

ANTIPROLIFERATIVE ACTION OF RANIBIZUMAB, BEVACIZUMAB AND PEGAPTANIB
ON FIBROBLAST-LIKE CELL STRAIN IN VITRO

A. Sergiienko, L. Lytvynchuk, G. Lavrenchuk

Kyiv, Ukraine

The efficacy of intravitreal injections of anti-VEGF in the case of choroidal neovascularization (CNV) due to pathologic myopia becomes apparent in particular with decreasing of membrane's dimensions. The authors have investigated antiproliferative and apoptotic action of anti-VEGF agents (ranibizumab, bevacizumab, pegaptanib) on fibroblast-like cell strain L₉₂₉ in vitro (testing model of CNV cellular matrix in vitro). Cultivation of investigated drugs with cellular culture was held according to standard protocol. During investigation cellular vital indices were evaluated (survival, mitotic activity, polycariocyte index). Analysis of cellular apoptosis level was evaluated as well. Cultivation of cellular culture L₉₂₉ with anti-VEGF agents has provoked depression of cellular vital indices that was manifested with decrease of survival, mitotic index and increase of polycariocytes, which are signs of cellular reproductive death. Apoptosis has increased as a result of action of all drugs. Antiproliferative and apoptotic effects were dependent on drug's doses. Obtained results reveal and approve an alternative actions of anti-VEGF drugs on fibroblast-like cells: depression of mitotic activity and apoptosis increase.



УДК 617.7–002.3–085

**ДИНАМІКА КЛІНІЧНОЇ КАРТИНИ ТА МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ
ПРИ ЗАСТОСУВАННІ АНТИМІКРОБНОЇ ФОТОДИНАМІЧНОЇ ТЕРАПІЇ З МЕТИЛЕНОВИМ
СИНІМ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ СТАФІЛОКОКОВОМУ ЕНДОФТАЛЬМІТІ**

О. В. Зборовська, канд. мед. наук, **Н. Б. Курильців**, аспірант

ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України»
Одеса, Україна

С целью изучения действия антимикробной фотодинамической терапии с метиленовым синим проведено экспериментальное исследование на 60 кроликах. На всех глазах был смоделирован стафилококковый эндофтальмит путем введения интравитреально 0,1 мл (150000 МТ) культуры музейного штамма Staphylococcus aureus ATCC 25923F-49. Все экспериментальные животные составляли 2 группы: контрольную (30 кроликов), в которой не проводилось лечение, и основную (30 кроликов), в которой использовали антимикробную фотодинамическую терапию с 0,1 % метиленовым синим. Мы провели сравнительную характеристику динамики клинической картины и микробиологических показателей в двух группах. В результате установлено, что при использовании предлагаемой методики на 90 % глазах удается достичь полной регрессии воспалительного процесса уже на 14 день эксперимента. Во всех случаях санация влаги передней камеры происходит на 10 день, а стекловидного тела на 14 день после инфицирования.

Ключові слова: енд офтальміт, Staphylococcus aureus, антимікробна фотодинамічна терапія, метиленовий синій

Ключевые слова: енд офтальміт, Staphylococcus aureus, антимікробна фотодинамічна терапія, метиленовий синій

Введення. Одним з невідкладних станів в офтальмології є, безперечно, гнійне запалення внутрішніх оболонок очного яблука з формуванням абсцесу в склистому тілі, що розвивається внаслідок внутрішньоочної інфекції, а саме – енд офтальміт.

