

# Сравнительная характеристика морфологических изменений при экспериментальном стафилококковом эндофтальмите с использованием антимикробной фотодинамической терапии с метиленовым синим и интравитреального введения ванкомицина

А.В. Зборовская, Н.Б. Курыльцев, Н.А. Горянова

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины», Одесса, Украина

---

*На 180 глазах 90 кроликов породы шиншилла создана модель стафилококкового эндофтальмита путем введения в стекловидное тело 150 тыс. микробных тел Staphylococcus aureus (ATCC 25923F-49). Контрольная группа кроликов (60 глаз) не подвергалась лечению. Со вторых суток после инфицирования кроликам II группы (60 глаз) проводили антимикробную фотодинамическую терапию (облучение диодным лазером с длиной волны 630–670 нм) в течение 3 минут с 0,1 % метиленовым синим (АФДТ с МС); кроликам III группы (60 глаз) на 2-е и 5-е сутки интравитреально вводили ванкомицин. В результате изучения морфологических изменений глаз кроликов со стафилококковым эндофтальмитом установлено, что при применении АФДТ с МС быстрее восстанавливаются структуры переднего и среднего отделов глаза, а после интравитреального введения ванкомицина более выражена реструктуризация задних отделов глаза и ретробульбарных образований.*

**Ключевые слова:** экспериментальный эндофтальмит, антимикробная фотодинамическая терапия, метиленовый синий, ванкомицин, патоморфологическая картина.

Российский офтальмологический журнал 2014; 1:62–67

---

Поиск новых эффективных способов лечения бактериальной инфекции является актуальной задачей. Это объясняется развитием резистентности к классической антибиотикотерапии, вызванной широким применением разных классов антибиотиков. Антимикробная фотодинамическая терапия (АФДТ) — новый альтернативный метод лечения бактериальной инфекции, который характеризуется малоинвазивностью, высоким уровнем эффективнос-

ти, возможностью дозирования, влиянием только на «чужеродные» клетки без повреждения внутриглазных структур [1–3].

В связи с этим **ЦЕЛЬ** нашего исследования — изучить особенности морфологических изменений при экспериментальном стафилококковом эндофтальмите на фоне использования антимикробной фотодинамической терапии с метиленовым синим (МС) и интравитреального введения ванкомицина.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование проведено на 90 кроликах (180 глаз) породы шиншилла весом 2,5–3,0 кг, самцах. Наблюдение и уход, лечебные манипуляции на животных, а также их выведение из эксперимента выполнялись в соответствии с Хельсинской декларацией по использованию животных в экспериментальных исследованиях (1964–2000 гг.).

На обоих глазах всех кроликов проведено моделирование экзогенного стафилококкового эндофтальмита (ЭСЭ) путем введения в стекловидное тело 0,1 мл суточной культуры музейного штамма микроорганизмов *Staphylococcus aureus* ATCC 25923F-49 ( $1,5 \times 10^5$  КОЕ/см<sup>3</sup>) (патент Украины № 84220).

Далее кролики были разделены на 3 группы по 30 особей (по 60 глаз). В контрольной (I) группе после заражения проводили изучение морфологических изменений в динамике без каких-либо вмешательств. Кроликам II группы со 2-х суток и до конца эксперимента проводили антимикробную фотодинамическую терапию с 0,1 % МС. Для этого после местной анестезии оксибупрокаином под конъюнктиву вводили 0,8 мл 0,1 % стерильного водного раствора МС. Через 30 мин транскорнеально, через 60 и 120 мин — транспупиллярно на протяжении 3 мин проводили облучение диодным лазером длиной волны 630–670 нм и диаметром пятна 3000 мкн [4]. В III группе животных на 2-е и 5-е сутки после инфицирования проводили интравитреальное введение 0,1 мл раствора ванкомицина (в дозе 1 мг) [5]. На 3, 7, 10, 14, 21 и 30-е сутки после заражения по 5 кроликов из каждой группы (10 исследуемых глаз) подвергались эвтаназии путем воздушной эмболии в состоянии глубокого наркоза (1 мл 10 % раствора тиопентала натрия на 1 кг массы). После энуклеации срезы глаз исследовали на микроскопе Jenamed-2 и фотографировали фотокамерой Canon DS 6031 с увеличением 200–400 [6].

