



УДК 615.454'457:579.882.015.14

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ АНТИХЛАМИДИЙНОЙ АКТИВНОСТИ ГЛАЗНОГО ГЕЛЯ АЗИТРОМИЦИНА

Р.М. ГУСОВ¹**И.В. НУРАЛОВА²****Б.А. ГУСОВА¹**

¹⁾ *Пятигорский филиал
Волгоградского государственного
медицинского университета*

²⁾ *ФГУ Государственный научно-
исследовательский испытательный
институт военной
медицины МО РФ, г. Санкт-
Петербург*

e-mail: 61312@mail.ru

В работе сообщается о результатах гистологических исследований роговицы и конъюнктивы, проведенных с целью определения эффективности лечения хламидийного поражения глаз кроликов разработанным глазным гелем азитромицина. Гистохимически на срезах тканей глаза и в соскобах с конъюнктивы сопоставлена эффективность разработанного геля с препаратом сравнения.

Ключевые слова: азитромицин, глазной гель, хламидийная инфекция, морфологические исследования, люминесцентная микроскопия

Введение. Хламидийные поражения в настоящее время являются одной из серьезных медико-социальных проблем и превосходят по частоте многие заболевания, уступая место респираторным вирусным инфекциям [1]. Учитывая высокую этиологическую роль хламидий в патологии человека, ВОЗ рассматривает хламидиозы как одну из актуальных проблем медицинской науки и здравоохранения [2].

По данным литературы ежегодно в нашей стране хламидийным конъюнктивитом заболевают около 1,5 млн. человек. Частота конъюнктивитов хламидийной этиологии колеблется от 10 до 20% всех конъюнктивитов у взрослого населения [3]. На сегодняшний день во многих развитых странах прослеживается стойкая тенденция к росту глазной хламидийной инфекции и значительное омоложение пораженного контингента [4]. Кроме того, наблюдается значительный рост резистентности микроорганизмов, вызывающих поражения глаз, к часто применяемым в офтальмологической практике антибактериальным препаратам [5, 6].

Приведенные данные свидетельствуют о необходимости использования при создании антибактериальных препаратов для лечения офтальмохламидиоза высокоэффективных антибиотиков. Одним из таких антибиотиков, обладающих высокой антихламидийной активностью и ранее не применявшихся в офтальмологической практике, является азитромицин [7, 8]. Все упомянутые факты явились основанием выбора азитромицина в качестве антимикробного агента в разработанном глазном геле.

Целью данной работы явилось проведение гистологических и гистохимических исследований конъюнктивы и роговицы глаз кроликов, инфицированных хламидиями с целью подтверждения данных об антихламидийной активности разработанного геля азитромицина, полученных нами ранее при проведении предварительных фармакологических исследований.

Материалы и методы. Исследования проведены на 12 кроликах (24 глазах, инфицированных *S. trachomatis*) породы шиншилла массой 2,5-3кг. С учетом высокой контагиозности *S. trachomatis* животные содержались в специальном виварии, находящемся в зоне, предназначенной для работы с карантинными инфекциями, с естественным 12 – часовым светотемновым режимом, со свободным доступом к воде и пище, при температуре воздуха 20-21°C. Содержание животных соответствовало правилам надлежащей лабораторной практики – Приказу МЗ РФ №267 от 19.06.2003г. «Об утверждении лабораторной практики».

Модель хламидийного конъюнктивита воспроизводили путем однократной интраконъюнктивальной инъекции 0,1 мл 5% суспензии оболочек желточных мешков куриных эмбрионов, зараженных штаммом серотип L-2 *Chlamydia trachomatis*. Предварительно проводилась местная анестезия путем двукратной инстилляцией 1% дикаина.

Инфицированные животные в эксперименте были разделены на четыре группы следующим образом: терапию первой группы проводили гелем азитромицина 1%, второй – препаратом сравнения – мазью эритромицина 10000 ЕД в 1г, третья группа служила контролем активности основы геля, четвертая – контролем без лечения.



Ежедневно гель азитромицина, мазь эритромицина и основу геля в объеме 0,15 мл с помощью стерильного шприца (без иглы) вводили в конъюнктивальный мешок двукратно с интервалом в десять часов.

