

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2020-24(1)-25

УДК: 547.962.9:612.8

МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПСЕВДОМОНАДНОГО КЕРАТИТУ: МІКРОБІОЛОГІЧНІ ТА КЛІНІЧНІ АСПЕКТИ

Малачкова Н.В., Кривецька Н.В., Вовк І.М., Коваленко І.М., Крижановська А.В.

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

Відповідальний за листування:
e-mail: kryvetska.n@gmail.com

Статтю отримано 22 листопада 2019 р.; прийнято до друку 26 грудня 2019 р.

Анотація. Протягом останніх десяти років відмічається зростання частоти бактеріальних кератитів, викликаних *Pseudomonas aeruginosa*, особливо у людей, які користуються контактними лінзами. Певні особливості перебігу таких кератитів, механізми ураження рогівки, фактори, які впливають на важкість та глибину деструкції тканин, залишаються не повністю з'ясованими. Тому метою нашої роботи було змодельовати експериментальний псевдомонадний кератит у кролів з використанням різних способів інфікування та дослідити мікробіологічні та клінічні аспекти перебігу кератиту залежно від способу зараження. В результаті проведеного дослідження нам вдалось відтворити поверхневий та глибокий кератит за різних способів інфікування. Запропонований нами спосіб інфікування кролів із використанням плівкових форм бактерій на контактній лінзі дозволив відтворити важкий за перебігом кератит з більш тривалим виділенням збудника з поверхні ураженої рогівки. Було також встановлено, що результати мікробіологічного дослідження матеріалу з ураженого ока не корелюють з перебігом важкого кератиту: негативні результати мікробіологічного дослідження не дозволяють робити висновки про елімінацію збудника із тканин ока, який заглиблюється у тканини рогівки та підтримує розвиток патологічного процесу, що було нами підтверджено шляхом мікробіологічного дослідження аутопсійних зразків ураженої рогівки. Зазначені моделі відтворення кератиту можуть бути використані для вивчення патоморфологічних, патофізіологічних особливостей перебігу кератиту, викликаного *Pseudomonas aeruginosa*, для проведення доклінічних досліджень антипсевдомонадних препаратів, оптимізації існуючих протоколів лікування кератиту.

Ключові слова: *Pseudomonas aeruginosa*, експериментальний кератит.

Вступ

В Україні в загальній структурі захворювань ока кератити становлять 4,2% [1]. Одним із факторів ризику виникнення кератитів є носіння контактних лінз: за різними даними від 55% до 75% кератитів пов'язані з використанням контактних лінз, і близько 30-40% носіїв контактних лінз звертаються за офтальмологічною допомогою з приводу бактеріальних кератитів [7, 8, 11, 12]. Провідну роль у виникненні бактеріального кератиту відіграють коагулазо-негативні стафілококи та *S. aureus* (33-46%), однак частота кератитів, викликаних неферментуючими грам-негативними паличками, а саме *P. aeruginosa*, яку виділяють у 22-40% хворих на бактеріальний кератит, зростає протягом останніх 10 років [8, 11]. Псевдомонадні кератити мають важкий перебіг, високий ризик розвитку ускладнень, і більш резистентні до антимікробної терапії [8, 12].

Експериментальні моделі бактеріальних кератитів є зручним інструментом для вивчення морфології, патогенетичних механізмів ураження рогівки, розробки нових та корекції існуючих схем терапії, складання прогностичних критеріїв залежно від перебігу захворювання та ін. [6, 10].

Метою нашого дослідження було створити експериментальну модель псевдомонадного кератиту на кролях із застосуванням різних методик інфікування рогівки, в тому числі - асоційованого з контактною лінзою.

Матеріали та методи

Псевдомонадний кератит в експерименті відтворюю-

вали шляхом нанесення на деепітелізовану поверхню рогівки кроля завсучу добової культури *P. aeruginosa* в кількості 0,2-0,4 мл з покриванням рогівки м'якою контактною лінзою та без неї за розробленою методикою [2, 3].

Для зараження використовували клінічний штам *P. aeruginosa*, отриманий з музею бактеріальних культур бактеріологічної лабораторії Вінницького національного медичного університету (ВНМУ) ім. М.І. Пирогова у вигляді завсучу добової культури мікроорганізму в концентрації 5×10^8 КУО/мл, що відповідає стандарту мутності МакФарланда на 0,5 ОД.

