

Моделирование травматических повреждений роговицы глаза

А.С. Ивкина¹, научный сотрудник ЦЭФ Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета, Д.Ю. Ивкин¹, кандидат биологических наук, начальник ЦЭФ СПбГХФУ, Е.Д. Семивеличенко¹, младший научный сотрудник ЦЭФ СПбГХФУ, Г.А. Плиско¹, младший научный сотрудник ЦЭФ СПбГХФУ, П.В. Буренков², руководитель сектора доклинических исследований ООО «Самсон-Мед»

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376,

Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А;

²ООО «Самсон-Мед», 196158, Санкт-Петербург, Московское шоссе, д. 13

E-mail: evgeniy.semivelichenko@pharminnotech.com

Резюме. На базе Центра экспериментальной фармакологии СПХФУ на кроликах-самцах породы советская шиншилла как наиболее доступной и релевантной тест-системе проведено моделирование травматической эрозии (ТЭ) по методу С. Hanna, J.E. O'Brien (1960) и кислотного ожога роговицы глаза с последующей гистологической оценкой патологического процесса. Для получения статистически достоверных результатов животных было достаточно. Описаны условия содержания животных и воспроизведение моделей, предложена балльная оценка выраженности травматического повреждения, в которой учитывались наличие или отсутствие патологических изменений, наличие и выраженность текущего экссудативного воспаления с последующей патологической васкуляризацией роговицы, наличие и распространенность фибропластических изменений роговицы как проявлений обратного развития патологического процесса и организации в его исходе. Состоятельность моделей подтверждена гистологически, выраженность повреждений преобладает при моделировании ТЭ; в дальнейшем интерес может представлять оценка состояния роговицы не только на 29-й день после моделирования патологии, но также на 8-й, 15-й, 22-й дни. Эксперимент позволяет исследовать развитие патологического процесса в динамике, что чрезвычайно актуально при исследовании глазных форм лекарственных препаратов с регенерирующим, антигипоксантичным и антиоксидантным эффектами.

Ключевые слова: травматическая эрозия, кислотный ожог, кролики.

Для цитирования: Ивкина А.С., Ивкин Д.Ю., Семивеличенко Е.Д., Плиско Г.А., Буренков П.В. Моделирование травматических повреждений роговицы глаза. Лабораторные животные для научных исследований; 2018; 2. <https://doi.org/10.29926/2618723X-2018-02-04>

Modeling of traumatic injuries of the cornea of the eye

A. Ivkina¹, Researcher, St. Petersburg state chemical-pharmaceutical University, D. Ivkin¹, candidate of biological Sciences, head of St. Petersburg state chemical-pharmaceutical University, E. Semivelichenko¹, Junior researcher St. Petersburg state chemical-pharmaceutical University, G. Plisko¹, Junior researcher St. Petersburg state chemical-pharmaceutical University, P. Burenkov², chief, preclinical research, «Samson-Med»

¹St. Petersburg state University of chemical and pharmaceutical Sciences Ministry of health of the Russian Federation, 197376, St. Petersburg, Professor Popov str., 14, lit. A;

²Samson-Med, 196158, St. Petersburg, Moscow highway, 13

E-mail: evgeniy.semivelichenko@pharminnotech.com

Summary. On the center of experimental pharmacology Saint-Petersburg Chemical-Pharmaceutical University on rabbits male breed of Soviet chinchilla, as the most accessible and relevant test system, was conducted modeling of traumatic erosion by the method of S. Hanna, J. O'Brien (1960) and an acid burn of the cornea of the eye followed by a histological evaluation of the pathological process. The number of animals was sufficient to obtain statistically reliable results. The article describes in the great detail the conditions for keeping animals and reproducing models, a scoring of the severity of traumatic injury was suggested, which took into account the presence or absence of pathological changes, the presence and severity of the current exudative inflammation followed by pathological vascularization of the cornea, the presence and prevalence of fibroplastic changes in the cornea, pathological process and organization in its outcome. The consistency of the models is confirmed histologically, the severity of the lesion predominates in the modeling of traumatic erosion; in the future, the evaluation of the condition of the cornea may be of interest not only on the 29th day after the modeling of the pathology, but also on the 8th, 15th, 22nd days. In this case, it becomes possible to investigate the development of the pathological process in dynamics. These models are extremely relevant in the study of eye forms of drugs with regenerative, antihypoxic and antioxidant effects.