С целью сравнения патоморфологических изменений в разных структурах глаза предложена система количественной оценки (в баллах) гистологических признаков воспаления (табл. 1). Учитывались 7, 14 и 30-е сутки эксперимента в связи с выраженностью патоморфологических изменений глаза. Предложено суммирование баллов, указывающих на воспалительный процесс переднего и заднего отдела глаза.

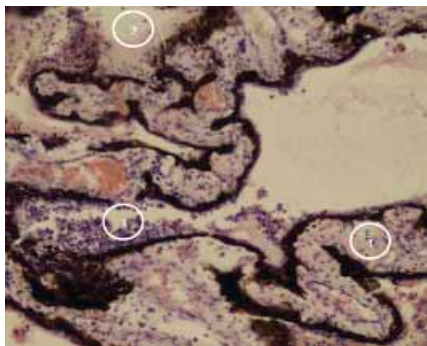
Статистическая обработка данных проводилась с помощью лицензионного пакета Statistica 10.0. Проведен дисперсионный анализ данных. Оценивали средние значения, стандартное отклонение от среднего, критерий достоверности Ньюмена — Кейлса и непараметрический показатель Манна — Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

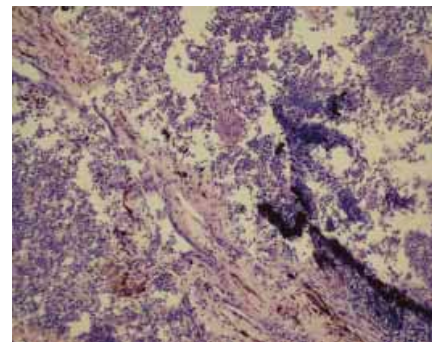
На 3-и сутки от момента заражения в контрольной группе отмечаются морфологические изменения во всех отделах глазного яблока: в роговице — перилимбальная межпластинчатая инфильтрация, отек стромы; в передней камере — экссудат; в увеальном тракте — отек, гиперемия и геморрагии, расслоение стромальных элементов; в стекловидном теле — массивная лейкоцитарная инфильтрация, сетчатка отечная, тотальная инфильтрация, нейроны сетчатки в состоянии резкой деструкции (рис. 1).

На 7-е и 10-е сутки деструктивно-воспалительные процессы усиливаются. Роговица отечна, интенсивно инфильтрирована лейкоцитами всех видов, в 4 случаях перфорирована. Отмечается также массивная инфильтрация парабульбарных тканей переднего отдела. Передняя камера широкая, заполнена гнойным экссудатом. Сосудистый тракт отечен, инфильтрирован. В камере стекловидного тела экссудативные явления нарастают, отмечается значительный лизис сетчатой оболочки (послойное строение относительно сохранно, но нейроны зернистых слоев разрушены). С 14-го дня и до конца эксперимента деструктивные процессы нарастают, что приводит к полной утрате органа зрения. Наблюдается грубая деформация и деструкция глазного яблока, тотальная инфильтрация всех отделов, в том числе пара- и ретробульбарных образований. В отдельных случаях отмечаются фрагменты оболочек, которые тяжело дифференцируются из-за гнойного расплавления тканей (рис. 2). На 5 глазах — перфорация глазного яблока.

Во II группе животных (АФДТ с 0,1 % МС) терапевтический эффект заметно проявляется на 7-й день эксперимента. В переднем отделе глаза лейкоцитарная инфильтрация тканей, гиперемия, геморрагии, отечные явления значительно уменьшаются в сравнении с контролем, в некоторых случаях практически отсутствуют. В заднем отделе глазного яблока признаков регресса воспалительного процесса еще не наблюдалось: в полости стекловидного



**Рис. 1.** ЭСЭ. Контроль. 3-и сутки. Отек, инфильтрация, гиперемия отростков цилиарного тела (1), воспалительный экссудат (2) и лейкоцитарная инфильтрация пространства между отростками (3). Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 100$ .



**Рис. 2.** ЭСЭ. Контроль. 14-е сутки. Грубая деструкция, тотальная инфильтрация, гнойный панеофтальмит. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 100$ .