Гострий та відстрочений післяопераційний енд офтальміт у структурі цього захворювання до-

мінують і складають приблизно 70 %, посттравматичний – близько 25 %, ендogenous – 5–8 %. Найбільш часто енд офтальміт розвивається після екстракції катаракти (близько 70–90 % випадків) [9]. Іноді енд офтальміт може розвиватись після pars plana вітректомії, вторинної імплантації кри-

© О. В. Зборовська, Н. Б. Курильців, 2012

шталика, проникаючих антиглаукомних операцій, пенентруючої кератопластики, парацентезу передньої камери та інших [6]. Ендофтальміт являється одним з найважчих ускладнень проникаючих поранень ока. Розвиток внутрішньоочної інфекції супроводжує перебіг від 4,5 до 50 % проникаючих травм, наявність внутрішньоочного стороннього тіла асоціюється з ендофтальмітом у 6,9–16,7 % випадків [7]. *Staphylococcus aureus* виступає етіологічним агентом у 5–20 % всіх випадків ендофтальмітів, що спричинені проникаючою травмою та у 20 % після внутрішньоочних операцій. Імовірність нормалізації зорових функцій в очах з посттравматичним ендофтальмітом у порівнянні з постопераційним значно нижча [9]. За даними літературних джерел, незважаючи на проведені інтенсивне комплексне лікування ендофтальмітів, рідко вдається зберегти не тільки функції зорового аналізатора, а й самого очного яблука, як анатомічного органа [8]. Тому надзвичайно актуальним є пошук альтернативних ефективних методів лікування. До них можна віднести антимікробну фотодинамічну терапію з використанням 0,1 % метиленового синього.

Антимікробна фотодинамічна терапія (АФДТ) — принципово новий метод лікування інфекційно-запальних захворювань, в основі якого лежить використання деструктивного ефекту енергії фотохімічних реакцій. З позицій реалізації фотодинамічних ефектів не існує мікроорганізмів, стійких до цього методу, оскільки кожний мікроорганізм активно поглинає й накопичує у великій кількості молекули фотосенсибілізуючої речовини й абсолютна більшість мікроорганізмів у своєму метаболічному циклі споживають кисень, який являється каталізатором у реалізації фотодинамічної реакції. Вітчизняними вченими були отримані переконливі докази вираженої антимікробної активності фотодинамічної терапії при впливі на більшість патогенних бактерій, до яких належать навіть мікобактерії туберкульозу. АФДТ однаково ефективна при гострій і хронічній інфекції, а також при деяких видах бацілоносійства [4]. Існують експериментальні докази ефективності використання АФДТ при бактерійних ендофтальмітах змішаної етіології (*Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli*) [2]. Метиленовий синій, який виступає фотосенсибілізатором, являється одним з небагатьох анілінових фарбників-фотосенсибілізаторів, що чинить мінімальну нейротоксичну дію та профарбовує всі оболонки очного яблука, особливо судинний тракт.

Мета: вивчити динаміку клінічних проявів та мікробіологічного статусу при модельованому стафілококовому ендофтальміті у кроликів при використанні антимікробної фотодинамічної терапії з 0,1 % метиленовим синім.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ. Для експериментального дослідження були відібрані 60 дорослих здорових кроликів породи шиншила (120 очей) з масою тіла 2,5–3,0 кг. Всі кролики перебували в стандартних умовах та отримували стандартне харчування. Лабораторні тварини були поділені на дві групи, у яких був змодельований стафілококовий ендофтальміт. Перша група (контрольна), що включала 30 кроликів, не отримувала лікування стафілококового ендофтальміту. Друга група (основна), з такою ж кількістю кроликів, на другу добу після інокуляції збудника почала отримувати антимікробну фотодинамічну терапію з 0,1 % метиленовим синім [1].

Експериментальний стафілококовий ендофтальміт був отриманий на основі моделі, запропонованої О. В. Зборовською. Для цього під місцевою анестезією оксибупрокаїном за допомогою інсулінового шприца інтравітреально вводили 0,1 мл (150000 МТ) добової культури музейного штаму мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* ATCC 25923F — 49 ($1,5 \times 10^5$ КОЕ/см³). [3].

