Министерство здравоохранения и социального развития
Российской Федерации

Федеральное государственное учреждение «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова Росмедтехнологии»

На правах рукописи

Плахотний Михаил Алексеевич

ИНТРАВИТРЕАЛЬНАЯ АНТИМИКРОБНАЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЭНДОФТАЛЬМИТА

14.01.07 – глазные болезни

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Белый Юрий Александрович

Москва – 2011

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений

MRSA – метициллинрезистентный стафилококк

а/б – антибиотики

АФДТ – антимикробная фотодинамическая терапия

ВСС – внутренний сетчатый слой

ИВО – интравитреальное облучение

КОЕ – колониеобразующие единицы

М/о – микроорганизмы

ОГ – оптикоганглионарные клетки

ПФОС – перфторорганическое соединение

СБК – слой биполярных клеток

УБМ – ультразвуковая биомикроскопия

ФДВ – фотодинамическое воздействие

ФДТ – фотодинамическая терапия

ФС – фотосенсибилизатор

ЦВС – центральная вена сетчатки

ЭРГ – электроретинография

ЭЭФ – экспериментальный эндофтальмит

ВВЕДЕНИЕ

Эндофтальмит (endophthalmitis; греч. «endon» – внутри, «ophthalmos» – глаз, «itis» – воспаление) – гнойное воспаление всех внутренних оболочек глазного яблока с образованием экссудата в стекловидном теле, приводящее к слепоте и гибели глаза в 53,4-89,4% случаев. Частота энуклеации при данной патологии составляет 15-25% [10,18,20,37,136].

По данным литературы, инфекция осложняет течение прободных ран глаза в 5-50%, а при хирургических вмешательствах, связанных со вскрытием полости глаза, инфекционные осложнения встречаются в 0,02-0,5% случаев [41,54,67,69,80,93,102,145,152].

Возбудителями эндофтальмита могут быть самые разнообразные патогенные микроорганизмы, при этом чаще всего обнаруживаются грамположительные кокки, преимущественно золотистый и эпидермальный стафилококки [19,31,54,70,72,97,117].

Трудность лечения эндофтальмита обусловлена тяжестью инфекционных процессов, анатомическим строением глазного яблока и скоростью развития микроорганизмов, размножающихся в полости глаза и имеющих благоприятные условия для своего развития [20,64].

В клинической офтальмологии при лечении эндофтальмита применяют различные методики введения антимикробных препаратов. Однако наличие гематоофтальмического барьера затрудняет проникновение лекарственных веществ в полость глаза из кровяного русла и окружающих тканей при их введении под конъюнктиву, ретробульбарно или в случае проведения системной терапии. Кроме того, несмотря на подавление микрофлоры, патологический процесс продолжает часто прогрессировать, приводя в конечном итоге к тяжелым и необратимым органическим изменениям [23,27,45,55,130,142].

Существенный положительный сдвиг в лечении эндофтальмита произошел благодаря внедрению в клиническую практику комбинированной

методики, включающей витрэктомию, интраокулярную антибиотикотерапию и интравитреальную тампонаду стекловидного тела различными заместителями: жидкими и газообразными ПФОС или силиконовым маслом [17,21,29,55,56,61,97]. Но и в этих случаях не всегда удается купировать воспалительный процесс из-за невозможности определить возбудителя непосредственно в момент операции, что, соответственно, затрудняет правильный выбор антимикробного препарата [20,73,75,89,103].

В последнее время появились работы по использованию в лечении воспалительных заболеваний глаза, в том числе эндофтальмита, сильных окислителей: озона, гипохлорита натрия, оксида азота, повидон-йода, – обладающих широким антисептическим спектром действия в отношении большинства микроорганизмов, ряда вирусов, грибков и простейших. Однако эти вещества воздействуют не только на белково-липидные плазматические мембраны микроорганизмов, но и на клеточные мембраны структур глаза, активируя перекисное окисление липидов, что нередко приводит к токсическому воздействию на зрительный нерв и сетчатку [4,5,15,36,62,63,79].

В связи с вышеизложенным, остается актуальным поиск методов лечения внутриглазных инфекционных заболеваний с максимально направленным воздействием.

На наш взгляд, этим требованиям отвечает методика фотодинамической терапии (ФДТ), обладающая направленным воздействием на патологический очаг и нашедшая в настоящее время применение в онкологии, при лечении различных сердечно-сосудистых заболеваний, атеросклероза, ревматоидного артрита [12,42,108].

В офтальмологии перспективы использования ФДТ связаны с лечением хориоидальной неоваскуляризации различной этиологии, прежде всего при возрастной макулярной дегенерации и патологической миопии, а также офтальмоонкологических заболеваниях [9,74,77,115].

В основе ФДТ лежит светоиндуцированная химиотерапия, использующая свойства препаратов (фотосенсибилизаторов (ФС)) образовывать активные формы кислорода и другие радикалы под действием светового облучения [46,52].

На сегодняшний день синтезировано несколько сотен химических соединений, способных выступать в роли ФС. При этом наиболее перспективными для ФДТ различной офтальмопатологии считаются ФС хлоринового ряда [30,46]. Среди них следует выделить современный отечественный ФС «Фотодитазин», обладающий применительно к офтальмологии целым рядом преимуществ, которые определяются его химическими, фотофизическими и фармакокинетическими характеристиками [30,52].

Следует отметить, что в последнее десятилетие серьезные успехи достигнуты в разработке методики антимикробной фотодинамической терапии – АФДТ [154], нашедшей в настоящее время широкое применение в стоматологии и дерматологии [53,68,82,127,131,156]. Проведение АФДТ инфекционных заболеваний стало возможным благодаря способностям современных ФС взаимодействовать с внешней стенкой бактериальных грамположительных и грамотрицательных, а также грибковых клеток, увеличивая их проницаемость и накапливаясь, таким образом, в достаточном количестве на уровне клеточной стенки и эндоплазматической мембраны [46].

В доступной литературе мы не нашли сведений об использовании АФДТ с интравитреальным введением ФС хлоринового ряда при лечении внутриглазных инфекционных заболеваний. В связи с этим нам представляется целесообразным изучить применение АФДТ с отечественным ФС хлоринового ряда «Фотодитазин» в комплексном хирургическом лечении экспериментального бактериального эндофтальмита.

Цель настоящего исследования – разработать методику интравитреальной антимикробной фотодинамической терапии с

отечественным фотосенсибилизатором «Фотодитазин» в комплексном хирургическом лечении экспериментального эндофтальмита и оценить ее эффективность в эксперименте.

В соответствии с поставленной целью **задачи** решались в следующей последовательности:

1. В эксперименте in vitro определить антимикробную активность различных концентраций «Фотодитазина»;
2. В эксперименте in vitro определить зависимость антимикробного эффекта и чувствительность патогенной микрофлоры к антибиотикам от плотности лазерной энергии, используемой при АФДТ;
3. Разработать автоматизированную систему расчета параметров интравитреальной АФДТ;
4. В эксперименте in vivo изучить состояние внутриглазных структур после интравитреальной АФДТ с ФС «Фотодитазин»;
5. В эксперименте in vivo провести анализ эффективности интравитреальной АФДТ с ФС «Фотодитазин» в комплексном лечении экзогенного бактериального эндофтальмита.

Научная новизна

В лабораторных условиях in vitro изучено влияние фотодинамического воздействия отечественного ФС хлоринового ряда «Фотодитазин» на патогенные микроорганизмы, а также подобраны концентрации препарата и параметры лазерного излучения при АФДТ, обладающие выраженным бактерицидным эффектом.

На основании характеристик витреальной полости глаз подопытных животных разработана автоматизированная система расчета параметров интравитреальной АФДТ.

В экспериментальных исследованиях in vivo определены безопасные для сетчатки и внутриглазных структур концентрации «Фотодитазина» и параметры интравитреальной АФДТ.

В экспериментальных исследованиях in vivo разработан метод комплексного хирургического лечения экспериментального бактериального эндофтальмита, включающий проведение витрэктомии с интравитреальной АФДТ и интравитреальной антибиотикотерапией.

В экспериментальных исследованиях in vivo проведен сравнительный анализ эффективности витрэктомии в сочетании с интравитреальной АФДТ с «Фотодитазином», интравитреальной антибиотикотерапией и без антибиотикотерапии при лечении экспериментального экзогенного бактериального эндофтальмита.

Практическая значимость

Разработанный в эксперименте метод комплексного хирургического лечения экзогенного бактериального эндофтальмита, включающий витрэктомию в сочетании с интравитреальной АФДТ с «Фотодитазином» и интравитреальную антибиотикотерапию, позволяет уже в ранние сроки эффективно воздействовать на внутриглазную патогенную флору.

Проведение клинической апробации разработанного метода с последующим его внедрением в офтальмологическую практику позволит эффективно и быстро бороться с экзогенным бактериальным эндофтальмитом и, таким образом, улучшить качество медицинской реабилитации данного контингента больных.

Основные положения, выносимые на защиту

Экспериментально рассчитанные и обоснованные параметры интравитреальной АФДТ, включающие концентрацию отечественного ФС

хлоринового ряда «Фотодитазин» 0,05 мг/мл и плотность энергии лазерного излучения инфракрасного диапазона 10 Дж/см^2, обладают выраженным антимикробным действием на различную патогенную микрофлору и являются безопасными для сетчатки и других внутриглазных структур.

Проведение витрэктомии с интравитреальной АФДТ с интравитреальным введением «Фотодитазина» в сочетании с интравитреальной антибиотикотерапией является эффективным методом комплексного хирургического лечения экзогенного бактериального эндофтальмита.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции «Высокие технологии в офтальмологии» (г. Анапа, 2008); на научно-практической конференции в ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» (г. Москва, 2008), на научно-практической конференции, посвященной 70-летию заслуженного деятеля науки РФ и РБ, академика М.Т. Азнабаева (г. Уфа, 2009).

Формы внедрения

Результаты проведенных исследований использованы при разработке методических рекомендаций, патентов РФ, изложены в докладах на научно-практических конференциях, публикациях, кандидатской диссертации.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, из них 5 в центральной печати. Имеется один патент РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, 4-х глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 35 рисунками, содержит 12 таблиц, 11 графиков. Указатель литературы включает 158 источников, из них 64 отечественных и 94 зарубежных авторов.

Работа выполнена в Калужском филиале ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова Росмедтехнологии» (директор – к. м. н., заслуженный врач РФ А.В. Терещенко) под руководством заместителя директора по научной работе, д. м. н., проф. Ю.А. Белого.

Рентгенологические исследования выполнялись на базе отделения лучевой диагностики МУЗ «Калужская областная больница».

Разработка компьютерного программного обеспечения проводилась совместно с сотрудниками кафедры ЭНУ5-КФ Калужского филиала МГТУ им. Н.Э. Баумана.

Лабораторные исследования выполнены на базе бактериологической лаборатории Калужского филиала ФГУ МНТК «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова Росмедтехнологии» под руководством врача-лаборанта Н.Х. Носковой, а также совместно с сотрудниками микробиологического отделения испытательного лабораторного центра ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Калужской области».

Морфологические исследования выполнены в ФГУ МНТК «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова Росмедтехнологии» (генеральный директор – д. м. н., проф. Х.П. Тахчиди) на базе лаборатории патогистологического исследования глаза (заведующая – к. м. н. А.В. Шацких).

Приношу глубокую благодарность за научное и практическое становление своему научному руководителю, проф. Ю.А. Белому.

Искренне благодарю директора Калужского филиала ФГУ МНТК «Микрохирургия глаза», к. м. н., Заслуженного врача РФ А.В. Терещенко, заместителя директора по лечебной работе, к.м.н. С.Я. Романенко, сотрудников отделения анестезиологии-реанимации, научного отдела и отдела витреоретинальной хирургии за поддержку и помощь при выполнении работы.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Этиология и патогенез внутриглазной инфекции

Одним из самых серьезных и опасных проявлений внутриглазной инфекции является экзогенный эндофтальмит – гнойное воспаление всех внутренних оболочек глазного яблока с образованием экссудата в стекловидном теле [59].

Основными источниками внутриглазной раневой инфекции при прободных травмах глаза, а также при глазных операциях являются микрофлора ранящего предмета, в том числе внутриглазного инородного тела (ВИТ), и микроорганизмы, присутствующие в конъюнктивальном мешке [18,23,64].

К факторам риска развития внутриглазной инфекции после прободных травм глазного яблока относятся: роговичные и корнеосклеральные ранения; ранения, не превышающие по величине 3 мм и не сопровождающиеся выпадением внутренних оболочек; наличие ВИТ, особенно при их локализации в стекловидном теле. Задержка в проведении необходимого лечения также повышает частоту возникновения внутриглазной инфекции [17,19,54,57,64,65,69,121].

Кроме того, немаловажным фактором являются особенности хирургической техники. Так, использование роговичного тоннельного разреза, ожог ультразвуком краёв операционной раны, несостоятельность операционного рубца при проведении факоэмульсификации значительно повышают риск развития эндофтальмита. По мнению многих авторов, связь с полостью стекловидного тела вследствие разрыва задней капсулы хрусталика, интравитреальное введение любого инструмента во время экстракции катаракты, а также выполнение интравитреальных инъекций

повышают риск возникновения послеоперационного эндофтальмита в 14 раз [18,30,73,93,113,133,135].

Наиболее часто инвазия микробов в полость глазного яблока происходит непосредственно в момент ранения или хирургического вмешательства (первичная микробная инвазия). Но инфекция может развиться и спустя некоторый срок после травмы или внутриглазного хирургического вмешательства (вторичная микробная инвазия), например, при отсутствии герметичности операционной раны. И если в первом случае инфекционные осложнения развиваются, как правило, в течение первых 2-3 суток, то во втором их клинические признаки могут проявиться и в более поздние сроки [11,20,43,54,88,100].

Возбудителями эндофтальмита могут быть различные бактерии, грибки и простейшие [37]. Среди них самой частой причиной посттравматического и послеоперационного инфекционного воспаления являются грамположительные бактерии, встречающиеся в 21,1-78,5%. В первую очередь к ним следует отнести микроорганизмы рода St. aureus, Strep. pneumonae, Ent. fecalis и faecium, B. xerosis, Bac. subtilis, и др. Однако чаще всего возбудителями являются золотистый и эпидермальный стафилококки: St. Epidermidis (7,7-27,8%) и St. Aureus (37.1-26.9%). Грамотрицательные микроорганизмы выявляются реже (11,8-41,7%). Это E.coli, Ps. aeruginosa, а также бактерии рода Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella, Proteus, Providentia, Serrata, Haemophilis. Причем в 20,4% случаев выявляются два, а в 2% случаев – сразу три микроорганизма. Грибковая флора встречается в 8,6-16,7%. Преимущественно это грибы рода кандида и аспергиллы [19,31,54,70,72,75,80,96,117,122,150].

Тяжесть течения и скорость развития эндофтальмита зависят не только от вида и количества внедрившегося в глаз возбудителя, но и от вирулентности микроорганизмов, способных выделять и синтезировать большое количество белков, токсинов и различных ферментов, разрушающих стекловидное тело и оболочки глаза. Немаловажное значение в развитии

эндофтальмита имеет реактивность организма, общий уровень здоровья пациента, перенесшего внутриглазную операцию или проникающую травму глаза, наличие и тяжесть сопутствующей соматической патологии (диабет, нейтропения, кахексия и т.д.), наличие в анамнезе лучевой и химиотерапии [28,54,151,153]. Так, развитие грибкового эндофтальмита тесно связано со снижением иммунологической защиты организма, первой линией которой против грибковой инфекции являются макрофаги. Именно нарушение этого звена иммунитета играет решающую роль в развитии грибкового эндофтальмита [157].

Замкнутая полость, замедленный обмен внутриглазной жидкости (ВГЖ), особенно в заднем отделе глаза, биохимический состав ВГЖ (белки, мукополисахариды), а также низкая способность стекловидного тела к естественному дренажу создают благоприятные условия для развития микроорганизмов и способствуют прогрессированию воспалительного экссудата при эндофтальмите. Гнойный выпот из сосудов сетчатки и хориоидеи в стекловидное тело претерпевает в последующем все изменения, свойственные абсцессу любой локализации [18,19].

При воспалительном процессе в стекловидном теле накапливается большое количество разнообразных токсических веществ (экзотоксины и протеазы возбудителей, гистамин, серотонин, гидроперикиси, гидрорадикалы, брадикинины, простагландины и другие медиаторы воспаления), то есть формируется «депо» токсических продуктов. Это является мощным стимулом к поддержанию и прогрессированию воспалительной реакции, что приводит к деструкции нейрорецепторного аппарата и увеального тракта. Как и при любом воспалении, при эндофтальмите в полости глаза происходит выраженная фибринозная экссудация. При этом фибриновый сгусток также является материалом для пролиферации клеток пигментного эпителия и глиальных клеток, что может приводить к формированию интравитреальных мембран с последующей

отслойкой сетчатки, цилиарного тела и развитием субатрофии глазного яблока [40,55,53,111].

Таким образом, первопричиной и ведущим звеном в патогенезе инфекционного эндофтальмита является инвазия возбудителя в полость глаза с последующим его размножением и развитием интраокулярной реакции, вследствие чего необходимость стерилизации внутриглазных структур становится патогенетически направленным и неотъемлемым условием успешного лечения эндофтальмитов [18,49,64].

1.2. Диагностика и лечение внутриглазной инфекции

В настоящее время диагноз эндофтальмита считается верифицированным, если имеется подтверждение, по крайней мере, по одному из трех критериев: клиническому, бактериологическому, цитологическому [33,63,148].

Для диагностики эндофтальмита применяют бактериологическое исследование содержимого влаги передней камеры, стекловидного тела, ранящего предмета. В последние годы самым надежным признано микробиологическое исследование образца стекловидного тела. Для этого непосредственно во время операции производят забор влаги передней камеры и стекловидного тела, после чего выполняют исследование полученных образцов. Однако микробиологические исследования требуют довольно значительного времени (до нескольких суток), что, естественно, не позволяет офтальмологу воспользоваться соответствующей информацией во время хирургической обработки проникающей раны глаза или в период первых клинических признаков внутриглазного инфекционного осложнения [23,29,37].

Одним из перспективных методов диагностики внутриглазных инфекций является активно внедряемая в клиническую практику PCR реакция. Однако технические сложности и дороговизна данного метода не

позволяют использовать его во всех случаях диагностики эндофтальмита. Возможно, что появление более доступных методов определения антигенов, специфичных для различных микроорганизмов, позволит в более широких масштабах проводить идентификацию микрофлоры у большинства пациентов с внутриглазными инфекциями [85,86,112,124].

В настоящее время лечение эндофтальмита производится комплексно с применением нескольких методов.

Так, сразу после установления диагноза назначается местная и системная антимикробная терапия. Однако известно, что в случаях использования традиционных путей введения лекарственных средств удается создать их терапевтическую концентрацию только в структурах переднего отдела глаза и в сосудистом тракте. В связи с этим, по мнению ряда авторов, лишь интравитреальное введение антимикробного препарата может обеспечить его эффективную концентрацию в витреальной полости [38,41,45].

Методики введения и дозы вводимых препаратов известны для большинства применяемых антимикробных препаратов. При невозможности проведения микробиологической диагностики, а также до момента определения микробной флоры и ее чувствительности к антибактериальным препаратам, как правило, применяются антибиотики широкого спектра действия или комбинации различных антибиотиков. Так, для введения в стекловидное тело чаще используют растворы гентамицина, цефалоспоринов, а также ванкомицина [10,22,23,27,29,35,56,129,130,142].

Особые трудности возникают при лечении грибковых эндофтальмитов, так как на сегодняшний день в распоряжении врачей имеется лишь ограниченное количество антимикотических препаратов. Прежде всего, препаратами первого выбора являются амфотерицин, вводимый системно и интравитреально, а также сочетанное применение каспорина и амфотерицина. В последние годы доказана возможность использования вориконазола, как системно, так и интравитреально [66,83,109,110,118,125].

Другой немаловажной проблемой в лечении эндофтальмита является тот факт, что для обеспечения стерильности внутриглазных сред однократной интравитреальной инъекции антимикробного препарата, как правило, недостаточно, и в ряде случаев при отсутствии клинического улучшения необходимо его повторное введение в стекловидное тело. При этом интраокулярное введение больших доз антибиотиков оказывает токсическое воздействие на ткани глаза, роговицу, хрусталик и сетчатку, обуславливая развитие кератопатии, образование катаракты, а также деструкцию пигментного эпителия сетчатки [104].

Таким образом, основными факторами, определяющими эффективность лечения внутриглазных инфекционных осложнений, являются рациональный выбор антибактериального препарата с учетом чувствительности к нему возбудителя инфекции и выбор оптимального метода введения медикамента, позволяющего обеспечить необходимую терапевтическую концентрацию лекарственного вещества в полости глаза. Однако подавление микробной флоры внутри глазного яблока не решает проблемы продолжающегося воспаления при внутриглазной инфекции, что связано с накоплением большого количества продуктов и медиаторов воспаления, в том числе и протеолитических ферментов лизосомального происхождения, продолжающих поддерживать воспалительную реакцию [40,98,146].

В качестве радикального способа хирургического лечения эндофтальмита, позволяющего освободить полость глаза от гноя, В.В. Волковым в 1972 году была предложена операция, названная автором витреопусэктомией. Операцию осуществляли по типу «открытое небо» [13].

Существенный положительный сдвиг в лечении эндофтальмита произошел благодаря внедрению в клиническую практику комбинированной методики, включающей проведение витрэктомии, интраокулярной антибиотикотерапии и интравитреальной тампонады стекловидного тела различными заместителями: жидкими и газообразными ПФОС или

силиконовым маслом [17,21,29,55,58,61,97,139]. Витрэктомия обеспечивает аспирацию инфицированных тканей, получение материала для микробиологического исследования, сводит к минимуму повреждение сетчатки микробными протеазами, улучшает условия для интравитреальной антибиотикотерапии за счет уменьшения микробной нагрузки и более равномерного распределения препаратов во внутриглазных средах. Своевременное оперативное лечение обеспечивает восстановление прозрачности оптических сред, предотвращает развитие воспалительных мембран, приводящих к отслойке сетчатки и цилиарного тела. Интраоперационная силиконовая тампонада тормозит повторное размножение микроорганизмов в витреальной полости, уменьшает риск развития тотальной отслойки сетчатки и субатрофии в послеоперационном периоде [56,58,67].

Однако, несмотря на наличие в настоящее время большого арсенала антибактериальных препаратов, внутриглазной инфекционный процесс нередко заканчивается гибелью глаза. Трудности лечения эндофтальмитов объясняются рядом факторов. Из них главным считается недостаточная терапевтическая концентрация медикаментов во внутренних отделах глаза, что, в свою очередь, приводит к развитию резистентных к ним форм микробов, усугубляющих течение эндофтальмита. Число штаммов бактерий, нечувствительных ко многим известным антибиотикам, неуклонно возрастает [20,73,75,89,103]. Кроме того, частые отрицательные результаты бактериологического исследования (фазовые колебания микробной обсемененности стекловидного тела, частичное подавление инфекционного процесса ранее проводившейся антибиотикотерапией), а порой и невозможность его проведения в момент операции по различным техническим причинам затрудняет выбор необходимого препарата не только для его интравитреального введения, но и последующего лечения. Возможность выбора оптимального антимикробного препарата ограничивается большим числом аллергических и возможных побочных

системных эффектов. Так, применение даже небольших доз противогрибковых препаратов, например амфотерицина-В, может вызывать осложнения со стороны почек и печени [87,118,125].

В последнее время в литературе появились работы по использованию в лечении воспалительных глазных заболеваний антимикробных препаратов других групп, сильных окислителей и антисептиков [8,32,51]. Преимуществами данных веществ являются их широкий антимикробный и антисептический спектр действия в отношении большинства микроорганизмов, ряда вирусов, грибков и простейших [4,5,15,36,62,63,79]. Так, димексид, озон, гипохлорит натрия, оксид азота и повидон-йод успешно используются при лечении конъюнктивита, гнойных язв роговицы и экзогенного бактериального эндофтальмита. Однако предложенные антисептические средства воздействуют не только на белково-липидные плазматические мембраны микроорганизмов, но и на клеточные мембраны структур глаза, активируя перикисное окисление липидов, что приводит к токсическому воздействию на зрительный нерв и сетчатку [8,36].

В связи с вышеизложенным, поиск методов лечения эндофтальмита, обладающих максимально эффективным дозированным и направленным действием, сохраняет высокую актуальность и социальную значимость.

На наш взгляд, этим требованиям отвечает методика фотодинамической терапии.

1.3. Основы фотодинамической терапии

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – это методика направленного воздействия на патологический очаг. В ее основе лежит светоиндуцированная химиотерапия, подразумевающая обязательное наличие трех факторов: двух экзогенных (фотохимического агента, фотосенсибилизатора (ФС), и света и одного эндогенного (кислорода) [42,46].

На сегодняшний день доказано, что введение ФС в организм сопровождается его селективной кумуляцией в тканях с повышенной митотической активностью. При этом в зависимости от характера патологического очага, типа применяемого ФС, маршрута и способа его доставки контраст накопления ФС в очаге по отношению к здоровой ткани может достигать от 4:1 до 10:1 [52].

Установлено, что вследствие осмотической диффузии ФС адсорбируется либо в плазматической мембране клеток, либо в их митохондриях ядрах и лизосомах. Избирательность накопления ФС в патологическом очаге обусловлена разностью концентраций ФС в пролиферирующей и нормальной тканях. Избирательность фотоповреждения объясняется локальностью подведения к очагу световой энергии соответствующей длины волны, вследствие чего в нем начинаются фотохимические процессы, в основе которых лежат два типа реакций. При первом типе реакций молекулы ФС под действием света переходят в возбужденное состояние, после чего взаимодействуют непосредственно с молекулами биологического субстрата. В результате образуются радикалы субстрата и ФС, вступающие в реакцию с молекулярным кислородом, что приводит к образованию свободных радикалов, являющихся очень активными окислителями биологических структур. В основе реакций второго типа возбужденная молекула ФС взаимодействует с кислородом, что приводит к образованию его активной синглетной формы, обладающей значительной окислительной активностью и цитотоксическим действием. Следует подчеркнуть, что для большинства ФС в механизме ФДТ характерны реакции второго типа [60].

Принимая во внимание целенаправленность и избирательность воздействия ФДТ непосредственно на патологический очаг, необходимо подчеркнуть, что эти достоинства энергетической методики обеспечиваются не только наличием ФС, избирательно накапливающимся в патологически

измененных тканях, но и взаимодействием с ФС лазерного излучения с длиной волны, соответствующей пику поглощения конкретного ФС.

Для ФДТ используются низкоэнергетические источники света, так как высокоэнергетические вызывают нагревание и испарение тканей. При этом теряется весь смысл и преимущества фотохимических реакций. В настоящее время чаще применяются лазерные источники света и светоизлучающие светодиоды.

Неоспоримыми преимуществами перед другими источниками света обладают диодные лазеры. Они портативны, экономичны, не требуют водяного охлаждения, питаются от обычной электрической сети, имеют гарантированный длительный период работы. Для подведения света от лазерной установки к месту выполнения ФДТ используются кварцевые моноволоконные световоды длиной 1.5-3 метра, диаметром 200-1000 мкм, с различными диффузорами и микролинзами [30,46,52].

1.4. Фотосенсибилизаторы, применяемые в ходе ФДТ. Отечественный ФС «Фотодитазин»

Возможности ФДТ в лечении различной патологии во многом определяются фотофизическими и фармакокинетическими характеристиками используемого ФС, обеспечивающего необходимую эффективность и направленность проводимого лечения. Условно ФС разделяются на два «поколения».

К ФС «первого поколения», использование которых началось с 1961 года, относятся препараты группы гематопорфиринов («Photofrin», «Photosan», HpD, «Фотогем»). Их преимуществами являются простота изготовления из широко доступных веществ. Их главными недостатками считаются длительный период накопления (до 2 суток), длительный период фототоксичности, а также низкая селективность.

К ФС «второго поколения», использование которых началось с 1980 года и актуально до настоящего времени, относятся порфирины, бензопорфирины, фталоцианины, тексафирины, хлорины и бактериохлорины [46, 52].

На сегодняшний день наиболее перспективными для ФДТ различной офтальмопатологии считаются ФС хлоринового ряда. Это вещества как естественного (из бактериохлорофилла), так и синтетического происхождения. К семейству ФС хлоринового ряда относятся мета-тетрагидроксифенилхлорин (m-THPC, “Foscan”), этил-этиопурпурин (SnET2, “Purlytin”), моно-N-аспартил-хлорин e6 (NPe6), BPD-MA (вертепорфин, “Visudyne”), отечественные препараты “Фотодитазин”, “Фотолон”, “Радахлорин”. Общими достоинствами этих препаратов являются наличие интенсивного максимума поглощения в красной области спектра (652-690 нм), высокая фотодинамическая активность в малых дозах, высокий контраст накопления в пролиферативной ткани, низкая общая и кожная токсичность, а также быстрая элиминация из организма, что позволяет проводить ФДТ в амбулаторных условиях. Кроме того, выраженные амфифильные свойства ФС этой группы позволяют использовать их в водных растворах, гелевых и липосомальных формах [30, 48, 52].

Среди отечественных ФС обращает на себя внимание ФС «Фотодитазин», разработанный в НИИ биомедицинской химии РФ (Патент на изобретение № 2144538) и производимый российской фирмой ООО «Вета Гранд».

Будучи ФС хлоринового ряда нового поколения, «Фотодитазин» отвечает всем современным медицинским требованиям, предъявляемым к лекарственным средствам. Это препарат растительного происхождения, созданный на основе производных хлорофилла А, получаемого из биомассы микроводоросли Спирулина платензис (Spirulina platensis).

В результате исследований, направленных на изучение зависимости результативности ФДТ от чистоты ФС, доказано, что чем больше в препарате

хлорина e_6 и меньше примесей, тем он эффективнее для использования в ФДТ. При этом установлено, что «Фотодитазин», представляющий собой бис-N-метилглюкамовую соль хлорина e_6, содержит минимальное количество (не более 3,5%) сопутствующих примесей хлоринового ряда, что существенно ниже, чем в сходных препаратах на основе хлорина e_6 – «Радахлорине» и «Фотолоне» [30].

По спектральным характеристикам в электронном спектре поглощения «Фотодитазина» наблюдаются пять характеристических полос поглощения с максимумами при длинах волн 401, 504, 536, 600 и 655 нм. В биологических средах его длинноволновый максимум поглощения сдвигается в область 662 нм, что соответствует области наибольшей оптической прозрачности для биологических тканей и обеспечивает, таким образом, большую глубину проникновения лазерного излучения при проведении ФДТ заднего отрезка глаза.

