
© Сотникова Е.П., Салдан В.И., Абрамова А.Б., Молодая А.Л.

УДК: 617.713-002-078-092.9-085:615.454-097

Сотникова Е.П., Салдан В.И., Абрамова А.Б., Молодая А.Л.

ГУ "Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П.Филатова НАМН Украины", лаборатория фармакологии и тканевой терапии (Французский б-р, 49/51, г. Одесса, Украина, 65061)

ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ ГЛАЗНЫХ МАЗЕЙ БИОПЕЛОИДОВ И ГЕНТАМИЦИНА НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО КЕРАТИТА

Резюме. При цитологическом исследовании мазков-отпечатков с поверхности конъюнктивы установлено, что сочетанное применение глазных мазей биопелоидов и гентамицина в условиях бактериального кератита оказывает положительное влияние на клеточное звено местного иммунитета: на 10,3% возрастает количество ЛФ по сравнению с первым днем (модель) и на 9,5% по отношению к контролю; на 8,7% увеличивается лейкоцитарная инфильтрация конъюнктивы (в контрольной группе - на 7,5%). Интенсивность фагоцитоза в опытной группе на 14-й день лечения возрастает практически вдвое (в 2,5 раза) и на 21-ый день сохраняется на высоком уровне (1,7 раза) по показателям фагоцитарной активности, фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы.

Ключевые слова: глазные мази, биопелоиды, гентамицин, бактериальный кератит, местный иммунитет, эксперимент.

Введение

Бактериальные кератоконъюнктивиты являются основными формами инфицированных глаз, составляя около 30% всей глазной патологии и 66,7% от общего числа больных с воспалительными заболеваниями глаз. Заболевание характеризуется тяжестью клинического течения, которое приводит к значительному снижению зрения, а также развитию осложнений. Широкое применение традиционной антибиотикотерапии не всегда обеспечивает положительный лечебный эффект. Основная причина заключается в развитии устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, а также в возникновении аллергических реакций на их применение [Майчук, 2000; Майчук, 2002]. В связи с этим, одной из важных задач практической офтальмологии является поиск и разработка новых оптимальных методов фармакотерапии бактериальных кератитов с включением натуральных метаболитотропных препаратов, обладающих выраженными противовоспалительными и регенераторными свойствами.

В настоящее время внимание клиницистов привлекают природные биологически активные вещества, механизм действия которых направлен на стимуляцию защитных систем организма и снятие побочного действия синтезированных препаратов. Важными моментами патогенетической терапии являются усиление метаболических процессов в тканях переднего отдела глаза, улучшение микроциркуляции, защита клеток роговицы от свободных радикалов. Экспериментальные и клинические исследования показывают, что введение в организм биогенных препаратов, в частности, пелоидодистиллата для инъекций, способствует активации физиологических механизмов иммунной защиты организма (выработка антител, усиление фагоцитарной активности лейкоцитов и др.). Под их влиянием происходит глубокая перестройка организма, сопровождающаяся изменением активности и качества его ферментных систем, гормональной функции, стимуляцией системы соединительной ткани и повышением реактивирующих свойств. Немаловажное значение имеет сочетанное использование биопрепаратов и специфических лекарственных средств. Наибольшую практическую ценность представляют данные о повышении лечебного действия синтезированного специфического средства, введенного совместно с биопрепаратами. Подобное сочетание оказывает положительное местное воздействие на ткани глаза за счёт реиннервации и реваскуляризации новообразованными нервами и сосудами вокруг трансплантата и одновременного действия лекарственного препарата, что благоприятно влияет на функциональную полноценность тканей глазного яблока [Абрамова, Соколова, 2006; Сакович, 2003; Сакович, 2004; Сотникова и др., 2007; Федоров, Шерстнева, 1997; Allansmith et al., 1978].

На основе пелоидодистиллата нами разработаны оригинальные глазные формы биопелоидов (капли,

мазь), изучены их фармакобиологические свойства на здоровых кроликах и при воспроизведении стафилококкового инфицирования роговицы - бактериального кератита (БК).

Цель исследования - изучить влияние сочетанного применения биопелоидной и гентамициновой глазных мазей на некоторые показатели местного иммунитета при воспроизведении БК у кроликов.

