

Л.Г.Мішина¹
Ю.Й.Салдан¹
М.С.Пушкар¹
Й.Р.Салдан¹
І.І.Герашенко¹
О.В.Валігура²

¹ Вінницький національний
медичний університет
ім.М.І.Пирогова

² Обласна клінічна лікарня
ім.М.І.Пирогова
м.Вінниця

Ключові слова: бактеріальний кератит, епітелій рогівки, наносуспензія силіксу, левоміцетин, ципрофлоксацин.

Надійшла: 02.10.2007

Прийнята: 14.12.2007

УДК 615.457.5

ЛІКУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КЕРАТИТУ КРАПЛЯМИ ЛЕВОМІЦЕТИНУ ТА ЦИПРОФЛОКСАЦИНУ НА ОСНОВІ НАНОСУСПЕНЗІЇ СИЛІКСУ

Резюме. Метою дослідження було вивчення динаміки гістоморфологічних змін в рогівці очей піддослідних тварин при лікуванні експериментального кератиту очними краплями на основі наносуспензії силіксу. Об'єкт дослідження - очні краплі, що містять наносуспензію силіксу, глюкозу, а також левоміцетин або ципрофлоксацин. Методи дослідження. Проводили мікроскопічні дослідження гістологічних зрізів рогівки, пофарбованих гематоксилін-еозином. Виготовляли фотоілюстрації за допомогою фотографічної системи "Leika" і кольорової плівки фірми «Kodak». Загальні результати. Охарактеризовано гістоморфологічні зміни в роговій оболонці очей піддослідних тварин після відтворення моделі бактеріального кератиту та його лікування згаданими очними краплями протягом двох тижнів. У всіх тварин дослідних груп спостерігався чіткий зв'язок між часом, коли розпочинали лікування (на другу чи на третю добу після інфікування), і клінічним перебігом хвороби. Висновки. Експериментально доведено, що суспензія силіксу з левоміцетином або ципрофлоксацином справляє кращу дію на регенераторний процес у передньому епітелії рогівки, аніж індивідуальні розчини левоміцетину та ципрофлоксацину, відповідно. Встановлено, що лікування бактеріального кератиту є більш ефективним, якщо його розпочинати на другу добу після відтворення моделі захворювання.

Морфологія.- 2008.- Т.ІІ, №1.- С.80-85

© Л.Г.Мішина, Ю.Й.Салдан, М.С.Пушкар, Й.Р.Салдан, І.І.Герашенко, О.В.Валігура, 2008

Mishina L.G., Saldan J.J., Pushkar M.S., Saldan J.R., Gerashchenko I.I., Valigura O.V. Treatment of experimental keratitis by eye drops which contains nanosuspension of "silics" and levomycetin or ciprofloxacin.

Summary. Aim – To study the histomorphological changes in cornea of rabbits during the treatment of experimental keratitis by the eye drops based on nanosuspension of Silics.

Object of Research - Eye drops containing nanosuspension of Silics, glucose, levomycetin or ciprofloxacin. Research methods – The microscopical study of histological sections of cornea dyed by hematoxylin-eosin was carried out. To prepare microphotos the "Leika" photosystem and colour film «Kodak» were used. Results - The histomorphological changes in cornea of rabbits caused by bacterial keratitis were characterized. The results of treatment of keratitis by the elaborated drops were compared. For all of the groups of animals a clinical progress of disease was in a strong connection with a time of beginning of treatment. Conclusion – It is experimentally stated that suspension of Silics containing levomycetin or ciprofloxacin caused a better healing effect on front epithelium of cornea in comparison with individual solutions of levomycetin and ciprofloxacin. A treatment of bacterial keratitis gives a better result if it begins on second day after start of disease.

Key words: bacterial keratitis, epithelium of cornea, nanosuspension of silica, levomycetin, ciprofloxacin.