ФС «Фотодитазин» обладает улучшенными фармакокинетическими свойствами. Исследования его фармакокинетики в опытах in vivo показали, что препарат обладает высоким контрастом накопления в патологических тканях в сравнении с интактными тканями, что обеспечивает большую избирательность его воздействия. При этом индекс контрастности «Фотодитазина» по отношению к окружающей интактной ткани составляет от 8:1 до 10:1.

При системном введении «Фотодитазина» максимум его накопления в патологическом очаге наблюдается через 1,5-2 часа от начала введения, а практически полное выведение из организма наблюдается в течение 28 часов.

Препарат проявляет высокую фотодинамическую активность при использовании малых доз и низкую световую токсичность при полном отсутствии темновой фототоксичности. Его токсичность при внутривенном введении LD50 составляет 158 мг/кг веса при средней терапевтической дозе 0,8 мг/кг.

«Фотодитазин» обладает высокой водорастворимостью и отсутствием образования агрегированных форм, а наличие у него выраженных амфифильных свойств определяет высокую способность препарата связываться с мембранами пролиферирующих, в том числе и микробных клеток.

Необходимо подчеркнуть, что «Фотодитазин» прошел успешные клинические испытания в лечении целого ряда онкологических заболеваний (плоскоклеточный и базальноклеточный рак кожи, рак легкого) на базе ГУ «Медицинский радиологический научный центр РАМН» (Обнинск), ГУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН» (Москва), НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова Росздрава (Санкт-Петербург) и по решению Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития был внесен в государственный реестр лекарственных средств (регистрационное удостоверение № ЛС – 001246 от 10.02.2006) под названием «Фотодитазин®».

Таким образом, применительно к офтальмологии отечественный ФС «Фотодитазин» обладает целым рядом преимущественных положительных свойств, которые определяются его химическими, фотофизическими и фармакокинетическими характеристиками [30, 52].

1.5. Применение ФДТ в медицине. Особенности антимикробной ФДТ

В последние годы ФДТ широко используется в различных областях медицины: при поражениях кожи или ранних стадиях рака дыхательного, пищеварительного, мочевыделительного трактов и половой системы [28,40]. Другой областью применения ФДТ является ее совместное использование с хирургическими вмешательствами или химиотерапией, а также при лечении сердечно-сосудистых заболеваний, атеросклероза, ревматоидного артрита [12,108].

В офтальмологии имеются сведения о ФДТ неоваскуляризации роговицы и радужки [3,34,134]. Кроме того, заслуживают внимания экспериментальные работы по ФДТ хориоидальной неоваскуляризации различной этиологии, а также офтальмоонкологических заболеваний, кистозных фильтрационных подушечек после антиглаукоматозных операций [9, 25,74,77,115].

Что касается антимикробного действия ФДТ, то оно было выявлено более 100 лет назад [143]. В настоящее время интерес исследователей к фотодинамическому повреждению микробных клеток связан с быстропротекающими эволюционными изменениями в природе, приводящими к появлению широкого разнообразия антибиотико-резистентных штаммов микроорганизмов. Инфекции, вызванные полирезистентными, в том числе и метициллин-устойчивыми микроорганизмами (MRSA), отличаются длительностью и сложностью лечения, что вынуждает исследователей искать новые альтернативные пути антимикробной терапии [103].

В последние десятилетия в разработке методик антимикробной фотодинамической терапии (АФДТ) были достигнуты серьезные успехи [154]. Ряд авторов подчеркивают возможность антимикробного действия АФДТ вне зависимости от антибиотикорезистентности микроорганизмов. По их мнению, уничтожение патогенных микроорганизмов может быть достигнуто при умеренных дозах облучения и коротком инкубационном периоде, при этом сохраняется высокая степень селективности по сравнению с главными элементами тканей хозяина. В литературных источниках также имеются многочисленные исследования активности ФС в отношении наиболее часто встречающихся микроорганизмов. Отмечается, что в эксперименте in vitro существуют приблизительно равные условия гибели культур фибробластов, эпителиальных клеток и большинства микроорганизмов при проведении ФДТ [92,119,126,147].

В настоящее время АФДТ наиболее широко используется в стоматологии и дерматологии.

Так, в дерматологии АФДТ используется при лечении герпеса, импетиго, дерматита и инфицированных ран [53,68,82,127]. В стоматологии АФДТ применяется либо как альтернатива антибактериальным средствам при лечении болезней периодонта и кариесе, либо в сочетании с механической очисткой инфицированных полостей, либо в качестве самостоятельного метода лечения. Кроме того, имеются сведения о совместном использовании ФДТ с различными антибактериальными средствами [131,156].

Согласно данным литературы, в ходе изучения в эксперименте дозозависимого эффекта АФДТ в лечении заболеваний периодонта, вызванных культурами A. actinomycetemcomitans, F. nucleatum, P. gingivalis, Pr. intermedia, и St. Sanguis, гибель этих микроорганизмов наблюдалась в 95-100% случаев. При этом было отмечено, что наиболее важными факторами в этих случаях следует считать длину волны лазерного излучения, его плотность и концентрацию ФС. Причем использование даже низкой мощности лазерного излучения, но при условии оптимальной длины волны и плотности энергии в комбинации с соответствующей концентрацией ФС делает АФДТ практически бактерицидной методикой [84,155,158].

В последнее время в литературе появились сообщения об использовании АФДТ с применением геля «Фотодитазин» в офтальмологии, в частности, при лечении гнойных язв роговицы, вызванных микробной и грибковой флорой. Гель в этих случаях наносится непосредственно на язвенный дефект, легко дозируется и длительно сохраняется в конъюнктивальной полости, что позволяет ФС проникать в пораженные участки роговицы. По мнению авторов, АФДТ с гелем «Фотодитазин» может использоваться без идентификации микрофлоры. При этом в ходе ее выполнения при гнойных язвах роговицы отмечается быстрое купирование воспалительного процесса и быстрое очищение раны от продуктов тканевого

распада [7,39]. Кроме того, в 2008 году группой авторов было предложено использовать антимикробную активность ФС для профилактики послеоперационного эндофтальмита при экстракции катаракты с имплантацией ИОЛ. В этих случаях для уменьшения вероятности адгезии микроорганизмов к ИОЛ на её поверхность наносился ФС (производное порфирина), имевший прочную химическую связь с материалом линзы. При этом после вскрытия упаковки линзы и в первые часы после имплантации поверхность ИОЛ обладала выраженными антимикробными свойствами [140].

1.6. Механизм действия АФДТ

На сегодняшний день известно, что механизм воздействия ФС на микробную клетку зависит от физико-химических параметров взаимодействия ФС с патогенным организмом в отсутствии света. При этом механизмы фотооксигенации реализуются с участием промежуточных радикалов и представляют собой фотоиндуцированное самоокисление. Установлено, что, несмотря на короткий период «жизни» синглетного кислорода, выделяемого ФС под действием облучения в водной среде (несколько миллисекунд), он все равно обладает выраженной реакционной способностью [24,46].

Механизм фотодинамического воздействия на микробные клетки на молекулярном уровне во многих случаях также хорошо изучен и представлен реакциями двух типов.

В реакциях первого типа ФС в возбужденном триплетном состоянии участвует в переносе электрона или атома водорода. В результате образуются активные радикалы биологического субстрата, вступающие в дальнейшие химические реакции с кислородом или другими молекулами. В присутствии воды реакция первого типа может привести к образованию гидроксид-радикалов, которые также могут взаимодействовать с биомолекулами

микробной стенки или образовывать пероксид водорода. Пероксидирование липидов приводит к нарушению целостности мембраны, вызывая уменьшение её подвижности, увеличение ионной проницаемости и нарушение трансмембранного транспорта. В реакции второго типа происходит перенос энергии от молекулы ФС к молекуле кислорода с переводом её в синглетное состояние, после чего образовавшийся в этом случае синглетный кислород окисляет биологические молекулы [81,107,141].

Бактерицидные эффекты порфиринов и родственных им хлоринов также проявляются в воздействии на уровне клеточной стенки, нарушении мембранного синтеза и, возможно, прикреплении ФС к эндоплазматическому ретикулуму грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжеподобных грибов и простейших, что сопровождается формированием незавершенных эзосом [26,60,78,123].

Как показывают многочисленные исследования, грамотрицательные микроорганизмы более устойчивы к фотодинамическому воздействию по сравнению с грамположительными бактериями. При этом антимикробная активность АФДТ с использованием ФС хлоринового ряда в отношении грамотрицательных микроорганизмов повышается в присутствии катионных агентов. Такой эффект, с точки зрения авторов, связан с тем, что грамотрицательные микроорганизмы несут на своей поверхности отрицательный заряд, препятствующий адсорбции ФС хлоринового ряда, имеющих одноименный заряд. Поэтому возможным направлением увеличения силы воздействия на микроорганизмы следует считать изменение PH либо использование ФС, имеющих положительный заряд [90,91,94,95,132,137,144,147].

В ниже представленной таблице 1 приведены суммирующие литературные данные по антимикробному фотодинамическому действию ФС хлорина е6 и его производных.

Таблица 1.

Антимикробное действие хлорина е6 и его производных в отношении различных микроорганизмов по данным литературы

Авторы статей	Используемые ФС хлоринового ряда	Вид патогенного микроорганизма
Embleton M.L.et al, 2004 [94]	immunoglobulin G (IgG)-SnCe6 conjugate	Staphylococcus aureus (MRSA)
Demidova and Hamblin, 2005 [90]	poly-L-lysine chlorin(e6) conjugate(pL-ce6)	E. coli , S. aureus, C.albicans
Demidova and Hamblin, 2005 [91]	poly-L-lysine chlorin(e6) conjugate, benzoporphyrin Derivative	Bacillus atrophaeus, B.cereus, B.megaterium, B.thuringiensis, B.subtilis
Embleton M.L. et al., 2005 [95]	Bacteriophage chlorin e6 (SnCe6) conjugate	Staphylococcus aureus
George P. Tegos and Hamblin, 2006 [106]	poly-L-lysine chlorin(e6) conjugate(pL-ce6)	S. aureus, E. coli, Ps. aeruginosa
Ефимова Е.Г., Чейда А.А. и др., 2006 [26]	N-диметилглюкаминовая, тринатриевая соль хлорина е6	St. aures, Streptococcus, Cit. amalonaticus, Ent. agglomerans, C. Albicans
Tang et al., 2007 [154]	chlorin(e6) conjugate (pL-ce6)	S. aureus, E. Coli
Schastak S. et al., 2008 [149]	chlorine e6 Photolon	Staphylococcus aureus (MRSA) , E.coli, Ps. Aeruginosa

Резюме

Согласно литературным данным, лечение внутриглазной инфекции (эндофтальмита) является актуальной проблемой клинической офтальмологии. Эндофтальмит нередко приводит не только к утрате зрительных функций, но и потере самого глаза как анатомического органа.

Современные достижения медицины, в том числе офтальмологии, существенно улучшили прогноз лечения эндофтальмита. Однако на конечный результат лечения значительное влияние оказывают вирулентность

возбудителя, наличие и характер сопутствующей травмы, сроки начала лечения и используемые методы, а также состояние иммунитета пациента.

Несмотря на широкое внедрение в клиническую практику комбинированной методики, включающей проведение витрэктомии и интраокулярной антибиотикотерапии, исход эндофтальмита в большинстве случаев остается сомнительным. Не всегда удается купировать воспалительный процесс из-за невозможности определить возбудителя непосредственно в момент операции и, соответственно, сделать правильный выбор антимикробного препарата, действующего именно на данную флору. Необходимо также учитывать и то, что широкое применение антимикробных средств ограничивается увеличением антибиотикорезистентных микроорганизмов и возрастающим числом аллергических реакций на лекарственные препараты.

Для решения комплекса данных проблем представляет интерес изучение антимикробного действия АФДТ, считающейся на сегодняшний день высокоэффективным и перспективным методом антимикробной терапии в отношении большинства бактерий и грибов вне зависимости от их чувствительности к антибиотикам, что позволяет использовать данную методику при лечении инфекционных заболеваний без идентификации микрофлоры.

По мнению большинства исследователей, занимающихся проблемой АФДТ, фотоинактивация микроорганизмов является многофакторным процессом. При этом появление фотостойких микроорганизмов на сегодняшний день экспериментально не выявлено [128,138]. Бактерицидное и бактериостатическое воздействие АФДТ на возбудителей инфекционных заболеваний осуществляется посредством генерации синглетного кислорода и перекисных радикалов с помощью ФС, находящихся вне- или внутриклеточно, с последующим развитием каскада фототоксических реакций. Рядом авторов отмечается, что задержка роста микробной культуры in vitro при проведении АФДТ, возможно, вызывается оксидантным стрессом

и представляет собой процесс активного взаимодействия токсичных радикалов с антистрессорными факторами микроорганизмов. Исходы данного процесса могут быть различными в зависимости от интенсивности генерации радикалов, активности антистрессорных протеинов, антиоксидантных ферментов бактерий и многих других факторов [46].

В доступной литературе мы не нашли сведений об использовании АФДТ при лечении внутриглазных инфекций. В этой связи, с нашей точки зрения, несомненный научный и практический интерес представляет целесообразность изучения в эксперименте возможностей интравитреальной АФДТ с использованием отечественного ФС хлоринового ряда «Фотодитазин», обладающего выраженными антимикробными характеристиками, в комплексном хирургическом лечении экспериментального бактериального экзогенного эндофтальмита.

В последующих главах диссертационной работы представлены результаты разносторонних экспериментальных исследований in vitro и in vivo, посвященных данной проблеме.

ГЛАВА 2

ОСОБЕННОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ ПАРАМЕТРОВ АНТИМИКРОБНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ НА ПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

(Экспериментальные исследования in vitro)

Согласно данным литературы, антимикробная фотодинамическая терапия (АФДТ) широко применяется в различных областях медицины при лечении острых и хронических воспалительных заболеваний [68,84,92].

В данной главе представлена серия экспериментальных исследований in vitro, направленных на изучение особенностей воздействия различных параметров АФДТ на патогенные микроорганизмы.

Исследования проводились на базе микробиологического отделения испытательного лабораторного центра ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Калужской области».

В качестве объектов исследования использовались бульонные культуры микробных (Staphilococcus aureus, Enterococcus faecium, Pseudomonas aeruginosa) и грибковых (Candida albicans) клеток, полученных от больных с множественной лекарственной устойчивостью:

1. St. Aureus – грамположительные кокки, чувствительные к тобрамицину, оксациллину, ципрофлоксацину, мало чувствительные к левомицетину и клафорану. Культура № 209R ATSS6538-R предоставлена ГНИИ ФИКМББ им. Тарасевича.

2. Ent. Faecium – крупные грамположительные диплококки, устойчивые к цефалексину, цефуроксиму, цефотаксиму, цефаклору, ампициллину, левомицетину, гентамицину, офлоксацину и линезолиду. Микроорганизм проявлял чувствительность только к ванкомицину. Культура № ATSS19434 предоставлена ГНИИ ФИКМББ им. Тарасевича.

3. Ps. aeruginosa – грамотрицательные палочки, неферментирующие, обладающие устойчивостью к воздействию ципрофлоксацина, ампициллина чувствительные к гентамицину, цефотаксиму, цефтазидиму, имипинему. Культура № ATSS9027 предоставлена ГНИИ ФИКМББ им. Тарасевича.

4. C. Albicans – типичные грибковые клетки овальной формы с одной почкой, слабо чувствительные к нистатину, устойчивые к клотримазолу, флюконазолу и нитрксолину. Культура № 885-653 предоставлена КМЦУ прикладной микробиологии (г. Оболенск).

Культуры всех патогенных микроорганизмов подвергались предварительной подготовке. Так, сначала в течение 24 часов St. aureus, Ent. faecium и P. aeruginosa подращивались на сывороточном агаре, а C. albicans – на мясопептонном бульоне с глюкозой. Далее производился их высев на накопительную среду с целью получения микробной массы в чистой культуре.

Для приготовления микробной взвеси использовали стандарт мутности на 5 Единиц в соответствии с Международным ОСО 42.28.86.07П, при котором в 1 мл взвеси количество микроорганизмов рода стафилококка составляло $0.56x10^9$, энтерококка и синегнойной палочки – $0.85x10^9$, грибов рода C. albicans – $0,47x10^9$. В ходе экспериментов использовались десятикратные разведения культур на изотоническом растворе NaCl.

Посевы, идентификацию и количественный учет исследуемых культур проводили в соответствии с Приказом МЗ СССР №535 от 22.04.1985 г. «Об унификации микробиологических методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях ЛПУ».

С целью изучения влияния различных условий проведения АФДТ на микроорганизмы была проведена серия экспериментов, включавшая:

- определение минимального времени «темновой» инкубации культур патогенных микроорганизмов с раствором ФС «Фотодитазин» в различных концентрациях;
- определение антимикробной активности АФДТ при использовании

различных концентраций раствора ФС «Фотодитазин» и различной плотности энергии лазерного излучения в отношении выбранных микроорганизмов.

- изучение влияния АФДТ на чувствительность микроорганизмов к антибиотикам.

2.1. Определение минимального времени «темновой» инкубации культур патогенных микроорганизмов с раствором ФС «Фотодитазин»

Известно, что одним из существенных факторов, влияющих на фотодеструкцию клеток, является длительность их «темновой» инкубации с ФС, т.е. время достижения необходимой для проведения АФДТ концентрации ФС на поверхности либо внутри микроорганизма в результате его взаимодействия с клеточной стенкой или другими структурами микроорганизма. Этот параметр может влиять на количество выживших микроорганизмов. По данным различных авторов, время инкубации микроорганизмов с раствором ФС может быть различным, варьируя от 3-5 минут до 1-2 часов в зависимости от характеристик ФС, вида микроорганизма, а также цели разрабатываемой методики антимикробной терапии [46,71].

Для выбора минимально необходимого времени темновой инкубации микроорганизмов с раствором «Фотодитазина» была проведена серия экспериментов in vitro.

2.1.1. Методика экспериментальных исследований.

В лунки 96 луночного планшета (ТУ 64-2-278-79) вносилось по 0.1 мл взвеси микроорганизмов Staphilococcus aureus, Enterococcus faecium, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans и 0,1 мл раствора «Фотодитазина» в концентрациях 5мг/мл, 0,5мг/мл, 0,05мг/мл, 0,005мг/мл и 0,0005мг/мл. Таким образом, полный объем опытных образцов составлял 0,2 мл на лунку. Далее

проводилось по 4 повтора каждой экспериментальной серии. Контролем служили микроорганизмы, не подвергавшиеся никакому воздействию.

После добавления «Фотодитазина» культуру инкубировали при температуре 37^0С без доступа света, при этом время инкубации составляло от 0 до 40 минут. Затем производилось облучение культуры клеток диодным лазером (длина волны 662 нм, плотность энергии 30 Дж/см^2) с помощью световода через отверстие Ø 6 мм (площадью – 0,28 см^2) в черном светонепроницаемом трафарете, соответствующем диаметру лунки.

Следует уточнить, что выбор времени инкубации и плотности энергии был обусловлен данными литературы, свидетельствующими о том, что этих параметров достаточно для выявления антимикробного действия АФДТ [46,126].

Далее 10 мкл от общего объема рабочей смеси высевали на селективные питательные среды: St. aureus – на желточно-солевой агар, Ps. aeruginosa – на эндо-агар, Ent. faecium – на агар с ТТХ, C. albicans – на агар Сабуро. Параллельно было раститровано и высеяно на питательные среды содержимое контрольных лунок.

Дальнейшая инкубация производилась в условиях термостата при температуре 37^0С. Культуры Ps. aeruginosa, St. aureus и Ent. faecium инкубировались в течение суток, грибов рода Candida – 2 суток + 1 сутки при комнатной температуре.

Подсчет КОЕ (колониеобразующих единиц) проводился с помощью лабораторного счетчика колоний GENCONS (Великобритания) при перерасчете на 1,0 мл. Для удобства полученные количества КОЕ представлены в виде десятичного логарифма (Log 10).

2.1.2. Результаты.

Полученные результаты указывали на наличие существенной разницы в количестве выживших микроорганизмов в контрольных лунках, а также опытных образцах в зависимости от вида микроорганизма и времени его темновой инкубации в различных концентрациях раствора «Фотодитазина».

Так, в «контрольных» лунках было зафиксировано значительное увеличение количества всех патогенных микроорганизмов, что приводило к их «сливному» росту после высевания на питательные среды.

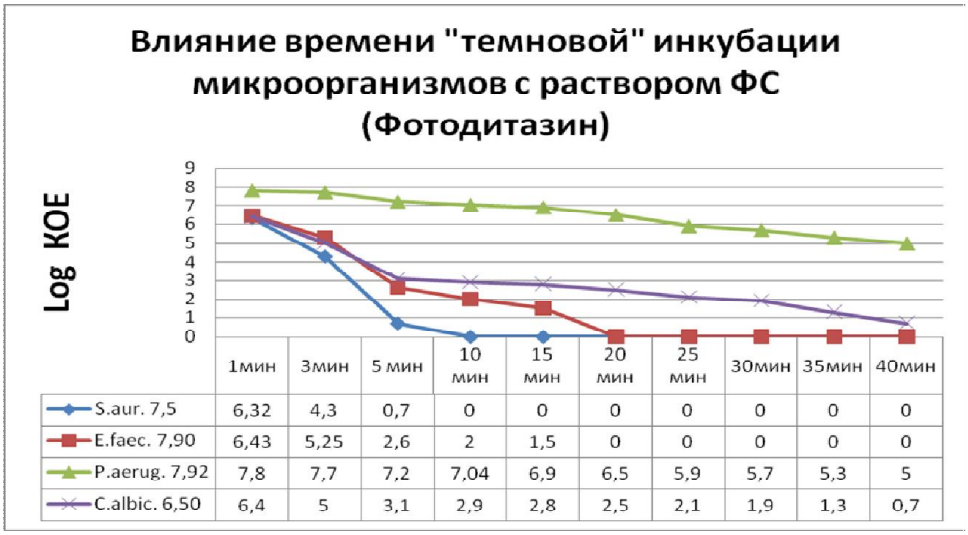
«Фотодитазин» в концентрации 5 мг/мл при проведении АФДТ проявлял бактериостатическое/бактерицидное действие в отношении всех изучаемых микроорганизмов. При этом его антимикробный эффект варьировал в широком диапазоне и зависел как от вида микроорганизма, так и от времени его «темновой »инкубации с раствором ФС. Так, «темновая» инкубация грамположительных микроорганизмов и грибов рода Candida уже на первой минуте вызывала бактериостатический, а к 10-30 минуте – бактерицидный эффект. Наиболее устойчивой к АФДТ была культура грамотрицательного микроорганизма Ps. aeruginosa, что проявлялось в достижении лишь бактериостатического эффекта даже при темновой инкубации в течение 40 минут. Аналогичные данные отмечались и при использовании «Фотодитазина» в концентрации 0,5 мг/мл и 0,05 мг/мл (график 1).

	1мин	3мин	5 мин	10 мин	15 мин	20 мин	25 мин	30мин	35мин	40мин
S.aur. 7,5	4,5	2,5	2	0	0	0	0	0	0	0
E.faec. 7,90	7,00	5,10	3,20	3,00	1,50	1,20	0,30	0,00	0,00	0,00
P.aerug. 7,92	7,84	7,76	7,66	7,3	7,18	7,08	6,9	6,53	5,3	4,8
C.albic. 6,50	6,00	4,10	3,10	3,00	2,50	1,20	1,00	0,00	0,00	0,00

График 1. Зависимость количества различных видов выживших микроорганизмов (Log 10 КОЕ) от времени их темновой инкубации с раствором ФС «Фотодитазин» в концентрации 5 мг/мл

При использовании ФС «Фотодитазин» в концентрации 0,005 мг/мл полученные данные были аналогичны таковым, представленным в графике 1. Однако антимикробный эффект «Фотодитазина» был выражен несколько

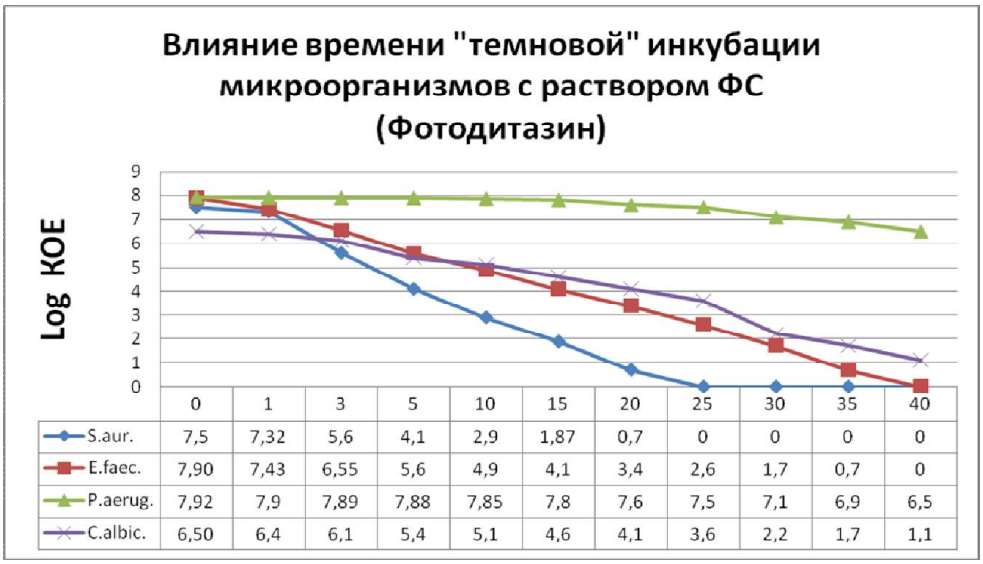
слабее в отношении грибов рода Candida, что подтверждалось сохранением их жизнеспособности и при инкубации в течение 40 минут (график 2).



	1мин	3мин	5 мин	10 мин	15 мин	20 мин	25 мин	30мин	35мин	40мин
S.aur. 7,5	6,32	4,3	0,7	0	0	0	0	0	0	0
E.faec. 7,90	6,43	5,25	2,6	2	1,5	0	0	0	0	0
P.aerug. 7,92	7,8	7,7	7,2	7,04	6,9	6,5	5,9	5,7	5,3	5
C.albic. 6,50	6,4	5	3,1	2,9	2,8	2,5	2,1	1,9	1,3	0,7

График 2. Зависимость количества различных видов выживших микроорганизмов (Log 10 КОЕ) от времени темновой инкубации с раствором ФС «Фотодитазин» в концентрации 0,005 мг/мл

При дальнейшем уменьшении концентрации ФС до 0,0005 мг/мл отмечалось увеличение времени достижения бактерицидного эффекта в отношении грамположительных микроорганизмов St. aureus до 25 минут и Ent. faecium до 40 минут (график 3).



	0	1	3	5	10	15	20	25	30	35	40
S.aur.	7,5	7,32	5,6	4,1	2,9	1,87	0,7	0	0	0	0
E.faec.	7,90	7,43	6,55	5,6	4,9	4,1	3,4	2,6	1,7	0,7	0
P.aerug.	7,92	7,9	7,89	7,88	7,85	7,8	7,6	7,5	7,1	6,9	6,5
C.albic.	6,50	6,4	6,1	5,4	5,1	4,6	4,1	3,6	2,2	1,7	1,1

График 3. Зависимость количества различных выживших микроорганизмов (Log 10 КОЕ) от времени темновой инкубации с раствором ФС «Фотодитазин» в концентрации 0,0005 мг/мл

Следует отметить, что, учитывая необходимость использования минимального времени проведения хирургических манипуляций при лечении эндофтальмита, нами было принято решение о нецелесообразности использования данной концентрации «Фотодитазина» в ходе дальнейших исследований.

2.1.3. Статистическая обработка полученных результатов.

Статистическая обработка полученных результатов была проведена для выявления минимального времени, требуемого для достижения бактериостатического эффекта АФДТ с раствором «Фотодитазина». Их воспроизводимость обеспечивалась 4-х кратным дублированием проводимых экспериментов. Характер изменчивости количества выживших микроорганизмов (КОЕ) от времени «темновой» инкубации и различной концентрации «Фотодитазина» оценивались методом однофакторного дисперсионного анализа, результаты которого представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2.

Результаты однофакторного дисперсионного анализа: коэффициент Фишера (F) и (F критическое) в зависимости от времени темновой инкубации и вида микроорганизма при концентрации Фотодитазина 5 мг/мл

Вид микроорганизма	Время темновой инкубации с раствором Фотодитазина в концентрации 5 мг/мл					
	1 минута		3 минуты		5 минут	
	F	F критическое	F	F критическое	F	F критическое
St. aureus	602112	5,98	303482,70	4,25	334718,20	3,490
Ent. faecium	2950233	5,98	605761,70	4,25	595015,70	3,490
C. albicans	1,27	5,98	332,32	4,25	583,35	3,490
Ps.aeruginosa	1,14	5,98	9,31	4,25	11,94	3,490

Полученные значения критерия Фишера (F) подтверждают гипотезу о существенном влиянии времени «темновой» инкубации микроорганизма с

раствором «Фотодитазина» на количество выживших микроорганизмов (КОЕ) и их взаимосвязь.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что наибольшую чувствительность к фотодинамическому воздействию проявляли культуры St. aureus и Ent. faecium (F>F критического). Значительное снижение количества выживших микроорганизмов отмечалось уже при их инкубации в течение 1 минуты. При исследовании культуры C. albicans статистически подтвержденное уменьшение количества микроорганизмов было выявлено на 3 минуте инкубации (F>F критического). Наиболее устойчивой к фотодинамическому воздействию оказалась культура грамотрицательного микроорганизма Ps. aeruginosa. Вместе с тем статистически достоверное уменьшение количества микроорганизмов достигалось также на 3 минуте инкубации при использовании раствора «Фотодитазина» в концентрации 5 мг/мл. Коэффициент Фишера (F) = 9,31. Аналогичные результаты получены при анализе данных, зафиксированных при использовании раствора Фотодитазина в концентрации 0,5 и 0,05 мг/мл.

Таблица 3.

