

Терещенко А.В.², Белый Ю.А.², Тахчиди Е.Х.¹, Новиков С.В.³,
Майчук Н.В.¹, Усанова Г.Ю.¹

¹МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, г. Москва

²Калужский филиал МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова

³ООО «Научно-экспериментальное производство «Микрохирургия глаза», г. Москва

E-mail: nauka@mntk.kaluga.ru

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ 0,1 % РАСТВОРА БЕНЗАЛКОНИЯ ХЛОРИДА НА СОСТОЯНИЕ РОГОВИЦЫ У КРОЛИКОВ

В настоящее время разработка новых эффективных методов профилактики и лечения токсических эрозий роговицы на фоне длительной медикаментозной терапии является актуальной. Для оценки их эффективности на доклиническом уровне и отработки режима инстилляций необходимо экспериментальное моделирование токсических эрозий роговицы с учетом этиологического фактора повреждения.

С целью изучения токсического воздействия раствора бензалкония хлорида на роговицу кроликов проведены исследования клинично-функционального состояния роговицы (с использованием метода конфокальной микроскопии и подсчетом площади десквамированного эпителия) и сравнительная оценка влияния инстилляций поверхностно-активного вещества – 0,1 % раствора бензалкония хлорида (опытная группа) 4 раза в день в течение 7 дней и физиологического раствора (контрольная группа) на роговицу кролика.

Результаты настоящего исследования подтверждают цитотоксическое действие раствора бензалкония хлорида на клетки глазной поверхности, что проявляется в развитии токсической эпителиальной эрозии на 7 сутки эксперимента. Ярко выраженное раздражающее действие 0,1 % раствора бензалкония хлорида не позволяет оценить слезопродукцию у экспериментальных животных из-за выраженного слезотечения. Подобранный режим и кратность инстилляций позволяет получить в эксперименте клинично-функциональные изменения роговицы, подобные клиничским проявлениям у пациентов, находящихся на длительной терапии медикаментозными препаратами.

Использование разработанной концентрации и режима инстилляций раствора бензалкония хлорида представляется перспективным и целесообразным при создании и изучении новых методов лечения токсической эрозии роговицы на фоне длительного применения медикаментозных препаратов на доклиническом этапе.

Ключевые слова: бензалкония хлорид, эрозия роговицы, цитотоксичность, конфокальная микроскопия.

Актуальность

Консервативное лечение различной офтальмопатологии (глаукома, ожоговая болезнь, состояние после кератопластики, фотокераторефракционных операций, дистрофии роговицы) требует назначения длительной местной медикаментозной терапии.

Развитие побочных реакций, как местного, так и системного характера на фоне местной медикаментозной терапии глазных заболеваний может быть причиной несоблюдения режима назначенной терапии, снижения качества жизни пациентов, а также может ухудшать клинично-функциональные результаты проведенного лечения [6], [9]. Токсические эрозии роговицы – наиболее частое проявление местного побочного действия лекарственных препаратов [8].

На фоне длительной медикаментозной терапии наиболее часто поражение роговицы проявляется в виде мелкоточечных микроэрозий,

реже макроэрозий, преимущественно в нижних квадрантах роговицы. По данным конфокальной микроскопии данные изменения наиболее часто проявляются в виде повышенной десквамации клеток переднего эпителия, кератинизации, отека передней стромы роговицы и снижения прозрачности экстрацеллюлярного матрикса [1].

Причиной возникновения токсических эрозий роговицы может послужить активное вещество препарата [5] и наличие в нем консерванта [2], [10].

Антибактериальные свойства консервантов реализуются за счет способности их молекул адсорбироваться на клеточных мембранах бактерий, взаимодействуя с фосфолипидами и белками, что приводит к нарушению их целостности [7]. Наиболее часто используемые консерванты в офтальмологии относятся к классу катионных детергентов, в том числе бензалкония хлорид (БХ) (benzalkonium

chloride, $C_6H_5CH_2N(CH_3)_2RCl$). Молекулы консервантов не обладают селективностью к компонентам бактериальных мембран, и даже в низких концентрациях при длительном применении оказывают токсическое действие на клетки роговицы [11], что требует назначения протекторов роговицы и конъюнктивы данной категории пациентов.

