

УДК 617.711+617.764–008.8.612.015.11–085–092.19

Влияние консерванта глазных капель бензалкония хлорида на состояние митохондриальных ферментов тканей переднего отдела глаза

В. И. Сенишин¹, врач-ординатор, С. Я. Рафалюк², ассистент кафедры офтальмологии

¹Львовская областная
клиническая больница
²ФПДО Львовского
национального медицинского
университета им. Данила
Галицкого, Львов (Украина)

E-mail:oko_science@mail.ru

Вступ. Незважаючи на доведені побічні ефекти, викликані бензалконію хлоридом (БАХ), у всьому світі більшість пацієнтів з глаукомою продовжують застосовувати очні краплі, що містять цей консервант, тому проведення досліджень по вивченню впливу бензалконію хлориду на стан тканин переднього відділу ока є актуальним.

Мета. Вивчити вплив консерванту очних крапель бензалконію хлориду на стан митохондріальних ферментів тканин переднього відділу ока.

Матеріал і методи. Експерименти проведено на 34 кроликах, які були розділені на 3 групи: 1 група — контрольна (10 кроликів), 2 група — дослідна (12 кроликів), які одержували інстиляції 0,02 % розчину БАХ, 3 група — дослідна (12 кроликів), які одержували 0,1 % розчин БАХ. Для дослідження брали тканину рогівки, кон'юнктиви і слюзну рідину. Визначали активність митохондріальних ферментів (малатдегідрогенази, глутаматдегідрогенази, сукцинатдегідрогенази і цитохромоксидази).

Результати. Аналіз представлених результатів свідчить про те, що досліджуваний консервант в низькій (0,02 % розчин) і більш високій (0,1 % розчин) концентрації бензалконію хлориду викликає виразне порушення процесів окислення біологічних субстратів в митохондріях тканин переднього відділу ока. Однак чіткий дозозалежний ефект впливу БАХ нами виявлено тільки по відношенню до цитохромоксидази — ферменту, локалізованого зовні на внутрішній митохондріальній мембрані. У той же час, не виявлено статистично значимої дозової залежності ферментів, які локалізовані під внутрішньомитохондріальним матриксом (малатдегідрогенази, глутаматдегідрогенази, сукцинатдегідрогенази).

Висновки. 1. Консервант очних крапель БАХ в концентрації 0,02 і 0,1 % викликає виражені пошкодження окислювальних функцій митохондрій тканин переднього відділу ока: рогівки, кон'юнктиви. 2. Виявлено чіткий дозозалежний інгібуючий ефект БАХ на фермент внутрішньої митохондріальної мембрани — цитохромоксидазу. Активність ферменту в умовах застосування більш високої концентрації БАХ в рогівці і кон'юнктиві знижується на 39,6 і 46,5 % відповідно.

Ключевые слова: роговица, конъюнктивы, слезная жидкость, глазные капли, митохондриальные ферменты

Ключові слова: рогівка, кон'юнктива, слюзна рідина, очні краплі, митохондріальні ферменти

Effect of the preservative benzalkonium chloride eye drops on the state of mitochondrial enzymes tissues of the anterior eye

Senishin VI¹, Rafaliuk SY²

¹Lviv Regional Hospital

²Lviv National Medical University
named after Danila Galitsky, Lviv
(Ukraine)

Introduction. Despite the proven side effects caused by benzalkonium chloride (BAC), the worldwide most glaucoma patients continue to use eye drops containing this preservative, so the investigation by studying the effect of benzalkonium chloride on the condition of the tissues of the anterior eye is important.

Purpose. To study the effect of the preservative benzalkonium chloride eye drops on the state of mitochondrial enzymes tissues of the anterior eye.

Material and methods. 34 rabbits were used for the experiment, they were divided into 3 groups: group 1 — control (10 rabbits), group 2 — investigated (12 rabbits), treated with instillation of 0.02 % solution of BAC, group 3 — investigated (12 rabbits) which received 0.1 % solution of BAC. The cornea, conjunctiva and tear fluid were studied. The activity of mitochondrial enzymes (malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase) was determined in the cornea, conjunctiva and tear fluid.

Results. The analysis of the results presented suggest that benzalkonium chloride in low (0.02 % solution) and higher (0.1 % solution) concentration cause expressive disturbance of oxidation of the biological substrates in the mitochondria tissues of the anterior eye. However, a clear dose-dependent effect of BAC was found only in relation to cytochrome oxidase — an enzyme localized outside the inner mitochondrial membrane. At the same time, there was found no statistically significant dose dependence of enzymes that are localized at inside of the mitochondrial matrix (malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, succinate dehydrogenase).

