

Т.К. ВОЛКОВИЧ, И.В. САМСОНОВА

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ БАКТЕРИАЛЬНОГО КЕРАТИТА**УО «Витебский государственный медицинский университет»,  
Республика Беларусь

**Цель.** Разработать экспериментальную модель бактериального кератита, приближающуюся по клиническим, цитологическим и морфологическим признакам к заболеванию у человека.

**Материал и методы.** Экспериментальная модель бактериального кератита разработана на 25 кроликах, путём выполнения послойной трепанации роговицы с последующим её инфицированием бактериальной суспензией *Staphylococcus aureus*. Для оценки патоморфологических изменений выполняли импрессионную цитологию роговицы и гистологическое исследование срезов переднего отрезка глаза.

**Результаты.** Разработана экспериментальная модель бактериального кератита с инициацией воспалительного процесса конъюнктивы, роговицы, радужки и цилиарного тела, о чём свидетельствуют выраженные некротические и некробиотические изменения структур переднего отрезка глазного яблока.

**Выводы.** Разработанная экспериментальная модель бактериального кератита по клиническим, цитологическим и гистологическим признакам приближается к таковой у человека и может быть использована для дальнейшего изучения патогенеза воспалительного процесса роговицы и разработки новых подходов его консервативного и хирургического лечения.

*Ключевые слова:* бактериальный кератит, роговица, воспалительный процесс, эпителий, регенерация

**Objective.** To work out the experimental model of the bacterial keratitis approximating to the disease development in man according to clinical, cytological and morphological signs.

**Methods.** The experimental model of the bacterial keratitis was designed on 25 rabbits by means of the sectional trepanation of the cornea with its subsequent being infected with the bacterial suspension *Staphylococcus aureus*. The impression cytology of the cornea and histological investigation of the cuts of the eye's anterior segment were performed to evaluate the pathomorphological changes.

**Results.** The experimental model of the bacterial keratitis was designed with initiation of the inflammatory process of the conjunctiva, the cornea, the iris and the ciliary body; it is proved by the marked necrotic and necrobiotic changes of the eyeball anterior segment structures.

**Conclusion.** The designed experimental model of the bacterial keratitis according to its clinical, cytological and histological signs approximates the same in man and can be used for further investigation of the inflammatory process pathogenesis of the cornea and for working out new approaches to its conservative and surgical treatment.

*Keywords:* bacterial keratitis, cornea, inflammatory process, epithelium, regeneration

**Введение**

Бактериальные кератиты являются тяжёлыми воспалительными заболеваниями роговицы. В 9–37,9% случаев они имеют осложнённое течение, сопровождаясь развитием десцеметоцеле, перфорации, абсцесса роговицы, эндофтальмита [1, 2, 3, 4, 5]. В 25% случаев бактериальные керати-

ты становятся причиной инвалидности по зрению, что существенно снижает качество жизни пациентов, затрудняет их социальную адаптацию [3, 6].

Роговица – передний прозрачный отдел наружной капсулы глазного яблока – подвержена воздействию всех неблагоприятных факторов внешней среды. Особенности её строения, анастомозирования кра-

евой петливой сети сосудов, иннервации, отсутствие собственных сосудов, замедленные обменные процессы объясняют быстрое вовлечение роговицы в патологический процесс и специфику его течения [7].

Пусковым моментом развития бактериального кератита является повреждение эпителия роговицы, имеющего первостепенное значение в защите глаза и являющегося своеобразным барьером для микробов и их токсинов, а также нарушение межклеточных связей и инфицирование чужеродными агентами (бактериальная и грибковая микрофлора, вирусы) [4, 5, 7, 8, 9].