Разработка новых эффективных методов профилактики и лечения токсических эрозий роговицы на фоне длительной медикаментозной терапии является актуальной. Для оценки их эффективности на доклиническом уровне и отработки режима инстилляций необходимо экспериментальное моделирование токсической эрозий роговицы с учетом этиологического фактора повреждения.

Цель исследования

Экспериментальное изучение влияния инстилляций 0,1 % раствора бензалкония хлорида на клинко-функциональное состояние роговицы кролика.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование было выполнено на 8 кроликах (16 глаз) породы Шиншилла, разделенных на 2 группы (опытная и контрольная группы). В опытной группе (8 глаз) ежедневно проводили 4-кратные инстилляций 0,1 % раствора бензалкония хлорида; в контрольной группе (парные глаза каждого кролика – 8 глаз) проводили инстилляцию физиологического раствора NaCl 0,9 % 2 раза в день. Динамическое наблюдение за животными проводили ежедневно утром и вечером с использованием биомикроскопии переднего отрезка глаза окрашиванием роговицы витальными красителями (тест-полоски с раствором лиссаминового зеленого и раствором флюоресцеина натрия) с последующим их фотографированием и подсчетом площади десквамированного эпителия в программе Adobe Photoshop CS. Для оценки морфологических изменений ежедневно проводили конфокальную микроскопию роговицы на приборе Confoscan 4 (Nidek, Япония). Все результаты представлены в виде среднеарифметических значений \pm стандартное отклонение (max значение – min значение).

Результаты

Во все сроки наблюдения в группе контроля глаза оставались спокойные без признаков раздражения, растворами лиссаминового зеленого и флюоресцеина натрия не окрашивались. При анализе морфологической картины роговицы, полученной при конфокальной микроскопии, отклонений от нормы выявлено не было.

В опытной группе на фоне инстилляций 0,1 % раствора бензалкония хлорида характер изменений глазной поверхности носили дозозависимый характер, что проявлялось в динамическом нарастании клинко-морфологических изменений в зависимости от сроков наблюдения.

Так через 24 часа от начала эксперимента в опытной группе глаза оставались спокойные. Конъюнктивa всех глаз сохраняла бледно-розовый оттенок, инъекции сосудов отмечено не было. Роговица сохраняла свою прозрачность, раствором лиссаминового зеленого и 0,5 % раствором флюоресцеина натрия не окрашивалась.

На 3 сутки эксперимента в опытной группе у всех животных отмечались признаки умеренного раздражения, которые проявлялись в виде слезотечения и блефароспазма. При биомикроскопии переднего отрезка глаз отмечалась умеренная конъюнктивальная инъекция, роговица сохраняла свою прозрачность и блеск, растворами витальных красителей не окрашивалась. При изучении морфологической картины роговицы методом конфокальной микроскопии отклонений от нормы выявлено не было: визуализировались жизнеспособные клетки поверхностных слоев эпителия, правильной формы с четкими границами, слаборефлективными ядрами. В передних и задних слоях стромы отмечались кератоциты правильной формы без патологической рефлективности на фоне прозрачного экстрацеллюлярного матрикса. Эндотелиальный слой роговицы был представлен в виде клеток правильной формы, с четкими границами, без патологических включений и признаков отека.

На 5 сутки эксперимента в опытной группе признаки раздражения нарастали. При биомикроскопии переднего отрезка глаз отмечалась

умеренная конъюнктивальная инъекция, шероховатость роговицы. При окраске витальными красителями в центральной зоне отмечался поверхностный дефект роговицы в виде мелкоочечных единичных эрозий. По данным конфокальной микроскопии отмечалось появление в поверхностных слоях эпителия клеток с неполной прозрачностью цитоплазмы, единичные десквамированные эпителиоциты с гиперрефлекторными ядрами с некоторой размытостью межклеточных границ. В стромальных отделах и эндотелиальном слое роговицы морфологическая картина не имела существенного отличия от группы контроля.

