

УДК 617.713-002.-092.9:617.764.1-008.811.4

Влияние дефицита слезной жидкости на развитие эндотоксин-индуцируемого кератита

Т. Б. Гайдамака¹, С. Я. Рафалюк²

¹ ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им.

В. П. Филатова НАМН Украины»

² Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого

E-mail: drgaydamaka@list.ru

Вступ. Проблема порушень сльозоутворення і сухого ока за останні роки набула високу актуальність у зв'язку з його значною поширеністю.

Мета. Вивчити вплив зниження продукції сльозної рідини на розвиток ендотоксин-індукованого кератиту.

Матеріал і методи. Всі лабораторні тварини були розділені на 4 групи: 1 група — контрольна (7 кроликів), 2 група — дослідна (6 кроликів), тварини з моделлю синдрому сухого ока, 3 група — дослідна (12), тварини з кератитом, 4 група — дослідна (11), тварини з кератитом і моделлю синдрому сухого ока. Оцінка стану рогівки проводилася за допомогою Draize-критерію (ступінь помутніння рогівки, ступінь набряку, ступінь інфільтрації рогівки, флуоресцеїновий тест — площа фарбування поверхні рогівки флуоресцеїном).

Результати. Аналізуючи отримані нами результати клінічної оцінки запального процесу в роговій оболонці при моделюванні інтрастромального ендотоксин-індукованого кератиту у інтактних тварин і у тварин з експериментальним синдромом сухого ока, необхідно відзначити, що в другому випадку всі клінічні ознаки кератиту були виражені більш значно.

Висновки. Недостатність сльозної рідини істотно підвищує інтенсивність запалення в роговій оболонці при моделюванні кератиту. Ступінь набрякості рогової оболонки, запальної її інфільтрації і показники флуоресцеїнового тесту в середній період спостереження були вище в середньому на 21 %, 21 % і 17 %, в порівнянні з відповідними показниками при ендотоксин-індукованому кератиті у тварин без синдрому сухого ока.

Ключевые слова: кератит, слезная жидкость

Ключові слова: кератит, сльозна рідина

Effect of tear deficiency on the course of endotoxin-induced keratitis

T. B. Gaydamaka,¹ S. Ya. Rafalyuk²

¹ Filatov Eye Disease and Tissue Therapy Institute, Odessa,

² Danylo Halytsky Lviv National Medical University

E-mail: drgaydamaka@list.ru

Background: In recent years, the problem of tear production disorders and dry eye syndrome (DES) has become increasingly important because of significant worldwide prevalence of DES.

Purpose: To investigate the effect of decreased tear production on the course of endotoxin-induced keratitis in rabbits.

Materials and Methods: Animals were divided into three groups: group 1 (controls; 7 rabbits), group 2 (keratitis-only group; 9 rabbits, 18 eyes), and group 3 (keratitis + dry eye model group; 10 rabbits; 20 eyes). The state of the cornea was scored by Draize criteria (the degree of corneal opacity, degree of corneal edema, degree of corneal infiltration and corneal fluorescein staining area) at preselected intervals (24, 48 and 72 hours) postinfection.

Results: It should be noted that the analysis of clinical scores of corneal inflammation in the models of intrastromal endotoxin-induced keratitis in intact animals and in those with experimental dry eye showed that the clinical manifestations in the latter were more pronounced.

Conclusion: Tear deficiency significantly contributes to corneal inflammation in animal models of keratitis. Within the observation period, mean corneal edema, inflammatory infiltration and fluorescein staining scores in the (dry eye + keratitis) rabbit model were 21 %, 21 % and 17 %, respectively higher than those in endotoxin-induced keratitis in animals without dry eye.

Key words: keratitis, tear production

Введение. Проблема нарушений слезообразования и синдрома сухого глаза за последние годы приобрела высокую актуальность в связи с его значительной распространенностью. Заболевание отмечается у 9–18 % населения развитых стран мира, а частота его выявления имеет тенденцию к повышению: за последние 30 лет она возросла в 4,5 раза. Синдром сухого глаза по праву считают болезнью цивилизации — его регистрируют практически у каждого второго больного при первичном обращении к офтальмологу по поводу заболеваний глаз или с целью коррекции зрения. Отмечено, что данный синдром регистрируют у 12 % пациентов в возрасте моложе 50 лет и у 67 % — старше 50 лет [1, 3, 4, 8, 9, 19].