Conclusions. 1. Preservative eye drops BAC at the concentration of 0.02 and 0.1 % causes severe damage of the mitochondrial oxidative function of tissues of the anterior eye: the cornea, conjunctiva. 2. There was revealed a clear dose-dependent inhibitory effect on the enzyme BAC of the inner mitochondrial membrane — cytochrome oxidase. The enzyme activity in using higher concentrations of BAC in the cornea and conjunctiva decreased by 39.6 and 46.5 %, respectively.

Key words. Cornea, conjunctiva, tear fluid, eye drops, mitochondrial enzymes

Введение. В настоящее время в офтальмологии при лечении глаукомы, заболеваний роговицы и т.п. используется большое количество глазных капель во флаконах для местного применения, которые содержат различные компоненты, включая химически активные (лекарственное вещество), носитель лекарственного вещества и консервант. При разработке препаратов учитывается степень обеспечения проникновения лекарственного вещества в глазное яблоко и его необходимой эффективности, а также приемлемости с точки зрения исключения побочных эффектов. Особенно важны меры для защиты от микробиологического загрязнения. Для решения последней проблемы в офтальмологических препаратах в качестве консерванта используется ряд антимикробных средств, среди которых наиболее часто — антисептик бензалконий хлорид (БАХ), широко применяемый, в частности, в глазных каплях для лечения глаукомы. Диапазон используемых концентраций его составляет от 0,004 до 0,2 % [3, 13].

Установлено, что бензалконий хлорид (БАХ) повреждает цитоплазматическое содержимое после растворения стенок бактерий и мембран. К сожалению, способность повреждать одноклеточные микроорганизмы является неспецифичной, и химические вещества могут оказывать токсическое воздействие и на клетки человека [6, 23].

Несмотря на доказанные побочные эффекты, вызываемые БАХ, во всем мире большинство пациентов с глаукомой продолжают применять глазные капли, содержащие этот консервант. И хотя местные побочные эффекты обычно связаны с воздействием консерванта, нельзя исключать также

влияние действующего вещества. В клинических условиях определение того, какой компонент капли является причиной побочного эффекта, весьма проблематично [7, 9, 15, 22, 25].

В ряде исследований было отмечено, что токсическое действие на клетки, оказываемое БАХ, является дозозависимым [8].

Имеются также доказательства того, что консерванты изменяют сократительную способность фибробластов роговицы, а это может оказать потенциальное влияние на форму роговицы и снизить надежность измерения ВГД, хотя клиническая значимость этих данных остается под вопросом. В последние годы токсическое воздействие консервантов на поверхность роговицы намного более полно и интенсивно изучалось на животных моделях. В исследовании, проведенном на кроликах, увеличение концентрации БАХ коррелировало с количеством микроэрозий роговицы и уровнем концентрации лактатдегидрогеназы и альбумина — известных маркеров поражения роговицы, высвобождаемых в слезную жидкость. Также на кроликах исследовалось влияние консервантов на процессы заживления роговицы [16, 18, 20, 24]. Показано, что даже малые концентрации БАХ (0,01 %) вызывали разрушение эпителиального барьера. Такая же концентрация БАХ или 0,1 % концентрация этилендиаминотетрауксусной кислоты (ЭДТА) приводили к задержке заживления роговицы, а БАХ в концентрации 0,02 % полностью подавлял процесс заживления после кератэктомии на глазах кроликов. В исследовании, выполненном на собаках, 0,0025 % БАХ или 0,025 % тиомеросал подавляли рост псевдоподиев эпителиальных клеток и препятствовали регенера-

ции эпителия роговицы. Что касается клинических исследований, то имеется несколько публикаций о случаях токсического воздействия БАХ на роговицу у пациентов при ношении контактных линз, а также в раннем послеоперационном периоде после операции по поводу катаракты и у лиц с синдромом «сухого глаза». Важно отметить, что симптомы у этих пациентов исчезали после замены глазных капель, содержащих консерванты, препаратами без консервантов [1, 10, 12, 14, 17, 19, 21].

Таким образом, исходя из вышесказанного, **цель** настоящего исследования заключалась в углубленном изучении влияния консерванта глазных капель бензалкония хлорида на состояние митохондриальных ферментов тканей переднего отдела глаза.

Материал и методы

Для проведения эксперимента использовали 34 кролика массой 2,2–2,7 кг.

Работа проводилась с учетом требований Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с экспериментальными животными, которые были предложены на Совете международных медицинских организаций (1985 г.) «О мерах по дальнейшему совершенствованию форм работы с использованием экспериментальных животных».