На 7 сутки эксперимента сохранялись слезотечение и блефароспазм у всех опытных животных. Конъюнктивa всех глаз была отечна, гиперемирована. Отмечалось снижение прозрачности, за счет умеренного отека поверхностных слоев стромы, при окраске витальными красителями роговица диффузно прокрашивалась в виде мелкоочечной диффузной эпителиопатии. По данным конфокальной микроскопии роговицы нами было зафиксировано наличие во всех опытных глазах повышенной десквамации эпителия и псевдокератинизации. В поверхностном слое эпителия роговицы отмечалась размытость межклеточных границ с повышенной рефлективностью ядер и цитоплазмы клеток, наблюдались единичные эпителиальные дефекты. В передних слоях стромы роговицы наблюдались явления клеточного стромального отека, что проявлялось в виде повышения рефлективности ядер и цитоплазмы кератоцитов и визуализации их отростков. Также отмечалось снижение прозрачности экстрацеллюлярного матрикса и увеличение количества активных кератоцитов. Морфологическая картина глубоких стромальных и эндотелиального слоев роговицы не имела существенного отличия от группы контроля.

Отмена раствора бензалкония хлорида после 7-дневных инстилляций приводило к полному восстановлению морфологической структуры роговицы и купированию видимых признаков воспаления через $129,22 \pm 27,73$ часа.

Продолжение инстилляций раствора бензалкония хлорида более 7 суток вызывало нарастание клинической симптоматики повреждения

глазной поверхности. На 14-е сутки наблюдения во всех опытных глазах отмечался выраженный хемоз конъюнктивы, диффузный отек всех слоев роговицы, концентрично лимбу отмечается рост поверхностных сосудов по направлению к оптической зоне на 2 мм. Поскольку изменения глазной поверхности приобретали характер необратимых, эксперимент в данной группе был прекращен.

Обсуждение

На сегодняшний день, самым распространенным консервантом, входящим в состав офтальмологических препаратов, остается бензалкония хлорид.

Многочисленные клинические исследования подтверждают наличие токсического действия бензалкония хлорида на роговицу и другие структуры глазной поверхности. Отмена медикаментозного лечения или использование бесконсервантных аналогов не всегда представляется возможным, что определяет актуальность разработки новых подходов к лечению пациентов, вынужденных находиться на длительной местной терапии офтальмологическими препаратами.

В настоящее время имеются различные мнения о механизмах токсического действия БХ на клетки слизистой оболочки глаза. Бензалкония хлорид вызывает нарушение целостности липидного слоя прероговичной слезной пленки, что приводит к сокращению времени ее разрыва, чрезмерному испарению с глазной поверхности, осаждению компонентов муцинового слоя и, как следствие, повышению концентрации ионов в слезной жидкости, т.е. повышению осмолярности. Повышенная осмолярность провоцирует выход ионов из клетки по градиенту концентрации, что нарушает осмотический баланс клетки. Также бензалкония хлорид оказывает непосредственное токсическое действие на секреторные и несекреторные эпителиальные клетки роговицы и конъюнктивы.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния инстилляций раствора бензалкония хлорида на состояния роговицы кролика с подбором концентрации раствора, а также отработки режима и кратности инстилляций для моделирования токсической эрозии.

Выбор концентраций БХ в этом эксперименте был основан на клинической практике и экспериментальных исследованиях, представленных в литературе.

Цитотоксический эффект бензалкония хлорида в зависимости от его концентрации нашел свое отражение в экспериментальной работе М. De Saint Jean с соавт. (2009) на клеточной линии клеток конъюнктивы человека «Chang Conjunctiva». Экспозиции раствора бензалкония хлорида в концентрации 0,005 % и ниже провоцировали замедление клеточного роста и деления, в концентрации 0,01 % вызывали гибель клеток по типу апоптоза в течение 24 часов, а высокие концентрации бензалкония хлорида от 0,1 % вызывали немедленный лизис клеток по типу некроза [11].

В условиях изолированной культуры невозможно воспроизвести весь комплекс защитно-приспособительных механизмов тканей, что не всегда объективно отражает функциональное влияние бензалкония хлорида. Вследствие этого, изучение влияния раствора бензалкония хлорида в настоящем исследовании проводили на экспериментальных животных.

Наиболее часто применяемая концентрация БХ в офтальмологических препаратах 0,01 % (в диапазоне от 0,004 % до 0,02 %) препаратах [14].

Создание экспериментальной модели на животных с использованием 0,01 % концентрации имеет определенные трудности, в связи с длительным наблюдением за животными [13]. Так, Furrer с соавторами выявили, что инстилляцией бета-блокаторов с консервантами (БХ 0,01 %) в течение 28 дней, вызывает эрозирование 9 % эпителия от общей поверхности роговицы [12].