Key words: traumatic erosion, acid burn, rabbits.

For citation: Ivkina A., Ivkin D., Semivelichenko E., Plisko G., Burenkov P. Modeling of traumatic injuries of the cornea of the eye. *Laboratory Animals for Science*. 2018; 2; <https://doi.org/10.29926/2618723X-2018-02-04>

Введение

Экспериментальные модели повреждений роговицы глаза чрезвычайно актуальны для исследования глазных форм лекарственных препаратов с регенерирующим, антигипоксическим и антиоксидантным эффектами. Проведено моделирование травматической эрозии (ТЭ) и кислотного ожога (КО) роговицы глаза кролика с гистологическим исследованием на 29-й день.

Цель исследования – отработка травматических моделей офтальмопатологии и гистологическая оценка патологического процесса.

Материалы и методы

В качестве тест-системы были выбраны лабораторные кролики-самцы породы советская шиншилла ($n=12$). Число животных для исследования было достаточным для получения статистически достоверных результатов, но минимальным с точки зрения биоэтических принципов. Лабораторные кролики являются стандартной тест-системой в опытах по изучению специфической активности глазных капель [1]. Имеющиеся научные данные и утвержденные рекомендации не предоставляют приемлемых *in vitro* альтернатив к использованию лабораторных животных в качестве тест-системы в настоящем исследовании. Результаты эксперимента на полноценном живом организме наиболее правильно и полно отражают всю динамику взаимодействий различных типов клеток, тканей и органов в организме человека [2, 3].

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ №51 от 29 августа 2014 г.),

Методическими указаниями по содержанию и использованию лабораторных животных (Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy press. – Washington, D.C., 1996) и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, а также Правилами, утвержденными Приказом Минздрава России от № 199н 01 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

Животные в период карантина и эксперимента содержались по 1 особи в металлических клетках для кроликов типа Еугора BIOSCAPE с пластиковым поддоном (ZOONLAB, Германия) (размер клетки 73×73×52 см). Условия содержания соответствовали требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных (площадь пола клетки ≥ 4200 см², высота ≥ 45 см для кроликов массой от 3 до 5 кг). Клетки были оборудованы кормушками из нержавеющей стали, пластиковыми поилками и держателями этикеток. Подстил не использовался.

Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды при температуре 17–23°C и относительной влажности 30–70%. В комнатах содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения и по крайней мере 10-кратная смена объема воздуха комнаты в час. Температура и влажность постоянно контролировались с помощью термогигрометров Testo 608-h1 (Китай).

Животные получали стандартный гранулированный корм «Полнораационный комбикорм для лабораторных кроликов и морских свинок» К-122, производства ООО «Лабораторкорм», Россия *ad libitum* в кормушку клетки. Животным давалась вода, соответствующая ГОСТ Р 51232-98 Вода питьевая, приготовленная методом фильтрации водопроводной воды через систему фильтров Аквафор. Питьевая вода давалась *ad libitum* в стандартных питьевых бутылочках с полной заменой воды 3 раза в неделю.

Период карантинирования животных составил 14 дней до начала эксперимента. Во время этого периода осуществлялся ежедневный ветеринарный осмотр и визуальный контроль потребления корма и воды. Животных с отклонениями в период карантина не зарегистрировано. Перед началом исследования все животные, прошедшие карантин, были включены в эксперимент и распределены на группы, которые формировали случайным образом, отклонение массы тела животных от среднего значения допускалось не более чем на 10%. В период карантина животные размещались в клетках, которые были идентифицированы карточкой, содержащей следующую информацию: пол и число животных, дата получения, возраст/масса тела при получении, назначение. После карантина каждому отобранному для исследования животному был присвоен индивидуальный идентификационный номер. Нумерация была сквозной – от 1-го до 12-го номера. Идентификационный номер был нанесен специальным нетоксичным маркером на внутреннюю поверхность уха животного. Каждая клетка была идентифицирована карточкой, содержащей следующую инфор-

мацию: название исследования, номер исследуемой группы, а также индивидуальный номер животного.