**Таблица 1.** Шкала патоморфологических изменений разных структур глаза при остром эндофтальмите в баллах

Морфологические изменения	Степень выраженности воспаления в баллах		
	1	2	3
<i>Роговица</i>			
Инфильтрация эпителия	незначительная перилимбальная	умеренная, до центральной зоны	интенсивная, тотальная
Инфильтрация стромы	незначительная перилимбальная	умеренная, диффузная	интенсивная, тотальная
Отек	легкий	умеренный	интенсивный
Деструкция эпителия	локальная	тотальная	язва
Деструкция стромы	дезорганизация коллаген. пластинок	деформация	лизис, перфорация
Васкуляризация	незначительная перилимбальная	умеренная	интенсивная, до центра
<i>Конъюнктива</i>			
Инфильтрация эпителия	незначительная перилимбальная	умеренная	интенсивная, тотальная
Инфильтрация собственной пластинки	незначительная перилимбальная	умеренная	интенсивная, тотальная
Гиперемия	незначительная	умеренная	интенсивная
Геморрагии	незначительные	умеренные	интенсивные
Отек	незначительный	умеренный	интенсивный
<i>Передняя камера / задняя камера</i>			
Инфильтрация	незначительная	умеренная	интенсивная
Деформация	незначительная	умеренная	интенсивная
<i>Радужка / цилиарное тело / сосудистая оболочка</i>			
Инфильтрация	незначительная	умеренная	интенсивная
Гиперемия, геморрагии	незначительные	умеренные	интенсивные
Отек	незначительный	умеренный	интенсивный
<i>Стекловидное тело</i>			
Инфильтрация	незначительная	умеренная	тотальная
Некротические изменения	скопление детрита, разрушенные лейкоциты	отдельные участки некроза	тотальные гнойно-некротические массы
<i>Сетчатка</i>			
Отслойка	незначительная, локальная	умеренная, в центральной зоне	тотальная
Инфильтрация	незначительная	умеренная	интенсивная
Лизис	участки некроза	выраженный	тотальный
<i>Склера</i>			
Инфильтрация	незначительная	умеренная	интенсивная
Гиперемия, геморрагии	незначительные	умеренные	интенсивные
Отек	незначительный	умеренный	интенсивный
<i>Зрительный нерв</i>			
Инфильтрация, отек	незначительные	умеренные	значительные
<i>Ретробульбарные образования</i>			
Инфильтрация	локальная	язвы	тотальная
Гиперемия, геморрагии	незначительные	умеренные	интенсивные
Отек	незначительный	умеренный	интенсивный

тела отмечался гнойный экссудат неоднородного характера. Сетчатка тотально инфильтрирована. На 4 глазах (40 %) прилегание сетчатки сохраняется, на 6 глазах (60 %) сетчатка деструктивно изменена, на значительном протяжении отслоена от сосудистой оболочки. Последняя в состоянии значительного отека, гиперемирована, инфильтрирована, в просветах сосудов лейкоциты. Склера относительно спокойна.

На 14-е сутки структуры переднего и среднего отделов глаза имеют практически интактный характер. В полости стекловидного тела наблюдается регресс воспалительного процесса с началом организации гнойного экссудата. В местах, где сохранилось прилегание сетчатки к сосудистой оболочке, отмечается уменьшение инфильтрации. Наблюдается значительная экскавация диска зрительного нерва (рис. 3).

На 30-е сутки во всех случаях глаз сохраняется как орган. В морфологической картине разных отделов наблюдаются тенденции, которые обнаружены в предыдущий срок.

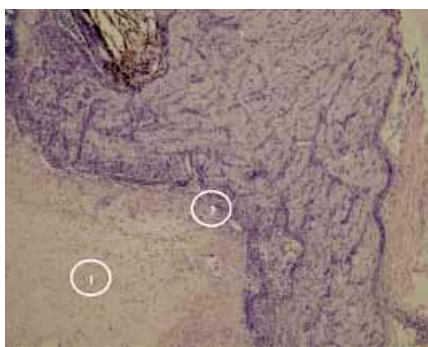
В III группе животных (интравитреальное введение ванкомицина) на 7-е сутки уже заметен положительный результат антибиотикотерапии, хотя и менее выраженный, чем в предыдущей группе. Наблюдается уменьшение гиперемии, отека во всех оболочках, передняя и задняя камера освобождаются от экссудата. На 10-е и 14-е сутки эксперимента корнеосклеральная капсула близка к интактной. Во всех отделах сосудистого тракта значительно уменьшена инфильтрация, гиперемия и геморагии отсутствуют (рис. 4). Заметной реструктуризации стекловидного тела и сетчатки не наблюдается. В тех местах, где сетчатка прилежит к сосудистой оболочке (на 3 глазах, 30 %), сохраняется ее слоистая структура. Деструкции подвергаются именно тела нейронов, количество их уменьшено. На тех глазах, где сетчатка отслоена (на 7 глазах, 70 %), она практически полностью поддалась лизису, элементы ее растворились в гнойных массах стекловидного тела (рис. 5).