Патогенез бактериального кератита представляет собой сложный процесс, включающий взаимодействие множества местных и общих факторов: гормональных, паракринных, нервных, сосудистых и клеточных [9, 10, 11, 12, 13]. Состояние каждого из них влияет на исход заболевания. Тяжесть течения воспалительного процесса роговицы тесно связана также с размером, глубиной очага поражения, выраженностью изменений. По данным М. Matsuda et al. [14], продолжительность и характер заживления находятся в прямой зависимости от размера дефекта.

Знание особенностей патогенеза является основой для разработки новых эффективных методов консервативного и хирургического лечения заболевания, его осложнений и последствий [15]. Однако изучить патоморфологические изменения при бактериальном кератите в динамике на клиническом материале не представляется возможным. Известен способ создания экспериментальной модели бактериального кератита путём интрастромального введения 20 мкл бактериальной суспензии с помощью иглы 30G [6]. Недостатком данного способа является развитие абсцесса роговицы без повреждения поверхностного её эпителия и боуеновой мембраны. Кроме того, указанный способ не может быть

стандартизирован, так как при интрастромальном введении невозможно контролировать равномерное распространение бактериальной суспензии между роговичными пластинами.

В связи с этим представляется актуальной разработка экспериментальной модели бактериального кератита, по клиническим, цитологическим и гистологическим проявлениям приближающейся к таковой у человека.

**Цель.** Разработать экспериментальную модель бактериального кератита, приближающуюся по клиническим, цитологическим и морфологическим признакам к заболеванию у человека.

### Материал и методы

Эксперимент выполнен на 25 кроликах-самцах массой 3–3,5 кг. Для моделирования бактериального кератита использовали лабораторный штамм *Staphylococcus aureus* (№ 6538-р), полученный из института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А.Тарасевича (Российская Федерация, г. Москва).

Под внутривенным нембуталовым наркозом (30 мг/кг массы тела животного) и местной анестезией (инстилляцией в конъюнктивальную полость 2% Sol. Lidocaini) всем экспериментальным животным в оптической зоне выполняли послойную трепанацию роговицы трепаном диаметром 5 мм до 1/3 толщины стромы. Далее роговицу инфицировали возбудителем путём инстилляцией в конъюнктивальную полость бактериальной суспензии лабораторного штамма *Staphylococcus aureus*. Предварительно живую культуру разводили физиологическим раствором до 3 единиц McFarland, что соответствовало  $10^5$ - $10^6$  Мт/мл. Для заражения повреждённой поверхности роговицы использовали 1 мл куль-

туры.

Клиническое наблюдение проводили ежедневно. Фоторегистрацию объективного осмотра выполняли с помощью цифровой фотокамеры Nikon. Для определения клеточного состава и морфофункционального состояния эпителия роговицы на 1-е, 3-и, 7-е, 14-е и 30-е сутки после повреждения и инфицирования роговицы выполняли импрессионную цитологию. Полученные клеточные образцы фиксировали на предметном стекле 96%-ным спиртом (приоритетная справка а20091200 от 04.08.2009 «Способ фиксации цитологического материала, полученного импрессионным методом»), просветляли в ксилоле и окрашивали гематоксилином и эозином (приоритетная справка а20091100 от 04.08.2009 «Способ окрашивания цитологического материала, полученного импрессионным методом»). Световую микроскопию и фоторегистрацию клеточных образцов выполняли на микроскопе Leica при увеличении  $\times 100$ ,  $\times 200$ ,  $\times 400$ ,  $\times 1000$ . В эти же сроки животных выводили из эксперимента (летальная доза нембутала) для забора глазных яблок и последующего гистологического исследования. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином и по Ван Гизон. Микроскопию гистологических образцов выполняли при увеличении  $\times 100$ ,  $\times 200$ ,  $\times 400$  и  $\times 1000$ .

Основными показателями, учитываемыми при анализе гистологических срезов и цитологических образцов, являлись нейтрофильная инфильтрация, макрофаги, фибробласты, эпителиальные клетки в состоянии митоза.

