

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ГРИБКОВОГО КЕРАТОУВЕИТА С ЯЗВОЙ РОГОВИЦЫ, ОСНОВАННАЯ НА АНАЛИЗЕ ЭТИОЛОГИИ КЛИНИЧЕСКИХ НАБЛЮДЕНИЙ ГРИБКОВОГО КЕРАТИТА

Давлетшина Н.И.\*<sup>1,2</sup>, Самойлов А.Н.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет», Казань

<sup>2</sup> ГАУЗ «РКОБ МЗ РТ им. проф. Е.В. Адамюка», Казань

DOI: 10.25881/20728255\_2023\_18\_3\_100

**Резюме.** Обоснование. Большинство рекомендаций по лечению грибкового кератита основаны на неконтролируемых клинических исследованиях или экспериментах на лабораторных моделях кератомикоза. Отсутствие качественных воспроизводимых моделей грибкового кератита и язвы роговицы, а также средств количественной оценки терапевтического ответа затрудняет создание таких рекомендаций. Предлагаемый нами способ моделирования грибкового кератита основан на анализе этиологии грибковых агентов в серии клинических наблюдений микотических кератитов, обладает достоверной воспроизводимостью, что позволит применять его в целях изучения природы развития кератомикозов, течения патологического процесса, исходов, а, главное – способов его лечения.

**Цель.** Создать воспроизводимую экспериментальную модель грибкового поражения роговицы с учетом клинически значимой грибковой флоры.

**Материалы и методы.** Проведено экспериментальное исследование на кроликах породы «шиншилла», в результате которого разработана модель грибкового поражения роговицы, учитывающая клинически значимую в практике флору. В результате моделирования получен грибковый кератит с гипопионом, изъязвлением роговицы. Контроль микрофлоры производился культуральным, цитологическим, морфологическим способом. Забор материала производился непосредственно перед заражением, далее в процессе моделирования.

**Результаты.** Новый способ экспериментального моделирования позволяет достичь картины грибкового кератита с гипопионом, язвой роговицы за 5–6 процедур на 12–14-е сутки. Без лечения, начиная с 16-х суток эксперимента, у 40% животных сформировалась перфорация роговицы, что на наш взгляд, сопоставимо с течением агрессивного кератомикоза у пациентов без адекватного и своевременного лечения.

**Ключевые слова:** грибковый кератит, микотический кератит, кератомикоз, *Fusarium*, экспериментальная модель.

Экспериментальные модели грибкового поражения роговицы необходимы для изучения антимикробного действия, эффективности и токсичности на животных моделях инфекции. Отсутствие качественных воспроизводимых моделей грибкового кератита и язвы роговицы, а также средств количественной оценки терапевтического ответа затрудняет создание таких рекомендаций [1].

По сообщениям исследователей из разных стран мира, частота заболеваемости грибковым кератитом может достигать более 50% всех глазных микозов, особенно в тропических регионах. Если предположить, что все случаи с отрицательным микробиологическим посевом являются грибковыми, ежегодная заболеваемость составит 1,480,916 случаев (1,036,641–1,925,191) [2].

Известно более чем о 100 преобладающих видах грибов, способных вызвать окуломикозы, в зависимости от изучаемого географического района. Патогены включают

### EXPERIMENTAL MODEL OF MYCOTIC KERATOUVEITIS BASED ON THE ANALYSIS OF FUNGAL KERATITIS CLINICAL CASES

Davletshina N.I.\*<sup>1,2</sup>, Samoylov A.N.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> The Kazan State Medical University, Kazan

<sup>2</sup> The Republican Clinical Ophthalmological Hospital, Kazan

**Abstract.** Rationale. Most recommendations for the treatment of fungal keratitis are based on uncontrolled clinical trials or experiments on laboratory models of keratomycosis. The lack of high-quality reproducible models of fungal keratitis and corneal ulcer, as well as the means of quantifying the therapeutic response, makes it difficult to make such recommendations. The proposed method for modeling fungal keratitis is based on the analysis of the etiology of fungal agents in a series of clinical cases of mycotic keratitis, has reliable reproducibility, which will allow it to be used to study the nature of the development of keratomycosis, the course of the pathological process, outcomes, and, most importantly, methods of its treatment.