Во время эксперимента наблюдали за лабораторными животными и отмечали, что общая толерантность, определяющаяся по изменениям поведения (агрессивность, вялость), общее состояние (аппетит, вес, внешний вид, состояние шерсти) не изменялись. По окончании эксперимента животных выводили из опыта под гексеналовым наркозом (20-30мг на 1кг веса) путем введения в ушную вену воздуха.

Для проведения гистологических исследований энуклеированные глаза кроликов фиксировали в 10% растворе формалина, затем по общепринятой методике материал подвергали обезвоживанию и заливали парафином. Готовили гистологические срезы конъюнктивы и роговицы толщиной 3-5 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином. Готовые препараты просматривали на лабораторном микроскопе Leica MT 2500 с фоторегистрацией получаемых изображений.

При подготовке образцов для люминисцентной микроскопии материал соскоба с конъюнктивы экспериментальных животных наносили на поверхность стерильного обезжиренного предметного стекла. Мазок фиксировали этиловым спиртом, после чего подсушивали 20 минут при комнатной температуре. После испарения спирта на стекло наносили раствор антител к хламидиям «Хламискан» (производства ЛАБ – диагностик, Россия). Мазки помещали в стеклянную камеру, насыщенную парами воды и ставили в термостат при температуре 37±2,5 °С на 20 минут. Затем стекла погружали на 5 минут в фосфатный буферный раствор с рН, равным 7,4. Мазки ополаскивали дистиллированной водой, подсушивали при комнатной температуре.

Готовые препараты микроскопировали на лабораторном микроскопе Leica MT 2500 с масляной иммерсией, при ультрафиолетовом освещении, с увеличением 630 крат. Для оценки результатов иммунофлуоресцентной микроскопии использовали общепринятую шкалу, представленную в следующей таблице.

Таблица 1

Шкала оценки результатов флуоресцентной микроскопии

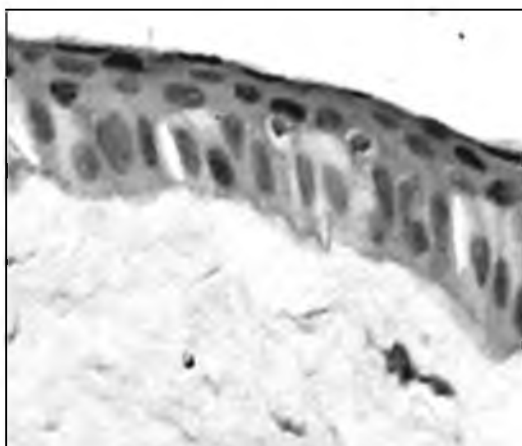
Кол-во +	Описание флуоресценции	Количество элементарных телец в поле зрения
++++	Яркая люминесценция изумрудно – зеленым цветом; вокруг элементарных телец возбудителя могут быть отчетливо видны светящиеся «ободки»	Свыше 100
+++	Достаточно яркая люминесценция желто – зеленым цветом, периферические «ободки» у элементарных телец могут еще выявляться	От 50 до 100
++	Слабая люминесценция, возбудитель выявляется еще достаточно четко, но периферические «ободки» у элементарных телец почти не видны	От 10 до 50
+	Люминесценция очень слабая, цвет неопределенный, возбудитель различим плохо	До 10

Результаты и их обсуждение. При гистологическом исследовании, выполненном на 20 сутки эксперимента, выявлено, что при применении обоих вариантов лечения хламидийной инфекции антибиотиками (азитромицином и эритромицином) сохранялись незначительные очаги поражений роговицы и конъюнктивы; но, вместе с тем, в зависимости от варианта терапии они существенно различались по своей выраженности.