Вступ

Кератит є поширеним захворюванням ока. Бактеріальні кератити зустрічаються в 13-20 % серед всієї патології рогівки. У 27,6 % випадків вони обумовлені ушкодженням переднього епітелію рогівки такими збудниками запальних процесів поверхні ока як: Staphylococcus, Streptococcus, Pneumococcus, Pseudomonas, Escherichia coli, Neisseria, Proteus vulgaris, Moraxella (Майчук Ю.Ф., 1973, 2000; Сакович В.Н., 1991).

Клінічно наявним стає рогівковий синдром: перикорнеальна гіперемія очного яблука, світлобоязнь, сльозотеча, блефароспазм, відчуття «сто-

роннього тіла». Приєднання бактеріальної інфекції сприяє утворенню в рогівці набряку, що супроводжується втратою прозорості, зниженням чутливості. Згодом інфільтрат може розпадатися з формуванням виразки. За несприятливих умов можливе поглиблення виразки з утворенням десцеметоцеле та перфорацією. У разі сприятливого перебігу процесу в зону пошкодження рогівки врастають судини, внаслідок чого формується рубець, що однак призводить до помутніння рогівки різного ступеня (хмарка, пляма, більмо). Кератити завжди поєднуються з іридоциклітами - запаленням переднього відділу судинної оболонки ока.

Лікування кератитів спрямовано на усунення інфекційного збудника і покращення умов для реалізації регенераторних властивостей епітеліальної оболонки рогівки.

Мета дослідження: виявити гістоморфологічні відмінності в результатах лікування експериментального альтеративного бактеріального кератиту очними краплями, що містять наносуспензію силіксу (розмір часток до 100 нм) з левоміцетином або ципрофлоксацином, у тому числі в залежності від часу початку лікування та його тривалості.

Матеріали та методи

Дослідження виконано на 30 кролях обох статей породи Шиншила, віком 8-10 місяців, масою 3-3,5 кг, що пройшли карантин і знаходились на стандартному харчовому раціоні віварію.

Модель бактеріального кератиту відтворю-

вали на обох очах тварин за відомою методикою, яка передбачає місцеву анестезію розчином дикаїну, розтин через центр рогівки до власної речовини, видалення ділянки епітелію та інфікування зони пошкодження добовою бульйонною культурою золотистого стафілокока (один млрд. мікробних тіл в 1 мл) (Сотникова О.П. та співавт., 2005). Використовували штам патогенної культури золотистого стафілокока з лабораторії Вінницької обласної СЕС. Через добу після інфікування було відібрано 29 кролів з клінічними ознаками бактеріального кератиту на обох очах. Тварин в залежності від застосованої терапії було розподілено на п'ять груп (табл. 1):

Лікування розпочинали на другу та на третю добу після інфікування. Інстиляції лікарських препаратів проводили три рази на день протягом 14 днів (табл. 2).

Таблиця 1

Характеристика груп тварин і застосованої терапії

Групи	Кількість тварин / очей	Склад очних крапель, що застосовували для інстиляцій
I (контроль)	5/10	-
II	6/12	0,25% розчин левоміцетину аптечного виготовлення
III	6/12	0,35% розчин ципрофлоксацину гідрохлориду заводського виготовлення (ципрофарм, ВАТ «Фармак», м. Київ)
IV	6/12	2% суспензія силіксу на 5% ізотонічному розчині глюкози з введенням 0,25% левоміцетину
V	6/12	2% суспензія силіксу на 5% ізотонічному розчині глюкози з введенням 0,35% ципрофлоксацину гідрохлориду

Таблиця 2

Розподіл кролів по групам в залежності від складу очних крапель і початку лікування

Групи	I		II		III		IV		V		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Підгрупи	-	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Кількість кролів / досліджених очей	3 ^{*)} /6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6
Доба початку лікування	-	друга	третя	друга	третя	друга	третя	друга	третя	друга	третя

^{*)} двоє кролів вибули з дослідів – пояснення в тексті.