Результаты однофакторного дисперсионного анализа: коэффициент Фишера (F) и (F критическое), в зависимости от времени темновой инкубации и вида микроорганизма при концентрации «Фотодитазина» 0,005 мг/мл

Вид микроорганизма	Время темновой инкубации с раствором «Фотодитазина» в концентрации 0,005 мг/мл					
	1 минута		3минуты		5 минут	
	F	F критическое	F	F критическое	F	F критическое
S. aureus	88886,11	5,98	93072,20	4,25	94480,38	3,49
Ent. faecium	550043,40	5,98	564271,20	4,25	571038,80	3,49
C. albicans	96,62	5,98	317,13	4,25	404,01	3,49
P.aeruginosa	2,25	5,98	3,49	4,25	24,45	3,49

Как следует из данных таблицы 3, при использовании раствора «Фотодитазина» в концентрации 0,005 мг/мл было выявлено статистически

достоверное уменьшение количества жизнеспособных грамположительных микроорганизмов и грибов рода Candida при «темновой» инкубации в течение одной минуты. Для достижения минимального бактериостатического эффекта в отношении грамотрицательных микроорганизмов рода Ps. aeruginosa необходима их инкубация в растворе Фотодитазина в концентрации 0,005 мг/мл в течение 5 минут.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что АФДТ с «Фотодитазином» в концентрации от 5,0 мг/мл до 0,0005 мг/мл обладает бактериостатическим/бактерицидным действием. Причем оптимальный диапазон концентрации «Фотодитазина» находится в интервале от 5,0 мг/мл до 0,005 мг/мл. Минимальный срок инкубации изучаемых микроорганизмов с раствором ФС «Фотодитазин», необходимый для дальнейшего проведения АФДТ, составляет не менее 5 минут и зависит от концентрации ФС. При данном временном диапазоне «темновой» инкубации отмечено статистически подтвержденное уменьшение количества выживших микроорганизмов и проявление бактериостатического эффекта «Фотодитазина». Поэтому для дальнейшего изучения параметров АФДТ в следующих сериях экспериментальных исследований нами использовалось время «темновой» инкубации 5 минут, учитывая, что его было достаточно для запуска фотохимического взаимодействия «Фотодитазина» с культурами всех изучаемых микроорганизмов, независимо от его концентрации.

2.2. Определение антимикробной активности АФДТ при использовании различных концентраций раствора «Фотодитазина» и плотности энергии лазерного излучения

В данной серии экспериментальных исследований изучалось влияние различных доз лазерного облучения и концентраций «Фотодитазина» на культуры микроорганизмов St. aureus, Ent. faecium, C. albicans и Ps. aruginosa.

Плотность энергии лазерного облучения составляла от 5Дж/см^2 до 30 Дж/см^2 с интервалом 5Дж/см^2. Следует уточнить, что взятые параметры АФДТ соответствовали средним значениям, используемым в ранее проведенных аналогичных экспериментальных исследованиях [46,105,106].

При проведении экспериментов использованы десятикратные разведения раствора «Фотодитазина» в концентрации от 5 мг/мл до 0,005 мг/мл. Время «темновой» инкубации культуры микроорганизмов с раствором «Фотодитазина» составляло 5 минут.

2.2.1. Методика экспериментальных исследований.

В лунки 96 луночного планшета (ТУ 64-2-278-79) вносилось по 0.1 мл взвеси микроорганизмов Staphilococcus aureus, Enterococcus faecium, Pseudomonas aeruginosa и Candida albicans и 0.1 мл раствора ФС в концентрациях 5 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,005 мг/мл. Таким образом, полный объем опытных образцов составлял 0.2 мл на лунку. Проводилось по 4 повтора каждой экспериментальной серии. Контролем служили микроорганизмы, не подвергавшиеся никакому воздействию, либо облученные лазером в максимальной дозе, а также лунки с добавлением раствора «Фотодитазина» в той же концентрации, что и в эксперименте, но без облучения лазером.

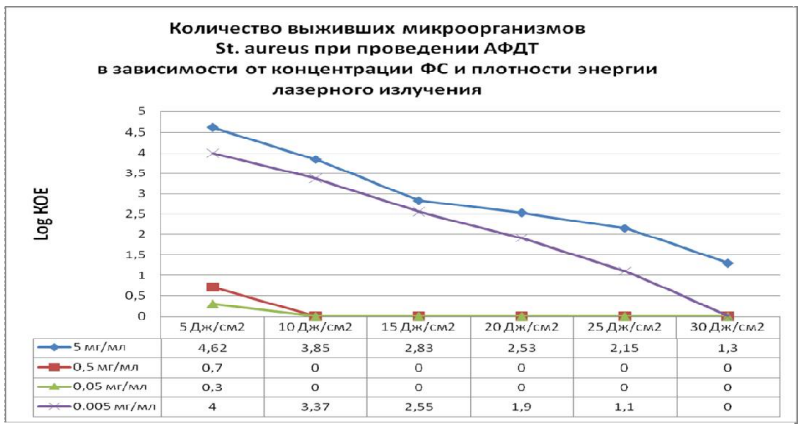
После добавления «Фотодитазина» культуры клеток инкубировали при 37^{0}С без доступа света в течение 5 минут. Затем производилось воздействие лазером. Плотность энергии лазерного излучения составляла от 5 Дж/см^2 до 30 Дж/см^2 с интервалом 5 Дж/см^2. Далее высевали 10 мкл от общего объема рабочей смеси на селективные питательные среды. Параллельно было растительно и высеяно на питательные среды содержимое контрольных лунок. Дальнейшая инкубация производилась в условиях термостата при 37^{0}С. Культуры Ps. aeruginosa, St. aureus и Ent. faecium инкубировались в течение суток, грибов рода Candida – 2 суток + еще 1 сутки при комнатной температуре. Затем производился подсчет КОЕ (колониеобразующих единиц) при перерасчете на 1,0 мл.

2.2.2. Результаты.

Облучение контрольных образцов не приводило к заметному изменению числа выживших микроорганизмов. В них отмечался сливной рост колоний в количестве, соответствующем изначально полученным разведениям. Воздействие лазерного облучения либо инкубация сенсибилизированных микроорганизмов без доступа света в условиях эксперимента сами по себе также не оказывали влияния на их жизнеспособность.

В то же время во всех опытных образцах было выявлено уменьшение количества жизнеспособных клеток. При этом особенно выраженный фотодинамический эффект наблюдался в отношении культур St. Aureus, Ent. faecium и C. albicans.

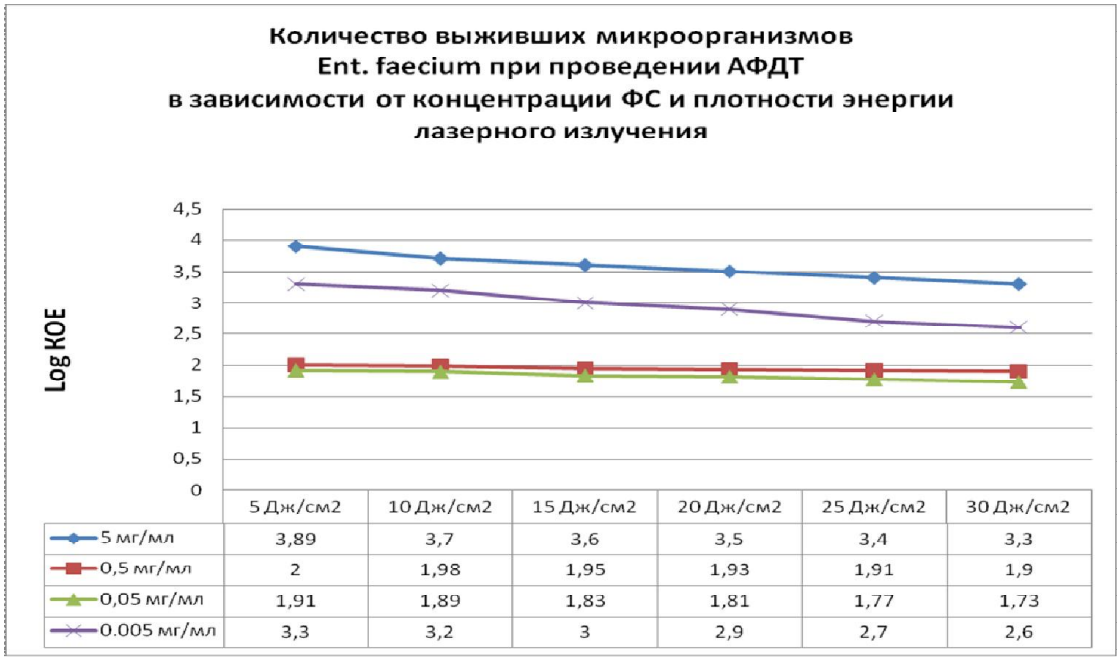
На представленном ниже графике 4 зафиксирован значительный антимикробный эффект АФДТ в отношении культуры St. aureus. При этом, несмотря на исходно высокое содержание жизнеспособных микроорганизмов в культуре ($0{,}56 \times 10^9$), бактериостатический эффект АФДТ был достигнут уже при плотности энергии лазера 5,0 Дж/см^2, а при использовании «Фотодитазина» в концентрации 0,05 мг/мл и 0,5 мг/мл в сочетании с энергией лазера 10,0 Дж/см^2 был получен бактерицидный эффект. Для удобства представления данных количество выживших микроорганизмов (КОЕ) показано в виде десятичного логарифма (Log10).



	5 Дж/см2	10 Дж/см2	15 Дж/см2	20 Дж/см2	25 Дж/см2	30 Дж/см2
5 мг/мл	4,62	3,85	2,83	2,53	2,15	1,3
0,5 мг/мл	0,7	0	0	0	0	0
0,05 мг/мл	0,3	0	0	0	0	0
0,005 мг/мл	4	3,37	2,55	1,9	1,1	0

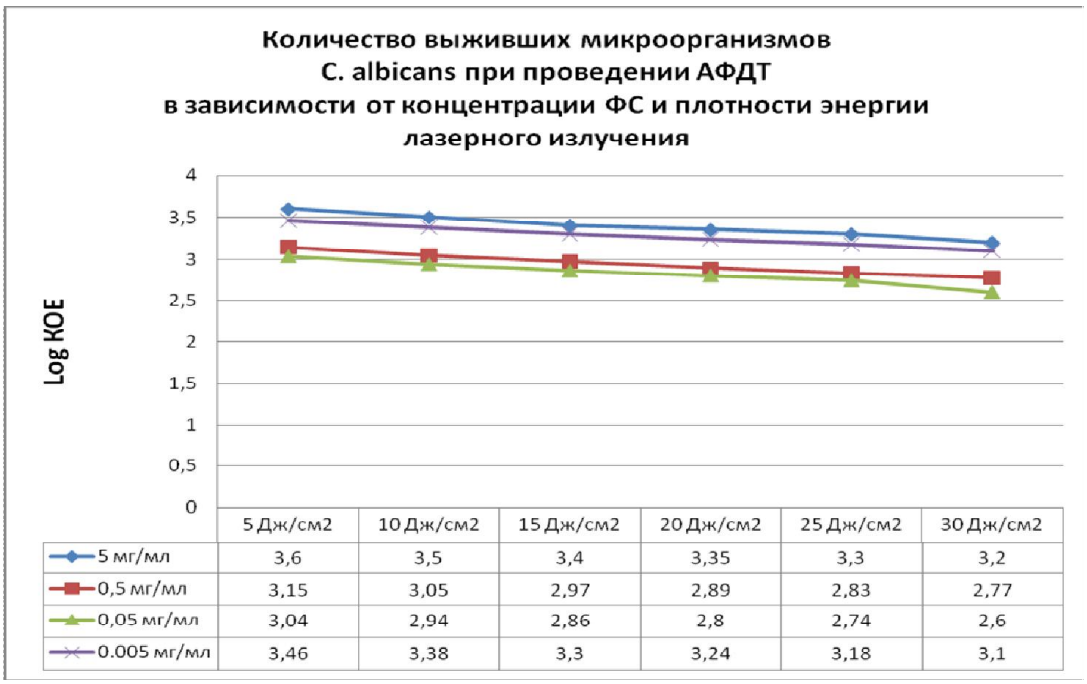
График 4. Зависимость количества выживших микроорганизмов вида St. aureus от процентного содержания «Фотодитазина» и мощности лазерного излучения при исходном количестве микробных тел $0{,}56 \times 10^9$ (Log10 КОЕ-7,45).

Как следует из графиков 5 и 6, где представлены результаты АФДТ на культурах Ent. faecium и C. albicans, данные микроорганизмы проявляли несколько большую устойчивость к фотоинактивации. Вместе с тем после проведения АФДТ отмечалось снижение количества выживших микроорганизмов рода Ent. faecium на 4-6 порядков и грибов рода Candida на 3-4 порядка в сравнении с их исходным количеством. Также как и в случае с культурой St. aureus, «Фотодитазин» проявлял наибольшую фотодинамическую активность в концентрациях 0,05 мг/мл и 0,5 мг/мл.



	5 Дж/см2	10 Дж/см2	15 Дж/см2	20 Дж/см2	25 Дж/см2	30 Дж/см2
5 мг/мл	3,89	3,7	3,6	3,5	3,4	3,3
0,5 мг/мл	2	1,98	1,95	1,93	1,91	1,9
0,05 мг/мл	1,91	1,89	1,83	1,81	1,77	1,73
0.005 мг/мл	3,3	3,2	3	2,9	2,7	2,6

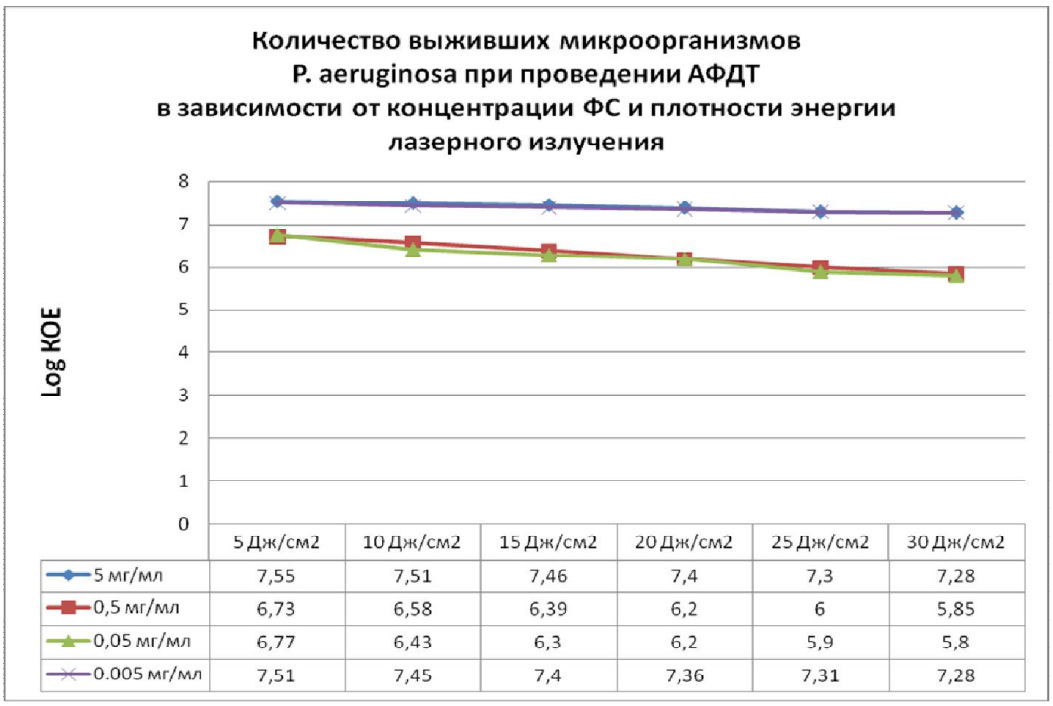
График 5. Зависимость количества выживших микроорганизмов вида Ent. faecium от процентного содержания «Фотодитазина» и мощности лазерного излучения при исходном количестве микробных тел $0,85x10^9$ (Log 10 КОЕ-7,92)



	5 Дж/см2	10 Дж/см2	15 Дж/см2	20 Дж/см2	25 Дж/см2	30 Дж/см2
5 мг/мл	3,6	3,5	3,4	3,35	3,3	3,2
0,5 мг/мл	3,15	3,05	2,97	2,89	2,83	2,77
0,05 мг/мл	3,04	2,94	2,86	2,8	2,74	2,6
0.005 мг/мл	3,46	3,38	3,3	3,24	3,18	3,1

График 6. Зависимость количества выживших грибов C. albicans от процентного содержания «Фотодитазина» и мощности лазерного излучения при исходном количестве микробных тел $0,47x10^9$ (Log10 КОЕ-6,67)

Следует отметить, что наибольшую устойчивость к фотоинактивации проявляла культура Ps. aeruginosa (график 7). Так, при проведении АФДТ в широком диапазоне доз лазерного излучения и концентраций «Фотодитазина» был получен лишь бактериостатический эффект. Антимикробное действие АФДТ в этих случаях проявлялось только в снижении количества жизнеспособных микроорганизмов на 2-2,5 порядка при использовании «Фотодитазина» в концентрациях 0,05 мг/мл и 0,5 мг/мл.



	5 Дж/см2	10 Дж/см2	15 Дж/см2	20 Дж/см2	25 Дж/см2	30 Дж/см2
5 мг/мл	7,55	7,51	7,46	7,4	7,3	7,28
0,5 мг/мл	6,73	6,58	6,39	6,2	6	5,85
0,05 мг/мл	6,77	6,43	6,3	6,2	5,9	5,8
0.005 мг/мл	7,51	7,45	7,4	7,36	7,31	7,28

График 7. Зависимость количества выживших микроорганизмов Ps.aeruginosa от процентного содержания «Фотодитазина» и мощности лазерного излучения при исходном количестве микробных тел $0{,}85 \times 10^9$ (Log 10 КОЕ - 7,92)

2.2.3. Статистическая обработка результатов.

Достоверность полученных результатов была проверена с оценкой воспроизводимости полученных результатов дисперсионным и корреляционным анализом. Выбор оптимального режима проведения АФДТ в зависимости от исходной концентрации микроорганизмов, концентрации «Фотодитазина» и плотности энергии лазерного излучения проводился с помощью многофакторного анализа. Вид факторной модели был выбран априори с учетом кинетики процесса гибели микроорганизмов при проведении ФДТ, подчиняющегося экспотенциальному закону [46,101]:

$$N = N_o \exp(-K\tau),$$

где N – количество микроорганизмов в момент времени τ; K – удельная скорость гибели микроорганизмов; N_o – исходное значение количества микроорганизмов.

Особенности вида микроорганизма и влияния различных факторов на характер их гибели должны быть «возложены» в параметр-функцию К.

Предварительный анализ экспериментальных значений КОЕ (представление их в графическом виде КОЕ с аппроксимацией экспонентой – линией тренда) подтвердил экспоненциальный характер кинетического процесса гибели микроорганизмов от мощности лазерного потока:

$$КОЕ = СО \exp(-F W),$$

где СО – исходная концентрация микроорганизма; W – мощность лазерного излучения; F – кинетический параметр, учитывающий природу микроорганизма и концентрацию фотосенсибилизатора в среде микроорганизма.

Проведенный численный анализ данного выражения для КОЕ применительно к полученным экспериментальным данным показал, что характерные особенности микроорганизма и концентрация ФС должны функционально входить в критерии F и СО, т.е. данные параметры здесь приобретают роль функционалов и являются функциями исходной концентрации микроорганизма и ФС.

Построение кинетических уравнений для исследуемых микроорганизмов проводилось с группированием экспериментальных данных для одной концентрации ФС и трех значений исходной концентрации рассматриваемого микроорганизма. Применялся двухфакторный анализ, и строилась двухфакторная регрессионная модель вида:

$$\text{Ln КОЕ} = B_o + B_1 \ln СО - B_2 W \qquad (a),$$

где B_o, B_1, B_2 – коэффициенты уравнения регрессии; СО – исходная концентрация микроорганизма; W – мощность лазерного излучения; КОЕ – количество выживших микроорганизмов.

Согласно экспериментальным данным, на каждый микроорганизм получали четыре регрессионных уравнения, коэффициенты которых отражали роль концентрации ФС.

Графический анализ численных значений КОЕ показал их параболическую зависимость от концентрации ФС с наличием

экстремальной точки КОЕ. Роль изменения концентрации ФС была включена в коэффициенты B_o, B_1, B_2 как $B_i = A_o + A_1 \ln FS + A_2 (\ln FS)^2$,

где A_o, A_1, A_2 – коэффициенты аппроксимации; FS – концентрация ФС.

Обобщенные коэффициенты B_o, B_1, B_2, подставленные в уравнение (а), и представляли собой кинетическую зависимость исследуемого микроорганизма от их исходной концентрации, мощности лазерного потока и концентрации ФС в исследуемых интервалах варьирования факторов.

Кинетические уравнения для исследуемых микроорганизмов были следующими:

- для стафилококка: lnKOE = (0,3628*(ln(*FS*))^2 + 2,084*ln(*FS*) + 2,4461) - (0,0249*(ln(*FS*))^2 + 0,1231*ln(*FS*) + 0,1477)**W* + (0,0728*(ln(*FS*))^2 + 0,3846*ln(*FS*) + 0,4514)*ln(*CO*);
- для энтерококка: lnKOE = 1,535*(ln(*FS*))^2 + 7,5254*ln(*FS*) - 6,3648 - (0,0027*(ln(*FS*))^2 + + 0,0108*ln(*FS*) + 0,0327)**W* + (-0,0628*(ln(*FS*))^2 - 0,3016*ln(*FS*) + 0,7009)*ln(*CO*);
- для кандида: lnKOE = -0,0903*(ln(*FS*))^3 - 0,584*(ln(*FS*))^2 - 0,0916*ln(*FS*) + 1,9655 - (-0,0016*(ln(*FS*))^2 -0,0091*ln(*FS*) + 0,0545)**W* + (0,0053*(ln(*FS*))^3 + 0,0381*(ln(*FS*))^2 + 0,0228*ln(*FS*7) + 0,4121)*ln(*CO*);
- для синегнойной палочки: lnKOE= - 0,3533*(ln(*FS*))^2 - 1,6057*ln(*FS*) + 2,9155 - (0,0002*(ln(*FS*))^3 + 0,0012*(ln(*FS*))^2 - 0,0011*ln(*FS*) + 0,0704)**W* +(0,0385*(ln(*FS*))^2 + 0,1804*ln(*FS*) + 0,9188)*ln(*CO*).

Качество полученной модели проверялось соответствием расчетных значений экспериментальным. Полученные конкретные выражения (уравнения) для четырех видов микроорганизмов позволяют в исследуемом интервале варьирования факторов численно выбирать оптимальные режимы проведения ФДТ.

Качество расчета значений КОЕ по полученным зависимостям представлено на графике 8.

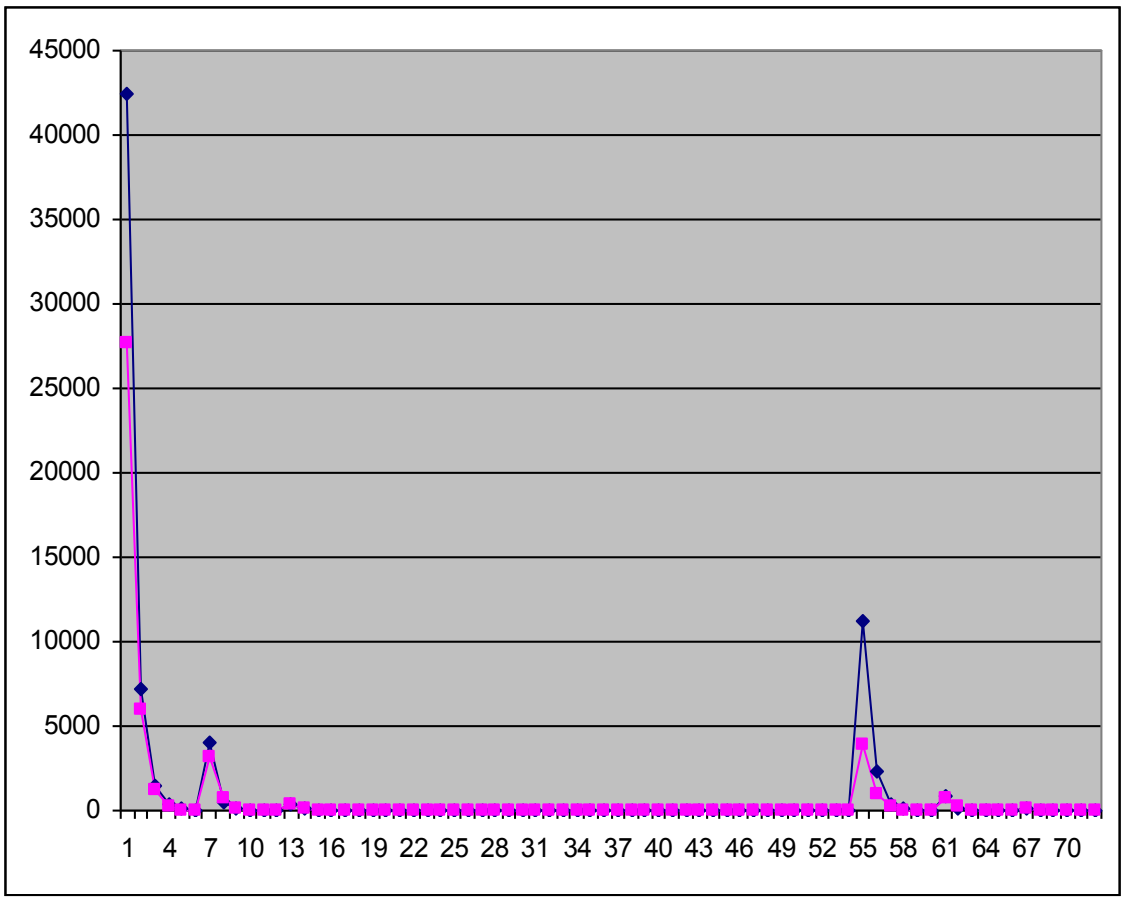


График 8. Соответствие расчетных значений КОЕ экспериментальным данным. Синий цвет – экспериментальные значения, сиреневый – расчетные значения КОЕ для культуры St.aureus

Таким образом, в ходе проведенных исследований было установлено, что выраженной фотодинамической активностью обладают концентрации «Фотодитазина» 0,05 мг/мл и 0,5 мг/мл. При увеличении плотности энергии лазерного излучения увеличивается эффективность АФДТ по отношению ко всем исследованным микроорганизмам. Вместе с тем при использовании лазера в диапазоне от 5,0 Дж/см^2 до 30 Дж/см^2 бактерицидный эффект был получен только в отношении культуры St.aureus. В отношении других исследованных микроорганизмов определялся лишь бактериостатический эффект различной степени выраженности. Данное обстоятельство свидетельствует о том, что применение только АФДТ с предложенными параметрами не может во всех случаях обеспечить полную гибель микроорганизмов, что указывает на целесообразность использования в ходе дальнейших экспериментальных исследований вариантов лечения

экспериментального эндофтальмита с помощью АФДТ в сочетании с антибиотиками.

В следующем разделе данной главы мы сочли целесообразным изучить влияние АФДТ на чувствительность к антибиотикам микроорганизма Ent. faecium, обладающего множественной антибиотикорезистентностью и проявившего одновременно достаточно выраженную чувствительность к АФДТ. Выбор этого патогенного микроорганизма обусловлен тем, что именно он будет использоваться нами в дальнейших главах диссертации для моделирования экспериментального эндофтальмита.

2.3. Влияние АФДТ на чувствительность Ent. faecium к антибиотикам

Для выполнения данного этапа экспериментальных исследований на стерильном физиологическом растворе готовились взвеси микроорганизма Ent. faecium, соответствующие стандарту мутности №10 ЕД, для чего было подготовлено 10 опытных и 5 контрольных чашек Петри с питательной средой АГВ (специальная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам).

В начале эксперимента при наливании среды в чашку Петри к ней добавляли раствор «Фотодитазина» в концентрации 5,0 мг/мл по 1,0 мл на каждую чашку (концентрация 0,5 мг/мл). Дальнейшие манипуляции проводили в затененном помещении без доступа прямого яркого света. Производился посев 1 мл микробной культуры на чашки Петри.

В качестве контроля использовали чашки со средой без добавления «Фотодитазина».

Затем на поверхность питательной среды во всех чашках укладывались 5 дисков, пропитанных различными антибиотиками: левомицетином, гентамицином, ампициллином, ципрофлоксацином и ванкомицином.

Через 5 минут поверхность питательной среды облучали лазером с плотностью энергии 30 Дж/см^2. После суточной инкубации в термостате

диаметр зоны задержки роста культуры вокруг диска в опытных экземплярах сравнивали с таковым в контроле.

Чувствительность культуры Ent. faecium к антибиотикам определяли по стандартным таблицам коррелятивной связи диаметра зоны задержки роста культуры вокруг диска и значений МПК антибиотиков,согласно методическим указаниям по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (МУК 4.2.1890-04) с использованием диско-диффузионного метода.

В соответствии с данными таблиц, для Ent. faecium результаты оценивали следующим образом: R – микроорганизм к данному антибиотику устойчив; S – умеренно устойчив; S* – чувствителен; G – высокочувствителен (таблица 4).

Таблица 4.

Чувствительность культуры Ent. faecium к антибиотикам при применении АФДТ

антибиотик	Контроль	Опыт
Левомицетин	R 10 мм	R 12 мм
Гентамицин	R 6 мм	R 6 мм
Ципрофлоксацин	S 16мм	S 16 мм
Ампициллин	R 10 мм	R 11 мм
Ванкомицин	S* 30 мм	S* 30 мм

Согласно данным таблицы 4, исследуемая культура Ent. faecium в контроле и опыте была устойчива к левомицетину, гентамицину и ампициллину, умеренно устойчива к ципрофлоксацину и чувствительна к ванкомицину.

В сравнении с контролем при воздействии на культуру АФДТ отмечалось общее уменьшение обсемененности поверхности питательной среды, уменьшение количества колоний в зонах, не прилежащих к дискам, пропитанным антибиотикам. Зоны задержки роста микроорганизма не отличались в контроле и опыте, в связи с чем возможно сделать вывод об отсутствии влияния АФДТ на чувствительность микроорганизма Ent. faecium к антибиотикам.

Таким образом, при совместном использовании АФДТ и растворов антибиотиков применение последних оправдано в терапевтических концентрациях. Учитывая, что при проведении АФДТ образуется большое количество активных радикалов, которые могут оказывать влияние не только на микроорганизмы, но и на структуру молекул антибиотика, на наш взгляд, оправдано не одновременное, а последовательное их применение.

Резюме

В результате проведенных экспериментов in vitro было выявлено, что:

- растворы ФС «Фотодитазин» обладают антимикробной активностью в отношении изученных патогенных микроорганизмов: Staphilococcus aureus, Enterococcus faecium, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans;

- антимикробный эффект АФДТ напрямую зависит от плотности энергии лазерного излучения;

- минимальное время «темновой» инкубации микроорганизмов с «Фотодитазином» в концентрации от 5,0 мг/мл до 0.005 мг/мл перед проведением АФДТ составляет не менее 5 минут;

- при проведении АФДТ наибольший антимикробный эффект в отношении микроорганизмов St. aureus, Ent. faecium, Ps. aeruginosa, C. albicans выявлен при использовании «Фотодитазина» в концентрации 0,5мг/мл и 0,05 мг/мл;

- АФДТ не влияет на чувствительность микроорганизма Ent. faecium к антибиотикам.

