

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-7-33-37

## ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ БЕНЗАЛКОНИЯ ХЛОРИДА В СОСТАВЕ АНТИГЛАУКОМНОГО ПРЕПАРАТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЛИМБА РОГОВИЦЫ И ВОЗМОЖНОСТИ ЕЕ СНИЖЕНИЯ

А. М. Суббот, Т. В. Нестерова, А. Н. Габашвили,  
Г. Б. Егорова, В. В. Аверич<sup>1</sup>

Оценивали цитотоксическое влияние антиглаукомного препарата Пролатан, содержащего бензалкония хлорид, самого бензалкония хлорида, слезозаменителя Стиллавит и их комбинации на культуру клеток лимба роговицы человека. Показано, что цитотоксичность исследованного антиглаукомного препарата на коротких сроках инкубации обусловлена содержанием в нем бензалкония хлорида, слезозаменитель показал низкую токсичность, при совместном применении препаратов 2 групп — антиглаукомного с бензалкония хлоридом, и слезозаменителя — наблюдается снижение уровня цитотоксичности.

**Ключевые слова:** антиглаукомный препарат; Пролатан; бензалкония хлорид; культура клеток; слезозаменитель; Стиллавит; цитотоксичность.

### ВВЕДЕНИЕ

Длительное применение лекарственных средств (ЛС) в виде глазных капель, например, для терапии глаукомы, часто приводит к осложнениям в виде синдрома сухого глаза, что существенно ухудшает качество жизни пациентов. Одной из причин этого считаются дополнительные компоненты, вводимые в состав препарата для увеличения его стабильности и предотвращения роста микрофлоры, повсеместно используемые при производстве инстилляционных форм ЛС, применяемых в офтальмологии и обладающих раздражающим действием на слизистые оболочки. Наиболее популярным в офтальмологии дополнительным компонентом с антисептическим действием является бензалкония хлорид (БХ), использование которого ассоциируют не только с проявлениями сухого глаза, но и с дегенерацией трабекулярной сети [6]. При попадании на глазную поверхность обладающий детергентными свойствами БХ разрушает липиды слезной пленки, проникает в передний эпителий роговицы и конъюнктивы, где, являясь мощным ингибитором комплекса I дыхательной цепи митохондрий, нарушает внутриклеточные энергетические процессы [6]. В результате страдает барьерная функция эпителиоцитов, что облегчает проникновение БХ в переднюю камеру и задние отделы глаза [5, 7, 9, 11, 12, 13]. Перечисленные патогенетические факторы приводят к снижению уровня продукции слезы и стабильности слезной пленки. Одним из самых известных ЛС для терапии глаукомы, содержащим в составе БХ, является Прола-

тан, поэтому мы выбрали его для тестирования в эксперименте.

Наиболее широкое применение в лечении различных клинических форм синдрома “сухого глаза” получили препараты “искусственной слезы”, содержащие в своем составе гиалуронат натрия. В настоящее время созданы и комбинированные ЛС, содержащие дополнительные компоненты для стимуляции регенераторных процессов в тканях глаза. Одним из них является трехкомпонентный препарат Стиллавит<sup>®</sup>, содержащий в своем составе, помимо гиалуроновой кислоты, еще хондроитин сульфат и декспантенол.

В связи с вышеперечисленным представляется целесообразным использование слезозаменителей совместно с антиглаукомными ЛС для предотвращения развития синдрома сухого глаза.

Модельным объектом для исследования нами была выбрана первичная культура клеток, полученных из лимбальной зоны роговицы человека.

По параметрам структурной и функциональной сохранности клеток оценивали степень влияния на них вышеозначенных препаратов и их комбинации.