На 21-е и 30-е сутки после заражения отек, инфильтрация, деструкция практически везде отсутствуют (кроме сетчатки и частично сосудистой оболочки). В сетчатке процессы распада нейрональных элементов менее выражены, содержимое стекловидного тела — неоднородное за счет дальнейшей организации воспалительного экссудата. Усиливается фиброз матрикса.

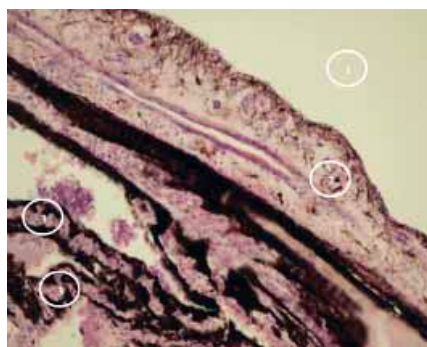
После суммирования балльной оценки морфологических изменений переднего и заднего отделов глазного яблока в контрольной группе получен их высокий стабильный уровень на протяжении всего эксперимента. Так, на 7-й день средняя сумма баллов воспаления в переднем отделе составила  $44,70 \pm 1,64$ , на 14-й день —  $58,20 \pm 0,55$  и на 30-й день —  $58,60 \pm 0,48$  (табл. 2); в заднем отделе соответственно  $35,70 \pm 0,61$ ,  $44,90 \pm 0,96$  и  $48,60 \pm 0,99$  (табл. 3).

Поскольку в контрольной группе лечение не проводилось, воспалительный процесс глаза характеризовался прогрессирующим течением, что позволяет провести сравнительную оценку с группами, в которых лечение проводилось (группа II и III).

По переднему отделу глаза учитывались 20 морфологических особенностей (табл. 1). Выявлено, что АФДТ с 0,1 % МС оказывает более быстрое терапевтическое действие на структуры переднего отдела глаза. Уже на 7-й день эксперимента в группе с применением АФДТ с 0,1 % МС средний балл морфологических изменений переднего отдела глаза составлял  $9,30 \pm 1,01$ , а в группе с интравитреальным введением ванкомицина —  $27,90 \pm 1,03$ ; в конце исследования (30-й день) в I группе —  $1,70 \pm 0,54$ , в тот же срок во II группе —  $5,80 \pm 0,64$  (табл. 2, рис. 6). Как следует из полученных данных, в каждый срок наблюдения в переднем отрезке глаза в соответствии с критерием Ньюмена — Кейлса отмечаются статистически значимые различия в эффективности двух методов лечения ( $p \leq 0,01$ ) в пользу применения АФДТ с 0,1 % МС (табл. 2).



**Рис. 3.** ЭСЭ. Лечение АФДТ. 7-е сутки. Умеренная инфильтрация тонковолокнистого матрикса экссудата стекловидного тела (1). Экскавация диска зрительного нерва (2). Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 100$ .



**Рис. 4.** ЭСЭ. Лечение ванкомицином. 10-е сутки наблюдения. Фрагмент увеального тракта. Передняя камера (1) и радужка (2) свободны от инфильтрации и экссудата. Умеренная инфильтрация отростков цилиарного тела (3) и пространств между ними. Отек, гиперемия отсутствуют. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 100$ .



**Рис. 5.** ЭСЭ. Лечение ванкомицином. 10-е сутки наблюдения. Полный лизис сетчатки. Грануляции вместо сосудистой оболочки (1), которые контактируют с лейкоцитарными массами стекловидной камеры (2). Строение склеры идентично интактному. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 100$ .

