

Ю. А. БЕЛЫЙ<sup>1</sup>, А. В. ТЕРЕЩЕНКО<sup>1</sup>, А. В. ШАЦКИХ<sup>2</sup>, М. А. ПЛАХОТНИЙ<sup>1</sup>

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОФТАЛЬМИТА

<sup>1</sup>Калужский филиал ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза»  
им. академика С. Н. Федорова Росмедтехнологии»,  
Россия, 248007, г. Калуга, ул. Вишневого, 1а. E-mail: nauka@mntk.kaluga.ru;

<sup>2</sup>ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза»  
им. академика С. Н. Федорова Росмедтехнологии»,  
Россия, 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, 59а

Исследования выполнены на 42 глазах 21 кролика. Животные были разделены на 4 группы. В группе 1 проводили субтотальную витрэктомию, в качестве ирригационного раствора использовали раствор ванкомицина в дозе 30 мкг/мл, в группе 2 – витрэктомию (с раствором BSS в качестве ирригационного) и антибактериальную фотодинамическую терапию (АФДТ), в группе 3 – витрэктомию с раствором ванкомицина в дозе 30 мкг/мл в качестве ирригационного и АФДТ. Контрольная группа – без лечения. Проведены морфологические исследования. Наиболее выраженные эффекты противовоспалительной терапии достигнуты в группе 3 – снижение значения количественной оценки патоморфологических признаков воспалительного процесса с 14,5 баллов в 1 сутки до 6,75 баллов к 14 суткам.

**Ключевые слова:** антибактериальная фотодинамическая терапия, экспериментальный бактериальный эндофтальмит

**Yu. A. BELYY<sup>1</sup>, A. V. TERESHCHENKO<sup>1</sup>, A. V. SHATSKIKH<sup>2</sup>, M. A. PLAKHOTNIY<sup>1</sup>**

### MORPHOLOGICAL EXAMINATIONS OF PHOTODYNAMIC INFLUENCE ON EXPERIMENTAL BACTERIAL ENDOPHTHALMITIS

<sup>1</sup>The S. Fyodorov Eye microsurgery Federal state institution, Kaluga branch,  
Russia, 248007, Kaluga, Vishnevskogo street, 1a. E-mail: nauka@mntk.kaluga.ru;

<sup>2</sup>the S. Fyodorov Eye microsurgery Federal state institution,  
Russia, 127486, Moscow, Beskudnikovskiy bulvar, 59a

42 eyes of 21 rabbits were examined. Experimental animals were divided into 4 groups. In group 1 a subtotal vitrectomy with vancomycin 30 mcg/ml solution as irrigation solution was performed, in group 2 – vitrectomy with BSS solution as irrigation solution with antibacterial photodynamic therapy (APDT), in group 3 – vitrectomy with vancomycin and APDT. There was no any treatment in control group. Morphological examination was made. The best effect of anti-inflammatory therapy was reached in group 3. Quantitative evaluation of inflammatory process morphological features had decreased from 14,5 points in 1 days to 6,75 points in 14 days.

**Key words:** antibacterial photodynamic therapy, experimental bacterial endophthalmitis.

Одной из актуальных проблем офтальмологии является лечение эндофтальмита. Ведется поиск методов лечения внутриглазной инфекции с максимально эффективным и направленным воздействием [6, 9]. Проведены работы по использованию в лечении воспалительных заболеваний глаза сильных окислителей: озона, гипохлорита натрия, оксида азота [4, 5, 10]. Однако интравитреальное использование как озона, так и гипохлорита натрия не обеспечивает избирательного воздействия на микроорганизмы и не исключает риска повреждения внутриглазных структур.

На наш взгляд, антимикробная фотодинамическая терапия (АФДТ) [1, 7, 12, 13, 14] является более эффективным, безопасным и дозированным методом по сравнению с вышеперечисленными. Это подтверждается ранее проведенными нами исследованиями in

vitro, показавшими ее бактериостатический эффект [2], а также исследованиями безопасности интраокулярной АФДТ in vivo, которые продемонстрировали отсутствие повреждающего воздействия АФДТ на внутриглазные структуры [3].