У дослідженні були використані 24 дорослих кролі різної статі породи Шиншила вагою 3-3,5 кг, які утримувались в окремих клітках і знаходились на однаковому харчовому раціоні у віварії науково-дослідного центру (НДЦ) ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Кератит моделювали на одному з очей кожної тварини. Експеримент виконували із дотриманням біоетичних норм, регламентованих Європейською конвенцією щодо захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментів або з іншою науковою метою ETSN123 (Страсбург, 18 березня, 1986 р.).

Залежно від способу інфікування тварини були розділені на 2 групи по 12 тварин у кожній групі. У першій групі мікробну суспензію закривали на поверхню ока після деепітелізації рогівки. У решти тварин деепітелізовану поверхню рогівки закривали на 16-24 годин м'якими контактними лінзами (МКЛ) з матеріалу балафіл-

кон А (PureVision2, виробник Bausch+Lomb; США), на яких підрошували плівкові форми штаму *Pseudomonas aeruginosa*. Для цього стерильні лінзи занурювали у виготовлений завис добової бактеріальної культури у м'ясо-пептонному бульйоні (концентрація клітин 10^6 - 10^7 в 1 мл) та інкубували при температурі 37°C протягом 48 годин для утворення мікробної біоплівки на верхній лінзі. Спостереження за тваринами вели протягом 7-10 діб, при цьому враховували клінічні ознаки кератиту, забирали матеріал для мікробіологічного дослідження та проводили офтальмологічне дослідження рогівки з флуоресцеїновою пробєю. Через 7-10 діб тварин виводили з експерименту в асептичних умовах шляхом повітряної емболії ($1-1,5 \text{ cm}^3$) через вушну вену з подальшим заборою рогівки для мікробіологічного та гістологічного дослідження.

Клінічну оцінку стану очей кролів проводили за бальною системою Дрейзе (від 0 до 3 балів) з урахуванням ступеня запальної реакції ока, інтенсивності помутніння рогівки, строків епітеалізації її поверхні [4].

Важкість кератиту оцінювали за площею ураження та наявністю деструктивних змін:

- помірний кератит: помутніння рогівки на площі, що не перевищує зону проведення деепітелізації; через помутніння ідентифікуються глибші структури ока;
- кератит середньої важкості: помутніння рогівки на площі, що виходить за межі зони деепітелізації, але не далі, ніж на діаметр рогівки в будь-якому напрямі; через помутніння частково ідентифікуються глибші структури ока; можливі фібринові нашарування;
- важкий кератит: субтотальне або тотальне помутніння, деформація кривизни рогівки, глибші структури ока не ідентифікуються; формування абсцесу та прободіння рогівки.

Для мікробіологічного дослідження матеріал з обох очей забирали стерильним тампоном з інтервалом 24 години від моменту зараження до виведення тварин з експерименту. Для визначення кількості мікроорганізмів в забраному матеріалі проводили висів матеріалу методом "тампон-петля" на м'ясо-пептонний агар, після добової інкубації в термостаті проводили підрахунок колоній *Pseudomonas aeruginosa* для визначення кількості мікроорганізмів в 1 мл клінічного матеріалу [5], і визначали середній результат. Після виведення тварин з експерименту асептично забраний сегмент ураженої рогівки вносили в стерильний м'ясо-пептонний бульйон та інкубували в термостаті 24-48 годин з наступним висівом вмісту середовища на щільний поживний агар для ідентифікації *P. aeruginosa*.

Результати. Обговорення

У ході експериментального дослідження встановлено, що важкість та динаміка перебігу кератиту у кролів значною мірою визначається способом інфікування поверхні ока тварин та наявністю контактної лінзи. Так, у більшості (9 з 12) тварин I групи виник помірний кера-

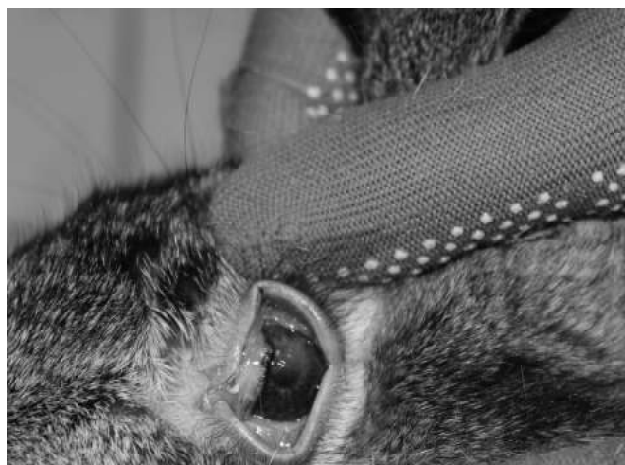


Рис. 1. Помірний кератит.