В настоящее время выявлен целый ряд патохимических изменений в роговице при моделировании сухого глаза. В частности, повышается концентрация лактатдегидрогеназы и альбумина — известных маркеров поражения роговицы, высвобождаемых в слезную жидкость [2, 10, 13, 15, 20].

Особое внимание офтальмологов к проблеме синдрома сухого глаза вызвано не только его распространенностью, но и повышенной частотой при тяжелых инфекционных воспалительных процессах роговицы, таких как кератит [6, 11, 12, 14, 22].

В предыдущем исследовании нами было показано, что при моделировании синдрома сухого глаза в роговице и слезной жидкости существенно понижается восстановительный потенциал тиоловых соединений. Развитие кератита у животных с синдромом сухого глаза вызывает более резкое достоверное падение восстановленного глутатиона по сравнению с данными при кератите без синдрома сухого глаза. Наличие синдрома сухого глаза при развитии воспалительного процесса в роговице вызывает в ней более высокую степень окислительного стресса, о чем свидетельствует достоверное повышение уровня окисленной формы глутатиона как в роговой оболочке, так и слезе [3, 7].

В этой связи значительный интерес представляет изучение влияния дефицита слезной жидкости на защитно-приспособительные механизмы роговицы в условиях развития в ней воспалительного процесса.

Цель работы: изучить влияние снижения продукции слезной жидкости на развитие эндотоксин-индуцируемого кератита.

Материал и методы

Для проведения экспериментов было использовано 36 кроликов породы шиншилла массой 2,2–2,9 кг.

Работа с животными проводилась с учетом требований *Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с экспериментальными животными, предложенных на Совете международных медицинских организаций (1985 г.) «О мерах по дальнейшему совершен-*

ствованию форм работы с использованием экспериментальных животных».

Экспериментальный кератит вызывали интрастромальной инъекцией 50 мкл 0,2 % раствора эндотоксина — липополисахарида на фосфатном буфере [17, 18].

Для развития синдрома сухого глаза использовали 0,1 % раствор БАХ, приготовленный на изотоническом фосфатном буфере (рН 7,3–7,4). Инстилляцию проводили ежедневно (2 раза в день) на протяжении двух недель [16, 21].

Животные выводились из эксперимента с помощью летальной дозы пентобарбитола натрия (100 мг на кг вводимого в маргинальную ушную вену).

Все лабораторные животные были разделены на четыре группы: 1 группа — контрольная (7 кроликов), 2 группа — опытная (6 кроликов), животные с моделью синдрома сухого глаза, 3 группа — опытная (12 кроликов), животные с кератитом, 4 группа — опытная (11 кроликов), животные с кератитом и моделью синдрома сухого глаза.

Оценка состояния роговой оболочки проводилась с помощью Draize-критерия (степень помутнения роговицы, степень отека роговицы, степень инфильтрации роговицы, флюоресцеиновый тест — площадь окрашивания поверхности роговицы флюоресцеином).

Признаки кератита оценивались в баллах по следующей условной шкале:

Отек роговицы (0 — отек роговицы отсутствует, роговица прозрачная на всем протяжении; 1 — локальный отек эпителия роговицы в зоне воспаления; 2 — локальный отек эпителия с переходом на поверхностные слои стромы; 3 — локальный отек в поверхностных и средних слоях стромы); *воспалительная инфильтрация* (0 — инфильтрация отсутствует; 1 — точечные единичные (не более трех) субэпителиальные инфильтраты; 2 — точечные множественные (более трех) субэпителиальные инфильтраты; 3 — множественные субэпителиальные инфильтраты размером более 1 мм; 4 — локальная инфильтрация в поверхностных и средних слоях стромы); *флюоресцеиновый тест* (0 — локальное окрашивание отсутствует; 1 — точечное окрашивание роговицы; 2 — площадь окрашивания < 3 мм²; 3 — площадь окрашивания > 3 мм²); *помутнение роговицы* (0 — отсутствует; 1 — есть); *локализация воспалительного очага в роговице* (1 — центральная; 2 — парацентральная).