На основі раніше проведеного дослідження *in vitro* Н. В. Пасечніковою, О. В. Зборовською та Н. А. Самолук, встановлено, що рід *Staphylococcus aureus* (тест штаму ATCC 25923) значно пригнічується при використанні 0,1 % метиленового синього, що виступає як фотосенсибілізатор, в комбінації з низькоенергетичним лазерним випромінюванням з довжиною хвилі 630 нм тривалістю 3 та 5 хв. [5]. Тому, починаючи з другої доби експерименту, на всіх очах кроликів основної групи щоденно проводилась АФДТ з 0,1 % метиленовим синім. Після місцевої інстиляції анестетика оксибупрокаїну, субкон'юнктивально (у верхнє склепіння кон'юнктиви) введено 0,8 мл 0,1 % стерильного водного розчину метиленового синього (з додаванням 0,2 мл 2 % лідокаїну). Через 30 хв транскорнеально та через 2 години транспупілярно проводилось опромінення діодним лазером довжиною хвилі 630–670 нм та діаметром плями 3000 мкм на протязі 3 хвилин. По ходу експерименту, що тривав 31 день, оцінювали динаміку клінічної картини, яку виражали в балах (табл. 1) [10]. Клінічну картину оцінювали, спираючись на зовнішній огляд, огляд в прохідному світлі, огляд при боковому фокальному освітленні, пряму офтальмоскопію та ехобіометрію. Проводилось кольорове фотографування переднього відрізка ока.

Перед інфікуванням та у дні виводу тварин з експерименту (3, 7, 10, 14, 21, 30 дні після інокуляції збудника) у досліджуваних кроликів були взяті волога передньої камери (ВПК) та склисте тіло (СТ) для аналізу мікробіологічного статусу. Досліджувані середовища були посіяні на 5 % кров'яний агар і «Середовище для контролю стерильності» та через 24 та 48 годин після посіву проаналізовані результати.

РЕЗУЛЬТАТИ. У всіх кроликів двох груп була виконана модель експериментального ендофтальміту. Вже на другу добу після інокуляції збудника при клінічному огляді всіх очей контрольної та основної груп були зафіксовані початкові ознаки ендофтальміту. Це проявлялось в більшій чи в меншій мірі у вигляді вираженої ін'єкції та хемозу кон'юнктиви, значних гнійних виділень з кон'юнктиви, набряку рогівки, опалесценції вологи передньої камери, набряку райдужки та помутніння склистого тіла. Далі динаміка клінічних проявів в двох групах відрізнялась (табл.2).

Шкала оцінки клінічних змін при гострому ендодфальміті в балах

Шкала (бали)	Кон'юнктива	Рогівка	Райдужка	Скliste тіло
0	Нормальна	Прозора	Нормальна	Прозоре
1	Помірний набряк	Фокальний набряк	Помірна гіперемія	Наявні ділянки помутнінь, червоний рефлекс збережений, видно деталі очного дна
2	Набряк, помірна гіперемія, легкий ексудат	Дифузний набряк	Значна гіперемія	Помірно- мутне, рефлекс з очного дна слабо-рожевий, деталей очного дна не видно
3	Набряк, значна гіперемія, значний ексудат	Мутна	Значна гіперемія, синехії, нерухома або в'ялорухома зіниця	Немає рефлексу з очного дна

Таблиця 2

Характеристика динаміки клінічних змін при експериментальному стафілококовому ендодфальміті у контрольній та основній групах кроликів в балах (M±m)

Дні	Групи кроликів	Кон'юнктива	Рогівка	Райдужка	Скliste тіло	Культура St.aureus у ВПК	Культура St.aureus у СТ
3	контрольна	2,76±0,36	1,6±1,07	2,53±0,7	2,4±0,6	+	+
	основна	2,03±0,48	1,33±0,55	1,98±0,52	2,3±0,58	+	+
7	контрольна	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	+	+
	основна	0,54±0,52	0,72±0,57	1,6±0,7	2,86±0,24	+	+
10	контрольна	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	+	+
	основна	0,15±0,26	0,57±0,69	1,42±0,61	3,0±0,0	-	+
14	контрольна	2,9±0,18	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	+	+
	основна	0,1±0,13	0,27±0,48	0,3±0,54	3,0±0,0	-	-
21	контрольна	2,15±0,59	2,3±0,63	2,5±0,65	3,0±0,0	+	+
	основна	0,0±0,0	0,25±0,45	0,2±0,36	3,0±0,0	-	-
30	контрольна	1,8±1,08	2,0±0,8	2,1±0,72	3,0±0,0	+	+
	основна	0,0±0,0	0,0±0,0	0,2±0,32	3,0±0,0	-	-