Цель работы – оценить морфологические изменения в структурах глаза после фотодинамического воздействия и его эффективность в лечении экспериментального бактериального эндофтальмита.

### Материалы и методы

Исследования проводили на 42 глазах 21 кролика породы шиншилла весом 2,5–3,5 кг в возрасте 6 месяцев.

I этапом на обоих глазах экспериментальных животных выполняли факоэмульсификацию прозрачного хрусталика.

II этапом, через 20–30 дней после факоэмульсификации и клинического успокоения глаз, создавали экспериментальную модель экзогенного бактериального (*Enterococcus faecium*) эндофтальмита [11].

На III этапе экспериментальные животные были разделены на 4 группы: 3 опытные (по 6 особей) и одну контрольную (3 кролика). В группе 1 проводили субтотальную витрэктомию по стандартной методике, в качестве ирригационного раствора использовали раствор антибиотика ванкомицина в дозе 30 мг/мл [6], в группе 2 – витрэктомию (с раствором BSS в качестве ирригационного) и АФДТ, в группе 3 – комбинацию витрэктомии с раствором ванкомицина и АФДТ. В контрольной группе никакого лечения не проводили.

Витрэктомию во всех случаях выполняли не позднее 12 часов после заражения, так как лечение, проведенное позднее этого срока, становится абсолютно неэффективным [8].

**Методика интраокулярной АФДТ.** Операцию проводили под внутривенным наркозом (10%-ный гексенал из расчета 10–15 мг/кг веса животного). Под контролем операционного микроскопа, используя одноразовые инструменты, выполняли 3 склеротомии размером 0,5 мм. В одну из склеротомий вводили ирригационную систему 25G. Две другие склеротомии использовали для введения эндоосветителя и наконечника витреотома. Производили субтотальную витрэктомию по стандартной методике, в ходе которой максимально удаляли стекловидное тело, разделяли задние синехии и удаляли остатки капсулы хрусталика. Проводили обмен «жидкость/воздух», в переднюю камеру вводили вискоэластик для защиты эндотелия роговицы от попадания ФС. Затем в витреальную полость вводили раствор ФС до уровня склеротомий, глаз герметизировали на 10 минут, после чего ФС удаляли, проводя повторно замену «жидкость/газ». Через склеротомическое отверстие в витреальную полость вводили световод и проводили интравитреальное лазерное облучение с длиной волны 662 нм и плотностью энергии 10 Дж/см<sup>2</sup>. В завершение операции витреальную полость заполняли раствором BSS, на разрезы накладывали узловыи швы 8–0.

На заключительном, IV этапе проводили клинические и морфологические исследования. Гистологические изменения глаз оценивали после энуклеации на 1, 3 и 14-е сутки.

Для сравнения выраженности патоморфологических изменений в различных структурах глаза была разработана система количественной оценки гистологических признаков воспалительного процесса глазного яблока (табл. 1).

Согласно предложенной системе каждому патоморфологическому признаку присваивали определенное количество баллов, затем производили их суммирование и, таким образом, получали количественную оценку гистологических признаков воспалительного процесса. Результаты сопоставляли между собой по группам для их сравнительной характеристики, а также внутри каждой группы для оценки динамики воспалительного процесса.

Состояние глаз по тяжести течения воспалительного процесса и возможному исходу оценивали по степеням следующим образом: легкая – 0–8 баллов; средняя – 9–16 баллов; тяжелая – 17–24 балла; крайне тяжелая – 25–33 балла.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа по критерию Фишера.

## Результаты и обсуждение

В контрольной группе (без лечения) через 12 часов после заражения: роговица отечная, со слабой межпластинчатой инфильтрацией по периферии; передняя камера заполнена плотным гнойно-фибринозным экссудатом; в радужке сосуды расширены, умеренная воспалительная клеточная инфильтрация; в стекловидном теле гнойно-некротический очаг, захватывающий передний витреум и окутывающий остатки капсулы хрусталика, цилиарные отростки; отек сетчатки, рассеянные воспалительные клетки; увеит; в склере явления слабой воспалительной инфильтрации; в зрительном нерве единичные воспалительные клетки. Среднее количество баллов составило 13 (исходное состояние на момент начала лечебных мероприятий в опытных группах).