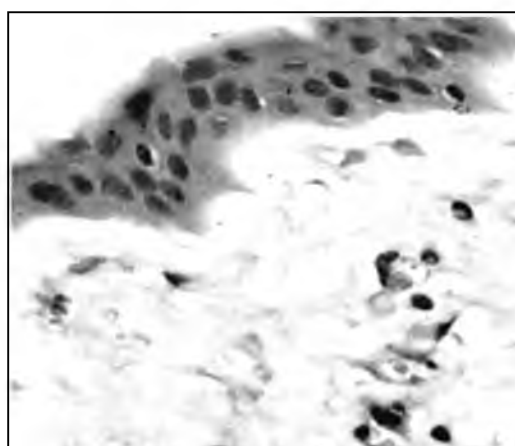
При терапии гелем азитромицина были выявлены дистрофически измененные клетки многослойного плоского неороговевающего эпителия роговицы с просветленной цитоплазмой, а также дезорганизация соединительной ткани с признаками воспалительной инфильтрации, единичными лимфоцитарно – макрофагальными инфильтратами в конъюнктиве.

При применении эритромициновой мази выявляли отек боуеновой мембраны, разволокнение коллагенового матрикса и активацию фибробластов в собственной пластинке роговицы кролика; гистологические изменения в конъюнктиве характеризовались неоваскуляризацией, наличием очаговых дистрофических изменений эпителия, в некоторых клетках которого выявляли хламидийные включения. Изменения структуры конъюнктивы и роговицы на 20 сутки эксперимента представлены на рис. 1 и 2.

Из рисунка видно, что при гистологическом исследовании роговицы воспалительный процесс на 20 сутки при лечении эритромицином по степени выраженности и глубине хламидийного поражения был значительно тяжелее того, который выявлен при терапии азитромицином.



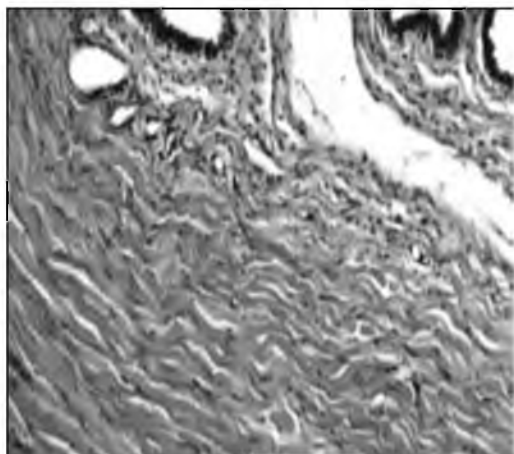
1



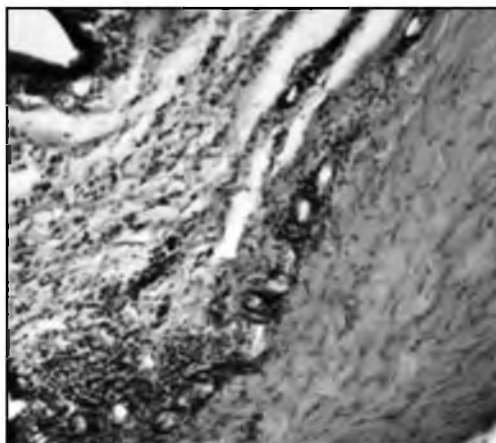
2

Рис. 1. Изменение структуры роговицы кролика на фоне терапии гелем азитромицина (1) и мазью эритромицина (2) при лечении хламидийной инфекции.
Окраска гематоксилин – эозином. Увеличение $\times 400$

На гистологических срезах конъюнктивы глаз кроликов, инфицированных *S. trachomatis*, лимфоцитарно – макрофагальный инфильтрат в субконъюнктивальной соединительной ткани на фоне лечения гелем азитромицина значительно менее выражен, чем в случае терапии мазью эритромицина, что видно на следующем рис. 2.



1



2

Рис.2. Изменения структуры конъюнктивы глаз кроликов при терапии хламидийного конъюнктивита гелем азитромицина (1) и мазью эритромицина(2) на 20 сутки эксперимента.
Окраска гематоксилин – эозином. Увеличение $\times 100$

Для гистохимического исследования срезы роговицы обрабатывали антихламидийными антителами, контрастировали синькой Эванса и родамином для выявления возбудителя в тканях глаза. Готовые препараты микроскопировали на лабораторном микроскопе при ультрафиолетовом освещении с фоторегистрацией получаемых изображений.

Проведение иммунофлуоресцентного исследования срезов роговицы показало принципиальные различия в эффективности проводимой антибактериальной терапии по степени контаминации роговицы микробными телами. Результаты исследования приведены на рис. 3.