Для видалення очей кролів виводили з експерименту методом повітряної емболії. Фіксацію проводили в 10 % водному розчині нейтрального формаліну протягом тижня. Кожне око розтинали лезом спереду назад через середину пошкодженої рогівки. Здійснювали парафінову проводку. Для формування парафінових блоків половинки очей клали на дно кювети площиною середнього розтину і заливали густим парафіном. Готові парафінові блоки закладали у фіксатор мікротому площиною розтину догори. За такою методикою в гістологічні зрізи обов'язково потрапляли ділянки зміненої рогівки з обох половинок. Мікротомні зрізи завтовшки 6-10 мкм фарбували гематоксилін-еозинном. Мікроскопічні дослідження проводили за допомогою мікроско-

пу "PZO Warszawa", користуючись окулярами $\times 10$ і $\times 15$ та об'єктивами $\times 5$, $\times 10$, $\times 40$. Фотоілюстрації виготовляли за допомогою фотографічної системи "Leika" і кольорової плівки фірми «Kodak».

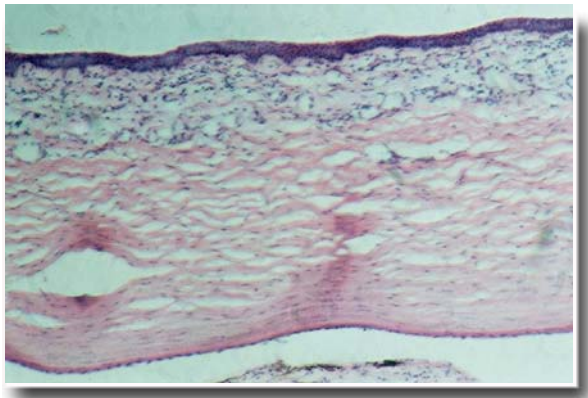
Результати та їх обговорення

В контрольній групі на восьмий день у одного кроля і на десятий день у другого відбулася перфорація рогівки, тому цих тварин виключили з дослідів. У двох кролів перебіг захворювання був відносно неважким. Очі цих тварин були гістоморфологічно досліджені на 14 день після інфікування.

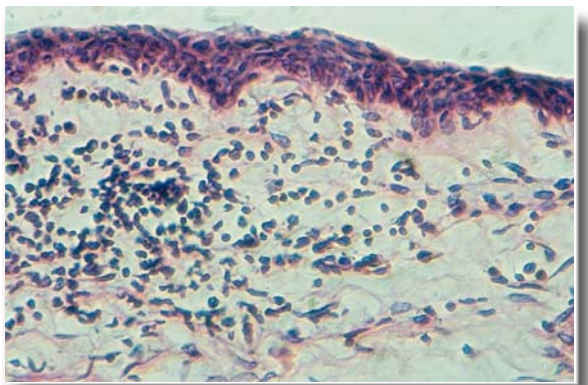
При дослідженні морфологічних змін рогівки очей тварин дослідних груп у всіх кролів спостерігався чіткий зв'язок між часом, коли розпо-

чинали лікування (на другу чи на третю добу після інфікування), і клінічним перебігом хвороби.

Результати гістоморфологічного дослідження рогівки кролів контрольної групи на чотирнадцятий день після відтворення експериментального кератиту. Мікроскопічно в гістопрепаратах очей цих тварин як в самій рогівці, так і в перикорнеальній кон'юнктиві виявлена ексудативно-клітинна реакція, яка свідчить про наявність запалення. Проте серед клітин бракує сегментоядерних нейтрофільних лейкоцитів. Натомість, лімфоцити, плазматичні клітини, макрофаги та місцеві фібробласти присутні у великій кількості (рис. 1). В місцях ексудативно-клітинної реакції кон'юнктиви її епітеліальний пласт відрізняється більшою товщиною і багаторядністю, утворенням епітеліальних гребінців у бік глибожачої сполучної тканини.



А



Б

Рис. 1. Гістопрепарат перикорнеальної зони кон'юнктиви правого ока кроля №21 (I група). Чотирнадцятий день. Ексудативно-клітинна реакція під епітелієм кон'юнктиви. Гематоксилін-еозин: а) $\times 100$; б) $\times 400$.