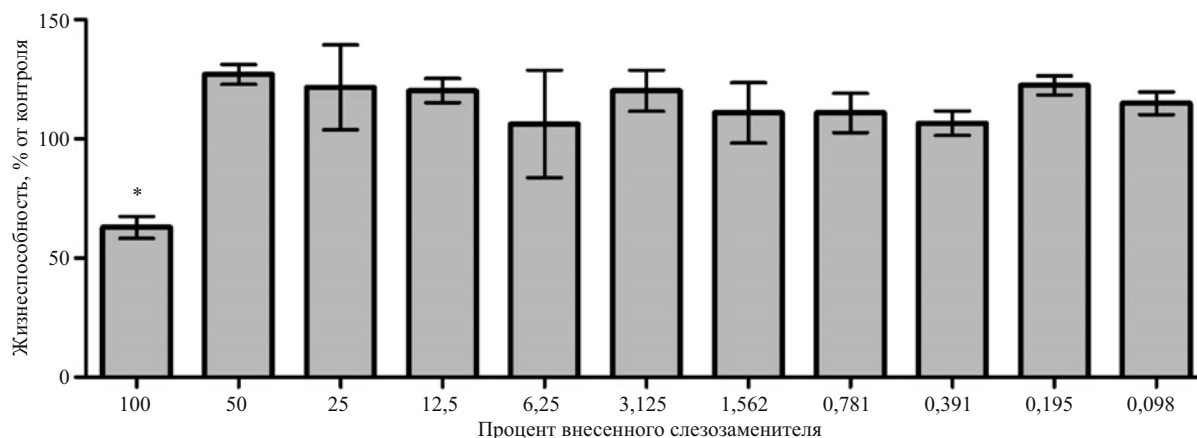
Целью работы была оценка на культуре клеток лимба роговицы человека уровня цитотоксичности:

- а) БХ и антиглаукомного препарата Пролатан, содержащего БХ;
- б) трехкомпонентного слезозаменителя Стиллавит;
- в) комбинации Пролатана и трехкомпонентного слезозаменителя Стиллавит.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования была использована первичная культура клеток лимба роговицы человека 5 – 7 пассажа. Клетки были получены методом проращивания из экспланта, культивировались на ростовой среде

<sup>1</sup> ФГБНУ “Научно-исследовательский институт глазных болезней”. Россия, 119021, Москва, ул. Россолимо, д. 11А, Б.



**Рис. 1.** Диаграмма уровня выживаемости клеток лимба роговицы при внесении к ним последовательных разведений слезозаменителя. \* Различие с контролем значимо ( $p < 0,05$ ).

DMEM с антибиотиками и противогрибковым средством (пенициллин 100 ЕД/мл, стрептомицин 100 мкг/мл, амфотерицин Б 0,25 мкг/мл), глутамином (2 мМ) и 10 % фетальной бычьей сывороткой, в стандартных условиях при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>. Все компоненты культуральных сред были торговой марки Gibco.

В культуральную среду добавляли следующие препараты:

1. Антиглаукомный препарат Пролатан (Sentiss Pharma Pvt. Ltd., Индия) (лаганопрост/БХ): лаганопрост — 0,005 %, БХ — 0,02 %.
2. Раствор БХ (Sigma-Aldrich): максимальная концентрация 0,02 % в физиологическом растворе.
3. Слезозаменитель Стиллавит (Офтальм-Ренессанс, Россия) (СЛ) — гиалуроновая кислота — 0,16 %, хондроитин сульфат — 0,05 %, декспантенол — 1 %, тетраборат натрия 0,05 %.

Действие исследуемых веществ на культуру клеток оценивали по следующим критериям: метаболическая активность клеток в МТС тесте, окрашивание трипановым синим, морфологические изменения, регистри-

