

УДК 617.13–002:617.711–002.1

Изучение клинических признаков воспалительного процесса в роговой оболочке при одновременном моделировании кератита и конъюнктивита в эксперименте

А. М. Петруня, д. мед. н. проф., Мухамед Абдульрахман Кутайни, аспирант

ООО «Луганский областной центр глазных болезней»

Ключевые слова: экспериментальный кератит, конъюнктивит

Ключові слова: експериментальний кератит, кон'юнктивіт

Представлено результати дослідження, які свідчать про те, що наявність запального процесу в кон'юнктиві в значній мірі підвищує ступінь клінічних ознак, які характеризують інтенсивність запалення в роговій оболонці при моделюванні кератиту. Ступінь запалення і набряклості рогової оболонки, в середині терміну спостереження зростали у порівнянні з даними у тварин при відтворенні тільки експериментального кератиту.

The study of the clinical signs of the inflammatory process in the cornea in simultaneous modeling of keratitis and conjunctivitis in the experiment

A. Petrunya, Muhamed Abdulrahman Kutayni

Luhansk Regional Center For Eye Diseases

Key words: experimental keratitis, conjunctivitis

Presents the results of experimental research, which indicates, that the presence of inflammation in the conjunctiva greatly increases the clinical signs, that characterize the intensity of inflammation in the cornea modeling keratitis. The degree of inflammation and swelling of the cornea, in the middle of the observation period increased compared with those in animals only when playing experimental keratitis.

Введение. Одна из наиболее частых причин низкого зрения — стойкие помутнения роговицы, являющиеся исходом кератитов различной этиологии, особенно, при отсутствии своевременно начатого лечения имеющегося воспалительного заболевания. Тяжелые рецидивирующие кератиты характеризуются затяжным течением, приводят к длительной потере трудоспособности и инвалидизации. Они требуют длительного медикаментозного, а в некоторых случаях и хирургического лечения. В последнее время резко увеличилось число вирусных заболеваний, в том числе и поражающих орган зрения, что в значительной степени вызвано ухудшающейся экологической обстановкой [4, 23].

До настоящего времени остается недостаточно изученной этиология и патогенез кератитов, что обуславливает отсутствие высокоэффективных методов их лечения. Использование традиционных медикаментозных средств не всегда приводит к излечению больного и предупреждению возникновения рецидивов. В связи с этим необходим дальнейший поиск терапевтических средств, которые могли бы быть использованы для лечения кератитов [1, 3, 8, 9, 14, 24].

Известно, что при кератите наблюдается помутнение роговицы, развивающееся вследствие ее инфильтрации и сопровождающееся уменьшением

прозрачности и блеска, нарушением сферичности и чувствительности.

Было установлено, что особенности воспалительной реакции ткани зависят от биохимических и морфологических изменений в ней. Известно, что воспалительный процесс сопровождается нарушением структурной организации мембран лизосом, что приводит к выходу гидролаз из этих внутриклеточных структур в цитозоль клетки. Также было выявлено, что при воспалительном процессе в конъюнктиве в передний отдел глаза выделяются как свободно-радикальные соединения кислорода и оксида азота, так и продукты перекисного окисления липидов [13].

В последние годы в результате многочисленных исследований была выявлена роль поверхностных структур глаза и, в частности, слизистой оболочки конъюнктивы в защитно-приспособительных реакциях органа зрения. Так, обнаружена новая важная функциональная особенность конъюнктивы, связанная с транспортом важнейшего детоксиканта глутатиона [10, 15], благодаря чему в слезу поступает значительное количество глутатиона и его концентрация в этой биологической жидкости превышает уровень в плазме крови. Несомненно,

© А. М. Петруня, Мухамед Абдульрахман Кутайни, 2013

что столь высокий уровень глутатиона в слезе с учетом его функциональных свойств позволяет слезе служить мощным защитным барьером для тканей глаза и, особенно, роговицы. Как известно, глутатион в ткани роговицы играет чрезвычайно важную роль [11,18,22].