Материалы и методы

Исследования проведены на 14 половозрелых кроликах породы Шиншилла, распределённых на 2 равные группы. После воспроизведения БК, на фоне развития воспалительного процесса, кроликам опытной группы ежедневно, 2 раза в день, в конъюнктивальный мешок оперированного глаза последовательно закладывали вначале биопелоидную, а через 15 минут - гентамициновую мазь. Контрольная группа получала только гентамициновую мазь по той же схеме [Чайка и др., 2003]. Местный иммунитет изучали с помощью метода цитологического исследования мазков-отпечатков с поверхности конъюнктивы глаз кроликов после воспроизведения БК (до начала лечения), на 7, 14 и 21 дни лечения. Принцип метода: к нижней пальпебральной и бульбарной поверхности конъюнктивы на 3 мин. прикладывали стерильную пластинку-переносчик. Затем её помещали на предметное стекло и тщательно придавливали. Полученные мазки-отпечатки фиксировали, окрашивали по методу Романовского и микроскопировали согласно общепринятым методам. Производили подсчет количества эпителиоцитов (ЭП) и лейкоцитов (ЛК), а также вычисляли процентное соотношение подтипов ЛК: лимфоцитов (ЛФ), нейтрофилов (НФ). Цитологическое исследование включало также оценку характера фагоцитоза. Принцип метода основывается на количественном подсчёте фагоцитированных сегментоядерных нейтрофилов и поглощённых ими микроорганизмов. Интенсивность фагоцитоза определяли по следующим показателям: фагоцитарная активность (ФА) - процентное соотношение активных фагоцитирующих нейтрофилов к общему числу подсчитанных нейтрофилов; фагоцитарный индекс (ФИ) - среднее количество поглощённых микроорганизмов, приходящихся на 1 активный нейтрофил; фагоцитарное число (ФЧ) - количество фагоцитированных микроорганизмов к общему числу подсчитанных нейтрофилов [Кульбаба, 2003; Кульбаба, 2007; Тост, 1999; Allansmith et al., 1978].

Результаты. Обсуждение

Непосредственно после воспроизведения БК количество ЭП в мазках-отпечатках опытной группы составило (82,1±6,8)%, ЛК (17,9±1,2)%, в контрольной - (80,4±6,5)% и (19,6±1,6)%, соответственно (табл. 1).

При подсчёте лейкоцитарной формулы было выяв-

Таблица 1. Влияние биопелоидной глазной мази на соотношение эпителиоцитов и лейкоцитов в мазках-отпечатках конъюнктивы в динамике лечения БК (%).

Группы	Модель		Дни лечения					
			7		14		21	
	ЭП	ЛК	ЭП	ЛК	ЭП	ЛК	ЭП	ЛК
Контроль, М±m	80,4±6,5	19,6±1,6	74,6±6,1	25,4±2,4	73,8±6,2	26,2±2,0	72,9*±6,3	27,1*±2,5
Опыт, М±m	82,1±6,8	17,9±1,2	76,1±6,7	23,9±2,3	71,8±6,1	28,2±2,4	73,4*±6,2	26,6*±2,4

Примечание. * - $p < 0,05$ по отношению к первому дню модели.

Таблица 2. Влияние глазной мази биопелоидов на динамику изменений соотношения 2-х подтипов лейкоцитов в мазках-отпечатках конъюнктивы в процессе лечения БК (%).

Группы	Модель		Дни лечения					
			7		14		21	
	ЭП	ЛК	ЭП	ЛК	ЭП	ЛК	ЭП	ЛК
Контроль, М±m	70,4±6,5	29,6±2,6	69,1±5,1	30,9±2,8	74,0±6,2	26,0±2,6	70,9±6,3	29,1±2,5
Опыт, М±m	71,1±6,3	28,9±2,7	75,1±5,7	24,9±2,3	78,8*±6,5	21,2*±2,1	80,4*±6,8	19,6*±2,1

Примечание. * - $p < 0,05$ по отношению к первому дню (модель) и к контрольной группе.

лено значительное преобладание ЛФ над НФ. Так, в опытной группе количество ЛФ равнялось 71,1±6,3%, НФ - 28,9±2,7%, а в контроле - 70,4±6,5% и 29,6±2,6% соответственно.

На 7-й день лечения в обеих группах отмечено изменение процентного соотношения ЭП и ЛК: уменьшение ЭП и увеличение ЛК на 6 % по сравнению с исходными показателями (до лечения). При этом в опытной группе наблюдается снижение на 6 % количества НФ по сравнению с контролем.