**Objective.** Develop a reproducible experimental model of fungal infection of the cornea, taking into account the clinically significant fungi.

**Methods.** An experimental study was carried out on rabbits of the "chinchilla" breed, as a result of which a model of fungal infection of the cornea was developed, taking into account the flora that is clinically significant in practice. As a result of modeling, fungal keratouveitis with hypopyon, corneal ulceration was obtained. Microflora control was carried out by cultural, cytological, morphological methods. The material was taken immediately before infection, then during the modeling process.

**Results.** A new method of experimental modeling allows to achieve a picture of fungal keratouveitis with hypopyon, corneal ulcer in 5–6 procedures on the 12th–14th day. Without treatment, starting from the 16th day of the experiment, 40% of the animals developed corneal perforation, which, in our opinion, is comparable to the course of aggressive keratomycosis in patients without adequate and timely treatment.

**Keyword:** mycotic keratitis, fungal keratitis, keratomycosis, *Fusarium*, experimental model.

2 основные формы: Мицелиарные (особенно — *Fusarium* и *Aspergillus*), которые обычно встречаются в тропических и субтропических зонах и Дрожжевые (в частности, *Candida*) [2; 3]. Большинство грибковых организмов, вызывающих поражения органа зрения, являются распространенными, сапрофитными организмами, и их инфекционная значимость описывается только в офтальмологической литературе [4].

Нами проведен анализ этиологии и противогрибковой чувствительности грибов в серии клинических случаев кератитов, резистентных к лекарственной терапии. Ретроспективный анализ включал 12 случаев (12 глаз), находившихся на лечении с августа 2018 по январь 2020 гг. (18 месяцев). Грибы были обнаружены в 12 случаях кератитов с резистентностью к терапии. Идентификацию возбудителя проводили методом прямой микроскопии, культуральным исследованием в микологической лабора-

\* e-mail: nargiza.d@bk.ru

тории, а также клиническими проявлениями. В 10 случаях обнаружены *Fusarium spp.*, в 1 случае — *Penicillium spp.*, в 1 случае — *Candida spp.* 100% грибов имели устойчивость к флуконазолу и амотерицину В [5].

**Цель:** Создание воспроизводимой экспериментальной модели кератомикоза *in vivo* для изучения механизмов заражения, течения патологического процесса, патологических исходов, разработки новых методик лечения.

### Материалы и методы

Экспериментальное моделирование проводилось на кроликах породы «советская шиншилла» с применением культуры грибов *Fusarium spp.*  $1,0 \times 10^6$  КОЕ/мл. Инокулом изготавливался из чистых, пяти суточных культур грибов *Fusarium solani*, выращенных на плотной питательной среде Сабуро. Инокулят предварительно растёрт в ступке. В стерильном изотоническом растворе хлорида натрия приготовлена взвесь микроорганизмов с конечной плотностью  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл, что соответствует 0,5 MF (измерение денситометром согласно данным изготовителя стандартов мутности bioMerieux). Эксперименты *in vivo* одобрены ЛЭК ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» МЗ РФ (№1 от 4.02.2020 года).

До начала эксперимента определена нормобиота конъюнктивы и роговицы кролика, которая включала *Aspergillus flavus*  $10^2$  КОЕ/мл; *Penicillium expansum*  $10^2$  КОЕ/мл; *S. aureus*  $10^1$  КОЕ/мл; *Enterobacteriaceae*  $10^1$  КОЕ/мл.

