Original researches

Experimental modeling of bacterial keratitis and uveitis

O. V. Shupyk, A. Y. Mazurkevich, R. R. Bokotko

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Received: 18 August 2020
Revised: 14 September 2020
Accepted: 27 December 2020

National University of Life and Environmental
Sciences of Ukraine, Polkovnyka Potekhina St.,
16, Kyiv, 03041, Ukraine

Tel.: +38-098-546-98-76
E-mail: vethouse.avs@ukr.net

Cite this article: Shupyk, O. V., Mazurkevich, A. Y., & Bokotko, R. R. (2020). Experimental modeling of bacterial keratitis and uveitis. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 8(4), 276–282. doi: 10.32819/2020.84041

Abstract. When developing new protocols and methods for treating eye diseases, there is a need to set up an experiment with modeling a particular pathology *in vivo*. Currently, there are several methods for modelling keratitis and uveitis, however, their effectiveness remains unclear. In our research, under the experimental conditions on laboratory animals (rabbits), were applied three action methods of pathological factors causing inflammation and morphofunctional changes in eye tissues. The first method included the effect of ultraviolet exposure for 3 min using a DRT-240 mercury lamp, followed by infecting damaged corneal surface with the pathogenic *Staphylococcus aureus* strain 1×10^5 CFU/ml. The second method consisted of the introduction of the *S. aureus* pathogenic strain by injection of 1×10^5 CFU/ml into the anterior chamber of the eye. The third method is the application of filter paper 5 mm in diameter and soaked in 1% sodium hydroxide (NaOH) solution for 30 s on the surface of the eye cornea. In order to compare the degree of damage to the eye tissues after using various pathological factors, intravital diagnostic methods were used, in particular, the Shimmer test, the Seidel fluorescence test, non-contact face-to-face tonometry, biomicroscopy in focal light, ultrasound eye diagnostics, photo fixation. On the 7th day of the experiment, the animals were taken out of the experiment and histological studies of the enucleated eyeballs were carried out. It was found that all the factors that were used cause pathological processes, expressed to varying degrees. According to a complex of clinical and histological studies, it was found that the first method turned out to be the most effective, since the exposure of ultraviolet long-wave UVA rays caused a burn, and the next infecting with a pathogenic strain of *S. aureus* caused the development of total keratitis and uveitis. When a bacterial pathogen was injected into the anterior chamber of the eye, acute inflammation occurred inside the chamber, filling it with purulent exudate and melting the surrounding tissues, but did not cause keratitis on the cornea outer surface. In the group where chemical burns were used, according to the sum of the evaluation criteria and other studies, keratitis was found, but the eye barrier systems prevented the occurrence of uveitis.

Keywords: keratoconjunctivitis; uveitis; rabbits; control of experiments; long-wave UVA rays; eye tissue damage of various etiology

Моделювання експериментального бактеріального кератиту та увеїту

О. В. Шупик, А. Й. Мазуркевич, Р. Р. Бокотко

Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, Україна

Анотація. При розробленні нових схем і методів лікування захворювань очей виникає потреба постановки експерименту з моделювання тієї чи іншої патології *in vivo*. Нині існує декілька методів моделювання кератитів і увеїтів, проте залишається нез'ясованою їх ефективність. У роботі, в умовах експерименту на лабораторних тваринах (кролі), застосовано три методи дії патологічних чинників, що викликають запалення та морфофункціональні зміни тканин ока. Перший метод включав вплив ультрафіолетового опромінення протягом 3 хв із використанням ртутної лампи ДРТ-240, із наступним зараженням пошкодженої поверхні рогівки патогенним штамом *Staphylococcus aureus* 10^5 КУО в 1 мл. Другий метод – аплікація на поверхню рогівки ока фільтрувального паперу діаметром 5 мм, змоченого в 1% розчині натрію гідроксиду (NaOH) протягом 30 с. Третій полягав у введенні методом ін'єкції патогенного штаму *S. aureus* 10^5 КУО в 1 мл у передню камеру ока. Для порівняння ступеня ушкодження тканин ока при застосуванні різних патологічних чинників використовували прижиттєві методи діагностики, зокрема, тест Шиммера, флюорисциновий тест Зейделя, безконтактну очну тонометрію, біомікроскопію в фокальному світлі, ультразвукову діагностику ока, фотофіксацію. На 7-му добу досліду тварин виводили з експерименту і проводили гістологічні дослідження енукейованих очних яблук. З'ясовано, що усі застосовані чинники викликають патологічні процеси, виражені у різному ступені. За комплексом клінічних і гістологічних досліджень встановлено, що найбільш ефективним виявилось перший метод, так як вплив ультрафіолетових довгохвильових променів UVA викликав опік, а наступне зараження патогенним штамом *S. aureus* зумовило розвиток тотального кератиту й увеїту. При введенні бактеріального збудника у передню камеру ока, виникало гостре запалення всередині камери з заповненням її гнійним ексудатом і розплавленням навколишніх тканин, проте не викликало кератиту на зовнішній поверхні рогівки. В групі де застосовували хімічний опік, за сумою критеріїв оцінювання та інших досліджень, виявили виникнення кератиту, проте бар'єрні системи ока запобігли виникненню увеїту.