Цель работы: изучить влияние экспериментального конъюнктивита на клинические признаки воспалительного процесса в роговой оболочке при одновременном моделировании кератита и конъюнктивита в эксперименте.

Материал и методы

Для проведения эксперимента использовали кроликов массой 2,2–2,7 кг.

Экспериментальные животные были разделены на три группы: I группа — интактная (8 кроликов), 2 группа — I опытная, животные с кератитом (8 кроликов), 3 группа — II опытная, животные с кератитом и конъюнктивитом (9 кроликов).

Работа с животными проводилась с учетом требований Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с экспериментальными животными, которые были предложены на Совете международных медицинских организаций (1985 г.) «О мерах по дальнейшему совершенствованию форм работы с использованием экспериментальных животных».

Экспериментальный кератит у животных I и II опытных групп вызывали интрастромальной инъекцией 50 мкл 0,2 % эндотоксин липополисахарида на фосфатном буфере [19, 20, 21].

Клинические признаки воспалительного процесса оценивались модифицированным тестом Draize в различные сроки эксперимента (через 3, 7 и 14 суток) [12, 17].

В контрольной группе животным вводили сбалансированный солевой раствор 10 мкл, опытной группе вводили раствор липополисахарида из *Escherichia coli* — K235 путем единичной субконъюнктивальной инъекции (10 мкл) при концентрации эндотоксина 200 нг/мкл в верхний отдел бульбарной конъюнктивы [17].

Балльная оценка выраженности степени воспаления строилась на основании таких признаков как: степень помутнения роговицы, степень отека роговицы, степень инфильтрации роговицы, площади окрашивания поверхности роговицы флюоресцеином [16].

Признаки оценивались в баллах по следующей условной шкале:

Отделяемое в конъюнктивальной полости

0 — отсутствует

1 — слизистое скудное

2 — слизистое обильное

3 — слизистое гнойное

Степень гиперемии конъюнктивы

0 — бледно-розовая, соответствующая физиологической норме

1 — слабая гиперемия конъюнктивы глазного яблока

2 — умеренно-выраженная гиперемия конъюнктивы глазного яблока

3 — выраженная гиперемия конъюнктивы глазного яблока

Отек роговицы

0 — отек роговицы отсутствует, роговица прозрачная на всем протяжении

1 — локальный отек эпителия роговицы в зоне воспаления

2 — локальный отек эпителия с переходом на поверхностные слои стромы

3 — локальный отек в поверхностных с средних слоях стромы

Воспалительная инфильтрация

0 — инфильтрация отсутствует

1 — точечные единичные (не более трех) субэпителиальные инфильтраты

2 — точечные множественные (более трех) субэпителиальные инфильтраты

3 — множественные субэпителиальные инфильтраты размером более 1 мм

4 — локальная инфильтрация в поверхностных и средних слоях стромы

Флюоресцеиновый тест

0 — отсутствует

1 — точечное окрашивание роговицы

2 — площадь окрашивания < 3 мм²

3 — площадь окрашивания > 3 мм²

Помутнение роговицы

0 — отсутствует

1 — есть

Интенсивность воспалительного процесса в конъюнктиве оценивались также в баллах:

Степень хемоза: 0 — нет хемоза, 1 — небольшой хемоз, 2 — явный хемоз, 3 — явный хемоз с воспалением более половины внутреннего века.

Обводненность: 0 — отсутствие обводненности, 1 — небольшая обводненность, 2 — обводненность с распространением на веки и ресницы, 3 — обводненность распространяется на все глазное яблоко.

Покраснение: 0 — нормальные кровеносные сосуды, 1 — ясно видимые сосуды, 2 — разлитое интенсивное покраснение, отдельные сосуды трудно различимы, 3 — диффузная резко выраженная краснота.

При анализе различных порядковых показателей, характеризующих степень воспалительной реакции по условной шкале во всех группах, использовали ранговый критерий Манна-Уитни [5].

Результаты и их обсуждение

Данные о сравнительном анализе выраженности клинических признаков у кроликов при моделировании кератита и конъюнктивита в зависимости от срока наблюдения представлены в таблицах 1–6 и на диаграмме (рис. 1).