Полученные данные клинических наблюдений подвергались статистической обработке посредством пакета SPSS 11.0 (с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни) [5].

Результаты и их обсуждение

Необходимо отметить, что изменения величин показателей теста Ширмера при моделировании сухого глаза снижались в среднем на 25 %, что соответствовало данным, приведенным авторами экспериментальной модели сухого глаза [16, 21].

Данные сравнительного анализа выраженности клинических признаков патологического состояния роговой оболочки у кроликов при моделировании кератита и синдрома сухого глаза в зависимости от срока наблюдения представлены в таблицах 1–3.

Как видно из данных таблицы 1, выраженность отека роговицы у животных с кератитом в I срок наблюдения составила — (1,78±0,55) балла, при этом средний ранговый показатель был равен — 17,97, а

Таблица 1. Показатели степени отека роговицы у кроликов при моделировании кератита и синдрома сухого глаза в зависимости от срока наблюдения (в баллах)

Сроки	Статистические показатели	Условия эксперимента	
		Кератит n=18	Кератит + сухой глаз n=20
I	M	1,78	1,95
	SD	0,55	0,51
	%	100,0	109,6
II (7-й день)	M	2,44	2,95
	SD	0,51	0,22
	%	100,0	120,9
III (14-й день)	M	1,56	1,80
	SD	0,62	0,41
	%	100,0	115,4

Примечание: % — относительный показатель выраженности отека роговицы у кроликов группы «Кератит+сухой глаз» по отношению к группе «Кератит»; n — количество глаз.

в группе с кератитом и синдромом сухого глаза степень отека роговицы составила — (1,95±0,51) балла (109,6 %), показатель среднего ранга равнялся — 20,88.

Показатели выраженности отека роговицы во II срок наблюдения в группе животных с кератитом были равны — (2,44±0,51) балла, а средний ранговый показатель — 14,44. В группе с кератитом и синдромом сухого глаза отек роговицы составил (2,95±0,22) балла (120,9 %), а показатели среднего ранга — 24,05 (p<0,001).

В III срок наблюдения в экспериментальной группе животных с кератитом, выраженность отека роговицы составила (1,56±0,62) балла, а данные по среднему рангу — 16,94. У животных с кератитом и синдромом сухого глаза показатели отека роговицы равнялись (1,80±0,41) балла (115,4 %), а средний ранг — 21,80.

Согласно данным таблицы 2, выраженность воспалительной инфильтрации роговой оболочки

Таблица 2. Показатели выраженности воспалительной инфильтрации роговицы у кроликов при моделировании кератита и синдрома сухого глаза в зависимости от срока наблюдения (в баллах)

Сроки	Статистические показатели	Условия эксперимента	
		Кератит n=18	Кератит+сухой глаз n=20
I	M	2,33	2,70
	SD	0,59	0,80
	%	100,0	115,9
II (7-й день)	M	3,06	3,70
	SD	0,38	0,57
	%	100,0	120,9
III (14-й день)	M	1,61	1,80
	SD	0,50	0,41
	%	100,0	111,8

Примечание: % — относительный показатель выраженности отека роговицы у кроликов группы «Кератит+сухой глаз» по отношению к группе «Кератит»; n — количество глаз.

у животных с кератитом в I срок эксперимента составила (2,33±0,59) балла, а показатели среднего ранга — 16,89. В группе животных с кератитом и синдромом сухого глаза степень воспалительной инфильтрации оценивалась в (2,70±0,80) балла (115,9 %), а сравнительная ранговая оценка — 21,85.

Во II период наблюдения у животных с кератитом показатели воспалительной инфильтрации роговицы в среднем был равен (3,06±0,38) балла, а средний ранговый показатель — 13,81. В группе животных с кератитом и синдромом сухого глаза эти показатели соответственно составляли — (3,70±0,57) балла (120,9 %) и 24,63 (p<0,001).

