

УДК 617.713–002–085.849.19:579.8+615.849.19

Застосування метиленового синього в комбінації із низько енергетичним лазером в лікуванні експериментального (змішана флора) бактеріального кератита.

Т. І. Гладуш, д. мед. наук, М. О. Чорнобай, аспірант

E-mail: z_mariya@hotmail.com

Ключові слова: кератит, фотодинамічна хіміотерапія, метиленовий синій

Ключевые слова: кератит, фотодинамическая химиотерапия, метиленовый синий

Актуальность. Антимикробным методом лечения инфекционных заболеваний роговицы без идентификации возбудителя является антибактериальная фотодинамическая химиотерапия (ФДХТ).

Цель: оценить эффективность комбинации метиленового синего (МС) и низкоэнергетического лазерного излучения (НЭЛИ) при лечении бактериального кератита.

Материал и методы. Кератит был смоделирован при помощи штамма *S. aureus* и *E.coli*. Глаза животных были разделены на 4 группы: 1 — НЭЛИ + МС + диметилсульфоксид (ДМСО); 2 — НЭЛИ + МС; 3 — офлоксацин; 4 — контроль без лечения.

Результат. На третьи сутки при оценке гиперемии положительный эффект ФДХТ проявился в первой группе ($p=0,011$). При оценке эрозии роговицы отмечена достоверная разница в первой и второй группах на седьмые сутки ($p=0,0001$ и $p=0,028$) со сдвигом на 1 сутки раньше в первой группе. Уменьшение инфильтрации и отека при ФДХТ в первой и второй группах на третьи сутки: инфильтрации — $p=0,0001$ и $p=0,001$; отёк — $p=0,011$ и $p=0,006$. Отмечается уменьшение срока выздоровления кератита на 3 суток при ФДХТ по сравнению с антибиотикотерапией. ДМСО в качестве проводника МС в клетки и НЭЛИ ускоряет выздоровление на 1 сутки по сравнению с МС и НЭЛИ.

Combination of methylene blue with low-power laser in the treatment of experimental (mixed flora) bacterial keratitis

Т. І. Gladush, М. О. Chornobai

E-mail: z.marya@hotmail.com

Key words: keratitis, photodynamic chemotherapy, methylene blue

Introduction. Antimicrobial treatment of infectious diseases of the cornea without identification of the pathogen is photodynamic antimicrobial chemotherapy (PDCT).

The purpose of study was to estimate the effect of methylene blue (MB) with low-power laser irradiation (LPLI) in treatment of bacterial keratitis.

Material and methods. Keratitis was made with suspension culture strain of *S. aureus* and *E.coli*. Eyes of the animals were divided into 4 groups: 1 — LPLI + MB + Dimethylsulfoxide (DMSO); 2 — LPLI + MB; 3 — ofloxacin; 4 — control without treatment.

Results. After 3 days of PDCT when evaluating congestion positive effect was in the first ($p = 0.011$). In assessing the erosion of the cornea showed a significant difference in the first and second on the seventh day ($p = 0.0001$ and $p = 0.028$) with a shift of one day less in the first group. Reduced infiltration and edema after PDCT in the first and second groups were observed on the third day: infiltration — $p = 0.0001$ and $p = 0.001$; edema — $p = 0.011$ and $p = 0.006$. Reduction or the recovery period of keratitis is marked for 3 days after the application of PDCT compared with antibiotic therapy. DMSO for conducting MB to cells and LPLI decreases term of recover for 1 day compared to MB and LPLI.

Вступ. Проблема діагностики і лікування бактеріального кератиту не втрачає свою актуальність. По швидкості розвитку бактеріальний кератит переважає інші патологічні процеси рогівки. Розміри запального дефекту, характер і вірулентність мікрофлори обумовлюють його тяжкість, високу частоту ускладнень і несприятливих наслідків [2,5].

Порушення загального і місцевого імунітету, погіршення екологічного стану, безконтрольний прийом антибактеріальних препаратів, в першу чергу антибіотиків, приводять до змін в еволюційно сформовані мікробіоценози, і зокрема, біоценози слізної плівки ока [4]. Нормальний мікробіоценоз слізної плівки є першою лінією захисту від інфекції. Наявність факторів локального імунітету перешкоджає проникненню мікроорганізмів в товщу рогівки. Умови дезадаптації стають фоном для розвитку дисбіотичних процесів у біоценозі поверхні ока [1]. Характерною особливістю запальних захворювань ока на сучасному етапі є переважання мікст-форм патогенних мікроорганізмів. Масивна антибактеріальна терапія викликає не тільки мікроекологічні порушення слізної плівки, а також формування резервуарів умовно-патогенної флори із множинною антибіотикорезистентністю [5].