Выраженность отека роговицы у животных с кератитом на 3 сутки составила (1,75±0,58) балла, при этом средний ранговый показатель был равен 15,50, а в группе с кератитом и конъюнктивитом отек роговицы составил (2,0±0,49) балла (114,3 %), показатели среднего ранга равнялись 19,28.

Во 2 срок наблюдения показатель выраженности отека роговицы в группе животных с кератитом был равен (2,38±0,50) балла, а средний ранговый показатель — 12,38 (p<0,001). В группе с кератитом и конъюнктивитом отек роговицы составил (2,94±0,24) балла, а показатели среднего ранга — 22,06 (p<0,001).

Таблица 1. Сравнительный анализ выраженности отека роговицы у кроликов при моделировании кератита и конъюнктивита в зависимости от срока наблюдения (в баллах)

Сроки	Статистические показатели	Условия эксперимента	
		Кератит n=8	Кератит+конъюнктивит n=9
3 суток	M	1,75	2,00
	SD	0,58	0,49
	%	100,0	114,3
	%1	100,0	100,0
7 суток	M	2,38	2,94
	SD	0,50	0,24
	%	100,0	123,5
	%1	100,0	100,0
14 суток	M	1,50	1,83
	SD	0,52	0,38
	%	100,0	122,0
	%1	100,0	100,0

Примечания: % — относительный показатель выраженности отека роговицы у кроликов группы «Кератит+конъюнктивит» по отношению к группе «Кератит»; n — количество глаз.

Таблица 3. Сравнительный анализ показателей флуоресцентного теста роговицы у кроликов при моделировании кератита и конъюнктивита в зависимости от срока наблюдения (в баллах)

Сроки	Статистические показатели	Условия эксперимента	
		Кератит n=8	Кератит+конъюнктивит n=9
3 суток	M	1,69	2,06
	SD	0,48	0,42
	%	100,0	121,9
	%1	100,0	100,0
7 суток	M	2,13	2,94
	SD	0,34	0,24
	%	100,0	138,0
	%1	100,0	100,0
14 суток	M	1,31	1,67
	SD	0,48	0,59
	%	100,0	127,5
	%1	100,0	100,0

Примечания: % — относительный показатель выраженности отека роговицы у кроликов группы «Кератит+конъюнктивит» по отношению к группе «Кератит»; n — количество глаз.

В экспериментальной группе животных с кератитом спустя 14 суток выраженность отека роговицы составила (1,50±0,52) балла, а данные по среднему рангу — 14,50 (p<0,05). У животных с кератитом и конъюнктивитом показатель отека роговицы рав-

Таблица 2. Сравнительный анализ выраженности воспалительной инфильтрации роговицы у кроликов при моделировании кератита и конъюнктивита в зависимости от срока наблюдения (в баллах)

Сроки	Статистические показатели	Условия эксперимента	
		Кератит n=8	Кератит+конъюнктивит n=9
3 суток	M	2,25	2,83
	SD	0,58	0,71
	%	100,0	125,8
	%1	100,0	100,0
7 суток	M	2,94	3,83
	SD	0,57	0,38
	%	100,0	130,3
	%1	100,0	100,0
14 суток	M	1,56	1,89
	SD	0,51	0,32
	%	100,0	121,2
	%1	100,0	100,0

Примечания: % — относительный показатель выраженности отека роговицы у кроликов группы «Кератит+конъюнктивит» по отношению к группе «Кератит»; n — количество глаз.

Таблица 4. Сравнительная ранговая оценка выраженности отека роговицы при моделировании кератита и конъюнктивита у кроликов в зависимости от срока наблюдения

Сроки наблюдения	Статистические показатели	Группы	
		Кератит	Кератит+конъюнктивит
3 суток	n	16	18
	Средний ранг	15,50	19,28
	Сумма рангов	248,00	347,00
	U	112,00	
7 суток	n	16	18
	Средний ранг	12,38	22,06
	Сумма рангов	198,00	397,00
	U	62,00	
14 суток	n	16	18
	Средний ранг	14,50	20,17
	Сумма рангов	232,00	363,00
	U	96,00	
	p	0,041	

Примечания: p — уровень значимости различий данных между группами «Кератит» и «Кератит+конъюнктивит», рассчитанный с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни; n — количество глаз.

