

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 617.764-608.811.4-092.9

*К.Е. Селиверстова, Е.С. Вахова, Е.В. Яни, В.В. Позднякова, Д.И. Ибрагимова*

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ «СУХОГО ГЛАЗА» НА КРОЛИКАХ

ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, 105602, Москва

Описаны модели «сухого глаза» на кроликах, доступные для изучения различных форм и патомеханизмов «сухого глаза», их преимущества и недостатки, понимание которых поможет правильно выбрать модель для решения конкретных задач и разработки новых методов лечения «сухого глаза». Без использования этих моделей «сухого глаза» невозможны поиск новых и оценка существующих методов лечения.

*Ключевые слова:* модель «сухого глаза», кролик

*K.E. Seliverstova, E.S. Vakhova, E.V. Yani, V.V. Pozdnyakova, D.I. Ibragimova*

## THE EXPERIMENTAL RABBIT «DRY EYE» MODELS

Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases Ministry of Health of the Russian Federation, 105062, Moscow, Russian Federation

Various experimental rabbit «dry eye» models available for the investigations into different forms and pathogenetic mechanisms of the «dry eye» condition are described with special reference to their advantages and drawbacks. Their understanding is believed to be helpful for the choice of an adequate model for the solution of concrete clinical problems and the development of new methods for the management of the disease being considered. The authors emphasized that the search for new therapeutic methods and the evaluation of the existing ones are impossible without the use of «dry eye» models.

*Key words:* «dry eye» models, rabbits

«Сухой глаз» (СГ) является одним из наиболее распространенных глазных заболеваний, им страдают десятки миллионов людей во всем мире [1]. Для изучения СГ в настоящее время исследователями со всего мира разработано и продолжает разрабатываться множество моделей на животных. Экспериментальные исследования затрагивают как внутренние (иммунные, эндокринные, нейрогенные), так и внешние факторы, участвующие в развитии СГ. Несмотря на то, что достигнуты некоторые успехи в моделировании этого патологического процесса у животных, на сегодняшний день доступны модели только с неполным или кратковременным развитием изменений. В связи с этим, многие авторы сходятся во мнении, что ни одна из ныне существующих экспериментальных моделей на животных не воспроизводит в полной мере клинические проявления и патогенез СГ у человека [2—5].

Мы рассмотрели варианты моделей СГ на кроликах, разработанных для изучения различных форм и патомеханизмов СГ, их преимущества и недостатки, понимание которых поможет правильно выбрать модель для решения конкретных задач и разработки новых методов лечения этого заболевания. Ввиду длительного, по сравнению с другими, сроками жизни кроликов, эти модели показывают не только снижение секреции слезы и ксеротические изменения глазной поверхности, но и дают возможность оценить изменения на поздних этапах развития заболевания. Строение глаза кролика обеспечивает хороший доступ к его поверхности, что

делает оценку клинических признаков заболевания более надежной.

Опираясь на основные патогенетические типы СГ, можно выделить следующие группы экспериментальных моделей [6, 7].

### **1. Модели, основанные на сокращении основной слезопродукции (количественные)**

**Аутоиммунное воспаление слезной железы (синдром Шегрена—Ларссона у кроликов).** В этой модели аутоиммунный дакриoadенит был индуцирован культурой лимфоцитов периферической крови с очищенными ацинарными [8] или эпителиальными клетками [9], полученными из одной аутологичной слезной железы, путем введения активированных лимфоцитов в контлатеральную железу. Это приводит к CD4<sup>+</sup>-Т-клеточной инфильтрации в слезной железе и сопровождается признаками СГ, такими как снижение продукции слезы, уменьшение стабильности слезной пленки, ксеротические изменения поверхности роговицы, которые проявляются ко 2-й неделе [9].