Мікроскопічний аналіз місця регенерації рогівки свідчить про незрілість покривного епітелію, недостатню кількість його шарів, відсутність боуменової оболонки під епітелієм. Власна речовина рогівки в проекції ушкодження в стані набряку. На лівому оці спостерігається утворення ділянок уповільненого дозрівання регенерую-

чого епітелію рогової оболонки. Клітини його надбазальних шарів вкрай гіпертрофовані та дистрофічно змінені, боуменова оболонка не виражена. Всі ці морфологічні особливості демонструють гістопрепарати кроля № 22 (рис. 2, 3).

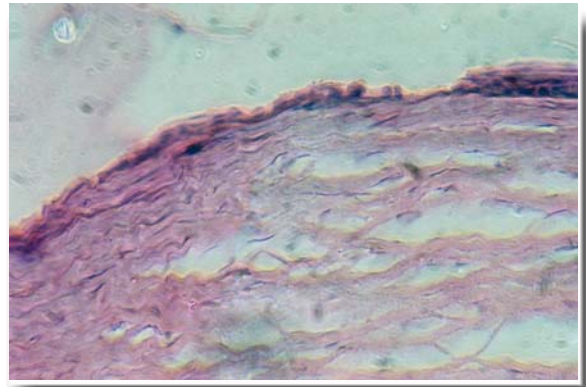


Рис. 2. Гістопрепарат рогівки правого ока кроля №22 (I група). Чотирнадцятий день. Малошаровість і десквамація відновлювального переднього епітелію на місці ушкодження. Набряк власної речовини рогівки. Гематоксилін-еозин. $\times 400$.

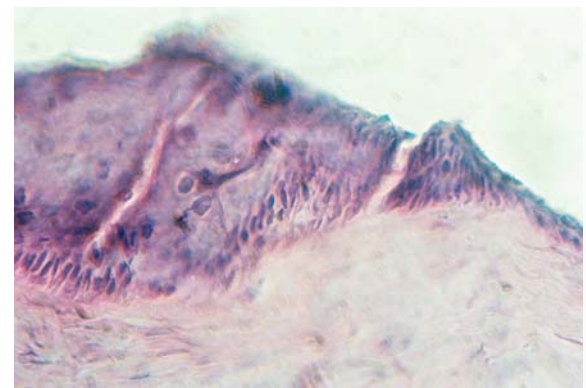


Рис. 3. Гістопрепарат рогівки лівого ока кроля №22 (I група). Чотирнадцятий день. Нашарування гіпертрофованих новоутворених епітеліоцитів у вигляді епітеліальної подушки. Відсутність їхньої належної структури. Гематоксилін-еозин. $\times 400$.

Результати гістоморфологічного дослідження рогівки кролів на чотирнадцятий день від початку лікування. Результати лікування тварин II групи (левоміцетином) насамперед порівнювали з результатами лікування тварин IV групи (левоміцетин + суспензія силіксу). Відповідно результати лікування тварин III групи (ципрофармом) порівнювали з результатами лікування тварин V групи (ципрофлоксацин + силікс). Одразу слід відзначити, що кращі результати відновлення рогівки спостерігались у тих тварин, лікування яких було розпочато на другу добу після інфікування.

Так, у кролів IV групи мікроскопічно добре контурується боуменова оболонка під переднім епітелієм. В клітинах росткового шару помітні гіпертрофовані ядра, мітотичні фігури. Та голо-

вне, виявляються ознаки функціональної стратифікації регенеруючого епітелію. Тут є вже і проміжний шар і поверхневий. Клітини останнього, як і належить, стоншені, горизонтальні, присутні ознаки посттравматичного набряку власної речовини (рис. 4).

