общим состоянием пациента и его глаза, а также диагностическими задачами в каждом конкретном случае.

В список необходимого дооперационного обследования вошли: общие клинические анализы крови и мочи, определение уровня сахара в крови и моче,

анализ крови на наличие антигенов гепатитов В и С, анализ на ВИЧ, реакция Вассермана, электрокардиография, флюорография грудной клетки, обследование стоматологом, отоларингологом, терапевтом. Окончательно решение о возможности хирургического лечения осуществлялось после получения заключения об отсутствии противопоказаний к операции.

Всем пациентам в дооперационном периоде проводилась проба на индивидуальную чувствительность к препарату коллагеназы («Коллализин»). Для этого производилась инъекция под конъюнктиву 1КЕ коллагеназы в 0,2 мл изотонического раствора хлорида натрия. Оценка реакции проводилась через 48 часов после инъекции. Отсутствие гиперемии в зоне инъекции расценивалось как отрицательная реакция.

3.3. Техническое обеспечение хирургического лечения

Все хирургические вмешательства в обеих группах выполнялись под офтальмологическим операционным микроскопом с коаксиальным освещением фирмы «Leica M841» (Германия).

Во время операции использовался микрохирургический инструментарий как отечественного производства, так и зарубежных фирм. Для наложения швов на склеральные разрезы и конъюнктиву применялась шелковая нить 8-0 фирмы «Aticon» (США).

Витрэктомия осуществлялась при помощи витреотома «Accurus» (Alcon, США). Для интраоперационной визуализации использовалась широкоугольная, бесконтактная операционная система фирмы EBIS (Möller Wedel, США) и эндоосветители на основе галогенового источника света.

Лазеркоагуляция сетчатки производилась с использованием аргонового эндолазера фирмы «Alcon» с длиной волны 532 нм. Для подачи витреопресса (ПФОС – ДК 164) применяли двухканальную эндовитреальную канюлю.

Удаление эпиретинальных мембран производилось с помощью инравитреальных пинцетов, шпателей и ножниц фирмы «Greishaber» (Швейцария).

Для интравитреальной иммобилизации сетчатки во время операции применяли перфторорганические соединения (ПФОС) «Витреопресс» или перфтордекалин фирмы «Bausch&Lomb» (США).

Для пролонгированной послеоперационной тампонады витреальной полости использовали силиконовое масло вязкостью 1300 либо 5700 сSt фирмы «Bausch&Lomb» (США).

Использовался препарат коллагеназы "Коллализин", выпускаемый Санкт-Петербургским НИИ вакцин и сывороток и разрешенный для интравитреального применения (регистрационный номер ЛСР-005615/09, дата регистрации 13.07.2009).

В качестве газовой тампонады использовали стерильный воздух и газ – перфторциклобутан, смешиваемые в конечной концентрации 75-25%. Стерильный воздух подавали в глаз с помощью автоматической системы обмена газ/жидкость фирмы Greishaber (Швейцария).

3.4. Клиническая характеристика I (основной) группы пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией

В основной группе среди пролеченных пациентов было 51 (44,0%) женщин и 65 (56,0%) мужчин, в возрасте от 23-х до 80-ти лет (таблица 6).

Таблица 6

Распределение пациентов основной группы по возрасту

Возраст пациентов (годы)	Количество пациентов	
	Абс.	%
23-30	9	7,8
31-40	14	12,1
41-50	16	13,8
51-60	54	46,5
61-70	11	9,5
71-80	12	10,3
Всего	116	100

У всех пациентов основной группы была диагностирована отслойка сетчатки в сроки от 1-го до 6-ти месяцев после возникновения жалоб на резкое снижение зрения, появление «черного пятна» либо «шторки» в поле зрения одного глаза. У восьми пациентов был диагностирован рецидив ранее оперированной отслойки сетчатки с применением методики эписклерального пломбирования.

Длительность существования регматогенной отслойки сетчатки у пациентов основной группы варьировала от 1-го до 6-ти месяцев (таблица 7).

Таблица 7

Длительность существования отслойки сетчатки у пациентов основной группы

Длительность существования отслойки сетчатки	Число случаев	
	Абс.	%
1 – 3 месяца	22	19,0
3 – 6 месяцев	94	81,0
Всего	116	100

У пациентов основной группы преимущественно определялась миопическая рефракция высокой и средней степени, распределение по видам рефракции представлено в таблице 8.

Таблица 8

Распределение пациентов основной группы по степени аметропии

Степень аметропии	Количество пациентов	
	Абс.	%
Миопия высокой степени	50	43,1
Миопия средней степени	24	20,7
Миопия слабой степени	16	13,8
Гиперметропия	20	17,2
Эмметропия	6	5,2
Всего	116	100

У 12-ти пациентов была диагностирована артификация, ЭК с имплантацией ИОЛ была произведена в сроки от 1-го до 5-ти лет ранее.

Лазеркоагуляция сетчатки по поводу различных форм периферической хориоретинальной дистрофии ранее была проведена 35-ти пациентам (30,1%). У всех пациентов определялось развитие пролиферативной витреоретинопатии С1-D1 стадий. Распределение по степени выраженности ПВР представлено в таблице 9.

Таблица 9

Распределение в основной группе по степени выраженности пролиферативной витреоретинопатии (по международной классификации)

Стадия ПВР	Количество пациентов	
	Абс.	%
С 1-4 - стадия	78	67,2
D 1 - стадия	38	32,8
Всего	116	100

У всех пациентов были выявлены ретинальные разрывы, которые локализовались следующим образом (таблица 10).

Таблица 10

Локализация ретинальных разрывов в основной группе

Локализация разрыва	Количество глаз	
	Абс.	%
Верхне-наружный квадрант	43	37,1
Верхне-внутренний квадрант	23	19,8
Нижне-наружный квадрант	31	26,7
Нижне-внутренний квадрант	19	16,4
Всего	116	100

В 26-ти случаях отслойка сетчатки сопровождалась развитием частичного гемофтальма.

В 38-ми случаях была выявлена тотальная воронкообразная отслойка сетчатки.

Острота зрения с максимальной коррекцией в основной группе пациентов до операции колебалась от pr. certae до 0,2 (таблица 11).

Острота зрения у пациентов основной группы до операции

Острота зрения	Количество пациентов	
	Абс.	%
pr. certae - 0,04	74	63,8
0,05-0,09	24	20,7
0,1-0,2	18	15,5
0,3-0,4	0	0
Всего	116	100

Внутриглазное давление у пациентов до операции определялось в пределах от 9 до 21 мм рт. ст. (в среднем $15 \pm 0,2$ мм рт. ст.).

При проведении ультразвукового исследования (В-сканирования) на всех 116-ти глазах определялась регматогенная отслойка сетчатки различной распространенности, с эпиретинальным фиброзом и признаками деструкции СТ различной степени. На 80-ти глазах (69 %) была выявлена частичная ЗОСТ. Из них на 35-ти глазах (30,2%), где по данным ультразвукового исследования определялась ЗОСТ, интраоперационно был обнаружен остаточный слой преретинального СТ на внутренней поверхности сетчатки после контрастирования.

На 38-ми глазах (32,8%) при биомикроскопии было обнаружено помутнение в кортикальных слоях хрусталика различной степени выраженности.

Из сопутствующей соматической патологии у 65-ти пациентов (56,0%) в анамнезе имелась ишемическая болезнь сердца, у 45-ти (38,8%) – гипертоническая болезнь, у 32-х (27,6%) – хронический гастрит.

3.5. Клиническая характеристика II (контрольной) группы пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией

Контрольную группу составили 98 пациентов (98 глаз), у которых была выявлена регматогенная отслойка сетчатки, осложненная пролиферативной витреоретинопатией (ПВР).

Среди пролеченных пациентов 35 (35,7%) женщин и 63 (64,3%) мужчин. Распределение по возрасту представлено в таблице 12.

Таблица 12

Распределение пациентов контрольной группы по возрасту

Возраст пациентов (годы)	Количество пациентов	
	Абс.	%
23-30	8	8,2
31-40	16	16,3
41-50	18	18,4
51-60	39	39,8
61-70	10	10,2
71-80	7	7,1
Всего	98	100

Длительность существования отслойки сетчатки варьировала от 1 до 6-ти месяцев (таблица 13).

Таблица 13

Длительность существования отслойки сетчатки у пациентов контрольной группы

Длительность существования отслойки сетчатки	Число случаев	
	Абс.	%
1 – 3 месяца	23	23,5
3 – 6 месяцев	75	76,5
Всего	98	100

Длина глаз варьировала от 22,8 до 32,2 мм. В дооперационном периоде периферическая лазеркоагуляция проводилась по поводу различных форм периферической хориоретинальной дистрофии у 23-х (23,9%) пациентов. У пациентов контрольной группы преимущественно определялась миопическая рефракция высокой и средней степени, распределение по видам рефракции представлено в таблице 14.

Распределение пациентов контрольной группы по степени аметропии

Степень аметропии	Количество пациентов	
	Абс.	%
Миопия высокой степени	47	48,0
Миопия средней степени	22	22,4
Миопия слабой степени	14	14,3
Гиперметропия	12	12,2
Эмметропия	3	3,1
Всего	98	100

У всех пациентов определялось развитие пролиферативной витреоретинопатии С1-D1 стадий. Распределение по степени выраженности ПВР представлено в таблице 15.

Таблица 15

Распределение в контрольной группе по степени выраженности пролиферативной витреоретинопатии (по международной классификации)

Стадия ПВР	Количество пациентов	
	Абс.	%
С 1-4 - стадия	77	78,6
D 1 - стадия	21	21,4
Всего	98	100

У всех пациентов были выявлены ретинальные разрывы, которые локализовались следующим образом (таблица 16).

Таблица 16

Локализация ретинальных разрывов в контрольной группе

Локализация разрыва	Количество глаз	
	Абс.	%
Верхне-наружный квадрант	33	33,7
Верхне-внутренний квадрант	18	18,4
Нижне-наружный квадрант	31	31,6
Нижне-внутренний квадрант	16	16,3
Всего	98	100

Из сопутствующей соматической патологии у 20-ти пациентов (20,4%) в анамнезе имелась ишемическая болезнь сердца, у 26-ти (26,5%) – гипертоническая болезнь, у 15-ти (15,3%) – хронический гастрит, в 2-х случаях (2,0%) – гиподисфункция щитовидной железы.

Острота зрения с максимальной коррекцией в контрольной группе пациентов до операции колебалась от *pr. certae* до 0,4 (таблица 17).

Таблица 17

Острота зрения у пациентов контрольной группы до операции

Острота зрения	Количество пациентов	
	Абс.	%
<i>pr. certae</i> - 0,04	63	64,3
0,05-0,09	28	28,6
0,1-0,2	5	5,1
0,3-0,4	2	2,0
Всего	98	100

Предоперационные показатели, полученные при тонометрии составляли от 10 до 20 мм рт.ст. (в среднем $15 \pm 0,5$ мм рт.ст.).

При проведении ультразвукового исследования (В-сканирования) на всех 98-ми глазах определялась регматогенная отслойка сетчатки различной распространенности с эпиретинальным фиброзом и признаками деструкции СТ различной степени. На 56-ти глазах (57,1%) ЗОСТ не определялась. Необходимо отметить, что на 28-ми глазах (29,1%) в случаях, когда по данным ультразвукового исследования определялась ЗОСТ, интраоперационно был обнаружен остаточный слой преретинального СТ на внутренней поверхности сетчатки после контрастирования.

На 23-х глазах (23,5%) при биомикроскопии было обнаружено помутнение в кортикальных слоях хрусталика различной степени выраженности.

3.6. Сравнительный анализ клинической характеристики I (основной) и II (контрольной) групп пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией

Сравнительный анализ клинической характеристики I (основной) и II (контрольной) групп пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией, проводился с использованием статистического непараметрического критерия – точного метода Фишера, не зависящего от характера распределения показателя.

Для каждого включенного в анализ признака проводилось попарное сравнение заданных групп пациентов, выявлялись достоверные различия. Для получения описательной статистики и проведения сравнения сформированных групп пациентов с использованием критерия Фишера использованы пакеты программ EXCEL 2010 и STATISTICA 7.0. Значимый уровень достоверности принимался при $p < 0,05$.

Сводные данные по показателям, характеризующим I (основную) и II (контрольную) группы пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией, представлены в таблице 18.

Сравнительный анализ I (основной) и II (контрольной) групп пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией

Признаки	Группа I (116 больных)	Группа II (98 больных)	Достоверность различий между группами (p – значения)
1. Пол			
Мужской	65 (56,0%)	63 (64,3%)	p=0,3
Женский	51 (44,0%)	35 (35,7%)	p=0,3
2. Возраст больных, годы			
23-30	9 (7,8%)	8 (8,2%)	p=0,9
31-40	14 (12,1%)	16 (16,3%)	p=0,4
41-50	16 (13,8%)	18 (18,4%)	p=0,5
51-60	54 (46,5%)	39 (39,8%)	p=0,3
61-70	11 (9,5%)	10 (10,2%)	p=0,9
71-80	12 (10,3%)	7 (7,1%)	p=0,5
3. Длительность существования отслойки сетчатки, месяцы			
1 – 3	22 (19%)	23 (23,5%)	p=0,5
3 – 6	94 (81%)	75 (76,5%)	p=0,5
4. Степень аметропии			
Миопия высокой степени	50 (43,1%)	47 (48,0%)	p=0,5
Миопия средней степени	24 (20,7%)	22 (22,4%)	p=0,9
Миопия слабой степени	16 (13,8%)	14 (14,3%)	p=0,9
Гиперметропия	20 (17,2%)	12 (12,2%)	p=0,3
Эмметропия	6 (5,2%)	3 (3,1%)	p=0,5
5. Степень выраженности ПВР			
С 1-4 – стадия	78 (67,2%)	77 (78,6%)	p=0,07
D 1 – стадия	38 (32,8%)	21 (21,4%)	p=0,07
6. Локализация ретинальных разрывов, квадранты			
Верхне-наружный	43 (37,1%)	33 (33,7%)	p=0,7
Верхне-внутренний	23 (19,8%)	18 (18,4%)	p=0,9
Нижне-наружный	31 (26,7%)	31 (31,6%)	p=0,5
Нижне-внутренний	19 (16,4%)	16 (16,3%)	p=0,9
7. Острота зрения у пациентов до операции			
рr. certae-0,04	74 (63,8%)	63 (64,3%)	p=0,9
0,05-0,09	24 (20,7)	28 (28,6%)	p=0,2
0,1-0,2	18 (15,5%)	5 (5,1%)	p=0,02
0,3-0,4	0 (0%)	2 (2,0%)	p=0,2

Примечание: значения, указывающие на наличие значимых различий, выделены жирным шрифтом.