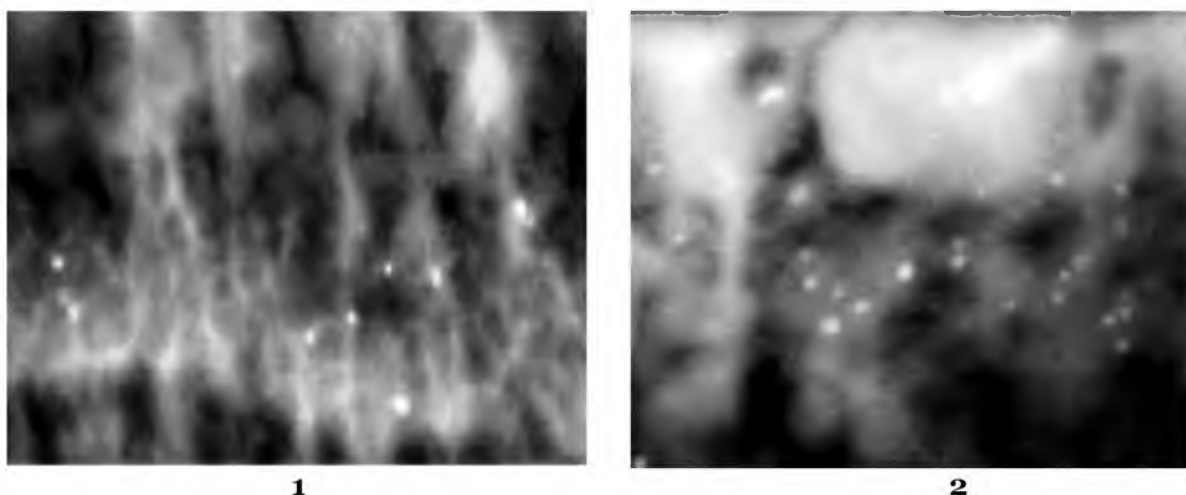


Рис. 3. Снижение количества флуоресцирующих очагов пролиферации хламидий в роговице после терапии гелем азитромицина (1) и мазью эритромицина (2). Обработка родоспецифичными антителами, меченными флуоресцеинизотиоцианатом с докраской родамином. Увеличение×1000

Из рисунка видно, что у животных, леченных эритромицином, отмечали более выраженный отек тканей и существенно большее количество микробных тел на единицу площади среза, тогда как применение геля азитромицина способствовало снижению выраженности отека роговицы и существенно уменьшало количество флуоресцирующих микробных тел.

Кроме того, для изучения эффективности терапии гелем азитромицина были проведены соскобы с конъюнктивы века экспериментальных животных. Методика пробоподготовки описана выше.

Данные, отражающие изменения численности очагов пролиферации клеток хламидий, полученные в результате флуоресцентной микроскопии мазков, представлены в следующей таблице 2.

Таблица 2

Динамика численности клеток *S.trachomatis* на фоне терапии хламидийного конъюнктивита

Препарат /контроль	Сроки наблюдения / численность возбудителя в поле зрения		
	4 день	10 день	20 день
Гель азитромицина	+++	++	+
Мазь эритромицина	+++	+++	++
Контроль без лечения	+++	++++	++++
Контроль с основой	+++	++++	++++

Из таблицы следует, что количество клеток *S.trachomatis* в конъюнктиве на 20 сутки терапии азитромицином было меньше по сравнению с их численностью при лечении препаратом сравнения, что доказывает более высокую антихламидийную активность геля азитромицина.

В отдельном эксперименте на интактных глазах определяли местно раздражающее действие разработанного геля азитромицина, который в объеме 0,1 мл вводили в конъюнктивальную полость глаз кроликов. Визуально оценивали раздражающее действие по времени появления, степени выраженности, длительности сохранения гиперемии и отека конъюнктивы, блефароспазма, слезотечения и влиянию на роговицу.