На додаток до вибіркової резистентності, бактеріальний склад флори може змінюватись при повторному впливу антибіотика. Нормальна флора кон'юнктиви (найбільш часто різновиди *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, анаеробні *Propionibacterium*) грає важливу роль в захисті ока проти інвазії і в пригніченні колонізації більш патогенного складу. Таким чином, зміни флори при використанні пролонгованого чи повторного використання антибіотиків можуть мати важливі клінічні наслідки. При дослідженні впливу субінгібуючої дози макролідів на *S.epidermidis* антибіотик підвищує транскрипцію генів, що формують і зміцнюють їх біоплівку. Присутність біоплівки є ознакою набуття більшої патогенності штамів *S. epidermidis* і виявляє перевагу у виживанні над *S. aureus* та іншими коагулазонегативними стафілококами [8, 9].

Альтернативним антимікробним засобом лікування інфекційних захворювань рогівки без ідентифікації збудника є антибактеріальна фотодинамічна хіміотерапія. Перевагою у порівнянні із іншими методами лікування є використання її у вигляді монотерапії, відсутність селекції патогенної мікрофлори, висока ефективність при гострому і хронічному перебігу захворювання, а також при довготривалому бактеріоносії, відсутність темної токсичності фотосенсибілізаторів. Метод фотодинамічної хіміотерапії дозволяє уникнути системної дії антибактеріальних препаратів [4].

Одним із фотосенсибілізаторів, що давно застосовується в офтальмології як антисептик, є метиленовий синій. Дослідження показали значну

ефективність фотосенсибілізатора метиленового синього до метицилінрезистентного *Staphylococcus aureus*, патогенних штамів *Ps. aeruginosa* і *C. albicans* [6, 7].

Метою є оцінка впливу метиленового синього в комбінації із низькоенергетичним лазером при застосуванні в лікуванні експериментального бактеріального (змішана флора) кератиту.

Матеріал та методи

Експериментальні дослідження проведені на 20 кроликах (40 очей) породи шиншила масою 2,5–3,0 кг, одного віку (6 місяців), що знаходились в однакових стандартних умовах віварію.

Під епібульбарною анестезією алкаїном кератит моделювали 0,1 мл суспензії культури клінічного високовірулентного штаму *S. aureus* і *E.coli* у ізотонічному розчині хлориду натрію, що вміщував 10^9 /мл колонієутворюючих одиниць у 1 мл (КУО/мл), шляхом одноразової інтрастромальної ін'єкції із нанесенням центральної ерозії і наступною трьохкратною інстиляцією суспензії культури в кон'юнктивальну порожнину. На другу добу отримали кератит середнього ступеня у всіх тварин.

Для лікування нами були застосовані: комбінація 0,1 % водного розчину метиленового синього і 10 % диметилсульфоксиду (ДМСО) (трьохкратне закапування) із низькоенергетичним лазерним випромінюванням (НЕЛВ) протягом 3 хв.; комбінація 0,1 % водного розчину метиленового синього (трьохкратне закапування) із низькоенергетичним лазерним випромінюванням (НЕЛВ) протягом 3 хв.; інстиляції антибіотику офлоксацину («Флоксал») із стандартною проти-запальною терапією. Лікування розпочали на другу добу з моменту інфікування.

Очі тварин були поділені на 4 групи: 1 група — НЕЛВ+МС+ДМСО (11 правих очей), 2 група — НЕЛВ+МС (11 лівих очей), 3 група — офлоксацин (9 правих очей), 4 група — контроль, без лікування (9 лівих очей).

Спостереження проводили протягом 20 діб за допомогою офтальмоскопії в прохідному світлі, біомікроскопії, із використанням зафарбовування флюоресцеїном, фоторегістрації, бактеріологічного дослідження з кон'юнктиви, визначення кислотно-лужного балансу кон'юнктивального середовища.

