

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-7-27-31

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ТРУСОПТА И ДОРЗОЛАНА СОЛО НА ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА

А. М. Суббот, Н. В. Фисенко*, С. В. Труфанов¹

Изучено влияние антиглаукомных препаратов тросопт и дорзолан соло, содержащих дорзоламид в качестве действующего вещества в одинаковой концентрации, на культуру эндотелиальных клеток роговицы человека. Выявлено, что тросопт обладает более выраженным цитотоксическим эффектом (снижение выживаемости клеток на 8,5 % при концентрации в нем дорзоламида 20 мкг/мл, ($p = 0,022$) и на 12,8 % при концентрации в нем дорзоламида 200 мкг/мл ($p < 0,0001$), по сравнению с препаратом дорзолан соло, что, возможно, обусловлено наличием в его составе бензалкония хлорида.

Ключевые слова: дорзоламид; бензалкония хлорид; культура эндотелиальных клеток роговицы; цитотоксичность; внутриглазное давление; кератотрансплантат.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что декомпенсация эндотелиального слоя, возникающая после пересадки роговицы, является одной из причин необратимых изменений кератотрансплантата, приводящих к уменьшению его прозрачности. Повышение офтальмотонуса в послеоперационном периоде способствует ускоренной потере эндотелиальных клеток (ЭК) за счет компрессионного эффекта, возникающего в условно изолированной закрытой структуре — глазном яблоке. Принято считать, что повышение внутриглазного давления (ВГД) обусловлено нарушением баланса между продукцией и оттоком внутриглазной жидкости (ВГЖ). Затруднение оттока ВГЖ может быть вызвано изменением формы угла передней камеры, вызванного несоответствием размера донорского роговичного трансплантата и ложа реципиента, введением газо-воздушной смеси в переднюю камеру или образованием периферических передних синехий. Увеличение секреции ВГЖ цилиарным телом, как правило, возникает из-за длительного применения глюкокортикостероидов (в виде растворов для инстилляций, субконъюнктивальных и парабульбарных введений) в послеоперационном периоде. К факторам риска повышения ВГД после пересадки роговицы также относят сопутствующую глаукому, наличие воспалительных заболеваний и ранее выполненные реконструктивные вмешательства на структурах переднего отрезка глаза [1, 7, 15].

В настоящее время одним из препаратов, широко используемых для снижения ВГД, является дорзола-

мид. Это липофильное соединение относится к ингибиторам карбоангидразы (КА). Механизм его действия заключается в блокаде КА II типа, расположенной в отростках цилиарного тела, что приводит к угнетению продукции ВГЖ [13]. Вместе с тем существуют данные о том, что применение дорзоламида связано с развитием эндотелиальной дисфункции роговицы, что, вероятно, обусловлено уменьшением метаболической активности ЭК роговицы, содержащих КА I и II типа [10, 14].

Еще одним фактором риска развития декомпенсации эндотелиального слоя роговицы при применении антиглаукомных лекарственных препаратов является эффект вспомогательных компонентов, обеспечивающих стабильность действующего вещества и препятствующих росту микрофлоры [9]. Одним из них является бензалкония хлорид (БХ). Это четвертичное аммониевое соединение относится к катионным детергентам и характеризуется значительной активностью в отношении широкого спектра микроорганизмов (кроме микобактерий и спорообразующих возбудителей). Механизм его действия заключается в нарушении структуры клеточной мембраны, денатурации белков, а также в ингибировании ферментов. Известно, что применение БХ в качестве вспомогательного вещества ассоциировано с нарушением стабильности прекорнеальной слезной пленки, развитием хронического воспаления в конъюнктиве, повреждением эпителиального слоя роговицы и дегенерацией трабекулярной сети [2 – 5]. Кроме того, нельзя исключить токсическое действие БХ на ЭК роговицы [8].

В связи с этим целью нашего исследования была оценка на культуре эндотелиальных клеток роговицы человека влияния дорзоламида в составе препаратов

¹ ФГБНУ “НИИ глазных болезней”, Россия, 119021, Москва, ул. Россолимо, 11, А, Б.