Все лабораторные животные были разделены на три группы: 1 группа — контрольная (10 кроликов), 2 группа — опытная (12 кроликов), получала инстилляцию 0,02 % раствора БАХ, 3 группа — опытная (12 кроликов), получавшие 0,1 % раствор БАХ.

Для инстилляций использовали 0,02 % и 0,1 % растворы БАХ, приготовленные на изотоническом фосфатном буфере (рН 7,3–7,4). Животные контрольной группы получали этот же раствор без БАХ. Инстилляцию проводили ежедневно (2 раза в день) на протяжении двух недель.

Животные выводились из эксперимента с помощью летальной дозы пентобарбитала натрия (100 мг на кг вводимого в маргинальную ушную вену). Для исследования производили забор тканей роговицы, конъюнктивы и слезную жидкость.

Исследуемые ткани немедленно удалялись и помещались в охлажденную свежеприготовленную среду для гомогенизирования. Ткани переднего отдела глаза животного гомогенизировались и суспензировались в буфере, содержащем 20 мМ HEPES-KOH (рН = 7,5), 1,5 М $MgCl_2$, 0,5 мМ сахарозы, содержащей поливинилпирролидон. Полученный гомогенат центрифугировался при 750 g в течение 10 минут при 4 °C для удаления ядер и неразрушенных клеток. Супернатант затем был центрифугирован при 10 000 g в течение 15 минут. Полученный осадок, содержащий митохондриальную фракцию клеток, был ресуспендирован и использовался для определения активности митохондриальных ферментов (малатдегидрогеназы, глутаматдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы).

Определение активности малатдегидрогеназы основано на реакции, в которой количество окисленного малата эквивалентно количеству восстановленного пиридиннуклеотида, а скорость изменения уровня восстановленного никотинамидадениндинуклеотида регистрировали при длине волны 340 нм.

Ход определения. Гомогенат готовили в соотношении 1:10 (вес ткани: объем среды для гомогенизации). В кювету вносили 1 мл инкубационной среды (Na-глициновый буфер — 85 мМ, рН 10,0; малат натрия — 85 мМ; НАД — 25 мМ), 0,1 М раствора трис-HCl буфера (рН 8,0) и 0,1 мл пробы. Перемешивали и регистрировали изменение оптической плотности реакционного раствора. Измерения проводили с использованием спектрофотометра Спекол-210 при 37 °C и длине волны 340 нм. Активность фермента выражали в нкат/г ткани [5].

Принцип метода определения активности сукцинатдегидрогеназы заключается в восстановлении феррицианида калия, раствор которого имеет желтую окраску, до бесцветного ферроцианида калия сукцинатом под действием сукцинатдегидрогеназы. Активность фермента пропорциональна количеству восстановленного феррицианида.

Ход определения. Гомогенат готовили в соотношении 1:10 (вес ткани: объем среды для гомогенизации). В центрифужные пробирки наливают по 1 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,8) и по 0,1 мл растворов янтарной кислоты (0,1 М) ЭДТА (25 мМ), азид натрия (150 мМ) и дистиллированной воды. К пробам добавляли 0,5 мл пробы и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин для ингибирования цитохромоксидазы азидом натрия. Реакцию начинали добавлением 0,1 мл 25 мМ раствора феррицианида калия. Пробу инкубировали в течение 10–15 мин при 30 °C. После инкубации реакцию останавливали погружением пробирок в ледяную воду и добавлением по 2 мл 20 % трихлоруксусной кислоты. В контрольные пробирки, содержащие все компоненты инкубационной смеси, трихлоруксусная кислота добавлялась перед пробам. После остановки реакции и охлаждения пробирки центрифугировали при 2000 об/мин в течение 15 мин для осаждения денатурированного белка. Надосадочную жидкость фотометрировали в количестве 1 см³ на спектрофотометре Спекол-210 при 420 нм [11].

Принцип метода определения цитохромоксидазы заключается в окислении N-диметилпарафенилендиамина ферментом, в результате чего образуется пигмент с максимумом поглощения при длине волны 510 нм, в количестве, пропорциональном цитохромоксидазной активности.