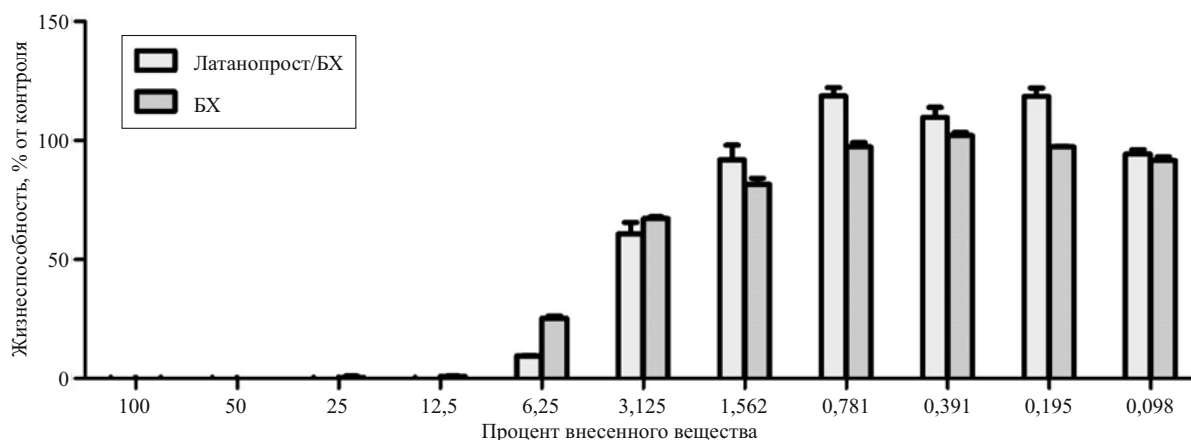
руемые с помощью световой и сканирующей электронной микроскопии.

Первая серия экспериментов была проведена при добавлении в культуральную среду вышеперечисленных препаратов в 10 последовательных разведениях, начиная со 100 %. Полученные результаты сравнивали с контрольными. В контрольные лунки не вносили препараты, в лунках летального контроля питательную среду заменяли на 70 % этанол.

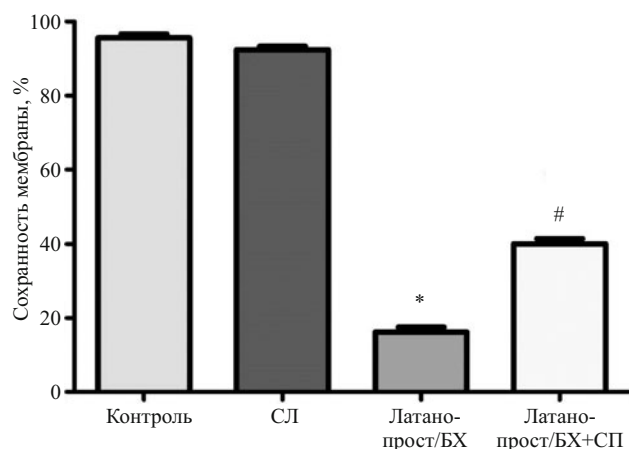
Для проведения МТС теста клетки рассеивали в лунки 96-луночного культурального планшета в плотности 2 тыс. на 1 лунку за 2 дня до исследования.

Экспозицию с препаратами для определения цитотоксичности проводили на протяжении короткого времени — 30 мин, повторяя динамику максимального контакта препарата в слезной жидкости.

После экспозиции с препаратами среду заменяли на свежую, после чего проводили оценку эффекта. Для этого был использован набор CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent (Promega), который позволяет по уровню пропускания света в лунке определить число клеток, в которых функционируют дегидрогеназные



**Рис. 2.** Диаграмма уровня выживаемости клеток лимба роговицы при внесении к ним последовательных разведений препаратов, содержащих БХ. Коэффициент корреляции Пирсона 0,98.



**Рис. 3.** Диаграмма соотношения клеток с сохранной мембраной в группах с внесением СЛ, латанопрост/БХ и при совместном внесении латанопрост/БХ + СЛ.

\* Различие с контролем значимо ( $p < 0,05$ ); # различие с латанопрост/БХ значимо ( $p < 0,05$ ).

ферменты, т.е. они метаболически активны. Тесты проводили в 3 повторах.