* e-mail: natfisenko@mail.ru, тел: 8-9031233944

трусопт и дорзолан соло и БХ в составе препарата трусопт.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования была использована первичная клеточная культура эндотелия роговицы человека третьего пассажа. Клетки были получены методом ферментативной диссоциации лоскутов, представленного эндотелиальным слоем и десцеметовой мембраной и полученных из донорских корнеосклеральных дисков, консервированных в среде Борзенка – Мороз. Для дезагрегации лоскутов была проведена инкубация их в растворе коллагеназы (10 мкг/мл) в течение 1 ч при 37 °С. После отмывки фермента фрагменты были дополнительно диссоциированы на протяжении 10 мин в 0,05 % растворе трипсина в ЭДТА. Полученную клеточную суспензию наносили на культуральный пластик 1 лунки 24-луночного планшета, поверхность которого с целью увеличения адгезии была покрыта фибронектином (10 мкг/см²). ЭК выращивали на безсывороточной среде K-SFM (Gibco) в стандартных условиях — 37 °С, 5 % CO₂ и 100 % влажности. Замену среды проводили 1 раз в 2–3 дня. В эксперименте в культуральную среду (выступающую в роли растворителя) добавляли следующие препараты:

1. Антиглаукомный препарат “Трусопт” (Santen, Япония): дорзоламид — 22 мг/мл, БХ — 0,075 мг/мл, гиалеза — 4,75 мг/мл, маннитол — 23 мг/мл, натрия цитрат — 2,94 мг/мл.

2. Антиглаукомный препарат “Дорзолан Соло” (Solopharm, Россия): дорзоламид — 22 мг/мл, натрия гиалуронат — 1,8 мг/мл, маннитол — 23 мг/мл, натрия цитрат — 2,94 мг/мл.

В качестве контроля использована группа ЭК, инкубированных в ростовой среде K-SFM без добавления препаратов.

Известно, что при инстилляционном пути введения максимальная концентрация (C_{\max}) дорзоламида в интактной роговице достигает 20 мкг/мл, а во ВГЖ — 3 мкг/мл [11]. В связи с этим нами была проведена оценка активности трусопта и дорзоламан соло в разведениях, соответствующих содержанию дорзоламида в концентрациях 3 и 20 мкг/мл. Также было проанализировано действие выбранных антиглаукомных препаратов в разведении, соответствующем концентрации действующего вещества 200 мкг/мл. Это было обусловлено тем, что в условиях раннего послеоперационного периода, как правило, отмечается повышение проницаемости кератотрансплантата на фоне активного воспаления, что может приводить к большему накоплению лекарственных веществ как в самой роговице, так и во ВГЖ.

Все тесты проводили в 3 повторах. Действие исследуемых лекарственных препаратов на культуру ЭК оценивали по метаболической активности клеток в MTS-тесте, а также по морфологическим изменениям, регистрируемым световой микроскопией. Для прове-



Рис. 1. Морфологическая картина контрольной культуры эндотелиальных клеток роговицы человека, фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок 50 мкм.

дения MTS-теста ЭК высевали в лунки 96-луночного планшета, покрытые фибронектином, в плотности 3 тыс/см² за 2 сут до исследования. Экспозицию с препаратами для определения цитотоксичности проводили в течение 24 ч. Затем культуральную среду заменяли на свежую, содержащую также реагент CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega). Он позволяет определить число метаболически активных клеток, которое прямо пропорционально коэффициенту пропускания света, измеренному в лунке. Фотометрию проводили с использованием прибора Muliscan-FC при длине волны 490 нм.

Морфологические изменения ЭК оценивали методом фазово-контрастной микроскопии без окрашивания на инвертированном микроскопе Zeiss AxioVert A1 (Германия). Фотофиксацию выполняли фотоаппаратом Canon EOS 700D (Япония). Последующую обработку изображений проводили с помощью программного пакета CorelDraw.