На 14-й день лечения количество ЭП составляло в опытной группе в среднем 71,8±6,1%, ЛК - 28,2±2,4%, а в контроле - 73,8±6,2% и 26,2±2,0% соответственно. На 21-й день соотношение ЭП и ЛК в обеих группах нормализовалось.

До начала лечения в обеих группах выявлено значительное преобладание ЛФ над сегментоядерными НФ. В контрольной группе на 100 ЛК, в среднем, приходилось 70,4±6,5% ЛФ и 29,6±2,6% сегментоядерных НФ; в опытной группе - 71,1±6,3% и 28,5±2,7% соответственно (табл. 2).

На 14-й день лечения в опытной группе количество НФ продолжало снижаться при одновременном возрастании числа ЛФ. При этом сочетанное применение биопелоидной и гентамициновой глазных мазей вызывает гибель патогенного штамма золотистого стафилококка у 5-ти кроликов, а на 21 день - у всех 7, что свидетельствует об усилении бактерицидного действия. В контрольной группе на 14 день отмечен рост патогенного штамма *S.aureus* у 3-х кроликов, а на 21 день - на фоне гибели патогенной микрофлоры произошло ее замещение на условно-патогенную. На 21-й день соотношение ЭП и ЛК стабилизировалось в обеих группах. В опытной - количество ЛФ возросло, а НФ снизилось, на 9,3% по сравнению с первым днем модели, что составило 80,4±6,8% и 19,6±2,1%, соответственно. В контрольной группе этой тенденции не наблюда-

лось, что свидетельствует о снижении интенсивности процесса регенерации тканей роговицы при лечении только гентамициновой мазью.

Сопоставляя клиническую картину течения БК с показателями фагоцитоза (ФА, ФИ, ФЧ) можно отметить, что наиболее выражен процесс фагоцитирования в опытной группе именно на 14-й день лечения заболевания. Эта тенденция прослеживается и на 21-й день лечения БК. В этот период наблюдается уменьшение относительного количества нейтрофилов, но при этом увеличивается степень фагоцитоза. Фагоцитоз начинает увеличиваться на 7-й день (ФИ=3,07) и продолжает оставаться на высоком уровне (ФИ=3,42, 2,43), $p < 0,05$, практически до исчезновения признаков воспалительного процесса. В контрольной группе (монотерапия гентамициновой мазью) фагоцитарный индекс повышается до величины 2,09 только к 7-му дню лечения, а затем медленно снижается. Это свидетельствует о снижении поглотительной и внутриклеточной бактерицидной активности фагоцитов (табл. 3).

Интенсивность фагоцитоза при уменьшении отно-

Таблица 3. Влияние глазной мази биопелоидов на показатели фагоцитоза в динамике лечения БК у кроликов (усл. ед.).

Дни наблюдения	Группы животных	Фагоцитарная активность, %	Фагоцитарный индекс	Фагоцитарное число
Модель (до лечения)	Контроль	34	3,12	1,15
	Опыт	33	3,04	0,97
7-й день лечения	Контроль	17	2,09	0,41
	Опыт	18	3,07	0,54
14-й день лечения	Контроль	18	1,73	0,34
	Опыт	36*	3,42*	1,18*
21-й день лечения	Контроль	16	1,4	0,32
	Опыт	21	2,43*	0,54

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к контролю.

сительного числа нейтрофилов позволяет предположить, что сочетанное применение мазей биопелоидов и гентамицина усиливает иммунную реакцию организма кроликов опытной группы.

Таким образом, учитывая клинико-иммунологические характеристики воспалительного процесса, были получены следующие результаты. В обеих исследуемых группах уже на 2 сутки после инокуляции *S.aureus* отмечался активный ответ иммунной системы на чужеродный микробный агент, что полностью соответствовало клиническим проявлениям со стороны глаз у кроликов: конъюнктивальная инъекция, хемоз, отек роговицы. В контрольной группе количественная характеристика всех показателей цитограмм имела тенденцию к увеличению до 14 дня эксперимента, что подтверждалось клиническими признаками хронизации процесса. При этом в опытной группе наблюдалась иная комплексная клинико-иммунологическая картина: уже к 10 дню эксперимента у 90% глаз кроликов отмечен почти полный регресс воспалительного процесса, что подтверждается иммунологически (постепенная нормализация всех показателей местного иммунитета). Как следует из таблиц, нейтрофильная фаза иммунного ответа замещается лимфоцитарной, и на стадии реконвалесценции лимфоцитоз постепенно нормализуется. Таким образом, при применении глазной мази биопелоидов в сочетании с гентамициновой наблюдается более быстрое исчезновение клинических проявлений воспаления (полная санация глаза) и нормализация данных цитограмм.