В контрольній групі (60 очей) у 70 % випадків (42 ока) запальна реакція протікала у вигляді гострого ендодфальміту з швидким прогресуванням процесу, у 30 % (18 очей) у вигляді гострого ендодфальміту, але з переходом у хронічний. До кінця експерименту на 10 очах відбулась перфорація очного яблука з витіканням внутрішньоочного вмісту. В основній групі на другий та третій дні на 8 очах (13 %) картина внутрішньоочного запалення була менш виражена. У решти 52 очей (87 %) була виражена змішана ін'єкція очного яблука, значний хемоз, поверхневий або стромальний набряк рогівки, опалесценція вологи передньої камери, гіперемія райдужки та помутніння в склистому тілі. З них на 3 очах клінічна картина характеризувала розвиток панофтальміту. Вже починаючи з сьомої доби експерименту відмічалось значне стухання запального процесу, а з 14 дня і до кінця експерименту тільки на 3 очах залишались ознаки панофтальміту, але з дещо меншою вираженістю запалення (зменшився набряк повік, хемоз, рогівка дещо просвітліла). У решти очей відмічалася відсутність хемозу та ін'єкції очного яблука, набряку рогівки та іриту, рефлекс з очного дна білий.

Середовища для оцінки мікробіологічного статусу (ВПК та СТ) всіх досліджуваних очей до інфи-

кування були стерильними. У контрольній групі у всі дні мікробіологічного дослідження відмічався стабільний бактеріальний ріст у СТ та з поступовим зменшенням у ВПК. В основній групі зникнення росту *Staphylococcus aureus* у волозі передньої камери відмічається з 10 дня та у склистому тілі з 14 дня експерименту. Кількісна характеристика в колонієутворюючих одиницях (КУО) динаміки росту культури *Staphylococcus aureus* після інокуляції у двох групах представлена у таблицях 3 та 4.

Таким чином, антимікробна фотодинамічна терапія з 0,1 % метиленовим синім чинить деструктивну дію на *Staphylococcus aureus* при екзогенному стафілококовому ендодфальміті, що проявляється стуханням клінічної картини запального процесу та санацією очного яблука.

ВИСНОВКИ

1. Використання низькоенергетичного лазерного випромінювання з фотосенсибілізатором 0,1 % метиленовим синім при лікуванні екзогенного стафілококового ендодфальміту у 90 % випадків призводить до повної регресії процесу на 14 день експерименту.

Таблица 3

Кількісна характеристика (КУО) культури *Staphylococcus aureus* у волозі передньої камери та склистого тіла очей контрольної групи кроликів

День після інфікування	ВПК	СТ
3	1×10^4	$3,5 \times 10^5$ ($1 \times 10^4 - 1 \times 10^6$)
7	8×10^3 ($0 - 1 \times 10^4$)	$1,3 \times 10^6$ ($1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$)
10	8×10^3 ($1 \times 10^2 - 1 \times 10^4$)	$8,2 \times 10^3$ ($1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$)
14	2×10^3 ($1 \times 10^1 - 1 \times 10^4$)	1×10^6
21	$3,4 \times 10^1$ ($0 - 1 \times 10^2$)	$6,4 \times 10^5$ ($1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$)
30	менше 1×10^1 ($0 - 1 \times 10^2$)	$5,1 \times 10^3$ ($0 - 1 \times 10^4$)

Таблица 4

Кількісна характеристика культури *Staphylococcus aureus* (КУО) у волозі передньої камери та склистого тіла очей основної групи кроликів

День після інфікування	ВПК	СТ
3	$9,1 \times 10^3$ ($1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$)	$3,7 \times 10^5$ ($1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$)
7	$1,4 \times 10^1$ ($0 - 1 \times 10^2$)	$1,4 \times 10^4$ ($1 \times 10^2 - 1 \times 10^5$)
10	немає	1×10^2 ($0 - 1 \times 10^2$)
14	немає	немає
21	немає	немає
30	немає	немає

2. Під впливом антимікробної фотодинамічної терапії з 0,1 % метиленовим синім санація вологи передньої камери відбувається на 10 день після інфікування та санація склистого тіла на 14 день експериментального дослідження.

