

УДК 617.7–002.3–097–092.18–085.849.19+615.33

Імунологічні особливості перебігу стафілококового ендофтальміту в експерименті з використанням антимікробної фотодинамічної терапії з метиленовим синім в комбінації з інтравітреальним введенням антибіотика

О. В. Зборовська, д. мед. наук, Н. Б. Курильців, аспірант

ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України»
e-mail: rakhmanovanb@yahoo.com

Ключові слова: стафілококовий ендофтальміт, загальний імунітет, місцевий імунітет, антимікробна фотодинамічна терапія, метиленовий синій, ванкомицин, експеримент

Ключевые слова: стафилококковый эндофтальмит, общий иммунитет, местный иммунитет, антимикробная фотодинамическая терапия, метиленовый синий, Ванкомицин, эксперимент

Введение. Актуальным является вопрос изучения динамики иммунологического ответа при экзогенном стафилококковом эндофтальмите.

Цель: проанализировать динамику общего и местного иммунного статуса при стафилококковом эндофтальмите у кроликов с использованием антимикробной фотодинамической терапии (АФДТ) с 0,1 % метиленовым синим в комбинации с интравитреальным введением 1,0 мг Ванкомицина.

Материал и методы. В эксперименте принимали участие 90 кроликов породы шиншилла, которые были разделены на три группы: I — без лечения, II — с введением Ванкомицина, III — АФДТ с 0,1 % метиленовым синим и Ванкомицином. Был изучен общий (клеточный состав периферической крови кролика) и местный (мазки-отпечатки конъюнктивы) иммунитет.

Результаты. В III группе нормализация всех показателей общей и местной иммунной защиты происходила уже с 7 дня эксперимента, в отличие от II (с 21 дня) и I групп (не вернулись к норме).

Вывод. Использование АФДТ с 0,1 % метиленовым синим в комбинации с интравитреальным введением 1,0 мг Ванкомицина при экспериментальном стафилококковом эндофтальмите приводит к быстрой нормализации данных иммунограммы, что свидетельствует о регрессе воспалительного процесса.

Immunologic peculiarity of dynamics of Staphylococcus aureus endophthalmitis in experimental study with using antibacterial photodynamic therapy with methylene blue in combination with intravitreal injection of antibiotic

О. V. Zborovska, N. B. Kuryltsiv

SI «The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy NAMS of Ukraine»
e-mail: rakhmanovanb@yahoo.com

Key words: Staphylococcus aureus endophthalmitis, general immune response, local immune response, antibacterial photodynamic therapy, methylene blue, Vancomycin, experiment

Introduction. The study of immune response dynamics in case of experimental Staphylococcus aureus endophthalmitis is very actual.

Purpose: to analyse the dynamics of general and local immune response of rabbits with staphylococcus aureus endophthalmitis with the using of antibacterial photodynamic therapy (APDT) with 0,1 % methylene blue, which was combined with intravitreal injection of 1,0 mg Vancomycin.

Material and methods: in the experimental study three groups (30 rabbits in each group) of rabbits are presented: I — without using any treatment (the control) , II — using intravitreal Vancomycin and III — using APDT with 0.1 % methylene blue and intravitreal Vancomycin.

Results: in the group III normalization of all data of general and local immunity became on day 7, unlike in group II (on day 21) and in group I (does not become the normal).

Conclusions: using of APDT with 0,1 % methylene blue in combination with intravitreal injection of 1,0 mg Vancomycin leads to the rapid normalization of data of immune response.

Вступ. Патогенез внутрішньоочного інфекційного запалення є складним та мультифакторним, оскільки являється результатом складної взаємодії агресії збудника та захисних механізмів очного яблука. В свою чергу запалення — це складний біо-

логічний, хімічний та фізичний процес як відповідь на сторонні тіла (бактерії). Цей процес відбувається через судинні, клітинні та гуморальні реакції. З точ-

© О. В. Зборовська, Н. Б. Курильців, 2013

ки зору імунологічних аспектів, бактерійний ендодфальміт характеризується масивною запальною реакцією і руйнуванням тканин ока, що спричинене двома спільнодіючими чинниками: безпосередньо бактерією та послідовною імунною відповіддю [2, 6]. Динаміка імунної відповіді при екзогенному стафілококовому ендодфальміті без лікування та з використанням антимікробної фотодинамічної терапії (АФДТ) з 0,1 % метиленовим синім в комплексі з інтравітреальним введенням 1,0 мг Ванкоміцину до кінця ще не вивчена.