В связи с этим многие исследователи изучали острое токсическое действие бензалкония хлорида на глазную поверхность, увеличив концентрацию в 1–50 раз. Увеличение концентрации раствора бензалкония хлорида согласуется с правилом Габера [15], используемого в токсикологии, применимым для веществ, обладающих кумулятивным действием. Согласно данному правилу увеличение концентрации вещества позволяет сократить время воздействия с сохранением дозы токсического вещества в тканях. Физиологический

раствор (0,9 % NaCl) был выбран в качестве препарата сравнения, как интактный раствор, не оказывающий токсическое действие на глазную поверхность.

Xiong С. с соавторами разработали модель синдрома сухого глаза, полученную путем инстилляций 0,1 % раствора бензалкония хлорида в течение 14 дней [17].

Позднее Zhirong Lin разработали модель синдрома сухого глаза на лабораторных крысах, сократив сроки получения экспериментальной модели до 7 дней за счет увеличения концентрации бензалкония хлорида до 0,2 % [18].

Ибрагимова Д.И. с соавторами изучали влияние 0,01 % и 0,2 % растворов бензалкония хлорида на состояние роговицы и слезопродукцию у кроликов. По данным исследователей во всех опытных группах наблюдались явления эпителиопатии роговицы различной степени выраженности (от единичных эпителиальных дефектов до тотальной эрозии роговицы) в зависимости от сроков наблюдения и концентрации раствора [3]. Однако, показатели пробы Ширмера I в опытных группах во все сроки наблюдения превышали показатели условно принятой нормы. В нашем исследовании у всех кроликов, начиная с 3 суток наблюдения, отмечались выраженные признаки раздражения в виде блефароспазма и слезотечения, в связи с чем, состояние слезопродукции не оценивалось. Полученные данные ставят под сомнение возможность моделирования дефицита слезопродукции путем инстилляций высоких концентраций раствора бензалкония хлорида, учитывая ярко выраженное раздражающее действие последнего.

В настоящем исследовании впервые была получена токсическая эрозия роговицы путем ежедневных 4х кратных инстилляций 0,1 % раствора бензалкония хлорида, что, по нашему мнению, позволяет в короткие сроки получить устойчивые во временных параметрах изменения роговицы обратимого характера. На 7 сутки эксперимента во всех опытных глазах отмечались признаки токсической эрозии роговицы. Кроме того, использование конфокальной микроскопии, помимо стандартных методик оценки состояния роговицы, позволило оценить состояние цитоархитектоники роговицы во всех ее слоях без выведения жи-

вотных из эксперимента, а также максимально приблизить оценку результатов к клинической практике, что является неоспоримым преимуществом.

Заключение

Результаты настоящего исследования подтверждают цитотоксическое действие раствора бензалкония хлорида на клетки глазной поверхности, что проявляется в развитии токсической эпителиальной эрозии на 7 сутки эксперимента. Ярко выраженное раздражающее действие 0,1 % раствора бензалкония хлорида не позволяет оценить слезопродукцию у экспериментальных животных из-за выраженного слезотечения. Подобранный режим и кратность инстилляций позволяет получить

в эксперименте клинико-функциональные изменения роговицы, подобные клиническим проявлениям у пациентов, находящихся на длительной терапии медикаментозными препаратами. Полученные изменения характеризуются легкой воспроизводимостью, малой травматичностью, неинвазивностью, дозируемостью, а также являются устойчивыми во временных параметрах.

Использование разработанной концентрации и режима инстилляций раствора бензалкония хлорида представляется перспективным и целесообразным при создании и изучении новых методик лечения токсической эрозии роговицы на фоне длительного применения медикаментозных препаратов на доклиническом этапе.