Исследование морфологии клеток проводили на культурах клеток после инкубации на протяжении более длительного времени — 24 ч. Концентрации препаратов для этого исследования и для совместного внесения препаратов были рассчитаны по результатам предыдущего теста с последовательными разведениями. За стартовую концентрацию для этих тестов брали

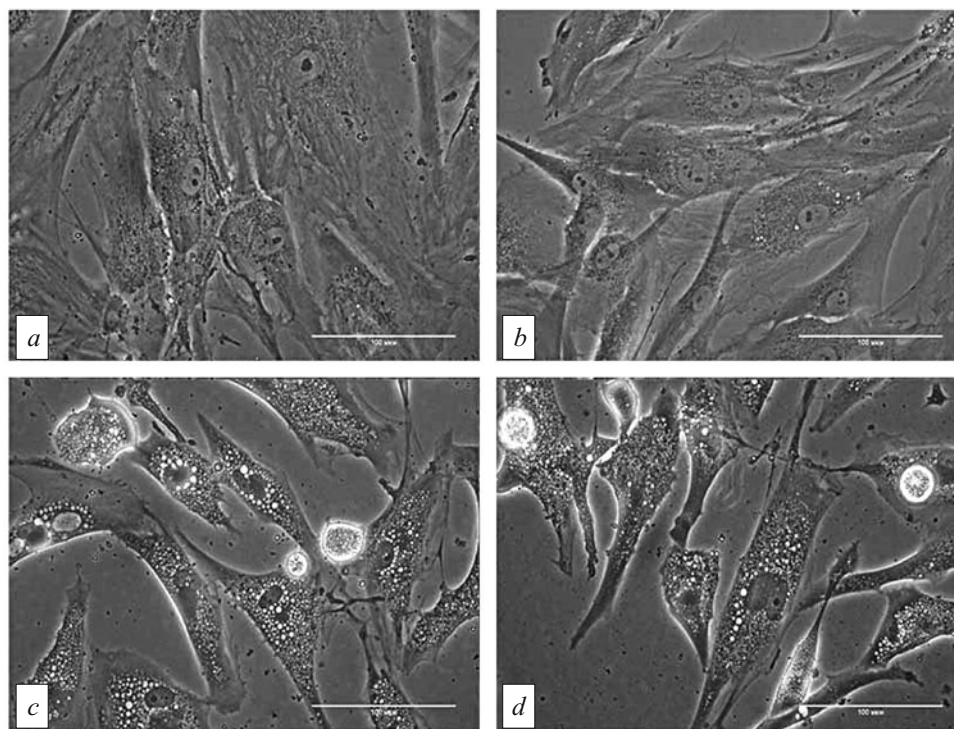
те разведения, при которых наблюдалась определяемая выживаемость клеток.

Еще одним тестом на выяснение уровня жизнеспособности клеток было их окрашивание трипановым синим (Sigma-Aldrich). Он окрашивает ядра только тех клеток, мембрана которых нарушена. После проведения окраски препараты фотографировали, был подсчитан процент окрашенных клеток (мертвых) и неокрашенных (живых) после инкубации с препаратами.