**Удаление и облучение слезной железы или закрытие выводного протока.** Удаление главной слезной железы ведет к снижению базальной слезопродукции. Однако это не вызывает существенных изменений глазной поверхности даже по истечении большого промежутка времени, что может быть обусловлено адекватной компенсаторной секрецией добавочными слезными железами и является достаточным для поддержания стабильности слезной пленки. Только в одном исследовании отмечено ро-

говичное изъязвление, наблюдаемое у 55% кроликов после удаления главной слезной железы, хотя существенного уменьшения показателей теста Ширмера обнаружено не было [10].

Закрытие у кроликов выводного протока слезной железы и хирургическое удаление третьего века и гардеровой железы может привести к увеличению осмолярности слезной жидкости уже в первый послеоперационный день и сопровождаться существенным снижением плотности клеток конъюнктивы, но снижения показателей теста Ширмера и изменений глазной поверхности могут наблюдаться только после 8-й недели после операции [11].

Кроме того, известны исследования влияния облучения на функцию слезной железы. В исследовании S.G. Hakim и соавт. [12] на модели кролика была использована разовая доза облучения в 15 Гр. В результате через 72 ч отмечены иммуногистологические, ультраструктурные изменения в слезной железе и снижение секреции слезы, но через 1 мес изменения оказались менее выражены. Данная модель не рассматривалась как модель СГ и оценка состояния глазной поверхности не проводилась.

**Нейрогенные нарушения слезопродукции.** Исследования, проводимые в этом направлении, опираются на предложенную M.E. Stern [цит. 7] концепцию интегрированного «функционального блока», включающего роговицу, конъюнктиву, главную и добавочные слезные, а также мейбомиевые железы. Ингибирование секреции слезной железы может быть достигнуто путем фармакологического блокирования парасимпатических вегетативных волокон. S. Burgalassi и соавт. [13] ввели простую модель СГ кролика, где иннервация слезной железы была заблокирована посредством ежедневного применения глазных капель 1% атропина сульфата в течение 5 дней, что значительно сократило образование слезы (по результатам теста Ширмера-1) на 2-й день, а через 3 дня вызвало появление эрозии роговицы. Эта модель не позволяет точно воспроизвести СГ человека, но она может быть полезна при изучении воздействия препаратов искусственной слезы на глазную поверхность. Отечественными авторами данная модель была модифицирована и предусматривала более длительное, в течение 14 дней, воздействие 1% атропина сульфата для стойкого снижения слезопродукции и индукции более выраженных изменений глазной поверхности [14].

В современной литературе встречается все больше сведений о применении ботулинического токсина в эксперименте для создания модели СГ. Ботулинический токсин хорошо известен и широко применяется в качестве блокатора высвобождения ацетилхолина в нервно-мышечных холинэргических синапсах.

Первое сообщение о проявлении СГ у кроликов путем инъекции ботулотоксина типа А непосредственно в слезную железу опубликовали A.M. Demetriades и соавт. [15]. Отмечено значительное снижение слезопродукции уже через 1 нед после инъекции, но изменений глазной поверхности не наблюдалось.

**Эндокринный контроль слезопродукции.** В настоящее время в литературе нет описаний развития СГ на животной модели при конкретном эндокрин-

ном дисбалансе. Тем не менее, есть сообщения о том, что орхизектомия и овариэктомия у кроликов были использованы для изучения влияния гормонов на структуру и функции слезных и мейбомиевых желез. Хотя эти модели не воспроизводят в полной мере характерные для СГ клинические особенности, но представляют ценность для выявления важных патогенетических аспектов эндокринного регулирования функций слезной железы [7, 16]. Так, D.A. Sullivan и соавт. [17], используя антиандрогенную терапию, показали, что андрогены регулируют функцию слезных желез, оказывая влияние на качество и количество слезной жидкости, а также на метаболизм липидного слоя слезной пленки.