Ход определения. Гомогенат готовили в соотношении 1:10 (вес ткани: объем среды для гомогенизации). В пробирки помещали 0,2 мл 0,04 % водного раствора цитохрома C, 0,2 мл пробы, доводили дистиллированной водой до 1 мл и выдерживали при 37 °C 5 мин. Реакцию инициировали добавлением во все пробирки, кроме контрольных, 0,1 мл 0,4 % раствора N,N- диметилпарафенилендиамина. Пробирки инкубировали около 5 мин до появления красной окраски. После окончания инкубации все пробирки помещали на лед и экстрагировали пигмент 4-кратным объемом смеси спирта и тетрагидроэтана (3:1) при слабокислой реакции среды (рН = 5,6–6,0), которая создавалась после внесения диметилпарафенилендиамина гидрохлорида. Пробирки центрифугировали при 6000 об/мин. Окраска усойчива в течение 10 мин. Измерения проводили в 1 см на спектрофотометре Спекол — 210 при 510 нм против экстрагирующей смеси. Активность цитохромоксидазы выражали в нкат/г [11].

Активность глутаматдегидрогеназы определялась с помощью методов спектрофотометрического анализа [5].

Полученные данные подвергались статистической обработке с помощью пакета SPSS 11.0 [4].

Результаты и их обсуждение

Данные о влиянии различных концентраций БАХ на активность малакдегидрогеназы в тканях роговой оболочки, конъюнктивы и слезной жидкости представлены в таблице 1.

Как видно из представленных данных, активность малакдегидрогеназы в роговой оболочке после инстилляций растворов низкой концентрации БАХ понизилась на 20 % и составила $(36,28 \pm 2,32)$ нкат/г, а при использовании растворов более высокой концентрации БАХ интенсивность фермента уменьшалась на 28,7 %, составляя $(32,34 \pm 2,20)$ нкат/г по сравнению с контрольной группой $(45,36 \pm 2,84)$ нкат/г.

Активность малакдегидрогеназы в тканях конъюнктивы экспериментальных животных после инстилляций растворов низкой концентрации БАХ снизилась на 21,7 %, составляя $(42,74 \pm 3,34)$ нкат/г, а после растворов высокой концентрации БАХ на 32,8 % $(36,71 \pm 3,42)$ нкат/г по сравнению с контролем $(54,63 \pm 3,25)$ нкат/г.

В слезной жидкости исследуемых животных активность малакдегидрогеназы при применении растворов низкой концентрации БАХ повысилась на 23,8 % — $(47,73 \pm 2,92)$ нкат/мл, а при высокой концентрации на 28,0 %, что составило $(49,35 \pm 3,32)$

нкат/мл по отношению к контрольной группе $(38,56 \pm 2,78)$ нкат/мл.

Данные о влиянии различных концентраций БАХ на активность глутаматдегидрогеназы в тканях роговой оболочки, конъюнктивы и слезной жидкости представлены в таблице 2.

При анализе активности глутаматдегидрогеназы в роговице экспериментальных животных необходимо указать, что она была понижена после инстилляций растворов низкой концентрации БАХ на 18,7 %, что составило $(10,45 \pm 0,80)$ нкат/г, а после применения растворов высокой концентрации БАХ на 27,5 %, составив $(9,32 \pm 0,78)$ нкат/г по отношению к контролю $(12,85 \pm 0,75)$ нкат/г.

При этом активность глутаматдегидрогеназы в тканях конъюнктивы в условиях инстилляций растворов низкой концентрации БАХ понизилась на 21,3 %, что составило $(19,16 \pm 1,58)$ нкат/г, а при высокой концентрации БАХ на 32,2 % — $(16,51 \pm 1,40)$ нкат/г относительно контрольных данных $(24,36 \pm 1,85)$ нкат/г.

В слезной жидкости исследуемых животных активность глутаматдегидрогеназы при применении растворов низкой концентрации БАХ повысилась на 22,0 %, составляя $(10,42 \pm 0,68)$ нкат/мл, а при высокой концентрации на 26,2 %, что составило

Таблица 1. Влияние консервантов (БАХ) на активность малакдегидрогеназы в тканях роговой оболочки, конъюнктивы и слезной жидкости

Исследуемая ткань	Статистические показатели	Контрольная группа	Низкая концентрация БАК	Высокая концентрация БАК
Роговая оболочка, нкат/г ткани	n	10	12	12
	M	45,36	36,28	32,34
	m	2,84	2,32	2,20
	p	—	<0,05	<0,01
	p1	—	—	>0,05
	%	100,0	80,0	71,3
Конъюнктура, нкат/г ткани	%1	—	100,0	89,1
	n	10	12	12
	M	54,63	42,74	36,71
	m	3,25	3,34	3,42
	p	—	<0,05	<0,01
	p1	—	—	>0,05
Слезная жидкость, нкат/мл	%	100,0	78,3	67,2
	%1	—	100,0	85,39
	n	10	12	12
	M	38,56	47,73	49,35
	m	2,78	2,92	3,32
	p	—	<0,05	<0,05
	p1	—	—	>0,05
	%	100,0	123,8	128,0
	%1	—	100,0	103,4

Примечания: p — уровень значимости различий данных по отношению к контрольной группе; p1 — уровень значимости различий данных по отношению к группе БАХ с низкой концентрацией.