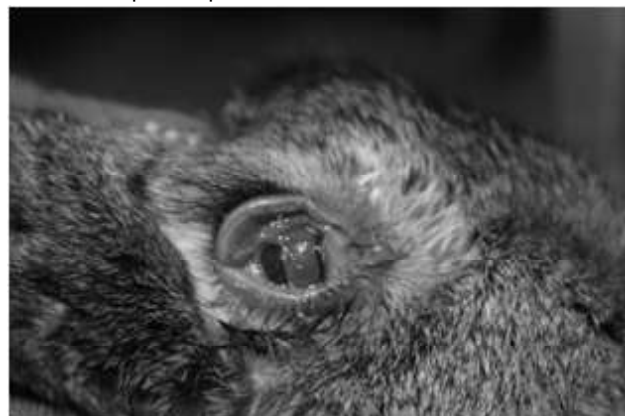


Рис. 2. Кератит середньої важкості.



Рис. 3. Важкий кератит.

тит з локальним набряком і запальною інфільтрацією рогівки, інтенсивним забарвленням дефекту флуоресцеїном. Спостерігалась помірна чи інтенсивна гіперемія кон'юнктиви, хемоз, переважно помірні гнійні виділення, набряк та почервоніння третьої повіки (рис. 1).

У трьох випадках розвивався кератит середнього ступеня, при цьому гіперемія кон'юнктиви, хемоз, набряк та почервоніння третьої повіки були більш інтен-



Рис. 4. Абсцес рогівки.

сивними, спостерігались рясні гнійні виділення (рис. 2).

Запальні зміни з боку кон'юнктиви самостійно зменшувались протягом 4-6 діб, епітелізація дефекту рогівки наступала на 7-9 добу із частковим або майже повним відновленням її прозорості.

У тварин II групи запальний процес характеризувався значно більшою площею та інтенсивністю уражень, котрі були розцінені як кератит середньої важкості у 8 випадках та важкий на 4 очак. Виявлялась інтенсивна гіперемія бульбарної кон'юнктиви та третьої повіки з вираженим хемозом, рясними гнійними виділеннями, часто - із залипанням повік. Характерним було значне розповсюдження площі помутніння рогівки до субтотального та тотального, її набряк. Через виражену інтенсивність помутніння глибші структури ока проглядалися лише частково чи не ідентифікувались (рис. 3).

При зафарбовуванні флуоресцеїном виникала картина глибокого проникнення барвника з поширенням по всій площі. Важкий кератит супроводжувався деформацією рогівки з втратою її сферичності. У двох випадках сформувався абсцес рогівки (рис. 4), в одному наступила перфорація рогівки.

У динаміці зменшення запальних проявів відбувалося значно повільніше, ніж у першій групі. Інтенсивні зміни з боку кон'юнктиви, третьої повіки (набряк, гноєвиділення) тривали 4-5 діб, проте гіперемія зберігалась до 10-11 доби. Площа помутніння рогівки, її набряк зменшувались поступово з периферії, починаючи з 6-7 доби. Дефект поверхні рогівки епітелізувався на 12-14 добу, проте із формуванням стійкого помутніння у всіх випадках.

Результати мікробіологічного дослідження матеріалу з ураженої поверхні рогівки наведені в таблиці 1.

Слід відмітити, що позитивні культури були отримані протягом перших трьох-чотирьох діб від моменту інфікування, незалежно від важкості перебігу кератиту, хоча кількість мікроорганізмів на поверхні ураження була різною в залежності від методики інфікування. При застосуванні контактних лінз під час відтворення моделі експериментального кератиту середня кількість мікроорганізмів в матеріалі була в 10^6 - 10^7 разів вищою через 24 години після зараження, ніж у групах тварин, у яких кератит спричиняли тільки інфікуванням деепітелізованої рогівки. Кількість бактерій зменшувалась в майже 36 000 разів через 24-48 годин після видалення лінзи в цих групах, в той час як в першій групі через 72 години після інфікування *P. aeruginosa* не виявлялась, хоча в посівах визначалась інша мікрофлора (стафілококи, бацили, плісняві гриби) у кількості не більше 10 мікроорганізмів в 1 мл.