**2. Модели, описывающие повышенную испаряемость слезы или нарушения формирования слезной пленки на глазной поверхности (качественные)**

**Дисфункция мейбомиевых желез.** Гистопатологические и клинические исследования показывают, что закрытие отверстий выводных протоков мейбомиевых желез является характерной чертой мейбомиевого блефарита, связанного с СГ. Первое объективное доказательство в поддержку этой гипотезы было представлено J.P. Gilbard и соавт. [11]. Исследователи использовали модель на кроликах, в которой каждое отверстие выводных протоков мейбомиевых желез было закрыто прижиганием. Результатом явилось не только значительное снижение плотности конъюнктивальных и клеток роговичного эпителия на 12-й неделе, но и наличие воспалительных клеток в бульбарной конъюнктиве после 20 нед. Хотя эта модель представляет интерес для исследования влияния дисфункции мейбомиевых желез на глазную поверхность, лучше проводить эти исследования в контролируемой среде, в которой температура, влажность и скорость потока воздуха постоянно контролируются, так как эти факторы напрямую влияют на скорость испарения слезной пленки. [18].

**Влияние факторов окружающей среды.** Неблагоприятные факторы внешней среды могут привести к развитию СГ даже при нормальных показателях количества слезы. Такие модели на кроликах, имитирующие СГ вследствие чрезмерного испарения слезной пленки, создавались в результате препятствия мигательным движениям век с помощью швов [19] или векорасширителя. Изменения на роговице выявлялись через 2 ч после начала эксперимента в виде участков сухих пятен на роговице при окрашивании метиленовым синим [20]. Ввиду остроты индуцированного СГ и использования анестетика, который сам по себе может вызвать уменьшение слезопродукции, эта модель не является оптимальной для изучения патогенеза СГ, который является, по сути, хроническим состоянием [7]. Однако эпителиопатия, возникающая на роговице кроликов в течение нескольких часов, как считают авторы, может быть использована для оценки влияния искусственных слез или других методов лечения, направленных на задержку испарения и сохранение прероговичной слезной пленки.

**Фармакологически вызванная неустойчивость слезной пленки.** Модель СГ, вызванного

нестабильной слезной пленкой, имитирующая широко распространенную проблему у пловцов в хлорированных бассейнах, была введена S. Nakamura и соавт. [21]. В этой модели нарушение слезной пленки вызывалось путем прикладывания к глазу кролика на 60 мин пластиковой камеры с раствором водопроводной воды с 1 промилле раствором хлорноватистой кислоты (НОСІ). Обширные участки разрыва слезной пленки возникали сразу и возвращались к нормальному уровню самостоятельно через 6 ч или моментально при закапывании искусственной слезы. Эта краткосрочная модель привлекательна для имитирования нестабильности слезной пленки от раздражающих веществ, таких как НОСІ, она может быть использована для проверки способности искусственной слезы стабилизировать слезную пленку.

Имеется большое количество экспериментальных исследований, демонстрирующих острое токсическое влияние на структуры передней глазной поверхности высоких концентраций раствора бензалкония хлорида (БАХ), наиболее часто применяемого в офтальмологии консерванта [22]. Результаты этих исследований показывают, что изменения, вызываемые воздействием БАХ на глазную поверхность аналогичны таковым при синдроме СГ человека [23].

Была создана экспериментальная модель на кроликах, с целью изучения токсического действия на роговицу бензалкония хлорида в 3 различных концентрациях: 0,01%, 0,005% и 0,1%. Консервант инстиллировали 2 раза в день в течение 4 дней. Выбор исследователями именно таких концентрации основывался на клиническом опыте и результатах ранее проведенных экспериментальных исследований, согласно которым 0,01% — концентрация БАХ, часто используемая в глазных каплях [24]. Концентрация 0,05% была задействована в эксперименте как средняя, с целью демонстрации изменений, происходящих в роговице при воздействии диапазона концентраций 0,01—0,1%. И, наконец, БАХ в концентрации 0,1% для подтверждения уже установленного ранее токсического влияния на роговицу [25]. В результате были получены данные, подтверждающие токсическое влияние на роговицу высоких концентраций БАХ (0,1%), а именно, нарушение связей между эпителиальными клетками роговицы, увеличение их в размере, с последующим развитием отека эпителия, нарушением целостности и, как следствие, ослабление барьерных функций роговичного эпителия [23]. Таким образом, местное применение БАХ может быстро привести к возникновению изменений глазной поверхности без проявлений СГ.