Статистическую обработку материала проводили с использованием программы GraphPad Prism 5. Для сравнения групп использовали критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости меньше 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлена светооптическая картина клеточной культуры, использованной в качестве контроля. Визуализируются ЭК полигональной формы с четкими ядрами, “распластанные” на поверхности и формирующие 80 % монослой.

При фазово-контрастной микроскопии, выполненной после инкубации ЭК с трусоптом и дорзоламан соло в разведении, соответствующем концентрации дорзоламида 3 мкг/мл, среди эндотелиоцитов определяются единичные клетки с признаками конденсации цитоплазмы, в некоторых клетках отмечается наличие вакуолей (рис. 2, а, б). Светооптическая картина куль-

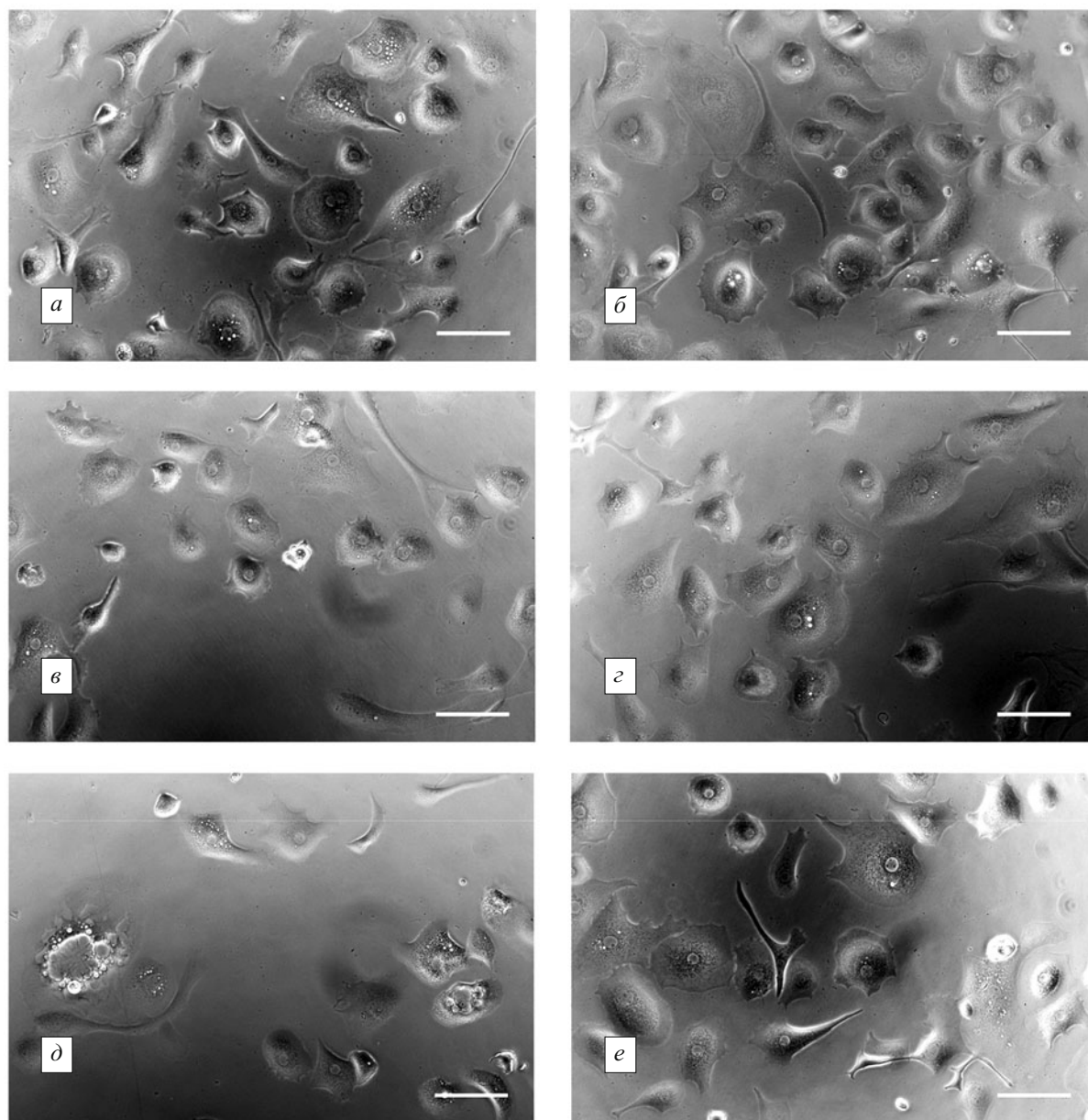


Рис. 2. Морфологическая картина культуры эндотелиальных клеток роговицы человека после экспозиции с препаратами в течение 24 ч, фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок 50 мкм:

- а* — трусопт (концентрация дорзоламида 3 мкг/мл, бензалкония хлорида — 0,01 мкг/мл);
- б* — дорзолан соло (концентрация дорзоламида 3 мкг/мл);
- в* — трусопт (концентрация дорзоламида 20 мкг/мл, бензалкония хлорида — 0,075 мкг/мл);