Сравниваемые группы пациентов практически не различаются по клинической характеристике, за единственным исключением остроты зрения у пациентов до операции в диапазоне 0,1-0,2, частота встречаемости которой в I группе достоверно выше (18% против 5%, $p < 0,05$).

3.7. Предоперационная подготовка пациентов

Предоперационная подготовка больных в обеих группах была сходной. После необходимого общего и офтальмологического обследования пациенты госпитализировались в стационар.

В предоперационном периоде производились инстилляции мидриатиков чтобы обеспечить наилучшую интраоперационную визуализацию для четкого контроля при выполнении внутриглазных манипуляций на всех этапах оперативного вмешательства. Применялись следующие препараты: М-холиноблокатор гидрохлорид циклопентолата («Цикломед» 1% ,Promed Pvt. Ltd., Индия) и адреномиметик фенилэфрина гидрохлорид («Ирифрин» 2,5% ,Promed exports Pvt. Ltd.,Индия) в виде двухкратных инстилляций или комбинированный препарат, содержащий 5% тропикамида и 0,8% фенилэфрина («Мидримакс», Promed exports Pvt. Ltd., Индия). Также проводились инстилляctions нестероидного противовоспалительного препарата диклофенака натрия («Дикло-ф» 0,1%, Promed exports Pvt. Ltd., Индия) с целью ингибирования миоза.

Перед началом операции осуществлялась двукратная обработка операционного поля марлевым шариком, смоченным антисептическим 0,5% спиртовым раствором. Затем в конъюнктивальную полость производилась инстиллякция 0,005% раствора пиклоксидина («Витабакт», Novartis, Франция). Для эпibuльбарной анестезии применялся 0,5% раствор проксиметакаина («Алкаин», Alcon Pharmaceuticals Ltd., Бельгия).

Операционное поле покрывали офтальмологической салфеткой с карманом и липким слоем «Здравмедтех-М» (Москва). Для расширения и удержания век использовался блефаростат.

Для поддержания необходимого в ходе операции мидриаза при отсутствии противопоказаний со стороны соматического состояния под конъюнктиву у лимба инъецировали 1% раствор фенилэфрина («Мезатон», Дальхимфарм, Россия) в 3-х точках - на 12, 4 и 8 часах, общим объемом до 0,1мл. В результате такой подготовки мидриаз в большинстве случаев составлял в среднем 7-8 мм.

Всем пациентам производилась местная инфильтрационная проводниковая анестезия с центральным потенцированием. Стандартная премедикация производилась за 40 минут до операции и включала парентеральное введение раствора кеторолака 30 мг/мл («Кетарол», Dr. Reddy's Laboratories Ltd., Индия) в дозировке 0,4 мг/кг для предотвращения чрезмерной активации ноцицептивных рецепторов, диазепам («Реланиум», Warsaw Pharmaceutical work, Польша) в дозировке 0,15-0,2 мг/кг для создания анксиолитического и седативного эффектов с сохранением сознания, а также тримеперидина («Промедол», Московский эндокринный завод, Россия) в дозировке 0,2 мг/кг для снижения возбудимости болевых центров и снотворного эффекта. Помимо этого осуществлялось ретробульбарное введение смеси из ропивакаина («Наропин», Astra Zeneca, Швеция) в дозировке 0,2 мг/кг и лидокаина («Лидокаин», Армавирская биологическая фабрика, Россия) в дозировке 0,7 мг/кг, в общем объеме 2,5 мл. Для достижения акинезии применяли 8,0 мл 2% раствора лидокаина («Лидокаин», Армавирская биологическая фабрика, Россия).

С целью предупреждения геморрагических осложнений использовалось внутримышечное введение 4,0 мл 12,5% раствора этамзилата («Дицинон», Lek D. D., Словения).

Регистрация основных гемодинамических показателей, таких как среднее артериальное давление (САД), частота сердечных сокращений (ЧСС), сердечный выброс (СВ), сердечный индекс (СИ), ударный объем (УО) и индекс системного сосудистого сопротивления (ИССС) производилась с помощью «Комплекса аппаратно-программного неинвазивного исследования

центральной гемодинамики методом объемной компрессионной осциллометрии» (Россия).

Интраоперационно осуществлялся индивидуальный подбор дозы анальгетиков и нейролептиков.

3.8. Техника операции субтотальной витрэктомии с применением ферментного препарата коллагеназы в I (основной) группе пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией

На основании данных проведенных экспериментальных исследований можно сделать вывод, что доза коллагеназы 30 КЕ/мл, являющаяся безопасной по результатам исследования цитотоксичности, при интраоперационном введении в витреальную полость с экспозицией в течение 10 мин. эффективно разрушает остаточный преретинальный слой СТ, не вызывая деструкции ВПМ сетчатки. Это дало возможность разработать методику интраоперационного применения ферментного препарата коллагеназы и перейти к клиническим исследованиям.

Всем пациентам производилась витрэктомия по стандартной методике с использованием технологии 25G. Операцию начинали с установки 3 портов в 4 мм от лимба на 2, 3 и 10 часах, без предварительного рассечения конъюнктивы. Перед установкой портов необходимо несколько сместить конъюнктиву, чтобы после операции склеральный прокол был прикрыт интактной конъюнктивой. Ирригационный порт стандартно устанавливали в нижне-наружном квадранте глаза, второй порт – в верхне-наружном квадранте и третий порт – в верхне-внутреннем. Такое расположение портов обеспечивает оптимальный доступ к внутренним структурам витреальной полости.

Затем осуществлялось контрастирование кортикальных отделов стекловидного тела суспензией кортикостероида. Для облегчения первичного удаления стекловидного тела с поверхности сетчатки использовался оригинальный метод гидроинъекционной деламации (патент на изобретение

№ 2303424, приоритет от 18.10.2005, авторы Лыскин П. В., Лозинская О. Л.). Для этого в витреальную полость перпендикулярно к поверхности сетчатки вводится канюля, через которую осуществляется подача физиологического раствора под давлением. После увеличения объема контрастированных остатков стекловидного тела за счет инфильтрации канюлю вводят в полость, образующуюся между сетчаткой и стекловидным телом. Возобновляется подача физиологического раствора, при этом создается параллельное поверхности сетчатки направление тока жидкости. Особенность этого метода состоит в нетракционном, атравматичном отделении кортикальных слоев стекловидного тела от поверхности сетчатки. После максимально возможно полного механического удаления стекловидного тела (витрэктомиа) производился контролируемый ферментный витреолиз неудаленных остатков стекловидного тела. Метод осуществлялся следующим образом: после удаления остаточных кортикальных слоев СТ с поверхности сетчатки в области центральных её отделов осуществлялось введение в витреальную полость ПФОС до нижней границы определяемой зоны витреоретиальной адгезии. Тем самым достигалась протекция сетчатки для полного исключения теоретически возможного побочного воздействия фермента на наиболее функционально значимые ее участки. После производилась максимально возможная витрэктомиа, с применением склерокомпрессии, механическое удаление эпиретинальных мембран. Затем в витреальную полость, предварительно остановив подачу физиологического раствора, через канюлю медленно вводили 3,5-5 мл изотонического раствора NaCl, содержащего 30 КЕ коллагеназы в 1 мл раствора. При этом под контролем микроскопа канюля постепенно подводилась к периферическим отделам сетчатки, перемещаясь по кругу, с тем, чтобы визуализируемой струей подаваемого раствора постепенно обработать все участки периферии сетчатки. При введении в витреальную полость изотонический раствор, содержащий коллагеназу, вытеснял ранее введенный физиологический раствор через имеющиеся в склере проколы. Введенный изотонический раствор коллагеназы выдерживали в витреальной

полости в течение 10 минут, закрыв свободные порты заглушками, после чего возобновляли подачу физиологического раствора, а витреальную полость полностью заполняли перфторорганическим соединением. Таким образом достигалось анатомическое прилегание сетчатки и практически полное удаление остатков коллагеназы из витреальной полости. Далее производилась лазеркоагуляция сетчатки (мощностью 0,15-0,30 Вт) с формированием циркулярной линии коагуляции, ширина которой сопоставлялась с шириной диска зрительного нерва. По завершении лазеркоагуляции производилась замена ПФОС на силикон. К системе инфузии присоединяли шприц с силиконовым маслом и вводили его в витреальную полость. Одновременно осуществлялось удаление ПФОС с помощью канюли методом пассивной аспирации. В ходе операции внутривенно всем пациентам вводили раствор ингибитора протеаз – апротинина («Контрикал») в дозе 200000 АТрЕ (150376 КИЕ).

3.9. Техника операции субтотальной витрэктомии во II (контрольной) группе пациентов с отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией

Техника операции отличалась от проводимой в первой группе отсутствием этапа ферментного витреолиза, то есть после максимально возможного механического удаления кортикальных слоев стекловидного тела в центральных отделах сетчатки производилось введение в витреальную полость ПФОС до нижней границы определяемой зоны витреоретинальной адгезии. Введение ПФОС способствует адаптации отслоенной сетчатки и выдавливанию субретинальной жидкости через ретинальные разрывы. Периферически расположенные кортикальные остатки стекловидного тела удалялись при помощи ретинального пинцета и витреотома, по мере необходимости выполнялась склерокомпрессия. По завершении витрэктомии осуществлялась полная тампонада витреальной полости ПФОС. Затем имеющиеся зоны ретинальных разрывов и деструкции сетчатки подвергались лазерному воздействию. С целью фиксации сетчатки к подлежащим тканям

выполнялась лазеркоагуляция с рабочим расстоянием от наконечника до сетчатки 0,5-3,0 мм, экспозицией 0,1-0,3 сек. и мощностью 0,15-0,30 Вт. В среднем наносили от 420 до 520 коагулятов. После выполнения лазеркоагуляции проводилась одномоментная замена ПФОС на силикон.

Таким образом, клинические исследования были проведены на 214 глазах 214 пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной ПВР.

Критериями отбора пациентов для проведения клинического исследования служили: регматогенная отслойка сетчатки длительностью существования до 6 месяцев (либо возникший в эти сроки рецидив ОС после проведения эписклерального пломбирования), с наличием пролиферативной витреоретинопатии С-D1 стадии. Стадия ПВР оценивалась в соответствии с международной классификацией, принятой Retina Society Terminology Committee (1983).

Все пациенты в обеих группах прошли обследование с применением следующих методик: визометрии, биомикроскопии переднего отрезка глаза, непрямой бинокулярной офтальмоскопии, тонометрии, периметрии, ультразвукового А- и В- офтальмосканирования, электроретинографии, определения порогов электрической чувствительности и электрической лабильности зрительного нерва.

По виду проводимого лечения пациенты были разделены на две группы – основную и контрольную. В основной группе (116 глаз) всем пациентам было проведено хирургическое лечение отслойки сетчатки с интраоперационным применением ферментного препарата коллагеназы, в контрольной группе (98 глаз) – пациентам производилась витрэктомия по стандартной методике с использованием технологии 25G.

Проведенные клинические исследования позволили изучить разработанную методику проведения субтотальной витрэктомии с применением ферментного препарата коллагеназы в клинике для последующей оценки ее анатомических и функциональных результатов по сравнению с результатами стандартной методики субтотальной витрэктомии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ОТСЛОЙКИ СЕТЧАТКИ, ОСЛОЖНЕННОЙ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ВИТРЕОРЕТИНОПАТИЕЙ

Для оценки функциональных и анатомических результатов разработанной методики проведения субтотальной витрэктомии с применением ферментного препарата коллагеназы, послеоперационные исследования проводились у пациентов основной и контрольной групп в динамике. Сначала в раннем послеоперационном периоде, затем через 1 месяц после операции и спустя 3 месяца после оперативного вмешательства (для определения сроков удаления силиконового масла или необходимости проведения повторной ревизии). После завершения курса хирургического лечения удалением силикона, наблюдение проводилось в сроки 1, 3, 6 12 и 24 месяца после операции.

4.1. Течение раннего послеоперационного периода в I (основной) и II (контрольной) группах пациентов

Послеоперационный период у всех пациентов протекал гладко. Оптические среды были прозрачными, не учитывая существовавшие и в дооперационном периоде частичные помутнения хрусталика.

После окончания операции все пациенты в течение двух часов соблюдали постельный режим. Дальнейший послеоперационный режим и терапия назначались индивидуально, с учетом состояния оперированного глаза.

Течение послеоперационного периода в большинстве случаев характеризовалось незначительной воспалительной реакцией в виде слабовыраженной смешанной инъекции, которая регрессировала к 7-10-му дню после операции. Роговица была прозрачная без явлений отека и десцеметита. Влага передней камеры была прозрачной.

Все лечебные мероприятия в послеоперационном периоде, как в основной, так и в контрольной группах, заключались в инстилляции растворов

стероидных препаратов (комбинированный препарат, содержащий тобрамицин и дексаметазон «Тобрадекс»), антибактериальных средств (0,005% раствора пиклоксидина «Витабакт») и мидриатиков (2,5% раствор фенилэфрина гидрохлорида «Ирифрин» или 1% раствор тропикамида «Мидриацил»). В первые дни после операции всем пациентам проводились инъекции кортикостероидов (0,5 мл 0,4% раствора дексаметазона субконъюнктивально) 1 раз в сутки.