### Заключение

Поскольку причины СГ многочисленны и разнообразны, ни одна экспериментальная модель, разработанная на данный момент, не отражает весь спектр механизмов участвующих в развитии данной патологии. Однако без использования этих моделей СГ невозможны поиск новых и оценка существующих методов лечения, опираясь на конкретные патологические механизмы СГ.

1. Schaumberg D.A., Sullivan D.A., Buring J.A., Dana M.R. Prevalence of dry eye syndrome among US women. *Am. J. Ophthalmol.* 2003; 136: 318—26.
2. Майчук Д.Ю. Клинико-экспериментальное доказательство роли воспаления в патогенезе вторичного «сухого глаза». В кн.: Современные методы диагностики и лечения заболеваний слезных органов. В кн.: Материалы научно-практической конференции: Сборник научных статей. М.; 2005; 209—15.
3. Labbe A., Pauly A., Liang H., Brignole-Baudouin F., Martin C. et al. Comparison of toxicological profiles of benzalconium chloride and polyquaternium-1: an experimental study. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2006; 22: 267—78.
4. Lin Z., Liu X., Zhou T. et al. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalconium chloride. *Mol. Vis.* 2011; 25: 257—64.
5. Strong B., Farley W., Stern M.E. et al. Topical cyclosporine inhibits conjunctival epithelial apoptosis in experimental murine keratoconjunctivitis sicca. *Cornea.* 2005; 24: 80—5.
6. Бржецкий В.В., Сомов Е.Е. Роговично-конъюнктивальный ксероз (диагностика, клиника, лечение). 2-е изд. СПб.; 2003.
7. Barabino S., Dana M.R. Animal models of dry eye: a critical assessment of opportunities and limitations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004; 45: 1641—6.
8. Guo Z., Song D., Azzarolo A.M., Schechter J.E., Warren D.W., Wood R.L. et al. Autologous lacrimal-lymphoid mixed-cell reactions induce dacryoadenitis in rabbits. *Exp. Eye Res.* 2000; 71: 23—31.
9. Zhu Z., Stevenson D., Schechter J.E., Mircheff A.K., Atkinson R., Trousdale M.D. Lacrimal histopathology and ocular surface disease in a rabbit model of autoimmune dacryoadenitis. *Cornea.* 2003; 22: 25—32.
10. Kumar P.A., Macleod A.M., O'Brien B.M., Hickey M.J., Knight K.R. Microvascular submandibular gland transfer for the management of xerophthalmia; an experimental study. *Br. J. Plast. Surg.* 1990; 43: 431—6.
11. Gilbard J.P., Rossi S.R., Gray K.L. A new rabbit model for keratoconjunctivitis sicca. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1987; 28: 225—8.
12. Hakim S.G., Schroder C., Geerling G., Lauer I., Wedel T. et al. Early and late immunohistochemical and ultrastructural changes associated with functional impairment of the lacrimal gland following external beam radiation. *Int. J. Exp. Pathol.* 2006; 87: 65—71.
13. Burgalassi S., Panichi L., Chetoni P., Saettoni M.F., Boldrini E. Development of a simple dry eye model in the albino rabbit and evaluation of some tear substitutes. *Ophthalm. Res.* 1999; 31: 229—35.
14. Позднякова В.В., Яни Е.В., Ибрагимова Д.И. Экспериментальные исследования влияния раствора атропина сульфата 1% на слезопroduкцию у кроликов. *Российский офтальмологический журнал.* 2012; 4: 80—2.
15. Demetriades A.M., Leyngold I.M., D'Anna S., Eghrari A.O., Emmert D.G., Grant M.P., Merbs S.L. Intraglandular injection of botulinum toxin a reduces tear production in rabbits. *Ophthalm. Plast. Reconstr. Surg.* 2013; 29: 21—4.
16. Обрубов С.А., Ставицкая Г.В., Обрубова Г.А., Обрубов А.С. Морфологические особенности мейбомиевых желез в экспериментальной модели хирургической менопаузы крольчих. В кн.: VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием: Сборник научных статей. М.; 2009; 566.
17. Sullivan D.A., Sullivan D.B., Evans J.E. et al. Androgen deficiency, meibomian gland dysfunction, and evaporative dry eye. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002; 966: 211—22.