В то же время, следует отметить, что полученные в данной главе результаты экспериментальных исследований in vitro, не позволяют сделать окончательный выбор безопасных параметров плотности энергии лазерного излучения и концентрации «Фотодитазина» при проведении АФДТ, вследствие чего нами проведены экспериментальные исследования in vivo, результаты которых представлены в следующих разделах диссертации.

ГЛАВА 3

РАЗРАБОТКА АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ СИСТЕМЫ РАСЧЕТА ПАРАМЕТРОВ ИНТРАВИТРЕАЛЬНОЙ АНТИМИКРОБНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

(экспериментально-теоретические исследования)

В данной главе диссертационной работы представлены результаты экспериментальных (in vivo) и теоретических исследований, направленных на разработку автоматизированной системы расчета индивидуальных параметров интравитреальной АФДТ, а именно, мощности и экспозиции лазерного излучения в зависимости от требуемой плотности энергии.

Следует уточнить, что в соответствии с нуждами разрабатываемой методики интравитреальной АФДТ возникла необходимость исследования параметров облучаемой витреальной полости, на основании которых можно провести расчет длительности и мощности лазерного излучения, необходимых для достижения заданных параметров плотности энергии лазера.

Учитывая, что в современной доступной литературе нами не было найдено информации по данному вопросу, мы сочли целесообразным посвятить первый этап настоящих исследований изучению анатомических характеристик витреальной полости глаз подопытных животных.

3.1. Изучение анатомических характеристик витреальной полости глаз подопытных животных

Объектом исследования служили 14 глаз 7 здоровых кроликов породы шиншилла весом 2,5-3,5 кг в возрасте 6 месяцев.

На всех глазах подопытных животных проводили ультразвуковую биомикроскопию на аппарате «UBM-840» фирмы «Humphry» (USA), ультразвуковое В-сканирование на аппарате «Ultra scan Imaging System»

фирмы «Alcon surgical» (USA), томографию с использованием рентгеновского спирального компьютерного томографа «Ultra Z» фирмы «Marconi» (USA).

В результате были получены серии томографических изображений в трех перпендикулярных плоскостях с шагом 1.0 мм (рис. 1), а также данные ультразвуковых измерений параметров глаз подопытных животных (рис. 2-5). Полученные результаты представлены в сводной таблице 5.

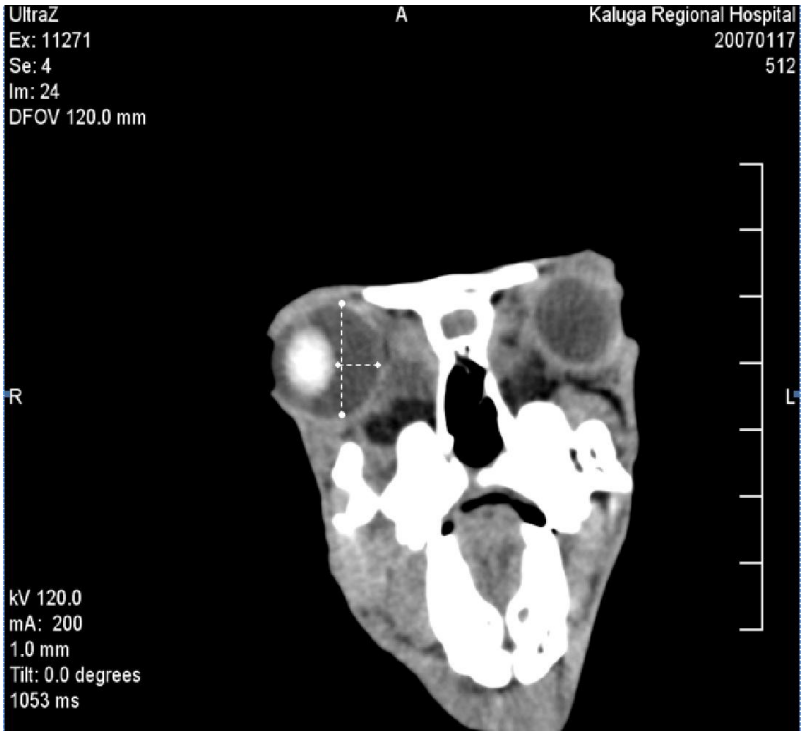


Рис. 1. Томограмма головы кролика

На рис. 1 калибровочными маркерами отмечены: расстояние от хрусталика до заднего полюса глаза – 6,5 мм, размер наибольшего вертикального поперечного сечения глаза – 16,3 мм.

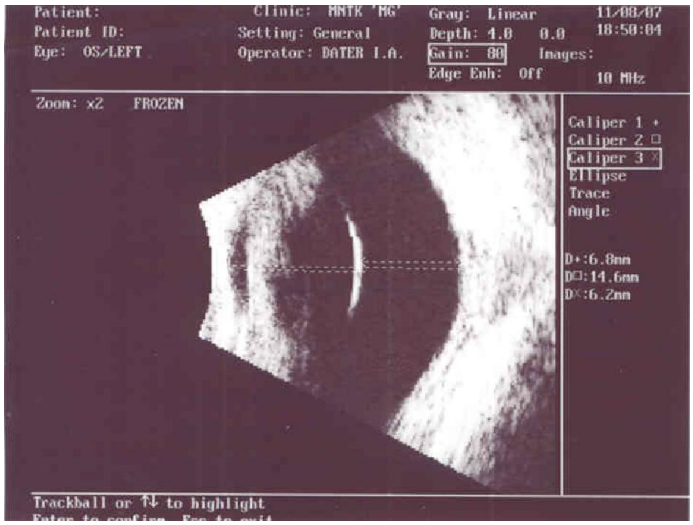


Рис. 2. Результаты ультразвукового В-сканирования глаза кролика

На рис. 2 калибровочными маркерами отмечены: расстояние переднезаднего размера глаза – 14,6 мм, толщина хрусталика – 6,8 мм, расстояние от хрусталика до заднего полюса глаза – 6,2 мм.

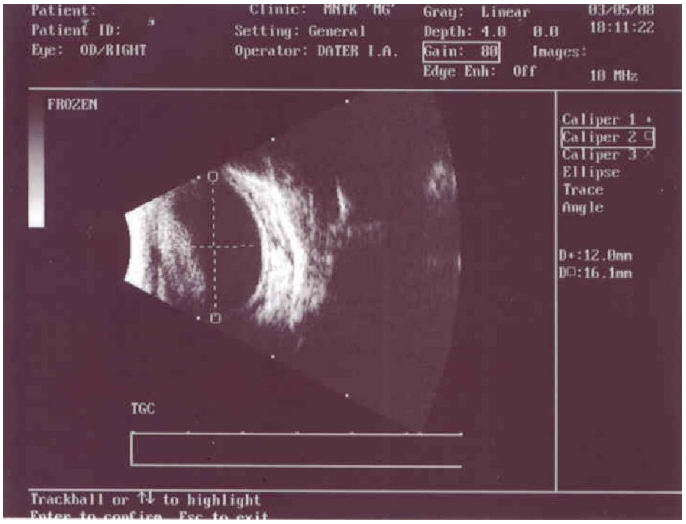


Рис. 3. Результаты ультразвукового В-сканирования глаза кролика

На рис. 3 калибровочными маркерами отмечен размер наибольшего поперечного сечения глаза – 16,1 мм.

Рис. 4. Результаты ультразвуковой биомикроскопии глаза кролика

На рисунке 4 калибровочными маркерами отмечен размер диаметра хрусталика – 10,51 мм.

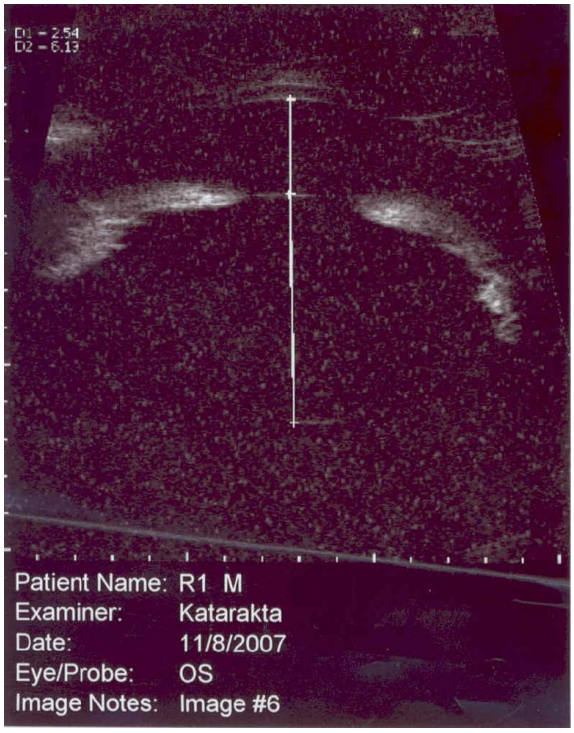


Рис. 5. Результаты ультразвуковой биомикроскопии глаза кролика

На рис. 5 калибровочными маркерами отмечены: размер передней камеры – 2,54 мм и толщина хрусталика – 6,13.

Таблица 5.

Результаты ультразвуковых измерений параметров глаз подопытных животных

№ п/п	Расстояние от заднего полюса хрусталика до заднего полюса глаза (мм)	Вертикальный размер наибольшего поперечного сечения витреальной полости (мм)	Горизонтальный размер наибольшего поперечного сечения витреальной полости (мм)	Толщина хрусталика (мм)	Поперечные размеры хрусталика (мм)
1	6,2	16,1	17,4	6,8	10,5
2	6	15,8	17,1	7	11
3	5,9	16,2	17,2	6,7	11,1
4	6,2	16,4	17,6	6,9	10,5
5	6,3	16,2	17	7	10,9
6	6	16,5	17,3	6,5	9,8
7	6,5	16,3	17,4	7,2	10,2
8	6,3	16	17,2	7,1	11,1
9	5,7	15,9	17,2	6,6	10,6
10	6,1	16,3	17,5	6,9	11
11	5,9	16,5	17,5	6,8	10,8
12	5,6	16	16,9	6,7	9,9
13	5,9	15,5	16,4	6,7	10,1
14	6	15,7	16,5	6,9	10,2
Среднее значение	6,043	16,63		6,84	10,55

В дальнейшем на основании полученных данных проводилось разработка математической модели витреальной полости подопытных животных.

3.2. Создание математической модели витреальной полости подопытных животных с использованием программы автоматизированного проектирования«Solid Works 2007»

На данном этапе работы была построена математическая модель витреальной полости, изменяющая свои пропорции в соответствии с

индивидуальными параметрами глаза. В основу модели были положены сечения глазного яблока, полученные в ходе томографии.

Построение модели осуществлялось в системе автоматизированного проектирования «SolidWorks 2007» [2, 47]. Модель строилась по габаритным размерам сечений глазного яблока, полученным в ходе томографии. Сечения представляли собой геометрическую фигуру, наиболее приближенную к эллипсу. Поэтому каждое сечение в модели представляло собой эллипс, а габаритные размеры являлись величинами, необходимыми для построения эллипса (рис. 6). Все сечения располагались на одной оси, то есть центры сечений лежали на одной прямой.

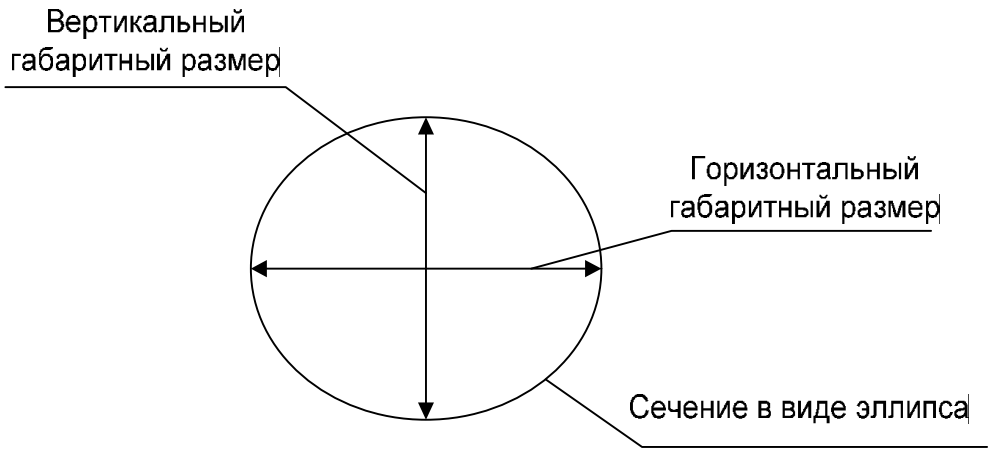


Рис. 6. Эллиптическое сечение

Алгоритм построения модели с использованием программы «SolidWorks 2007» (далее просто «SolidWorks») заключался в следующем. На первом этапе полученные эллиптические сечения, которые находились в параллельных плоскостях, были введены в программу с шагом в 1,0 мм. Затем был построен необходимый массив параллельных плоскостей (рис. 7).

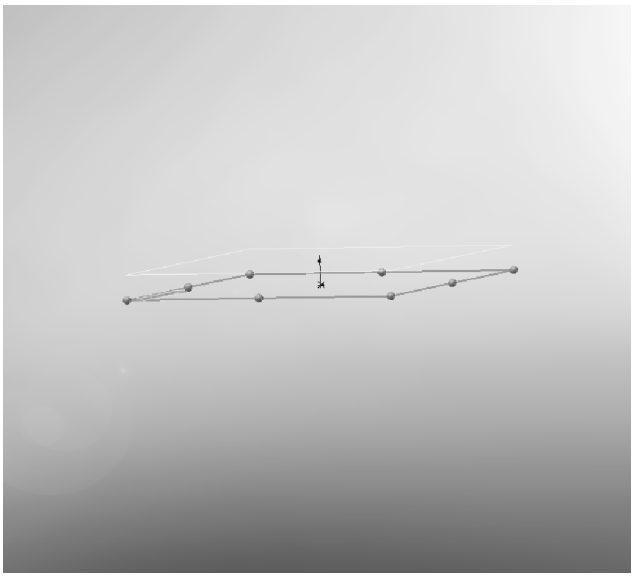


Рис. 7 Построение параллельных плоскостей

Вторым этапом проводилось построение эллиптических сечений. В каждой из уже созданных плоскостей был создан эскиз, в котором строился эллиптический контур. Выбрав правильное положение в трехмерном пространстве получаемой структуры, а также используя инструментарий привязок, центры всех эллиптических сечений располагали на одной оси. Таким образом, были получены эллиптические контуры в двух параллельных плоскостях с центрами на одной оси, и сформирован базовый «каркас» будущей трехмерной модели, представленный на рис. 8.

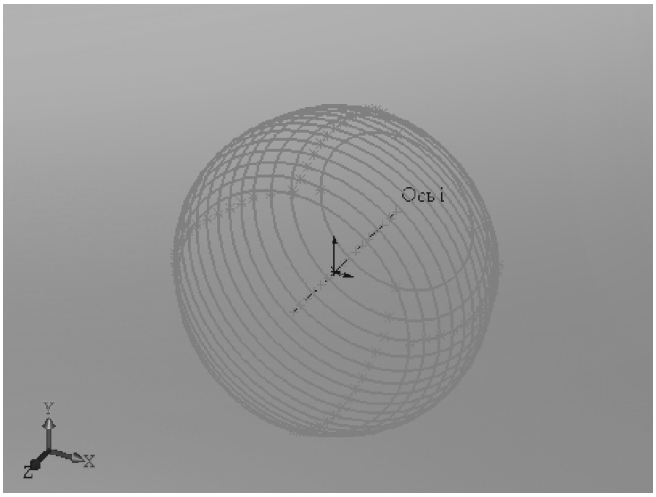


Рис.8. «Каркас» трехмерной модели витреальной полости

После того, как были построены все эллиптические контуры, используя специальные возможности программного пакета SolidWorks, была сформирована основа трехмерной модели витреальной полости. После дальнейшей обработки, в частности, введения в модель параметров хрусталика и цилиарного тела, полученных по данным В-сканирования и УБМ, была создана трехмерная модель витреальной полости глазного яблока кролика (рис. 9).

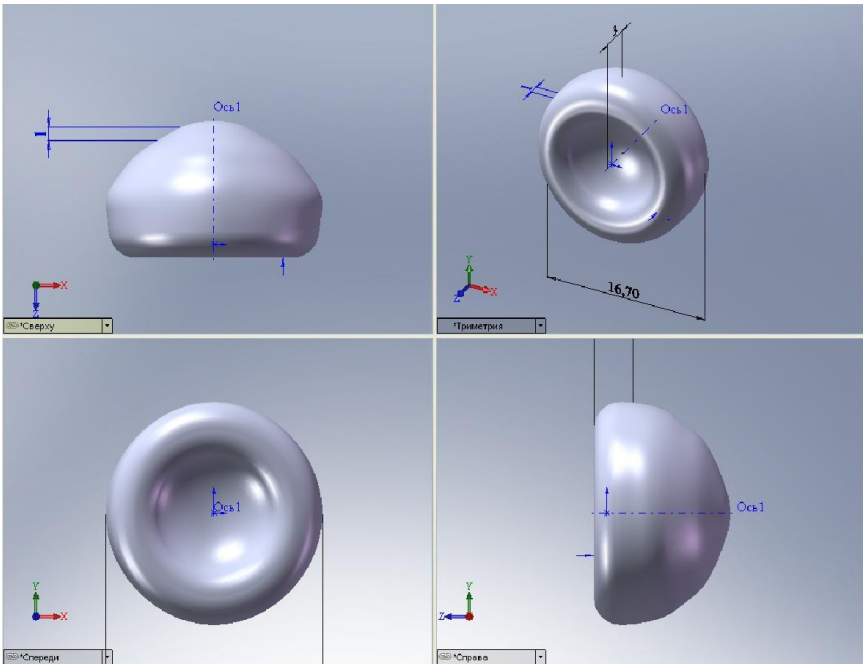


Рис. 9. «Трехмерная» модель витреальной полости глазного яблока кролика

В дальнейшем проводилась автоматизация полученной модели таким образом, чтобы при изменении всего лишь трех параметров: диаметра наибольшего сечения глаза, толщины хрусталика и расстояния от хрусталика до заднего полюса глаза, – она перестраивалась и изменялась в пропорциях в соответствии с приведенными ранее параметрами.

Для решения этой задачи был принят ряд допущений:

1) габаритные размеры каждого сечения глазного яблока прямо пропорциональны габаритным размерам наибольшего сечения;

2) расстояние между сечениями глазного яблока прямо пропорционально величине передне-заднего размера глазного яблока;

3) для расчетов учитывается половина толщины хрусталика;

4) диаметр хрусталика – постоянная величина, равная 10,5 мм (исходя из данных литературы и результатов УБМ) [6].

Среди всех используемых для построения сечений самым большим по размеру являлось сечение, находящееся в середине глазного яблока, поэтому габаритные размеры всех остальных сечений приводились в соотношение с размерами наибольшего сечения модели. Таким образом, был вычислен коэффициент отношения каждого габаритного размера сечений к размерам наибольшего сечения. После чего была введена прямая зависимость габаритных размеров сечений от размеров наибольшего сечения, что позволило, изменяя размеры, перестраивать модель.

Таким образом, используя программу автоматического проектирования «Solid Works 2007», нами была получена трехмерная модель витреальной полости глаза кролика, которая позволила визуально оценить свою адекватность по отношению к реальной анатомии глаза. Использование специальных возможностей программы предоставляло возможность определять индивидуальные параметры витреальной полости: объем, площадь полной и боковой поверхностей – в каждом конкретном случае. В то же время, применение программного пакета «Solid Works» для проведения расчетов параметров АФДТ было связано с рядом трудностей. К ним относились: громоздкость программы, требовательность к системным ресурсам компьютера, а также необходимость соблюдения лицензионных соглашений. Как следствие, на следующем этапе экспериментальных исследований нами была разработана собственная система расчета размеров витреальной полости и параметров интравитреального лазерного облучения при АФДТ.

3.3. Разработка автоматизированной системы расчета параметров интравитреальной АФДТ

Разработка проводилась путем аппроксимации сечений и фигур, полученных на предшествующих этапах исследования. Полный объем модели составляла сумма объемов эллиптических усеченных конусов, из которых состояла вся модель. Сечения являлись основаниями этих конусов, поэтому формула подсчета объема модели (1) имела вид:

$$V = \Sigma \frac{\pi \cdot h}{3 \cdot (a_1 - a_2)} \cdot \left(a_1^2 \cdot b_1 - a_2^2 \cdot b_2\right), \qquad (1)$$

где a_1 и b_1 – половины горизонтального и вертикального габаритных размеров 1-го основания, соответственно; a_2 и b_2 – половины горизонтального и вертикального габаритных размеров 2-го основания, соответственно; h – расстояние между сечениями.

Площадь боковой поверхности витреальной полости подсчитывалась как сумма боковых площадей эллиптических усеченных конусов, из которых состоит вся модель.

Сечения являлись основаниями этих конусов, поэтому формула подсчета площади (2) имела следующий вид :

$$S_{бок} = \Sigma \pi \sqrt{h^2 + \left(\frac{a_1 + b_1}{2} - \frac{a_2 + b_2}{2}\right)^2} \cdot \left(\frac{a_1 + b_1}{2} + \frac{a_2 + b_2}{2}\right), \qquad (2)$$

где a_1 и b_1 – половины горизонтального и вертикального габаритных размеров 1-го основания, соответственно; a_2 и b_2 – половины горизонтального и вертикального габаритных размеров 2-го основания, соответственно; h – расстояние между сечениями [14,50].

При разработке алгоритма системы расчета параметров ФДТ была использована формула расчета плотности энергии лазерного излучения:

$$P=Wt/S,$$

где P – плотность энергии лазерного излучения; W – мощность лазерного излучения на конце световода; t – время облучения (экспозиция); S – площадь облучаемой поверхности.

Программа разрабатывалась в среде программирования «Microsoft Visual C# 2005» [1, 44].

Разработанная программа (рис. 10) выполняла следующие функции:

- при введении в соответствующие поля данных ультразвукового B-сканирования, а именно, расстояния от задней поверхности хрусталика до заднего полюса глаза, поперечного размера витреальной полости и толщины хрусталика, автоматически проводился расчет площади поверхности витреальной полости глаза;
- на основании полученных данных проводился расчет мощности лазерного излучения и времени экспозиции лазера, необходимых для получения заданной плотности энергии лазерного излучения при проведении интравитреальной ФДТ;
- представление результатов анализа в виде таблицы с возможностью сохранения ее структуры и всей находящейся в ней информации в любом из трех форматов файлов: *.html, *.doc, *.xls.

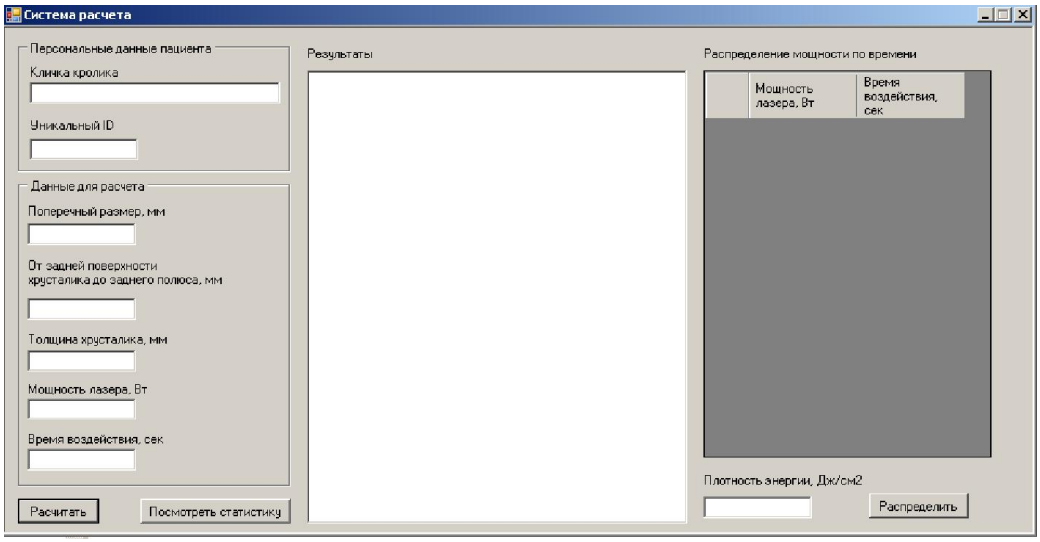


Рис. 10. Интерфейс программы для расчета параметров витреальной полости глаза и параметров АФДТ

На заключительном этапе был произведен расчет параметров лазерного излучения с использованием усредненных данных анатомических

характеристик глаз подопытных животных, представленных выше в табл. 5. В расчете энергия лазерного излучения составляла 0,15 Вт. Выбор постоянного параметра энергии лазерного излучения, равным 0,15 Вт, объясняется проведенными ранее исследованиями по воздействию рассеянного лазерного излучения на структуры глаза (Белый Ю.А. с соавт., 2005), в результате которых было установлено, что мощность 150 мВт не оказывает повреждающего воздействия на ткани глаза [5].

В табл. 6 представлена зависимость времени воздействия лазерного излучения от площади облучаемой поверхности и плотности энергии лазерного излучения

Таблица 6.

Зависимость времени воздействия лазерного излучения от площади облучаемой поверхности и плотности энергии лазерного излучения

Плотность энергии лазерного излучения (Дж/см^2)	Время воздействия лазером (сек)	Площадь облучаемой поверхности (мм^2/объем мм^3)
5	231,5	6,95/1,025
10	463,1	6,95/1,025
15	694,7	6,95/1,025
20	926,3	6,95/1,025
25	1157,8	6,95/1,025
30	1389,4	6,95/1,025

Таким образом, в ходе проведенных расчетов установлено, что площадь облучаемой поверхности составляет 6,95 мм^2, а объем витреальной полости 1,025 мм^3.

При этом из представленных данных следует, что для получения плотности энергии 20 Дж/см^2 при мощности лазера 0,15 Вт время воздействия составляет более 15 минут (926 сек). Однако, с нашей точки зрения, столь длительное облучение в ходе интравитреальной АФДТ может неблагоприятно отразиться на состоянии тканей и структур глаза.

Поэтому в дальнейших экспериментальных исследованиях in vivo, представленных в последующих главах диссертации, мы сочли нецелесообразным применять экспозицию, превышавшую 15 минут, а использовали плотность энергии лазера в диапазоне 5-15 Дж/см^2 при мощности лазерного излучения 0,15 Вт и времени воздействия 231-695 сек.

Резюме

Таким образом, в результате исследований, описанных в данной главе диссертации, была разработана трехмерная модель витреальной полости, на основании которой была создана автоматизированная система расчета параметров интравитреальной АФДТ. Полученная система позволила с высокой точностью рассчитать характеристики лазерного излучения (мощность и экспозицию) и определить его оптимальные временные параметры.

ГЛАВА 4

СОСТОЯНИЕ ВНУТРИГЛАЗНЫХ СТРУКТУР ПОСЛЕ ИНТРАВИТРЕАЛЬНОЙ АФДТ

(экспериментальные исследования in vivo)

В ходе экспериментальных (in vitro) и теоретических исследований, представленных в предыдущих главах настоящей диссертации, было установлено, что наибольший антимикробный эффект АФДТ обеспечивается при использовании «Фотодитазина» в концентрациях 0,5 мг/мл и 0,05 мг/мл при времени «темновой» инкубации микроорганизмов с «Фотодитазином» в данных концентрациях в течение 5 минут перед проведением АФДТ. Мощность лазерного излучения в этих случаях, являясь постоянной величиной [5], составляет 0,15 Вт, плотность энергии лазерного излучения находится в диапазоне 5-15 Дж/см^2, а время лазерного воздействия определяется плотностью энергии лазерного излучения, составляя, согласно данным таблицы 6, для 5 Дж/см^2, 10 Дж/см^2 и 15 Дж/см^2 232 секунды, 463 секунды и 696 секунд, соответственно.

В данной главе представлены результаты экспериментальных исследований in vivo, направленных на выбор из вышеприведенных концентраций «Фотодитазина» и значений плотности энергии лазерного излучения наиболее безопасных и эффективных параметров АФДТ с точки зрения состояния внутриглазных структур подопытных животных.

Учитывая, что длинноволновый максимум поглощения «Фотодитазина» составляет 662 нм, в ходе исследований использовали диодный лазер «АЛОД-01» фирмы «АЛКОМ – Медика» (Санкт-Петербург) с длиной волны 662 нм. Лазерное облучение проводили с помощью кварцевых световодов диаметром 0,4-0,6 мм с диффузором на конце. Мощность лазерного излучения на выходе световода измеряли на приборе ИИМ-1П фирмы ООО «Полироник» (Россия).

4.1. Влияние плотности энергии лазерного излучения на состояние внутриглазных структур

Исследование проводилось на 40 глазах 20 кроликов породы шиншилла, разделенных на 3 опытные и 1 контрольную группы по 10 глаз (5 животных) в каждой группе.

В первой опытной группе использовали плотность энергии лазерного излучения 5 Дж/см^2 , во второй – 10,0 Дж/см^2 , в третьей – 15 Дж/см^2 .

На глазах контрольных животных проводилось введение световода в витреальную полость без облучения.

Методика вмешательства заключалась в следующем. После местной анестезии в виде 2-х кратного закапывания в конъюнктивальную полость 1% раствора инокаина и ретробульбарной инъекции 2,0 мл 4% раствора лидокаина под контролем операционного микроскопа фирмы «Opton» (Германия) в 2 мм от лимба формировалось склеротомическое отверстие. Затем в витреальную полость вводился кварцевый световод с диффузором на конце, после чего в опытных группах проводилось облучение с плотностью энергии лазерного излучения 5, 10 и 15 Дж/см^2, соответственно (рис. 11-13).

В конце вмешательства на склеротомическое отверстие накладывался узловой шов 8-0.