Ключові слова: кератокон'юктивіт; увеїт; кролі; контроль експериментів; довгохвильові промені UVA; пошкодження тканин ока різної етіології

Вступ

Серед причин виникнення патології рогівки, опікова травма являється однією з провідних, а проблема лікування опіків рогівки досі залишається гострою та актуальною (Bol'shakov et al., 2002; Макаров, 2003). Пошкодження лімбу рогівки із стовбуровими клітинами (необхідними для постійної регенерації епітелію рогівки), пов'язане з найгіршим прогнозом щодо збереження зору – призводить до порушення регенерації епітелію рогівки, викликаючи її васкуляризацію, втрату прозорості та появу більма (Fares et al., 2020). Важкі опіки викликають: сильний набряк і блідість кон'юнктиви (що нагадує варене риб'яче м'ясо), опік лімбу рогівки (поява ішемічних ділянок), помутніння рогівки з набряком (набуває порцелянового вигляду – повністю або частково обмежена візуалізація глибоких структур ока), помірну чи важку запальну реакцію в передньому сегменті судинної оболонки, підвищення внутрішньоочного тиску та опіки шкіри навколо очей. Це руйнує бар'єрну властивість ока та відкриває шлях секундарній інфекції, що у свою чергу призводить до незворотних процесів і втраті зору частково або повністю. Такі пошкодження дуже часто виникають у тварин і людей при недотриманні техніки безпеки при роботі з УФП (Poljanskaja, 2007). Випромінювання електричної дуги, при зварювальних роботах, сонця (особливо сонячні промені, відбиті поверхнею води або снігу на значних висотах), лампи в соляріях, лазерні приціли (на зброї) лазерні указки, медичне обляднання та лазерні шоу й інші джерела УФП. Це довгохвильові промені UVA-з довжиною хвилі 400–320 нм являються найнебезпечнішими і в 10–15 разів інтенсивнішими від сонячних (Poljanskaja, 2007). Ступінь ушкодження залежить від режиму (переривний і непереривний, який викликає сильний термічний опік сітківки та викликає руйнування світлочутливих клітин), і довжини хвилі, а також від її сили (Deng et al., 2013; Rahmoun et al., 2020).

На перебіг опікової травми впливають численні фактори, які сприяють зниженню реактивності організму і зумовлюють розвиток вторинної імунної недостатності (Dikinov et al., 2014).

У сучасній стратегії лікування опіків рогівки великого значення надають активному хірургічному втручанню (Sokurenko et al., 2009). Нині дослідження важко уявити без експерименту і створення такої патології.

У біомедичних дослідженнях планування експериментального розділу має особливе значення через широкую варіабельність властивостей, характерних для біологічних об'єктів (Dikinov et al., 2014). Численні дослідження механізмів розвитку опікової хвороби, проведені на гістоморфологічному, біохімічному, імунологічному, електронномікроскопічному рівнях,

як у тканинах ока, так і в організмі, сформували уявлення про патогенез опіків очей, як про багатофакторний, багатокомпонентний і взаємозв'язаний процес, який не обмежується тільки ділянкою ока, а викликає різноманітні патологічні зміни в різних системах організму: наростають явища автоінтоксикації і аутосенсibiliзації, виникають порушення реактивності організму, в процес втягуються імунокомпетентні органи, порушуються ферментні та обмінні процеси, нервоворефлекторні зв'язки, а також виникають зміни крові та кровоносних судин (López-García et al., 2006; Savchuk, 2015). Однак питання отримання травматичних уражень очей в експерименті, особливо їх патоморфологічна картина залишаються маловивченими. Крім того, в доступній літературі опис методики формування світлового опіку в експерименті відсутній (Poljanskaja, 2007; Caspi, 2011; Kazakova, 2015). Ця особливість постає основною причиною труднощів, пов'язаних з інтерпретацією результатів, які можуть значно відрізнятися від досвіду до досвіду.