Такое осложнение как транзиторная гипертензия, наблюдалось в 18-ти (15,5%) случаях в основной группе и в 15-ти (15,6%) случаях – в контрольной группе. Для лечения этого состояния применялась консервативная гипотензивная терапия, включающая 2-х кратные инстилляциии β -адреноблокаторов, ингибиторов карбоангидразы и назначение диакарба внутрь. К моменту выписки из стационара ВГД компенсировалось в течение 2-4-х дней у всех пациентов.

К моменту выписки из стационара отмечалось улучшение остроты зрения на 0,01-0,1 у 82% больных основной группы и у 73% больных в контрольной группе.

Длительность пребывания в стационаре составляла от 2-х до 5-ти дней. Инстилляциии вышеуказанных капель после выписки из стационара продолжали в течение 1-1,5 месяцев с постепенным сокращением числа закапываний.

4.2. Осложнения в интра- и послеоперационном периоде

В ходе оперативного вмешательства в качестве наиболее часто встречающегося осложнения отмечалось кровотечение из сосудов сетчатки, произошедшее в 4-х случаях в основной (3,4%) и в 4-х случаях в контрольной группе (4,1%) во время удаления эпиретинальных мембран. Для остановки возникшего кровотечения проводили диатермокоагуляцию сосуда. Кровотечения из склерального разреза в процессе витрэктомии встречались в

контрольной группе у двух пациентов (1,7%) и были остановлены коагуляцией склеральных сосудов.

Послеоперационные осложнения и их лечение

В послеоперационном периоде отмечалось прогрессирование катаракты в исследуемой группе на 28-ми глазах (24,1%) (возраст пациентов в этой группе – от 51 до 80 лет), в контрольной – на 25-ти глазах (25,5%) (возраст пациентов в этой группе также от 51 до 80 лет). Возникновение начальных помутнений в задних кортикальных слоях хрусталика было выявлено в основной группе на 16-ти глазах (13,8%), а в контрольной группе - 15 глазах (15,3%).

В течение первых дней после операции отмечалось повышение внутриглазного давления на 18-ти глазах (15,5%) в основной группе и на 15-ти глазах (15,3%) – в контрольной группе. На фоне консервативной гипотензивной терапии через 3-4 дня ВГД соответствовало дооперационному уровню.

Экссудативная реакция в виде феномена Тиндаля была отмечена на 8-ми глазах (6,9 %) в основной группе и на 6-ти глазах (6,1%) в контрольной группе. Признаки воспаления купировались после назначения консервативной противовоспалительной терапии - комбинированный препарат, содержащий тобрамицин и дексаметазон («Тобрадекс») по 2 капли 6 раз в день, мидриацил 1% по 2 капли 2 раза в день и парабульбарной инъекции бетаметазона («Дипроспан»).

Сравнительный анализ осложнений в I (основной) и II (контрольной) группах пациентов проводился с использованием статистического непараметрического критерия – точного метода Фишера, не зависящего от характера распределения показателя.

Для каждого включенного в анализ признака проводилось попарное сравнение заданных групп пациентов, выявлялись достоверные различия. Для получения описательной статистики и проведения сравнения сформированных групп пациентов с использованием критерия Фишера

использованы пакеты программ EXCEL 2010 и STATISTICA 7.0. Значимый уровень достоверности принимался при $p < 0,05$.

Сводные данные по осложнениям в I (основной) и II (контрольной) группах пациентов представлены в таблице 19.

Таблица 19

Послеоперационные осложнения в I (основной) и II (контрольной) группах пациентов

Осложнения	Количество пациентов		Достоверность различий между группами (p – значения)
	Группа I (116 больных)	Группа II (98 больных)	
Прогрессирование катаракты	28 (24,1%)	25 (25,5%)	p=0,9
Возникновение катаракты	16 (13,8%)	15 (15,3%)	p=0,8
Повышение ВГД	18 (15,5%)	15 (15,3%)	p=0,9
Экссудативная реакция (феномен Тиндаля)	8 (6,9%)	6 (6,1%)	p=0,9

По выявленным осложнениям разработанная методика не превосходит стандартную методику.

Стандартные назначения инстилляций в оперированный глаз в послеоперационном периоде включали: комбинированный препарат, содержащий дексаметазон и полимиксин В («Макситрол») по 2 капли 4 раза в день, 1% раствор тропикамида («Мидриацил») по 2 капли 2 раза в день, 0,1% раствор индометацина («Индоколлир») по 2 капли 4 раза в день. Инстилляцию глазных капель назначалось продолжать после выписки из стационара в течение 1-1,5 месяцев. В среднем больные после операции находились в стационаре 4-6 дней. Контрольный осмотр пациентов проводился через 1 месяц после операции и спустя 3 месяца после оперативного вмешательства (для определения сроков удаления силиконового масла или необходимости проведения повторной ревизии). После завершения курса хирургического

лечения удалением силикона, наблюдение проводилось в сроки 1, 3, 6, 12 и 24 месяца после операции.

4.3. Результаты лечения пациентов I (основной) группы с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией

Интраоперационно полное анатомическое прилегание сетчатки достигнуто во всех 116 случаях (100%).

До проведения хирургического лечения, большинство пациентов в исследуемой группе (63,8%) имели остроту зрения в пределах рг.с.- 0,04 с коррекцией, и только 15,5% пациентов имели остроту зрения в пределах 0,1-0,2. После хирургического лечения 48,3% пациентов имели остроту зрения 0,1-0,2 с коррекцией; 19,0% пациентов имели остроту зрения в пределах 0,3-0,4; 10,3% пациентов достигли остроты зрения 0,5-0,7 и только у 5,2% пациентов острота зрения осталась в пределах рг. certae - 0,04 (таблица 20).

Таблица 20

Острота зрения у пациентов основной группы до операции и после хирургического лечения (с максимальной коррекцией)

Острота зрения	Количество пациентов			
	До операции		После хирургического лечения	
	Абс.	%	Абс.	%
рг. certae – 0,04	74	63,8	6	5,2
0,05-0,09	24	20,7	20	17,2
0,1-0,2	18	15,5	56	48,3
0,3-0,4	0	0	22	19,0
0,5-0,7	0	0	12	10,3
Всего	116	100	116	100

Курс лечения завершен удалением силикона в 112-ти случаях (96,5%).

В 30-ти (25,8%) случаях в связи с прогрессированием помутнений в хрусталике потребовалось проведение ФЭК+ИОЛ (возраст пациентов в этой группе – от 51 до 80 лет).

Развитие рецидива отслойки сетчатки отмечалось в 4-х случаях (3,4%).

Данные оптической когерентной томографии (ОКТ) сетчатки после проведенного хирургического вмешательства показали положительную динамику (рис. 8).

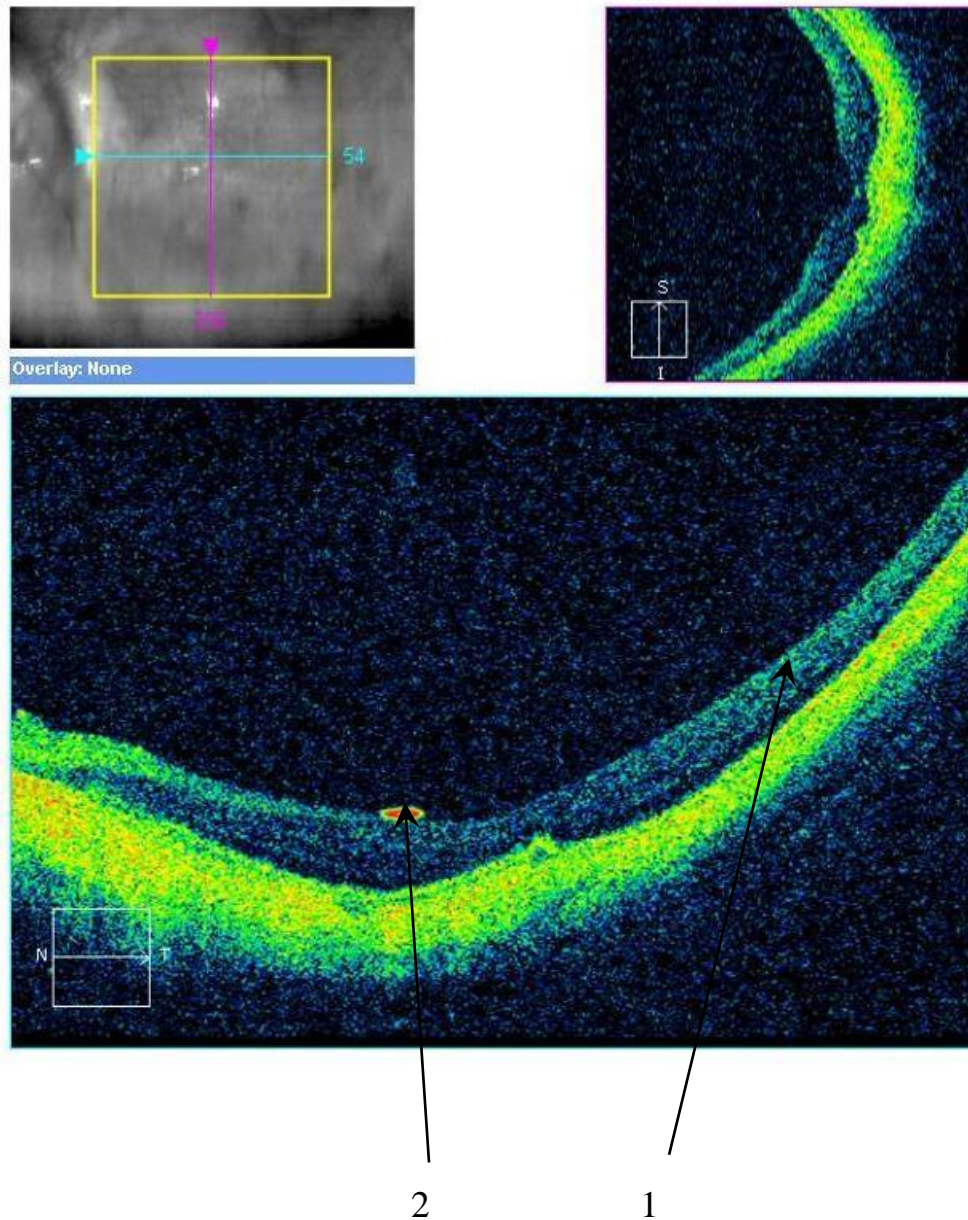


Рис. 8. ОКТ пациента I (основной) группы. Исследование проведено через 1 месяц после проведения хирургического вмешательства. Сетчатка прилежит (1), отека нет, виден уровень силикона (2).

4.4. Результаты лечения пациентов II (контрольной) группы с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией

Интраоперационно полное анатомическое прилегание сетчатки достигнуто во всех 98-ми случаях (100%).

До проведения хирургического лечения, большинство пациентов в исследуемой группе (64,3%) имели остроту зрения в пределах *pr. certae* - 0,04 с коррекцией, и только 5,1% пациентов имели остроту зрения в пределах 0,1-0,2. После хирургического лечения 49,0% пациентов имели остроту зрения 0,1-0,2 с коррекцией; 12,2% пациентов имели остроту зрения в пределах 0,3-0,4; 7,2 % пациентов достигли остроты зрения 0,5-0,7 и только у 10,2% пациентов острота зрения осталась в пределах *pr. certae* - 0,04 (таблица 21).

Таблица 21

Острота зрения у пациентов контрольной группы до операции и после хирургического лечения (с максимальной коррекцией)

Острота зрения	Количество пациентов			
	До операции		После хирургического лечения	
	Абс.	%	Абс.	%
<i>pr. certae</i> – 0,04	63	64,3	10	10,2
0,05-0,09	28	28,6	21	21,4
0,1-0,2	5	5,1	48	49,0
0,3-0,4	2	2,0	12	12,2
0,5-0,7	0	0	7	7,2
Всего	98	100	98	100

Курс лечения завершён удалением силикона в 90 случаях (91,8%).

В 28-ми случаях (28,6%) в связи с прогрессированием помутнений в хрусталике потребовалось проведение ФЭК+ИОЛ (возраст пациентов в этой группе – от 50 до 65 лет). Развитие рецидива отслойки сетчатки отмечалось в 15-ти случаях (15,3%).

Данные оптической когерентной томографии (ОКТ) сетчатки после проведенного хирургического вмешательства показали положительную динамику (рис. 9).