Апликация геля азитромицина на поверхность глаза вскоре после его нанесения вызывала слабо выраженную кратковременную гиперемию конъюнктивы глазного яблока и незначительный блефароспазм. Слезотечения, отека, изменений со стороны роговицы не наблюдалось. При гистологическом исследовании на срезах конъюнктивы и роговицы, на которые наносился гель, патологических изменений воспалительного или какого-либо другого характера



выявлено не было. Таким образом, нами показано, что при нанесении на интактный глаз гель азитромицина обладает слабо выраженным раздражающим действием, и переносимость тканями глаза предлагаемого геля вполне удовлетворительная.

Выводы. В результате проведенных исследований были сделаны следующие выводы:

- гистологические исследования срезов конъюнктивы и роговицы, инфицированных хламидиями глаз кроликов, позволили установить, что патологические изменения тканей при лечении гелем азитромицина выражены в меньшей степени, чем при терапии препаратом сравнения азитромицином;

- проведенные исследования свидетельствуют об отсутствии у разработанного геля азитромицина выраженного местно раздражающего действия;

- с помощью гистохимического метода иммунофлуоресценции доказано снижение численности клеток хламидий в роговице глаза на фоне терапии гелем азитромицина.

Таким образом, данные, полученные в результате проведенных исследований, коррелируют с предварительными фармакологическими результатами и свидетельствуют об эффективности разработанного геля азитромицина при лечении хламидийного поражения глаз, что позволяет сделать вывод о перспективности внедрения предлагаемой лекарственной формы в офтальмологическую практику.

Литература

1. Messmer E.M. Bacterial conjunctivitis – diagnosis and therapy update /E.M. Messmer [et al.] // *Klin. Monbl. Augenheilkd.* – 2012. – Vol. 229, №5. – P. 529 – 533.
2. Henrichfreise B. Infections with Chlamydia trachomatis / B. Henrichfreise [et al.] // *Med Monatsschr Pharm.* – 2012. – Vol. 35, №6. – P. 209 – 222.
3. Особенности медикаментозной терапии хронического хламидийного конъюнктивита у детей / Л.П. Прозорная [и др.] // *Клинич. офтальмология.* – 2009. – Т. 10, № 1. – С. 25 – 30.
4. Майчук Ю.Ф. Современная терапия конъюнктивитов у детей / Ю.Ф. Майчук // *Педиатрия приложение consilium medicum.* – 2007.- №2. – С.80 – 87.
5. Khan M. A. Molecular characterisation of methicillin – resistant Staphylococcus aureus (MRSA) from keratitis patients: a microbiological analysis / M. A. Khan [et al.] // *The British j. of ophthalmology.* – 2010. – Vol. 94, № 8. – P. 994 – 998.
6. Kim S.J. Antimicrobial resistance and ophthalmic antibiotics: 1-year results of a longitudinal controlled study of patients undergoing intravitreal injections. / S.J. Kim [et al.] // *Arch. Ophthalmol.* – 2011.- Vol.129, №9. – P. 1180 – 1188.
7. Mclean S. Effectiveness, tolerability and safety of azithromycin 1% in DuraSite for acute bacterial conjunctivitis / S. Mclean [et al.] // *Patient preference and adherence.* – 2010. – Vol. 13. – P.69- 76.
8. Garnock – Jones K. P. Azithromycin 1.5% ophthalmic solution: in purulent bacterial or trachomatous conjunctivitis / K. P. Garnock – Jones [et al.] // *Drugs.* – 2012. – Vol. 72, №3. – P.361 – 373.

SOME ASPECTS OF ANTICHLAMYDIAL ACTIVITY OF AZITHROMYCIN EYE GEL

R.M. GUSOV¹

I.V. NURALOVA²

B.A. GUSOVA¹

¹⁾ *Pyatigorsk branch of Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation*

²⁾ *Federal State Research Testing Institute of Military Medicine of the Russian Federation*

e-mail: 61312@mail.ru

In this paper we report about the results of histological studies of the cornea and conjunctiva, conducted to determine the effectiveness of treatment of chlamydial eye disease rabbits developed eye gel azithromycin. The efficiencies of the developed gel are compared histochemically in sections of the eye and conjunctival scrapings with the initial medication.

Keywords: azithromycin ophthalmic gel, chlamydia infection, morphological study, fluorescence microscopy