Мета дослідження – це досягнення найбільш ймовірної моделі кератокон'юнктивіту, при ураженні ультрафіолетовими довгохвильовими променями UVA і хімічного опіку, ускладненими бактеріальною інфекцією на експериментальних тваринах (кроликах). Визначити при якому методі ушкоджуються усі тканини ока. На експериментальній моделі бактеріального кератиту середнього ступеня тяжкості та увеїту, за допомогою візуальних та інших методів оцінити ступінь пошкодження рогівки та інших тканин ока.

Матеріал і методи досліджень

Експериментальне дослідження проведено на дев'яти очках 12 кроликів породи Шиншила вагою 2,5–3,0 кг, які знаходились на звичайному раціоні. Оперативні втручання виконували на базі клініки Немішайського Агротехнічного коледжу. Всі процедури, передбачені протоколом дослідження виконувались у відповідності до вимог Європейської конвенції про захист домашніх та лабораторних тварин, (конвенцію ратифіковано Законом України, № 578-VII (578-18) від 18.09.2013 р).

Тварин розділили на чотири групи. Тваринам першої групи застосовували ураження УФП (лампю ДРТ-240) з подальшою інсталяцією зараження *Staphylococcus aureus* 10⁵ КУО в 1 мл. Для другої групи тваринам викликали хімічний опік рогівки шляхом аплікації на її поверхню фільтрувального паперу діаметром 5 мм, змоченого в 1 N розчині натрію гідроксиду (NaOH), витримуючи протягом 30 с. У третій групі кролям у передню камеру ока ін'єктували патогенний штам *S. aureus* 10⁵ КУО в 1 мл. Четверта група – це інтактні тварини.

Моделювання бактеріального кератиту середнього ступе-

Рис. 1. Техніка моделювання бактеріального кератиту: а – ураження УФП; б – ін'єкція патогенного штаму *S. aureus*; в – аплікації на поверхню рогівки фільтрувального паперу, змоченого розчином натрію гідроксиду.

ня тяжкості в першій групі, проводили під змішаним наркозом (Ксилазин внутрішньом'язово для премедикації 0,15 мл/кг маси тіла тварини, внутрішньовенно Пропофол 40 мг/кг) і місцевою анестезією (інстиляція в кон'юнктивальну порожнину 0,5% *Sol. alcaini*). Після цього кролів клали під ртутну лампу ДРТ-240 (Рис. 1а), яка використовується в медичних установах як апарат для стерилізації приміщень та інструментів, при лікуванні шкірних захворювань, і тримали під довгохвильовим променем (UVA довжиною 320 нм), протягом 3 хв. Через 12 годин заражали пошкоджену поверхню рогівки та кон'юнктиви методом інсталяції патогенного штаму *S. aureus* 10⁵ КУО в 1 мл, отриманого методом виділення чистої культури. Хімічний опік рогівки кролів третьої групи викликали шляхом аплікації на її поверхню фільтрувального паперу діаметром 5 мм, змоченого в 1 N розчині натрію гідроксиду (NaOH) протягом 30 с. Маніпуляції проводили під місцевою епібубальбарною анестезією 0,5% розчином алкаїну та ретробубальбарною анестезією 2% розчином лідокаїну (Рис. 1б). Третій групі кроликів просто уведено методом ін'єкції патогенний штам *S. aureus* 10⁵ КУО в 1 мл (Рис. 1б).

Контроль експериментальних тварин здійснювали в визначені дні в однаковий час і однаковими методами, це:

1. тест Шиммера (оцінювання кількості слезової рідини за допомогою тест-смужки). При цьому використовували секундомір. При оцінюванні результатів за норму вважали ≥ 15 мм (0 балів); від 5 до 10 мм – виражена недостатність (1 бал); ≤ 5 мм – важка недостатність вироблення слізної рідини (2 бали), від 15 до 35 мм – патологічна слезотеча (3 бали);

2. флюорисциновий тест Зейделя (використання флюорисцинової фарби, яка вказує на ступінь ушкодження поверхні рогівки). Ступінь кератопатії визначали за площею та інтенсивністю забарвлення рогівки флюорисцином. Рогівку ділили на п'ять сегментів (верхній, нижній, латеральний, медіальний і центральний), у кожному оцінювали інтенсивність забарвлення за 3-х бальною шкалою залежно від інтенсивності. Де 0 балів – відсутність забарвлення, 1 бал – слабе забарвлення, 2 бали – помірне забарвлення, 3 бали – виражене забарвлення.