Рис.11. Формирование склеротомического отверстия в 2,0 мм от лимба

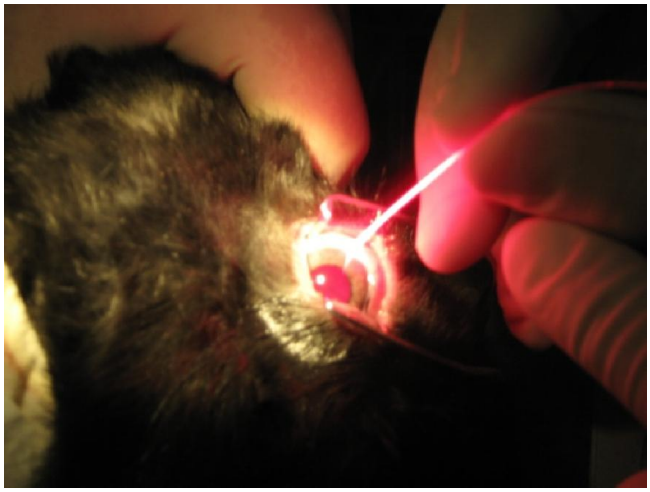


Рис. 12. Облучение витреальной полости глаз подопытных животных

Рис. 13. Кварцевый световод с диффузором
для интравитреального облучения

Через 1, 3, 7, 30 суток и 3 месяца после вмешательства на всех глазах экспериментальных животных проводили биомикроскопию с использованием щелевой лампы фирмы "Opton" (Германия); непрямую офтальмоскопию, выполнявшуюся при помощи бинокулярного офтальмоскопа фирмы "Heine" (Германия); электроретинографию (ЭРГ) с использованием электродиагностической системы "Tomey" (Япония). Максимальный ответ в темно-адаптированном глазу (10 мин) получали при использовании стандартного стимула Ganzfeld для генерации вспышки белого цвета с интенсивностью 1,8 cd/m^2, с частотой 0,1 Гц. В качестве

активного электрода использовался серебряный электрод-петля и кожные иглы (референтный и заземляющий электроды), располагающиеся соответственно на правом и левом ушах кроликов. За норму были приняты следующие показатели ЭРГ: амплитуда а-волны – 51±5,6 мкВ, время – 15±1,5 мс и амплитуда b-волны – 125±15,1 мкВ, время – 36±1,7 мс [63].

По истечении необходимого срока после биомикроскопии, офтальмоскопии и ЭРГ животных выводили из опыта путем воздушной эмболии, глазные яблоки энуклеировали и подвергали морфологическому исследованию. Для этого материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, промывали проточной водой, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (70^o, 80^o, 90^o, 96^o) и заливали в парафин. Глаза кроликов маркировались согласно эксперименту, выполнялись серии гистологических срезов толщиной 5-8 мкм с применением окраски гематоксилин-эозином. Препараты изучали под микроскопом фирмы «Leica DM LB2» при 50х, 100х, 200х, 400х кратном увеличении с последующим фотографированием.

4.1.1. Результаты биомикроскопии, офтальмоскопии и ЭРГ

В первые сутки на всех опытных и контрольных глазах подопытных животных наблюдалась смешанная инъекция сосудов глазного яблока в месте склеротомии, а также отек конъюнктивы, полностью проходившие к 3-7 дню. Конъюнктивальный шов был чистый.

На протяжении всего периода наблюдения роговица оставалась прозрачной, передняя камера равномерной, средней глубины, влага передней камеры прозрачной, сохранялась живая реакция зрачка на свет, а также обычные цвет и структура радужной оболочки. Хрусталик оставался прозрачным. Рефлекс глазного дна был розовым. Диск зрительного нерва, сосуды сетчатки и хориоидеи, а также собственно внутренние оболочки заднего отдела глаза были без патологических изменений.

По результатам ЭРГ в глазах подопытных животных первой (плотность энергии 5 Дж/см^2) и второй (плотность энергии 10 Дж/см^2) опытных групп амплитудные характеристики волн "a" и "b" ЭРГ во все сроки послеоперационного наблюдения оставались без изменений и не отличались от таковых до операции и контроля. В глазах третьей опытной группы (плотность энергии 15 Дж/см^2) на 10 сутки выявлялось умеренное снижение b-волны сетчатки до 62-58 мкВ, сохранявшееся в течение всего срока наблюдения.

4.1.2. Результаты световой микроскопии

Во всех опытных глазах независимо от использованной плотности интравитреального облучения в течение всего срока наблюдения все внутриглазные структуры кроме сетчатки и хориоидеи оставались без видимых морфологических изменений.

В зоне склеротомии в области плоской части цилиарного тела наблюдали раневой канал. Рубцовые изменения в отдаленные сроки носили локальный характер, не вызывая выраженных изменений в близлежащих структурах глаза (рис. 14).

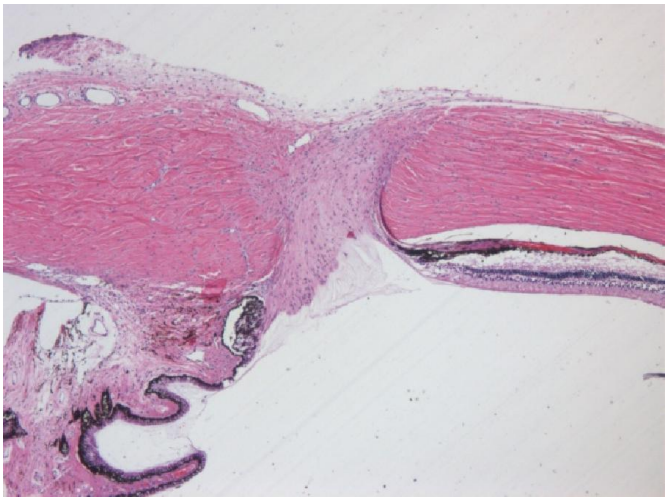


Рис. 14. Область рубца в зоне склеротомии через 1 месяц после ИВО при плотности энергии 10 Дж/см^2. Ув. х50

На 1 сутки наблюдения в сосудах хориоидеи всех опытных и контрольных глаз были зафиксированы застой и полнокровие, сохранявшиеся на протяжении 3 дней с полным исчезновением к 10 суткам эксперимента, что, по-видимому, было связано с реакцией глазного яблока на оперативное витреоретинальное вмешательство (рис. 15).

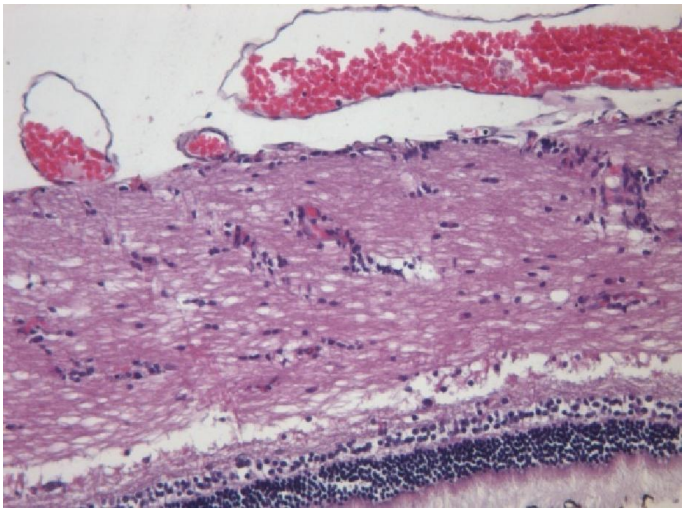


Рис. 15. Перипапиллярная зона хориоидеи кролика на 3 сутки после ИВО при плотности энергии лазерного излучения 15 Дж/см^2. Ув. х200

В структуре сетчатки на 1 сутки эксперимента выраженных изменений выявлено не было. Обращал на себя внимание лишь незначительный отек ее внутренних слоев (рис. 16).

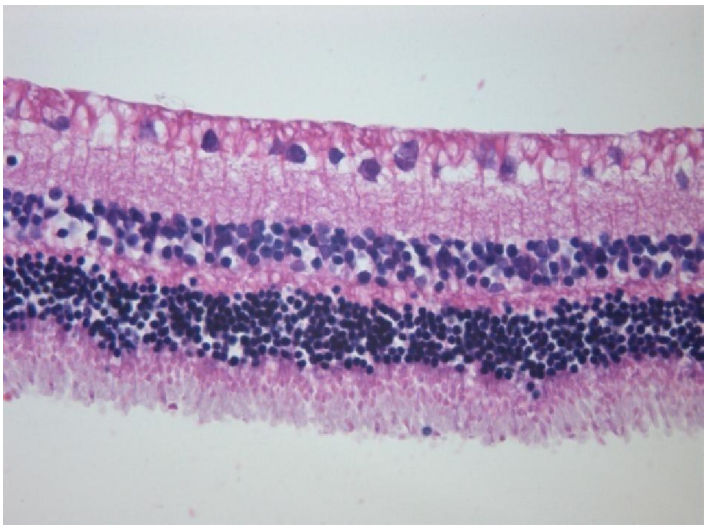


Рис. 16. Сетчатка кролика на 1 сутки после ИВО. Ув. х400

По истечении 3 суток изменения в сетчатке глаз 3 опытной группы (плотность энергии 15 Дж/см^2) нарастали. Во внутренних слоях наблюдалось частичное разрушение ядер оптикоганглионаров и уплотнение с гомогенизацией структур различной выраженности, носящее вид поверхностной коагуляции (рис. 17 а, б). На глазах животных других групп изменения в сетчатке отсутствовали.

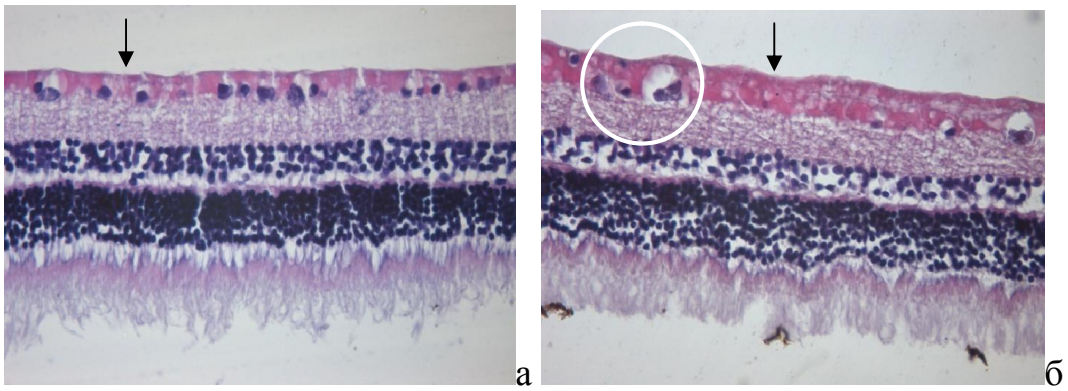
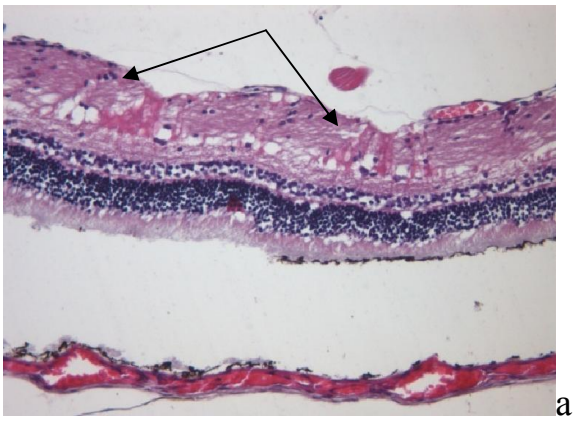

а б

Рис. 17 а, б. Сетчатка кролика на 3 сутки после ИВО при плотности энергии лазерного излучения 15 Дж/см^2. Уплотнение внутренних слоев с гомогенизацией структур (указано стрелками), частичное разрушение ядер оптикоганглионаров (окружность). Ув. х400

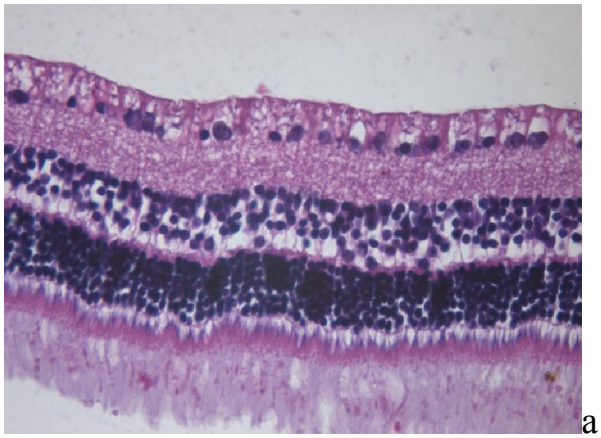
Перипапиллярно в той зоне, где слой нервных волокон был наиболее выражен, уплотнения носили фрагментарный характер (рис. 18 а, б, – указаны стрелками). В этих участках наблюдали деструкцию нервных волокон и мелких сосудов, что вблизи диска зрительного нерва приводило к венозному застою.


а


б

Рис. 18 а, б. Сетчатка кролика на 3 сутки после ИВО при плотности энергии лазерного излучения 15 Дж/см^2. Деструкция нервных волокон и мелких сосудов (указано стрелками). Ув. х400

На глазах 1 и 2 опытной групп (энергия лазерного излучения 5 Дж/см^2 и 10 Дж/см^2, соответственно), а также в контроле сетчатка оставалась интактной на протяжении всего эксперимента, что наглядно проявляется на сроках 3 суток и 1 месяц (рис. 19 а, б).


а

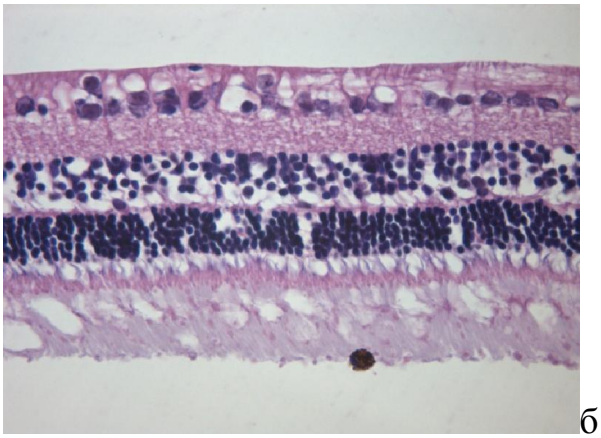
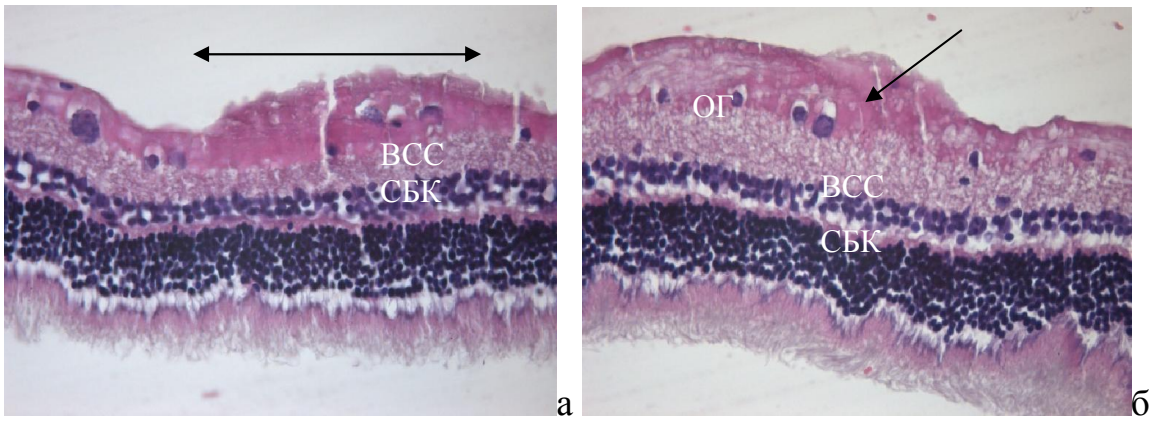

б

Рис. 19 а, б. Сетчатка кролика на 3 сутки (а) и 1 месяц (б) после ИВО при плотности энергии 10 Дж/см^2. Ув. х400

Через 10 суток наблюдения в третьей опытной группе (энергия лазерного излучения 15 Дж/см^2) было выявлено наличие очагов более выраженной деструкции внутренней поверхности сетчатки. Однако они не проникали вглубь, оставляя сохранными отдельные оптикоганглионары, а также внутренний сетчатый и слой биполярных клеток (рис. 20 а, б).



а б

Рис. 20 а, б. Сетчатка кролика на 10 сутки после ИВО при плотности энергии лазерного излучения 15 Дж/см^2. Очаги поверхностной деструкции сетчатки с сохранением отдельных оптикоганглионаров (ОГ), внутреннего сетчатого слоя (ВСС) и слоя биполярных клеток (СБК). Ув. х400

Поверхностная деструкция привела к разрушению стенок мелких сосудов сетчатки и их облитерации, что вызывало усугубление венозного застоя, полнокровие сосудов, расширение их просветов, сладжирование крови и активизацию тромбообразования (рис. 21 а, б).

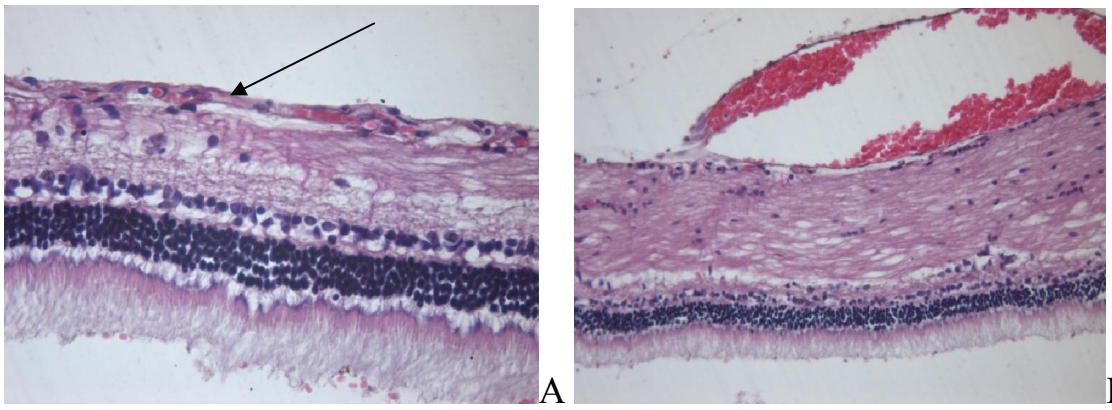

А Б

Рис. 21 а, б. Сетчатка кролика на 10 сутки после ИВО при плотности энергии лазерного излучения 15 Дж/см^2. Облитерация просвета мелких сосудов (стрелка). Эктазия притока ЦВС с пристеночным тромбообразованием. Ув. а – х400, б – х200

Таким образом, интравитреальное облучение сетчатки с плотностью энергии лазерного излучения 15 Дж/см^2 уже на ранних сроках после вмешательства приводило к поверхностным деструктивным изменениям в слое оптикоганглионаров центральных отделов сетчатки по типу коагуляции

с аналогичными очагами в перипапиллярной зоне и наличием деструкции мелких сосудов и явлений венозного застоя.

В сроки 1 и 3 месяца в глазах контроля, а также 1 и 2 опытных групп (плотность энергии 5 Дж/см^2 и 10 Дж/см^2, соответственно) морфологических изменений не наблюдалось.

Что касается глаз 3 опытной группы (плотность энергии 15 Дж/см^2), то в них структура сетчатки в отдаленные сроки наблюдения была значительно изменена с формированием плотного сращения с хориоидеей. Эти изменения были обусловлены практически полным разрушением ядерных слоев сетчатки и их дискомплексацией. Пигментный эпителий был подвержен трансформации с активным участием в пролиферативном процессе, как на внутренней поверхности сетчатки, так и субретинально (рис. 22).

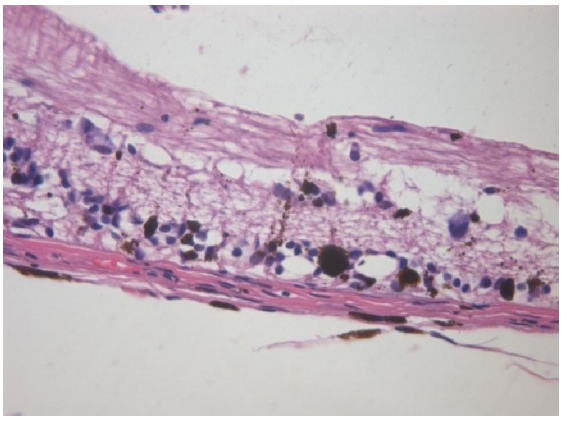


Рис. 22. Сетчатка кролика через 3 месяца после ИВО при плотности энергии 15 Дж/см^2. Ув. х400

Таким образом, в результате лазерного облучения сетчатки при плотности энергии 5 Дж/см^2 и 10 Дж/см^2 был выявлен слабый дозозависимый эффект, в то время как при использовании плотности энергии лазерного излучения 15 Дж/см^2 отмечался выраженный дозозависимый эффект, вследствие чего данная плотность энергии не использовалась при проведении дальнейших исследований.

4.2. Влияние интравитреальной АФДТ с «Фотодитазином» в различных концентрациях на состояние внутриглазных структур

Данный этап экспериментальных исследований был выполнен на 36 глазах 18 кроликов. Животные были разделены на 2 опытные и 1 контрольную группу по 12 глаз (6 кроликов) в каждой группе.

В первой опытной группе проводили витрэктомию и интравитреальную АФДТ с «Фотодитазином» в концентрации 0,05 мг/мл, во второй опытной группе – витрэктомию и интравитреальную АФДТ с «Фотодитазином» в концентрации 0,5 мг/мл.

Во всех случаях плотность энергии лазерного излучения составляла 10 Дж/см^2, выбранная, исходя из того, что при всех равных условиях именно она обладает наиболее значительным антимикробным эффектом, подтвержденным результатами экспериментальных исследований in vitro, представленными в главе 2.

В контрольных глазах проводилась витрэктомия без интравитреальной АФДТ.

Следует уточнить, что за 4-6 недель до начала эксперимента на всех глазах подопытных животных была выполнена факоэмульсификация по стандартной методике, принятой в ФГУ «МНТК «МГ» для исключения последующего развития катаракты.

В первые часы после проведения факоэмульсификации, а иногда и в конце операции в передней камере всех глаз выявлялась экссудативная реакция в виде нитей фибрина, проходившая самостоятельно к 7-10 дню после операции. Всем животным в послеоперационном периоде в течение 2 недель 3 раза в день в конъюнктивальную полость закапывали растворы тобрадекса и мидриацила. Однако, несмотря на проведенное лечение, во всех глазах отмечалось формирование задних синехий между радужкой и остатками задней капсулы хрусталика.

Через месяц после клинического успокоения глаз проводился основной этап экспериментальных исследований. Всем животным до операции в

конъюнктивальную полость закапывали 1% раствор атропина и ретробульбарно вводили 1 мл 2% новокаина. Операцию проводили под внутривенным наркозом (10% гексенал из расчета 10-15 мг/кг веса животного). Веки фиксировали блефаростатом, глазное яблоко – фиксационным пинцетом, захватывающим лимбальную конъюнктиву. Под контролем операционного микроскопа, используя одноразовые инструменты, производили 3 склеротомии размером 0,5 мм. В одну из склеротомий вводили ирригационную систему 25G. Две другие склеротомии использовались для введения эндоосветителя и наконечника витреотома. В качестве ирригационного раствора использовался раствор BSS. Производилась субтотальная витрэктомия по стандартной методике, принятой в ФГУ «МНТК «МГ» с максимально полным удалением стекловидного тела, разделением задних синехий и удалением остатков капсулы хрусталика. После выполнения обмена вода/воздух в переднюю камеру для защиты эндотелия роговицы вводили вискоэластик, после чего в витреальную полость вводился раствор «Фотодитазина» в соответствующей концентрации до уровня склеротомий. Затем глаз герметизировали на 5 минут. По истечению этого срока «Фотодитазин» полностью удаляли из глаза, проводя повторный обмен вода/газ. Затем через склеротомическое отверстие в витреальную полость вводили световод и проводили интравитреальное лазерное облучение. В завершении операции на разрезы накладывали узловые швы 8-0. В контроле проводилась витрэктомия, удаление остатков задней капсулы хрусталика без последующего введения ФС и лазерного облучения.

Интраоперационных осложнений не было отмечено ни в одном случае.

В сроки 1, 3, 7, 30 суток, 3 и 6 месяцев послеоперационного периода всем экспериментальным животным проводили биомикроскопию с использованием щелевой лампы фирмы "Opton" (Германия); непрямую офтальмоскопию при помощи бинокулярного офтальмоскопа фирмы "Heine" (Германия); ЭРГ на электродиагностической системе "Tomey" (Япония). За

нормальные показатели ЭРГ принимались значения волны “а”: 15±1,5 мс, 51±5,6 мкВ; волны “б”: 36±1,7 мс, 125±15,1 мкВ [63].

4.2.1. Результаты биомикроскопии, офтальмоскопии, ЭРГ

В глазах контроля и 1 опытной группы (концентрация «Фотодитазина 0,05 мг/мл, плотность энергии 10 Дж/см^2) с первых суток наблюдалась смешанная инъекция сосудов глазного яблока и отек конъюнктивы в месте склеротомий, самостоятельно проходившие к 3-7 дню. На протяжении всего периода наблюдения до 6 месяцев роговица оставалась прозрачной, передняя камера была равномерной, глубокой, влага передней камеры прозрачной, сохранялась реакция зрачка на свет, а также обычные цвет и структура радужной оболочки. Рефлекс глазного дна был розовым. Диск зрительного нерва, сосуды сетчатки и хориоидеи, а также собственно внутренние оболочки заднего отдела глаза были без патологических изменений.

По данным ЭРГ амплитудные характеристики волн "a" и "b" во все сроки послеоперационного наблюдения оставались без изменений и не отличались от таковых до операции (рис. 23, 24, 25).

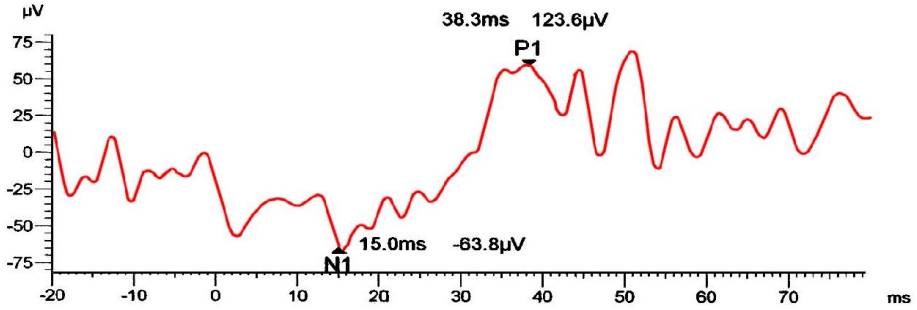


Рис. 23. ЭРГ глаза кролика контрольной группы.
Волна “а”: 15,0 мс, 63,8 мкВ; волна “б”: 38,3 мс, 123,6 мкВ

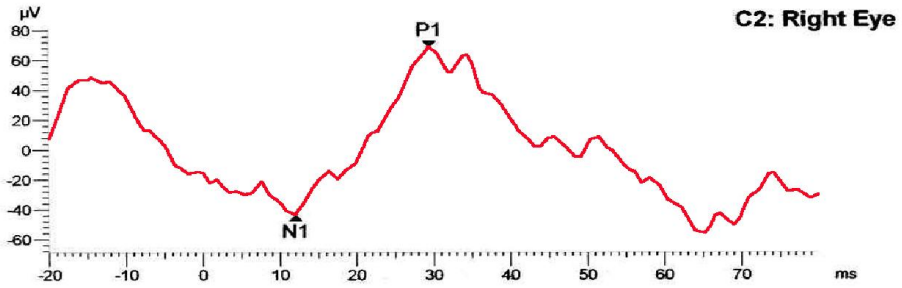


Рис. 24. ЭРГ глаза кролика 1 опытной группы при сроке наблюдения 3 дня. Волна “а”: 12,0 мс, 43,9 мкВ; волна“б”: 29,5 мс, 113,3 мкВ

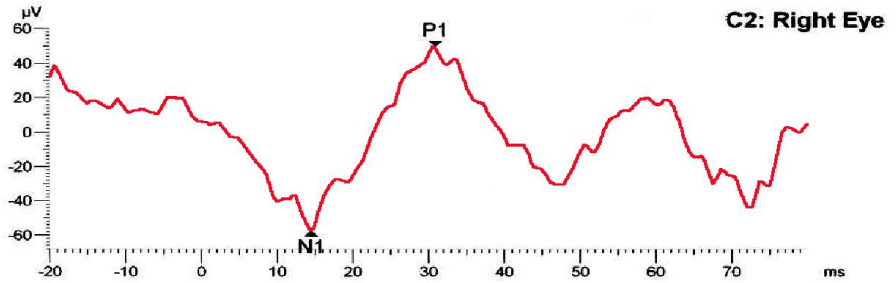


Рис. 25. ЭРГ глаза кролика 1 опытной группы при сроке наблюдения 3-6 месяцев. Волна “а”: 14,5 мс, 57,4 мкВ; волна“б”: 31,0 мс, 107,6 мкВ

Во второй опытной группе (концентрация «Фотодитазина» 0,5мг/мл, плотность энергии 10 Дж/см^2) на 1 сутки определялась смешанная инъекция сосудов глазного яблока и отек конъюнктивы. Роговица была прозрачной, выявлялись опалесценция влаги передней камеры, отечность радужки со стушеванным рисунком, вялая реакция зрачка на свет, экссудативная реакция в виде нитей фибрина в просвете зрачка. На 3 сутки было зафиксировано умеренное раздражение глаз, отсутствие отека конъюнктивы, уменьшение опалесценции влаги передней камеры, легкая стушеванность рисунка радужной оболочки, розовый рефлекс глазного дна. На 7 сутки все глаза 2 опытной группы были спокойными, роговица и влага передней камеры прозрачными, радужка с четким рисунком, рефлекс глазного дна розовым. На 14 сутки и во все последующие сроки наблюдения до 6 месяцев в переднем отрезке отсутствовали признаки воспаления, на глазном дне

формировался обширный очаг с диффузным перераспределением пигмента. Изменений со стороны зрительного нерва не отмечалось.

Согласно данным ЭРГ, снижение амплитудных характеристик волн "a" и "b" наблюдалось сразу после операции во всех случаях (рис. 26, 27). Через 3-6 месяцев после оперативного вмешательства сохранялись умеренно выраженные электроретинографические признаки снижения функции наружных слоев сетчатки. Восстановления параметров общей ЭРГ до исходных значений в них не произошло. Наблюдалось прогрессивное падение волны "б" ЭРГ.