нялся (1,83±0,38) балла, а средний ранг — 20,17 (p<0,05).

Выраженность воспалительной инфильтрации у животных с кератитом в 1 срок эксперимента составила (2,25±0,58) балла, а показатель среднего

Таблица 5. Сравнительная ранговая оценка выраженности воспалительной инфильтрации роговицы при моделировании кератита и конъюнктивита у кроликов в зависимости от срока наблюдения

Сроки наблюдения	Статистические показатели	Группы	
		Кератит	Кератит+ конъюнктивит
3 суток	n	16	18
	Средний ранг	13,66	20,92
	Сумма рангов	218,50	376,50
	U	82,50	
	p	0,020	
7 суток	n	16	18
	Средний ранг	10,84	23,42
	Сумма рангов	173,50	421,50
	U	37,50	
	p	0,000	
14 суток	n	16	18
	Средний ранг	14,56	20,11
	Сумма рангов	233,00	362,00
	U	97,00	
	p	0,034	

Примечания: p — уровень значимости различий данных между группами «Кератит» и «Кератит+конъюнктивит», рассчитанный с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни; n — количество глаз.

Таблица 6. Сравнительная ранговая оценка показателей флуоресцентного теста роговицы при моделировании кератита и конъюнктивита у кроликов в зависимости от срока наблюдения

Сроки наблюдения	Статистические показатели	Группы	
		Кератит	Кератит+ конъюнктивит
3 суток	n	16	18
	Средний ранг	14,50	20,17
	Сумма рангов	232,00	363,00
	U	96,00	
	p	0,025	
7 суток	n	16	18
	Средний ранг	10,13	24,06
	Сумма рангов	162,00	433,00
	U	26,00	
	p	0,000	
14 суток	n	16	18
	Средний ранг	10,69	23,56
	Сумма рангов	171,00	424,00
	U	35,00	
	p	0,000	

Примечания: p — уровень значимости различий данных между группами «Кератит» и «Кератит+конъюнктивит», рассчитанный с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни; n — количество глаз.

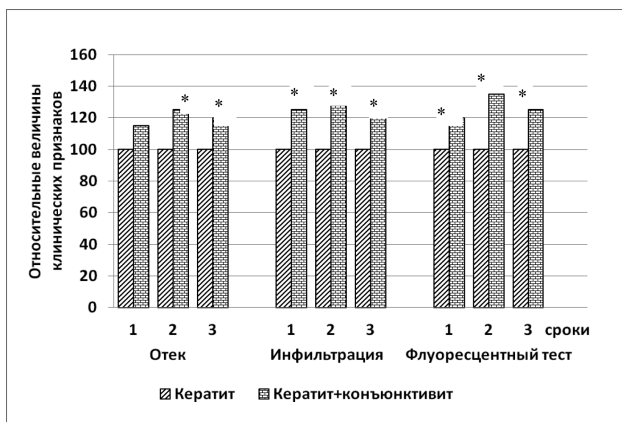


Рис. 1. Относительное влияние воспалительного процесса в конъюнктиве на выраженность клинических показателей кератита.

* — уровень значимости различия данных группы «Кератит+конъюнктивит» по отношению к группе «Кератит» при $p < 0,05$

ранга — 13,66 ($p < 0,05$). В группе животных с кератитом и конъюнктивитом степень воспалительной инфильтрации равнялась (2,83±0,71) балла, а сравнительная ранговая оценка — 20,92 ($p < 0,05$).

Во 2 срок наблюдения у животных с кератитом показатель воспалительной инфильтрации был равен (2,94±0,57) балла, а средний ранговый показатель — 10,84 ($p < 0,001$). В группе животных с кератитом и конъюнктивитом изучаемый признак

составлял (3,83±0,38) балла, а сравнительная ранговая оценка — 23,42 ($p < 0,001$).