Методика моделирования заключается в том, что под местной анестезией 0,4% оксибупрокаина на роговицу накладывали смоченный в 5% спиртовом растворе формалина стерильный диск из гемостатической губки размером  $10 \times 10$  мм. Далее надевали мягкую контактную линзу (МКЛ) и оставляли на 24 часа. На следующий день удаляли МКЛ и диск гемостатической губки, а на поверхность роговицы в течение 3 суток инстилировали 0,1% раствор дексаметазона 4 раза в сутки. На 3-и сутки под местной инфильтрационной анестезией производили скарификацию эпителия роговицы размером  $10 \times 10$  мм, инсулиновым шприцем с интегрированной иглой 29G производили интрастромальную инъекцию 0,1 мл  $10^6$  КОЕ/мл клинической суспензии грибковых изолятов *Fusarium spp.* На роговицу инстилировали 2–3 капли 99% концентрата димексида. Следующим шагом производили орошение конъюнктивальной поверхности  $10^6$  КОЕ/мл клинической суспензией грибковых изолятов *Fusarium spp.*, включающей фрагменты мицелия, а также наносили на внутреннюю поверхность МКЛ 0,2–0,3 мл этой же суспензии. В завершении надевали МКЛ на роговицу, далее через 1 сутки за 5–6 процедур производили дополнительное заражение роговицы, орошая 99% концентратом димексида, свежей клинической суспензией грибковых изолятов *Fusarium spp.*  $10^6$  КОЕ/мл совместно с интрастромальной инъекцией, таким образом на 12-й–14-й день получали грибковый кератоеврит с гипопионим, язвой роговицы (Рис. 1, 2) [6; 7].

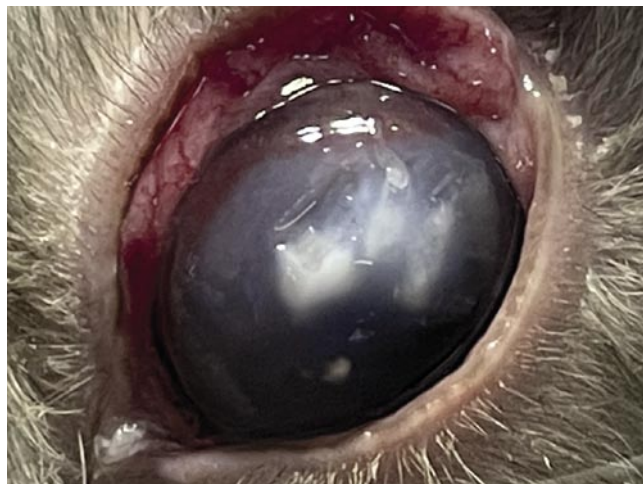


Рис. 1, 2. Кератоеврит с изъязвлением роговицы у кролика в результате экспериментального заражения по описанной методике.



Рис. 3. Перфорация язвы роговицы у кролика на 14-е сутки эксперимента.

На 16-е сутки эксперимента получена перфорация язвы роговицы, что, на наш взгляд, соответствует исходу патологического процесса в клинических случаях без адекватного и своевременного лечения (Рис. 3).

Давлетшина Н.И., Самойлов А.Н.  
 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ГРИБКОВОГО КЕРАТОУВЕИТА С ЯЗВОЙ РОГОВИЦЫ,  
 ОСНОВАННАЯ НА АНАЛИЗЕ ЭТИОЛОГИИ КЛИНИЧЕСКИХ НАБЛЮДЕНИЙ ГРИБКОВОГО КЕРАТИТА