Выводы и перспективы дальнейших разработок

1. По данным цитологических исследований мазков-отпечатков с поверхности конъюнктивы установ-

лено, что сочетанное применение глазных мазей биопелоидов и гентамицина в условиях бактериального кератита оказывает положительное влияние на клеточное звено местного иммунитета: на 10,3% ($p < 0,05$) возрастает количество лимфоцитов по сравнению с первым днем (модель) и на 9,5% ($p < 0,05$) по отношению к контролю. При этом количество нейтрофилов соответственно снижается.

2. При монотерапии гентамициновой мазью количество лимфоцитов и нейтрофилов практически соответствовало исходным значениям. В опытной группе отмечено увеличение лейкоцитарной инфильтрации конъюнктивы на 8,7% по сравнению с первым днем (модель), в контрольной - на 7,5%.

3. Сочетанное применение обеих глазных мазей усиливает иммунную реакцию организма кроликов опытной группы, о чем свидетельствует интенсивность фагоцитоза (фагоцитарная активность, фагоцитарный индекс и фагоцитарное число), которая возрастает практически вдвое на 14-й день лечения и на 21-ый день сохраняется на высоком уровне (1,7 раз), что соответствует описанию клинической картины заболевания в эти же сроки (купирование воспалительной реакции, процесс эпителизации).

Полученные результаты доклинического исследования показывают перспективность сочетанного применения мазей биопелоидов и гентамицина в условиях бактериального кератита для повышения иммунной реакции организма: усиление клеточного звена местного иммунитета и снижение цитотоксического действия гентамицина. Выраженные противовоспалительные и регенераторные свойства мази биопелоидов позволяют рекомендовать её для клинической апробации в качестве эффективного патогенетического средства в комплексной фармакотерапии бактериального кератита.

Список литературы

- Абрамова А. Б. Оцінка нешкідливості та лікувальної ефективності очної мазі на основі торфоту в експерименті на тваринах / А.Б. Абрамова, Б.Н. Соколова // III Нац. з'їзд фармакологів України, 17-20 жовт. 2006 р.: тези доп. - Одеса, 2006. - С.3
- Кульбаба О. Г. Вплив на клітинні реакції кон'юнктиви дексаметазону / О. Г. Кульбаба // Вісник морфології. - 2003. - № 1. - С. 88-89.
- Кульбаба О. Г. Цитологічні дослідження кон'юнктиви при інфекційних захворюваннях поверхні очей / О. Г. Кульбаба // Вісник Вінницького державного медичного університету. - 2003. - Т. 7, № 2. - С. 654-656.
- Кульбаба О. Г. Зміни місцевого імунітету при лікуванні хворих на герпетичний кератит / О. Г. Кульбаба // Офтальмологічний журнал. - 2007. - № 6. - С. 114-118.
- Майчук Ю. Ф. Успехи и проблемы фармакотерапии инфекционных и аллергических заболеваний глаз / Ю.Ф. Майчук // Рус. офтальм. журн. - 2000. - № 1. - С. 13-17
- Майчук Ю. Ф. Оптимизация антибактериальной терапии при глазных инфекциях / Ю.Ф. Майчук, А.М. Южаков // Рефр. хир. и офтальм. - 2002. - Т. 2, - № 2. - С. 44-52
- Сакович В. Н. Сравнительная оценка эффективности применения пробиотика субалина и пелоидов в лечении поверхностных герпетических кератитов / В. Н. Сакович // Офтальмологічний журнал. - 2003. - № 5. - С. 24-26.
- Сакович В. Н. Динаміка показників клітинного імунітету в хворих з поверхневими формами герпетичних кератитів при різних видах комплексного лікування / В. Н. Сакович // Офтальмологічний журнал. - 2004. - № 4. - С. 10-14.
- Сотникова Е. П. Традиционные основы тканевой терапии и перспективы развития / Е.П. Сотникова, В.И. Салдан, Г.С. Фесюнова // Экспериментальная и клиническая медицина. - 2007. - № 1. - С. 15-19.
- Тост Ф. Цитологічні дослідження кон'юнктиви / Ф. Тост, Г. Дункер, Г. І. Дрожжина // Офтальмологічний журнал. - 1999. - № 3. - С. 192-195.
- Федоров А. А. Клинико-цитологические параллели при воспалительных заболеваниях конъюнктивы / А.А. Федоров, Л.В. Шерстнева // Вестник офтальм. - 1997. - № 3. - С. 33-36.
- Экспериментальное изучение безвредности и фармакологической активности глазных лекарственных средств: метод. рекомендации / [Л. А. Чайка, А. Г. Ципкун, Т. Б. Гайда-