ЛІТЕРАТУРА

1. Аль-Асталь Мухамед Салих. Фотодинамическая терапия неоваскуляризации роговицы с применением метиленового синего и лазерного излучения дли-

ной волны 578 нм: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.08. / Респуб. гос. казенное предпр. «Казахский ордена «Знак почета» научно-исследовательский институт глазных болезней». — Алматы, 2006. — 24 с.

2. Зборовская А. В. Фотодинамическая терапия с 0,1 % метиленовым синим в комбинации с 10 % диметилсульфоксидом в лечении эндофтальмитов бактериальной этиологии // Офтальмол. журн. — 2011. — № 3. — С. 70–72.

3. Зборовская А. В., Кустрин Т. Б., Насинник И. О. Экспериментальная модель бактериального эндофтальмита. // Офтальмол. журн. — 2011. — № 4. — С. 81–83.

4. Коробоев. У. М. Фотодинамическая терапия гнойных ран и трофических язв: Дисс. д-ра мед. наук. — М., 2001. — 178 с.

5. 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. — № 1–2. — 2009. — С. 88–91.

6. Abu el-Asrar A. M. Al-Amro SA, al-Mosallam AA, al-Obeidan S. Post-traumatic endophthalmitis; causative organisms and visual outcome // Eur J ophthalmol. — 1999. — V.9. — P.21–31.

7. Dusch-Samper A., Menezo J., Hurtado-Sario M. Endophthalmitis following penetrating eye injuries // Acta Ophthalmol.Scand. — 1997. — Vol. 75. — № 1. — P.104–106.

8. Endophthalmitis Vitrectomy Study Group. Microbiologic factors and visual outcome in the Endophthalmitis Vitrectomy Study // Am. J. Ophthalmol. — 1996. — Vol. 122. — P. 830–846.

9. Huang, John J., Gaudio, Paul A. Ocular Inflammatory Disease and Uveitis Manual: Diagnosis and Treatment. 1st Edition — 2010. Lippincott Williams & Wilkins. — 250.

10. Peyman G. A., Paque J. T., Meisels H. I., and Bennett T. O.: Postoperative endophthalmitis: A comparison of methods for treatment and prophylaxis with gentamicin // Ophthalmic Surg. — 1975. — P.26–35.

Поступила 23.04.2012

Рецензент д. м. н. В. В. Савко

DYNAMICS OF THE CLINICAL PICTURE AND MICROBIOLOGICAL RESULTS IN USING ANTIBACTERIAL PHOTODYNAMIC THERAPY WITH METHYLENE BLUE IN EXPERIMENTAL STAPHYLOCOCCAL ENDOPHTHALMITIS

Zborovska O. V., Kuryltsiv N. B.

Odessa, Ukraine

To determine the effects of antibacterial photodynamic therapy with methylene blue there were made the experimental studies on 60 rabbits. All experimental animals were divided into two groups: controls (30 rabbits) — without any treatment, and experimental animals (30 rabbits) — using antibacterial photodynamic therapy with 0.1 % methylene blue. *Staphylococcus aureus* endophthalmitis was modeled in all eyes by intravitreal injection of 0.1 ml (150000 CFU) *Staphylococcus aureus* sample (ATCC 25923F-49). After analyzing the clinical examination and culture results, our studies demonstrate that in the experimental group full reduction of inflammation in 90 % eyes was reached on the 14th day, bacterial culture was absent in the aqueous samples on the 10th day and in all vitreous samples — on the 14th day after inoculation.