В конце периода наблюдений (III срок) степень воспалительной инфильтрации роговицы у животных с кератитом составила — (1,61±0,50) балла, показатель среднего ранга — 17,61. В группе животных с кератитом и синдромом сухого глаза выраженность воспалительной инфильтрации роговицы была равна 1,80±0,41, (111,8 %) а средний ранговый показатель — 21,20.

По данным таблицы 3 видно, что выраженность окрашивания роговицы флюоресцеином у животных с кератитом в I срок наблюдения составила — (1,78±0,55) балла, сравнительная ранговая оценка — 18,44. В группе животных с кератитом и синдромом сухого глаза, показатели флюоресцеинового теста равнялись (1,90±0,55) балла (106,7 %), а средняя ранговая оценка — 20,45.

На седьмой день степень окрашивания роговицы флюоресцеином у животных с кератитом составила (2,28±0,46) балла, показатели среднего ранга — 15,78. В группе животных с кератитом и синдромом сухого глаза выраженность окрашивания роговицы флюоресцеином была равна (2,65±0,49) балла, а средний ранговый показатель — 22,85 (p<0,05).

Таблица 3. Показатели флюоресцеинового теста роговицы у кроликов при моделировании кератита и синдрома сухого глаза в зависимости от срока наблюдения (в баллах)

Сроки	Статистические показатели	Условия эксперимента	
		Кератит n=18	Кератит+сухой глаз n=20
1	M	1,78	1,90
	SD	0,55	0,55
	%	100,0	106,7
2 (7-й день)	M	2,28	2,65
	SD	0,46	0,49
	%	100,0	116,9
3 (14-й день)	M	1,39	1,55
	SD	0,50	0,60
	%	100,0	111,5

Примечания: % — относительный показатель выраженности отека роговицы у кроликов группы «Кератит + сухой глаз» по отношению к группе «Кератит»; n — количество глаз.

На 14 день у животных с кератитом показатель флюоресцеинового теста составили $(1,39 \pm 0,50)$ балла, а оценка среднего ранга — 18,19. В группе животных с кератитом и синдромом сухого глаза, степень окрашивания роговицы флюоресцеином выражалась $(1,55 \pm 0,60)$ баллом (111,5 %), а сравнительный ранговый показатель — 20,67.

Анализируя полученные нами результаты клинической оценки воспалительного процесса в роговой оболочке при моделировании интрастромального эндотоксин-индуцируемого кератита у интактных животных и у животных с экспериментальным синдромом сухого глаза, необходимо отметить, что во втором случае все клинические проявления кератита были выражены более значительно.

Таким образом, можно полагать, что дефицит слезной жидкости существенно снижает защитно-

приспособительные свойства роговицы при развитии воспалительного процесса.

В механизме такого патогенного действия дефицита слезной жидкости существенную роль несомненно играют метаболические нарушения, выявленные нами в роговице при экспериментальном синдроме сухого глаза у кроликов [3, 7].

Вывод

Недостаточность слезной жидкости существенно повышает интенсивность воспалительного процесса в роговой оболочке при моделировании кератита. Показатели степени отечности роговой оболочки, её воспалительной инфильтрации и данные флюоресцеинового теста в период наблюдения в среднем на 21 %, 21 % и 17 %, превышали соответствующие показатели при эндотоксин-индуцируемом кератите у животных без синдрома сухого глаза.