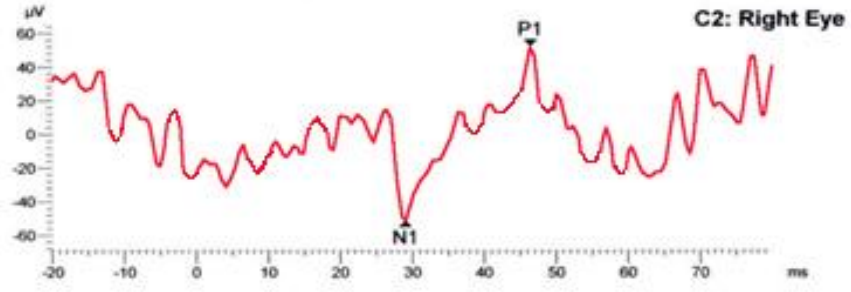


Рис. 26. ЭРГ глаза кролика 2 опытной группы при сроке наблюдения 3 дня. Волна “а”: 29,0 мс, 51,5 мкВ; волна “б”: 46,5 мс, 104,6 мкВ

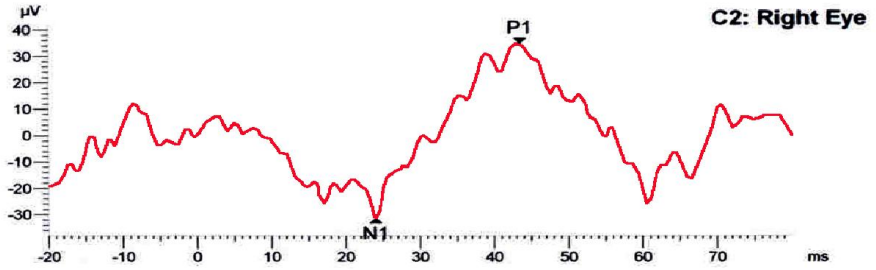


Рис. 27. ЭРГ глаза кролика 2 опытной группы при сроке наблюдения 3-6 месяцев. Волна “а”: 24,0 мс, 31,3 мкВ; волна “б”: 43,5 мс, 66,5 мкВ

Таким образом, по данным биомикроскопии и офтальмоскопии, послеоперационная реакция на глазах 1 опытной группы (концентрация «Фотодитазина» 0,05 мг/мл) не отличалась от таковой в контроле. Во все сроки наблюдения патологических изменений не наблюдалось. В то же время

интравитреальное проведение АФДТ с «Фотодитазином» в концентрации 0,5 мг/мл (2 опытная группа) вызывало у экспериментальных животных развитие умеренной воспалительной реакции и повреждение сетчатки, что проявлялось в первые сутки после операции наличием экссудативных явлений в передней камере, эктазией сосудов радужки. К 14-30 суткам после операции происходило перераспределение пигмента в заднем полюсе глаза.

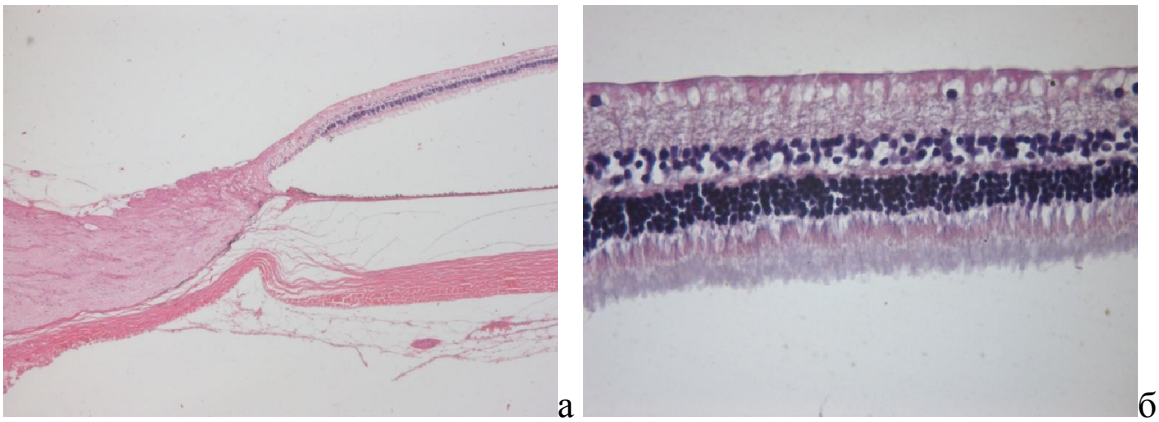
Что касается показателей ЭРГ, то в случаях применения раствора «Фотодитазина» в концентрации 0,05 мг/мл и плотности энергии лазерного излучения 10 Дж/см^2 было отмечено отсутствие электроретинографических изменений во все сроки наблюдения, что свидетельствовало о том, что данные параметры АФДТ не обладают ретинальной токсичностью.

Использование «Фотодитазина» в концентрации 0,5 мг/мл при той же плотности энергии лазерного излучения 10 Дж/см^2 вызывало необратимые токсические изменения со стороны сетчатки, не исчезавшие к концу срока наблюдения, что подтверждало поражение сетчатки.

4.2.2. Результаты световой микроскопии

В глазах контроля и 1 опытной группы (концентрация Фотодитазина 0,05 мг/мл, плотность энергии 10 Дж/см^2) в течение всего срока послеоперационного наблюдения до 6 месяцев роговица сохраняла нормальную структуру, целостность и обычное строение всех слоев без каких-либо патологических изменений. Радужка и цилиарное тело также обладали правильной структурой с обычным клеточным составом, нормальным калибром сосудов без признаков дистрофии, токсического повреждения и воспалительной реакции. Морфологических изменений со стороны оболочек и диска зрительного нерва не было выявлено. Все слои сетчатки сохраняли правильное строение без воспалительных, дистрофических, токсических и сосудистых нарушений.

Во 2 опытной группе (концентрация Фотодитазина 0,5 мг/мл, плотность энергии 10 Дж/см^2) в течение всего срока наблюдения не отмечалось изменений со стороны роговицы и склеры. Однако на 1 и 3 сутки наблюдалось расширение сосудов радужки и наличие фибринозного бесклеточного экссудата в передней камере. Ярких изменений со стороны внутриглазных структур не отмечалось, однако на внутренней поверхности сетчатки определялся слабый коагуляционный эффект, не выходящий за пределы слоя нервных волокон (рис. 28 а, б).



а б

Рис. 28 а, б. Гистологический препарат глаза кролика 2 опытной группы на 3 сутки после АФДТ. Морфологических изменений со стороны оболочек и диска зрительного нерва не выявлено. Ув.: а – х50, б – х400

К концу 1 месяца наблюдения выявлялись слабые фотодинамические проявления в заднем отделе глаз, практически без изменений диска зрительного нерва, с разрушением перипапиллярной сетчатки, но без образования хориоретинального рубца. При этом визуализировались признаки измененного пигментного эпителия, проявляющиеся в его округлении, конденсации пигмента, местами с отрывом клеток от мембраны Бруха (рис. 29 а-г).

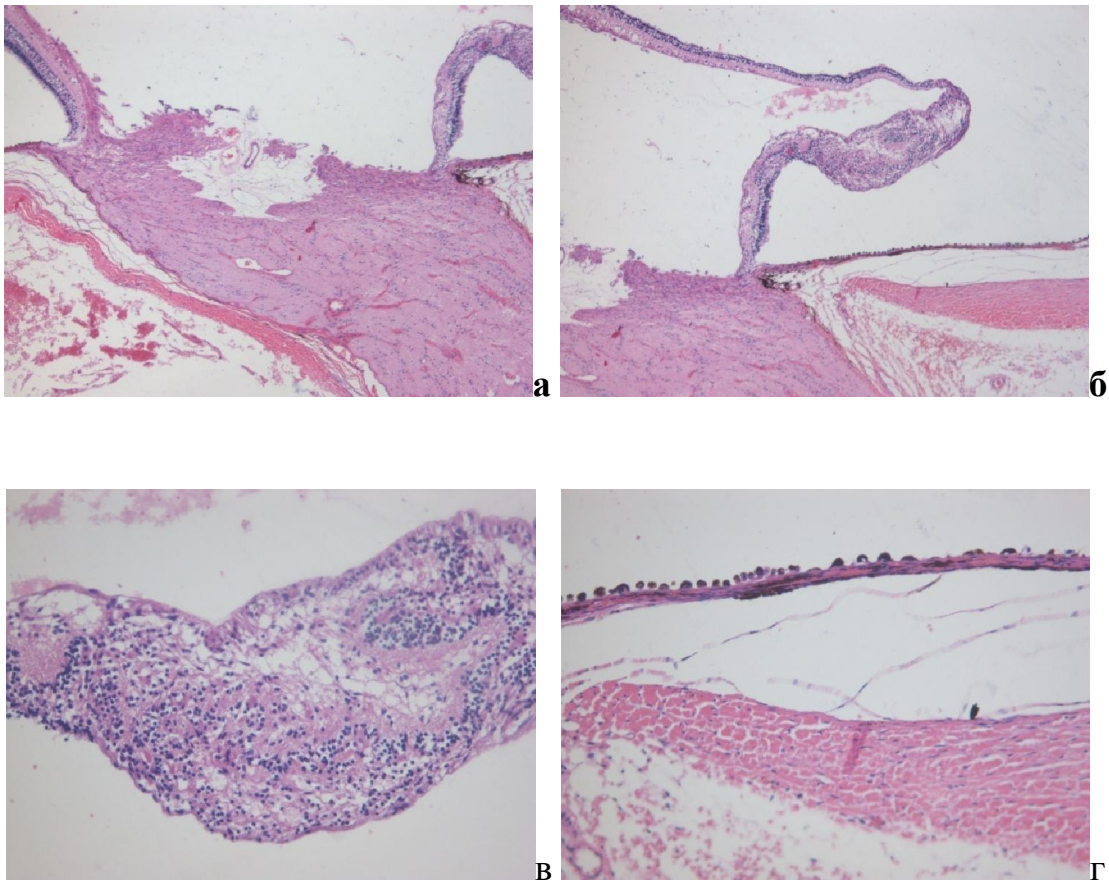


Рис. 29. Гистологический препарат глаза кролика 2 опытной группы через 1 месяц после АФДТ. Ув.: а, б – х50, в, г – х200

В ходе дальнейшего наблюдения до 6 месяцев в глазах 2 опытной группы определялось усугубление этих процессов с формированием хориоретинального рубца.

Резюме

Таким образом, в ходе проведения экспериментальных исследований in vivo, направленных на выбор наиболее безопасных и эффективных параметров интравитреальной АФДТ, с точки зрения состояния внутриглазных структур было установлено, что при плотности энергии лазерного излучения 5 Дж/см^2 и 10 Дж/см^2 определяется слабый дозозависимый эффект вмешательства, в то время как при использовании плотности энергии лазерного излучения 15 Дж/см^2 – выраженный

дозозависимый эффект, вследствие чего данную плотность энергии следует считать не целесообразной для выполнения интравитреальной АФДТ.

При этом, несмотря на практически равноценные результаты исследования состояния внутриглазных структур в случаях использования плотности энергии лазерного излучения 5 Дж/см^2 и 10 Дж/см^2, все же следует отдать предпочтение плотности энергии 10 Дж/см^2, учитывая возможность достижения с ее помощью значительно большего антимикробного эффекта, подтвержденного экспериментальными исследованиями in vitro, представленными во второй главе диссертации.

Заключительный этап экспериментальных исследований in vivo свидетельствовал о том, что проведение интравитреальной АФДТ с «Фотодитазином» в концентрации 0,05 мг/мл и плотности энергии лазера 10 Дж/см^2 не вызывает каких-либо патологических изменений со стороны сетчатки и других внутриглазных структур на протяжении всего срока наблюдения до 6 месяцев.

Поэтому именно вышеуказанные параметры интравитреальной АФДТ, расцененные нами как наиболее щадящие, были выбраны для использования при лечении экспериментального бактериального эндофтальмита, результаты которого представлены в следующей главе диссертации.

ГЛАВА 5

ИНТРАВИТРЕАЛЬНАЯ АНТИМИКРОБНАЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ЭКЗОГЕННОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОФТАЛЬМИТА

(экспериментальные исследования in vivo)

На основании разносторонних экспериментальных исследований, представленных в предыдущих главах диссертации, было доказано, что АФДТ с использованием раствора «Фотодитазина» в концентрации 0,05 мг/мл и плотности энергии лазерного излучения 10 Дж/см^2, обладая выраженным антимикробным эффектом в отношении целого комплекса патогенных микроорганизмов, является методикой, безопасной для внутриглазных структур.

Серия экспериментальных исследований in vivo, представленных в данной главе диссертации, направлена на изучение особенностей интравитреальной АФДТ в лечении экспериментального бактериального эндофтальмита.

5.1. Материалы и методы

Экспериментальные исследования in vivo проведены на 42 глазах 21 кролика породы шиншилла весом 2,5-3,5 кг в возрасте 6 месяцев.

Исследования включали 4 этапа.

На первом (предварительном) этапе на всех глазах подопытных животных проводилась факоэмульсификация прозрачного хрусталика по стандартной методике, принятой в ФГУ «МНТК «МГ», для исключения развития катаракты при последующем моделировании экспериментального эндофтальмита и оценки тяжести воспалительного поражения внутриглазных структур в различные сроки послеоперационного наблюдения [49].

На втором этапе (через 20-30 дней после факоэмульсификации и клинического успокоения глаз) создавали экспериментальную модель экзогенного бактериального эндофтальмита с использованием культуры патогенного микроорганизма Enterococcus faecium. Для этого ее сначала предварительно центрифугировали в течение 3 минут при 2000 об/мин. Далее надосадочную жидкость удаляли микропипеткой, а 0,2 мл приготовленной культуры Enterococcus faecium в заведомо высокой дозе 100 000 микробных тел с помощью одноразовых шприцов и игл вводили в витреальную полость глаз кроликов через прокол склеры в верхнем наружном квадранте на расстоянии 2 мм от лимба [49,63,99].

На третьем этапе зараженные подопытные животные были разделены на три опытные группы по 6 животных (12 глаз) в каждой группе и одну контрольную группу (3 кролика – 6 глаз).

Не позднее 12 часов после заражения в каждой опытной группе проводили субтотальную витрэктомию по стандартной методике, принятой в ФГУ «МНТК «МГ». Следует уточнить, что необходимость выполнения витрэктомии не позднее 12 часов после заражения объясняется наличием определенного периода времени после введения возбудителя в полость глаза (в среднем 12 часов), по истечении которого лечение становится неэффективным и затруднительным [49,63].

В первой опытной группе (12 глаз 6 кроликов) проводили субтотальную витрэктомию, при этом в качестве ирригационного раствора использовали раствор антибиотика ванкомицина в дозе 30 мкг/мл.

Во второй группе (12 глаз 6 кроликов) проводили витрэктомию в сочетании с интравитреальной АФДТ по предложенной нами методике, при этом в качестве ирригационного раствора использовали физиологический раствор.

В третьей группе (12 глаз 6 кроликов) проводили витрэктомию и интравитреальную АФДТ, а в качестве ирригационного раствора использовали раствор антибиотика ванкомицина в дозе 30 мкг/мл [23].

Четвертая группа животных (6 глаз 3 кроликов) была контрольной, без лечения.

Сразу после заражения, через 12 часов до начала хирургического лечения и в дальнейшем на 1, 3 и 14 сутки послеоперационного периода на всех глазах экспериментальных животных проводили биомикроскопию, непрямую офтальмоскопию и ЭРГ.

Выраженность воспалительных изменений оценивали по 5 степеням [80,101]: 0 степень (0 баллов) – признаки воспаления отсутствуют, детали глазного дна легко офтальмоскопируются; 1 степень (1 балл) – незначительная гиперемия конъюнктивы, радужки и отек роговицы, единичные преципитаты, в передней камере 5-10 клеток в поле зрения, глазное дно легко офтальмоскопируется; 2 степень (2 балла) – умеренная гиперемия конъюнктивы и умеренно выраженный отек роговицы, преципитаты, множественные воспалительные клетки во влаге передней камеры, гипопион до 2 мм, рисунок радужки стушеван, плавающие помутнения в стекловидном теле, рефлекс глазного дна снижен, детали глазного дна под густым флером или не офтальмоскопируются; 3 степень (3 балла) – тяжелая выраженная инъекция, гиперемия конъюнктивы, выраженный отек и преципитаты роговицы, гипопион более 2 мм, рефлекса с глазного дна нет; 4 степень (4 балла) – тотальный отек роговицы, гипопион, заполняющий всю переднюю камеру, глубжележащие структуры не офтальмоскопируются.

В результате каждому глазу присваивали определенное количество баллов. Сложив все баллы, присвоенные глазам экспериментальных животных, в каждой исследуемой группе получали сумму группы в определенные сроки наблюдения, а затем рассчитывали их средние значения.

Результаты ЭРГ оценивали по степени угнетения функции сетчатки, как соотношение амплитуды волны «b» зараженного глаза к амплитуде волны «b» глаза после интравитреального введения физиологического раствора.

После клинического исследования из каждого глаза брали по 0,2 мл содержимого витреальной полости для дальнейшего микробиологического исследования. Далее на 1, 3 и 14 сутки глаза энуклеировали для последующего морфологического исследования (световая микроскопия). Выбор именно таких сроков наблюдения коррелирует с данными литературы, посвященными лечению эндофтальмитов [49,63].

Все исследования выполнялись по стандартным методикам, описанным в предыдущих главах диссертации.

5.2. Результаты биомикроскопии и непрямой офтальмоскопии

Через 12 часов после заражения и до начала хирургического лечения во всех 42 глазах экспериментальных животных наблюдалась клиника эндофтальмита. На 33 глазах имелась реакция 3 степени: выраженная инъекция и гиперемия конъюнктивы, выраженный отек роговицы, детали передней камеры просматриваются с трудом, обильный серозно-фибринозный экссудат в форме «гриба», гипопион более 2 мм, рефлекс глазного дна отсутствовал. На 9 глазах отмечалась реакция 2 степени: умеренная инъекция конъюнктивы и умеренно выраженный отек роговицы, множественные воспалительные клетки во влаге передней камеры, «паутинообразный» экссудат, гипопион менее 2 мм, рисунок радужки стушеван, резкая гиперемия сосудов радужки, плавающие помутнения в стекловидном теле, рефлекс снижен, детали глазного дна под густым флером. Среднее количество баллов выраженности клинических проявлений воспаления – 2,79.

В I группе (витрэктомия + ванкомицин) на 1 сутки на 6 глазах выявлялась реакция 2 степени: диффузная буллезность эпителия роговицы, слабая отечность стромы, складки десцеметовой мембраны, клеточная реакция в передней камере, «паутинообразный» экссудат, из них на двух глазах уровень гипопиона 1 мм, в стекловидном теле значительное

количество клеток, глазное дно под флером. На 6 глазах диагностировалась реакция 3 степени: выраженный отек роговицы, на 3-х из 6 глаз гипопион более 2 мм, в стекловидном теле диффузное клеточное экссудативное помутнение, на 5 глазах при офтальмоскопии глазного дна задний полюс за густым флером, детали не офтальмоскопировались. Среднее количество баллов выраженности клинических проявлений воспаления – 2,5.

На 3 сутки на всех глазах 1 группы отмечалось уменьшение воспалительной реакции. Реакция 2 степени выраженности имелась на 6 из 8 глаз. Только у одного животного на обоих глазах сохранялся выраженный гипопион и отсутствовал рефлекс с глазного дна. Среднее количество баллов выраженности клинических проявлений воспаления – 2,25.

На 14 сутки в глазах 1 группы отмечалась диффузная буллезность эпителия роговицы, слабая отечность стромы, складки десцеметовой мембраны, врастание неоваскулярных сосудов в роговицу до 1 мм от лимба, в передней камере экссудативная реакция в виде отдельных нитей. Радужная оболочка отечна, поверхностная неоваскуляризация зрачковой зоны, задний полюс за флером, прослеживались границы зрительного нерва и ход крупных сосудов. Среднее количество баллов выраженности клинических проявлений воспаления – 1,5.

Во 2 группе (витрэктомия + АФДТ) на 1 сутки на 8 глазах была выявлена реакция 3 степени выраженности с гипопионом более 2 мм. На 4 глазах гипопион 1,0 мм, на всех глазах отмечался паутинообразный экссудат, офтальмоскопия была затруднена. Во всех случаях выявлялась резко выраженная экссудативная реакция в передней камере. Среднее количество баллов выраженности клинических проявлений воспаления – 2,67.

На 3 сутки во всех глазах 2 группы происходило уменьшение степени выраженности воспалительной реакции. При этом реакция 3 степени выраженности сохранялась только на 2 глазах, где отмечался гипопион более 2 мм. Среднее количество баллов выраженности клинических проявлений воспаления – 2,25.

На 14 сутки в глазах 2 группы диагностировалась диффузная буллезность эпителия роговицы, слабая отечность стромы, складки десцеметовой мембраны, врастание неоваскулярных сосудов в роговицу на расстоянии менее 1 мм, «паутинообразный» экссудат, отечность радужки со сглаженным рисунком, поверхностная неоваскуляризация зрачковой зоны радужки. При офтальмоскопии глазного дна задний полюс за флером, экссудативная реакция в виде пленок. Среднее количество баллов выраженности клинических проявлений воспаления – 1,75.

В 3 группе (витрэктомия + АФДТ + ванкомицин) на 1 сутки на 7 глазах выявлялась реакция 2 степени: диффузная буллезность эпителия роговицы, слабая отечность стромы, складки десцеметовой мембраны, клеточная реакция в передней камере, «паутинообразный» экссудат в виде нитей, гипопион не более 1,0 мм, в стекловидном теле значительное количество клеток, глазное дно под флером, офтальмоскопия затруднена. На 5 глазах обнаруживалась реакция 3 степени: выраженный отек роговицы, гипопион более 2 мм, в стекловидном теле диффузное клеточное экссудативное помутнение, при офтальмоскопии глазного дна задний полюс за густым флером, детали не офтальмоскопировались. Среднее количество баллов выраженности клинических проявлений воспаления – 2,42.

На 3 сутки на всех глазах 3 группы также отмечалось уменьшение воспалительной реакции до 2 степени. Среднее количество баллов выраженности клинических проявлений воспаления – 2,0.

На 14 сутки в 4 глазах 3 группы выявлялись единичные нежные складки десцеметовой мембраны роговицы, слабая отечность стромы на 1 глазу, врастание новообразованных сосудов в роговицу до 1 мм от лимба, особенно выраженное в зоне послеоперационного роговичного тоннеля. Нити экссудата в области зрачка, отечность радужки и поверхностная неоваскуляризация зрачковой зоны радужки на 1 глазу. Невыраженная клеточная реакция стекловидного тела, организовавшийся экссудат в витреальной полости, при офтальмоскопии глазного дна задний полюс за

флером, при этом прослеживались границы ДЗН и сосуды Среднее количество баллов выраженности клинических проявлений воспаления – 1,0.

В контрольной группе (без лечения) на 1 сутки на всех глазах была зарегистрирована реакция 3 степени выраженности, а на 3 сутки наблюдалась клиника тяжелого эндофтальмита с переходом в панофтальмит. Из конъюнктивальной полости выделялся гной, отмечалась выраженная инъекция, хемоз конъюнктивы, нарушение подвижности глаз. Роговица была отечной, отмечалась диффузная буллезность эпителия, складчатость десцеметовой оболочки, детали передней камеры не просматривались, на роговице диагностировалось расплавление в зоне роговичного послеоперационного тоннеля, гнойное расплавление конъюнктивы в зоне введения микробной культуры, рефлекс глазного дна отсутствовал. Суммарное среднее количество баллов выраженности клинических проявлений воспаления – 4,0.

На ниже представленном графике 9 приведена сводная информация о выраженности клинического проявления воспаления на глазах экспериментальных животных в баллах в зависимости от способа лечения экспериментального эндофтальмита и сроков наблюдения.

График 9. Выраженность клинического проявления воспаления на глазах экспериментальных животных в баллах в зависимости от способа лечения экспериментального эндофтальмита и сроков наблюдения

5.3. Результаты микробиологических исследований

В ходе микробиологических исследований in vivo после забора содержимого витреальной полости в различные сроки после заражения были получены следующие результаты.

Так, сразу после заражения количество микроорганизмов резко возрастало. А после проведения витрэктомии, микробная обсемененность витреальной полости во всех прооперированных глазах резко снижалась. При сравнении микробной обсемененности витреальной полости в зависимости от применяемых методов лечения было выявлено, что проведение АФДТ по предложенной методике позволяет значительно уменьшить количество микроорганизмов в витреальной полости, как сразу после вмешательства, так и в период до 3 суток. Аналогичные данные были получены и при применении витрэктомии с использованием раствора ванкомицина. Но особенно высокой эффективностью обладает метод сочетанного применения ФДТ и антибиотика (табл. 7, график 10).

Таблица 7.

Микробная обсемененность витреальной полости в зависимости от времени с момента заражения и способа лечения (Log 10)

Способ лечения	Микробная обсемененность витреальной полости в зависимости от времени с момента заражения и способа лечения (Log10)			
	12 часов	1 сутки	3 сутки	14 сутки
Витрэктомия + ванкомицин	0	1,55	1,09	0
Витрэктомия + АФДТ	0	1,83	0,88	0
Витрэктомия + АФДТ + ванкомицин	0	0,67	0	0
Без лечения (контроль)	5,04	5,72	6,05	

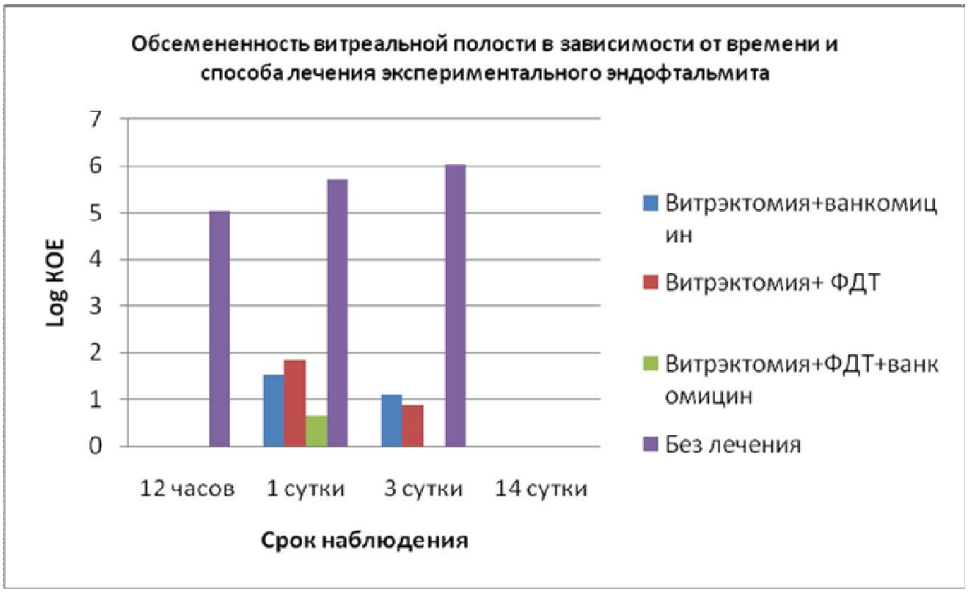


График 10. Микробная обсемененность витреальной полости в зависимости от времени с момента заражения и способа лечения. Количество микроорганизмов (КОЕ) показано в усредненном виде для каждой исследованной группы и выражено в виде Log10

5.4. Результаты электроретинографии

В первые 12 часов после заражения во всех опытных и контрольных глазах отмечалось угнетение волны «b» ЭРГ. Через 12 часов происходило снижение волны «b» ЭРГ в 2 раза по сравнению с исходными значениями. В контроле наблюдалось полное отсутствие показателей ЭРГ уже на 3 сутки от момента заражения (табл. 8, график 11).

Таблица 8.

Выраженность снижения показателей ЭРГ в зависимости от времени с момента заражения и проводимого лечения

Способ лечения	Выраженность снижения показателей ЭРГ в зависимости от времени с момента заражения и способа лечения				
	заражение	12 часов	1 сутки	3 сутки	14 сутки
Витрэктомия + ванкомицин	126	69,2	50	45,6	45,75
Витрэктомия + АФДТ	127	67,7	50,7	44,125	44
Витрэктомия + АФДТ + ванкомицин	127,5	67,4	52,6	46,75	46
Без лечения (контроль)	126,8	68	25,6		

График 11. Выраженность снижения показателей ЭРГ в зависимости от времени с момента заражения и проводимого лечения на глазах экспериментальных животных

Анализ результатов количественной оценки выраженности проявлений воспаления, а также микробилогических и электроретинографических исследований показал положительную динамику воспалительного процесса при использовании каждого из лечебных мероприятий.

Наиболее быстро стихание воспалительного процесса, элиминация возбудителя (снижение значения количественной оценки клинических признаков воспалительного процесса с 2,79 баллов до начала лечения до 1,0 балла к двум неделям), а также отсутствие роста микроорганизмов на 3 сутки исследования наблюдались в 3 группе, где проводимое лечение включало витрэктомию, интравитреальную АФДТ и интравитреальное введение ванкомицина.

Своевременное удаление возбудителя из витреальной полости в комбинации с ирригацией ванкомицином и АФДТ в короткие сроки приводило к стиханию воспалительного процесса и наилучшему сохранению функции нейрорецепторного аппарата сетчатки (волна «b» ЭРГ на уровне 46 мкВ – 36% от нормы).

5.5. Результаты количественной оценки патоморфологических признаков воспалительного процесса при эндофтальмите

Распределение глаз в опытных группах и контроле, согласно срокам энуклеации и последующему выполнению морфологических исследований представлено в таблице 9.

Таблица 9.

Распределение глаз экспериментальных животных по группам и срокам энуклеации

Сроки энуклеации после заражения	Опытные группы			Контроль
	1 группа Витрэктомия + ванкомицин	2 группа Витрэктомия + АФДТ	3 группа Витрэктомия +АФДТ + ванкомицин	
12 часов	-	-	-	2
1 сутки	4	4	4	2
3 сутки	4	4	4	2
14 сутки	4	4	4	-
Итого	12 глаз	12 глаз	12 глаз	6 глаз
Всего глаз	42 глаза (21 кролик)			

Для сравнения выраженности патоморфологических изменений в различных структурах глаза была разработана система количественной оценки гистологических признаков воспалительного процесса глазного яблока (табл. 10).

Состояние глаз по тяжести течения воспалительного процесса и возможному исходу оценивали по степеням следующим образом: легкая степень – 0-8 баллов; средняя степень – 9-16 баллов; тяжелая степень – 17-24 балла; крайне тяжелая степень – 25-33 балла.

Таблица 10.