Для оцінки перебігу запального процесу при бактеріальному враженні переднього відрізка ока нами використовувалась бальна система критеріїв Т. Б. Гайдамаки. [5] Кон'юнктива: блідо-рожева — 1 бал; слабо гіперемована — 2; помірно гіперемована — 3; інтенсивно гіперемована — 4. Ерозія рогівки: відсутня — 1; точкова — 2; деревоподібна — 3; обмежена — 4. набряк рогівки: відсутній — 1; поверхневий — 2; стромальний локальний — 3. Інфільтрація рогівки: відсутня — 1; точкова, поверхнева — 2; локальна стромальна — 3. помутніння рогівки: відсутнє — 1; точкове — 2.

Досліджували результати посіву бактеріологічного дослідження з кон'юнктиви на щільні поживні середовища. Культуру для бактеріологічного дослідження збирали з кон'юнктиви з використанням пробірок SARSTEDT. Культуру з кон'юнктиви брали із нижнього склепіння по стандартним правилам і намагаючись мінімізувати контамінацію із повік, вій або шкіри із подальшим посівом на щільні поживні середовища 5 % кров'яний агар і «Середовище для контролю стерильності».

Кислотно-лужний баланс сльози визначали за допомогою індикаторних паперових стрічок (рН універсальний індикаторний папір «Лак-Нер»). Стрічку досліджуваного папірця змочували в досліджуваній розчин, потім клали на білий водонепроникний піднос і швидко порівнювали зафарбовування стрічки із еталонною шкалою.

Для статистичної обробки даних дослідження використали непараметричний метод — порівняння двох незалежних виборок (критерій Манна-Уїтні); середні значення із стандартною похибкою.

Результати та їх обговорення

При моделюванні комбінованого бактеріального кератиту ми отримали практично ідентичну, патогномонічну для бактеріального кератиту картину у всіх експериментальних тварин. Через добу після втручання у всіх кроликів з'явилась гіперемія кон'юнктиви, інфільтрація і набряк рогівки. Ерозія рогівки, нанесена при моделюванні, була активно виражена.

На третю добу при бальній оцінці гіперемії позитивний вплив фотодинамічної хіміотерапії (ФДХТ) проявився в першій групі $1,5 \pm 0,5$ ($p=0,011$), на сьому добу зникнення гіперемії відмічалось і в другій групі $1,8 \pm 0,7$ ($p=0,04$). В третій групі ознаки гіперемії зникли на чотирнадцятий день $1,2 \pm 0,4$ ($p=0,004$),

в контрольній групі без лікування гіперемія була присутня впродовж всього періоду спостереження.

При оцінці ерозії рогівки відмічена достовірна різниця, в порівнянні з контролем, в першій $1,7 \pm 0,7$ і другій групі $1,7 \pm 0,6$ на сьому добу ($p=0,0001$ і $p=0,028$ відповідно) із зсувом на одну добу раніше в першій групі. Достовірна різниця, в порівнянні з контролем, в третій групі спостерігається на 14 добу $1,1 \pm 0,3$ ($p=0,004$)

Щодо інфільтрації і набряку рогівки, то при використанні ФДХТ в першій і другій групах спостерігалась статистично достовірна різниця у порівнянні з контролем на третю добу: інфільтрація — $1,1 \pm 0,4$ і $1,3 \pm 0,5$ ($p=0,0001$ і $p=0,001$ відповідно); набряк — $1,5 \pm 0,5$ в обох групах ($p=0,011$ в першій групі і $p=0,006$ в другій). В третій групі позитивна динаміка із статистично достовірною різницею відбулась на сьому добу: інфільтрація — $1,3 \pm 0,5$ ($p=0,007$); набряк — $1,2 \pm 0,4$ ($p=0,002$).

Помутніння рогівки в трьох групах лікування, в порівнянні з контролем, до кінця спостереження не відмічалось.

Динаміка протікання інфекційно-запального процесу представлена в таблицях 1–4.

Таблиця 1. Бальна оцінка та динаміка гіперемії в різних групах дослідження

Період (доба)	Групи дослідження							
	1		2		3		4	
1	$2,3 \pm 0,5$	–	$2,9 \pm 0,7$	–	$2,8 \pm 0,7$	–	$2,4 \pm 0,7$	–
3	$1,5 \pm 0,5$	0,011	$2,5 \pm 0,5$	0,213	$2,7 \pm 0,7$	0,881	$3,2 \pm 0,7$	0,172
7	$1,2 \pm 0,4$	0,0001	$1,8 \pm 0,7$	0,04	$2,6 \pm 0,7$	0,607	$3,4 \pm 0,7$	0,058
10	1,0	0,0001	$1,1 \pm 0,4$	0,001	$1,8 \pm 0,7$	0,067	$3,3 \pm 0,7$	0,106
14	1,0	0,0001	1,0	0,0001	$1,2 \pm 0,4$	0,004	$2,8 \pm 0,8$	0,375
20	1,0	0,0001	1,0	0,0001	1,0	0,0001	$1,7 \pm 0,8$	0,214

Де p^* — оцінка значимості різниці за критерієм Манна-Уїтні.