3. тонометрія, яку проводили безконтактним способом ветеринарним тонометром «Iscag Tonovet», модель TV011, розмір 24–29 мм $\times$ 35–95 мм $\times$ 215 мм (Японія), по загальноприйнятій методиці. За норму брали середній показник 15–23 мм. рт. ст. 0 балів; зниження чи гіпотензія вказувала на значні запальні процеси з проявом відшарування сітківки, < -15 –23 мм. рт. ст. – 1 бал; > -15 –23 мм. рт. ст. – 2 бали;

4. біомікроскопія в фокальному світлі, проводили на щільній лампі фірми «Carl Zeiss» (Німеччина), по загальноприйнятій методиці. Задню біомікроскопію проводили при максимально розширеній зіниці з лінзою 90,0 D. Для огляду периферичних відділів сітківки використовували лінзу Гольдмана (при можливості доступу очного дна, при відносній прозорості очної рідини). Відсутність прозорості – 0 балів, запалення су-

динної оболонки, ураження очного дна ока – 1 бал;

5. ультразвукова діагностика ока, проводили апаратом фірми «IZISCAN VET» США (лінійним датчиком 50 МГц, при режимі А). Визначали диструкції скловидного тіла, наявність крововиливів, відшарування сітківки. Помутніння склоподібного тіла (ПомСТ) – 1 бал, внутрішня ексудація (ВЕкс) – 2 бали, потовщення судинної оболонки (ПСО) – 3 бали;

6. фотореєстрація;

7. гістологічне дослідження.

Усіх тварин вивели з експерименту на сьому добу, попередньо провівши всі клінічні не інвазивні дослідження.

На етапі забору матеріалу (7-ма доба), тварин виводили із експериментального дослідження шляхом уведення в серцевий м'яз розчину тіопенату, з послідовним забором енуклеованих очних яблук. Енуклеовані очні яблука фіксували в 10% водному розчині нейтрального формаліну, заливали в парафін (Рис. 2). Зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином за загальноприйнятою методикою (Горальський, 2019) і досліджували з використанням світлового мікроскопа Bioex 3 “Konus”.

Одержані цифрові дані опрацьовували методом варіаційної статистики (Mann & Whitney, 1947). Достовірність різниці між двома вибірками визначали за U-критерієм Манна-Уїтні.

Результати

Не кожний паталогічний чинник, що використаний у моделюванні запального процесу в тканинах ока, відображає модель кератиту та увеїту, проте викликає шкодження структур органа і значне запалення. Тому основним завданням експерименту було чітко відобразити патологію до реальних випадків, які викликають кератит, а особливо увеїт, для подальших досліджень впливу мезенхімальних стовбурових клітин на репаративні процеси в різних тканинах ока.

Клінічний стан очей кроликів через 12 годин характеризувалося ознаками рогівкового синдрому: світлобоязнь, блефароспазмом, слезотечею (епіфора). У експериментальних тварин об'єктивно при проведенні біомікроскопії відзначали: кон'юнктивальну ін'єкцію, незначний поверхневий дефект рогівки.

У всіх кролів першої групи на 7-му добу був чітко виражений увеїт, ускладнений бактеріальним кератитом. Він характеризувався вираженим набряком кон'юнктиви (хемоз) із крапковими крововиливами (пітехії). Через 24 години після інфікування клітинною культурою у 100% кроликів діагностували увеїт середнього ступеня тяжкості. На 3-тню добу у 93,4% кроликів спостерігали нерівномірне помутніння з явищами вогнищевої інфільтрації та набряк строми з чітко вираженим запальним процесом і бактеріальний кератит. У 52% кролів на 7-му добу виявили виражену ерозію рогівки 2,0–4,0 мм у діаметрі, у деяких – коагуляційний некроз тканин рогівки.

Передній поверхневий епітелій являється однією з найваж-

Рис. 2. Енуклеюване очне яблуко кроля, підготовка до гістологічного дослідження

Рис. 3. Клінічний прояв експериментального кератиту: а – помутніння вологи передньої камери; б – накопичення гнійного ексудату; в – крововилив у передню камеру ока (гіфема); г – кератомалачія.

Рис. 4. Персистуючі ерозії з хронічним подразненнями ока.