- г* — дорзолан соло (концентрация дорзоламида 20 мкг/мл);
- д* — трусопт (концентрация дорзоламида 200 мкг/мл, бензалкония хлорида — 0,75 мкг/мл);
- е* — дорзолан соло (концентрация дорзоламида 200 мкг/мл).

туры клеток в обеих группах практически не отличается от контроля. По данным MTS-теста значимых различий в уровне метаболической активности ЭК между группами не выявлено (рис. 3).

При наблюдении за культурой ЭК после инкубации с трусоптом в разведении, соответствующем концентрации дорзоламида 20 мкг/мл, можно отметить появление деструктивных изменений в ЭК. Так, по данным фазово-контрастной микроскопии, отмечено уменьше-

ние площади клеток, они становятся менее расплывчатыми. В цитоплазме обнаруживаются вакуоли. Появляются компактные фрагменты, вероятно апоптотические тельца (рис. 2, *в*). Вместе с тем дорзолан соло в том же разведении обуславливает только появление вакуолей в цитоплазме отдельных ЭК (рис. 2, *г*). Результаты MTS-теста, представленные на рис. 3, подтверждают светооптическую картину: метаболическая

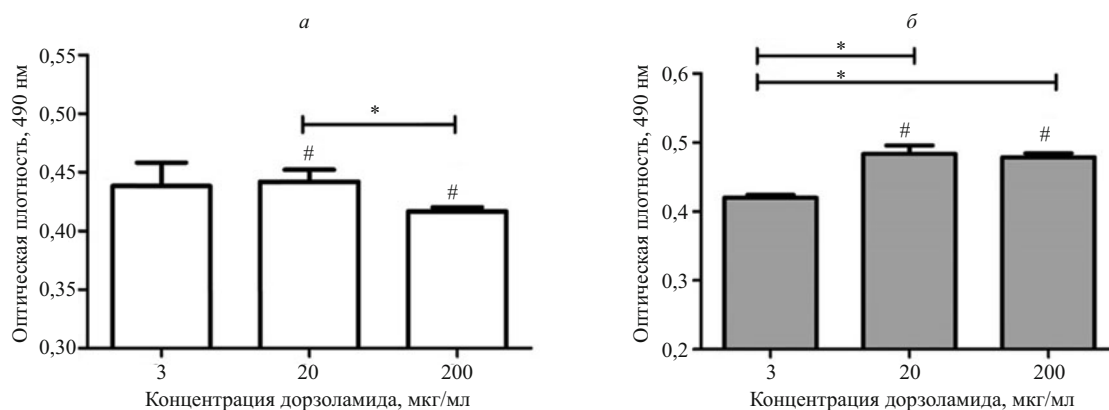


Рис. 3. Влияние препаратов на выживаемость эндотелиальных клеток роговицы человека, зарегистрированное по результатам MTS теста:

a — трупот;

б — дорзолан соло;

* $p < 0,05$; # $p < 0,05$ (между *a* и *б*).