**Таблица 2.** Количественная суммарная оценка морфологических изменений переднего отдела глаза при экзогенном стафилококковом эндофтальмите без лечения, с использованием АФДТ с 0,1 % МС и ванкомицина (для всех групп n = 10)

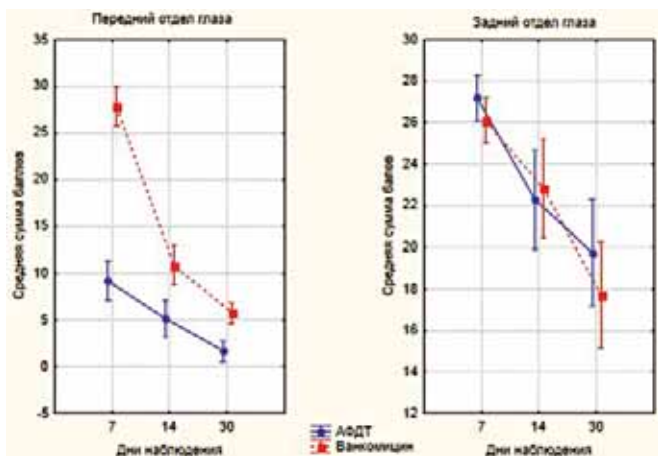
№	Группы	Дни	M ± m	95 % доверительный интервал	
				нижняя граница	верхняя граница
1	Контрольная	7	44,70 ± 1,64	41,0	48,4
2	Контрольная	14	58,20 ± 0,55	56,9	59,5
3	Контрольная	30	58,60 ± 0,48	57,5	59,7
4	АФДТ	7	9,30 ± 1,01	7,2	11,4
5	АФДТ	14	5,20 ± 0,95	3,2	7,2
6	АФДТ	30	1,70 ± 0,54	0,6	2,8
7	Ванкомицин	7	27,90 ± 1,03	25,8	30,0
8	Ванкомицин	14	10,900 ± 0,885	8,9	12,9
9	Ванкомицин	30	5,80 ± 0,64	4,7	6,9

$p_{1-4} \leq 0,05$ ;  $p_{1-7} \leq 0,05$ ;  $p_{2-5} \leq 0,05$ ;  $p_{2-8} \leq 0,05$ ;  $p_{3-6} \leq 0,05$ ;  $p_{3-9} \leq 0,05$ ;  $p_{4-7} \leq 0,05$ ;  $p_{5-8} \leq 0,05$ ;  $p_{6-9} \leq 0,05$

**Таблица 3.** Количественная суммарная оценка морфологических изменений заднего отдела глаза при экзогенном стафилококковом эндофтальмите без лечения, с использованием АФДТ с 0,1 % МС и ванкомицина (для всех групп n = 10)

№	Группы	Дни	M ± m	95 % доверительный интервал	
				нижняя граница	верхняя граница
1	Контрольная	7	35,70 ± 0,61	34,4	37,0
2	Контрольная	14	44,90 ± 0,96	42,9	46,9
3	Контрольная	30	48,60 ± 0,99	46,0	50,0
4	АФДТ	7	27,20 ± 0,52	26,1	28,3
5	АФДТ	14	22,30 ± 1,13	19,9	24,7
6	АФДТ	30	19,70 ± 1,22	17,1	22,3
7	Ванкомицин	7	26,10 ± 0,61	25,0	27,2
8	Ванкомицин	14	22,80 ± 1,09	20,4	25,2
9	Ванкомицин	30	17,70 ± 1,12	15,1	20,3

$p_{1-4} \leq 0,05$ ;  $p_{1-7} \leq 0,05$ ;  $p_{2-5} \leq 0,05$ ;  $p_{2-8} \leq 0,05$ ;  $p_{3-6} \leq 0,05$ ;  $p_{3-9} \leq 0,05$ ;  $p_{4-7} \geq 0,05$ ;  $p_{5-8} \geq 0,05$ ;  $p_{6-9} \geq 0,05$



**Рис. 6.** Динамика количественной оценки степени воспалительной реакции в баллах, по данным морфологии переднего и заднего отделов глазного яблока (M±m), при экзогенном стафилококковом эндофтальмите с использованием АФДТ с 0,1 % МС и ванкомицина интравитреально.