ливіших структур, що забезпечують гомеостаз рогівки. При його пошкодженні змінюється місцевий обмін речовин, розвивається інтоксикація продуктами розпаду пошкоджених клітин.

У другій групі кролів виявили, що волога передньої камери опалесцює (помутніння внаслідок запалення) (Рис. 3а), райдужка з розлитим нечітким малюнком, зіниця діаметром 7

мм, реакція на світло агресивна. По краю лімба часто виявили крововилив у передню камеру ока між рогівкою і райдужкою (гіфема) (Рис. 3в). Видимі гнійні скупчення склеювали повіки, агресивно розплавляли поверхневий шар рогівки, втягуючи в запальний процес майже всі тканини ока (Рис. 3б). Це викликає в подальшому плавлення рогівки (кератомалачію) (Рис. 3г).

Рис. 5. УЗД очей

У тварин при затяжному процесі без належного втручання, через слабку адгезію епітелію кон'юнктиви з стромою рогівки, виникали персистуючі ерозії з хронічним подразненнями ока (Рис. 4). Високий рівень бактеріальної забрудненості порушує метаболічні процеси та призводить до підвищення осмотичного тиску, ацидозу в тканинах, змінює мікроциркуляцію, що спричиняє розвиток вторинних некрозів.

У результаті УЗД очей інтактних тварин виявлено, що передня камера між радужкою і рогівкою заповнена прозорою рідиною, візуалізується анехогенно, що вказує на прозорість рідинного вмісту. Рогівка візуалізується як опукла, тонка, ехогенна смужка, розташована в передній частині ока. Кришталік являє собою двоопуклу гіперехогенну структуру, яка знаходиться за зіницею і радужкою, фіксовану периферично циліарним тілом. Сітківка ока прилягає до склери, лежить гладкою лінією, яка не переривається уздовж задньої стінки очного яблука (Рис. 5).

При хімічному типі ушкодження (друга група) виникає коліквацийний некроз рогівки ока, площа якого набагато перевищує розмір контактної плями. Чітко видно глибокі некротизовані рубці та потовщення шарів рогівки майже по всій поверхні.

При ультразвуковому дослідженні крововилив у склоподібне тіло проявляється як яскравий ехогенний шар у межах задньої частини ока. Присутній крововилив у склоподібне тіло досить велике, яке повністю затінене, присутній розрив сітківки з явищами неоваскуляризації.

Відшарування скловидного тіла на УЗД проявляється як яскрава ехогенна лінія у задній частині ока. Крововилив проявляється у вигляді мутного гіперехогенного матеріалу позаду відшарування.

У другій групі, де застосовували хімічний опік за сумою критеріїв оцінювання та інших досліджень чітко видно пошкоджену помутнівшу рогівку, що викликало кератит, але бар'єрні вла-

стивості структур ока запобігли виникненню увеїту. Так само і в третій групі, при введенні бактеріального збудника в передню камеру ока, почався гострий проліферативний запальний процес усередині камери, що призвів до заповнення її гнійним ексудатом і плавленням навколишніх тканин, але не викликав кератиту на зовнішній поверхні рогівки.

Статистично достовірних відмінностей між трьома експериментальними групами за критерієм Манна-Уїтні не відмітили ($P > 0,09$), тільки за показниками внутрішньої ексудації ($P = 0,44$), за порівнянням відмінностей 1-ї та 2-ї груп, та з показником ($P = 0,3$) для 3-ї групи. Основним показником створення моделі стійкого увеїту з яскравим вираженням гострого ексудативного запалення всіх відділів судинної оболонки ока зі значними змінами в мікроциркуляторному руслі в 1-й групі ($P = 0,09$). Вираженість запального процесу в рогівці тварин була достовірно нижче в групі із застосуванням техніки введення збудника в передню камеру ока по критеріям: ступінь гіперемії кон'юнктиви ($P = 0,03$), запальна інфільтрація стромы рогівки ($P = 0,03$), ступінь фарбування рогівки флюоресцеїном ($P = 0,03$), тестом Шиммера ($P = 0,03$), внутрішньої ексудації ($P = 0,3$).

Оцінюючи гістологічні структури очей кроликів при формуванні увеїту та кератокон'юнктивіту, відмічали значну активність фібропластичних процесів, викликаних опіком і секундарною інфекцією, що зумовлювали дистрофічні і деструктивні зміни. При гістологічному дослідженні рогівки кролів, яким збудника заносили методом інсталяції виявлено, що клітини переднього епітелію утворили шар клітин різної форми. Нижній базальний шар мав призматичну форму. До нього прилягали два ряди остистих (шипуватих) клітин. Над шаром шипуватих клітин виявляли п'ять рядів плоских клітин, розташованих паралельно поверхні рогівки. Передній епітелій на периферії рогівки в ділянці лімба містив келихоподібні клітини.