активность ЭК после добавления дорзолана соло, в сравнении с трупотом, достоверно выше.

Инкубация клеточной культуры с препаратом трупот в разведении, соответствующем концентрации дорзоламида 200 мкг/мл, приводит к развитию деструктивных изменений практически во всех ЭК. Так, при микроскопии выявляются клетки с различной степенью вакуолизации и конденсации цитоплазмы, в некоторых клетках наблюдается “вскипание цитоплазмы” (“блеббинг”), характерное для поздних стадий апоптоза. В поле зрения отмечено много апоптотических телец (рис. 2, *д*). Дорзолан соло в аналогичном разведении приводит к менее выраженным изменениям в культуре: в цитоплазме отдельных ЭК происходит вакуолизация, определяются единичные апоптотические тельца (рис. 2, *е*). Как видно из рис. 3, показатели MTS-теста также свидетельствуют о большем повреждающем действии трупота на клеточную культуру.

Таким образом, сравнительная оценка действия трупота и дорзолана соло в одинаковых разведениях выявила достоверно более выраженный негативный эффект трупота в отношении культуры ЭК роговицы человека. Это позволило исключить ведущее влияние дорзоламида на метаболическую активность ЭК в условиях *in vitro*.

В состав трупота в качестве вспомогательного вещества входит БХ. По данным ряда авторов это соединение обладает цитотоксическим действием в отношении эпителиальной выстилки и бокаловидных клеток конъюнктивы, а также роговичного эпителия и ЭК [5]. Нами было исследовано влияние трупота на культуру ЭК роговицы человека с учетом особенностей фармакокинетики его основного вещества — дорзоламида. Так, трупот в максимальном разведении, использованном в нашей работе, содержал БХ в концентрации 0,01 мкг/мл, и не вызывал деструктивных изменений в ЭК. Уменьшение разведения трупота и соответственно повышение концентрации БХ до 0,075 мкг/мл спо-

собствовало ослаблению метаболической активности ЭК. Выявленное снижение выживаемости клеток по данным MTS-теста (рис. 3, *а*) было отмечено при их инкубации с трупотом в минимальном разведении (концентрация БХ равна 0,75 мкг/мл).

Полученные нами данные о действии препарата, содержащего БХ, на культуру ЭК роговицы человека согласуются с результатами М. Ayaki, et al. [6]. Вместе с тем нами отмечен токсический эффект БХ, содержащегося в трупоте при более низкой его концентрации, чем была выявлена указанными авторами. Это может быть обусловлено как различием в методике постановки эксперимента (в частности, другая ростовая среда и “посевная” плотность культуры ЭК), так и индивидуальной чувствительностью клеточной культуры.

Таким образом, цитотоксический эффект препарата трупот на ЭК роговицы человека, по-видимому, обусловлен наличием в его составе БХ, применяемого в качестве вспомогательного вещества. Считаем, что применение антиглаукомных препаратов, содержащих БХ, не является целесообразным для снижения внутриглазного давления у пациентов после пересадки роговицы.