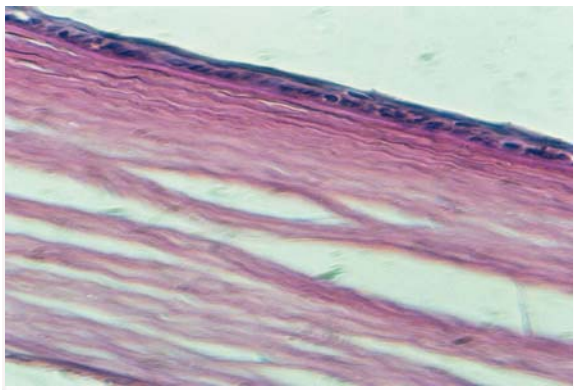


Рис. 4. Гістопрепарат рогівки правого ока кроля №15 (IV група). Чотирнадцятий день лікування. Нормальна репаративна регенерація переднього епітелію рогівки. Мітози і наявність ознак функціонального відновлення епітеліоцитів. Гематоксилін-еозин. $\times 400$.

У кролів II групи на чотирнадцятий день лікування морфологічно також спостерігалось завершення процесів репарації. Наприклад, у кроля №9 на малому ($\times 100$) і великому ($\times 400$) збільшеннях в рогівці правого ока в місці пошкодження помітне потовщення клітинного пласту переднього покривного епітелію, але він містить ознаки неповного відновлення. Залишається також набряк власної речовини у вигляді розшарування її колагенових пластин (рис. 5, 6).

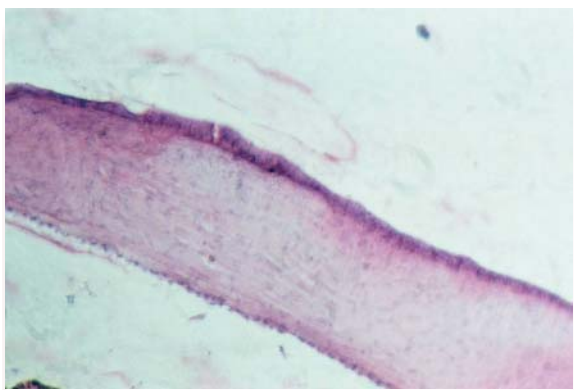


Рис.5. Гістопрепарат рогівки правого ока кроля №9 (II група). Чотирнадцятий день лікування. Потовщення епітеліального покриття рогівки. Гематоксилін-еозин. $\times 100$.

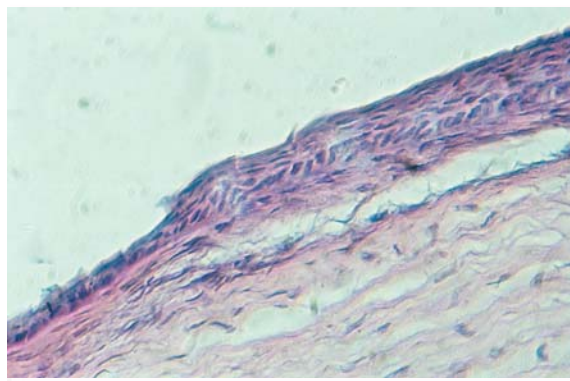


Рис. 6. Гістопрепарат рогівки правого ока кроля №9 (II група). Чотирнадцятий день лікування. Примноження епітеліальних шарів на місці ураження рогівки. Збереження набряку власної речовини рогової оболонки. Гематоксилін-еозин. $\times 400$.

В гістопрепаратах очей кролів III групи, яким лікування розпочали на другу добу після інфікування, на чотирнадцятий день також спостерігалась повна епітелізація дефектів рогівки. Наприклад, в препаратах очей кроля №11 мікроскопічно в місці втручання рогівка повністю епітелізована, але дещо деформована через ущільнення власної речовини в ділянці регенерації та розшарування й потовщення власної речовини у сусідніх ділянках (рис. 7).