Таблиця – Порівняльне оцінювання вираженості ушкодження очей при моделюванні експериментального бактеріального кератиту й увеїту залежно від дії різних патологічних чинників (критерій Манна-Уїтні)

Показники	Група 1	P	Група 2	P	Група 3	P	Група 4	P
Тест Шиммера	785	0,09	1065	0,1	825	0,08	65	0,03
Щільна лампа	725	0,011	0	0	0	0,011	0	0,03
Тонометрія	1005	0,03	765	0,02	1005	0,04	105	0,03
Флюорисциновий тест Зейделя	765	0,02	915	0,2	0	0,09	0	0
Помутніння скловидного тіла	729	0,002	677	0,01	915	0,01	0	0
Внутрішня ексудація	686	0,44	863	0,2	967	0,3	65	0,02
Потовщення судинної оболонки	915	0,09	785	0,04	791	0,07	63	0,33

Примітка: порівняння проводили з показниками першої групи, і тільки для опису візуальних характеристик використовували інтактну четверту групу тварин.

Під епітелієм чітко виділена строма рогівки, яка складалась із пучків колагенових волокон, що утворювали гомогенні пластинки. Між пластинками були і кератоцити. Їхні ядра, витягнуті форми під поверхню рогівки. У нижньому відділі строма переходила у десцеметову оболонку, побудовану колагеновими волокнами. З внутрішнього боку до задньої межевої пластинки прилягав один шар плоских клітин епітелію. У цитоплазмі клітин зрачного набряку не спостерігали, зроговіння верхнього шару не відмічено, проте в стромі зустрічались сегментоядерні лейкоцити, ближче до лімбу видно колагенові волокна, макрофаги та поодинокі лімфоцити, трохи нижче лімбу зібрані в пучок колагенові волокна між якими містились фіброласти (Рис. 6а).

При гістологічному дослідженні оболонок ока тварин з ін'єкцією збудника в передню камеру ока виявлено порушення диференціації епітеліоцитів по шарам, передня прикордонна пластинка, розташована під покривним епітелієм немала чіткої межі зі стромою, і місцями мала ознаки розпшення щільної сітки колагенових фібрил, що вказує на гострий запальний процес у середині шарів рогівки ока (Рис. 6б).

У тварин третьої групи виявляли: ушкодження стовбурових клітин рогівки епітелію за вираженістю лімбальної ішемії в місці хімічного опіку, значний набряк і розшарування строми рогівки, нерівний хвилястоподібний з пошкодженою поверхню передній епітелій і задній епітелій, розміщений на базальній мембрані з пошкодженою апікальною поверхню епітеліоцитів рогівки з відсутніми мікрроворсинками (Рис. 6в).

З гістологічного зрізу на частині без деепітелізації, але з потовщеною стромою рогівки, мало дифузне розміщення клітин запального інфільтрату, збільшення кількості фіброblastів по всій стромі, містило незначну кількість еритроцитів, що вказує на васкуляризацію (Рис. 6г).

Тому в цій експериментальній моделі першої групи більш виражений процес запалення, де видно що гіалінова плівка спаяна з

війчастим тілом, а в деяких місцях і відшарування з найбільшою інфільтрацією, хоріоїд інфільтрований мононуклеарними клітинами з дегенерацією сітківки, що вказує на більш обширний процес увеїту. В передньому епітелії рогівки в стромі видно дифузні скопичення лімфоцитів і макрофагів, велика кількість проліферуючих фіброblastів і склеєних колагенових волокон, а також їх розволокнення, в області лімбу та в самій стромі – розширені кровоносні судини. Як передня стінка так і десцеметова оболонка має по всій своїй поверхні нерівну структуру, що вказує на деструктивні зміни всіх клітин і тканин, внаслідок опіку і обширного запального процесу що відобразило ознаки як кератиту так, і увеїту.

Обговорення

Моделювання увеоретиніту і ретинопатії на тваринах і клітинних культурах стало найважливішим кроком на шляху не тільки до розкриття імунних механізмів інтраокулярного запалення, але і до розробки методів біотерапії захворювань судинного тракту і сітківки. У значній кількості літератури проаналізовано переваги та недоліки основних експериментальних моделей увеоретиніту та ретинопатії з позицій адекватності відтворення захворювань очей (Dikinov et al., 2014).