Через 1 сутки: воспаление продолжало нарастать с переходом в тяжелую стадию; явления кератита, иридоциклита с кровоизлияниями в строме и склерита; в сетчатке скопления воспалительных клеток с очагами деструкции; во всех отделах стекловидного тела гнойный экссудат; в зрительном нерве воспалительная инфильтрация, выходящая за пределы lamina cribrosa. Среднее количество баллов – 19,5.

Через 3 суток наблюдалась картина яркого эндофтальмита с переходом в панфтальмит: тотальное расплавление сетчатки; диффузная лейкоцитарная инфильтрация радужки, цилиарного тела и хориоидеи с очагами гнойного расплавления; склерит с выраженными гнойно-некротическими изменениями и угрозой склеромалии; неврит зрительного нерва с выходом воспаления за линию отсечения зрительного нерва (более 1 см). Среднее количество баллов – 29. Учитывая крайне тяжелое состояние глаз, приняли решение в контроле не пролонгировать срок эксперимента.

В группе 1 (витрэктомия + ванкомицин) по данным световой микроскопии на 1-е сутки после операции отмечались следующие изменения, соответствующие средней степени тяжести воспалительного процесса: в передней камере рыхлый фибриноидный экссудат с умеренным клеточным компонентом; сосуды радужки незначительно расширены; воспалительная инфильтрация внутренних слоев сетчатки и остатков кортекса стекловидного тела; явления умеренного увеита и переднего оптического неврита. Среднее количество баллов – 14,5.

На 3-и сутки морфологическая картина была стабильной и соответствовала отеку и умеренному воспалению, со слабой, преимущественно периваскулярной лимфоцитарной инфильтрацией в оболочках, сохранением отдельных клеток в стекловидном теле в задних отделах на фоне слабой воспалительной инфильтрации с единичными полиморфно-ядерными лейкоцитами в сетчатке. Среднее количество баллов – 11,75.

На 14-е сутки: отек роговицы сохраняется, появление васкуляризации по периферии; передняя камера заполнена плотным фибриноидным экссудатом; в витреальной полости на поверхности сетчатки фрагменты фибриноидного экссудата со слабой клеточной инфильтрацией; очаги воспалительной поверхностной деструкции сетчатки начинают замещаться глиальной тканью, формируя эпиретинальные мембраны, вызывающие тракции. В остальных структурах встречаются единичные воспалительные клетки. Среднее количество баллов – 10,5.