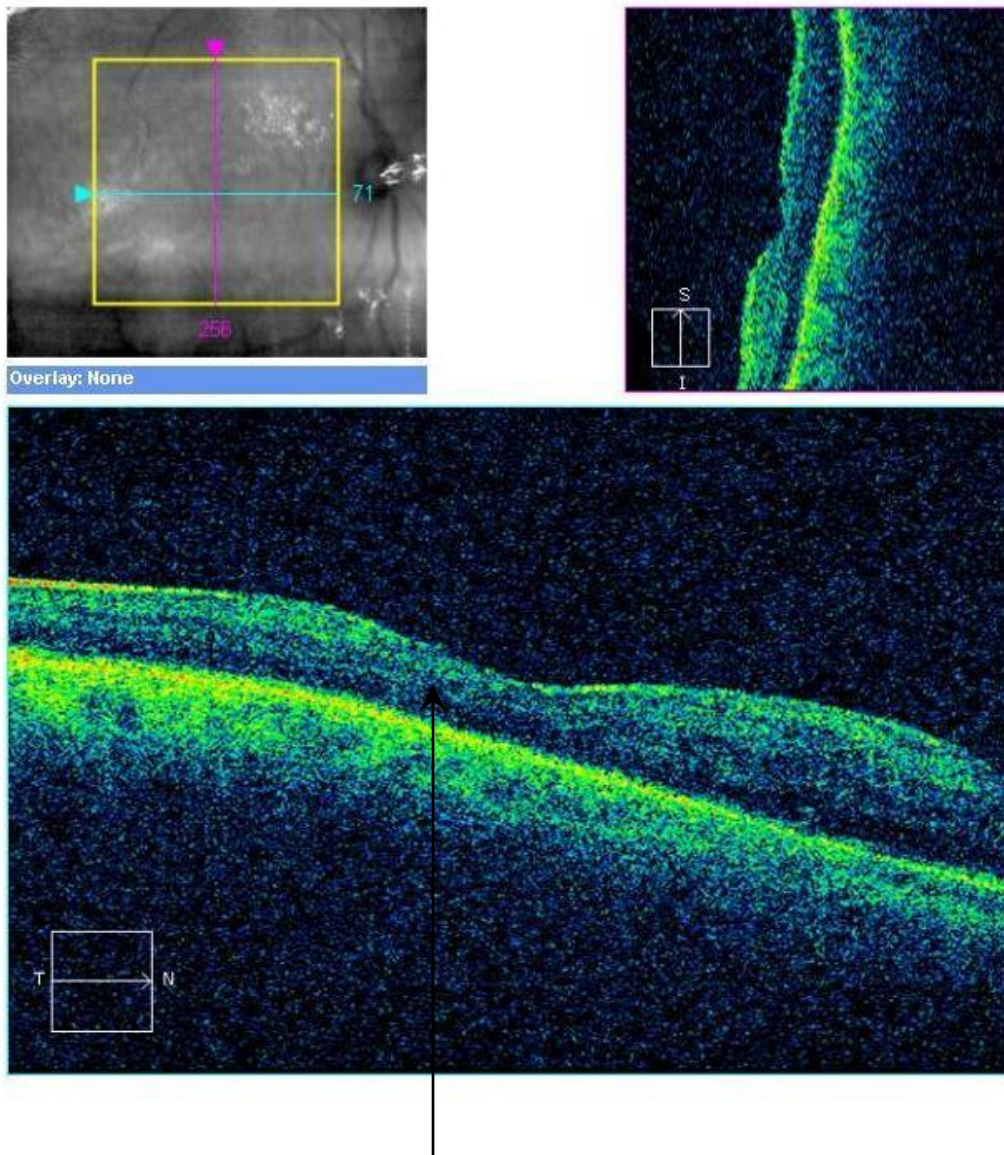


Рис. 9. ОКТ пациента II (контрольной) группы. Исследование проведено через 1 месяц после проведения хирургического вмешательства. Сетчатка прилежит.

4.5. Сравнительный анализ результатов хирургического лечения пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией

После проведенного хирургического вмешательства в раннем послеоперационном периоде у всех пациентов обеих групп в 100% случаев отмечалось полное прилегание сетчатки, ретинальные разрывы были блокированы лазерными коагулятами. Дальнейший осмотр проводили спустя 1 и 3 месяца после оперативного вмешательства для определения сроков удаления силиконового масла или проведения повторной ревизии. После удаления силикона наблюдение проводилось в сроки 1, 3, 6, 12 и 24 месяца после операции.

По завершении курса хирургического лечения были получены следующие анатомические результаты: лечение завершено удалением силиконового масла в основной группе в 112 случаях (96,5%), в контрольной группе – в 90 случаях (91,8%).

Рецидив отслойки сетчатки после удаления силикона обнаружен в основной группе в 4-х (3,4%) случаях, в контрольной группе 15-ти (15,3%) случаях.

Сравнительный анализ рецидивов и остроты зрения после хирургического лечения в I (основной) и II (контрольной) группах пациентов проводился с использованием статистического непараметрического критерия – точного метода Фишера, не зависящего от характера распределения показателя.

Для каждого включенного в анализ признака проводилось попарное сравнение заданных групп пациентов, выявлялись достоверные различия. Для получения описательной статистики и проведения сравнения сформированных групп пациентов с использованием критерия Фишера использованы пакеты программ EXCEL 2010 и STATISTICA 7.0. Значимый уровень достоверности принимался при $p < 0,05$.

Сводные данные по рецидивам в I (основной) и II (контрольной) группах пациентов представлены в таблице 22.

Таблица 22

Сравнительный анализ рецидивов у больных I (основной) и II (контрольной) групп пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией

	Группа I (116 больных)	Группа II (98 больных)	Достоверность различий между группами (p – значения)
Количество рецидивов	4 (3,4%)	15 (15,3%)	p=0,003

Примечание: значения, указывающие на наличие значимых различий, выделены жирным шрифтом.

Частота рецидивов в основной группе достоверно ниже, чем в контрольной (3,4% против 15,3%, $p < 0,01$). Таким образом, по частоте рецидивов разработанная методика имеет преимущество перед стандартной.

При анализе функциональных результатов хирургического лечения в качестве основного параметра учитывалась острота зрения с максимальной коррекцией. Сводные данные по остроте зрения после хирургического лечения в I (основной) и II (контрольной) группах пациентов представлены в таблице 23.

Таблица 23

Сравнительный анализ остроты зрения у больных I (основной) и II (контрольной) групп пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией после хирургического лечения

Острота зрения	Группа I (116 больных)	Группа II (98 больных)	Достоверность различий между группами (p – значения)
pr. certae-0,04	6 (5,2%)	10 (10,2%)	p=0,2
0,05-0,09	20 (17,2%)	21 (21,4%)	p=0,5
0,1-0,2	56 (48,3%)	48 (49,0%)	p=0,9
0,3-0,4	22 (19,0%)	12 (12,2%)	p=0,2
0,5-0,7	12 (10,3%)	7 (7,2%)	p=0,5

По остроте зрения после хирургического лечения разработанная методика не уступает стандартной методике.

Данные, полученные при ОКТ сетчатки, показали положительную динамику после хирургического лечения в обеих группах. В частности, отмечалось уменьшение толщины нейроэпителлия, которая до операции в парацентральных зонах составляла 500-600 мкн в связи с наличием кистозного отека нейроэпителлия. Через месяц после операции эта величина составляла в среднем 300-350 мкн. После удаления силикона, нормализация толщины нейроэпителлия отмечалась в обеих группах в течении трех месяцев после завершения хирургического лечения. При этом не было выявлено заметных различий в структуре сетчатки между двумя группами, что свидетельствует об отсутствии негативного воздействия, связанного с применением ферментного препарата коллагеназы.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА

На основании проведенных клинических и морфологических исследований определены показания и противопоказания к применению ферментного препарата коллагеназы в хирургическом лечении отслойки сетчатки (в случае плотной фиксации кортикальных слоев СТ к сетчатке) при ряде витреоретинальных заболеваний.

Показаниями являются:

- выраженная деструкция и помутнение стекловидного тела;
- пролиферативная витреоретинопатия;
- гемофтальм;
- рецидив оперированной отслойки сетчатки.

Результаты клинических исследований показали, что метод является атравматичным, технически легко выполнимым и возможно его широкое внедрение в клиническую практику.

Противопоказаниями к применению ферментного препарата коллагеназы в хирургическом лечении отслойки сетчатки являются:

- наличие признаков аллергической реакции на ферментный препарат «Коллализин»;
- наличие у пациента патологии свертывающей системы крови (гипокоагуляция).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Значительный прогресс хирургических технологий за последние годы позволил улучшить анатомические и функциональные результаты оперативного лечения отслойки сетчатки, а также уменьшить число осложнений. Тем не менее, по данным различных авторов, процент успешных хирургических вмешательств при использовании современных высокотехнологичных подходов составляет от 61,5 до 97,5% в зависимости от тяжести исходного состояния глаза [125, 137, 193].

Одной из основных причин неудач хирургического лечения регматогенной отслойки сетчатки является возникновение и прогрессирование пролиферативной витреоретинопатии в послеоперационном периоде. Проведенные исследования показали, что развитие ПВР отмечается в 2,2 – 29,3% случаев, а частота развития рецидивов отслойки сетчатки при этом составляет от 2,2 до 20,0% [4, 63, 83, 94, 117, 125, 135, 193]. При этом значительное количество рецидивов отмечается в первые три месяца после операции. Возможно также возникновение локального пролиферативного процесса с формированием эпиретинальной мембраны в макулярной зоне, что приводит к значительному снижению функционального результата операции.

Для лечения отслойки сетчатки, осложненной пролиферативной витреоретинопатией, необходимо проведение интравитреального вмешательства. В последние годы особое значение придается максимально возможному удалению кортикальных слоев стекловидного тела в процессе витрэктомии, как фактору, непосредственно влияющему на результативность хирургического лечения [101, 143].

Несмотря на постоянное усовершенствование хирургической техники и инструментария, по-прежнему невозможно полностью механически удалить кортикальные слои стекловидного тела с поверхности сетчатки. Хирургические манипуляции могут стать причиной разрывов сетчатки,

кровотечения из ее сосудов, повреждения нервных волокон, в особенности у пациентов молодого возраста [164].

Прочность витреоретинального контакта обусловлена проникновением витреальных фибрилл в ВПМ сетчатки в зоне базиса СТ, а центральное – наличием фибронектина и ламинина, являющихся основными адгезивными гликопротеинами экстрацеллюлярного матрикса [78,134].

Альтернативой механическому методу отделения задних кортикальных слоев стекловидного тела может служить биохимическая индукция отслойки кортикальных слоев стекловидного тела или «фармакологический витреолизис».

Изученные на данный момент витреолитические препараты включают гиалуронидазу, тканевой активатор плазминогена, хондроэтиназу, и др. [92, 170, 171, 82]. Наиболее перспективными, безусловно, являются плазмин и микроплазмин, которые в определенных дозировках и при соответствующем времени инкубации могут вызывать терапевтическую ЗОСТ, но оба препарата не влияют на витрео-ретинальные взаимоотношения в зоне базиса стекловидного тела [86, 161, 178, 107, 112]. Данная особенность ограничивает применение этих препаратов в хирургии отслойки сетчатки, где от максимально полного удаления кортикальных слоев стекловидного тела с поверхности сетчатки в зоне базиса напрямую зависит успех операции (например, при наличии периферических разрывов сетчатки или отрыва от зубчатой линии).

Несомненным остается тот факт, что основным компонентом фиброцеллюлярных пролиферативных мембран является коллаген. Соответственно, при появлении эпиретинальной пролиферативной ткани на начальной стадии развития ПВР целесообразно интравитреальное введение коллагенолитических препаратов с последующей витрэктомией и удалением пролиферативных мембран [31].

Если в хирургии отслойки сетчатки принципиальным моментом является полнота витрэктомии, то ферментный витреолиз должен обеспечить максимальный успех операции. Помимо воздействия на белки

экстрацеллюлярного матрикса, осуществляющие прикрепление коллагеновых фибрилл к поверхности ВПМ в зоне заднего полюса глаза и его экватора, можно воздействовать собственно на коллаген, обеспечивающий витреоретинальное сращение в зоне базиса СТ и являющийся основным компонентом фиброцеллюлярных пролиферативных мембран. Для этой цели препаратом выбора является коллагеназа.

Коллагеназа – («Коллализин», клостридопептидаза А) – протеолитический фермент, получаемый из культуры *Clostridium histolyticum*. В медицинской практике коллагеназа используется в виде водных растворов, которые готовятся непосредственно перед применением (утвержден к применению 04.08.1983).

Впервые коллагеназа была получена Касавиной Б. С. с соавторами в 1969 году [26]. Применение протеолитического фермента, обладающего субстратной специфичностью в отношении коллагена, открыло новые возможности как в консервативном, так и в хирургическом лечении.

В связи с вышеизложенным, **целью настоящей работы** явилась разработка новой методики хирургического лечения отслойки сетчатки с применением ферментного препарата коллагеназы для более полного удаления кортикальных слоев стекловидного тела.

Для реализации цели работы необходимо было решить ряд задач. В частности, произвести исследование цитотоксичности различных концентраций препарата коллагеназы в зависимости от времени инкубации; в эксперименте *in vitro* определить минимальную эффективную дозу препарата, в которой он разрушает кортикальные слои стекловидного тела при интравитреальном введении. Последовательное решение вышестоящих задач позволило разработать методику проведения субтотальной витрэктомии с применением ферментного препарата коллагеназы в клинике. Затем необходимо было оценить клинические и функциональные результаты применения разработанной методики по сравнению со стандартной, чтобы определить её эффективность.

В эксперименте исследовали цитотоксичность различных концентраций препарата коллагеназы, выпускаемого Санкт-Петербургским НИИ вакцин и сывороток, «Коллализин» – 5, 15, и 30 КЕ в зависимости от времени инкубации – 10, 20 или 30 мин. с культурой фибробластов мыши линии НИН 3Т3. Большой отрезок времени не рассматривался, так как задачей было максимально возможное сокращение времени воздействия фермента в ходе операции.

Проведенные исследования показали, что все исследуемые концентрации препарата коллагеназы в условиях данного эксперимента не оказывают цитотоксического действия на культуру фибробластов мыши линии НИН 3Т3 через 10 мин. и 20 мин. после инкубации. Через 30 мин. концентрации препарата 5 КЕ и 15 КЕ не оказывают цитотоксического действия на культуру фибробластов. При воздействии концентрации коллагеназы в 30 КЕ/лун после инкубации 30 мин. наблюдается нерезкая цитотоксичность, которая выражается в лизисе не более 20% клеток; также не более 20% клеток круглые, слабо прикрепленные, не имеющие интрацитоплазматических гранул.

Исследование для определения минимальной эффективной дозы и минимального времени экспозиции препарата коллагеназы для разрушения остаточных волокон эпиретинального СТ было проведено в эксперименте *in vitro* на 17 кадаверных глазах 9 доноров. При производстве экспериментальных операций задачей было воссоздание условий, максимально приближенных к условиям планируемого хирургического вмешательства, соблюдение разработанной методики.