Таблица 2. Влияние консервантов (БАХ) на активность глутаматдегидрогеназы в тканях роговой оболочки, конъюнктивы и слезной жидкости

Исследуемая ткань	Статистические показатели	Контрольная группа	Низкая концентрация БАК	Высокая концентрация БАК
Роговая оболочка, нкат/г ткани	n	10	12	12
	M	12,85	10,45	9,32
	m	0,75	0,80	0,78
	p	—	<0,05	<0,01
	p1	—	—	>0,05
	%	100,0	81,3	72,5
Конъюнктура, нкат/г ткани	%1	—	100,0	89,2
	n	10	12	12
	M	24,36	19,16	16,51
	m	1,85	1,58	1,40
	p	—	<0,05	<0,01
	p1	—	—	>0,05
Слезная жидкость, нкат/мл	%	100,0	78,7	67,8
	%1	—	100,0	86,2
	n	10	12	12
	M	8,54	10,42	10,78
	m	0,52	0,68	0,70
	p	—	<0,05	<0,05
	p1	—	—	>0,05
	%	100,0	122,0	126,2
	%1	—	100,0	103,5

Примечания: p — уровень значимости различий данных по отношению к контрольной группе; p1 — уровень значимости различий данных по отношению к группе БАХ с низкой концентрацией.

(10,78±0,70) нкат/мл по отношению к контрольной группе (8,54±0,52) нкат/мл.

Данные о влиянии различных концентраций БАХ на активность сукцинатдегидрогеназы в тканях роговой оболочки, конъюнктивы и слезной жидкости представлены в таблице 3.

В роговой оболочке активность сукцинатдегидрогеназы после инстилляций растворов низкой концентрации БАХ понизилась на 16,9 % — (19,76±1,14) нкат/г, а при использовании растворов высокой концентрации БАХ на 25,8 %, составляя (17,65±1,20) нкат/г по сравнению с контрольной группой (23,78±1,42) нкат/г.

В конъюнктиве активность сукцинатдегидрогеназы в условиях инстилляций растворов низкой концентрации БАХ понизилась на 18,5 %, что составило (24,65±1,68) нкат/г, а при высокой концентрации БАХ на 30,0 %, составив (21,17±1,53) нкат/г относительно контрольных данных (30,24±1,95) нкат/г.

В слезной жидкости исследуемых животных активность сукцинатдегидрогеназы при применении растворов низкой концентрации БАХ повысилась на 20,3 % — (22,40±1,28) нкат/мл, а при высокой концентрации на 25,8 % — (23,42±1,34) нкат/мл по отношению к контрольной группе (18,62±1,24) нкат/мл.

Таблица 3. Влияние консервантов (БАХ) на активность сукцинатдегидрогеназы в тканях роговой оболочки, конъюнктивы и слезной жидкости

Исследуемая ткань	Статистические показатели	Контрольная группа	Низкая концентрация БАХ	Высокая концентрация БАХ
Роговая оболочка, нкат/г ткани	n	10	12	12
	M	23,78	19,76	17,65
	m	1,42	1,14	1,20
	p	—	<0,05	<0,01
	p1	—	—	>0,05
	%	100,0	83,1	74,2
Конъюнктура, нкат/г ткани	%1	—	100,0	89,3
	n	10	12	12
	M	30,24	24,65	21,17
	m	1,95	1,68	1,53
	p	—	<0,05	<0,01
	p1	—	—	>0,05
Слезная жидкость, нкат/мл	%	100,0	81,5	70,0
	%1	—	100,0	85,9
	n	10	12	12
	M	18,62	22,40	23,42
	m	1,24	1,28	1,34
	p	—	<0,05	<0,05
	p1	—	—	>0,05
	%	100,0	120,3	125,8
	%1	—	100,0	104,6

Примечания: p — уровень значимости различий данных по отношению к контрольной группе; p1 — уровень значимости различий данных по отношению к группе БАХ с низкой концентрацией.

Данные о влиянии консервантов (БАХ) на активность цитохромоксидазы в тканях роговой оболочки, конъюнктивы и слезной жидкости представлены в таблице 4.

Активность цитохромоксидазы в роговой оболочке после инстилляций растворов низкой концентрации БАХ понизилась на 22,5 %, составляя (75,42±5,32) нкат/г, при использовании растворов высокой концентрации БАХ на 39,6 % — (58,79±3,80) нкат/г по сравнению с контрольной группой (97,32±6,45) нкат/г. При этом в условиях применения высокой концентрации БАХ активность фермента была на 22 % ниже по сравнению с низкой концентрацией БАХ (p<0,05).