### Результаты и обсуждение

Клинически заболевание развивалось и протекало одинаково у всех экспериментальных животных. Так, через 24 часа пос-

ле инфицирования у кроликов определялись признаки бактериального кератита. При клиническом осмотре глазная щель была закрыта, наблюдалась гиперемия, отёк век, обильное гнойное отделяемое, выраженная смешанная гиперемия и небольшой хемоз конъюнктивы (больше в нижнем сегменте), отёк роговицы, более выраженный вокруг воспалительного очага. В оптической зоне определялся язвенный дефект с инфильтрированными краями, рыхлым дном, заполненным детритом (рис. 1, см. цветной вкладыш). У 19 животных влага передней камеры выглядела мутной, у 6 – определялся гипопион 1–2 мм. У всех экспериментальных животных был выявлен отёк радужки.

Импрессионная цитология в данные сроки выявила выраженные некротические и некробиотические изменения как в язвенно-воспалительной, так и в перифокальной и паралимбальной зонах. Центр язвенно-воспалительной зоны формировало небольшое количество детрита; вокруг него наблюдалась выраженная нейтрофильная инфильтрация, преимущественно за счёт сегментоядерных и в меньшей степени палочкоядерных нейтрофилов. В перифокальной и паралимбальной зонах были выявлены выраженные некротические и некробиотические изменения эпителия роговицы с явлениями кариорексиса, кариолизиса и цитолизиса (рис. 2 см. цв. вкладыш).

Гистологически выраженные изменения отмечались во всех оболочках глазного яблока. Так, в оптической зоне роговицы эпителий отсутствовал, в прилегающей зоне был истончён, с дегенеративными изменениями. Основное вещество роговицы (строма) выглядело разволокнённым за счёт отёка, определялась умеренно выраженная преимущественно нейтрофильно-клеточная воспалительная инфильтрация. Ближе к лимбу в основном веществе отме-

чалась от умеренной до выраженной диффузная полиморфно-клеточная инфильтрация с преобладанием нейтрофилов. Задняя пограничная пластинка (десцеметова мембрана) была несколько утолщена на всём протяжении, эпителий частично десквамирован.

К 3-им суткам клинического наблюдения нарастала воспалительная реакция со стороны конъюнктивы, роговицы и радужки. Так, было выявлено нарастание отёка и гиперемии конъюнктивы, усиление отёка эпителия роговицы и стромы (больше вокруг воспалительного очага), а также гиперемия и отёк радужки.

Цитологический материал по клеточному составу и характеру изменений принципиально не отличался от 1-ых суток наблюдения. Однако, более выраженными были сегментоядерная инфильтрация и некротические изменения в язвенно-воспалительной зоне.

Световая микроскопия гистологических срезов роговицы выявила отсутствие эпителия и нейтрофильно-клеточную инфильтрацию основного вещества роговицы в зоне воспалительного очага. На остальном протяжении эпителий роговицы был истончен, основное вещество резко отёчно. Помимо этого, наблюдалась выраженная воспалительная инфильтрация с преобладанием клеток лимфоцитарного ряда (в том числе плазмоцитов) в области лимба. Сосуды радужки и реснитчатых отростков были полнокровны.

На 7-е сутки клинически у всех экспериментальных животных выявлялись очищение язвенного дефекта от некротических масс, признаки начала эпителизации, а также поверхностная неоваскуляризация роговицы 2–3 мм по всей окружности лимба.

Данные импрессионной цитологии свидетельствовали о развитии пролиферативных процессов в роговице. Среди ни-

тей детрита и остатков разрушенных клеток в зоне, соответствующей дну язвенного дефекта, встречались единичные фибробласты, фиброциты, а также макрофаги, эпителиоциты. Сегментоядерная инфильтрация по краю язвенного дефекта была менее выражена; здесь встречались эпителиальные клетки базального типа, макрофаги и фибробласты. Количество последних увеличивалось по направлению к паралимбальной зоне. Данные изменения клеточного состава и морфо-функционального состояния эпителиальных клеток были расценены нами как проявления пролиферативной стадии воспалительного процесса, направленные на восстановление целостности зоны повреждения.