18. *Rolando M., Refojo M.F.* Tear evaporimeter for measuring water evaporation rate from the tear film under controlled conditions in humans. *Exp. Eye Res.* 1983; 36: 25—33.
19. *Иванов А.Н.* Воздействие препарата Селекартен на модель «сухого глаза» у кролика. В кн.: Современные методы диагностики и лечения заболеваний роговицы и склеры. В кн.: Материалы научно-практической конференции: Сборник научных статей. М.; 2007; 1: 243—5.
20. *Fujihara T., Nagano T., Nakamura M.* et al. Establishment of a rabbit short-term dry eye model. *J. Ocul. Pharmacol.* 1995; 11: 503—8.
21. *Nakamura S., Okada S., Umeda Y., Saito F.* Development of a rabbit model of tear film instability and evaluation of viscosity of artificial tear preparations. *Cornea.* 2004; 23: 390—7.
22. *Chen Z.Y., Liang Q.F., Yu G.Y.* Establishment of a rabbit model for keratoconjunctivitis sicca. *Cornea.* 2011; 30: 1024—9.
23. *Wensheng C., Zhiyuan Li., Jiaoyue Hu.* et al. Corneal alternations induced by topical application of benzalkonium chloride in rabbit. *PLoS One.* 2011; 6: e26103.
24. *Pisella P.J., Fillacier K., Elena P.P.* et al. Comparison of the effects of preserved and unpreserved formulations of timolol on the ocular surface of albino rabbits. *Ophthalm. Res.* 2000; 32: 3—8.
25. *Swan K.C.* Reactivity of the ocular tissue to wetting agents. *Am. J. Ophthalmol.* 1944; 27: 1118—22.