Литература

1. **Анина Е. И.** Распространенность заболеваний роговой оболочки глаза у населения Украины // Тезисы доп. II Міжнародної наук. конф. офтальмологів Причорномор'я. — Одеса, 2004. — С.14.
2. **Бржеский В. В.** Заболевания слезного аппарата: [пособие для практикующих врачей] / **Бржеский В. В.** — [2-е изд.]. — СПб.: Изд-во Н. — Л., 2009. — 106 с.
3. **Гайдамака Т. Б., Рафалюк С. Я.** Влияние эндотоксин-индуцируемого кератита на восстановительный потенциал глутатиона в роговице у животных с экспериментальным синдромом сухого глаза // Офтальмол. журн. — 2014. — № 6. — С. 54–57.
4. **Жабоедов Г. Д.** «Синдром сухого глаза» клиника, диагностика, лечение: учеб. — метод. Рекомендации / Жабоедов Г. Д., Киреев В. В. — К., 2006. — 24 с.
5. **Наследов А.** SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках / Наследов А. — СПб.: Питер, 2005. — 416 с.
6. **Петруня А. М.** Патогенетические особенности кератита при остром конъюнктивите: автореф. дисс. ... канд. мед. наук: 14.01.18 «Одесский НИИ глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова» / А. М. Петруня. — Одесса, 2013. — 19 с.
7. **Сенишин В. И., Рафалюк С. Я.** Влияние консерванта глазных капель бензалкония хлорида на состояние митохондриальных ферментов тканей переднего отдела глаза // Офтальмол. журн. — 2014. — № 4. — С. 37–40.
8. **Сомов Е. Е.** Синдром слезной дисфункции (анатомо-физиологические основы, диагностика, клиника и лечение) / **Сомов Е. Е.** — СПб.: Человек, 2011. — 160 с.
9. **Albeitz J. M.** Prevalence of dry eye subtypes in clinical optometry practice / Albeitz J. M. // Optom. Vis. Sci. — 2000. — Vol. 77. — P. 357–363.
10. **Barabino S.** Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: uses and limitations / Barabino S., Chen W., Reza Dana M. // Exp. Eye Res. — 2004. — Vol. 613–621.
11. **Baudouin C.** The pathology of dry eye / Baudouin C. // Surv. Ophthalmol. — 2001. — Vol. 45. — P. S211–S220.
12. **Bourcier T., Thomas F., Borderie V.** Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases // Br. J. Ophthalmol. — 2003. — Vol. 87. — P. 834–838.
13. **Brewitt H.** Dry eye disease: the scale of the problem / Brewitt H., Sistani F. // Surv Ophthalmol. — 2001. — Vol. 45. — P. S199–S202.
14. **Carlson E. C.** Visualization and characterization of inflammatory cell recruitment and migration through the corneal stroma in endotoxin-induced keratitis / Carlson E. C., Drazba J., Yang X. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2006. — Vol. 47. — P. 241–248.
15. **Kim J. R., Oh T. H., Kim H. S.** Effect of benzalkonium chloride on the ocular surface of the rabbit // Jpn. J. Ophthalmol. — 2011. — Vol. 55. — P. 283–293.
16. **Lin Z., Liu X., Zhou T.** A model of dry eye induced by topical administration of benzalkonium chloride // Mol. Vis. — 2011. — Vol. 17. — P. 257–264.
17. **Schultz C. L.** Lipopolysaccharide induced acute red eye and corneal ulcers / Schultz C. L., Morck D. W., McKay S. G. // Exp. Eye Res. — 1997. — Vol. 64. — P. 3–9.
18. **Schultz C. L.** Lipopolysaccharide entry in the damaged cornea and specific uptake by polymorphonuclear neutrophils / Schultz C. L., Buret A. G., Olson M. E. // Infect. Immunity. — 2000. — Vol. 68. — № 3. — P. 1731–1734.
19. **Trinkaus-Randall V.** Quantification of stromal destruction in the inflamed cornea / Trinkaus-Randall V., Leibowitz H. M., Ryan W. J. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 1991. — Vol. 32. — № 3. — P. 603–609.
20. **Trocme S., Hwang L.-J., Bean G. W.** The role of benzalkonium chloride in the occurrence of punctate keratitis: a meta-analysis of randomized, controlled clinical trials // Ann. Pharmacother. — 2010. — Vol. 44. — P. 1914–1921.
21. **Xiong C.** A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride / Xiong C., Chen D., Liu J. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2008. — Vol. 49. — P. 1850–1856.
22. **Yuan X., Wilhelmus K. R., Matoba A. Y.** Pathogenesis and outcome of paecilomyces Keratitis // Am. J. Ophthalmol. — 2009. — Vol. 147. — P. 691–696.

