

Курыльцев Н.Б., Зборовская А.В.

Институт глазных болезней и тканевой терапии имени В.П. Филатова Национальной академии медицинских наук Украины, Одесса, Украина

Kuryltsiv N.B., Zborovskaya A.V.

Institute of the Eye Disease and Tissue Therapy named after Filatov of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Odessa, Ukraine

Антимикробная фотодинамическая терапия с метиленовым синим в комплексном лечении экспериментального стафилококкового эндофтальмита

Antibacterial photodynamic therapy with methylene-blue in the complex treatment of the experimental staphylococcus endophthalmitis

Резюме

Эксперимент проведен на 120 глазах 60 кроликов породы шиншилла. У всех животных создана модель эндофтальмита путем введения в стекловидное тело 150 тысяч микробных тел *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923F-49). Глаза контрольной группы кроликов (60 глаз) не поддавались лечению. Со вторых суток после инфицирования на глазах основной группы (60 глаз) проводили антимикробную фотодинамическую терапию с 0,1% метиленовым синим (облучение диодным лазером с длиной волны 630–670 нм на протяжении 3 мин.) и интравитреальное введение Ванкомицина. В результате установлено, что применение комбинации антимикробной фотодинамической терапии с метиленовым синим и интравитреального Ванкомицина в комплексном лечении экзогенного стафилококкового эндофтальмита приводит к регрессии воспалительного процесса и к отсутствию возбудителя во влаге передней камеры и стекловидном теле уже на 7-й день эксперимента.

Ключевые слова: стафилококковый эндофтальмит, эксперимент, метиленовый синий, фотодинамическая терапия, интравитреальное введение.

Resume

The experimental research was made on 60 rabbits (120 eyes). The model of endophthalmitis was created in all animals by intravitreal injection of 0,1 ml (150,000 CFU) *Staphylococcus aureus* sample (ATCC 25923F-49). The rabbits eyes (60) of control group were not treated. The antibacterial photodynamic therapy was conducted with 0,1% methylene-blue and intravitreal Vancomycin injections in rabbits eyes of experimental group (60 eyes) on the second day. As a result, it was

defined that use of combined antibacterial photodynamic therapy with 0,1% methylene-blue and intravitreal Vancomycin injections led to full reduction of inflammation and bacterial culture absence in the aqueous and vitreous samples on the 7th day of the experiment.

Key words: staphylococcus endophthalmitis, experiment, methylene-blue, photodynamic therapy, intravitreal injection.

■ ВВЕДЕНИЕ

Бактериальный экзогенный эндофтальмит – одно из самых сложных и неотложных состояний в офтальмологии, которое возникает в результате попадания микроорганизмов в витреальную полость и проявляется гнойным воспалением внутренних оболочек глазного яблока с формированием абсцесса в стекловидном теле. Данное осложнение является следствием операций, травм, сопровождающихся повреждением фиброзной оболочки глаза. Тяжесть инфекционного процесса обусловлена быстрым размножением микроорганизмов, а также токсическим поражением нейросенсорного, пигментного эпителия и зрительного нерва. Часто данный процесс приводит к инвалидизации больного [10].

Патогенез внутриглазного воспаления является сложным и мультифокальным, поскольку воспалительная реакция возникает в результате сложного взаимодействия агрессии возбудителя и защитных механизмов глазного яблока и организма в целом. Ключевыми моментами патогенеза экзогенного бактериального эндофтальмита (ЭБЭ) являются вирулентность микроорганизма, способность выделять и синтезировать большое количество белков, токсинов и различных ферментов, пути инвазии возбудителя, закономерность функционирования защитных механизмов глаза и развитие внутриглазного воспалительного процесса [1, 5, 11]. Несмотря на проведенное интенсивное комплексное лечение эндофтальмитов, не часто удается сохранить не только функции зрительного анализатора, но и глазное яблоко как анатомический орган [6]. Исходя из этого чрезвычайно актуальным является поиск альтернативных эффективных методов лечения экзогенного бактериального эндофтальмита. К ним можно отнести антимикробную фотодинамическую терапию с использованием 0,1% метиленового синего.

В основе антимикробной фотодинамической терапии (АФДТ) лежит использование деструктивного эффекта энергии фотохимических реакций. Из позиций реализации фотодинамических эффектов не существует микроорганизмов, стойких к этому методу, поскольку каждый из них активно поглощает и накапливает в большом количестве молекулы фотосенсибилизирующего вещества и абсолютное большинство микроорганизмов в своем метаболическом цикле используют кислород, который является катализатором в реализации фотодинамической реакции. Многими учеными были получены убедительные доводы выраженной антимикробной активности фотодинамической терапии при влиянии на большинство патогенных бактерий, к которым принадле-

По данным литературных источников, Staphylococcus aureus выступает этиологическим агентом в 5–20% всех случаев эндофтальмитов, вызванных проникающей травмой и в 20% после внутриглазных операций [7].