Количественная оценка патоморфологических признаков воспалительного процесса глазного яблока

№ п/п	Структуры глаза	Баллы			
		0	1	2	3
1.	Роговица (воспалительная инфильтрация)	нет	Слабая	Выраженный кератит, инфильтрация стромы воспалительными клетками	Гнойно- некротическое воспаление с нарушением архитектоники роговичной ткани и расплавлением роговицы
2.	Роговица (отечность)	нет	Легкий отек	Умеренный отек	Выраженный отек
3.	Роговица (неоваскуляризация)	нет	По периферии	Неоваскуляризация без поражения центральной зоны	Врастание сосудов в центральную зону
4	Передняя камера (экссудат)	Без экссудата	Экссудат серозный	Фибриноидный экссудат с наличием включений из воспалительных клеток	Гипопион
5.	Радужка и цилиарное тело	норма	Слабая периваскулярная воспалительная инфильтрация	Умеренная периваскулярная воспалительная инфильтрация со слабой диффузной в строме, полнокровие и эктазия сосудов	Явления выраженного иридоциклита
6.	Витреальная полость (экссудат)	Без экссудата	Нежно волокнистый фибриноидный экссудат	Очаговое уплотнение экссудата	Плотный фибриноидный экссудат
7.	Витреальная полость (клеточная реакция)	нет	Слабая клеточная инфильтрация остатков витреума и экссудата	Умеренная клеточная инфильтрация	Абсцесс
8.	Сетчатка	норма	Слабая, поверхностная воспалительная инфильтрация	Выраженная воспалительная инфильтрация с очагами деструкции	Гнойное расплавление сетчатки
9.	Хориоидея	норма	Слабая периваскулярная воспалительная инфильтрация	Диффузная воспалительная инфильтрация, участки кровоизлияний	Гнойное расплавление хориоидеи
10.	Склера	норма	Слабая воспалительная инфильтрация внутренних слоев	Диффузная инфильтрация внутренних слоев склеры	Склеромаляция вследствие гнойного расплавления
11.	Зрительный нерв	норма	Слабая, поверхностная воспалительная инфильтрация ДЗН, не выходящая за пределы lamina cribrosa	Периваскулярная воспалительная инфильтрация, выходящая за пределы lamina cribrosa, но не достигая линии пересечения нерва, расширение межоболочечного пространства	Диффузная воспалительная инфильтрация по линии отсечения зрительного нерва с вовлечением оболочек

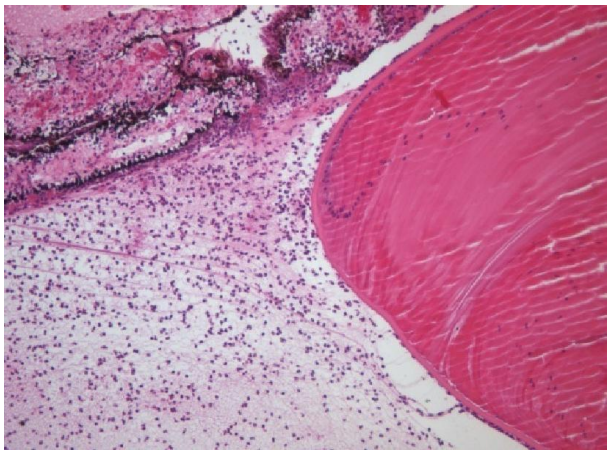
Согласно использованной системе, каждому патоморфологическому признаку присваивали определенное количество баллов, затем производили их суммирование и, таким образом, получали количественную оценку патоморфологических признаков воспалительного процесса каждого глаза. Сложив их в каждой исследуемой группе, получали сумму баллов группы в определенные сроки наблюдения. Затем производили расчет среднего значения количественной оценки патоморфологических признаков воспалительного процесса. Результаты сопоставляли между собой по группам для их сравнительной характеристики и оценки динамики воспалительного процесса.

5.6. Результаты морфологических исследований

Через 12 часов после заражения в глазах контрольной группы (без лечения) по данным световой микроскопии отмечались следующие изменения структур глаза: отечность роговицы со слабой межпластинчатой инфильтрацией по периферии; передняя камера была заполнена плотным гнойно-фибринозным экссудатом; в радужке обнаруживалось расширение сосудов, умеренная воспалительная клеточная инфильтрация; в стекловидном теле выявлялся гнойно-некротический очаг, захватывающий передний витреум и окутывающий капсулу хрусталика и цилиарные отростки; диагностировался отек сетчатки, рассеянные воспалительные клетки; определялись явления увеита; в склере диагностировались признаки слабой воспалительной инфильтрации; в зрительном нерве обнаруживались единичные воспалительные клетки. Среднее количество баллов 13, что соответствовало исходному состоянию на момент начала лечебных мероприятий в опытных группах.

Через 1 сутки в контроле: роговица отечная, межпластинчатый отек с нарушением параллельности хода стромальных пластин и выраженная воспалительная инфильтрация; передняя камера заполнена плотным

фибринозным экссудатом, инфильтрирована лейкоцитами; в радужке сосуды расширены, периваскулярная инфильтрация; в сетчатке скопления воспалительных клеток с очагами деструкции; в цилиарном теле и хориоидее скопления воспалительных клеток и очаги кровоизлияний; во всех отделах стекловидного тела гнойный экссудат (рис. 30 а, б); в склере явления межволоконного отека, слабая воспалительная инфильтрация внутренних слоев; в зрительном нерве воспалительная инфильтрация, выходящая за пределы lamina cribrosa. Среднее количество баллов – 19,5.


а

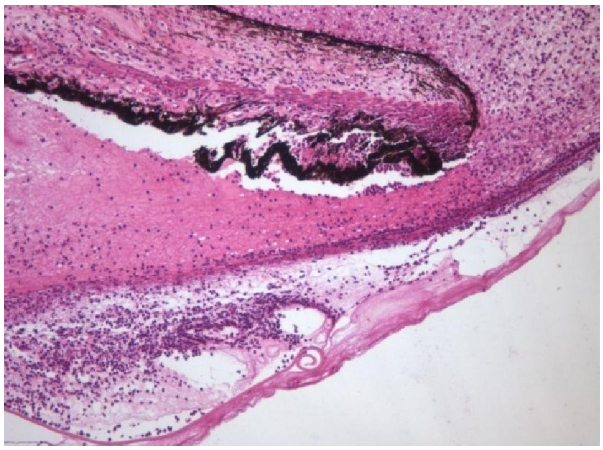

б

Рис. 30. Гнойно-некротический очаг в витреальной полости и передней камере в условиях экспериментального эндофтальмита (1 сутки без лечения). Основные скопления вблизи остатков экваториальной зоны хрусталика после ФЭК (а), ближе к зрачку (б) виден переход в переднюю камеру и остатки капсулы хрусталика. Ув. х100

Через 3 суток в контроле: роговица отечная, выраженный кератит с расплавлением эпителия и поверхностных слоев стромы, визуализация только отдельных клеток эндотелия; эндофтальмит с переходом в панофтальмит: тотальное расплавление сетчатки; диффузная лейкоцитарная инфильтрация радужки, цилиарного тела и хориоидеи с очагами гнойного расплавления; склерит с выраженными гнойно-некротическими изменениями; неврит зрительного нерва с выходом воспаления за линию отсечения зрительного нерва более 1 см. Среднее количество баллов – 29.

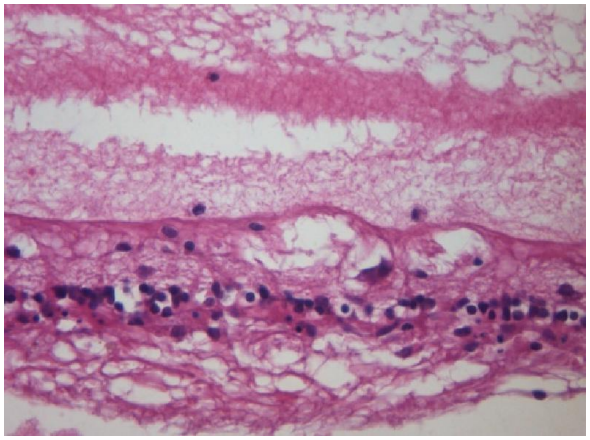
Учитывая выявленную в контроле на 3 сутки наблюдения клиническую картину панофтальмита с риском расплавления роговицы и склеры, дальнейшее проведение исследований в этой группе было прекращено.

В группе 1 (витрэктомия + ванкомицин) по данным световой микроскопии на 1 сутки после операции отмечались следующие изменения: интактность роговицы; в склере явления умеренной воспалительной инфильтрации вдоль склеротомических отверстий; в передней камере рыхлый фибриноидный экссудат с умеренным клеточным компонентом; незначительное расширение сосудов радужки; воспалительная инфильтрация внутренних слоев сетчатки; явления умеренного увеита в хориоидее; в зрительном нерве периваскулярная воспалительная инфильтрация. Среднее количество баллов – 14,5.

На 3 сутки в 1 группе: роговица и склера слабо отечны, инфильтрация склеры по ходу склеротомий; в передней камере фибриноидный экссудат, строма радужки слабо инфильтрирована воспалительными клетками; остатки воспалительно измененного стекловидного тела в задних отделах; слабая лимфоцитарная инфильтрация диска зрительного нерва и его межоболочечного пространства, явления переднего оптического неврита; в сетчатке слабая воспалительная инфильтрация с единичными полиморфно-ядерными лейкоцитами; в сосудистой оболочке периваскулярное скопление лимфоцитов. Среднее количество баллов – 11,75.

На 14 сутки в 1 группе: роговица отечна, васкуляризирована по периферии, с явлениями слабой периферической инфильтрации; в склере явления межволоконного отека; передняя камера заполнена плотным фибриноидным экссудатом, инфильтрирована лейкоцитами; в радужке сосуды расширены, периваскулярная инфильтрация, на поверхности радужки новообразованные сосуды; в витреальной полости на поверхности сетчатки очагами плотный фибриноидный экссудат со слабой клеточной инфильтрацией (рис. 31 а, б); хориоидея инфильтрирована единичными лимфоцитами; очаги воспалительной поверхностной деструкции сетчатки

начинают замещаться глиальной тканью, формируя эпиретинальные мембраны, вызывающие тракции; склера и зрительный нерв без особенностей. Среднее количество баллов – 10,5.


а

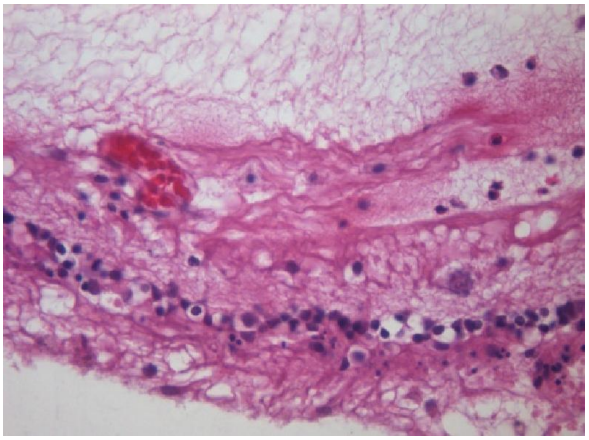

б

Рис. 31 а, б. Фиброзный экссудат в витреальной полости глаз 1 опытной группы в условиях экспериментального эндофтальмита после лечения (14 сутки). Ув. х400

В группе 2 (витрэктомия + АФДТ) на 1 сутки изменения по данным световой микроскопии были следующими: структура роговицы сохранена, локальная инфильтрация воспалительными клетками у лимба; в передней камере фибриноидный экссудат с умеренным клеточным компонентом; в радужке умеренная воспалительная инфильтрация с вовлечением в процесс цилиарных отростков и плоской части цилиарного тела; в витреальной полости экссудат с небольшим количеством клеточных элементов (рис. 32 а, б); в сетчатке воспалительная инфильтрация внутренних слоев; в склере незначительная клеточная инфильтрация; в зрительном нерве воспалительная инфильтрация вещества нерва, не выходящая за пределы laminae cribrosae. Среднее количество баллов – 15,0.

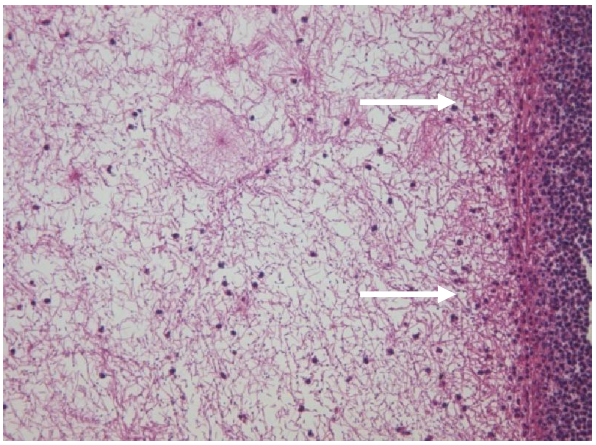
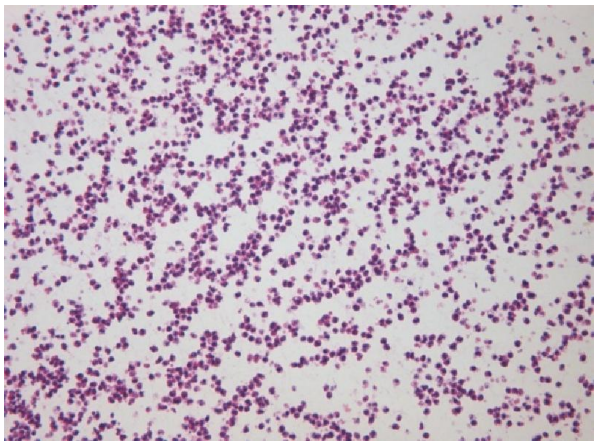

а

б

Рис. 32 а, б. Гнойно-некротический очаг в витреальной полости глаз 2 группы в условиях экспериментального эндофтальмита (1 сутки): а – участок передних отделов кортекса стекловидного тела с визуализацией резкой границы зоны фотодинамического воздействия на экссудат (стрелками указана граница ФДВ); б – без лечения. Ув. х200

На 3 сутки во 2 группе: в роговице всех глаз слабый воспалительный отек периферических отделов; передняя камера заполнена фибриноидным экссудатом; сосуды радужки умеренно дилатированы. В витреальной полости отмечена положительная динамика: бесклеточный фиброзный экссудат не активен, волокнистый компонент уплотнился, промежутки между ними расширились, клеточных компонентов мало (рис. 33 а, б). В хориоидее слабая периваскулярная инфильтрация более выражена в передних отделах. В сетчатке единичные воспалительные клетки. В склере явления умеренно выраженной воспалительной инфильтрации вдоль склеротомических каналов, другие области склеры без патологии. В зрительном нерве слабая воспалительная инфильтрация. Среднее количество баллов – 11.

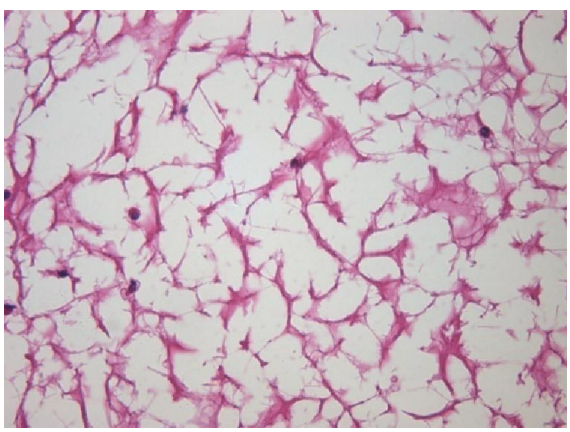
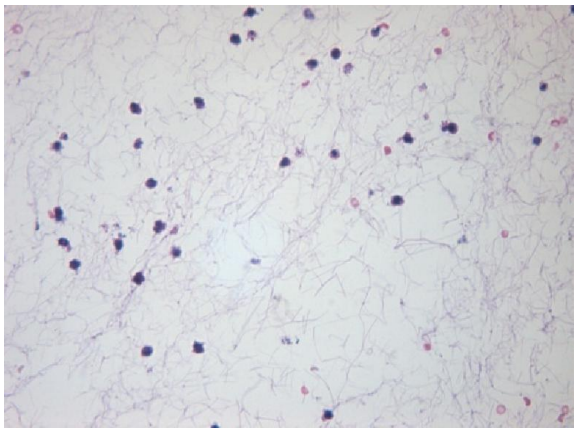
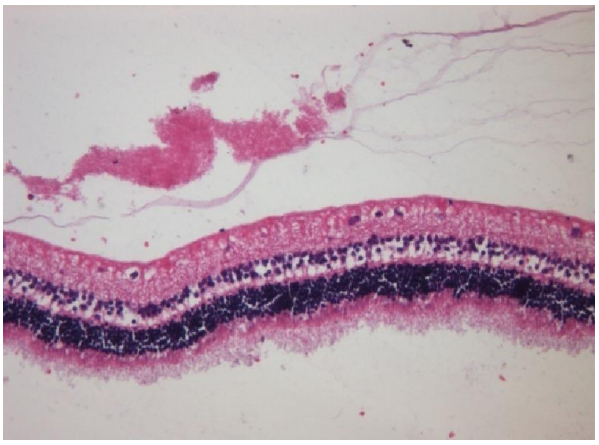

а

б

Рис. 33 а, б. Фибриноидный экссудат в витреальной полости в глазах 2 группы в условиях экспериментального эндофтальмита (3 сутки): а – после проведения витрэктомии + АФДТ; б – после витрэктомии + ванкомицин. Ув. х400

На 14 сутки во 2 группе: в роговице врастание сосудов по периферии, больше в зоне лимбального тоннеля после проведенной ранее факоэмульсификации, с явлениями слабой периферической инфильтрации; в передней камере остатки организовавшегося экссудата с единичными клеточными элементами; в радужке сосуды расширены, слабая периваскулярная клеточная инфильтрация, на поверхности радужки новообразованные сосуды; в витреальной полости фибриноидный экссудат с очагами уплотнения и слабой клеточной инфильтрацией; хориоидея без особенностей; на внутренней поверхности сетчатки очаговый глиоз; в склере явления межволоконного отека; зрительный нерв без видимых изменений. Среднее количество баллов – 8,75.

В группе 3 (витрэктомия + АФДТ + ванкомицин) на 1 сутки отмечались следующие изменения: слабый воспалительный отек роговицы; в склере явления умеренной воспалительной инфильтрации, более выраженной в зоне склеротомий; передняя камера заполнена рыхлым фибриноидным экссудатом с небольшим количеством клеток воспалительного ряда – результат АФДТ; в радужке сосуды незначительно расширены, умеренная воспалительная инфильтрация; сетчатка в экваториальной зоне интактна, в перипапиллярной зоне на ее поверхности остатки стекловидного тела, инфильтрированные лейкоцитами с признаками частичного воздействия АФДТ, воспалительно-

фиброзный экссудат тесно связан с диском зрительного нерва с вовлечением стенок ветвей ЦАС и притоков ЦВС. Структура фрагментов кортекса с признаками слабого ФДТ-патоморфоза, более разряженная плотность ватообразного экссудата с нежноволокнистой основой, меньшее количество клеточных элементов. В сосудистой оболочке отмечена инфильтрация вдоль сосудов, более выраженная в цилиарном теле. В зрительном нерве – единичные воспалительные клетки (рис. 34 а, б) Среднее количество баллов – 14,5.


а

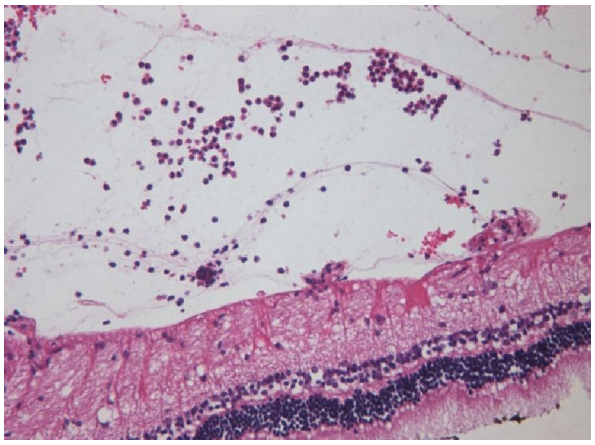

б

Рис. 34 а, б. Перипапиллярная зона сетчатки глаз 3 группы в условиях экспериментального эндофтальмита (1 сутки): а – после витрэктомии + АФДТ + ванкомицин; б – после витрэктомии + ванкомицин. Ув. х200

На 3 сутки в 3 группе: в двух глазах сохранялся слабо выраженный отек роговицы с легкой перилимбальной инфильтрацией; в передней камере рыхлый фибриноидный экссудат с единичными клетками воспалительного ряда; в радужке сосуды незначительно расширены, без выраженных воспалительных явлений; в витреальной полости сохраняется экссудативная реакция, небольшое количество клеточных элементов в передних отделах витреума; сетчатка в экваториальной и перипапиллярной зонах интактна, с наличием единичных воспалительных клеточных элементов; структура центральной зоны сетчатки условно сохранна; сосуды хориоидеи полнокровны и эктазированы; в склере грубых изменений нет; зрительный нерв интактен. Среднее количество баллов – 9,75.

На 14 сутки в 3 группе: неоваскуляризация роговицы у лимба в зоне лимбального послеоперационного тоннеля; передняя камера свободна; в радужке и хориоидее сосуды незначительно расширены, без воспалительных явлений; в витреальной полости сохраняется нежноволокнистый бесклеточный экссудат (рис. 35 а, б); в сетчатке воспалительных изменений не выявлено; хориоидея и склера без особенностей; зрительный нерв без патологии. Среднее количество баллов – 6,75.

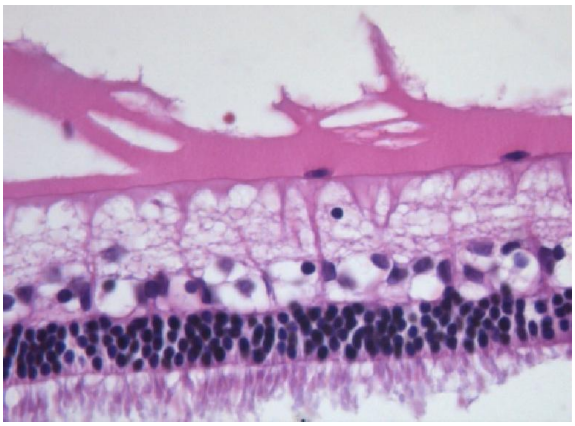
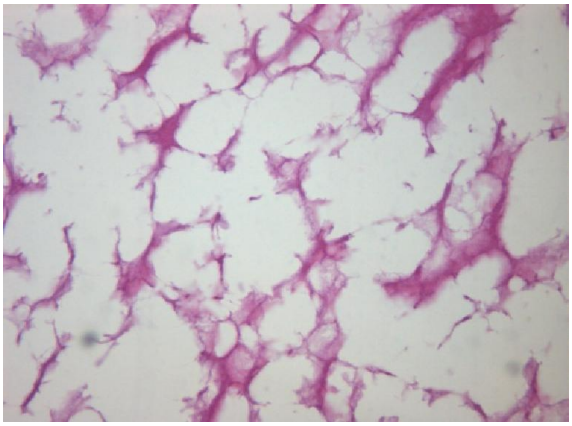

а

б

Рис. 35 а, б. Фибриноидный бесклеточный экссудат в витреальной полости глаз 3 опытной группы в условиях экспериментального эндофтальмита после витрэктомии + АФДТ + ванкомицин (14 сутки). Ув. х200

В таблице 11 представлены средние значения количественной оценки патоморфологических признаков воспалительного процесса в группах экспериментальных животных в различные сроки наблюдения.

Таблица 11.

Количественная оценка (в баллах) патоморфологических признаков воспалительного процесса во всех группах экспериментальных животных в различные сроки наблюдения

Сроки энуклеации после заражения	Опытные группы			Контроль
	1 группа в/э + ванкомицин	2 группа в/э+ АФДТ	3 группа в/э + АФДТ+ ванкомицин	
	Количество баллов			
12 часов (исходное состояние глаз перед лечением)	13			
1 сутки	14,5	15	14,5	19,5
3 сутки	11,75	11	9,75	29
14 сутки	10,5	8,75	6,75	-

Анализ морфологической картины показал положительную динамику воспалительного процесса при применении каждого из лечебных мероприятий. В то же время в контрольной группе (без лечения) прогрессирование воспалительного процесса к 3 дню эксперимента привело к панофтальмиту и гибели глаз (количество баллов к этому сроку достигает максимума – 29,0).

Течение воспалительного процесса в каждой опытной группе имело свои особенности. Так, наиболее быстро стабилизация процесса с выраженными эффектами противовоспалительной терапии наблюдалась в группе 3 (витрэктомия + АФДТ + ванкомицин). Отмечалось снижение значения количественной оценки патоморфологических признаков воспалительного процесса с 14,5 баллов в 1 сутки до 6,75 баллов к двум неделям. Своевременное удаление возбудителя из витреальной полости в комбинации с ирригацией ванкомицином и АФДТ в короткие сроки приводило к стиханию воспалительного процесса.

В группе 1 (витрэктомия + ванкомицин) проведение антибиотикотерапии ванкомицином также быстро элиминировало возбудителя из витреальной полости (стабилизация процесса от 12 до 24 часов на уровне средней тяжести – 14,5 баллов). Однако наблюдалось воспаление в поверхностных слоях сетчатки, чему могло способствовать сохранение структуры экссудата.

В группе 2 (витрэктомия + АФДТ) отмечалось прямое бактерицидное воздействие лазерного излучения на экссудат. Но в некоторых случаях труднодоступные передние отделы кортекса вместе с дополнительным экссудатом в передней камере подвергались лишь частичному разрушению. Однако в динамике этот метод проявил более благоприятный исход, составив к 14 суткам 8,75 баллов по сравнению с 10,5 баллами в группе 1.

Наиболее пристальное внимание в ходе патоморфологических исследований уделяли сетчатке. Ее структура была условно сохранна во всех

трех опытных группах в экваториальной зоне и более подвержена воспалительной инфильтрации в центральной перипапиллярной зоне. Воспалительные явления угасали, но с сохранением слабой воспалительной инфильтрации в поверхностных слоях после применения витрэктомии в сочетании с антибиотикотерапией ванкомицином. После АФДТ таких явлений обнаружено не было, особенно при применении комбинированной методики (АФДТ в сочетании с ирригацией ванкомицином).

Результаты патоморфологических исследований были подтверждены данными статистической обработки. Значения критерия Фишера F, превышающие критические, отражают эффективность метода лечения и скорость стихания воспалительного процесса в каждой опытной группе. Упорядоченная последовательность опытных групп для всех сроков наблюдения при оценке патоморфологических признаков воспаления имеет вид: группа 1 (F1) < группа 2 (F2) < группа 3 (F3) (табл. 9). Данное обстоятельство свидетельствует о наибольшей эффективности лечения экспериментального экзогенного бактериального эндофтальмита в группе 3, когда в ходе витрэктомии проводили АФДТ, а в качестве ирригационного раствора использовали раствор антибиотика ванкомицина (табл. 12).

Таблица 12.

Результаты однофакторного корелляционного анализа (критерий Фишера F) в зависимости от методики лечения экспериментального эндофтальмита

Способ лечения	F	F критическое
Витрэктомия + ванкомицин (F_1)	3,14	3,06
витрэктомия + АФДТ (F_2)	9,15	3,06
витрэктомия + АФДТ + ванкомицин (F_3)	14,16	3,06

Резюме

Представленные в данной главе результаты экспериментальных исследований in vivo посвящены сравнительному анализу различных

вариантов лечения экспериментального бактериального экзогенного эндофтальмита, а именно: витрэктомии + антибиотикотерапия, витрэктомии + АФДТ и витрэктомии + АФДТ + антибиотикотерапия.

Результаты проведенных клинических и патоморфологических исследований, расчет значений количественной оценки признаков воспаления с их последующим сравнением и статистической обработкой полученных данных в каждой группе экспериментальных животных указывают на то, что, несмотря на уменьшение микробной обсемененности интравитреальной полости, а также снижение клинических и патоморфологических признаков воспаления в срок до 14 суток с момента заражения во всех группах подопытных животных, наиболее эффективным методом лечения экспериментального эндофтальмита является витрэктомия в сочетании с АФДТ и антибиотикотерапией.

Проведение витрэктомии с интравитреальной АФДТ и антибиотикотерапией по лечебному эффекту превышает по эффективности на 35,7% традиционно применяемый в лечебной практике метод – витрэктомию с интравитреальным введением антибиотика.

С нашей точки зрения, использование предложенной нами методики интравитреальной АФДТ в клинической практике позволит уменьшить вероятность развития антибиотикорезистентности и усилить антимикробный эффект лечения эндофтальмита без опасности токсического воздействия на внутриглазные структуры.

ВЫВОДЫ

1. В эксперименте in vitro установлено, что наибольший антимикробный эффект фотосенсибилизатора «Фотодитазин» отмечается при его использовании в концентрациях 0,5 мг/мл и 0,05 мг/мл при условии предварительной темновой инкубации патогенных микроорганизмов с «Фотодитазином» в данных концентрациях в течение 5 минут.

2. В эксперименте in vitro доказано, что антимикробный эффект АФДТ напрямую зависит от плотности энергии лазерного излучения, при этом

АФДТ не влияет на чувствительность патогенной микрофлоры к антибиотикам.

3. Разработанная система автоматизированного расчета позволяет с высокой точностью определять параметры лазерного излучения при интравитреальной АФДТ.

4. В эксперименте in vivo доказано, что интравитреальная АФДТ с ФС «Фотодитазин» в концентрации 0,05 мг/мл при плотности энергии лазера 10 Дж/см^2 не вызывает каких-либо патологических изменений со стороны сетчатки и других внутриглазных структур.

5. Результаты проведенных клинических, микробиологических и патоморфологических исследований, а также расчет значений количественной оценки признаков воспаления с их последующим сравнением и статистической обработкой указывают на то, что наиболее эффективным методом лечения экспериментального бактериального эндофтальмита является проведение витрэктомии в сочетании с интравитреальной АФДТ с ФС «Фотодитазин» и антибиотикотерапией.

Список литературы

1. Агуров П.В. C#. Сборник рецептов. – СПб.: БХВ – Петербург, 2007. – 432 с.: ил.

2. Алямовский А.А. SolidWorks. Компьютерное моделирование в инженерной практике. – СПб.: БХВ – Петербург, 2006. – 800 с.: ил.

3. Андреев Ю.В. Фотохимическая деструкция новообразованных сосудов роговицы (в эксперименте): Автореф. дис. …канд. мед. наук. – М., 1993.