Процедуры с животными были рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией СПХФУ Минздрава России (Протокол № Rabbits-1/2-17 от 07.11.2017).

Внешний вид животных оценивали ежедневно во время ветеринарного осмотра в период карантина и проведения эксперимента. Клинический осмотр каждого животного на открытой площадке с обязательным офтальмологическим осмотром проводился при формировании групп, еженедельно в последующем на 8 и 15, 22 и 29-й дни.

Ежедневно проводили осмотр подопытных животных в клетках содержания, с целью выявления смерти или признаков отклонения в их состоянии здоровья.

Массу тела регистрировали при формировании групп, непосредственно перед первым введением, и еженедельно – в ходе исследования.

Моделировали патологию глаз – ТЭ и КО. При формировании ТЭ применяли метод С. Hanna, J.E. O'Brien (1960) [1], согласно которому под местной анестезией (закапывание раствора 0,4% инокаина) на роговицу наносили метку 0,1% раствором флюоресцеина натрия. В пределах метки лезвием соскабливали эпителий роговицы. Дефект эпителия повторно окрашивали раствором флюоресцеина для того чтобы отчетливее визуализировались форма и размер ТЭ роговицы. КО в эксперименте формировали под местной анестезией (0,4% инокаином) аппликацией фильтровальной бумаги (в виде круга диаметром 8 мм), смоченной 3% раствором уксусной кислоты с экспозицией 5 с на роговицу [1].

Из 12 животных были сформированы 3 группы животных по 4 особи в каждой: 1-я – интактная с животными без индукции патологии; 2-я и 3-я группы состояли из животных, подвергшихся моделированию патологии (соответственно ТЭ и КО) без лечения.

На 29-й день эксперимента животные подвергались эвтаназии путем наркотизации углекислым газом в CO₂-боксе с последующим извлечением глазных яблок, которые фиксировали в 10% нейтральном формалине.

Выполнялось гистологическое исследование структур передних отделов глазных яблок всех животных. После стандартной гистологической проводки и имбибиции парафином с помощью ротационного микротомы были изготовлены срезы ткани толщиной 4 мкм, помещенные на предметные стекла, окрашенные гематоксилином и эозином и заключенные под покровные стекла. Гистологические препараты изучались в проходящем свете.

Результаты и обсуждение

Все животные переносили моделирование удовлетворительно: процедура не сопровождалась какими-либо негативными явлениями.

Внешний вид животных. По результатам проведенного клинического осмотра в период эксперимента изменений в поведении, общем состоянии и состоянии нервной системы у животных не выявлено. После индукции патологии (как КО,



Рис. 1. Последствия КО на следующий день после моделирования (а); взаимодействие поверхности ТЭ с флуоресцеином (б); последствия ТЭ на следующий день после моделирования (в)

так и ТЭ) поведение животных не изменялось. У всех подопытных животных нос был умеренно влажный, патологические выделения отсутствовали. Уши – бледно-розовые, обычной температуры, нагноений, воспаления, загрязнений за весь период наблюдения ни у одного не отмечено. Зубы у всех сохранены. Дыхание в целом было нормальным у всех экспериментальных животных, признаков одышки не отмечалось.

Шерсть у всех животных – опрятная, блестящая, без очагов облысения. Тонус мускулатуры у всех животных был нормальным. Видимые слизистые оболочки бледно-розовой окраски, блестящие. Деформации или отека конечностей нет. Кожа без признаков раздражения или воспаления. Половые органы самцов правильно выражены.

Все животные нормального телосложения, удовлетворительного питания. У 100% кроликов всех групп двигательная активность была в норме. В целом поведение было стандартным. Кровотечений у животных не наблюдали.