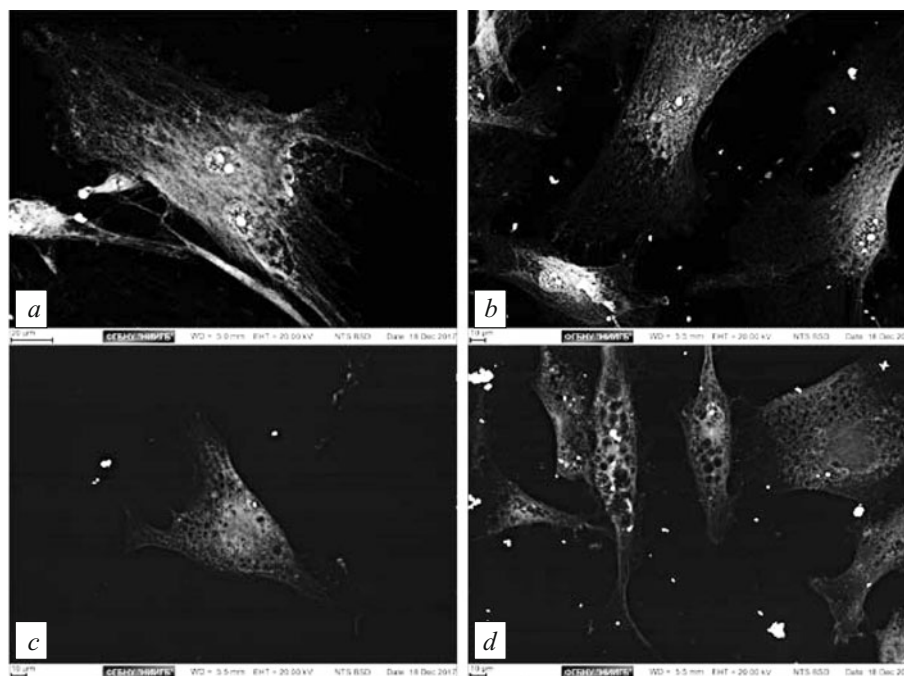
В течение 1 сут проводили оценку морфологии клеток при инкубации их с препаратами. Исследования проводили динамически, без окрашивания, на инвертированном микроскопе Zeiss AxioVert A1 (Германия) в фазово-контрастном режиме. Фотосъемку проводили с использованием фотоаппарата Canon EOS 700D (Япония). Отмечали размер и количество вакуолей, площадь, занимаемую ядром и цитоплазмой. Морфометрические измерения проводили с использованием программного продукта ImageJ.

После 24 ч исследования на световом микроскопе клетки были подготовлены для исследования на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) Zeiss EVO Ls10. Пробоподготовку проводили с лантаноидным контрастированием с использованием реагентов и по протоколу BioREE-B (ООО «Глаукон», Россия). Изображения были получены в режиме детекции обратно-рассеянных электронов, ускоряющее напряжение 20 кВ, режим низкого вакуума. Оценивали сохранность цитоархитектоники клеток.

Построение диаграмм и статистические вычисления проводили с использованием программного пакета



**Рис. 4.** Культура клеток лимба после 24 ч экспозиции с препаратами: а) контроль; б) СЛ; в) латанопрост/БХ; д) латанопрост/БХ + СЛ. Световая микроскопия, фазовый контраст, масштабный отрезок 100 мкм.



**Рис. 5.** Культура клеток лимба после экспозиции с препаратами: а) контроль; б) СЛ; в) латанопрост/БХ; д) латанопрост/БХ + СЛ. Сканирующая электронная микроскопия, лантаноидное контрастирование (BioREE-B).

та GraphPad Prism. Для сравнения групп использовали критерий Манна — Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости меньше 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Зарегистрированные значения уровней выживаемости клеток при добавлении к ним 3 вышеперечисленных препаратов в 10 последовательных разведениях приведены на рис. 1 и 2.

Установлено, что препарат искусственной слезы обладает низким уровнем цитотоксичности. Только при добавлении его в 100 % концентрации наблюдалось статистически значимое по отношению к контролю снижение выживаемости клеток, в остальных разведениях показатели были сопоставимы с контрольными и даже превышали их, что позволяет предположить стимулирующее действие слезозаменителя на метаболическую активность клеток лимба. Такие результаты согласуются с данными других исследователей, оценивших влияние препаратов искусственной слезы на клеточные культуры [12].

Показатели MTS теста для образцов с БХ (БХ и латанопрост с его добавлением), напротив, свидетельствуют о значительном повреждающем действии этого вещества на клетки. Только после разведения их в 32 и более раз наблюдалась определяемая метаболическая активность клеток (рис. 2).