4. Белый Ю.А., Терещенко А.В., Шкворченко Д.О., Макаров К.Н., Юдина Н.Н., Носкова Н.Х. Применение озонированных перфторорганических соединений в лечении эндофтальмита // Офтальмохирургия. – 2004. – № 1. – С. 31-34.

5. Белый Ю.А., Терещенко А.В., Володин П.Л., Каплан М.А. Экспериментальное изучение препарата «Фотодитазин» для фотодинамической терапии в офтальмологии // Лазерная медицина. – 2005. –

Том 9. – № 2. – С. 46-49.

6. Белый Ю.А., Терещенко А.В., Плахотний М.А., Кучеров А.А. Математическая модель витреальной полости глаза // III Всероссийская науч. конф. молодых ученых с участ. иностр. специалистов «Актуальные проблемы офтальмологии»: Сб. науч. ст. / под ред. Х.П. Тахчиди. – М., 2008. – С. 209-210.

7. Белый Ю.А. ,Терещенко А.В., и др. Лечение бактериальных язв роговицы методом локальной ФДТ // Новые технологии в офтальмологии. – Казань, 2008.

8. Борзенок С.А., Мороз З.И., Змызгова А.В. Озонотерапия в офтальмологии: Пособие для врачей. – Москва, 2000. – 36 с.

9. Будзинская М.В., Шевчик С.А., Лихванцева В.Г. и др. Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия с препаратом Фотосенс эпибульбарной меланомы в эксперименте // РБЖ. – 2004. – Т.3. – № 2. – С. 47.

10. Быков В.П., Малаев А.А., Южаков А.М., Маматов О.В. Максимальные нетоксичные дозы антибиотиков и противогрибковых препаратов необходимые для приготовления инфузионной жидкости для проведения витрэктомии при эндофтальмите // Клиника, диагностика и лечение проникающих и осколочных ранений глаза, осложненных инфекцией: Тез. докл. науч.-практ. конф. – Дагомыс, 1994. – С. 18-19.

11. Величко В.А. Эндофтальмит. Некоторые аспекты этиологии // Офтальмология. – 2004. – Том 1. – №2. – С. 44-52.

12. Возовиков И.Н., Андреева Р.В., Кузьмина С.Г. Фотодинамическая терапия в лечении и профилактике атеросклеротических изменений в сосудах // Росс. Физиол. журнал им. И. М. Сеченова. – 2004. – Т. 90. – 5. – С. 569-76.

13. Волков В.В. Витреопусэктомия // Стекловидное тело в клинической офтальмологии: Сб. науч. трудов Вып. 2 / Под ред. проф. А.И. Горбаня – Л, 1979. – С. 73-75.

14. Выгодский М.Я. Справочник по высшей математике. – М.: Государственное издательство технико-теоретической литературы, 1957. – 783 с.

15. Гогодзе М.Г. Применение озона в лечении посттравматических и послеоперационных эндофтальмитов: Дисс. ... канд. мед. наук. – М, 2000. – 123 с.

16. Горбань А.И., Джалиашвили О.А. Микрохирургия глаза: ошибки и осложнения. – СПб, 1993. – 55 с.

17. Гундорова Р.А. Особенности лечения травм глаза и их последствий методом закрытой витрэктомии // Офтальмол. журн. – 1985. – № 1. – С. 1-10.

18. Гундорова Р.А., Быков В.П. Закрытая витрэктомия в лечении посттравматического эндофтальмита // Офтальмол. журн. – 1984. – № 5. – С. 267-268.

19. Гундорова Р.А., Майчук Ю.Ф., Крамская З.И. О результатах исследования бактериальной флоры конъюнктивы глаза и пути профилактики внутриглазной инфекции // Вестн. офтальмол. – 1980. – № 6. – С. 55-57.

20. Гундорова Р.А., Малаева А.А., Южаков А.М. Травмы глаза. – М.: Медицина, 1986. – 368 с.

21. Гусев Ю.А. Комплексное хирургическое лечение послеоперационных эндофтальмитов: Дисс. ... канд. мед. наук. – М, 1995.

22. Гыцу Ф.И., Бобу И.Ф., Боиштян В.Е. Лечение эндофтальмита способом длительного субсклерального орошения и дренирования // Офтальмол. Журн. – 1976. – №3. – С. 219-220.

23. Даниличев В.Ф. Современная офтальмология. – С-Петербург, 2000. – С. 564-568.

24. Дементьева Е.И, Угарова Н.Н., Кобболд П.Х. Измерение АТР в интактных клетках E. Coli, содержащих рекомбинантную люциферазу светляков // Биохимия. – 1996. – 61. – С. 1285-1293.

25. Егоров Е.А., ПрокофьеваМ.И., Егоров А.Е. и др. Применение фотодинамической терапии в лечении заболеваний переднего и заднего отрезка глаза // Вестн. офтальмологии. – 2003. – №2. – С.13-15.

26. Ефимова Е.Г., Чейда А.А., Гарасько Е.В. и др. Антимикробная фотодинамическая терапия, как модель специализированной помощи больным инфицированным микроорганизмам с множественной лекарственной устойчивостью // Физ. Мед. – 2006. – Т16. – №2. – С. 58-60.

27. Жукова О.В. Эффективность и отдаленные результаты применения цефтреаксина при хирургическом лечении эндофтальмитов // Офтальмохирургия. – 1991. – №1. – С. 60-61.

28. Жукова О.В., Ергунова Г.А. Состояние неспецифических факторов защиты больных с травматическим эндофтальмитом // Вестн. офтальмол. – 1989. – № 2. – С. 58-60.

29. Захаров В.Д. Витреоретинальная хирургия. – М, 2003. – 180 с.

30. Каплан М.А., Капинус В.Н., Романко Ю.С. и др. Фотодитазин – эффективный фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии // РБЖ. – 2004. – Т.3. – № 2. – С. 51.

31. Каранадзе И.А. Микробиологическая диагностика и профилактика раневой и послеоперационной инфекции // Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – Тбилиси, 1986. – 25 с.

32. Каторгина О.А., Бузало А.Ф. Эффективность димексида при проникающих ранениях глазного яблока, осложненных гнойной инфекцией // Тез. докл. международ. конф. – Одесса, 1981. – С. 32-34.

33. Кодзов М.Б., Малюта Г.Д. Ультразвуковое исследование при проникающих ранениях глаз // Офтальмол. журн. – 1985. – № 5. – С. 261.

34. Копаева В.Г., Андреев Ю.В., Ронкина Т.И. и др. Новый способ фотохимической деструкции новообразованных сосудов роговицы (экспериментальное исследование). // Офтальмохирургия. – 1997. – № 3. – С. 50-57.

35. Корнилова А.Ф., Федорищева Л.Е., Гришина Н.И. Длительная перфузия стекловидного при гнойном воспалении глаза // Офтальмол. Журн. – 1984. – № 5. – С. 270-272.

36. Лапина И.М. Применение озона для профилактики и лечения внутриглазной бактериальной инфекции: Дисс. ... канд. мед. наук. – М., 1996. – 162 с.

37. Логай И.М., Родин С.С. Экзогенный бактериальный эндофтальмит. – Одесса, Черноморье, 1996. – С. 152.

38. Майчук Ю.Ф., Южаков А.М., Людоговская Л.А., Каранадзе Н.А. Фармакокинетика антибиотика в жидкостях глаза в зависимости от способа введения и лекарственной формы гентамицина // Антибиотики. – 1984. – №5. – С. 386-391.

39. Мамиконян В.Р., Балаян М.Л., Будзинская М.В. и др. Возможности фотодинамической терапии в лечении грибковых поражений роговицы // Вестн. офтальмол. – 2007. – №5. – С. 25-28.

40. Метелицина И.П., Родин С.С. Роль лизосомальных протеаз в развитии интраокулярного воспаления при экзогенном бактериальном эндофтальмите // Офтальмол. журн. – 1992. – № 2. – С. 205-206.

41. Минц С.С. Интравитреальная антибиотикотерапия и микрохирургия в лечении травматических эндофтальмитов и проникающих ранений глаза: Автореф. дисс. … канд. мед. наук. – М., 1983. – 20 с.

42. Миронов А.Ф. Фотодинамическая терапия рака – новый метод диагностики и лечения злокачественных опухолей // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 8. – С. 33-38.

43. Михайлов А.И. Ранние клинические признаки раневой инфекции глаз // Офтальмол. журн. – 1984. – № 4. – С 262.

44. Нейгл Кристиан. C# 2005 для профессионалов. – М.: Вильямс, 2007. – 1376 с.: ил.

45. Нуритдинов В.А., Акмаева И.И. Количественная оценка парабульбарного метода введения лекарств // Вестн. офтальмол. – 1985. – №6. – С. 60-61.

46. Пометун Е. В. Использование метода фотодинамического воздействия на клетки в биолюминисцентном определении микроорганизмов и фотостерилизации. Дисс. … канд. хим. Наук. – Москва, 2005. – С. 11-37.

47. Прохоренко В.П. SolidWorks. Практическое руководство. – М.: ООО Бином-Пресс, 2004. – 448 с.: ил..

48. Решетников А. В., Иванов А. В., Абакумова О. Ю. и др. Оценка биологических свойств новых ФС хлоринового ряда // Использование лазеров для диагностики и лечения заболеваний: Научно-информационный сборник (приложение к бюллетеню «Лазер – информ»). – 2001. – № 3. С. 34-40.

49. Родин С.С. Современные подходы к лечению экзогенного бактериального эндофтальмита // Офтальмол.журн. – 1992. – №4. – С. 235-237.

50. Рывкин А.А. Справочник по математике. – М.: Высшая школа, 1964. – 520 с.

51. Терещенко А.В., Белый Ю.А., Шкворченко Д.О. и др. Экспериментальное определение концентрации растворенного озона в барбартированном перфторполиэфире ДК – 164 // Боевые повреждения органа зрения: Материалы науч. конф. – СПб., 1999. – С. 107-108.

52. Терещенко А.В., Белый Ю.А., Володин П.Л., каплан М.А. Фотодинамическая терапия с фотосенсибилизатором «Фотодитазин» в офтальмологии.// Под ред. проф. Х.П. Тахчиди. – Калуга, 2008. – С. 10-37.

53. Толстых П.И., Корабоев У.Н., Шехтер А.Б. и др. Экспериментальное изучение влияния фотодинамической терапии на заживление гнойных ран // Лазерная медицина. – 2001. – Т.5. – Вып. 2. – С. 8-13.

54. Федорищева Л.Е. Прогнозирование инфекционных осложнений при

прободных ранениях глаза, их лечение: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. – М., 1994. – 37 с.

55. Федоров С.Н., Глинчук Я.И., Чичерова Л.К. Лечение послеоперационных эндофтальмитов при артифакии методом витрэктомии и интравитреального введения гентамицина // Офтальмол. журн. – 1984. – № 5. – С. 264-267.

56. Хакимов А.М. Эндофтальмит в хирургии катаракты // Офтальмохирургия. – 2008. – № 2. – С. 48-54.

57. Хорошилова И.П., Вериго Е.Н. Инфекционный гнойный эндофтальмит при проникающем ранении глаза как причина энуклеации // Вестн. офтальмол. – 1986. – № 1. – С. 40-42.

58. Худяков А.Ю., Егоров В.В. Эффективность силиконовой тампонады витреальной полости в лечении эндофтальмита // Современные технологии лечения витреоретинальной патологии: Сб. науч. ст. – М., 2002. – С. 294-298.

59. Ченцова О.Б. Эндофтальмит // БМЭ / Под. ред. Б.В. Петровского – 3 изд. – М., Советская энциклопедия, 1986. – Т. 28. – С. 560-561.

60. Черняева Е.Б. и др. Механизмы взаимодействия фотосенсибилизаторов с клетками // Итоги науки и техники. Совр. Пробл. Лаз. Физ. М.:ВИНИТИ, 1990. – □ Т.3.

61. Шиловский О.В., Тузова Е.А., Казайкин В.Н. Хирургическое лечение хронических эндофтальмитов при артифакии // VIII съезд офтальмологов России: Тез. докл. – М, 2005. – 139 с.

62. Юдина Н.Н., Белый Ю.А., Терещенко А.В. Применение гипохлорита натрия в офтальмологии // Офтальмология. – 2007. – Т. 4. – №3. – С. 15-21.

63. Юдина Н.Н. Интравитреальное применение электролизного раствора гипохлорита натрия в ходе витрэктомии при лечении экзогенного бактериального эндофтальмита: Дисс. … канд. мед. наук. – М., 2005. – 148 с.

64. Южаков А.М. Профилактика и лечение внутриглазной бактериальной

инфекции: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. – М., 1984. – 31 с.

65. Aaberg T.M., Flynn H.W., Schiffman J., et al. Nosocomial acute onset postoperative endophthalmitis survey // Ophthalmol. 1998; 105: 1004-1010.

66. Akler M.E.., Vellend H, McNeely D.M. et al. Use of fluconazole in the treatment of candidal endophthalmitis // Clin Infect Dis. 1995;20(3):657-64.

67. Albert D.M., Jakobiec F.A.: Postoperative Endophthalmitis. In: Principles and Practice of Ophthalmology. W B Saunders Co; 2000: 2441-2462.

68. Alexiades-Armenakas M.R., Geronemus R.G. Laser-mediated photodynamic therapy of actinic cheilitis // J Drugs Dermatol. 2004; 3 (5):548-51.

69. Alfaro D.V., Roth D., Liggett P.E.: Posttraumatic endophthalmitis. Causative organisms, treatment, and prevention // Retina 1994; 14(3): 206-11.

70. Al-Omran A.M., Abboud E.B., Abu El-Asrar A.M. Microbiologic spectrum and visual outcome of posttraumatic endophthalmitis // Retina. 2007;27(2):236-42.

71. Alves Eliana, Costa Liliana, Carla MB Carvalho. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins // BMC Microbiology 2009, 9:70.

72. Anand A.R., Therese K.L., Madhavan H.N. Spectrum of etiological agents of postoperative endophthalmitis and antibiotic susceptibility of bacterial isolates // Indian J Ophthalmol. 2000;48(2):123-8.

73. Ashkenazi I., Melamed S., Avni I. et al. Risk factors associated with late infection of filtering blebs and endophthalmitis // Ophthalmic. Surg. 1991;22(10):570-574.

74. Barbazetto I.A., Lee T.C., Rollins I.S. et al. Treatment of choroidal melanoma using photodynamic therapy // Am J Ophthalmol. 2003;135(6):898-9.

75. Benz M.S., Scott I.U., Flynn H.W. Jr, Unonius N., Miller D. Endophthalmitis isolates and antibiotic sensitivities: a 6 – year review of culture – proven cases // Am J Ophthalmol. 2004;137(6): 1169-70.

76. Bernard H., Doft M.D., Stephen R. Diabetes and Postoperative

Endophthalmitis in the Endophthalmitis Vitrectomy Study // Arch Ophthalmol. 2001;119(5):650-656.

77. Blinder K.J., Blumenkranz M.S., Bressler N.M. et al. Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in pathologic myopia: 2-year results of a randomized clinical trial – VIP report no. 3 // Ophthalmology. 2003;110(4):667-73.

78. Bombelli C., Bordi F., Ferro S. et al. New cationic liposomes as vehicles of m-tetrahydroxyphenylchlorin in photodynamic therapy of infectious diseases // Mol Pharm. 2008 Jul Aug;5(4):672-9.

79. Brozou C.G., Karabatakis V., Giannousis M. et al. The efficacy of intravitreal povidone iodine application in experimental Staphylococcus epidermidis endophthalmitis // Ophthalmic Res. 2009;41(4):181-5.

80. Callegan M.C., Engelbert M., Parke W. et al. Bacterial Endophthalmitis: Epidemiology, Therapeutics, and Bacterium – Host Interactions // Clinical Microbiology Reviews 2002;15:111-124.

81. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy. I. Photosensitizers, photochemistry and cellular localization // Photodiagn. Photodyn. 2004. Ther. 1:279-293.

82. Ceburkov O., Gollnick H. Photodynamic therapy in dermatology // European Journal of Dermatologie. 2002: ;10(7):568-576.

83. Chakrabarti A., Shivaprakash M.R., Singh R. et al. Fungal endophthalmitis: fourteen years' experience from a center in India // Retina. 2008;28(10):1400-7.

84. Chan Y., Lai C.H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy // Lasers Med Sci. 2003;18(1):51-5.

85. Chiquet C., Cornut P.L., Benito Y. et al. Eubacterial PCR for bacterial detection and identification in 100 acute postcataract surgery endophthalmitis // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008 May;49(5):1971-8.

86. Chiquet C., Lina G., Benito Y. et al. Polymerase chain reaction identification in aqueous humor of patients with postoperative endophthalmitis // J Cataract

Refract Surg. 2007 Apr;33(4):635-41.

87. Conway B.P., Campochiaro P.A. Macular infarction after endophthalmitis treated with vitrectomy and intravitreal gentamicin // Arch.Ophthalmol. 1986;104(2): 367-371.

88. Das T., Choudhury K., Sharma S. et al. Clinical profile and outcome in Bacillus endophthalmitis // Ophthalmology. 2001; 108(10): 1819-1825.

89. Davis J.L., Koidou Tsiligianni A., Pflugfelder S.C. et al. Coagulase-negative staphylococcal endophthalmitis. Increase in antimicrobial resistance // Ophthalmology. 1988; 95(10):1404-1410.

90. Demidova, T.; Hamblin, M. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation // Antimicrob. Agents Chemother. 2005:49:2329-2335.

91. Demidova, T.N.; Hamblin, M.R. Photodynamic inactivation of Bacillus spores, mediated byphenothiazinium dyes // Appl. Environ. Microbiol. 2005;71:6918-6925.

92. Donnelly R.F., McCarron P.A., Tunney M.M. Antifungal photodynamic therapy // Microbiol Res. 2008;163(1):1-12.

93. Eifrig C.W., Flynn H.W.Jr., Scott I.U., Newton J. Acute-onset postoperative endophthalmitis: review of incidence and visual outcomes (1995 – 2001) // Ophthalmic. Surg. Lasers 2002;33(5): 373-378.

94. Embleton ML, Nair SP, Cookson BD, Wilson M. Antibody-directed photodynamic therapy of methicillin resistant Staphylococcus aureus // Microb Drug Resist. 2004 Summer;10(2):92-7.

95. Embleton M.L., Nair S.P., Heywood W. et al. Development of a novel targeting system for lethal photosensitization of antibiotic-resistant strains of Staphylococcus aureus // Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(9):3690-6.

96. Endophthalmitis Research Group. Microbiologic spectrum and susceptibility of isolates: part II. Posttraumatic endophthalmitis // Am J Ophthalmol.

1999;128(2):242-4.

97. Endophthalmitis Vitrectomy Study Group: Results of the Endophthalmitis Vitrectomy Study. A randomized trial of immediate vitrectomy and of intravenous antibiotics for the treatment of postoperative bacterial endophthalmitis // Arch Ophthalmol 1995; 113(12): 1479-96.

98. Engelbert M., Mylonakis E., Ausubel F., Calderwood S., Gilmore M. Contribution of Gelatinase, Serine Protease, and fsr to the Pathogenesis of Enterococcus faecalis Endophthalmitis // Infection and immunity. 2004:72(6):3628-3633.

99. Ermis S.S., Cetinkaya Z., Kiyici H., Ozturk F. Treatment of Staphyiococcus Epidermidis Endophtalminis with Intravitreal Monoflocsacin in a Rabbit Model // Tohoku J. Exp. Med. 2005;205(3):223-229.

100. Ernest J., Rejmont L., Nemec P. Epidemic endophthalmitis after cataract surgery // Eur. J. Ophthalmol. 2002;12(3):225-227.

101. Forster R. Experimental postoperative endophtalmitis. Tr.Am.Ophth. Soc. vol. LXXXX, 1992 .p 520.

102. Francis B.A., DiLoreto D.A., Chong L.P., Rao N. Lateonset bacteria endophthalmitis following glaucoma drainage implantation // Ophthalmic. Surg. Lasers. Imaging. 2003;34(2): 128-130.

103. Fridkin, S. K. Vancomycin-intermediate and -resistant Staphylococcus aureus: what the infectious disease specialist needs to know // Clin. Infect. Dis. 2001;32:108-115.

104. Galloway G., Ramsay A., Jordan K., Vivian A. Macular infarction after intravitreal amikacin: mounting evidence against amikacin // British Journal of Ophthalmology 2002;86:242-248.

105. George P. Tegos, Michael R. Hamblin Phenothiazinium Antimicrobial Photosensitizers Are Substrates of Bacterial Multidrug Resistance Pumps // Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(1):196-203.

106. George P. Tegos, Masahiro Anbe, Changming Yang et al. Protease-Stable

Polycationic Photosensitizer Conjugates between Polyethyleneimine and Chlorin(e6) for Broad – Spectrum Antimicrobial Photoinactivation // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2006;50(4):1402-1410.

107. Grotti A.W., Photodynamic lipid peroidation in biological systems // Photochemistry and Photobiology. 1990;51:497-509.

108. Hansch A., Frey O., Gajda M. et al. Photodynamic treatment as a novel approach in the therapy of arthritic joints // Lasers Surg Med. 2008;40(4):265-72.

109. Hariprasad S.M., Mieler W.F., Holz E.R. et al. Determination of vitreous, aqueous, and plasma concentration of orally administered voriconazole in humans // Arch Ophthalmol. 2004;122(1):42-7.

110. Hua G., Pennesi M., Shah K. et al. Safety of intravitreal voriconazole: electroretinographic and histopathologic studies // Trans Am Ophthalmol Soc. 2003;101:183-9.

111. Huber-Spitzy V., Aricker-Mettinger E., Herkner K. et al. Diagnosis and therapy of bacterial endophthalmitis and inflammation marcers. // Infection. 1992;20(3):122-127.

112. Jaeger E.E., Carroll N.M., Choudhury S. et al. Rapid detection and identification of Candida, Aspergillus, and Fusarium species in ocular samples using nested PCR // J. Clin. Microbiol. 2000;38(8):2902-2908.

113. Jonas J.B., Spandau U.H., Schlichtenbrede F. Short-term complications of intravitreal injections of triamcinolone and bevacizumab // Eye. 2008;22(4):590-1.

114. Jori G., Fabris C., Soncin M. et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications // Lasers Surg Med. 2006 Jun;38(5):468-81.

115. Jurklies B., Anastassiou G., Ortmans S. et al. Photodynamic therapy using verteporfin in circumscribed choroidal haemangioma // Br J Ophthalmol. 2003;87(1):84-89.

116. Kodjikian L., Roques C., Pellon G. et al. Bacterial adhesion to intraocular lenses and endophthalmitis prevention: review of the literature // J. Fr. Ophtalmol.

2006;29(1):74-81.

117. Kunimoto D.J., Das T. Sharma. S. Jalal S., Rao T.N. Microbiological spectrum and suscebility of isolates. Posttraumatic endophthalmitis // Am. J. Ophthalmol. 1999;128(2):292-294.

118. Kusbeci T., Avci B., Cetinkaya Z. et al. The effects of caspofungin and voriconazole in experimental Candida endophthalmitis // Curr Eye Res. 2007;32(1):57-64.

119. Lambrechts S.A.., Aalders M.C., Verbraak F.D. et al. Effect of albumin on the photoinactivation of microorganisms by a cationic porphyrin // J Photochem Photobiol. 2005;79:5157.

120. Lasocki K., Szpakowska M., Grzybowski J., Graczyk A. Examination of antibacterial activity of the photoactivated arginine haematoporphyrin derivative // Pharmacol Res. 1999; 39 (3):181-4.

121. Lieb D.F., Scott I.U., Flynn H.W. et al. Open globe injuries with positive intraocular cultures: factors influencing final visual acuity outcomes // Ophthalmology. 2003;110(8):1560-1566.

122. Lim J.H., Sangtam T., George S.M., Eong K.A. Pseudomonas aeruginosa endophthalmitis following cataract surgery // Indian J Ophthalmol. 2008;56:342.

123. Lipson R.L., Baldes E.J., Gray M.J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer // Cancer. 1967;(20):2255-2257.

124. Lohmann C.P., Heeb M., Linde H.J., Cabel V.P. Diagnosis of infectious endophthalmitis afte cataract surgery by polymerase Chain reaction // J.Cataract.Refract.Surg. 1998;24(6):821-826.

125. Luttrull J.K., Wan W.L., Kubak B.M. et al. Treatment of ocular fungal infections with oral fluconazole // Am J Ophthalmol. 1995;119(4):477-81.

126. Maisch T., Bosl C., Szeimies R.M. et al. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells // Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(4):1542-52.

127. Maisch T., Szeimies R.M., Lehn N., Abels C. Antibacterial photodynamic therapy A new treatment for bacterial skin diseases? // Hautarzt. 2005;(5):42-48.

128. Malik, Z., Ladan H., Nitzan Y. Photodynamic inactivation ofgram-negative bacteria: problems and possible solutions // J. Photochem. Photobiol. Biol. 1992;14:262-266.

129. Mandelbaum S., Forster R.K. Postoperative Endophthalmitis // Int.Ophthalmol.Clinics. 1987;27(2):95-106.

130. Martin D.F., Ficker L.A., Aguilar H.F. et al. Vitreous cefazolin levels after intravenous injection. Effects of inflammation, repeated antibiotic doses and surgery // Arch.Ophthalmol. 1990;108(3): 411-414.

131. Meisel P., Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art // J Photochem Photobiol B. 2005;79(2):159-70.

132. Merchat M., Bertolini G., Giacomini A. et al. Meso-Substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria // J. Photochem. Photobiol. 1996;32:153-157.

133. Meyer C.H., Mennel S., Eter N. Incidence of endophthalmitis after intravitreal Avastin injection with and without postoperative topical antibiotic application // Ophthalmologe. 2007;104(11):952-7.

134. Miller J., Ruockonen P., Schellenbeck., et al. Treatment of rubeosis iridis with photodynamic therapy with verteporfin: a new therapeutic and prophylactic option for patient with the risk of neovascular glaucoma? // Ophtalmol. Res. 2003;35.

135. Nagaki Y., Hayasuku, Kodoi C., et al. Bacterial endophthalmitis after small – incision cataract surgery. Effects of incision placement and intraocular lens types // J Cataract Refract Surg. 2003;29;20-26.

136. Ng J.Q., Morlet N., Pearman J.W., et al: Management and outcomes of postoperative endophthalmitis since the endophthalmitis vitrectomy study: the Endophthalmitis Population Study of Western Australia (EPSWA)'s fifth report // Ophthalmology 2005;112(7):1199-206.

137. Nikolaos S. Soukos, Laurie Ann Ximenez-Fyvie, Michael R. Hamblin et al. Targeted Antimicrobial Photochemotherapy // Antimicrob Agents Chemother. 1998;42(10):2595-2601.

138. Nitzan Y., Ashkenazi H. Photoinactivation of Acinetobacter baumannii and Escherichia coli by cationic hydrophilic porphyrin at various light wavelengths // Current Microbiology. 2001;42:408-414.

139. Ozdamar A., Aras C., Ozturk R., Akin E., Karacorlu M., Ercikan C. In vitro antimicrobial activity of silicone oil against endophthalmitis-causing agents // Retina. 2001; 21(1):92-3.

140. Parsons C., McCoy C.P., Gorman S.P. et al. Anti-infective photodynamic biomaterials for the prevention of intraocular lens-associated infectious endophthalmitis // Biomaterials. 2009 Feb;30(4):597-602.

141. Pervaiz S. Reactive oxygen-dependent production of novel photochemotherapeutic agents // Faseb J. 2001;15:612-617.

142. Peyman G.A., Schulman J.A. Intravitreal Drug Therapy // Jap.J.Ophthalmol. 1989; 33(4): 392-394.

143. Raab O. 1900. Ueber die Wirkung fluorizierender Stoffe auf Infusorien // Z. Biol. 39:524-546.

144. Reddi E., M. Ceccon G., Valduga G. et al. Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins // Photochem. Photobiol. 2002;75:462-470.

145. Roberts C.W., McDonnell P.J., Pascucci S.E. et al. Antibacterial therapy and intraocular surgery: problems and decisions // Ophthalmol.Times.2002; 27(Suppl. 5):16.

146. Sakamoto T.K., Cruess A.F., Zoutman D.E., Evans G.A. Clindamycin-resistant Bacillus endophthalmitis // Can. J. Ophthalmol. 1993;28(7):339-342.

147. Saskia A. G. Lambrechts, Maurice C. G. Aalders, Diana H. Langeveld. Effect of Monovalent and Divalent Cations on the Photoinactivation of Bacteria with

meso-Substituted Cationic Porphyrins // Photochemistry and Photobiology. 2004;79(3): 297-302.

148. Satger D., Pégourié P., Romanet J.P. et al. Ultrasound imaging in the management of endophthalmitis // J Fr Ophtalmol. 2007;30(10):1037-48.

149. Schastak S., Gitter B., Handzel R. et al. Improved photoinactivation of gram-negative and gram-positive methicillin-resistant bacterial strains using a new near-infrared absorbing meso-tetrahydroporphyrin: a comparative study with a chlorine e6 photosensitizer photolon // Methods Find Exp. Clin. Pharmacol. 2008;30(2):129-133.

150. Sharma S., Saffra N.A., Chapnick E.K. Post traumatic polymicrobial endophthalmitis, including Neisseria subflava // Am. J. Ophthalmol. 2003;136(3):554-555.

151. Shingleton B.J., Heltzer J., O'Donoghue M.W. Outcomes of phacoemulsification in patients with and without pseudoexfoliation syndrome // J Cataract Refract Surg. 2003;29:1080-1085.

152. Taban M., Behrens A., Newcomb R.L. Acute endophthalmitis following cataract surgery: a systematic review of the literature // Arch Ophthalmol. 2005; 123(5): 613-620.

153. Tang H.H., Yip P.P., Woo C.F. et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus endophthalmitis after phacoemulsification in a continuous ambulatory peritoneal dialysis patient // J Cataract Refract Surg. 2008;34(10):1806-1808.

154. Tang, H.M.; Hamblin, M.R.; Yow, C.M. A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens // J. Infect. Chemother. 2007; 13:87-91.

155. Wainwright M., Phoenix D.A., Laycock S.L., Wareing D.R., Wright P.A. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus // FEMS Microbiol Lett. 1998;160 (2):177-81.

156. Wilson M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections // Photochem Photobiol

Sci. 2004;3(5):412-8.

157. Wykoff C.C., Flynn H.W., Miller D. et al. Exogenous fungal endophthalmitis: microbiology and clinical outcomes // Ophthalmology. 2008;115(9):1501-1507.

158. Zanin I.C., Goncalves R.B., Junior A.B. et al. Susceptibility of Streptococcus mutans biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study // Antimicrob Chemother. 2005;56(2):324-30.