Тому, метою нашого дослідження є проаналізувати динаміку загального та місцевого імунологічного статусу тварин з екзогенним стафілококовим ендодфальмітом при використанні антимікробної фотодинамічної терапії (АФДТ) з 0,1 % метиленовим синім в комплексі з інтравітреальним введенням 1,0 мг Ванкоміцину.

Матеріал та методи

Експериментальна робота проведена на 90 дорослих здорових кроликах породи шиншила (120 очей) з масою тіла 2,5–3,0 кілограми. Всі тварини отримували стандартне харчування та перебували в стандартних умовах віварію. На обох очах всіх експериментальних тварин був змодельований екзогенний ендодфальміт шляхом інтравітреального введення добової культури музейного штаму мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* ATCC 25923F — 49 (1,5Ч10⁵ КОЕ/см³) [5]. Далі кролики були поділені на три групи: I група, що включала 30 кроликів, не отримувала лікування стафілококового ендодфальміту, була контрольною; II група, з такою ж кількістю кроликів, на 2 та 5 доби після інокуляції збудника отримували по 1,0 мг Ванкоміцину інтравітреально; III група, що включала так само 30 тварин, отримували з 2 доби та до кінця експерименту АФДТ з 0,1 % метиленовим синім, а також на 2 та 5 доби 1,0 мг Ванкоміцину інтравітреально [1].

Методика інтравітреального введення антибіотика полягала в наступному. Після інстиляційної місцевої анестезії оксипрокаїном за допомогою інсулінового шприца (26 gauge) в 3,5 мм від лімбу через плоску частину циліарного тіла в верхньовнішньому квадранті ока в склисте тіло вводили 0,1 мл розведеного Ванкоміцину (під контролем прямої офтальмоскопії).

Методика АФДТ з 0,1 % метиленовим синім полягала в наступних діях: після місцевої інстиляції анестетика оксипрокаїном, субкон'юнктивально (у верхнє склепіння кон'юнктиви) вводилось 0,1 % стерильного водного розчину метиленового синього (в кількості 0,8 мл з додаванням 2 % лідокаїну в кількості 0,2 мл). Через 30 хв транскорнеально та через 2 години транспупілярно проводилось опромінення діодним лазером довжиною хвилі 630–670 нм та діаметром плями 3000 мкм протягом 3 хвилин [4].

На 3, 7, 10, 14, 21 та 30 дні після інокуляції збудника для проведення аналізу загального імунологічного статусу забірали кров з маргінальної вени вуха тварин, та для вивчення місцевого імунітету — мазки-відбитки кон'юнктиви.

Вивчення первинного імунного статусу проводили за стандартною методикою, яка була запропонована ДУ «Інститут очних захворювань і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України». Дане дослідження реалізувалось

за допомогою методів прискореної первинної оцінки імунологічного статусу, що включало визначення наступних показників загального імунітету: 1) абсолютна кількість лейкоцитів, 2) відносна та абсолютна кількість лімфоцитів, 3) відносна та абсолютна кількість Т-лімфоцитів, 4) відносна та абсолютна кількість Т-лімфоцитів-хелперів, 5) відносна та абсолютна кількість Т-лімфоцитів-супресорів, 6) відносна та абсолютна кількість В-лімфоцитів, 7) відносна та абсолютна кількість фагоцитуючих нейтрофілів (ФН), 8) відносна та абсолютна кількість натуральних кіллерів, 9) відносна кількість розеткоутворюючих нейтрофілів (РУН), 10) співвідношення Т-хелперів до Т-супресорів — імунорегуляторний індекс (ІРІ), 11) співвідношення розеткоутворюючих лімфоцитів та нейтрофілів в серії навантажуючих тестів — індекс навантаження імунітету (ІН).