Нужно отметить, что напрямую экстраполировать зафиксированные уровни токсичности на те явления, которые наблюдаются в ткани роговицы, нельзя, так как в использованной модельной системе *in vitro* отсутствуют основные защитные механизмы, ограждаю-

щие клетки от повреждения и удаляющие вредные метаболиты *in vivo*.

Из рис. 2 видно, что полученные значения выживаемости клеток в эксперименте с добавлением латанопрост/БХ и только БХ очень близки, нами был рассчитан коэффициент корреляции Пирсона между этими совокупностями, который составил 0,98, что говорит о тесной положительной корреляционной связи. В рассмотренном случае это можно интерпретировать как доказательство того, что токсический эффект внесения латанопрост/БХ обусловлен БХ.

Полученные данные в целом согласуются с опубликованными результатами других исследователей, хотя и демонстрируют более ранний “выход на плато” кривой доза — эффект [8]. Возможно, такая разница связана с тем, что в проанализированных литературных источниках оценивали действие БХ на иммортализованные культуры, а не на первичные.

В следующих сериях экспериментов была использована концентрация латанопрост/БХ, обеспечивающая определяемую выживаемость, т.е. 6,25 % от исходной. Был изучен эффект совместного добавления к клеткам 2 препаратов — латанопрост/БХ и СЛ.

Зафиксировано, что в 7 сериях экспериментов полученные при совместном внесении препаратов значения выживаемости статистически значимо превышают аналогичные при добавлении изолированно латанопрост/БХ. Приращения показателей выживаемости составили от 5,386 до 23,75 %. Эти факты позволяют нам говорить о наличии протективного эффекта СЛ при одновременном внесении с препаратом латанопрост/БХ.

Тест на окраску трипановым синим также показал, что после совместной инкубации с препаратом искусственной слезы в культуре наблюдается больше клеток с сохранной мембраной, чем в группе латанопрост/БХ, что также свидетельствует о защитном действии слезозаменителя (рис. 3).

Параллельно с выяснением уровня выживаемости культуры клеток оценивали и морфологическую сохранность клеток после экспозиции их с токсикантом.

На рис. 4 представлены снимки клеточной культуры, демонстрирующие разную реакцию клеток на введение препаратов, содержащих и не содержащих БХ.

Можно заключить, что светооптическая картина клеток культуры, инкубированной с СЛ (*b*), не отличается от контрольной группы (*a*). В то же время инкубация клеток с латанопрост/БХ (*c*) приводит к массивной вакуолизации цитоплазмы клеток, изменению их размеров, клетка “поджимается”, становится менее распластанной, ее площадь, как ядра, так и цитоплазмы, статистически значимо уменьшается. В группе с комбинацией латанопрост/БХ + СЛ (*d*) явления вакуолизации также происходят, однако они менее выражены — площадь, занимаемая вакуолями статистически значимо меньше.

Сходные наблюдения о морфологических изменениях и выживаемости стромальных клеток опубликованы исследователями, тестировавшими БХ на первичной культуре фибробластов конъюнктивы [11].

Представленные наблюдения, сделанные с помощью СЭМ, подтверждают уменьшение размеров клеток, потерю их архитектоники в группах с добавлением БХ (рис. 5, *c, d*).

Кроме того, бледный тон ядра и отсутствие на изображениях проекции ядрышек говорит о том, что процессы синтеза в клетках не идут.

При добавлении СЛ (рис. 5, *b*) количество ядрышек в клетках увеличивается, что косвенно свидетельствует о включении механизмов продукции внеклеточного матрикса.