Активность цитохромоксидазы в тканях конъюнктивы экспериментальных животных после инстилляций растворов низкой концентрации БАХ снизилась на 25,1 %, что составило (101,54±7,83) нкат/г, а после растворов высокой концентрации БАХ на 46,5 %, составляя (72,60±5,42) нкат/г по сравнению с контролем (135,64±10,14) нкат/г. Таким образом, при применении высокой концентрации БАХ активность фермента была на 28,5 % ниже по сравнению с низкой концентрацией БАХ (p<0,01).

В слезной жидкости исследуемых животных активность цитохромоксидазы при применении

Таблица 4. Влияние консервантов (БАХ) на активность цитохромоксидазы в тканях роговой оболочки, конъюнктивы и слезной жидкости

Исследуемая ткань	Статистические показатели	Контрольная группа	Низкая концентрация БАХ	Высокая концентрация БАХ
Роговая оболочка, нкат/г ткани	n	10	12	12
	M	97,32	75,42	58,79
	m	6,45	5,32	3,80
	p	—	<0,05	<0,01
	p1	—	—	<0,05
	%	100,0	77,5	60,4
Конъюнктура, нкат/г ткани	%1	—	100,0	78,0
	n	10	12	12
	M	135,64	101,54	72,60
	m	10,14	7,83	5,42
	p	—	<0,05	<0,001
	p1	—	—	<0,01
Слезная жидкость, нкат/мл	%	100,0	74,9	53,5
	%1	—	100,0	71,5
	n	10	12	12
	M	14,36	18,15	22,68
	m	1,06	1,32	1,68
	p	—	<0,05	<0,001
	p1	—	—	<0,05
	%	100,0	126,4	157,9
	%1	—	100,0	125,0

Примечания: p — уровень значимости различий данных по отношению к контрольной группе; p1 — уровень значимости различий данных по отношению к группе БАХ с низкой концентрацией.

растворов низкой концентрации БАХ повысилась на 26,4 % — $(18,15 \pm 1,32)$ нкат/мл, а при высокой концентрации на 57,9 % — $(22,68 \pm 1,68)$ нкат/мл по отношению к контрольной группе $(14,36 \pm 1,06)$ нкат/мл. При этом в условиях применения высокой концентрации БАХ активность фермента была на 25,0 % выше по сравнению с низкой концентрацией БАХ ($p < 0,05$).

Общий анализ представленных результатов свидетельствует о том, что изучаемый консервант в низкой (0,02 % раствор) и более высокой (0,1 % раствор) концентрации, вызывает отчетливое нарушение процессов окисления биологических субстратов в митохондриях тканей переднего отдела глаза. В механизме этого явления важную роль играет дезинтегрирующее действие консерванта на мембраны митохондрий. Это положение подтверждается, в частности, и тем фактом, что уровень активности митохондриальных ферментов в слезной жидкости повышается у животных, получавших инстилляции БАХ.

Таким образом, в слезной жидкости под влиянием БАХ не только повышается концентрация цитозольных дегидрогеназ, свидетельствуя о повреждении клеточных мембран, но и изменяется активность маркерных митохондриальных ферментов [2]. Эти факты говорят о значительной степени повреждения консервантом не только клеточных, но и субклеточных структур роговицы и конъюнктивы.