В 3 срок эксперимента степень воспалительной инфильтрации у животных с кератитом составила (1,56±0,51) балла, а показатель среднего ранга — 14,56 ($p < 0,05$). В группе животных с кератитом и конъюнктивитом выраженность воспалительной инфильтрации роговицы была равна (1,89±0,32), а средний ранговый показатель — 20,11 ($p < 0,05$).

Выраженность окрашивания роговицы флуоресцеином у животных с кератитом в 1 срок наблюдения составила — (1,69±0,48) балла, а сравнительная ранговая оценка — 14,50 ($p < 0,05$). В группе животных с кератитом и конъюнктивитом, показатели флуоресцеинового теста равнялись (2,06±0,42) балла, а средняя ранговая оценка — 20,17 ($p < 0,05$).

Во 2 срок наблюдения степень окрашивания роговицы флуоресцеином у животных с кератитом составила (2,13±0,34) балла, показатели среднего ранга — 10,13 ($p < 0,001$). В группе животных с кератитом и конъюнктивитом выраженность окрашивания роговицы флуоресцеином была равна (2,94±0,24) балла, а средний ранговый показатель — 24,06 ($p < 0,001$).

В 3 срок наблюдения у животных с кератитом, показатели флуоресцеинового теста составили (1,31±0,48) балла, а оценка среднего ранга — 10,69 ($p < 0,001$). В группе животных с кератитом и конъюнктивитом

конъюнктивитом, степень окрашивания роговицы флюоресцеином была равна ($1,67 \pm 0,59$) балла, а сравнительный ранговый показатель — 23,56 ($p < 0,001$).

Данные о влиянии воспалительного процесса в конъюнктиве на выраженность клинических признаков кератита приведены на диаграмме (рис. 1.).

Как видно из представленных данных, у животных с кератитом и конъюнктивитом отек роговицы в 1 срок был на 15 % выше по сравнению с животными с кератитом, во 2 срок — на 25 %, в 3 срок — на 20 %.

Степень воспалительной инфильтрации роговицы у животных с кератитом и конъюнктивитом в 1 срок была на 25 % выше, по сравнению с животными с кератитом, во 2 срок — на 30 %, в 3 срок — на 20 %.

Показатели флюоресцеинового теста у животных с кератитом и конъюнктивитом в 1 срок повысились на 20 % по отношению к животным с кератитом, во 2 срок — на 35 %, в 3 срок — на 25 %.