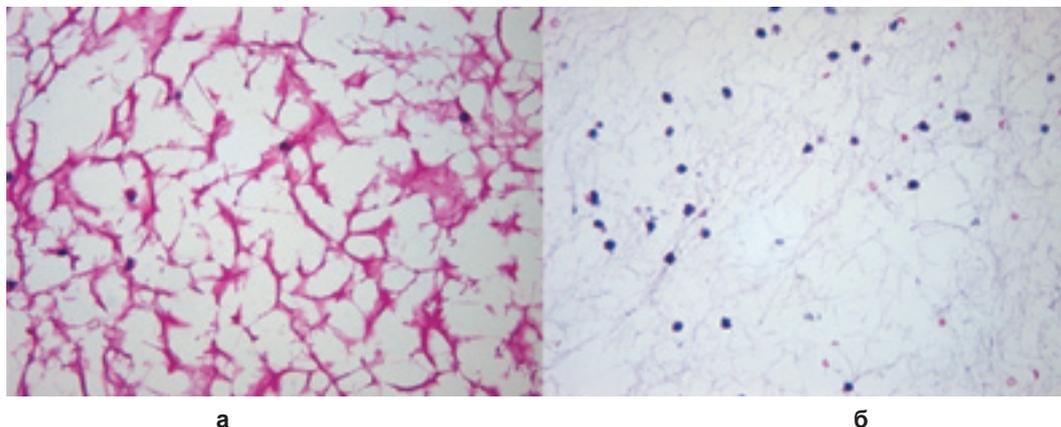
Таблица 1

## Количественная оценка патоморфологических признаков воспалительного процесса глазного яблока

№	Структуры глаза	Баллы		
		0	1	2
				3
1	Роговица (воспалительная инфильтрация)	Нет	Слабая	Выраженный кератит, инфильтрация стромы воспалительными клетками
2	Роговица (отечность)	Нет	Легкий отек	Умеренный отек
3	Роговица (неоваскуляризация)	Нет	По периферии	Неоваскуляризация без поражения центральной зоны
4	Передняя камера (экссудат)	Без экссудата	Экссудат серозный	Фибриноидный экссудат с включениями из воспалительных клеток
5	Радужка и цилиарное тело	Норма	Слабая периваскулярная воспалительная инфильтрация	Умеренная периваскулярная воспалительная инфильтрация со слабой диффузией в строме, полнокровие и эктазия сосудов
6	Витреальная полость (экссудат)	Без экссудата	Нежно-волоконистый фибриноидный экссудат	Очаговое уплотнение экссудата
7	Витреальная полость (клеточная реакция)	Нет	Слабая клеточная инфильтрация остатков витреума и экссудата	Умеренная клеточная инфильтрация
8	Сетчатка	Норма	Слабая, поверхностная воспалительная инфильтрация	Выраженная воспалительная инфильтрация с очагами деструкции
9	Хориоидея	Норма	Слабая периваскулярная воспалительная инфильтрация	Диффузная воспалительная инфильтрация, участки кровоизлияний
10	Склера	Норма	Слабая воспалительная инфильтрация внутренних слоев	Диффузная инфильтрация внутренних слоев склеры
11	Зрительный нерв	Норма	Слабая поверхностная воспалительная инфильтрация диска зрительного нерва, не выходящая за пределы lamina cribrosa	Периваскулярная воспалительная инфильтрация, выходящая за пределы lamina cribrosa, но не достигающая линии пересечения нерва, расширение межжоболочного пространства
				Гнойно-некротическое воспаление с нарушением архитектоники роговичной ткани и расплавлением роговицы
				Выраженное воспаление в центральной зоне
				Гипопион
				Явления выраженного иридоциклита
				Плотный фибриноидный экссудат
				Абсцесс
				Гнойное расплавление сетчатки
				Гнойное расплавление хориоидеи
				Склеромалиция вследствие гнойного расплавления
				Диффузная воспалительная инфильтрация по линии отсечения зрительного нерва, с вовлечением оболочек

В группе 2 (витрэктомия + ФДТ) на 1-е сутки наблюдалась картина, сходная с группой 1: в передней камере фибриноидный экссудат с умеренным клеточным компонентом, в радужке умеренная воспалительная инфильтрация с вовлечением в процесс цилиарных отростков и плоской части цилиарного тела; среди особенностей – в витреальной полости экссудат с небольшим количеством клеточных элементов и в сетчатке воспалительная инфильтрация внутренних слоев. Среднее количество баллов – 15.

На 3-и сутки в витреальной полости отмечена положительная динамика: бесклеточный фиброзный экссудат не активен, волокнистый компонент уплотнился, промежутки между ними расширились, клеточных компонентов мало (рис. 1а, б).



**Рис. 1. Фибриноидный экссудат в витреальной полости кролика в условиях экспериментального эндофтальмита (3-и сутки): а) группа 2; б) группа 1. Окраска гематоксилин-эозин, ув. х400**

В сетчатке единичные воспалительные клетки. Реакция сосудистой в виде слабой периваскулярной инфильтрации более выражена в передних отделах на фоне умеренной тяжести изменений в других оболочках глаза и зрительном нерве. Среднее количество баллов – 11.