Применяли 5 КЕ/мл, 10 КЕ/мл, 15 КЕ/мл и 30 КЕ/мл коллагеназы в 4 мл физиологического раствора, то есть доза фермента не превышала безопасных значений, полученных при исследовании цитотоксичности. Экспозиция составляла 10 и 20 мин. соответственно. Больше время экспозиции не рассматривалось, так как задачей было максимально возможное увеличение дозы вводимого фермента при ограничении экспозиции.

На основании данных сканирующей электронной микроскопии заключили, что доза коллагеназы 30 КЕ/мл при интраоперационном введении в

витреальную полость с экспозицией в течение 10 мин. эффективно разрушает остаточный преретинальный слой СТ, не вызывая деструкции ВПМ сетчатки. Концентрация коллагеназы 30 КЕ при экспозиции в 20 мин. является "пограничной" и при незначительном увеличении времени воздействия оказывает цитотоксическое влияние, что нежелательно.

Полученные в результате серии экспериментов результаты позволили нам перейти к этапу применения разработанной методики интраоперационного введения исследуемого ферментного препарата в клинику.

Разработана методика проведения субтотальной витрэктомии с применением ферментного препарата коллагеназы, рекомендованная для применения в хирургическом лечении отслойки сетчатки, осложненной ПВР.

Клинические исследования были проведены на 214 глазах 214 пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной ПВР.

Критериями отбора пациентов для проведения исследования служили: регматогенная отслойка сетчатки длительностью существования до 6 месяцев (либо возникший в эти сроки рецидив ОС после проведения эписклерального пломбирования), с наличием пролиферативной витреоретинопатии С-D1 стадии. Стадия ПВР оценивалась в соответствии с международной классификацией, принятой Retina Society Terminology Committee (1983).

Все пациенты в обеих группах прошли обследование с применением следующих методик: визометрии, биомикроскопии переднего отрезка глаза, непрямой бинокулярной офтальмоскопии, тонометрии, периметрии, ультразвукового А- и В- офтальмосканирования, электроретинографии, определения порогов электрической чувствительности и электрической лабильности зрительного нерва.

По виду проводимого хирургического лечения пациенты были разделены на две группы – основную и контрольную. В основной группе (116 глаз) всем пациентам было проведено хирургическое лечение отслойки сетчатки с интраоперационным применением ферментного препарата коллагеназы, в

контрольной группе (98 глаз) – пациентам производилась витрэктомия по стандартной методике с использованием технологии 25G.

У всех пациентов основной группы определялось развитие пролиферативной витреоретинопатии С1-4 стадии (67,2% случаев) и D1 (32,8% случаев) стадий. В контрольной группе степень выраженности пролиферативной витреоретинопатии в 78,6% случаев соответствовала С 1-4 стадии и в 21,4% случаев – D1 стадии.

После проведенного хирургического вмешательства в раннем послеоперационном периоде у всех пациентов обеих групп в 100% случаев отмечалось полное прилегание сетчатки, ретинальные разрывы были блокированы лазерными коагулятами. Определено, что интраоперационное применение ферментного препарата коллагеназ не изменяет течения послеоперационного периода.

Проведенный сравнительный анализ анатомических и функциональных результатов хирургического лечения отслойки сетчатки с интраоперационным применением ферментного препарата коллагеназы показал более высокие результаты, чем при применении стандартной методики.

По завершении курса хирургического лечения, были получены следующие анатомические результаты: удаление силиконового масла в основной группе провели в 112 случаях (96,5%), в контрольной группе – в 90 случаях (91,8%).

Рецидив отслойки сетчатки после удаления силикона обнаружен в основной группе в 4-х случаях (3,4%), в контрольной группе – в 15-ти случаях (15,3%).

До хирургического лечения большинство пациентов как основной, так и контрольной группы имели остроту зрения от $pr.certa$ до 0,04 (63,8 % и 64,3 % соответственно). После проведенного хирургического лечения острота зрения большинства пациентов составляла от 0,05-0,09 (17,2% и 21,4% соответственно) до 0,1-0,2 (48,3% и 49,0% соответственно). Однако после проведенного хирургического лечения острота зрения 29,3% пациентов в основной группе

0,3-0,7, в то время как в контрольной группе такая острота зрения определялась у 19,4% пациентов.

В основной группе в 30 случаях (25,8%) в связи с прогрессированием помутнений в хрусталике потребовалось проведение ФЭК+ИОЛ (возраст пациентов в этой группе – от 51 до 80 лет). В контрольной группе в 28 случаях (28,6%) в связи с возникновением и прогрессированием помутнений в хрусталике потребовалось проведение ФЭК+ИОЛ (возраст пациентов в этой группе также от 51 до 80 лет).

Таким образом, клинически и морфологически доказано, что разработанная методика интраоперационного применения ферментного препарата коллагеназы позволяет более эффективно удалять кортикальные слои СТ в зоне базиса по сравнению с механическим их удалением, тем самым повышая эффективность хирургического лечения отслойки сетчатки.

Полученные анатомические результаты применения разработанной методики – 96,5% успешного завершения хирургического лечения и 3,4% рецидивов, в сравнении с данными литературы демонстрируют относительно высокий уровень её эффективности. По данным различных авторов, процент успешных хирургических вмешательств при использовании современных высокотехнологичных подходов составляет от 61,5 до 97,5% в зависимости от тяжести исходного состояния глаза [Heimann H., 2007; Kreissig I., 2010; Wilkinson C. P., Rice T. A., 1997], при этом частота рецидивов отслойки сетчатки составляет от 2,2% до 20,0%; большинство рецидивов развивается в первые три месяца после операции [Bonnet M., Guenoun S., 1995; Heimann H., 2007; Kon C. N. et al., 2000; Wilkinson C. P., Rice T. A., 1997].

На основании проведенных экспериментальных и клинических исследований определены показания к применению ферментного препарата коллагеназы в хирургическом лечении отслойки сетчатки (в случае плотной фиксации кортикальных слоев СТ к сетчатке), при ряде витреоретинальных заболеваний, таких как выраженная деструкция и помутнение стекловидного тела, пролиферативная витреоретинопатия, гемофтальм. Также разработанная

методика рекомендована при хирургическом лечении рецидивов оперированной отслойки сетчатки. Противопоказаниями к применению ферментного препарата коллагеназы в хирургическом лечении отслойки сетчатки рекомендовали считать наличие признаков аллергической реакции на ферментный препарат «Коллализин», а также патологии свертывающей системы крови (гипокоагуляция).

Использование разработанного метода ферментного витреолиза позволяет повысить эффективность удаления кортикальных слоев СТ в процессе витрэктомии, тем самым улучшая качество хирургического лечения отслойки сетчатки и снижая риск возникновения рецидива отслойки сетчатки.

ВЫВОДЫ

1. Результатами исследования цитотоксичности доказано, что все исследуемые концентрации ферментного препарата коллагеназы (5 КЕ/мл, 10 КЕ/мл, 15 КЕ/мл и 30 КЕ/мл) в условиях данного эксперимента не оказывают цитотоксического действия на культуру фибробластов мыши линии NIH 3T3 через 10 мин. и 20 мин. после инкубации; через 30 мин концентрация 30 КЕ оказывает незначительное цитотоксическое действие на фибробласты.

2. В эксперименте определена минимальная эффективная доза препарата коллагеназы, в которой он разрушает кортикальные слои стекловидного тела при интравитреальном введении: в концентрации 30 КЕ/мл при экспозиции 10 мин. происходит эффективное разрушение остаточного преретинального слоя стекловидного тела без деструкции внутренней пограничной мембраны сетчатки.

3. Отработанная методика проведения субтотальной витрэктомии с применением ферментного препарата коллагеназы в клинике позволяет интраоперационно разрушать кортикальные слои стекловидного тела в зоне базиса, которые невозможно полностью удалить механическим путем.

4. Применение новой методики позволяет получить более высокие анатомические и функциональные результаты по сравнению со стандартной. В основной группе процент рецидивов отслойки сетчатки составил 3,4% (4 случая), в контрольной группе - 15,3% (15 случаев). После хирургического лечения в основной группе 19,0% пациентов имели остроту зрения в пределах 0,3-0,4; остроты зрения 0,5-0,7 достигли 10,3% пациентов, в то время, как в контрольной группе эти цифры составили 12,2% и 7,2% соответственно.

5. Показаниями к применению предложенной методики хирургического лечения регматогенной отслойки сетчатки являются наличие пролиферативной витреоретинопатии, выраженной деструкции и помутнения стекловидного тела, гемофтальма, а также рецидив оперированной отслойки сетчатки. Противопоказаниями являются наличие у пациента признаков аллергической реакции на ферментный препарат «Коллализин» либо патологии свертывающей системы крови (гипокоагуляция).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВПМ – внутренняя пограничная мембрана

ДЗН – диск зрительного нерва

ЗГМ – задняя гиалоидная мембрана

ЗОСТ – задняя отслойка стекловидного тела

КЕ – коллагенная единица

КМ – клетки Мюллера

МР – макулярный разрыв

ОКТ – оптическая когерентная томография

ОСО – отслойка сосудистой оболочки

ПВР – пролиферативная витреоретинопатия

ПФОС – перфторорганическое соединение

ПЭЧ – порог электрической чувствительности

РПЭ – ретинальный пигментный эпителий

СТ – стекловидное тело

ЭРГ – электроретинография

ЭФИ – электрофизиологические исследования

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анджелова, Д.В. Эффективность ферментотерапии при гемофтальме / Д.В. Анджелова // Вестн. офтальмол. – 2010. – № 6. – С. 32-34.
2. Анджелова, Д.В. Гемофтальм у больных с гипертонической болезнью / Д.В. Анджелова // Вестн. офтальмол. – 2005. – № 4 – С. 28-30.
3. Антелава, Н.Д. Клиника и лечение пролиферативной витреоретинопатии при регматогенной отслойке сетчатой оболочки: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Николай Джимшемирович Антелава. – М., 1998. – 22 с.
4. Балашова, Л.М. Морфологические особенности витреоретинальной пролиферации, осложняющей дистрофическую отслойку сетчатки, и экспериментальное моделирование / Л.М. Балашова, В.Ю. Евграфов // Вестн. офтальмол. – 1995. – Т. 111, № 2. – С. 37-39.
5. Берченко, Г.Н. Сопоставление гистохимических, ультраструктурных и биохимических данных при репаративном гистогенезе соединительной ткани / Г.Н. Берченко, Т.М. Ильина // Экспериментально-клинические аспекты репаративных процессов и методы их стимулирования: сб. науч. работ. – М., 1977. – С. 52-57.
6. Бобро, Л.И. Фибробласты и их значение в тканевых реакциях / Л.И. Бобро // Арх. патол. – 1990. – Т. 52, № 12. – С. 65-68.
7. Виноградов, В.В. Формирование межклеточного вещества соединительной ткани в процессе её гистогенеза и репаративной регенерации: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Виноградов Владимир Викторович – Новосибирск, 1969. – 12 с.
8. Волков, В.В. Новые аспекты патогенеза, лечения и профилактики отслойки сетчатки / В.В. Волков, Р.Л. Трояновский // Актуальные проблемы офтальмологии / Под ред. М.М. Краснова, А.П. Нестерова, С. Дыбова. – М.: Медицина. – 1981. – С. 140-171.

9. Гаджиев, Р.В. Отслойка стекловидного тела в патогенезе диабетической ретинопатии / Р.В. Гаджиев // Офтальмохирургия. – 1992. – № 2. – С. 48-52.
10. Глинчук, Я.И. Хирургическое лечение гемофтальмов и помутнений стекловидного тела методом закрытой витрэктомии: дис. канд. ... мед. наук / Глинчук Ярослав Иосифович. – М., 1975. – 346 с.
11. Гундорова, Р.А. Травмы глаза / Р.А. Гундорова, А.А. Малаев, А.М. Южаков. – М.: Медицина, 1986. – 368 с.
12. Даниличев, В.Ф. Офтальмология энзимотерапия и экстракорпоральная гемокоррекция / В.Ф. Даниличев. – 2-е изд., доп. – СПб., 2002. – 310 с.
13. Даниличев, В.Ф. Протеолитическая энзимотерапия при патологии глаз: метод, рекомендации / В.Ф. Даниличев, Г.Ю. Кнорринг. – СПб., 2005. – С. 32.
14. Даниличев, В.Ф. Патология глаз, ферменты и ингибиторы / В.Ф. Даниличев. – СПб.: Стройпечать, 1996. – 235 с.
15. Даниличев, В.Ф. Обоснование и эффективность применения протеолитических ферментов при патологии глаза: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Даниличев Виктор Федорович. – Л., 1983. – 21 с.
16. Даниличев, В.Ф. Патология глаз, ферменты и ингибиторы / В.Ф. Даниличев. – СПб.: Стройпечать, 1996. – С. 122, С. 179.
17. Даниличев, В.Ф. Травмы и заболевания глаз: Применение ферментов и пептидных регуляторов / В.Ф. Даниличев, И.Б. Максимов. – Минск: Наука и техника, 1994. – 223 с.
18. Даниличев, В.Ф. Протеолитические ферменты в терапии повреждений и заболеваний глаз / В.Ф. Даниличев. – Л., 1980. – 210 с.
19. Думброва, Н.Е. Современные данные о структуре и функциях пигментного эпителия сетчатки / Н.Е. Думброва, Н.И. Нестерук // Офтальмол. журн. – 1991. – № 4. – С. 243-246.
20. Евграфов В.Ю. Внутриглазные кровоизлияния диабетического генеза: современные представления о патогенезе и ферментотерапия /

В.Ю. Евграфов, Ж.Ю. Алябьева // Вестн. офтальмол. – 1995. – Т. 111., № 4. – С. 35-37.

21. Замыслова, Т.И. Биологические и физико-химические свойства лечебного препарата коллагеназы: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Замыслова Тамара Ивановна. – Л., 1978. – 24 с.