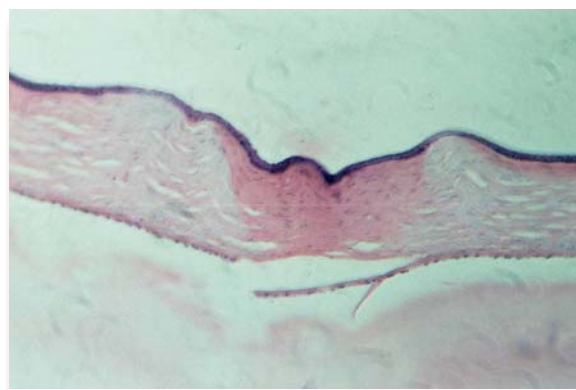


Рис. 7. Гістопрепарат рогівки правого ока кроля №11 (III група). Чотирнадцятий день лікування. Повне покриття відновленим епітелієм зони експериментального ураження, деформація власної речовини рогівки (відшарування заднього ендотелію як артефакт). Гематоксилін-еозин. $\times 100$.

Наступна мікрофотографія демонструє ту саму рогівку під збільшенням $\times 400$. Стратифікація відновленого епітелію майже відбулася. Трохи потоншена боуменова оболонка під епітелієм. Помітно реактивну перебудову і зміну напрямку колагенових структур власної речовини в бік зони колишнього пошкодження рогівки. Не скрізь в ділянці регенерації відповідно структурована боуменова оболонка під епітелієм (рис. 8).

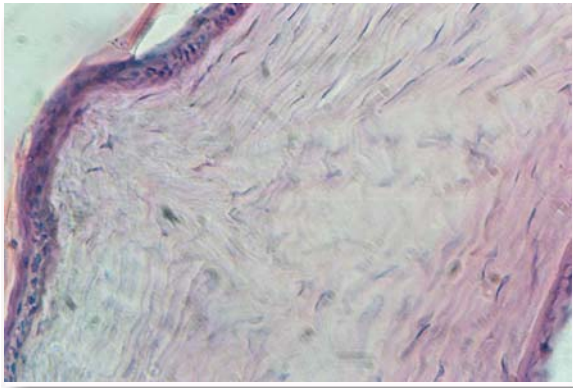


Рис. 8. Гістопрепарат рогівки правого ока кроля №11 (III група). Чотирнадцятий день лікування. Задовільна стратифікація клітин відновленого епітеліального покриву рогівки. Порушення напрямку розташування колагенових структур власної речовини в центральній зоні. Гематоксилін-еозин. ×400.

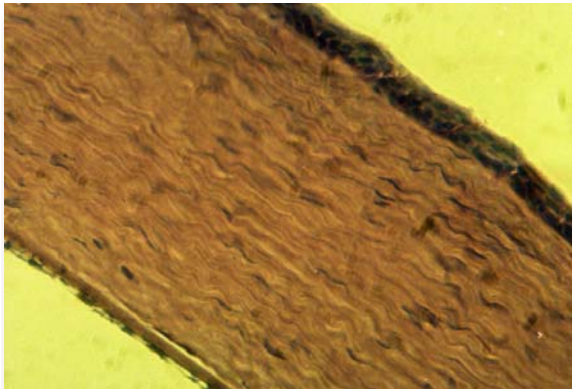


Рис. 9. Гістопрепарат рогівки правого ока кроля № 24 (V група). Чотирнадцятий день лікування. Ділянка повної регенерації переднього епітелію рогівки. Диференціювання керацитів у середніх і зовнішніх шарах. Стану епітелію відповідає стан боуменової оболонки. Гематоксилін-еозин. ×400.

При гістологічному дослідженні препаратів рогової оболонки кролів V групи спостерігається позитивний результат застосування досліджуваних крапель у лікуванні ока з експериментальним кератитом. Так, у центрі рогівки кроля № 24 власна речовина під відновленим епітелієм взагалі без будь-яких змін. Епітелій багат шаровий, нормальної товщини – повна диференціація середніх і зовнішніх шарів рогової оболонки. Структурована також боуменова оболонка (рис. 9).