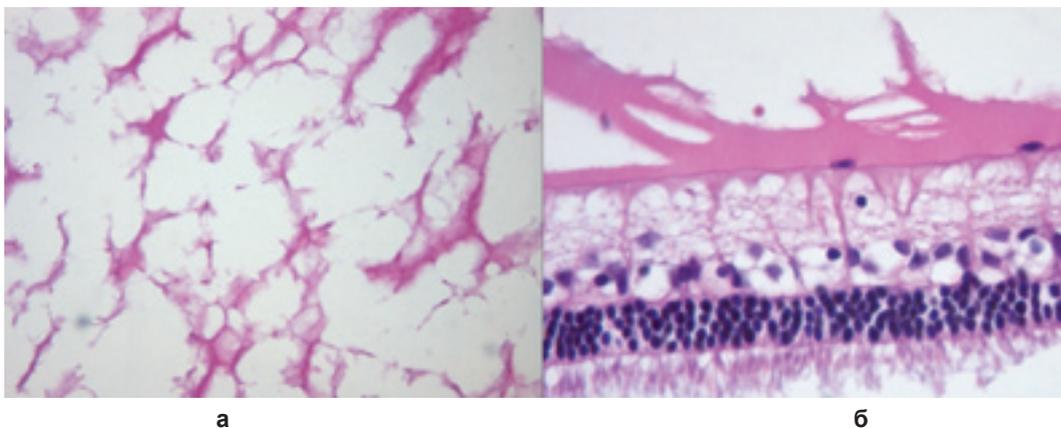
На 14-е сутки отмечали изменения в глазу, соответствующие тяжести перенесенных операций, а также: в передней камере остатки организованного экссудата с единичными клеточными элементами, в витреальной полости в фибриноидном экссудате – очаги уплотнения и слабой клеточной инфильтрации; на внутренней поверхности сетчатки – очаговый глиоз. Среднее количество баллов – 8,75.

В группе 3 (витрэктомия + АФДТ + ванкомицин) на 1-е сутки наблюдали свои особенности по отношению к экссудату: структура фрагментов кортекса имела признаки слабого ФДТ-патоморфоза, более разряженная плотность ватообразного экссудата с нежно-волокнистой основой, меньшее количество клеточных элементов. Среднее количество баллов – 14,5.

На 3-и сутки: выраженных воспалительных явлений в глазах не обнаружено: в витреальной полости сохраняется экссудативная реакция, небольшое количество клеточных элементов в передних отделах витреума; сетчатка в экваториальной и перипапиллярной зонах интактна, с единичными воспалительными клеточными элементами; структура центральной зоны сетчатки условно сохранна. Среднее количество баллов – 9,75.

На 14-е сутки состояние глаз стабильно, без воспалительных явлений: в витреальной полости сохраняется нежно-волокнистый бесклеточный экссудат (рис. 2а); в сетчатке (рис. 2б) лишь явления очагового глиоза в центральной зоне; хориоидея, склера и зрительный нерв без особенностей. Среднее количество баллов – 6,75.

Результаты патоморфологических исследований были подтверждены данными статистической обработки. Значения критерия Фишера F, превышающие критические, отражают эффективность метода лечения и скорость стихания воспалительного процесса в каждой опытной группе (табл. 2).



**Рис. 2. Группа 3 (14-е сутки): а) фибриноидный бесклеточный экссудат в витреальной полости; б) структура сетчатки сохранена. Окраска гематоксилин-эозин, ув. х400**

## Результаты однофакторного корреляционного анализа в зависимости от метода лечения экспериментального эндофтальмита

Метод лечения	F	F критическое
Витрэктомия+ванкомицин (F <sub>1</sub> )	3,142953	3,0681
Витрэктомия +ФДТ (F <sub>2</sub> )	9,155821	3,066391
Витрэктомия +ФДТ+ванкомицин (F <sub>3</sub> )	14,16693	3,066391

Упорядоченная последовательность опытных групп для всех сроков наблюдения при оценке патоморфологических признаков воспаления имеет вид: группа 1 (F<sub>1</sub>) < группа 2 (F<sub>2</sub>) < группа 3 (F<sub>3</sub>), что свидетельствует о наибольшей эффективности лечения экспериментального экзогенного бактериального эндофтальмита в группе 3, где в ходе витрэктомии проводили АФДТ и в качестве ирригационного раствора использовали раствор антибиотика.