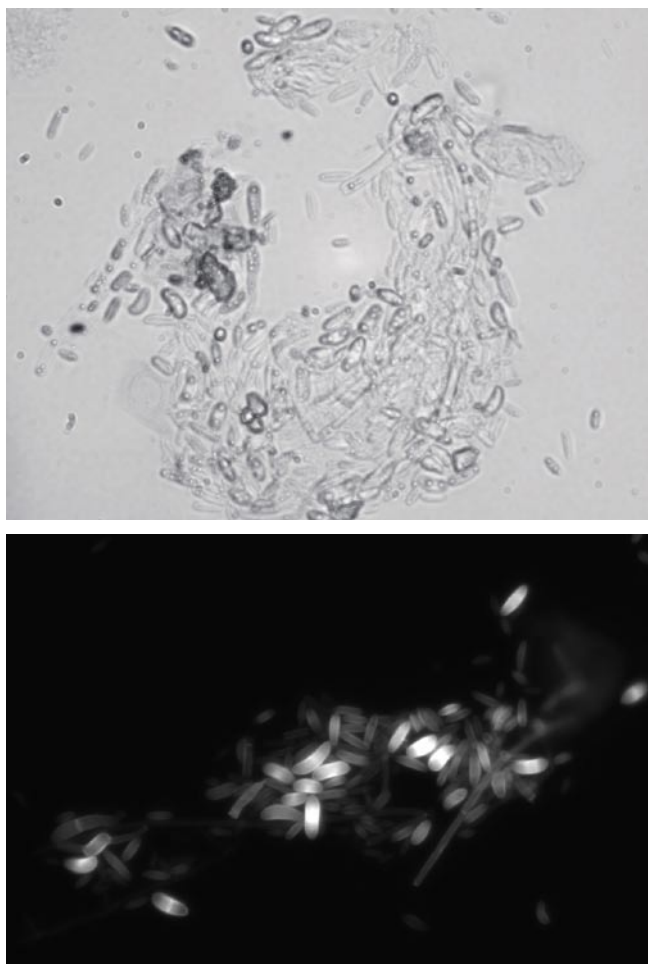


Рис. 4, 5. Морфологические элементы живых грибов *Fusarium spp.* при электронной прямой микроскопии (ув. 400).

Применение спиртового раствора формалина позволило полностью санировать конъюнктивальную полость экспериментальных животных, что было подтверждено культуральными данными в начале исследования. Получив химический ожог легкой степени, мы получили асептическое воспаление. Стоит отметить, что запустить инфекционно-воспалительный процесс в роговице здорового кролика оказалось крайне сложно ввиду высоких репаративных способностей. Инстиляции дексаметазона позволили снизить местные компенсаторные возможности, подавить активность иммунной защиты и предотвратить самостоятельную санацию условно-патогенного *Fusarium spp.* При электронной микроскопии соскобов с роговицы выявлено, что применение димексида способствовало повышению адгезии грибковых элементов к эпителию, боуеновой оболочке и строме, что позволило улучшить результативность контаминации (Рис 4–6).

Отсутствие мягкой контактной линзы приводило к самопроизвольной санации даже при выполнении вышеописанных условий. Интрастромальные инъекции позволили достичь картины агрессивного течения кератита, сопоставимого с клиническим. Все травмирующие этапы произведены под местной анестезией 0,4% оксибупрокаином. Ситуационно проводилась нейролептаналгезия внутримышечной инъекцией ксилазина гидрохлорида.

### Результаты

Заявленная методика позволяет воспроизвести глубокий грибковый кератоувеит с изъязвлением роговицы у кроликов с применением микроинвазивной травмы у экспериментальных животных.