В заднем отделе глаза видна иная картина морфологических изменений в обеих группах (рис. 6). По сумме баллов ни в один срок наблюдения преимуществ какого-либо препарата не отмечено (табл. 3). На 7-й день исследования в группе с АФДТ средняя суммарная оценка составляла  $27,20 \pm 0,52$  балла, в группе с применением ванкомицина —  $26,10 \pm 0,61$  балла ( $p \geq 0,05$ ); на 14-й день — соответственно  $22,30 \pm 1,13$  и  $22,80 \pm 1,09$  балла ( $p \geq 0,05$ ), на 30-й день —  $19,70 \pm 1,22$  и  $17,70 \pm 1,12$  балла ( $p \geq 0,05$ ). Но по отдельным признакам имеются различия в терапевтическом воздействии на ту или иную структуру заднего отдела глаза. Статистически значимые различия по критерию Манна — Уитни в пользу интравитреального действия ванкомицина наблюдаются на 7-й день исследования при оценке инфильтрации и лизиса сетчатки, на 14-й день — гиперемии и геморрагий сосудистой оболочки, на 30-й день — гиперемии и геморрагий сосудов склеры, отека, гиперемии и геморрагий сосудистой оболочки, а также лизиса сетчатки ( $p \leq 0,05$ ). И, наоборот, статистически значимые различия по критерию Манна — Уитни в пользу АФДТ с 0,1 % МС наблюдаются на 7-й день при оценке инфильтрации, отека, гиперемии и геморрагий склеры, на 14-й день — пролиферативных

изменений стекловидного тела, некротических изменений сетчатки, на 30-й день — некротических изменений стекловидного тела и отека склеры.

Следовательно, применение обоих предложенных методов лечения стафилококкового эндофтальмита привело к сохранению глаза как органа, регрессу воспалительного процесса в глазу, но не к полному выздоровлению. Вся морфологическая картина указывает на то, что зрительные функции утрачены полностью и бесповоротно.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, сравнивая два метода лечения стафилококкового эндофтальмита — АФДТ с 0,1 % МС и интравитреальное введение 1,0 мг ванкомицина, следует отметить, что терапевтический эффект зависит от места использования фактора действия. В частности, транскорнеальное и транспупиллярное применение АФДТ с МС приводит к более быстрому

восстановлению именно структур переднего и среднего отделов глаза, в то время как сосудистая оболочка, сетчатка и склера восстанавливаются в меньшей степени. В условиях интравитреального применения ванкомицина реструктуризация задних отделов глаза по некоторым критериям более выражена, чем в предыдущей группе сравнения, хотя нельзя не отметить положительное терапевтическое влияние АФДТ с 0,1 % МС на некоторые структуры заднего отдела глаза. С нашей точки зрения, это свидетельствует о необходимости оценки результатов комбинированного применения двух методик лечения стафилококкового эндофтальмита.

#### Литература

1. Медведев И.Б., Беликова Е.И., Сямичев М.П. Фотодинамическая терапия в офтальмологии. М.; 2006.
2. 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; 30(4): 597–602.
3. Patrice T. *Photodynamic Therapy*. Cambridge: UK, 2003.
4. Пасечникова Н.В., Зборовская А.В., Самолук Н.А. Антибактериальное действие метиленового синего, активированного лазерным излучением с длиной волны 630 нм, на культуру золотистого стафилококка. *Офтальмол. журн.* 2009; 1(2): 88–91.
5. Даниличев В.Ф. Современная офтальмология. СПб., 2000; 564–568.
6. Саркисов Д.С., Перова Ю.Л. Микроскопическая техника. М.: Медицина, 1996.

---

## A comparative study of morphological changes occurring in experimental *staphylococcus endophthalmitis* using antimicrobial photodynamic therapy with methylene blue and intravitreal vancomycin injections

A.V. Zborovskaya, N.B. Kuryltsiv, N.A. Goryanova

*The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of Ukrainian National Academy of Science, Odessa, Ukraine  
rakhmanovanb@yahoo.com*

*180 eyes of 90 chinchilla rabbits were used to produce experimental staphylococcus endophthalmitis by introducing intravitreally 0.1 ml (150000 staphylococcus aureus microbial bodies, ATCC 25923F-49). The experimental study involved three groups of 30 rabbits each: the control group 1 who received no treatment, the experimental group 2 which received antibacterial photodynamic therapy (APDT) with 3-minute diode laser radiation (wavelength 630–670 nm) with 0.1% methylene blue (MB) from the second day of infection, and the experimental group 3 that received intravitreal injections of 1.0 mg Vancomycin on days 2 and 5. The results of histomorphological studies showed that the use of APDT with 0.1% MB brings about a rapid repair of structures of the anterior and the middle parts of the eye, while the use of Vancomycin enables the restructuring of the posterior parts of the eye and retrobulbar tissues.*

**Key words:** experimental *Staphylococcus aureus* endophthalmitis, histomorphology, antibacterial photodynamic therapy, methylene blue, Vancomycin.

*Russian Ophthalmological Journal, 2014; 1:62–67*