### Заключение

Таким образом, проведенный нами комплекс разносторонних экспериментальных исследований свидетельствует о перспективности использования АФДТ при лечении бактериального эндофтальмита. С нашей точки зрения, проведение последующей клинической апробации разработанного метода с его внедрением в клиническую практику позволит значительно повысить эффективность хирургического лечения эндофтальмита, улучшив тем самым качество медицинской реабилитации данного тяжелого контингента больных.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Белый Ю. А., Терещенко А. В., Плахотный М. А. и др. Лечение бактериальных язв роговицы методом локальной ФДТ // Рефракционная хирургия и офтальмология. – 2008. – Т. 8. № 2. – С. 28–33.
2. Белый Ю. А., Терещенко А. В., Плахотный М. А. Оценка антимикробного действия фотодинамической терапии in vitro // Инфекции в хирургии. – 2008. – Т. 6. Приложение 1. – С. 13.
3. Белый Ю. А., Терещенко А. В., Плахотный М. А. и др. Интравитреальная фотодинамическая терапия в лечении экспериментального эндофтальмита // Офтальмохирургия. – 2009. – № 3. – С. 47–52.
4. Белый Ю. А., Терещенко А. В., Шкворченко Д. О., Макаров К. Н., Юдина Н. Н., Носкова Н. Х. Применение озонированных пер-

фторорганических соединений в лечении эндофтальмита // Офтальмохирургия. – 2004. – № 1. – С. 31–34.

5. Белый Ю. А., Терещенко А. В., Юдина Н. Н. Оценка эффективности интравитреального применения электролизного раствора гипохлорита натрия в ходе витрэктомии при лечении экзогенного бактериального эндофтальмита // Офтальмохирургия. – 2007. – № 2. – С. 40–45.

6. Даниличев В. Ф. Современная офтальмология. – СПб, 2000. – С. 564–568.

7. Мамиконян В. Р., Балаян М. Л., Будзинская М. В. и др. Возможности фотодинамической терапии в лечении грибковых поражений роговицы // Вестник офтальмологии. – 2007. – № 5. – С. 25–28.

8. Родин С. С. Современные подходы к лечению экзогенного бактериального эндофтальмита // Офтальмолог. журн. – 1992. – № 4. – С. 235–237.

9. Хакимов А. М. Эндофтальмит в хирургии катаракты // Офтальмохирургия. – 2008. – № 2. – С. 48–54.

10. Юдина Н. Н., Белый Ю. А., Терещенко А. В. Применение гипохлорита натрия в офтальмологии // Офтальмология. – 2007. – Т. 4. № 3. – С. 15–21.

11. Ermis S. S., Cetinkaya Z., Kiyici H., Ozturk F. Treatment of Staphylococcus Epidermidis Endophthalmitis with Intravitreal monofloxacilin in a rabbit // Model exp. med. – 2005. – № 3. – P. 223–229.

12. Maisch T., Szeimies R. M., Jori G., Abels C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology // Photochem. photobiol. sci. – 2004. – Vol. 3. № 10. – P. 907–917.

13. Meisel P., Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art // J. photochem. photobiol. B. – 2005. – № 2. – P. 159–170.

14. Parsons C., McCoy C. P., Gorman S. P. et al. Anti-infective photodynamic biomaterials for the prevention of intraocular lens-associated infectious endophthalmitis // Biomaterials. – 2009. – Vol. 30. № 4. – P. 597–602.

Поступила 23.09.2010

Е. В. БЫКОВА<sup>1</sup>, Л. А. СТОРОЖУК<sup>2</sup>

## ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ, АНТИВИРУСНЫХ, АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ И АНЕСТЕЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ, НА АКТИВНОСТЬ ЛИЗОЦИМА СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ

<sup>1</sup>Краснодарский филиал ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. академика С. Н. Федорова Росмедтехнологии»,

Россия, 350012, г. Краснодар, ул. Красных партизан, 6;

<sup>2</sup>кафедра фундаментальной и клинической биохимии

Кубанского государственного медицинского университета,

Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4. E-mail: ПлуМВ@ksma.ru