В группе латанопрост/БХ + СЛ (рис. 5, *d*) ядро и ядрышко визуализируются, что говорит о хотя бы минимальном уровне метаболизма в этих клетках, хотя мы видим значительную вакуолизацию и компактизацию клеток по сравнению с контролем (рис. 5, *a*).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что антиглаукомный препарат Пролатан, содержащий в своем составе латанопрост и БХ, в высоких концентрациях оказывает повреждающее действие на культуру клеток лимба, и это действие по крайней мере на коротких сроках наблюдения обусловлено наличием в его составе БХ. Слезозаменитель Стиллавит не снижал жизнеспособность и не нарушал морфологию клеток лимба роговицы человека в условиях *in vitro*. Дополнительное введение слезозаменителя предупреждает повреждающее действие БХ на клетки в этой экспериментальной системе, что позволяет предполагать целесообразность применения лекарственных средств, содержащих БХ, в сочетании со слезозаменителями.

## ЛИТЕРАТУРА

1. О. И. Александрова, И. Н. Околов, Ю. И. Хорольская и др., *Офтальмология*, № 1, 59 – 66 (2017).
2. А. И. Ерёмченко, С. В. Янченко, *Фундам. исслед.*, № 7, 34 – 35 (2006).
3. В. П. Еричев, К. Г. Амбарцумян, *Глаукома*, № 2, 59 – 66 (2011).
4. Синдром “сухого глаза” и заболевания глазной поверхности. Клиника, диагностика, лечение, С. Ю. Федотова (ред.), Геотар-Медиа, Москва (2016).
5. D. A. Ammar, R. J. Noecker, M. Y. Kahook, *Adv. Ther.*, **28**(6), 501 – 510 (2011).
6. S. Datta, C. Baudouin, F. Brignole-Baudouin, et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **58**(4), 2406 – 2412 (2017).
7. G. A. Georgiev, N. Yokoi, K. Koev, E. Kutsarova, et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **52**(7), 4645 – 4654 (2011).
8. A. Guzman-Aranguéz, P. Calvo, I. Roperó, et al., *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **30**(9), 790 – 798 (2014).
9. S. Khoh-Reiter, B. A. Jessen, *BMC Ophthalmol.*, **9**, 5 (2009).
10. E. J. Kim, Y.-H. Kim, S.-H. Kang, et al., *Korean J. Ophthalmol.*, **27**(6), 446 – 453 (2013).
11. C. A. Rasmussen, P. L. Kaufman, J. A. Kiland, *J. Ocular Pharmacol. Ther.*, **30**(2 – 3), 163 – 169 (2014).
12. M. Rolando, G. Brezzo, P. Giordano, et al., In: O. P. Van Bijsterweld, M. A. Lemp, D. Spinelli (eds.), *The Lacrimal System*, Kagler & Ghedini publications, Amsterdam, (1991), pp. 89 – 91.
13. G. M. Yanochko, S. Khoh-Reiter, M. G. Evans, B. A. Jessen, *Toxicol. in Vitro*, **24**(4), 1324 – 1331 (2010).

Поступила 04.06.19

## EXPERIMENTAL STUDY OF THE CYTOTOXICITY OF BENZALKONIUM CHLORIDE AS A COMPONENT OF THE ANTIGLAUCOMA PREPARATION ON THE CULTURE OF CORNEAL LIMBAL CELLS AND THE POSSIBILITY OF CYTOTOXICITY REDUCTION

A. M. Subbot, T. V. Nesterova, A. N. Gabashvili, G. B. Egorova, and V. V. Averich

Research Institute of Eye Diseases, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Rossolimo 11A/B, Moscow, 119021 Russia

The cytotoxic effect of an antiglaucoma preparation Prolatan containing benzalkonium chloride was studied in comparison to benzalkonium chloride itself, a lacrimer Stillavit, and their combination on the culture of the human corneal limbal cells. It was found that the cytotoxicity of the antiglaucomatous preparation Prolatan on short terms of incubation was related to the content of preservative (benzalkonium chloride). The tear-replacer showed low toxicity, and the joint application of drugs of the two groups (antiglaucomatous preparation with benzalkonium chloride and a lacrimer) led to a decrease in the level of cytotoxicity.

**Keywords:** antiglaucoma drug; Prolatan; benzalkonium chloride; cell culture; artificial tear drops; Stillavit; cytotoxicity.