22. Запускалов, И.В. Наш опыт лечения пролиферативной диабетической ретинопатии с применением коллализина (клинические случаи) / И.В. Запускалов, К.А. Назаренко, А.А. Березовская // Офтальмохирургия. – 2006. – № 2. – С. 37-40.

23. Захаров, В.Д. Витреоретинальная хирургия / В.Д. Захаров – М., 2003. – 102 с.

24. Захаров, В.Д. Способ удаления кортикальных слоев стекловидного тела в процессе витрэктомии / В.Д. Захаров, Г.Н. Тагиев // Офтальмохирургия. – 2013. – № 1. – С. 18-21.

25. Игнатьев, С.Г. К вопросу о классификации клинического состояния стекловидного тела / С.Г. Игнатьев // II Евро-Азиатская конференция по офтальмохирургии. – Екатеринбург, 2001. – С. 316-317.

26. Касавина, Б.С. Роль ферментов в патогенезе, диагностике и терапии заболевания органов зрения / Б.С. Касавина, Т.П. Кузнецова // Вестн. офтальмол. – 1977. – № 4. – С. 85-88.

27. Кочмала, О.Б. Посттравматические пролиферативные процессы в глазу: их патогенетические аспекты и хирургическое лечение / дис. ... д-ра мед. наук / Кочмала Олег Борисович – Красноярск, 2011. – 209 с.

28. Краснов, М.М. Заднегиалоидная мембрана как структурная основа роста новообразованной ткани при пролиферативной диабетической ретинопатии / М.М. Краснов, С.В. Сдобникова, А.А. Федоров // Вестн. офтальмол. – 1998. – Т. 114, № 3. – С. 16-20.

29. Краснов, М.М. Интравитреальное ферментное лечение помутнений стекловидного тела: метод, рекомендации / М.М. Краснов, Г.М. Ларюхина. – М., 1995. – 27 с.

30. Краснов, М.М. Эффективность применения протеолитических ферментов при экстракапсулярной экстракции катаракты / М.М. Краснов, М.Л. Двали, Г.С. Полунин и др. // Вестн. офтальмол. – 1990. – № 5. – С.8-12.

31. Кривошеева, О.И. Клеточные механизмы развития пролиферативной витреоретинопатии (экспериментально-клиническое исследование): автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Кривошеева Ольга Ивановна – Томск, 2004. – 251 с.

32. Куглеев, А.А. Лечение больных с кровоизлиянием в стекловидное тело и их последствиями электрофорезом с коллалазином / А.А. Куглеев // 4-й Всероссийский съезд офтальмологов: тез докл. – Л., 1981. – Т. 1. – С. 15-16.

33. Лебедев, О.И. Регуляция репаративных процессов при антиглаукоматозной хирургии с помощью коллалазина / О.И. Лебедев // Вестн. офтальмол. – 1989. – № 3. – С. 4-6.

34. Лозинская, О.Л. Ферментная деструкция внутренней пограничной мембраны сетчатки в хирургическом лечении макулярного разрыва / О.Л. Лозинская, П.В. Лыскин, М.Г. Назарян, Х.П. Тахчиди, В.Д. Захаров // Сборник тезисов V Научно-практической конференции «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии». – М., 2007. – С.141-112.

35. Лыскин, П.В. «Бесциркляжная» тактика хирургического лечения отслоек сетчатки / П.В. Лыскин // Офтальмохирургия. – 2002. – № 2. – С.24-27.

36. Лыскин, П.В. Патогенетические различия регматогенных отслоек сетчатки / П.В. Лыскин // Сборник тезисов VI Научно-практической конференции «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии». – М., 2008. – С.110-112.

37. Лыскин, П.В. Первичная механическая и биохимическая витректомия в бесциркляжной хирургии отслойки сетчатки / П.В. Лыскин // Сборник тезисов V Научно-практической конференции «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии». – М., 2007. – С.145-148.

38. Лыскин, П.В. Ферментный «пилинг» внутренней пограничной мембраны в хирургии макулярных отверстий / П.В. Лыскин, О.Л. Лозинская //

Сборник тезисов V Всероссийского семинара «Макула». – 2012. – С.293-298.

39. Макаров, И.А. Сравнительное изучение эффективности современных протеолитических препаратов при лечении травматических иридоциклитов / И.А. Макаров // Вестн. офтальмол. – 2003. – № 3. – С. 37-41.

40. Мазуров, В.И. Биохимия коллагеновых белков / В.И. Мазуров. – М., 1974. – 260 с.

41. Махачева, З.А. Анатомия стекловидного тела / З. А. Махачева // Офтальмохирургия. – 1994. – № 2. – С. 38-42.

42. Махачева, З.А. Стекловидное тело: новые анатомо-физиологические данные: Лекция для врачей-офтальмологов, интернов, клинических ординаторов / З.А. Махачева. – М.: Изд-во МНТК «Микрохирургия глаза», 1996. – 11 с.

43. Махачева, З.А. Анатомические особенности стекловидного тела и витреоретинального интерфейса в патологии заднего отрезка глаза / З.А. Махачева // Проллиферативный синдром в офтальмологии. – М., 2002. – С. 8-9.

44. Махачева, З.А. Новые методы исследования стекловидного тела в изолированных глазах: Учеб.-методическое пособие / З.А. Махачева. – М.: Изд-во МНТК «Микрохирургия глаза». – 1996. – 7 с.

45. Марри, Р. Биохимия человека / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэлл. – М., 1993. – Т. 1. – 384 с.

46. Морозов, В.И. Первый опыт использования коллагеназы при заболеваниях роговицы / В.И. Морозов, Б.С. Касавина, С.Н. Золотов, И.А. Зеленская // Вестн. офтальмол. – 1972. – № 1. – С. 47-50.

47. Назаренко, К.А. Эффективность эпиретинального метода введения ферментного препарата коллалазина при пролиферативной диабетической витреоретинопатии: дис. ... канд. мед. наук / Назаренко Ксения Александровна. – Томск, 2006. – 126 с

48. Назарян, М.Г. Экспериментально-клиническое исследование травматичности удаления кортикальных слоев стекловидного тела

механическим и гидроделаминационным методами: дис. ... канд. мед. наук / Назарян Марина Грачиковна. – М., 2009. – 89 с.

49. Нарбут, Н.П. Эффективность применения ферментов в лечении токсико-аллергических реакций после экстракции катаракты с имплантацией интраокулярных линз / Н.П. Нарбут, С.М. Нуриева // Вестн. офтальмол. – 1998. – № 5. – С. 21-23.

50. Нахабина, Т.П. Фонофорез коллализина в лечении больных с помутнением роговицы / Т.П. Нахабина, А.Я. Новик // 8-й Съезд офтальмологов Украинской ССР: тез. докл. – Одесса, 1990. – С. 316-317.

51. Павленко, О.А. Наш опыт применения коллализина / О.А. Павленко // Офтальмол. журн. – 1986. – № 3. – С. 188.

52. Полунин, Г.С. Основные направления ферментотерапии в офтальмологии / Г.С. Полунин // Тез. докл. IV Всерос. съезда офтальмологов. – М, 1982. – С. 424- 425.

53. Полунин, Г.С. Показания и способы ферментотерапии в офтальмологической практике : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Полунин Геннадий Серафимович – М., 1990. – 21 с.

54. Полунин, Г.С. Применение коллализина в офтальмологии / Г.С. Полунин, И.А. Кулиева // Вестн. офтальмол. – 2000. – № 3. – С. 45-47.

55. Сдобникова, С.В. Роль задней гиалоидной мембраны в патогенезе и трансцилиарной хирургии пролиферативной диабетической ретинопатии / С.В. Сдобникова, Г. Е. Столяренко // Вестн. офтальмол. – 1999. – № 1. – С. 11-15.

56. Сдобникова, С.В. Особенности течения пролиферативного процесса при диабетической ретинопатии, осложненного гиалошизисом / С.В. Сдобникова, Г.Е. Столяренко, А.А. Федоров // Проллиферативный синдром в офтальмологии. – М., 2000.- С. 17-18.

57. Серов, В.В. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология) / В.В. Серов, А.Б. Шехтер. – М.: Медицина, 1981. – 312 с.

58. Ситковский, Н.Б. Ингибиторы протеолиза в хирургии детского возраста /Н.Б. Ситковский, Г.С. Ханес, Т.А. Куценко. – Киев: Здоров'я, 1977. –

86 с.

59. Старков, Г.Л. Патология стекловидного тела / Г.Л. Старков. – М.: Медицина, 1967. – 200 с.

60. Старков, Г.Л. Ферментотерапия в офтальмологии / Г.Л. Старков, В.И. Савиных // Тез. докл. – Кемерово, 1977. – С. 42-43.

61. Тахчиди, Х.П. Избранные разделы микрохирургии глаза / Х.П. Тахчиди. – М., 2002. – С. 32-35.

62. Тахчиди, Х.П. Ферментная витрэктомия в лечении идиопатических макулярных разрывов / Х.П. Тахчиди, П.В. Лыскин, О.Л. Лозинская, А.В. Шипунова, В.А. Письменская, Н.В. Перова, А.Л. Кайшева, В.А. Егорова // Современ. технологии лечения витреоретинальной патологии. – М., 2009. – С. 166-168.

63. Хорошилова-Маслова, И.П. Посттравматическая пролиферативная витреоретинопатия (экспериментальное моделирование) / И.П. Хорошилова-Маслова, О.А. Киселева, Л.В. Илатовская // Ожоги глаз и их последствия – М., 1997. – С. 74-76.

64. Хорошилова-Маслова, И.П. Проблема цитопатогенеза пролиферативной витреоретинопатии и возможности ее обоснованной медикаментозной профилактики / И.П. Хорошилова-Маслова, Е.О. Саксонова, Л.В. Илатовская // Современные технологии лечения витреоретинальной патологии – М., 2002. – С.284-287.

65. Хорошилова-Маслова, И.П. Пептид клеточной адгезии в профилактике ПВР / И.П. Хорошилова-Маслова, М.А. Бабижаев, С.А. Киселева // Вестн. офтальмол.– 1997.– № 4.– С. 27-31.

66. Черкасов, И.С. Лечение коллализином внутриглазных кровоизлияний / И.С Черкасов, В.А. Пашковская, А.Я. Новик // Офтальмол. журн. – 1980. – № 5. – С. 289-290.

67. Шехтер, А.Б. Экспериментально - морфологическое обоснование применения коллагена в медицине : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Шехтер Анатолий Борисович. – М., 1971. – 21 с.

68. Шехтер, А.Б. Фибробласты и развитие соединительной ткани: ультраструктурные аспекты биосинтеза, фибриллогенеза и катаболизма коллагена / А.Б. Шехтер, Г.Н. Берченко // *Арх. патол.* – 1978. – Т. 40, № 8. – С. 70-80.
69. Шехтер, А.Б. Макрофагально-фибробластическое взаимодействие и его возможная роль в регуляции метаболизма коллагена при заживлении ран / А.Б. Шехтер // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* – 1977. – № 5. – С.627-630.
70. Шехтер, А.Б. Воспаление, адаптивная регенерация и дисрегенерация (анализ межклеточных взаимодействий) / А.Б. Шехтер, В.В. Серов // *Арх.патологии.* – 1991. – Т. 53, № 7. – С. 7-14.
71. Шишкин, М.М. Передняя пролиферативная витреоретинопатия (патогенез, лечение, профилактика): автореф. дис. д-ра мед. наук / Шишкин Михаил Михайлович. – СПб., 2000. – 51 с.
72. Норман, К.С. Экспериментальное обоснование использования миниплазмينا с целью индукции задней отслойки стекловидного тела: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Норман Кирилл Сергеевич. – М.:, 2012. – 22 с.
73. Шульпина, Н.Б. Биомикроскопия глаза / Н.Б. Шульпина. – М.: Медицина, 1974. – 288 с.
74. Якименко, С.А. Фонофорез протеолитических ферментов лекозима и коллалазина в комплексной терапии ожогов глаз / С.А. Якименко, Р.И. Чаланова // *Офтальмол. журн.* – 1990. – № 6. – С. 321-325.
75. Albini, T. Long-term Retinal Toxicity of Intravitreal Commercially Available Preserved Triamcinolone Acetonide (Kenalog) in Rabbit Eyes / T. Albini, M. Abd-El-Barr, P.E. Carvounis, M.N. Iyer, R.R. Lakhanpal, M.E. Pennesi, P. Chevez-Barrios, S.M. Wu, E.R. Holz // *Invest. Ophthalmol.* – 2007. – Vis. Sci. 48. – P. 390-395.
76. Ambati, J. Postoperative complications of scleral buckling surgery / J. Ambati, J.G. Arroyo // *Int. Ophthalmol. Clin.* – 2000. – Winter Vol. 40 – № 1 – P. 175-85.
77. Bailey, A. Structure, function and ageing of the collagens of the eye /

A. Bailey // *Eye*. – 1992. – Vol. 24. – P. 175-181.

78. Balazs, E.A. Studies on the structure of the vitreous body / E.A. Balazs, L.Z. Toth, E.A. Eckl, A.P. Mithcell // XII Cytological and histochemical studies on the cortical tissue layer // *Exp. Eye Res.* – 1964. – Vol. 3. – P. 57-71.

79. Balazs, E.A. Aging changes in the vitreous / E.A. Balazs, J.L. Denlinger // *Aging and human visual function*. – New York: Alan R Liss, 1982. – P.45-57.

80. Balazs, E.A. Physiology of the vitreous body / Importance of the vitreous body in retinal surgery with special emphasis on re-operation. – St Louis: CV Mosby, 1960. – P.29-57.

81. Balazs, E.A., Sebag J. Morphology and ultrastructure of human vitreous fibers / E.A. Balazs, J. Sebag // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1989. – Vol. 30. – № 8. – P. 1867-1871.