Поступила 28.04.2015

References

1. **Anina EI.** [Prevalence of corneal disorders in Ukrainian population]. In: [Proceedings of the 2nd International Conference of the Black Sea Ophthalmological Society]; 2004 Sep 8–10; Odessa. p.14. Russian.
2. **Brzheskii VV, Astakhov IuS, Kuznetsova NIu.** [Tear system disorders: A manual for ophthalmic practitioners]. 2nd rev. ed. St. Petersburg: N-L; 2009. 108 p. Russian.
3. **Gaydamaka TB, Rafalyuk SYa.** [Effect of endotoxin-induced keratitis on the reduction potential of glutathione in the cornea of animals with experimental dry eye syndrome]. *Oftalmol Zh.* 2014;(6):54–7. Russian.
4. **Zhaboedov GD, Kireev VV.** [Dry eye syndrome: Clinical picture, diagnosis and treatment. Guidelines for medical students and practitioners]. Kyiv, 2006. 24 p. Russian.
5. **Nasledov AD.** [SPSS. Computer data analysis in psychology and social science]. St. Petersburg: Piter; 2005. 416 p. Russian.
6. **Petrunia AM.** [Pathogenetic features of keratitis in acute conjunctivitis]. [Cand. Sc. (Med) Thesis Abstract]. Odessa: Filatov Eye Disease and Tissue Therapy Institute; 2013. 19 p. Russian.
7. **Senyshyn VI, Rafalyuk SYa.** [Effect of ophthalmic preservative, benzalkonium chloride, on the mitochondrial enzymes of anterior eye tissues]. *Oftalmol Zh.* 2014;(4):37–40. Russian.
8. **Somov EE.** [Tear dysfunction syndrome: anatomic and physiological basis, clinical picture and treatment]. St. Petersburg: Chelovek; 2011. 160 p. Russian.
9. **Albietz JM.** Prevalence of dry eye subtypes in clinical optometry practice. *Optom Vis Sci.* 2000 Jul;77(7):357–63.
10. **Barabino S, Chen W, Dana MR.** Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: uses and limitations. *Exp Eye Res.* 2004;79:613–21.
11. **Baudouin C.** The pathology of dry eye. *Surv Ophthalmol.* 2001;45(Suppl. 2):S211–20.
12. **Bourcier T, Thomas F, Borderie V et al.** Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases. *BrJ Ophthalmol.* 2003;87(7):834–8.
13. **Brewitt H, Sistani F.** Dry eye disease: The scale of the problem. *Surv Ophthalmol.* 2001;45(Suppl. 2):S199–202.
14. **Carlson E C, Drazba J, Yang X, Perez V L.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47: 241–8.
15. **Kim JR, Oh TH, Kim HS.** Effects of benzalkonium chloride on the ocular surface of the rabbit. *Jpn J Ophthalmol.* 2011 May;55(3):283–93.
16. **Lin Z, Liu X, Zhou T et al.** A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride. *Mol Vis.* 2011; Jan 25;17:257–64.
17. **Schultz CL, Morck DW, McKay SG et al.** Lipopolysaccharide induced acute red eye and corneal ulcers. *Exp Eye Res.* 1997 Jan;64(1):3–9.
18. **Schultz CL, Buret AG, Olson ME et al.** Lipopolysaccharide entry in the damaged cornea and specific uptake by polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun.* 2000 Mar;68(3):1731–4.
19. **Trinkaus-Randall V, Leibowitz HM, Ryan WJ, Kupferman A.** Quantification of stromal destruction in the inflamed cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991 Mar;32(3):603–9.
20. **Trocme S, Hwang LJ, Bean GW, Sultan MB.** The role of benzalkonium chloride in the occurrence of punctate keratitis: a meta-analysis of randomized, controlled clinical trials. *Ann Pharmacother.* 2010 Dec;44(12):1914–21.
21. **Xiong C, Chen D, Liu J et al.** A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 May;49(5):1850–6.
22. **Yuan X, Wilhelmus KR, Matoba AY et al.** Pathogenesis and outcome of *Paecilomyces* keratitis. *Am J Ophthalmol.* 2009 Apr;147(4):691–696.

Received 28.04.2015