У першій групі кролів бактеріальні культури щодо *P. aeruginosa* були позитивними перші три доби спостереження, а їх кількість в 200-700 разів меншою, ніж у матеріалі тварин другої групи. На п'яту добу спостереження культури були негативними щодо збудника експериментального кератиту у обох групах, однак були присутні інші мікроорганізми в незначній кількості (до 10 КУО/мл). Результати висіву сегменту рогівки були позитивними в 11 випадках із 12 досліджених зразків у другій групі після виведення тварин з експерименту, в той час як у першій групі синьогнійну паличку виділили тільки з двох зразків. Негативні культури з поверхні ураження з одночасним бактеріологічним виявленням *P. aeruginosa* у стромі рогівки можна пояснити поглибленням процесу за рахунок дії факторів вірулентності збудника (протеази, екзотоксин А), внаслідок чого бактерії уникають дії місцевих факторів захисту та вимивання сльозою, перебуваючи в аваскулярній тканині рогівки [9, 10]. Результати мікробіологічного дослідження та важкість перебігу кератиту корелюють тільки частково, на початку спостереження. Нами доведено, що навіть при важких кератитах з розвитком ускладнень, бактеріологічне дослідження матеріалу з поверхні ураження рогівки може давати негативний результат, що знаходить підтвердження в інших наукових дослідженнях [7, 12].

Таблиця 1. Мікробіологічне дослідження при експериментальному псевдомонадному кератиті кролів у різних групах спостереження (кількість *P. aeruginosa* в 1 мл матеріалу, $X_{ср} \pm \sigma$).

Група	Доба спостереження					Бактеріологічне дослідження рогівки
	I	II	III	IV	V	
I	84,6±18,7	25,4±5,4	3,3±1,4*	0*	0*	Негативне (10 із 12)
II	(63,7±4,1) × 10 ⁷	(17,7±8,3) × 10 ³	(6,3±1,5) × 10 ²	42,5±9,4*	0*	Позитивне (11 із 12)

Примітка: 0* - у матеріалі не виявляється *P. aeruginosa*, присутня інша флора. n* - у матеріалі мішана мікрофлора, де n - кількість *P. aeruginosa*.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Запропоновані моделі псевдомонадного кератиту дозволяють не лише відтворити бактеріальне ураження рогівки в експерименті, але й дають можливість викликати кератити різної важкості шляхом використання різних методик інфікування.

2. Отримані результати свідчать, що за наявності контактної лінзи псевдомонадний кератит стає значно агресивнішим та супроводжується важкими за глиби-

ною та поширенням ураженнями.

Запропоновані моделі розширюють можливості вивчення в експерименті мікробіологічних та морфологічних аспектів перебігу кератиту, змін локального специфічного та неспецифічного захисту при псевдомонадній інфекції ока, динаміки розвитку запального процесу, бактеріального ушкодження та регенерації рогівки, в тому числі під впливом різних схем лікування.