Таблиця 2. Бальна оцінка та динаміка ерозії рогівки в різних групах дослідження

Період	Групи дослідження							
	1		2		3		4	
1	$2,8 \pm 0,0$	–	$2,8 \pm 0,7$	–	$2,7 \pm 0,7$	–	$2,8 \pm 0,7$	–
3	$2,3 \pm 0,5$	0,213	$2,5 \pm 0,7$	0,656	$2,6 \pm 0,7$	0,881	$3,0 \pm 0,7$	0,856
7	$1,7 \pm 0,7$	0,0001	$1,7 \pm 0,6$	0,028	$1,9 \pm 0,6$	0,158	$2,8 \pm 0,7$	0,801
10	$1,1 \pm 0,3$	0,0001	$1,2 \pm 0,4$	0,001	$1,7 \pm 0,7$	0,079	$2,3 \pm 0,7$	0,370
14	1,0	0,0001	1,0	0,0001	$1,1 \pm 0,3$	0,002	$2,1 \pm 0,6$	0,198
20	1,0	0,0001	1,0	0,0001	1,0	0,0001	1,0	0,0001

Де p^* — оцінка значимості різниці за критерієм Манна-Уїтні.

Таблиця 3. Бальна оцінка та динаміка інфільтрації рогівки в різних групах дослідження

Період	Групи дослідження							
	1		2		3		4	
1	$2,2 \pm 0,5$	–	$2,4 \pm 0,5$	–	$2,3 \pm 0,5$	–	$2,3 \pm 0,5$	–
3	$1,1 \pm 0,4$	0,0001	$1,3 \pm 0,5$	0,001	$1,8 \pm 0,8$	0,074	$2,4 \pm 0,5$	0,629
7	$1,1 \pm 0,3$	0,0001	$1,1 \pm 0,3$	0,0001	$1,3 \pm 0,5$	0,007	$2,4 \pm 0,5$	0,629
10	1,0	0,0001	1,0	0,0001	$1,1 \pm 0,3$	0,001	$2,3 \pm 0,5$	1,0
14	1,0	0,0001	1,0	0,0001	1,0	0,0001	$1,7 \pm 0,4$	0,079
20	1,0	0,0001	1,0	0,0001	1,0	0,0001	$1,1 \pm 0,3$	0,001

Де p^* — оцінка значимості різниці за критерієм Манна-Уїтні.

Таблиця 4. Бальна оцінка та динаміка набряку рогівки в різних групах дослідження

Період	Групи дослідження							
	1		2		3		4	
1	2,3±0,5	–	2,4±0,5	–	2,3±0,5	–	2,3±0,5	–
3	1,5±0,5	0,011	1,5±0,5	0,006	1,7±0,7	0,067	2,6±0,5	0,343
7	1,2±0,4	0,0001	1,2±0,4	0,0001	1,2±0,4	0,002	2,4±0,5	0,629
10	1,0	0,0001	1,0	0,0001	1,1±0,3	0,001	2,2±0,4	0,599
14	1,0	0,0001	1,0	0,0001	1,0	0,0001	2,0±0,5	0,254
20	1,0	0,0001	1,0	0,0001	1,0	0,0001	1,1±0,3	0,001

Де р* — оцінка значимості різниці за критерієм Манна-Уїтні.

При посіві виділень з кон'юнктивальної порожнини на другу добу спостерігався бурхливий ріст колоній *Staphylococcus aureus* і *Escherichia coli*. На сьому добу спостереження і 5 добу після початку лікування в першій і другій групах по даним проведеного бактеріологічного дослідження росту мікрофлори не відмічалось. В третій групі відсутній ріст мікрофлори спостерігався на 8 добу після початку лікування. В контрольній групі ріст мікрофлори був відсутній на 18 добу після початку лікування.

При оцінці рН тесту з кон'юнктивальної порожнини на другу добу дослідження до початку лікування у всіх тварин показники були із зсувом в бік лужного. На сьому добу дослідження відмічалась нормалізація рН в першій і другій групах дослідження, в третій групі рН наблизився до норми на 14 добу. В контрольній групі рН в межах нейтрального був на 20 добу.