Гистологическая картина на 7-е сутки наблюдения соответствовала цитологической и характеризовалась развитием пролиферативных изменений, формированием акантоотических тяжей. Строма роговицы была разволокнена с умеренно выраженной нейтрофильной инфильтрацией в перифокальной зоне и более выраженной в оптической и лимбальной зонах. В радужке и части реснитчатых отростков определялись от умеренно до выраженных явления склерозирования и периваскулярного фиброза.

14-ые сутки наблюдения характеризовались дальнейшим развитием репаративных процессов роговицы. При клиническом обследовании экспериментальных животных были выявлены признаки эпителизации воспалительного очага и выраженная неоваскуляризация по всей окружности роговицы 4–5 мм в направлении к воспалительному очагу. В клеточных образцах, особенно по краю язвенного дефекта, преобладали эпителиальные клетки базального типа. В паралимбальной зоне значительно увеличивалось количество фиброцитов и фибробластов.

При световой микроскопии гистологи-

ческих срезов в оптической зоне роговицы поверхностные ее слои были представлены грануляционной тканью с начальными признаками эпителизации. Воспалительная инфильтрация определялась на всем протяжении (более густая в области лимба и в поверхностных слоях роговицы). Основное вещество роговицы (строма) в зоне воспалительного очага было представлено рыхлой волокнистой неоформленной соединительной тканью, на остальном протяжении определялись зрелые сформированные волокна. В сосудистой оболочке отмечалось фиброзирование легкой степени, более выраженное вокруг сосудов – периваскулярный фиброз. В лимбальной зоне сохранялась воспалительная преимущественно лимфоцитарная инфильтрация.

На 30-е сутки исследования при клиническом осмотре наблюдалось формирование васкуляризованного бельма роговицы (рис. 2, см. цветной вкладыш). Анализ цитологических образцов выявил рост количества фиброцитов и фибробластов во всех исследуемых зонах по направлению к лимбу. Помимо этого в паралимбальной зоне выявлялись меланин-содержащие эпителиальные клетки конъюнктивы (рис. 3 а, б, см. цветной вкладыш) с уменьшением их количества в направлении язвенно-воспалительной зоны. Это свидетельствовало о конъюнктивализации роговицы и соответствовало клиническим проявлениям.

Гистологически данные сроки наблюдения характеризовались явлениями фиброза и неоваскуляризации роговицы. При проведении световой микроскопии на большем протяжении поверхность роговицы была эпителизирована, при этом в передней части имелись участки без эпителиальной выстилки и участки утолщения эпителия за счет пролиферации базальных клеток и появления многослойности. Основное вещество роговицы было представлено волокнистой соединительной тканью

с явлениями набухания волокон в большей степени в поверхностных слоях. На всем протяжении отмечалась отечность стромы, полнокровие сосудов, полиморфноклеточная воспалительная инфильтрация от слабой ближе к лимбу до выраженной в оптической зоне роговицы (рисунок 4 а, б, см. цветной вкладыш). В задней пограничной пластинке наблюдались дистрофические изменения в виде фибриноидного набухания и гиалинизирования. Задний эпителий был десквамирован, дистрофически изменен на значительном протяжении. В ресничных отростках наблюдался умеренный отек, некоторое набухание волокнистых элементов и эндотелиоцитов сосудов.

**Заключение.** Таким образом, разработанная нами экспериментальная модель бактериального кератита, в отличие от ранее предложенной, по клиническим проявлениям, цитологическим и гистологическим изменениям является более приближенной к течению воспалительного процесса роговицы у человека.