Список посилань

1. Ефимова, Ю. В., & Витовская, О. П. (2015). Эффективность применения фторхинолонов в лечении кератитов. *Архів офтальмології України*, 3 (2), 65-69. Взято з <http://ophthalmolog.kiev.ua/images/docs/keratitis.pdf>.
2. Малачкова, Н. В., Кривецька, Н. В., Вовк, І. М., & Кривецький, В. Ф. (2020). Патент України 141155. Київ: Державне патентне відомство України.
3. Малачкова, Н. В., Кривецька, Н. В., Вовк, І. М., & Кривецький, В. Ф. (2020). Патент України 141156. Київ: Державне патентне відомство України.
4. Петруня, А. М., & Кутайни, М. А. (2013). Изучение клинических признаков воспалительного процесса в роговой оболочке при одновременном моделировании кератита и конъюнктивита в эксперименте. *Офтальмологический журнал*, 2, 83-88. Взято с http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ofzh_2013_2_18.
5. Шелкова, Н. Г., & Прокопеч, В. П. (2009). Метод кількісного дослідження вмісту бактерій у клінічних матеріалах, що відібрані за допомогою ватного тампону. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО*, 17 (2), 698-702. Київ.
6. Begum Bulam Kilic, Dilek Dursun Altiors, Muge Demirbilek, & Ersin Ogus. (2017). Comparison between corneal cross-linking, topical antibiotic and combined therapy in experimental bacterial keratitis model. *Saudi Journal of Ophthalmology*, 32 (2), 97-104. DOI: 10.1016/j.sjopt.2017.10.003.
7. Green, M., Apel, A., & Stapleton, F. (2008). Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. *Cornea*, 27 (1), 22-27. doi: 10.1097/ICO.0b013e318156caf2.
8. Jin, H., Parker, W. T., Law, N. W., Clarke, C. L., Gissman, J. D., Pflugfelder, ... Al-Mohtaseb, Z. N. (2017). Evolving risk factors and antibiotic sensitivity patterns for microbial keratitis at a large county hospital. *The British Journal of Ophthalmology*, 101 (11), 1483-1487. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2016-310026.
9. Marquart, M. E. (2011). Animal Models of Bacterial Keratitis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 680642. doi: 10.1155/2011/680642.
10. McClellan, S., Jiang, X., Barrett, R., & Hazlet, L. D. (2015). High mobility Group Box 1: A Novel Target for Treatment of Pseudomonas aeruginosa keratitis. *Journal of Immunology*, 194, 1776-1787. doi: 0.4049/jimmunol.1401684.
11. Truong, D. T., Bui, M.-Th., Memon, P., & Dwight Cavanagh, H. (2015). Microbial Keratitis at an Urban Public Hospital: A 10-Year Update. *Journal of Clinical and Experimental Ophthalmology*, 6 (6), 498. doi: 10.4172/2155-9570.1000498.
12. Zimmerman, A. B., Nixon, A. D. & Rueff, E. M. (2016). Contact lens associated microbial keratitis: practical considerations for the optometrist. *Clinical Optometry*, 8, 1-12. doi: 10.2147/OPTO.S66424.
13. Efimova, Yu. V., & Vitovskaya, O. P. (2015). Эффективность применения фторхинолонов в лечении кератитов. *Архів офтальмології України*, 3 (2), 65-69. Взято з <http://ophthalmolog.kiev.ua/images/docs/keratitis.pdf>.
14. Malachkova, N. V., Kryvetska, N. V., Vovk, I. M., & Kryvetskiy, V. F. (2020). Patent Ukraine 141155. Kyiv: State Patent Office of Ukraine.
15. Malachkova, N. V., Kryvetska, N. V., Vovk, I. M., & Kryvetskiy, V. F. (2020). Patent Ukraine 141156. Kyiv: State Patent Office of Ukraine.
16. Petrunya, A. M., & Kutajni, M. A. (2013). Izuchenie klinicheskikh priznakov vospalitel'nogo processa v rogovoy obolochke pri odnovremennom modelirovanii keratita i konyunktivita v eksperimente [Study of clinical inflammatory signs in a cornea at simultaneous experimental keratitis and conjunctivitis]. *Oftalmologicheskij zhurnal - Journal of Ophthalmology*, 2, 83-88. Vzyato s http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ofzh_2013_2_18.
17. Shelkova, N. H., & Prokopets, V. P. (2009). Metod kilkisnogo doslidzhennia vmistu bakterii u klinichnykh materialakh, shcho vidibrani za dopomohoiu vatnoho tamponu [Quantitative assay of bacterial number in clinical samples collected with cotton swabs]. *Zbirnyk naukovykh prats spivrobotnykiv NMAPO - Scientific works collection of NMAPE*, 17, (2), 698-702. Kyiv.
18. Begum Bulam Kilic, Dilek Dursun Altiors, Muge Demirbilek, & Ersin Ogus. (2017). Comparison between corneal cross-linking, topical antibiotic and combined therapy in experimental bacterial keratitis model. *Saudi Journal of Ophthalmology*, 32 (2), 97-104. DOI: 10.1016/j.sjopt.2017.10.003.
19. Green, M., Apel, A., & Stapleton, F. (2008). Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. *Cornea*, 27 (1), 22-27. doi: 10.1097/ICO.0b013e318156caf2.
20. Jin, H., Parker, W. T., Law, N. W., Clarke, C. L., Gissman, J. D., Pflugfelder, ... Al-Mohtaseb, Z. N. (2017). Evolving risk factors and antibiotic sensitivity patterns for microbial keratitis at a large county hospital. *The British Journal of Ophthalmology*, 101 (11), 1483-1487. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2016-310026.
21. Marquart, M. E. (2011). Animal Models of Bacterial Keratitis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 680642. doi: 10.1155/2011/680642.
22. McClellan, S., Jiang, X., Barrett, R., & Hazlet, L. D. (2015). High mobility Group Box 1: A Novel Target for Treatment of Pseudomonas aeruginosa keratitis. *Journal of Immunology*, 194, 1776-1787. doi: 0.4049/jimmunol.1401684.
23. Truong, D. T., Bui, M.-Th., Memon, P., & Dwight Cavanagh, H. (2015). Microbial Keratitis at an Urban Public Hospital: A 10-Year Update. *Journal of Clinical and Experimental Ophthalmology*, 6 (6), 498. doi: 10.4172/2155-9570.1000498.
24. Zimmerman, A. B., Nixon, A. D. & Rueff, E. M. (2016). Contact lens associated microbial keratitis: practical considerations for the optometrist. *Clinical Optometry*, 8, 1-12. doi: 10.2147/OPTO.S66424.