Висновки

1. За всіма гістоморфологічними ознаками більш ефективний вплив на регенераторний процес у передньому епітелії рогівки справляє суспензія силіксу з левоміцетином або ципрофлоксацином, аніж індивідуальні розчини левоміцетину та ципрофлоксацину, відповідно.

2. Лікування бактеріального посттравматичного кератиту дає кращі результати, якщо його розпочинати на другу добу після відтворення моделі захворювання.

Перспективи подальших розробок

Розроблені авторами (Мішина Л.Г. та співавт., 2006, 2007) комбіновані очні краплі з дезінтоксикаційною та антибактеріальною дією, що містять наносуспензію силіксу і левоміцетин або ципрофлоксацин, можуть використовуватися для лікування бактеріальних кератитів, хімічних опіків очей, кон'юнктивітів, гнійно-запальних процесів, якими супроводжуються травми повік та орбіти, а також для надання невідкладної допомоги.

Список літературних джерел

Вивчення адсорбційних та антимікробних властивостей очної суспензії на основі високодисперсного кремнезему / Мішина Л.Г., Герашенко І.І., Осолодченко Т.П., Луцюк М.Б. // Фармацевтичний журнал.- 2006.- №1.- С.74-78.

Експериментальне обґрунтування лікувальної ефективності і нешкідливості нових очних крапель 20 % сульфацил-гуміната і 0,1 % гуміната / Сотникова О.П., Салдан В.Й., Осташевський В.Л. та ін. // Одеський медичний журнал.- 2005.- №5.- С.44-48.

Майчук Ю.Ф. Антибиотики в офтальмологии.- М.: Медицина, 1973.- 280 с.

Майчук Ю.Ф. Терапевтические алгоритмы при инфекционных язвах роговицы // Вестник офтальмологии.- 2000.- №3.- С.35-37.

Мішина Л.Г., Герашенко І.І., Осолодченко Т.П. Комбінована очна суспензія силіксу з ципрофлоксацином: дослідження адсорбційної і антимікробної активності in vitro // Фармацевтичний журнал.- 2007.- №4.- С.73-78.

Сакович В.Н. Характер микрофлоры конъюнктивальной полости глаза и ее чувствительность к антибиотикам при гнойных кератитах // Офтальмологический журнал.- 1991.- № 3.- С.189.

Мишина Л.Г., Салдан Ю.И., Пушкарь М.С., Салдан И.Р., Геращенко И.И., Валигура О.В. Лечение экспериментального кератита каплями левомецетина и ципрофлоксацина на основе наносуспензии силикса.

Резюме. Целью исследования было изучение динамики гистоморфологических изменений в роговице глаз подопытных животных при лечении экспериментального кератита глазными каплями на основе наносуспензии силикса. Объект исследования - глазные капли, которые содержат наносуспензию силикса, глюкозу, а также левомецетин или ципрофлоксацин. Методы исследования. Проводили микроскопические исследования гистологических срезов роговицы, окрашенных гематоксилин-эозином. Изготавливали фотоиллюстрации с помощью фотографической системы "Leika" и цветной пленки фирмы «Kodak». Общие результаты. Охарактеризованы гистоморфологические изменения в роговой оболочке глаз подопытных животных после воспроизведения модели бактериального кератита и его лечения упомянутыми глазными каплями на протяжении двух недель. У всех животных опытных групп наблюдалась четкая зависимость между временем, когда начинали лечение (на вторые или на третьи сутки после инфицирования), и клиническим течением болезни. Выводы. Экспериментально доказано, что суспензия силикса с левомецетином или ципрофлоксацином оказывает лучшее действие на регенераторный процесс в переднем эпителии роговицы, чем индивидуальные растворы левомецетина и ципрофлоксацина, соответственно. Установлено, что лечение бактериального кератита является более эффективным, если его начинать на вторые сутки после воспроизведения модели заболевания.

Ключевые слова: бактериальный кератит, эпителий роговицы, наносуспензия силикса, левомецетин, ципрофлоксацин.