Місцевий імунітет вивчався за допомогою методу цитологічного вивчення кон'юнктиви, який заключався в отриманні мазків-відбитків кон'юнктиви [3]. Для цього необхідна наявність пластинок-переносників, які виготовлялися з поролонової пластики і були квадратної форми та розміром 8×8 міліметрів. Перед використанням вони стерилізувалися. Після інстиляції анестетика в кон'юнктивальну порожнину, до поверхні нижньої пальпебральної та бульбарної кон'юнктиви за допомогою стерильного пінцету прикладали стерильну пластинку-переносник на 3 хвилини. В результаті цього на її поверхні залишався шар епітеліальних клітин, різних видів лейкоцитів, при бактерійному ураженні — мікроорганізми та слиз. Після того, пластинку-переносник розміщували на предметне скло, щільно віддавлювали на ньому, а отриманий мазок профарбовували гематоксилін-еозини і міроскопували. При міроскопії відбитка підраховувалась кількість епітеліальних клітин і пластів на 100 клітин, кількість підтипів лейкоцитів на 100 клітин в лейкоцитарній формулі та індекс співвідношення лейкоцитів і лімфоцитів.

Статистична обробка всіх отриманих даних проводилась за допомогою комп'ютерної програми «Statistica 10.0». Були обчислені середня арифметична величина (М) та стандартна помилка середнього (m). Достовірність показників оцінювали за t — критерієм Стюдента. Достовірною вважали різницю при p <= 0,05. Всі оброблені показники знайшли своє відображення в таблицях та на рисунках.

Результати та їх обговорення

Вже на третю добу після введення збудника, в усіх досліджуваних групах ми отримали результати активної імунно-запальної відповіді на чужорідний агент. А саме, ріст в периферичній крові кролика лейкоцитів та імунорегуляторного індексу в середньому в 2 рази, фагоцитуючих нейтрофілів, розеткоутворюючих нейтрофілів Т-лімфоцитів-хелперів та В-лімфоцитів в середньому в 1,5 рази, зниження індексу навантаження імунітету, відносного числа Т-лімфоцитів-супресорів та натуральних кіллерів (рис. 1, 2; табл.1–3). Починаючи з 7 доби, в трьох досліджуваних групах відмічена різна динаміка перебігу імунної реакції на розвиток ендодфальміту та запропоновані методи лікування. В контрольній групі, де не використовувався жодний метод терапії, запальний процес характеризувався гіперактивною імунною відповіддю без регресу запального