Интересно, что по данным MTS-теста обнаружено достоверное повышение метаболической активности ЭК при уменьшении степени разведения дорзолана соло (рис. 3, *б*). Вероятно, это обусловлено стимулирующим действием гиалуроната натрия, входящего в состав дорзолана соло в качестве вспомогательного вещества. По данным ряда авторов, это соединение обладает цитопротективным действием на ЭК роговицы человека [12]. Однако требуется проведение дополнительной серии экспериментов, направленных на оценку действия данного вещества на культуру эндотелиальных клеток роговицы человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительный анализ состояния первичной культуры эндотелиальных клеток роговицы человека после инкубации с тросоптом и дорзоланом соло в одинаковых разведениях свидетельствует о более выраженном цитотоксическом действии тросопта. Зарегистрировано снижение выживаемости клеток на 8,5 % при концентрации в нем дорзоламида 20 мкг/мл ($p = 0,022$) и на 12,8 % при концентрации в нем дорзоламида 200 мкг/мл ($p < 0,0001$), по сравнению с дорзоланом соло.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. А. Маложен, С. В. Труфанов, С. Ю. Петров, *Офтальмология*, **12**(3), 4 – 11 (2015); doi: 10.18008/1816-5095-2015-3-4-11.
2. А. М. Суббот, Т. В. Несерова, А. Н. Габашвили и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **82**(7), 33 – 37 (2019); doi: 10.30906/0869-2092-2019-82-7-33-37.
3. D. A. Ammar, R. J. Noecker, M. Y. Kahook, *Adv. Ther.*, **28**(6), 501 – 510 (2011); doi: 10.1007/s12325-011-0029-x.
4. D. A. Ammar, M. Y. Kahook, *Mol. Vis.*, **17**, 1806 – 1813 (2011).
5. M. Ayaki, S. Yaguchi, A. Iwasawa, R. Koide, *Clin. Exp. Ophthalmol.*, **36**(6), 553 – 559 (2008); doi: 10.1111/j.1442-9071.2008.01803.x.
6. M. Ayaki, A. Iwasawa, Y. Inoue, *Clin. Ophthalmol.*, **4**, 1217 – 1222 (2010); doi: 10.2147 / OPTH. S13708.
7. M. R. Banitt, V. Chopra, *Cur. Opin Ophthalmol.*, **21**(2), 144 – 149 (2010); doi: 10.1097/ICU.0b013e3283360b95.
8. W. Chen, Z. Li, J. Hu, et al., *PLOS ONE*, **6**(10), e26103 (2011); doi: 10.1371/journal.pone.0026103.
9. P. D. Freeman, M. Y. Kahook, *Expert Rev. Ophthalmol.*, **4**(1), 59 – 64 (2009); doi: 10.1586/17469899.4.1.59.
10. J. Inoue, M. Oka, Y. Aoyama, et al., *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **20**(1), 1 – 13 (2004); doi: 10.1089/108076804772745419.
11. T. Loftsson, P. Jansook, E. Stefansson, *Acta Ophthalmol.*, **90**, 603 – 608 (2012); doi: 10.1111/j.1755-3768.2011.02299.x.
12. M. Parekh, *Sci. Rep.*, **7**, 142 (2017); doi: 10.1038/s41598-017-00209-5.
13. M. F. Sugrue, *Prog. Retin. Eye Res.*, **19**(1), 87 – 112 (2000); doi: 10.1016/s1350-9462(99)00006-3.
14. M. G. Wirtitsch, O. Findl, H. Heinzl, W. Drexler, *Arch. Ophthalmol.*, **125**(10), 1345 – 1350 (2007); doi: 10.1001/archophth.125.10.1345.
15. M. Zemba, A. C. Stamate, *Rom. J. Ophthalmol.*, **61**(3), 159 – 165 (2017); doi: 10.22336/rjo.2017.30.

Поступила 18.06.20

CYTOTOXICITY OF TRUSOPT AND DORZOLAN SOLO DRUGS TO PRIMARY CULTURE OF HUMAN CORNEAL ENDOTHELIAL CELLS

A. M. Subbot¹, N. V. Fisenko^{1,*}, and S. V. Trufanov¹

¹ Research Institute of Eye Diseases, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Rossolimo 11A/B, Moscow, 119021 Russia

*e-mail: natfisenko@mail.ru

The effect of antiglaucoma drugs on primary culture of human corneal endothelial cells (HCECs) was evaluated. Test solutions diluted in culture media included trusopt (dorzolamide preserved with benzalconium chloride) and dorzolan solo (preservative-free dorzolamide). Trusopt showed greater cytotoxicity with average HCECs viability difference of 8.53% for 20 mg/mL dorzolamide solution ($p = 0.0224$) and 12.85% for 200 mg/mL dorzolamide solution ($p < 0.0001$), which was probably related to the presence of benzalconium chloride.

Keywords: dorzolamide; benzalconium chloride; human corneal endothelial cells; cytotoxicity; intraocular pressure; corneal graft.