Литература

1. Гайдамака Т. Б., Сенишин В. И., Великсар Т. А., Рафалюк С. Я. Исследование патохимического влияния контактных линз и консервантов глазных капель на структуры переднего отдела глаза // Материалы XIII Съезда офтальмологов Украины, 21–23 мая. — Одесса, — 2014. — С. 9–10.
2. Гайдамака Т. Б., Сенишин В. И. Влияние бензалкония хлорида на активность окислительно-восстановительных ферментов в тканях переднего отдела глаза // Офтальмол. журн. — 2013. — № 5. — С. 62–67.
3. Иванова Н. В. Консерванты в топической терапии глазных заболеваний: преимущества и недостатки // Офтальмология. Вост. Европа. — 2013. — Т. 1. — № 16. — С. 2–7.
4. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. — СПб.: Питер, 2005. — 416 с.
5. Новые методы биохимического анализа. — Изд. Ленинградского универ. — 1991. — 395 с.
6. Петров С. Ю., Сафонова Д. М. Консерванты в офтальмологических препаратах: от бензалкония хлорида к поликватернию. — М.: Глаукома. — 2013. — Т. 4. — С. 92–96.
7. Ammar D. A., Noecker R. J., Kahook M. Y. Effects of benzalkonium chloride-preserved, polyquad-preserved, and soft Zia-preserved topical glaucoma medications on human ocular epithelial cells // Adv. Ther. — 2010. — Vol. 27. — P. 1–9.
8. Ayaki M., Yaguchi S., Iwasawa A. Cytotoxicity of ophthalmic solution with and without preservatives to human corneal endothelial cells, epithelial cells and conjunctival epithelial cells // Clin. Exp. Ophthalmol. — 2008. — Vol. 36. — P. 553–559.
9. Barki W. H., Tahir M. Effects of topical benzalkonium chloride on corneal epithelium // Biomedica. — 2007. — Vol. 23. — P. 65–70.
10. Baudouin C., Labbe A., Liang H. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly // Prog. Retin. Eye Res. — 2010. — Vol. 29. — P. 312–334.
11. Bergmeyer H. V. Methoden der enzymatischen Analyse / Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. — Berlin. — 1986. — 2220 p.
12. De Saint Jean M., Brignole F., Bringuier A. Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 1999. — Vol. 40. — P. 619–630.
13. Hopes M., Broadway D. C. Preservative-free Treatment in Glaucoma Is a Sensible and Realistic Aim for the Future // Europ. Ophthalmic. Review. — 2010. — Vol. 4. — P. 23–28.
14. Hughes E. H., Pretorius M., Eleftheriadis H. Long-term recovery of the human corneal endothelium after toxic

- injury by benzalkonium chloride // Br. J. Ophthalmol. — 2007. — Vol. 91. — P. 1460–1463.
15. **Khot-Reiter S., Jessen B. A.** Evaluation of the cytotoxic effects of ophthalmic solutions containing benzalkonium chloride on corneal epithelium using an organotypic 3-D model // BMC Ophthalmol. — 2009. — Vol. 9. — P. 1471–1475.
 16. **Kim J. R., Oh T. H., Kim H. S.** Effect of benzalkonium chloride on the ocular surface of the rabbit // Jpn. J. Ophthalmol. — 2011. — Vol. 55. — P. 283–293.
 17. **Lemp M. A., Zimmerman L. E.** Toxic endothelial degeneration in ocular surface disease treated with topical medications containing benzalkonium chloride // Am. J. Ophthalmol. — 1988. — Vol. 105. — P. 670–673.
 18. **Liang H., Baudouin C., Pauly A.** Conjunctival and corneal reactions in rabbits following short- and repeated exposure to preservative-free tafluprost, commercially available latanoprost and 0,02 % benzalkonium chloride // Br. J. Ophthalmol. — 2008. — Vol. 92. — P. 1275–1282.
 19. **Lin Z., Liu X., Zhou T.** A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride // Mol. Vis. — 2011. — Vol. 17. — P. 257–264.
 20. **Majumdera S., Hippalgaonkara K., Repka M. A.** Effect of chitosan, benzalkonium chloride and ethylenediamine-tetraacetic acid on permeation of acyclovir across isolated rabbit cornea // Int. J. Pharm. — 2008. — Vol. 348. — P. 175–178.
 21. **Trocme S., Hwang L.-J., Bean G. W.** The role of benzalkonium chloride in the occurrence of punctate keratitis: a meta-analysis of randomized, controlled clinical trials // Ann. Pharmacother. — 2010. — Vol. 44. — P. 1914–1921.
 22. **Whitson J. T., Cavanagh H. D., Lakshman N.** Assessment of corneal epithelial integrity after acute exposure to ocular hypotensive agents preserved with and without benzalkonium chloride // Adv. Ther. — 2006. — Vol. 23. — P. 663–671.
 23. **Wilson F. M.** Adverse external ocular effects of topical ophthalmic therapy: an epidemiologic, laboratory, and clinical study // Tr. Am. Ophth. Soc. — 1983. — Vol. 19. — P. 854–858.
 24. **Xiong C.** A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride / Xiong C., Chen D., Liu J. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2008. — Vol. 49. — P. 1850–1856.
 25. **Ye J., Wu H., Zhang H.** Role of benzalkonium chloride in DNA strand breaks in human corneal epithelial cells // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. — 2011. — Vol. 249. — P. 1681–1687.