References

1. Efimova, Yu. V., & Vitovskaya, O. P. (2015). Effektivnost

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПСЕВДОМОНАДНОГО КЕРАТИТА: МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Малачкова Н.В., Кривецкая Н.В., Вовк И.Н., Коваленко И.Н., Крыжановская А.В.

Аннотация. В течение последнего десятилетия наблюдается увеличения частоты бактериальных кератитов, вызванных *Pseudomonas aeruginosa*, особенно у пациентов, которые пользуются контактными линзами. Особенности течения подобных кератитов, механизмы поражения роговицы, факторы, влияющие на тяжесть и глубину деструкции тканей, остаются невыясненными до конца. Поэтому целью нашей работы стало смоделировать экспериментальный псевдомонадный кератит у кроликов с использованием разных способов инфицирования и исследовать микробиологические и клинические аспекты течения кератита в зависимости от способа инфицирования. В результате проведенного исследования нами были созданы экспериментальные модели поверхностного и глубокого кератитов при использовании различных методов инфицирования. Предложенный нами способ инфицирования животных с использованием биопленок на контактных линзах позволил создать модель тяжелого кератита с более длительным выделением возбудителя с поверхности пораженной роговицы. Также было установлено, что результаты микробиологического исследования материала с поверхности роговицы не полностью отображают течение тяжелого кератита: негативные результаты культурального метода не свидетельствуют об элиминации возбудителя из тканей глаза, так как бактерии проникают в роговицу и поддерживают развитие патологического процесса, что было подтверждено позитивными культурами, полученными из тканей роговицы после энуклеации пораженных глаз животных. Используемые модели псевдомонадного кератита могут быть применены для изучения патоморфологических, патофизиологических особенностей течения кератита, вызванного *Pseudomonas aeruginosa*, для проведения доклинических испытаний антипсевдомонадных препаратов, оптимизации существующих протоколов лечения кератита.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, экспериментальный кератит.

MODELS OF EXPERIMENTAL PSEUDOMONAS KERATITIS: MICROBIOLOGICAL AND CLINICAL ASPECTS

Malachkova N.V., Kryvetska N.V., Vovk I.M., Kovalenko I.M., Kryzhanovskaya A.V.

Annotation. Over the last ten years, there has been an increase in the incidence of bacterial keratitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*, associated with contact lenses use. Certain features of the course of such keratitis, the mechanisms of corneal damage, the factors that affect the severity and depth of tissue destruction remain unclear. Therefore, the aim of our work was to model experimental pseudomonal keratitis in rabbits using different methods of infection and to investigate the microbiological and clinical aspects of keratitis depending on the method of infection. As a result of the study, we were able to reproduce superficial and deep keratitis with different methods of infection. Our proposed method cornea infection with bacterial films on a contact lens allowed to reproduce severe keratitis with a longer release of the pathogen from the surface of the affected cornea. It was also found that the results of microbiological examination of the material from the affected eye do not correlate with the course of severe keratitis: negative results of microbiological examination did not demonstrate the elimination of the pathogen from eye tissues, which deepens into corneal tissues, that was proved with microbiological examination of the cornea autopsy samples. These models of experimental keratitis can be used to study the pathomorphology, and pathophysiology of the keratitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*, as well as to conduct experimental research of new antimicrobials and improve current guidelines for treatment of this pathology.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, experimental keratitis.