Метиленовый синий является одним из немногих анилиновых красителей-фотосенсибилизаторов, который обладает минимальным нейротоксическим действием и прокрашивает все оболочки глазного яблока, особенно сосудистый тракт.

В качестве антибиотика для интравитреального введения был выбран Ванкомицин, поскольку доказана высокая чувствительность *Staphylococcus aureus* к нему. А также Ванкомицин не вызывает ретинотоксического эффекта при введении в стекловидное тело [9].

жат даже микобактерии туберкулеза. АФДТ одинаково эффективна при острой и хронической инфекции, а также при некоторых видах бактерионосительства [2].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить эффективность комбинации антимикробной фотодинамической терапии с 0,1% метиленовым синим и интравитреального Ванкомицина в комплексном лечении экзогенного стафилококкового эндофтальмита на лабораторных животных.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование проводили на 120 глазах 60 кроликов-самцов породы шиншилла весом 2,5–3,0 килограмма. Все кролики находились в стандартных условиях вивария и получали стандартное питание. На первом этапе исследования на обоих глазах всех кроликов проведено моделирование экзогенного стафилококкового эндофтальмита. Для этого под местной анестезией оксibuпрокаином с помощью одноразового инсулинового шприца (26 gauge) производили прокол склеры в верхненаружном квадранте на расстоянии 3,5 мм от лимба и вводили 0,1 мл (150000 МТ) суточной культуры музейного штамма микроорганизмов *Staphylococcus aureus* ATCC 25923F-49 ($1,5 \times 10^5$ КОЕ/см³) [4].

На втором этапе лабораторные животные были разделены на 2 группы по 30 особей. В первой группе (контрольной) после инокуляции возбудителя проводили изучение естественного инфекционного процесса в динамике, лечение не применяли. Во второй группе (основной) со вторых суток и до конца эксперимента проводили антимикробную фотодинамическую терапию с 0,1% метиленовым синим. Для этого после местной анестезии оксibuпрокаином, субконъюнктивально (в верхненаружном квадранте) вводили 0,1% стерильного водного раствора метиленового синего (в количестве 0,8 мл с добавлением 2% лидокаина в количестве 0,2 мл). Через 30 мин. транскорнеально, 60 и 120 мин. транспупиллярно на протяжении 3 мин. проводили облучение диодным лазером длиной волны 630–670 нм и диаметром пятна 3000 мкм [3].

Кроме того, 60 глаз основной группы на 2-е и 5-е сутки после инфицирования получили интравитреальное введение Ванкомицина. Для этого с помощью одноразового инсулинового шприца (26 gauge) производили прокол склеры в верхненаружном квадранте на расстоянии 3,5 мм от лимба и вводили в стекловидное тело 0,1 мл раствора Ванкомицина (в дозе 1 мг).

Течение процесса фиксировали посредством внешнего осмотра, прямой офтальмоскопии и дополнительно эхобиометрии. Проводили цветное фотографирование переднего отрезка глаза. Результаты клинической картины оценивали по балльной системе критериев, которая представлена в таблице 1 [8]. До инфицирования (0-е сутки), на 3, 7, 10, 14, 21 и 30-е сутки после инфицирования у всех животных проводили забор влаги передней камеры (ВПК) и стекловидного тела (СТ) для микробиологического анализа. Исследуемые пробы были посеяны на 5% кровяной агар и «Среда для контроля стерильности», а результаты проанализированы через 24 и 48 часов после посева.

Таблица 1
Шкала клинических изменений при остром эндофтальмите в баллах

Шкала	Конъюнктивa	Роговица	Радужка	Стекловидное тело
0	Нормальная	Прозрачная	Нормальная	Прозрачное
1	Умеренный отек	Фокальный отек	Умеренная гиперемия	Наличие участков помутнений, розовый рефлекс с глазного дна, видны детали глазного дна
2	Отек, умеренная гиперемия, легкий экссудат	Диффузный отек	Значительная гиперемия	Умеренно-мутное, рефлекс с глазного дна слабо-розовый, детали глазного дна не видны
3	Отек, значительная гиперемия, значительный экссудат	Мутная	Значительная гиперемия, синехии, малоподвижный или неподвижный зрачок	Рефлекс с глазного дна отсутствует