Получена 10.06.2014

References

1. **Gaidamaka TB, Senishin VI, Veliksar TA, Rafalyuk SYA.** Study of pathochemical influence of contact lenses and eye drops preservatives on the structure of the anterior segment eye. Proceedings of XIII Ukrainian Congress of Ophthalmologists, 21–23 May. Odessa; 2014. 9–10.
2. **Gaidamaka TB, Senishin VI.** Influence of benzalkonium chloride on activity of the oxidation-reduction enzymes in the tissues of the anterior eye. Oftalmol Zh. 2013;5:62–7. Russian.
3. **Ivanova NV.** Preservatives in topic therapy of eye diseases: advantages and disadvantages. Oftalmologiya. Vostochnaya Evropa. 2013.1(6):2–7. Russian.
4. **Nasledov A.** SPSS computer data analysis in psychology and social sciences. Spb.: Piter; 2005. 416 p.
5. **New methods of biochemical analysis.** Izd. Leningradskogo univer. 1991. 395 p.
6. **Petrov SYu, Safonova DM.** Preservatives in ophthalmic preparations; from benzalkonium chloride to polyquaternium. M.: Glaukoma. 2013;4:92–6. Russian.
7. **Ammar D. A., Noecker R. J., Kahook MY.** Effects of benzalkonium chloride-preserved, polyquad-preserved, and sofZia-preserved topical glaucoma medications on human ocular epithelial cells. Adv. Ther. 2010;27:1–9.
8. **Ayaki M., Yaguchi S., Iwasawa A.** Cytotoxicity of ophthalmic solution with and without preservatives to human corneal endothelial cells, epithelial cells and conjunctival epithelial cells. Clin. Exp. Ophthalmol. 2008;36:553–9.
9. **Barki WH, Tahir M.** Effects of topical benzalkonium chloride on corneal epithelium. Biomedica. 2007;23:65–70.
10. **Baudouin C., Labbe A., Liang H.** Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. Prog. Retin. Eye Res. 2010;29:312–34.
11. **Bergmeyer HV.** Methoden der enzymatischen Analyse. Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. Berlin; 1986. 2220 p.
12. **De Saint Jean M, Brignole F, Bringuier A.** Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cells. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1999;40:619–30.
13. **Hopes M, Broadway DC.** Preservative-free Treatment in Glaucoma Is a Sensible and Realistic Aim for the Future. Europ. Ophthalmic. Review. 2010;4:23–8.
14. **Hughes EH, Pretorius M, Eleftheriadis H.** Long-term recovery of the human corneal endothelium after toxic injury by benzalkonium chloride. Br. J. Ophthalmol. 2007;91:1460–3.
15. **Khot-Reiter S, Jessen BA.** Evaluation of the cytotoxic effects of ophthalmic solutions containing benzalkonium chloride on corneal epithelium using an organotypic 3-D model. BMC Ophthalmol. 2009;9:1471–5.
16. **Kim JR, Oh TH, Kim HS.** Effect of benzalkonium chloride on the ocular surface of the rabbit. Jpn. J. Ophthalmol. 2011;55:283–93.
17. **Lemp MA, Zimmerman LE.** Toxic endothelial degeneration in ocular surface disease treated with topical medications containing benzalkonium chloride. Am. J. Ophthalmol. 1988;105:670–3.
18. **Liang H, Baudouin C, Pauly A.** Conjunctival and corneal reactions in rabbits following short- and repeated exposure to preservative-free tafluprost, commercially available latanoprost and 0,02 % benzalkonium chloride. Br. J. Ophthalmol. 2008;92:1275–82.
19. **Lin Z, Liu X, Zhou T.** A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride. Mol. Vis. 2011;17:257–64.
20. **Majumdera S, Hippalgaonkara K, Repka M. A.** Effect of chitosan, benzalkonium chloride and ethylenediaminetetraacetic acid on permeation of acyclovir across isolated rabbit cornea. Int. J. Pharm. 2008;348:175–8.
21. **Trocme S, Hwang L.-J, Bean GW.** The role of benzalkonium chloride in the occurrence of punctate keratitis: a

- meta-analysis of randomized, controlled clinical trials. *Ann. Pharmacother.* 2010;44:1914–21.
22. **Whitson JT, Cavanagh HD, Lakshman N.** Assessment of corneal epithelial integrity after acute exposure to ocular hypotensive agents preserved with and without benzalkonium chloride. *Adv. Ther.* 2006;23:663–71.
23. **Wilson FM.** Adverse external ocular effects of topical ophthalmic therapy: an epidemiologic, laboratory, and clinical study. *Tr. Am. Ophth. Soc.* 1983;19:854–8.
24. **Xiong C, Chen D, Liu J.** A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008;49:1850–6.
25. **Ye J, Wu H, Zhang H.** Role of benzalkonium chloride in DNA strand breaks in human corneal epithelial cells. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2011;249:1681–7.

Received 10.06.2014