Відомо, що експериментальний імуногенний увеїт протікає у вигляді гострого ексудативного запалення усіх відділів судинної оболонки ока зі значними змінами в мікроциркуляторному руслі, досягає піку розвитку в період із 3-ої по 14-ту добу, супроводжується підвищенням локальних і системних концентрацій простагландину E2 і позаклітинної пероксидазної активності. Збережені морфологічні зміни, підвищені показники позаклітинної пероксидазної активності і концентрації простагландину E2 з 21-ої по 30-у добу увеїту свідчать про формування хронічного перебігу увеїту (Adamova, 1992).

Увеоретиніт також розвивається у відповідь на інтравітральне введення іншого патогенасоційованого молекулярного

Рис. 6. Гістопрепарат рогівки ока кроля: а – інтактної групи; б – групи з ін'єкцією патогенного штаму *S. aureus*; в – за хімічного опіку рогівки; г – за впливу ультрафіолетового опромінення із наступним зараженням патогенним штамом *S. aureus*.

паттерна пептидоглікана, зокрема виділеного з клітинної стінки *S. aureus* (Wagoner, 1997).

Вважається, що моделі аутоімунного увеїту набагато ближче до неінфекційних запальних захворювань судинної оболонки ока людини як за клінічним проявом, так і за розкритими механізмами розвитку (Rosenzweig et al., 2008).

К. А. Kazakova (2014) у своїй експериментальній частині роботи по обґрунтуванню застосування діодного лазерного коагулятора, використовувала модель, створену шляхом скарифікації епітелію рогівки в центральній зоні й одномоментним інтрастромальним введенням лабораторного штаму *S. aureus*. На 2-у добу в кроликів поступово наростала запальна реакція очей: з'являлася ін'єкція кон'юнктиви, рясне слизово-гнійне виділення, набряк рогівки, в зоні інфікування формувалася інфільтрат сіро-жовтого кольору, поверхня поступово ставала нерівною, утворювався виразковий дефект, у передній камері з'являвся гіпопійон.

За методикою запропонованою N. A. Adamova (1992) у центральних відділах рогівки кролика трепаном діаметром 5 мм наносили насічку глибиною 150 мкм, у межах якої рогівка розшаровується. В отриманий дефект втирали чисту культуру *S. aureus*. Через добу в усіх тварин відмічали помірний набряк повік, гнійні виділення і виражену змішану ін'єкцію очного яблука. У центрі рогівки формувалася гнійний інфільтрат близько 5 мм у діаметрі, жовтуватого кольору, середньої інтенсивності з дефектом епітелію розміром 4–4,5 мм. Навколо інфільтрату був перифокальний набряк, реєстрували появу дифузної інфільтрації стромы оточуючих відділів рогівки. Волога передньої камери ока опалесцювала, реакції зіниці на світло не було.

Як показують численні експериментальні та клінічні дослідження, існує великий спектр запальних, дегенеративних і дистрофічних захворювань рогівки, при яких важливе значення має ступінь ураження тканин ока, імунна відповідь інтраокулярного запалення, що впливає на процеси руйнування бар'єрних структур і на їх швидкість відновлення.

Ці результати свідчать про те, що створені моделі тяжкого лужного опіку очей, опіку ультрафіолетовими променями та інфекційними збудниками забезпечують проведення порівняльного клініко-морфологічного оцінювання регенерації рогівки при пошкодженні різної площі не тільки рогівки, а й лімба та їх поєднання в експерименті.

Висновки

Описана модель експериментального кератиту й увеїту відображає суть репаративних процесів з точки зору доказової медицини, а дані, отримані при проведенні експерименту, можуть бути екстрапольовані в подальших наукових експериментах.

Більш швидко відтворювана і яскрава клінічна картина захворювання спостерігалася при одночасному ушкодженні ультрафіолетовим опроміненням і зараженням патогенним штамом *S. aureus*, де також відмічені зміни в імунологічному статусі тварин: збільшення кількості лейкоцитів, що виражалось помутнінням очної рідини з набряком рогівки, активізація фагоцитозу. Ця модель увеїту є найбільш зручним робочим варіантом і характеризується високою активністю і тривалістю запального процесу в оці.