82. Balazs, E.A. The vitreous // *Int. Ophthalmol. Clin.* – 1973. – Vol. 13. – № 3. – P. 169-187.

83. Baudouin, C. Immunohistologic study of proliferative vitreoretinopathy / C. Baudouin, D. Fredj-Reygrobellet, F. Baudouin // *Am. J. Ophthalmol.* – 1989. – Vol. 108. – № 4. – P. 387-394.

84. Baudouin, C. Immunocytology of cellular components in vitreous and subretinal fluid from patients with proliferative vitreoretinopathy / C. Baudouin, P. Hofman, F. Brignole et al. // *Ophthalmologica*. – 1991. – Vol. 203. – P. 38-46 .

85. Baudouin, C. Immunopathologic study of retinal detachment with vitreoretinal proliferation / C. Baudouin, D. Fredj-Reygrobellet, D. Jambou // *Ophthalmology*. – 1989. – Vol. 96, № 1. – P. 22-25.

86. Benz, M.S. A placebo-controlled trial of microplasmin intravitreal injection to facilitate posterior vitreous detachment before vitrectomy / M.S. Benz, K.H. Packo, V. Gonzalez et al. // *Ophthalmology*. – 2010. – Vol. 117. – № 4. – P. 791–797.

87. Bhisitkul, R.B. Anticipation for enzymatic vitreolysis. / R.B. Bhisitkul // *Br. J. Ophthalmol.* – 2001. – Vol. 85. – P. 1-3.

88. Bishop, P.N. The biochemical structure of mammalian vitreous / P.N. Bishop // *Eye (Lond)*. – 1996. – Vol. 10 – Pt. 6. – P.664-670.
89. Bishop, P.N. Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel / P.N. Bishop // *Prog. Retin. Eye. Res.* – 2000. – Vol. 19 – P. 323-344.
90. Bishop, P.N. Identification of alternatively spliced variants of type II procollagen in vitreous / P.N. Bishop, A.J. Reardon, D. McLeod, S. Ayad // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1994. – P.289-295.
91. Bishop, P.N. Age-related changes on the surface of vitreous collagen fibrils / P.N. Bishop, D.F. Holmes, K.E. Kadler, D. McLeod, K.J. Bos // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2004. – Vol. 45. – № 4 – P. 1041-1046.
92. Bishop, P.N. Effects of hyaluronan lyase, hyaluronidase, and chondroitinase on mammalian vitreous gel / P.N. Bishop, D. McLeod, A. Reardon // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1999. – Vol. 40. – № 10. – P. 2173–2178.
93. Blumencranz, M.S. Evidence for cell specificity in proliferative vitreoretinopathy / M.S. Blumencranz, A. Hajek, N. Sossi // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1984. – Vol. 5. – P. 272.
94. Bonnet, M. Surgical risk factors for severe postoperative proliferative vitreoretinopathy in retinal detachment with grade B PVR / M. Bonnet, S. Guenoun // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 1995. – P. 789-791.
95. Bos, K.J. Axial structure of the heterotypic collagen fibrils of vitreous humour and cartilage / K.J. Bos, D.F. Holmes, K.E. Kadler, D. McLeod, N.P. Morris, P.N. Bishop // *J. Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 306. – P. 1011–1022.
96. Brewton, R.G. Mammalian vitreous humor contains networks of hyaluronan molecules: electron microscopic analysis using the hyaluronan-binding region (G1) of aggrecan and link protein / R.G. Brewton, R. Mayne // *Exp. Cell. Res.* – 1992. – Vol. 198. – P. 237-249.
97. Burk, S.E. Indocyanine green-assisted peeling of the retinal internal limiting membrane / S.E. Burk, A.P. Da Mata, M.E. Snyder, R.Jr. Rosa, R.E. Foster // *Ophthalmol.* – 2000. – Vol. 107. – P. 2010-2014.

98. Campochiaro, P.A. The retinal pigmented epithelium and retinal wound repair / P.A. Campochiaro // *Basin. Vis. Sci. Symp.* – 1996. – № 2. – P. 28-34.
99. Campochiaro, P.A. Retinoic acid promotes densitydependent growth arrest in human retinal pigment epithelial cells / P.A. Campochiaro, S.F. Hackett, B.P. Conway // *Invest. Ophthalmol.Vis. Sci.* – 1991. – Vol. 32. – P. 66-72.
100. Campochiaro, P.A. Pathogenic mechanisms in proliferative vitreoretinopathy / P. A. Campochiaro // *Arch. Ophthalmol.* – 1997. – Vol. 115, № 2. – P. 237-241.
101. Charles, S. Vitreous microsurgery / S. Charles // 2-nd ed. – Baltimor, 1987. – P.73-78.
102. Carsten, H.M. Chromovitrectomya new field in vitreoretinal surgery / H.M. Carsten, K. Peter, E.B. Rodrigues // *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.* – 2005. – Vol. 243, № 4. – P. 291-293.
103. Charteris, D.G. Proliferative vitreoretinopathy. Lymphocytes in epiretinal membranes / D.G. Charteris, P. Hiscott, I. Grierson // *Ophthalmology.* – 1992. – Vol. 99, № 9. – P. 1364-1367.
104. Charteris, D.G. Proliferative vitreoretinopathy: pathobiology, surgical management and adjunctive treatment / D.G. Charteris // *Br. J. Ophthalmol.* – 1995. – Vol. 79. – P. 953-960.
105. Charteris, D.G. Proliferative vitreoretinopathy developments in adjunctive treatment and retinal pathology / D.G. Charteris, C.S. Sethi, G.P. Lewis et al. // *Eye.* – 2002. – Vol. 16. – P. 369-374.
106. Chen, C.H. Studies on the soluble proteins of vitreous in experimental animals / C.H. Chen, S.C. Chen // *Exp. Eye Res.* – 1981. – Vol. 32. – P. 381-388.
107. Chen, W. Enzymatic vitreolysis with recombinant microplasminogen and tissue plasminogen activator / W. Chen, X. Huang, X.W. Ma, W. Mo, W.J. Wang, H.Y. Song // *Eye (Lond).* – 2008. – Vol. 22, № 2. – P. 300-307.
108. Dyer, D. Clinical Evaluation Of The Safety And Efficacy Of Preservative-Free Triamcinolone (Triesence(R) [Triamcinolone Acetonide Injectable Suspension] 40 Mg/Ml) For Visualization During Pars Plana Vitrectomy / D. Dyer,

D. Callanan, T. Bochow, P. Abraham, H.M. Lambert, S.Y. Lee, T. Schneiderman, S.L. Potts, T.M. Walker // *Retina*. – 2009. – Vol. 29 (1). – P. 38-45.

109. Faulborn, J. Combined macroscopic, light macroscopic, scanning and transmission investigation of the vitreous body. The anterior vitreous cortex / J. Faulborn, S. Bowald // *Ophthalmic Res.* – 1982. – Vol. 14. – P. 117-123.

110. Fine, B.S. Limiting membranes of the sensory retina and pigment epithelium: an electron microscope study / B.S. Fine, A.J. Tousimus // *Arch. Ophthalmol.* – 1961. – Vol. 66. – P. 847-860.

111. Gandorfer, A. Ultrastructure of the vitreoretinal interface following plasmin assisted vitrectomy / A. Gandorfer, E. Putz, U. Welge-Lussen, M. Gruterich, M. Ulbig, A. Kampik // *Br. J. Ophthalmol.* – 2001. – January, Vol.85, № 1. – P. 6-10.

112. Gandorfer, A. Posterior vitreous detachment induced by microplasmin / A. Gandorfer, M. Rohleder, C. Sethi et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2004. – Vol. 45, №2. – P. 641-647.

113. Gartner, J. Vitreous electron microscopic studies on the fine structure of the normal and pathologically changed vitreoretinal limiting membrane / J. Gartner // *Surv. Ophthalmol.* – 1964. – Vol. 9. – P. 291-294.

114. Gartner, J. Electron microscopic study on the fibrillar network and fibrocyte-collagen interactions in the vitreous cortex at the ora serrata of human eyes with special regard to the role of disintegrating cells / J. Gartner // *Exp. Eye. Res.* – 1986. – Vol. 42. – P. 21-33.

115. Gottlieb, J.L. The safety of intravitreal hyaluronidase. A clinical and histologic study / J.L. Gottlieb, A.N. Antoszyk, D.L. Hatchell, P. Saloupis // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1990. – Vol. 31. – № 11. – P. 2345-2352.

116. Gumbiner, B. The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis / B. Gumbiner // *Cell adhesion* – 1996. – Vol. 84. – P. 345.

117. Haimovici, R. A new model for rhegmatogenous retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy / R. Haimovici, C. M. Yana, E. Hernandez // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1991. – Vol. 32, № 4. – P. 769.

118. Han, D. Surgical excision of the attached posterior hyaloids / D. Han,

G.W. Abrams, T.M. Aaberg // Arch. Ophthalmol. – 1988. – Vol. 106. – P. 998-1000.

119. Haritoglou, C. The effect of indocyanine-green on functional outcome of macular pucker surgery / C. Haritoglou, A. Gandorfer, C.A. Gass, M. Schaumberger, M.W. Ulbig, A. Kampik // Am J Ophthalmol – 2003. – Vol. 135. – P. 328-337.

120. Harris, E.D. Ultrastructure of epiretinal membrane causing retinal starfold / E.D. Harris, S.M. Krane // New Engl. J. Med. – 1974. – Vol. 225. – P. 1565.

121. Hartnett, M.E. Effects of growth factors and cell-cell interaction on bloodretinal barrier function / M.E. Hartnett, C.M. Garcia // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2000. – Vol. 41, № 4. – P. 411.

122. Heegaard, S. Morphology of the vitreoretinal border region / S. Heegaard // Acta. Ophthalmol. Scand. Suppl. – 1997. – № 222. – P. 1-31.

123. Heegaard, S. Structure of the human vitreoretinal border region / S. Heegaard // Ophthalmologica. – 1994. – Vol. 208, № 2. – P. 82-91.

124. Heidemkummer, H.P. Morphologic analysis of epiretinal membranes in surgically treated idiopathic macular foramina. Results of light and electron microscopy/ H.P. Heidemkummer, A. Kampik // Ophthalmology. – 1996. – Vol. 102, № 6. – P. 675-679.

125. Heimann, H. Scleral buckling versus primary vitrectomy in regmatogenous retinal detachment (a prospective randomized multicenter clinical study) / H. Heimann, K.U. Bartz-Shmidt, N. Bornfeld et al. // Ophthalmology. – 2007. – Vol. 114, № 12. – P. 2142-2154.

126. Hikichi, T. Intravitreal injection of hyaluronidase cannot induce posterior vitreous detachment in the rabbit / T. Hikichi, M. Kado, A. Yoshida // Retina. – 2000. – Vol. 20, № 2. – P. 195-198.

127. Hiscott, P. Matrix and the retinal pigment epithelium in proliferative retinal disease / P. Hiscott, C. Sheridan, R.M. Magee et al. // Prog Retin Eye Res. – 1999. – Vol. 18. – P. 167-190.

128. Hudson, B.G. Type IV collagen: Structure, gene organization, and role

in human diseases / B.G. Hudson, S.T. Reeders, K. Tryggvason // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268. – P. 26033-26036.

129. Jaffe, N.S. *The vitreous in clinical ophthalmology* / N.S. Jaffe. – St. Louis: C.V. Mosby Company, 1969. – P. 310.

130. Jamper, J.M. Electron immunocytochemical analysis of posterior hyaloid associated with diabetic macular edema / J.M. Jamper, S.M. Embabi, C.A. Toth et al. // *Retina.* – 2000. – Vol. 20. – P. 63-68.

131. Jorge, R. Intravitreal injection of dispase causes retinal hemorrhages in rabbit and human eyes / R. Jorge, E.K. Oyamaguchi, J.A. Cardillo, A. Gobbi, E.M. Laicine, A. Haddad // *Curr Eye Res.* – 2003. – Vol. 26, № 2. – P.107-112.

132. Kennedy, A. Proliferative response and macromolecular synthesis by ocular cells cultured on extracellular matrix materials / A. Kennedy, R.N. Frank // *Curr. Eye Res.* – 1990. – Vol. 9, № 4. – P. 307-322.

133. Kirchhof, B. Vitreous modulation of migration and proliferation of retinal pigment epithelial cells in vitro / B. Kirchhof, E. Kirchhof // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1989. – Vol. 30, № 9. – P. 1951-1957.

134. Kohno, T. Immunofluorescent studies of the fibronectin and laminin in the human eye / T. Kohno, N. Sorgente, T. Ishibashi // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1987. – Vol. 28. – P. 506-514.

135. Kon, C.N. Risk factors for proliferative vitreoretinopathy after primary vitrectomy: a prospective study / C.N. Kon, R.H. Asaria et al. // *J Ophthalmol.* – 2000. – Vol. 84. – P.506-511.

136. Koyama, N. Migratory and proliferative effect of platelet-derived growth factor in rabbit retinal endothelial cells: evidence of an autocrine pathway of platelet-derived growth factor / N. Koyama, S. Watanabe, M. Tezuka // *J. Cell.Physiol.* – 1994. – Vol. 19, № 3. – P. 85-90.

137. Kreissig, I. Surgical techniques for repair of primary retinal detachment: Part II. Comparison of present techniques in relation to morbidity / I. Kreissig // *Folia Med (Plovdiv).* – 2010. – Jan-Mar, Vol. 52, № 1. – P. 5-11.