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После проведенного наблюдения и лечения получены следующие результаты. Уже на 2-е сутки после инокуляции возбудителя при клиническом осмотре всех глаз контрольной и основной групп были зафиксированы начальные признаки эндофтальмита. Это проявлялось, в большей или в меньшей мере, в виде выраженной инъекции глазного яблока, гиперемии и хемозе конъюнктивы, отеке эпителия и стромы роговицы, опалесценции влаги передней камеры, отека радужки и помутнении стекловидного тела. Дальше динамика клинических проявлений в группах отличалась (табл. 2). В контрольной группе (60 глаз) в 70% случаев (42 глаза) воспалительная реакция протекала в виде острого эндофтальмита с быстрым прогрессированием процесса, в 30% (18 глаз) в виде острого эндофтальмита, но с переходом в хронический. До конца эксперимента перфорация глазного яблока произошла на 10 глазах. У кроликов, где в качестве лечения бактериального эндофтальмита применяли АФДТ с 0,1% МС и интравитреальное введение Ванкомицина, на 53 глазах (88,6%) клиническая картина была характерна для эндофтальмита, на 7 глазах (11,6%) с самого начала заболевания – для панофтальмита. Начиная с 7-го дня эксперимента отмечалась значительная регрессия воспалительного процесса (уменьшение хемоза конъюнктивы, отека радужки), на 10-е сутки эксперимента отмечалось отсутствие хемоза и гиперемии конъюнктивы, значительное уменьшение отека роговицы, ирита. При офтальмоскопии отмечались помутнения в стекловидном теле. По данным ультразвукового исследования – помутнение в стекловидном теле, цилиарное тело не изменено, отсутствие шварт между стекловидным телом и сетчаткой, сетчатка прилежит. В этой группе экспериментальных животных случаев перфорации глазного яблока не наблюдалось.

Пробы для оценки микробиологического статуса (ВПК и СТ) всех исследуемых глаз до инфицирования были стерильными. В контрольной группе во все дни микробиологического исследования отмечался стабильный бактериальный рост в СТ и рост культуры *Staphylococcus aureus* с постепенным уменьшением во ВПК. В основной группе, начиная с 7-го дня эксперимента, отмечалось отсутствие роста *Staphylococcus*

Таблица 2

Характеристика динамики клинических изменений при экспериментальном стафилококковом эндофтальмите у кроликов контрольной и основной групп наблюдения в баллах (M ± m)

Дни	Группы кроликов	Конъюнктивa	Роговица	Радужка	Стекловидное тело
3	Контрольная	2,76 ± 0,36	1,6 ± 1,07	2,53 ± 0,7	2,4 ± 0,6
	Основная	2,01 ± 0,7*	1,3 ± 0,6*	1,58 ± 0,79*	2,08 ± 0,28*
7	Контрольная	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0
	Основная	0,36 ± 0,7*	0,58 ± 0,8*	1,1 ± 0,5*	2,7 ± 0,46*
10	Контрольная	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0
	Основная	0,06 ± 0,2*	0,3 ± 0,6*	0,5 ± 0,7*	2,8 ± 0,4*
14	Контрольная	2,9 ± 0,18	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0
	Основная	0,04 ± 0,2*	0,1 ± 0,3*	0,2 ± 0,4*	2,87 ± 0,35*
21	Контрольная	2,15 ± 0,59	2,3 ± 0,63	2,5 ± 0,65	3,0 ± 0,0
	Основная	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	3,0 ± 0,0
30	Контрольная	1,8 ± 1,08	2,0 ± 0,8	2,1 ± 0,72	3,0 ± 0,0
	Основная	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	3,0 ± 0,0

Примечание:

* – p ≤ 0,05 по сравнению с контрольной группой.

aureus во влаге передней камеры и в стекловидном теле. Количественная характеристика динамики роста культуры *Staphylococcus aureus* после инокуляции во всех экспериментальных группах представлена в таблице 3.

Таким образом, антимикробная фотодинамическая терапия с 0,1% метиленовым синим в комплексном лечении экзогенного стафилококкового эндофтальмита оказывает быстрое разрушающее действие на культуру *Staphylococcus aureus*, который иммуноморфологически является основным звеном деструкции тканей глазного яблока, тем самым приводя к регрессии воспалительного процесса в глазу.