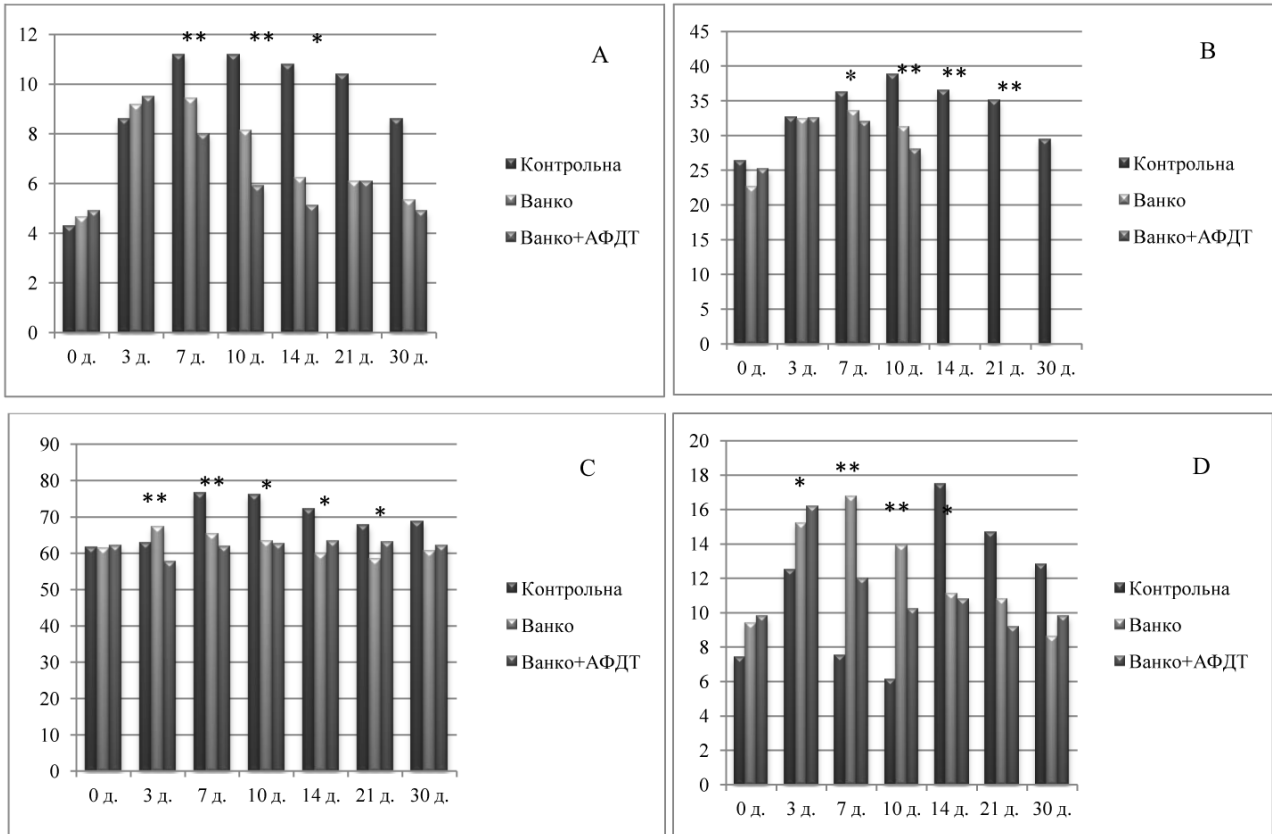


Рис. 1. Порівняльний аналіз кількості лейкоцитів (А), лімфоцитів (В), Т-лімфоцитів(С) та В-лімфоцитів(Д) (%) у периферичній крові кролика з екзогенним стафілококовим ендотальмітом без лікування, з використанням Ванкоміцину та АФДТ з 0,1 % метиленовим синім.

процесу. А саме, до кінця експерименту (30 день після інокуляції *Staphylococcus aureus*) відмічався ріст та утримання високого рівня лейкоцитів (в середньому в 3 рази), лімфоцитів, В-лімфоцитів, Т-лімфоцитів, фагоцитуючих нейтрофілів, ІРІ. В ІІ (інтравітреальне введення 1,0 мг Ванкоміцину) та ІІІ групах (АФДТ з 0,1 % метиленовим синім в комбінації з інтравітреальним введенням 1 мг Ванкоміцину) імунно-запальний процес мав регресивний характер. В двох групах, починаючи з 7 дня експерименту, відмічалась поступова нормалізація рівня всіх імуннокомпонентних клітин, ІРІ та ІН. В ІІІ групі всі показники загального імунного статусу були у нормі вже на 10 день експерименту, в ІІ — нормалізація рівня імуннокомпонентних клітин, ІРІ та ІН відбувалась поступово до кінця експерименту.

При нормально протікаючому запальному процесі з наявністю ефекту від лікування характерним є підвищення кількості Т-хелперів та зниження кількості Т-супресорів (зріст ІРІ) на початку процесу та зниження кількості Т-хелперів та підвищення кількості Т-супресорів (зниження ІРІ) з поступовою нормалізацією показників в другій та третій фазі запалення. Таку закономірність відмічено в ІІ та ІІІ групах дослідження. В ІІ групі (контрольній) це співвідношення немає такого характеру і про

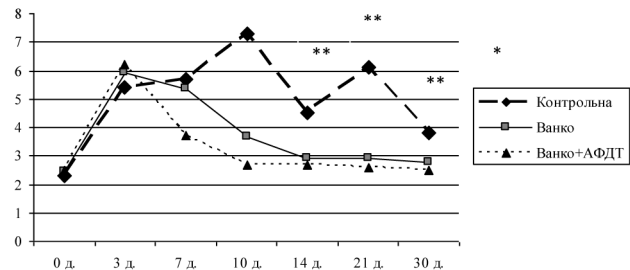


Рис. 2. Порівняльний аналіз співвідношення Т-хелперів до Т-супресорів (ІРІ) в периферичній крові кролика з екзогенним стафілококовим ендотальмітом без лікування, з використанням Ванкоміцину та АФДТ з 0,1 % метиленовим синім.

являється високим рівнем Т-хелперів і, відповідно, ІРІ на протязі усього експерименту (табл. 1, рис. 2).

Функція фагоцитозу вивчена шляхом підрахунку абсолютної та відносної кількості фагоцитуючих нейтрофілів, розеткоутворюючих нейтрофілів, індексу навантаження імунітету (табл.2 та 3). В групі кроликів, де для лікування стафілококового ендотальміту використовували АФДТ з 0,1 % метиленовим синім та Ванкоміцин інтравітреально, відмічено зниження рівня ІН, підвищення рівня фагоцитів та РУН на 3 добу та нормалізацію цих показників вже з 7 доби експерименту.