Данная экспериментальная модель бактериального кератита может быть использована для дальнейшего изучения патогенеза воспалительного процесса роговицы и разработки новых подходов его консервативного и хирургического лечения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Шаимова, В. А. Гнойная язва роговицы (клиника, диагностика, лечение): автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.08 / В. А. Шаимова; Урал. гос. мед. акад. доп. образ. Фед. агентства по здравоохран. и соц. разв. – М., 1999. – 22 с.
2. Каспаров, А. А. Лечение гнойных язв роговицы / А. А. Каспаров, А. К. Садыхов, С. А. Маложен // Вестн. офтальмологии. – 1987. – № 6. – С. 67-71.
3. Майчук, Ю. Ф. Фармакотерапия воспалительных заболеваний глаз: вчера, сегодня, завтра / Ю. Ф. Майчук // Актуальные вопросы воспалительных заболеваний глаз. – М., 2001. – С. 7-17.
4. Шаимова, В. А. Клиника гнойной язвы роговицы / В. А. Шаимова // Актуальные проблемы клин. офт.

- тальмологии: сб. науч. тр. – Челябинск, 1999. – С. 104-106.
5. Clinical outcomes of keratitis / M. D. Green [et al.] // *Clinical and Experimental Ophthalmology*. – 2007. – Vol. 35. – P. 421-426.
6. Mucoadhesive polymer extracted from tamarind seed improves the intraocular penetration and efficacy of rufloxacin in topical treatment of experimental bacterial keratitis / E. Ghelardi [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2004. – Vol. 48. – P. 3396-3401.
7. Глазные болезни / под ред. В. Г. Копаевой. – М.: Медицина, 2002. – 560 с.
8. Шаимова, В. А. Клинико-этиологические особенности различных типов течения гнойной язвы роговицы / В. А. Шаимова // *Вест. офтальмологии*. – 2002. – Т. 118, № 1. – С. 39-41.
9. Zhao, J. Role of tears in keratocyte loss after epithelial removal in mouse cornea / J. Zhao, T. Nagasaki, D. M. Maurice // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2001. – Vol. 42. – P. 1743-1749.
10. Corneal cells: chatty in development, homeostasis, wound healing, and disease / E. Steven [et al.] // *Am. J. Ophthalmol.* – 2003. – Vol. 136. – P. 530-536.
11. Effects of growth factors on corneal wound healing / G. Schultz [et al.] // *Acta Ophthalmol.* – 1992. – Vol. 70. – P. 60-66.
12. Proinflammatory chemokine induction in keratocytes and inflammatory cell infiltration into the cornea / J.W. Hong [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2001. – Vol. 42. – P. 2795-2803.
13. Wilson, S. E. Keratocyte apoptosis: implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease / S. E. Wilson, W.J. Kim // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1998. – Vol. 39. – P. 220-226.
14. Matsuda, M. Kinetics of corneal wound repair / M. Matsuda, J. L. Ubels, H. F. Edelhauser // *Corneal Surgery: Theory, Technique and Tissue* / Ed. F. S. Brighthill. – 1986. – P. 603-612.
15. Crosson, C. E. Epithelial wound closure in the rabbit cornea. A basic process / C. E. Crosson, S. D. Klyce, R. W. Beuerman // *Invest. Ophthalmol.* – 1986. – Vol. 27. – P. 464-473.

**Адрес для корреспонденции**

210023, Республика Беларусь,  
г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27,  
Витебский государственный  
медицинский университет,  
кафедра офтальмологии,  
e-mail: t.volkovich@rambler.ru,  
Волкович Т.К.

*Поступила 16.04.2010 г.*

---

**ЧИТАЙТЕ В СЛЕДУЮЩЕМ НОМЕРЕ:**

А.В. Воробей с соавт.

Опыт применения двухбаллонной энтероскопии при патологии тонкой кишки  
и панкреатобилиарной зоны

Ю.М. Стойко с соавт.

Дисфункция эндотелия у больных хронической венозной недостаточностью  
нижних конечностей и возможности её коррекции