■ ВЫВОДЫ

1. Использование антимикробной фотодинамической терапии с 0,1% метиленовым синим и интравитреального Ванкомицина в комплексном лечении экспериментального экзогенного стафилококкового

Таблица 3

Количественная характеристика культуры *Staphylococcus aureus* (КОЕ) во влаге передней камеры и стекловидном теле при экспериментальном стафилококковом эндофтальмите у кроликов контрольной и основной групп наблюдения

Дни	Влага передней камеры		Стекловидное тело	
	Контрольная группа	Основная группа	Контрольная группа	Основная группа
3	1 × 10 ⁴	Менее 1 × 10 ¹ (0–1 × 10 ¹)	3,5 × 10 ⁵ (1 × 10 ⁴ –1 × 10 ⁶)	2,71 × 10 ¹ (0–1 × 10 ²)
7	8 × 10 ³ (0–1 × 10 ⁴)	Рост отсутствует	1,3 × 10 ⁶ (1 × 10 ³ –1 × 10 ⁷)	Рост отсутствует
10	8 × 10 ³ (1 × 10 ² –1 × 10 ⁴)	Рост отсутствует	8,2 × 10 ³ (1 × 10 ³ –1 × 10 ⁴)	Рост отсутствует
14	2 × 10 ³ (1 × 10 ¹ –1 × 10 ⁴)	Рост отсутствует	1 × 10 ⁶	Рост отсутствует
21	3,4 × 10 ¹ (0–1 × 10 ²)	Рост отсутствует	6,4 × 10 ⁵ (1 × 10 ⁵ –1 × 10 ⁶)	Рост отсутствует
30	менее 1 × 10 ¹ (0–1 × 10 ²)	Рост отсутствует	5,1 × 10 ³ (0–1 × 10 ⁴)	Рост отсутствует

эндофтальмита ведет к значительной регрессии воспалительного процесса с 7-го дня исследования.

2. Под воздействием низкоэнергетического лазерного излучения с 0,1% метиленового синего и интравитреального Ванкомицина при лечении экспериментального стафилококкового эндофтальмита происходит санация влаги передней камеры и стекловидного тела на 7-е сутки экспериментального исследования.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Жукова, О.В. Состояние неспецифических факторов защиты больных с травматическим эндофтальмитом / О.В. Жукова, Г.А. Ергунова // Вестн. офтальмол. – 1989. – № 2. – С. 58–60.
2. Медведев, И.Б. Фотодинамическая терапия в офтальмологии / И.Б. Медведев, Е.И. Беликова, М.П. Сямичев – М., 2006. – 129 с.
3. Пасечникова, Н.В. Антибактериальное действие метиленового синего, активированного лазерным излучением с длиной волны 630 нм, на культуру золотистого стафилококка / Н.В. Пасечникова, А.В. Зборовская, Н.А. Самолук // Офтальмол. журн. – 2009. – № 1–2. – С. 88–91.
4. Родин, С.С. Интравитреальное применение гордокса в лечении экзогенного бактериального эндофтальмита: дис. ... канд. мед. наук / С.С. Родин. – Одесса, 1993. – 196 с.
5. Федорищева, Л.Е. Прогнозирование инфекционных осложнений при прободных ранениях глаза, их лечение: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук / Л.Е. Федорищева. – Москва, 1994. – 37 с.
6. Huang, J.J. Ocular Inflammatory Disease and Uveitis Manual: Diagnosis and Treatment / J.J. Huang, P.A. Gaudio. – New-York: USA, 2010. – 248 p.
7. Kunimoto, D.Y. Microbiologic spectrum and susceptibility of isolates: part II. Posttraumatic endophthalmitis. Endophthalmitis Research Group / D.Y. Kunimoto, T. Das, S. Sharma [et al.] // Am J Ophthalmology. – 1999. – Vol. 128. – P. 242–244.
8. Peyman, G.A. Postoperative endophthalmitis: A comparison of methods for treatment and prophylaxis with gentamicin / G.A. Peyman, J.T. Paque, H.I. Meisels, T.O. Bennett // Ophthalmic Surg. – 1975. – Vol. 6. – P. 26–35.
9. Pflugfelder, S.C. Intravitreal vancomycin. Retinal toxicity, clearance, and interaction with gentamicin / S.C. Pflugfelder, E. Hernández, S.J. Fliesler, J. Alvarez, M.E. Pflugfelder, R.K. Forster // Arch Ophthalmol. – 1987. – Vol. 105(6). – P. 831–837.
10. Seal, D., Pleyer, U. Ocular infection. – New-York: USA, 2007. – 380 p.
11. Shingleton, B.J. Outcomes of phacoemulsification in patient with and without pseudoexfoliation syndrome / B.J. Shingleton, J. Heltzer, M.W. O'Donoghue // J Cataract Refract Surg. – 2003. – Vol. 29. – P. 1080–1085.

Поступила в редакцию 15.08.2013
 Контакты: rakhmanovanb@yahoo.com