138. Lane, J.I. Retinal detachment: imaging of surgical treatments and complications / J.L. Lane, R.E. Jr. Watson, R.J. Witte, C.A. McCannel // *Radiographics*. – 2003. – Jul-Aug, Vol. 23, № 4. – P. 983-994.
139. Le Goff, M.M. Adult vitreous structure and postnatal changes / M.M. Le Goff, P.N. Bishop // *Eye*. – 2008. – Vol. 22 – P. 1214-1222.
140. Lee, B. Rheology of the vitreous body. III. Concentration of electrolytes, collagen and hyaluronic acid / B. Lee, M. Litt, G. Buchsbaum // *Biorheology*. – 1994. – Vol. 31. – P. 339-51.
141. Leibovich, S.J. The macrophage and the fibroblast / S.J. Leibovich, R. Ross // *Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology* / Eds. R. Van Furth. – Oxford: Blackwell, 1975. – P. 347-354.
142. Machemer, R. A new concept for vitreous surgery. 1. Instrumentation / R. Machemer, J.M. PareI, H. Buetter // *Am. J. Ophthalmol.* – 1972. – Vol. 73. – P. 1-7.
143. Machemer, R. Proliferative vitreoretinopathy (PVR) – A personal account of its pathogenesis and treatment / R. Machemer // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1988. – Vol. 29, № 12. – P. 1771-1783.
144. Mayne, R. Isolation and characterization of the chains of type V/type XI collagen present in bovine vitreous / R. Mayne, R.G. Brewton, P.M. Mayne, J.R. Baker // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268. – P. 9381-9386.
145. Malcaze, F. Some ultrastructural aspects of the vitreoretinal juncture / F. Malcaze, C. Caratero, A. Caratero // *Ophthalmologica*. – 1984. – Vol. 191, № 1. – P. 22-28.
146. Milagros, H.A. Silicone oil as a delivery vehicle for BCNU in rabbit proliferative vitreoretinopathy / H.A. Milagros, F.R. Miguel et al. // *Retina*. – 1993. – Vol. 13. – P. 245-250.
147. Miller, B. Retinal wound healing. Cellular activity at the vitreoretinal interface / B. Miller, H. Miller, R. Patterson // *Arch. Ophthalmol.* – 1986. – Vol. 104, № 2. – P. 281-285.

148. Mitry, D. Pathogenesis of rhegmatogenous retinal detachment: predisposing anatomy and cell biology / D. Mitry, B.W. Fleck, A.F. Wright, H. Campbell, D.G. Charteris // *Retina*. – 2010. – Vol. 30, № 10. – P.1561-1572.
149. Mitry, D. The fellow eye in retinal detachment: findings from the Scottish Retinal Detachment Study / D. Mitry, J. Singh, D. Yorston, M.A. Rehman Siddiqui, A.L. Murphy, A.F. Wright, B.W. Fleck, H. Campbell, D.G. Charteris // *Br. J. Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 96, № 1. – P. 110-113.
150. Moorhead, L.C. Bacterial collagenase. Proposed adjunct to vitrectomy with membranectomy / L.C. Moorhead, D.A. Redburn, D.S. Kirkpatrick, F. Kretzer // *Arch. Ophthalmol.* – 1980. – Vol.98, № 10. – P. 1829-1839.
151. Moorhead, L.C. Enzyme-assisted vitrectomy with bacterial collagenase. Time course and toxicity studies / L.C. Moorhead, H.H. Chu, C.A. Garcia // *Arch. Ophthalmol.* – 1983. – Vol. 101, № 2. – P. 265-274.
152. Moorhead, L.C. Enzyme-assisted vitrectomy with bacterial collagenase. Pilot human studies / L.C. Moorhead, N. Radtke // *Retina*. – 1985. – Vol. 5, № 2. – P. 98-100.
153. Nork, T.M. Immunocytochemical study of an eye with proliferative vitreoretinopathy and retinal tacks / T.M. Nork, I.H. Wallow, S.J. Sramek // *Retina*. – 1990. – Vol. 10, № 1. – P. 78-85.
154. Oliveira, L.B. Dispase facilitates posterior vitreous detachment during vitrectomy in young pigs / L.B. Oliveira, M. Tatebayashi, T.H. Mahmoud, S.M. Blackmon, F. Wong, B.W. McCuen // *Retina*. – 2001. – Vol. 21, № 4. – P. 324-331.
155. O'Neill, R. The effects of bacterial collagenase in rabbit vitreous / R. O'Neill, M. Shea // *Can. J. Ophthalmol.* – 1973. – Vol.8, № 2. – P. 366-370.
156. Pedler, C. The ILM of retina / C. Pedler // *Br. J. Ophthalmol.* – 1961. – Vol. 45. – P. 423-438.
157. Polverini, P.J. Activated macrophages induce vascular proliferation / P. J. Polverini, R.S. Cotran, M.A. Gimbrone // *Nature*. – 1977. – Vol. 269, № 5570. – P. 804.
158. Quiroz, H. Enzymatically induced posterior vitreous detachment

[abstract]. / H. Quiroz, S.M. Buzney, H. Furukawa et al. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1984. – Vol. 25(Suppl). – P. 307.

159. Rizzo, S. Autologous plasmin for pharmacologic vitreolysis prepared 1 hour before surgery / S. Rizzo, G. Pellegrini, F. Benocci, C. Belting, U. Baicchi, M. Vispi // *Retina.* – 2006. – Vol. 26, № 7. – P. 792-796.

160. Rodrigues, E.B. Mechanisms of intravitreal toxicity of indocyanine green dye: implications for chromovitrectomy / E.B. Rodrigues, C.H. Meyer, S. Mennel, M.E. Farah // *Retina.* – 2007. – Vol. 27 (7). – P. 958-970.

161. Sakuma, T. Safety of in vivo pharmacologic vitreolysis with recombinant microplasmin in rabbit eyes / T. Sakuma, M. Tanaka, A. Mizota, J. Inoue, S. Pakola // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2005. – Vol. 46, № 9. – P. 3295-3299.

162. Scott, J.E. Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape / J.E. Scott // *J. Anat.* – 1995. – Vol. 187. – Pt. 2. – P. 259-69.

163. Sebag, J. The vitreous: structure, function, and pathobiology / J. Sebag // New York: Springer-Verlag, 1989. – P. 173.

164. Sebag, J. Age-related differences in the human vitreoretinal interface / J. Sebag // *Arch Ophthalmol.* – 1991. – Vol. 109, № 7. – P. 966-971.

165. Sebag, J. Vitreoschisis / J. Sebag // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2008. – Vol. 246, № 3. – P. 329-32.

166. Sebag, J. Age related changes in human vitreous structure / J. Sebag // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 1987. – Vol. 225. – P. 89-93.

167. Sebag, J. Morphology and ultrastructure of human vitreous fibers / J. Sebag, E.A. Balazs // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1989. – Vol. 30, № 8. – P. 1867-1871.

168. Sebag, J. Structure, function and age-related changes of the human vitreous / J. Sebag // *Bull. Soc. Belge Ophthalmol.* – 1987. – Vol. 223. – P. 37-57.

169. Sebag, J. Anomalous posterior vitreous detachment: a unifying concept in vitreo-retinal disease / J. Sebag // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 2004. – Vol. 242, № 8. – P. 690-698.

170. Sebag, J. Pharmacologic vitreolysis – permise and promise of the first decade / J. Sebag // *Retina.* – 2009. – Vol. 29, № 7. – P. 871–874.
171. Sebag, J. Pharmacologic vitreolysis / J. Sebag // *Retina.* – 1998. – Vol. 18, № 1. – P. 1-3.
172. Sebag, J. Molecular biology of pharmacologic vitreolysis / J. Sebag // *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* – 2005. – Vol. 103. – P. 473-494.
173. Sebag, M. Epiretinal membrane surgery assisted by trypan blue / M. Sebag, M. Perrier // *Am. J. of Ophthalmology.* – 2003. – Vol. 135. – Is. 6. – P. 909-911.
174. Sebag, J. Is pharmacologic vitreolysis brewing? / J. Sebag // *Retina.* – 2002. – Vol. 22, № 1. – P. 1-3.
175. Schaal, S. Primary retinal detachment repair: comparison of 1-year outcomes of four surgical techniques / S. Schaal, M.P. Sherman, C.C. Barr, H.J. Kaplan // *Retina.* – 2011. – Vol. 31, № 8 – P. 1500-1504.
176. Schumann, R.G. Ultrastructure of the vitreomacular interface in full-thickness macular holes: A consecutive analysis of 100 cases / R.G. Schumann, M.M. Schumberger, M.B. Rohleder // *Am. J. Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 134. – P. 1112-1118.
177. Shinoda, K. A new technique for separation of posterior vitreous in vitreous surgery / K. Shinoda, M. Inoue, H. Katsura, S. Ishida // *Ophthalmic Surg Lasers.* – 1999. – Jul-Aug., Vol. 30, № 7. – P. 588-590.
178. de Smet M.D. Microplasmin: Ex Vivo Characterization of Its Activity in Porcine Vitreous / M.D. de Smet, C. Valmaggia, J. Zarranz-Ventura, B. Willekens // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2009. – Vol. 50, № 2. – P.814-819.
179. Smith, R.S. Vitreous membranes. A light and electron microscopical study / R.S. Smith, B. Streeten // *Arch. Ophthalmol.* – 1976. – Vol. 94, № 9. – P. 1556-1560.
180. Sonoda, K.H. Residual vitreous cortex after surgical posterior vitreous separation visualized by intravitreal triamcinolone acetonide / K.H. Sonoda, T.

Sakamoto, H. Enaida, M. Miyazaki, Y. Noda, T. Nakamura, A. Ueno, M. Yokoyama, T. Kubota, T. Ishibashi // *Ophthalmology*. – 2004. – Feb, Vol. 111, № 2. – P. 226-30.

181. Tezel, T.H. Posterior vitreous detachment with dispase / T.H. Tezel, L.V. Del Priore, H.J. Kaplan // *Retina*. – 1998. – Vol. 18, № 1. – P. 7-15.

182. Trese, M.T. Enzymatic-assisted vitrectomy / M.T. Trese // *Eye (Lond)*. – 2002. – Vol. 16, № 4. – P. 365-368.

183. Uemura, A. Effect of plasmin on laminin and fibronectin during plasmin-assisted vitrectomy / A. Uemura, M. Nakamura, S. Kachi et al. // *Arch. Ophthalmol.* – 2005. – Vol. 123, № 2. – P. 209-213.

184. Viores, S.A. Ultrastructural and electron-immunocytochemical characterization of cells in epiretinal membranes / S.A. Viores, P.A. Campochiaro, B.P. Conway // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1990. – Vol. 31, № 1. – P. 14-28.

185. Wang, F. Histopathologic changes of weiss ring after retinal detachment associated with proliferative vitreoretinopathy / F. Wang, X. Zhang, H. H. Hu // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2000. – Vol. 41, № 4. – P. 346.

186. Wang, J. Age-Dependent changes in the basal retinovitreal adhesion / J. Wang, D. McLeod, D.B. Henson, P.N. Bishop // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2003. – Vol. 44, № 5. – P. 1793-1800.

187. Wang, Z.L. PVD following plasmin but not hyaluronidase: implications for combination pharmacologic vitreolysis therapy / Z.L. Wang, X. Zhang, X. Xu, X.D. Sun, F. Wang // *Retina*. – 2005. – Vol. 25, № 1. – P. 38-43.

188. Weiss, R.E. Role of fibronectin in collagenous matrix – induced mesenchymal cell proliferation and differentiation in vivo / R.E. Weiss, A.N. Reddi // *Exp. Cell. Res.* – 1981. – Vol. 133, № 2. – P. 247-254.

189. Weller, M. Immunohistology of proliferative vitreoretinopathy following gianttear detachment / M. Weller, M. Bresgen, K. Heimann // *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* – 1989. – Vol. 195, № 5. – P. 323-325.

190. Weller, M. Mononuclear phagocytes and their growth factors: pacemakers of proliferative vitreoretinopathy / M. Weller, K. Heimann, P. Wiedemann // *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* – 1990. – Vol. 196, № 3. – P. 121-127.

191. Weller, M. Proliferative vitreoretinopathy – is it anything more than wound healing at the wrong place? / M. Weller, P. Wiedemann, K. Heimann // *Int.Ophthalmol.* – 1990. – Vol. 14, № 2. – P. 105-117.
192. Wiedemann P. Growth factors in retinal diseases: proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy, and retinal degeneration / P. Wiedemann // *Surv. Ophthalmol.* – 1992. – Vol. 36. – P. 373-384.
193. Wilkinson, C.P. Results of retinal reattachment surgery. -Michel's retinal detachment / C.P. Wilkinson, T.A. Rice // 2nd ed. St Louis: Mosby, 1997. – P. 935-978.
194. Wolfe, S. Peeling of the basal membrane in the human retina / S. Wolfe, U. Schnurbush, P. Wiedemann // *Ophthalmology.* – 2003. – Vol. 111. – P. 238-243.
195. Wolter, J.R. Pores in the ILM of the human retina / J.R. Wolter // *Acta Ophthalmol.* – 1964. – Vol. 42. – P. 971-974.
196. Worst, J.G. F. Cisternal anatomy of the fully developed vitreous body in the young adult / J.G. F. Worst // *Trans. Ophthalmol. Soc. UK.* – 1977. – Vol. 97, № 3. – P. 550-554.
197. Worst, J.G.F. A SEM-correlation of the anatomy of the vitreous body: making visible the invisible / J.G. F. Worst // *Doc. Ophthalmol.* – 1986. – Vol. 64, № 1. – P. 117-127.
198. Worst, J.G. F. Comparative anatomy of the vitreous body in rhesus monkeys and man / J.G. F. Worst // *Doc. Ophthalmol.* – 1992. – Vol. 71, № 1. – P. 169-178.
199. Wu, J.J. Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding / J.J. Wu, P.E. Woods, D.R. Eyre // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267. – P. 23007–23014.
200. Zakov, Z.N. Ultrasonographic mapping of vitreoretinal abnormalities / Z. N.Zakov, L. A. Berlin, F. A. Gutman // *Am. J. Ophthalmol.* – 1983. – Vol. 96, № 5. – P. 622-631.

201. Zimmerman, L.E. Anatomic relationship of the retina to the vitreous body and to the pigment epithelium / L.E. Zimmerman, B.R. Straatsma – St. Louis: C.V. Mosby, 1960. – P. 15-28.