При застосуванні хімічного опіку за сумою критеріїв оцінювання й інших досліджень, чітко видно пошкоджену помутнівшу рогівку, що вказує на кератит, проте бар'єрні особливості ока запобігли виникненню увеїту. Так само при введенні бактеріального збудника в передню камеру ока, почався гострий проліферативний запальний процес усередині камери, що призвів до заповнення її гнійним ексудатом і плавленням навколишніх тканин, але не викликав кератит на зовнішній поверхні рогівки.

References

- Adamova, N. A. (1992). Jeksperimental'noe obosnovanie i klinicheskoe primeneniye preparata fibronektina pri zabolevaniyah i povrezhdeniyah rogovicy [Experimental substantiation and clinical use of the fibronectin preparation for diseases and injuries of the cornea]. Extended abstract of candidate's thesis. Odessa.
- Bol'shakov, O. P., Neznakov, N. G., & Babahanjan, R. V. (2002). Didakticheskie i jeticheskie aspekty provedeniya issledovanij na biomodeljah i na laboratornyh zhivotnyh [Didactic and ethical aspects of research on biomodels and laboratory animals]. *Kachestvennaya Klinicheskaya Praktika*, 1, 58–61.
- Caspi, R. R. (2011). Understanding autoimmune uveitis through animal models the friedewald lecture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(3), 1873.
- Deng, S., Sejpal, K., & Bakhtiari, P. (2013). Presentation, diagnosis and management of limbal stem cell deficiency. *Middle East African Journal of Ophthalmology*, 20(1), 5.
- Dikinov, Z. H., Evsegneeva, I. V., & Kayuzhin, O. V. (2014). Modelling of uveoretinitis and retinopathy as a tool for study of their immunopathogenesis. *Biomedicine*, 1, 27–37.
- Fares, M. A., Rahmoun, D. E., & Lieschova, M. A. (2020). Histological study of eyelid in Algerian locale bovine. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*, 3(2), 60–63.
- Kazakova, K. A. (2015). Jeksperimental'no-klinicheskoe obosnovanie primeneniya diodnogo lazernogo koagulyatora 1,44 mkm v lechenii jazvy rogovicy [Experimental and clinical substantiation of the use of a 1.44 μm diode laser coagulator in the treatment of corneal ulcers]. Moscow.
- López-García, J. S., Rivas, L., García-Lozano, I., & Murube, J. (2006). Analysis of corneal surface evolution after moderate alkaline burns by using impression cytology. *Cornea*, 25(8), 908–913.
- Makarov, P. V. (2003). Oslozheniya tjazhelej ozhogovoj travmy glaz: patogenez, analiz prichin, profilaktika i vozmozhnye puti optimizacii rezul'tatov lechenija [Complications of severe eye burn injury: pathogenesis, analysis of causes, prevention and possible ways to optimize treatment results]. Moscow.
- Mann, H. B., & Whitney, D. R. (1947). On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *The Annals of Mathematical Statistics*, 18(1), 50–60.
- Pinnamaneni, N., & Funderburgh, J. L. (2012). Concise review: stem cells in the corneal stroma. *STEM CELLS*, 30(6), 1059–1063.
- Poljanskaja, N. K. (2007). Taktika lechenija pacientov s jazvami rogovicy na fone tjazhelej somaticheskoy patologii. *Russkij Medicinskij Zhurnal*, 1, 56–60.
- Rahmoun, D. E., Lieschova, M. A., Gherissi, D. E., & Hadjeris, T. (2020). Anatomical and histological characteristics of the dromedary eye (*Camelus dromedarius*). *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 8(2), 132–138.
- Rosenzweig, H. L., Martin, T. M., Jann, M. M., Planck, S. R., Davey, M. P., Kobayashi, K., & Rosenbaum, J. T. (2008). NOD2, the gene responsible for familial granulomatous uveitis, in a mouse model of uveitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49(4), 1518.
- Savchuk, Z. L. (2015). Intensity of lipid intensity of peroxidation in rabbits with chemical burns of the cornea against merkazolil-induced hypothyroidism. *Zdobutky Klinichnoi i Eksperymentalnoi Medytsyny*, 2–3, 171–175.
- Sokurenko, V. M., Tymchyk, H. S., & Chyzh, I. H. (2009). Oko liudyny ta oftalmolohichni pryklady [Human eye and ophthalmic devices]. Kyiv. NTUU «KPI».
- Wagoner, M. D. (1997). Chemical injuries of the eye: Current concepts in pathophysiology and therapy. *Survey of Ophthalmology*, 41(4), 275–313.