10.09.2015

Список литературы:

1. Астахов С.Ю., Ткаченко Н.В. Диагностические возможности конфокальной микроскопии при исследовании поверхностных структур глазного яблока. *Офтальмологические ведомости*. 2009; 2(1): 82 – 89.
2. Еричев В. П., Амбарцумян К. Г. Консерванты и вторичный синдром сухого глаза при длительной местной медикаментозной терапии первичной открытоугольной глаукомы. *Глаукома*. 2011; 2: 59–66.
3. Ибрагимова Д.И. Выбор алгоритма терапии различных форм поражения роговицы при синдроме сухого глаза (экспериментально-клиническое исследование): автореф. дисс. / канд. мед. наук, 2014.
4. Качалина Г.Ф., Мушкова И.А., Кишкин Ю.И., Майчук Н.В. и др. Подготовка глазной поверхности у пациентов с компенсированной первичной открытоугольной глаукомой к последующей коррекции рефракционных нарушений. *Актуальные проблемы офтальмологии*. 2014; 3: 142–144.
5. Куроедов А.В., Огородникова В.Ю. Бета-блокаторы в терапии первичной открытоугольной глаукомы. Преимущества и недостатки. *Обзор. Офтальмология*. 2008; 4: 4–17.
6. Кушнир В.Н., Сурацел Л.А., Лупан В.Д. Оценка качества жизни пациентов первичной открытоугольной глаукомой, леченых медикаментозно. *Сборник РООФ*. 2012; 1: 229–233.
7. Ляпунов Н.А., Пуртов А.В., Дунай Е.В. Поверхностно-активные, коллоидно-мицеллярные и антибактериальные свойства некоторых катионных антисептиков. *Фармация*. 2013; 4: 44–47.
8. Майчук Д.Ю. Эрозии роговицы: клинические формы, новые методы лечения. *Клиническая офтальмология*. 2004; 5(1): 17–20.
9. Онищенко А.Л., Лихачева И.Г., Пластинина С.Л., Ткачев В.А. Причины низкой комплаентности больных глаукомой и пути ее коррекции. *Глаукома*. 2009; 4: 39–42.
10. Baudouin C. Detrimental effect of preservatives in eyedrops: implications for the treatment of glaucoma. *Acta Ophthalmol*. 2008; 86(7): 716–726.
11. De Saint Jean M., Brignole F., Bringuier A.F. Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 1999; 40(3): 619–630.
12. Furrer P., Berger J., Mayer J.M., Gurny R.A. comparative study of the ocular tolerance of three timolol-based preparations: the influence of preservatives on ocular tolerance. *J Fr Ophtalmol*. 2001; 24: 13–19.
13. Labbe A., Pauly A., Liang H., Brignole-Baudouin F., et. al. Comparison of toxicological profiles of benzalkonium chloride and polyquaternium-1: an experimental study. *J Ocul Pharmacol Ther* 22: 267–278.
14. Pisella P.J., Fillacier K., Elena P.P., Elena P.P. et. al. Comparison of the effects of preserved and unpreserved formulations of timolol on the ocular surface of albino rabbits. *Ophthalmic Res*. 32: 3–8.
15. Shustermann D., Matovinovic E., Salmon A. Does Haber's Law Apply to Human Sensory Irritation? *Inhal Toxicol*. 2006; 18: 457–471.
16. The definition and classification of dry eye disease: report of the definition and classification subcommittee of the International Dry EyeWorkShop 2007. *Ocul Surf*. 2007; 5: 75–92.
17. Xiong C., Chen D., Liu J., Liu B. et. al. A Rabbit Dry Eye Model Induced by Topical Medication of a Preservative Benzalkonium Chloride. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49: 1850–1856.
18. Zhirong Lin., Xiaochen Liu., Tong Zhou., Yihui Wang. et. al. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride. *Mol Vis*. 2011; 25(17): 257–264.

Сведения об авторах:

Терещенко Александр Владимирович, директор Калужского филиала
МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, доктор медицинских наук

Белый Юрий Александрович, заместитель директора по науке Калужского филиала
МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, профессор, доктор медицинских наук
248007, г. Калуга, ул. им. Святослава Фёдорова, 5, e-mail: nauka@mntk.kaluga.ru

Тахчиди Елена Христовна, врач-офтальмолог МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова,
кандидат медицинских наук

Майчук Наталья Владимировна, врач-офтальмолог МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова,
кандидат медицинских наук

Новиков Сергей Викторович, заместитель директора ООО Научно-экспериментальное производство
«Микрохирургия глаза»

Усанова Галина Юрьевна, очный аспирант МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова,
врач-офтальмолог

127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, 59а, e-mail: nauka@mntk.kaluga.ru