## REFERENCES

1. *Schaumberg D.A., Sullivan D.A., Buring J.A., Dana M.R.* Prevalence of dry eye syndrome among US women. *Am. J. Ophthalmol.* 2003; 136: 318—26.
2. *Maychuk D.Yu.* Clinical-experimental proof of the role of inflammation in the pathogenesis of secondary a dry eye. In: Modern methods of diagnosis and treatment of diseases of the lacrimal organs: Sci. Pract. conference. Moscow; 2005: 209—15 (in Russian).
3. *Labbe A., Pauly A., Liang H., Brignole-Baudouin F., Martin C.* et al. Comparison of toxicological profiles of benzalconium chloride and polyquaternium-1: an experimental study. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2006; 22: 267—78.
4. *Lin Z., Liu X., Zhou T.* et al. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalconium chloride. *Mol. Vis.* 2011; 25: 257—64.
5. *Strong B., Farley W., Stern M.E.* et al. Topical cyclosporine inhibits conjunctival epithelial apoptosis in experimental murine keratoconjunctivitis sicca. *Cornea.* 2005; 24: 80—5.
6. *Brzheskiy V.V., Somov E.E.* Corneal and conjunctival xerosis (diagnosis, clinic, treatment) Sankt-Petersburg; 2003 (in Russian).
7. *Barabino S., Dana M.R.* Animal models of dry eye: a critical assessment of opportunities and limitations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004; 45: 1641—6.
8. *Guo Z., Song D., Azzarolo A.M., Schechter J.E., Warren D.W., Wood R.L.* et al. Autologous lacrimal-lymphoid mixed-cell reactions induce dacryoadenitis in rabbits. *Exp. Eye Res.* 2000; 71: 23—31.
9. *Zhu Z., Stevenson D., Schechter J.E., Mircheff A.K., Atkinson R., Trousdale M.D.* Lacrimal histopathology and ocular surface disease in a rabbit model of autoimmune dacryoadenitis. *Cornea.* 2003; 22: 25—32.
10. *Kumar P.A., Macleod A.M., O'Brien B.M., Hickey M.J., Knight K.R.* Microvascular submandibular gland transfer for the management of xerophthalmia; an experimental study. *Br. J. Plast. Surg.* 1990; 43: 431—6.
11. *Gilbard J.P., Rossi S.R., Gray K.L.* A new rabbit model for keratoconjunctivitis sicca. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1987; 28: 225—8.
12. *Hakim S.G., Schroder C., Geerling G., Lauer I., Wedel T.* et al. Early and late immunohistochemical and ultrastructural changes associated with functional impairment of the lachrymal gland following external beam radiation. *Int. J. Exp. Pathol.* 2006; 87: 65—71.
13. *Burgalassi S., Panichi L., Chetoni P., Saettone M.F., Boldrini E.* Development of a simple dry eye model in the albino rabbit and evaluation of some tear substitutes. *Ophthalm. Res.* 1999; 31: 229—35.
14. *Pozdnyakova V.V., Yani E.V., D.I. Ibragimova.* Experimental study of the effect of atropine sulfate solution 1% in tears production in rabbits. *Russian Ophthalmological Journal.* 2012; 4: 80—2 (in Russian).
15. *Demetriades A.M., Leyngold I.M., D'Anna S., Eghrari A.O., Emmert D.G., Grant M.P., Merbs S.L.* Intraglandular injection of botulinum toxin a reduces tear production in rabbits. *Ophthalm. Plast. Reconstr. Surg.* 2013; 29: 21—4.
16. *Obrubov S.A., Stavitskaja G.V., Obrubova G.A., Obrubov A.S.* Morphological features of the meibomian glands in the experimental model of surgical menopause of rabbits. In: 8<sup>th</sup> All-Russian scientific-practical conference with international participation: Moscow, 2009: 566 (in Russian).
17. *Sullivan D.A., Sullivan D.B., Evans J.E.* et al. Androgen deficiency, meibomian gland dysfunction, and evaporative dry eye. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002; 966: 211—22.
18. *Rolando M., Refojo M.F.* Tear evaporimeter for measuring water evaporation rate from the tear film under controlled conditions in humans. *Exp. Eye Res.* 1983; 36: 25—33.
19. *Ivanov A.N.* Impact of a medicine Selecarten on the model of dry eye in the rabbit. In.: Modern methods of diagnosis and treatment of diseases of the cornea and sclera: Sci.-pract. conference. Moscow; 2007; 1: 243-5 (in Russian).
20. *Fujihara T., Nagano T., Nakamura M.* et al. Establishment of a rabbit short-term dry eye model. *J. Ocul. Pharmacol.* 1995; 11: 503—8.
21. *Nakamura S., Okada S., Umeda Y., Saito F.* Development of a rabbit model of tear film instability and evaluation of viscosity of artificial tear preparations. *Cornea.* 2004; 23: 390—7.
22. *Chen Z.Y., Liang Q.F., Yu G.Y.* Establishment of a rabbit model for keratoconjunctivitis sicca. *Cornea.* 2011; 30: 1024—9.
23. *Wensheng C., Zhiyuan Li., Jiaoyue Hu.* et al. Corneal alternations induced by topical application of benzalconium chloride in rabbit. *PLoS One.* 2011; 6: e26103.
24. *Pisella P.J., Fillacier K., Elena P.P.* et al. Comparison of the effects of preserved and unpreserved formulations of timolol on the ocular surface of albino rabbits. *Ophthalm. Res.* 2000; 32: 3—8.
25. *Swan K.C.* Reactivity of the ocular tissue to wetting agents. *Am. J. Ophthalmol.* 1944; 27: 1118—22.

Поступила 29.03.13