Література

1. Волкович Т. К. Защитные факторы слёзной жидкости и их значение в диагностике заболеваний глаз // Вестник ВГМУ. — 2008. — Том 7, № 3.
2. Волкович Т. К., Королькова Н. К., Хорошенькая Н. В. Бактериальный кератит: этиология, патогенез // Вестник ВГМУ. — 2011. — Том 10, № 3. — С. 6–11.
3. Гайдамака Т. Б. Новый способ моделирования вирусного кератита // Офтальмол. журн. — 1999. — № 6. — С. 429–431
4. Доленко О. В. Показники імуноглобулінів та лізоциму цервікального слизу при фотодинамічній терапії неспецифічних бактеріальних вульвовагінітів і цервіцитів / О. В. Доленко // Експеримент. і клініч. медицина. — 2006. — № 2. — С. 141–143.
5. Морхат В. И., Волкович Т. К. Особенности течения первичной и вторичной форм бактериального кера-

Висновки

1. Відмічається скорочення строку видужування експериментального бактеріального кератиту на 3 доби при застосуванні фотодинамічної хіміотерапії у порівнянні із стандартною антибіотикотерапією.

2. При застосуванні димексиду в якості провідника МС в клітини і НЕЛВ видужування спостерігалось на одну добу раніше у порівнянні з МС і НЕЛВ.

3. При проведенні фотодинамічної хіміотерапії усунення мікробного обсіменіння експериментального бактеріального кератиту відбувалося в 2 рази швидше ніж при антибіотикотерапії.

4. Показник рН при фотодинамічній хіміотерапії приходив в норму в 2 рази швидше ніж при антибіотикотерапії.

тата // Новости хирургии. — 2010. — № 5, Т. 18. — С. 107–111.

6. Пасечнікова Н. В. Фотодинамічна терапія інфекційних агентів (огляд літератури) / Н. В. Пасечнікова, О. В. Зборовська // Ліки. — 2002. — № 5–6. — С. 43–47.
7. Пасечнікова Н. В. Фотодинамічний вплив гелій-неонового лазера на *staphylococcus aureus* і *streptococcus pyogenes* in vitro / Н. В. Пасечнікова, О. В. Зборовська, В. А. Піотрович, Т. В. Таран // Одеський мед. журнал. — 2003. — № 3. — С. 14–16.
8. Dave S. B., Toma H. S., Kim S. J. Changes in ocular flora in eyes exposed to ophthalmic antibiotics // Ophthalmology. — V.120. — № 5. — P.937–941.
9. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* — the «accidental» pathogen // Nat Rev Microbiol. — 2007. — № 7. — P.555–67

Поступила 03.04.2014

References

1. **Volkovich TK.** Protective factors lacrimal fluid and their importance in the diagnosis of eye diseases. Vestnik VGMU. 2008;7(#). Russian.
2. **Volkovich TK, Korolkova NK, Khoroshenkaya NV.** Bacterial keratitis: etiology, pathogenesis. Vestnik VGMU. 2011;10(3):6–11. Russian.
3. **Gaidamaka TB.** A new way of modeling viral keratitis. Oftalmol Zh. 1999;6:429–31. Russian.
4. **Dolenko OV.** Indicators of immunoglobulins and lysozyme of cervical mucus during photodynamic therapy of non-specific bacterial vulvovaginitis and cervicitis. Eksperiment. i klinich. Meditsina. 2006;2:141–3. Ukrainian.
5. **Morkhat VI, Volkovich TK.** Features of course of primary and secondary forms of bacterial keratitis. Novosti khirurgii. 2010;18(5):107–11. Russian.
6. **Pasychnikova NV, Zborovska OV.** Photodynamic therapy of infectious agents (review). Liky. 2002;5–6:43–7. Ukrainian.
7. **Pasychnikova NV, Zborovska OV, Piotrovich VA, Taran TV.** Photodynamic effect of helium-neon laser on staphylococcus aureus I streptococcus pyogenes in vitro. Odeskyi med. Zhurnal. 2003;3:14–6. Ukrainian.
8. **Dave SB, Toma HS, Kim SJ.** Changes in ocular flora in eyes exposed to ophthalmic antibiotics // Ophthalmology. 120(5):937–41
9. **Otto M.** Staphylococcus epidermidis — the «accidental» pathogen. Nat Rev Microbiol. 2007;7:555–67

Received 03.04.2014