мака и др.]. - К., 2003. - 43 с. cells in the normal conjunctiva / M. R. // American journal of ophthalmology.
Allansmith M. R. Number of inflammatory Allansmith, G. V. Greiner, R. S. Baird - 1978. - Vol. 86 (2). - P. 250-259.

Сотнікова О.П., Салдан В.Й., Абрамова Г.Б., Молода А.Л.

ВПЛИВ СУМІСНОГО ЗАСТОСУВАННЯ ОЧНИХ МАЗЕЙ БІОПЕЛОЇДІВ І ГЕНТАМІЦИНУ ЗА ДЕЯКИМИ ПОКАЗНИКАМИ МІСЦЕВОГО ІМУНІТЕТУ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ БАКТЕРІАЛЬНОГО КЕРАТИТУ

Резюме. При цитологічному дослідженні мазків-відбитків з поверхні кон'юнктиви встановлено, що сумісне застосування очних мазей біопелоїдів і гентаміцину в умовах бактеріального кератиту виявляє позитивний вплив на клітинну ланку місцевого імунітету: на 10,3% збільшується кількість ЛФ у порівнянні з першим днем (модель) і на 9,5% по відношенню до контролю; на 8,7% збільшується лейкоцитарна інфільтрація кон'юнктиви (в контрольній групі - на 7,5%). Інтенсивність фагоцитозу у дослідній групі на 14-й день лікування збільшується практично вдвічі (у 2,5 рази) і на 21-у добу зберігається на високому рівні (1,7 рази) за показниками фагоцитарної активності, фагоцитарного індексу і фагоцитарного числа у порівнянні з аналогічними показниками контрольної групи.

Ключові слова: очні мазі, біопелоїди, гентаміцин, бактеріальний кератит, місцевий імунітет, експеримент.

Sotnikova E.P., Saldan V.I., Abramova A.B., Molodaya A.L.

INFLUENCE OF COMBINED APPLICATION OF OCULENTUMS OF BIOPELOID AND GENTAMICIN ON SOME INDEXES OF LOCAL IMMUNITY AT REPRODUCING OF BACTERIAL KERATITIS

Summary. According to cytological smears from the surface of the conjunctiva revealed that combined application of biopeloid eye ointment and gentamitsine ointment in the treatment of bacterial keratitis has a positive effect on the cellular link of local immunity: an increasing number of LF by 10,3% compared to the first day of the model and 9,5% relative to control. In the experimental group increased leukocyte infiltration of the conjunctiva by 8,7% compared to the first day of the model, and in the control group - by 7,5%. At the estimation of intensity of phagocytosis in the dynamics of treatment of BK by ointment of biopeloids and ointment of gentamitsine, indexes of phagocytosis activity, phagocytosis index and phagocytosis number were higher on the average in 1,3 and 2,5 time (14 and 21 days) as compared to those indexes in a control group.

Key words: oculentums, biopeloids, gentamicin, bacterial keratitis, local immunity, experiment.

Рецензент - д.биол.н., проф. Филиппова Т.О.

Статья поступила в редакцию 22.04.2015 г.

Сотнікова Елена Петровна - д.мед.наук, проф., зав. лабораторії фармакології і тканинної терапії ГУ "Інститут глазных болезней и тканевой терапії ім. В.П.Філатова НАМН України"; +38 048 729-84-64, 748-04-46; 2606sotnikovelena@gmail.com
Салдан Вікторія Йосифовна - к.биол.н., науч. сотрудник лабораторії фармакології і тканинної терапії ГУ "Інститут глазных болезней и тканевой терапії ім. В.П.Філатова НАМН України"; +38 048 729-84-26; v.saldan@mail.ru
Абрамова Анна Борисовна - науч. сотрудник лабораторії фармакології і тканинної терапії ГУ "Інститут глазных болезней и тканевой терапії ім. В.П.Філатова НАМН України"; +38 048 729-84-73
Молодая Алла Леонидовна - врач высшей категории, зав. сан. эпид. отделом; +38 048 729-83-01