Согласно офтальмологическому осмотру, на этапе формирования групп роговица глаз у всех кроликов находилась в состоянии нормы. На следующий день после моделирования патологии у групп кроликов с КО наблюдалось помутнение роговицы, отек и слизистое нагноение (рис. 1а), а животные с ТЭ характеризовались наличием слезотечения и светобоязни, а также зеленоватым оттенком роговицы глаза после взаимодействия белков раневой поверхности с флуоресцеином (см. рис. 1б, в).

Масса тела кроликов. Масса тела равномерно увеличивалась в течение всего периода наблюдения. В период наблюдения животные потребляли корм и воду в рамках физиологических потребностей.

Гистологическое исследование. Гистологической оценке подвергались глазные яблоки всех животных. У животных интактной группы значимой патологии не выявлено. Роговица – из 5 слоев, многослойный плоский эпителий – обычного строения, сосуды не определяются, патологической клеточной инфильтрации не выявлено (рис. 2а). Строение радужки, ресничного тела не нарушено (рис. 2б). Строение лимба обычного строения, с минимально выраженной лимфо-

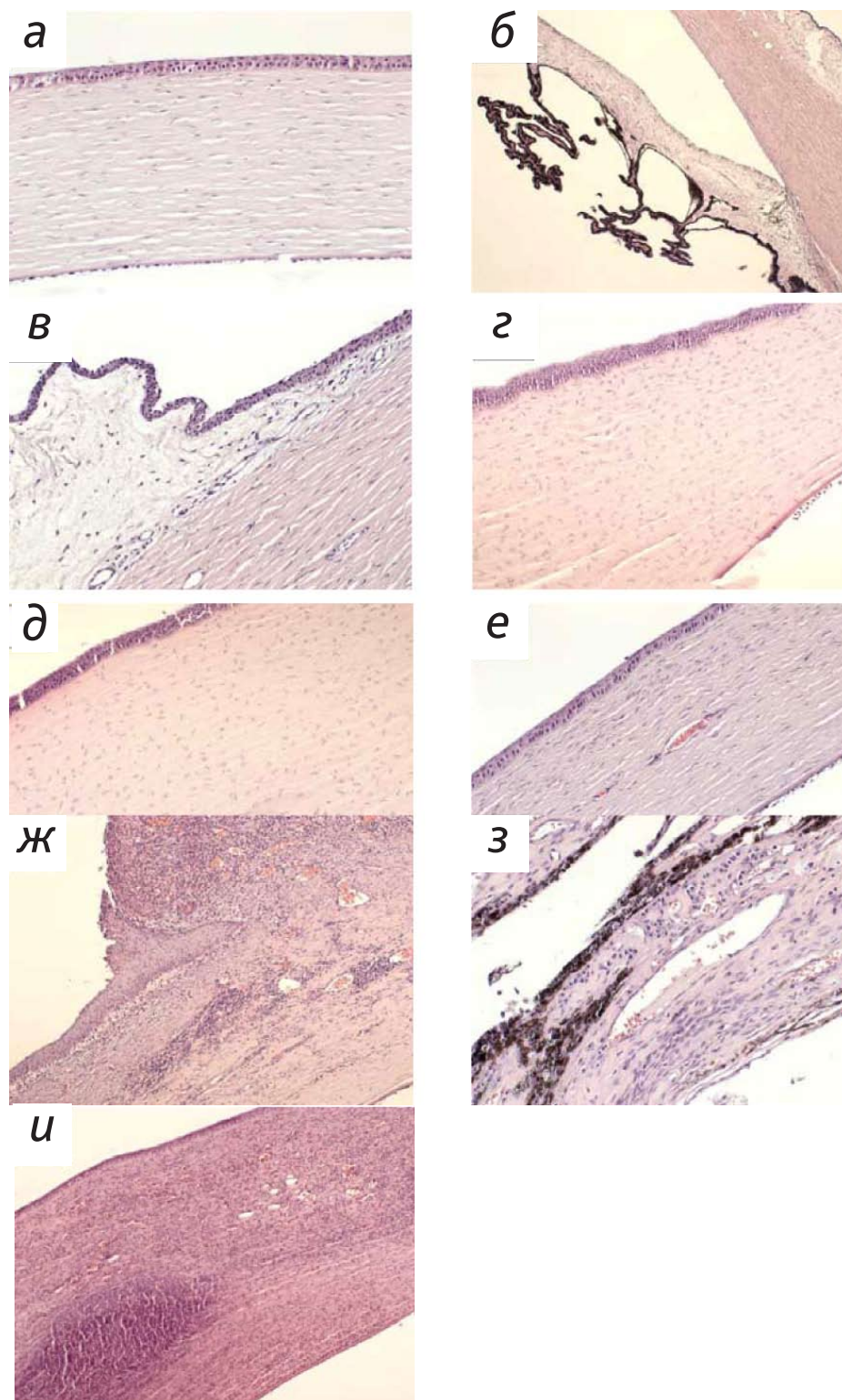


Рис. 2. Гистологическое исследование глаз кроликов, окраска гематоксилином и эозином: а – интактная роговица, $\times 100$; б – интактная радужная оболочка, $\times 50$; в – обычное строение лимба, $\times 100$; г – ТЭ, утолщение роговицы за счет обширной фибропластической реакции. Утолщение эпителиальной выстилки роговицы, $\times 100$; д – КО, утолщение роговицы за счет обширной фибропластической реакции. Утолщение эпителиальной выстилки роговицы, $\times 100$; е – ТЭ, слабо выраженная патологическая васкуляризация роговицы, $\times 100$; ж – ТЭ, тяжелый язвенный кератит с выраженной экссудативной клеточной реакцией, разрастанием грануляционной ткани и обильной патологической васкуляризацией роговицы, $\times 100$; и – ТЭ, очаговый экссудативный иридоциклит, $\times 200$; к – распространенный экссудативный кератит с фокусом некроза и патологической васкуляризацией роговицы, $\times 100$

гистиоцитарной инфильтрацией (см. рис. 2в). Склера – сосудистая, строение сетчатой оболочки – в норме.