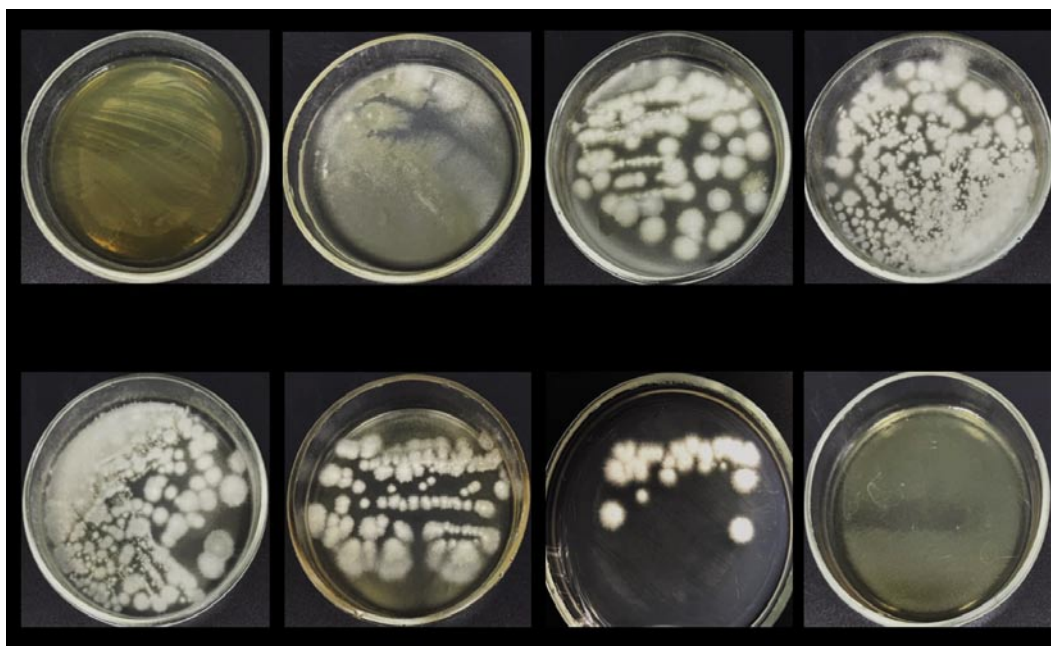


Рис. 6. Динамика культивирования *Fusarium spp.* в процессе моделирования.

## Выводы

*Fusarium spp.* является наиболее частый возбудителем грибковых кератитов в нашем регионе и представляет собой повышенный исследовательский интерес. Этапы подготовки оказались необходимы ввиду спонтанной санации и эпителизации, в том числе по причине условной патогенности *Fusarium spp.*

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов (The authors declare no conflict of interest).**

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kaufman H, Barron B, McDonald M. The Cornea, Second Edition. Boston: Butterworth-Heinemann, 1998. P.247-303.
2. Brown L, Leck AK, Gichangi M, Burton MJ, Denning DW. The global incidence and diagnosis of fungal keratitis. *Lancet Infect Dis.* 2021; 21(3): e49-e57. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30448-5.
3. Al-Hatmi AMS, Castro MA, Hoog GS, Badali H, Alvarado VF, Verweij PE, Meis JF, Zago VV. Epidemiology of *Aspergillus* species causing keratitis in Mexico. *Mycoses.* 2019; 62(2): e144-151. doi: 10.1111/myc.12855.
4. Blindness and vision impairment. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/blindness-and-visualimpairment>.
5. Самойлов А.Н., Давлетшина Н.И. Анализ этиологии и антимикробной чувствительности возбудителей грибковых кератитов в серии клинических случаев // Офтальмохирургия. — 2020. — №1. — С.71-76. [Samoylov AN, Davletshina NI. Analysis of etiology and antimicrobial sensitivity of fungal keratitis pathogens in a series of clinical cases. *Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery.* 2020; 1: 71-76. (In Russ.)] doi: 10.25276/0235-4160-2020-1-71.
6. Патент РФ на изобретение № 2746647. МПК G09B 23/28 A61F 9/00. Самойлов А.Н., Давлетшина Н.И., Шакирова Ф.В., Давлетшина Н.И., Самойлова П.А. Способ создания экспериментальной модели грибкового кератита у кроликов. [Patent RUS № 2746647. Samoylov AN, Davletshina NI, SHakirova FV, Davletshina NI, Samoylova PA. Sposob sozdaniya eksperimental'noj modeli gribkovogo keratita u krolikov. (In Russ.)]
7. Патент РФ на изобретение № 2768476. МПК G09B 23/28 A61F 9/00. Самойлов А.Н., Давлетшина Н.И., Валиева Р.И., Лисовская С.А., Исаева Г.Ш., Шакирова Ф.В., Давлетшина Н.И., Самойлова П.А. Способ создания экспериментальной модели грибкового кератоувеита у кроликов. [Patent RUS № 2768476. Samoylov AN, Davletshina NI, Valieva RI, Lisovskaya SA, Isaeva GSH, SHakirova FV, Davletshina NI, Samojlova PA. Sposob sozdaniya eksperimental'noj modeli gribkovogo keratouveita u krolikov. (In Russ.)]