Литература

1. Дрожжина Г. И., Каменская Е. В. Влияние факовита и тауфона на особенности клинического течения поверхностного герпетического кератита // Офтальмол. журн. — 2008. — № 2. — С. 44–48.
2. Дрожжина Г. И., Гайдамака Т. Б., Каменская Е. В. Изменение концентрации тиоловых соединений в роговице при развитии моделированного герпетического кератита // Дистрофічні захворювання органа зору: XIV Міжнародний наук. симпозіум «Одеса-Генуя», 8–9 вересня 2005 р.: тези. — Одеса, 2005. — С. 33–34.
3. Каменская Е. В. Эффективность медикаментозной коррекции нарушений тиолового статуса при поверхностных формах герпетического кератита: автореф. дис. канд. мед. наук: спец. 14.01.18 «Офтальмология» / Е. В. Каменская. — Одесса, 2008. — 20 с.
4. Майчук Ю. Ф. Современные тенденции в эпидемиологии и терапии глазных инфекций // Окулист. — 2005. — № 6 (74). — С. 8–9.
5. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках / Наследов А. — СПб.: Питер, 2005. — 416 с.
6. Петруня А. М., Мухамед Абдульрахман Кутайни. Изучение обменных процессов в роговице при экспериментальном кератите и конъюнктивите // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. — 2012. — Вип. 3 (111). — С. 205–221.
7. Петруня А. М., Мухамед Абдульрахман Кутайни. Исследование тиолового обмена и окислительно-восстановительных процессов в роговице при экспериментальном конъюнктивите // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. — 2012. — Вип. 1 (109). — С. 259–272.
8. Abu el-Asrar A. M., Geboes K., Tabbara K. F. Immunopathogenesis of vernal keratoconjunctivitis // Bull Soc Belge Ophthalmol. — 1996. — Vol. 261. — P. 15–24.
9. Bourcier T. Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases / Bourcier T., Thomas F., Borderie V. // Br. J. Ophthalmol. — 2003. — Vol. 87. — P. 834–838.
10. Ciriolo M. R. Loss of GSH, Oxidative stress, and Decrease of Intracellular pH as Sequential Steps in Viral Infection / Ciriolo M. R., Palamara A. T., Incerci S. // The J. Biol. Chem. — 1997. — V. 272, № 5. — P. 2700–2708.
11. Dickinson D. A. Cellular glutathione and thiols metabolism / Dickinson D. A., Forman H. J. // Biochem. Pharmacol. — 2002. — Vol. 64. — P. 1019–1026.
12. Douset O., Lanvin M., Thillou C. Reconstituted human corneal epithelium: a new alternative to the Draize eye test for the assessment of the eye irritation potential of chemicals and cosmetic products // Toxicol. Votro. — 2006. — Vol. 20. — P. 499–512.
13. Friend J., Hassell J. R. Biochemistry of the cornea In: Kaufman H. E., Barron B. A., McDonalds H. B. eds. The Cornea. — New York: Churchill Livingstone. — 1998. — P. 47–67.
14. Hazlett L. D. Role of innate and adaptive immunity in the pathogenesis of keratitis // Ocul. Immunol. Inflammat. — 2005. — Vol. 13. — P. 133–138.
15. Kannan R., Gukasyan H. J., Wenzheng Z. Impairment of conjunctival glutathione secretion and ion transport by oxidative stress in an adrnovirus type 5 ocular infection model of pigmented rabbits // Free Rad. Biol. Med. — 2004. — Vol. 37. — P. 229–238.
16. Liang H. LPS-stimulated inflammation and apoptosis in corneal injury models / Liang H., Brignole-Baudouin F., Labbe A. // Mol. Vis. — 2007. — Vol. 13. — P. 1169–1180.
17. Liang H. In vivo confocal microscopy and ex vivo flow cytometry: new tools for assessing ocular inflammation applied to rabbit lipopolisaccharide-induced conjunctivitis / Liang H., Baudouin C., Labbe A. // Mol. Vis. — 2006. — Vol. 12. — P. 1392–1402.
18. Reim M. The redox state of the glutathione in the bovine corneal epithelium / Reim M., Beermann H. R., Luthe P. // Graefes Arch. Klin. Ophthalm. — 1976. — Vol. 201. — P. 143–148.

19. **Schultz C. L.** Lipopolysaccharide induced acute red eye and corneal ulcers / Schultz C. L., Morck D. W., McKay S. G. // *Exp. Eye Res.* — 1997. — Vol. 64. — P. 3–9.
20. **Schultz C. L.** Lipopolysaccharide entry in the damaged cornea and specific uptake by polymorphonuclear neutrophils / Schultz C. L., Buret A. G., Olson M. E. // *Infect. Immunity.* — 2000. — Vol. 68. — № 3. — P. 1731–1734.
21. **Trinkaus-Randall V.** Quantification of stromal destruction in the inflamed cornea / Trinkaus-Randall V., Leibowitz H. M., Ryan W. J. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 1991. — Vol. 32. — № 3. — P. 603–609.
22. **Whitehart D. R.** Total and oxidized glutathione in bovine corneal epithelium and endothelium / Whitehart D. R. // *Exp. Eye Res.* — 1975. — Vol. 21. — P. 89–92.
23. **Wilson S. E., Liu J. J., Mohan R. R.** Stromal-epithelial interactions in the cornea // *Prog. Retin Eye Res.* — 1999. — Vol. 18. — P. 293–309.
24. **Yuan X., Wilhelmus K. R., Matoba A. Y.** Pathogenesis and outcome of paecilomyces Keratitis // *Am. J. Ophthalmol.* — 2009. — Vol. 147. — P. 691–696.

Поступила