При моделировании обеих патологий наблюдали гистологические изменения (см. рис. 2).

Для объективизации морфологических изменений роговицы при ТЭ и КО была использована полуколичественная шкала характера и степени выраженности патологического процесса. Учитывались наличие или отсутствие патологических изменений, наличие и выраженность текущего экссудативного воспаления (с последующей патологической васкуляризацией роговицы), наличие и распространенность фибропластических изменений роговицы (как проявления обратного развития патологического процесса и организации в его исходе): «нет патологии» – 0 баллов; фибропластическая реакция роговицы с формированием ограниченного или обширного рубца – 1 или 2 балла соответственно; кератит разной степени выраженности от слабо выраженного (3 балла), средней степени выраженности (4 балла), до тяжелого язвенного (5 баллов). Распределение патологических изменений, отраженных в баллах при различных моделях отражено в таблице.

Оценка патологических изменений в баллах при различных моделях

Номер группы	Модель	Распределение патологического процесса, глаз; баллах						Сумма баллов при оценке патологического процесса
		0	1	2	3	4	5	
1	Интакт	8	0	0	0	0	0	0
2	ТЭ	4	0	2	1	0	1	12
3	КО	4	4	0	0	0	0	4

Согласно результатам исследования, состоятельность моделей подтверждена гистологически, выраженность повреждения преобладает при моделировании ТЭ. В дальнейшем целесообразно оценивать состояние роговицы не только на 29-й день после моделирования патологии, но также на 8-й, 15-й и 22-й дни. В таком случае появится возможность исследовать развитие патологического процесса в динамике.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература

1. Канюков В.Н., Стадников А.А., Трубина О.М., Яхина О.М. Экспериментальное моделирование травматических повреждений роговицы. – Вестник ОГУ, 2014, 12 (173): 156–9.
2. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. Под ред.: Н.Н. Каркищенко и С.В. Грачева. М., 2010.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. I. М.: Гриф и К, 2012.