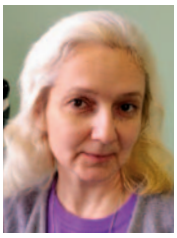
ISSN 1816-5095 (print); ISSN 2500-0845 (online)
https://doi.org/10.18008/1816-5095-2018-2-167-175

поступила 20.03.18
was received 20.03.18

Оценка цитотоксичности *in vitro* как критерий рационального выбора слезозаместительных препаратов



О.И. Александрова[1] И.Н. Околов[2] Ю.И. Хорольская[1] И.Е. Панова[2] М.И. Блинова[1]

[1] ФГБУН институт цитологии РАН
Тихорецкий пр., 4, Санкт-Петербург, 194064, Российская Федерация

[2] Санкт-Петербургский филиал ФГАУ «НМИЦ “МНТК «Микрохирургия глаза»” им. академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
ул. Я. Гашека, 21, Санкт-Петербург, 192283, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Офтальмология. 2018;15(2):167–175

Цель: сравнительный анализ цитотоксического действия широкой линейки препаратов слезозаместительной терапии в отношении эпителиальных клеток роговицы в условиях *in vitro*. **Материалы и методы.** Объектом исследования явились 11 препаратов «искусственных слез» с различными системами консервантов и 9 бесконсервантных слезозаместителей. В качестве тест-систем были использованы клетки постоянной трансформированной клеточной линии эпителия роговицы (*HCEC*) человека. Цитотоксичность «искусственных слез» оценивали по жизнеспособности клеток, культивируемых в питательной среде, содержащей в своем составе исследуемые препараты. **Результаты.** Наиболее токсичными в отношении клеток эпителия роговицы из слезозаместителей, содержащих консерванты, оказались Лакрисифи, Слезин, Гипромелоза-П и Офтолин®. Близкими к ним по токсичности были Катионорм®, Артелак® Баланс и Оптив®. Глазные капли Стиллавит, Систейн®Ультра и Блинк®контактс проявили умеренную токсичность. Визмед® Лайт из группы слезозаместителей с консервантами не оказывал цитотоксического действия на клетки в условиях *in vitro*, так же как и бесконсервантные слезозаместители Хилабак®, Теалоз®, Теалоз Дуо® и Эво Тиарс™. Цитотоксический эффект в отношении клеток эпителия роговицы выявлен у препаратов Хилозар-Комод® и Хило®Фреш, несмотря на отсутствие в их составе консерванта. **Заключение.** Проведенное исследование показало принципиальную возможность использования систем *in vitro* для сравнительной оценки цитотоксического действия препаратов в целях рационального выбора слезозаместителей.

Ключевые слова: клеточные культуры, цитотоксичность, «искусственная слеза», консерванты, буферы, роговица, эпителий глазной поверхности

Для цитирования: Александрова О.И., Околов И.Н., Хорольская Ю.И., Панова И.Е., Блинова М.И. Оценка цитотоксичности *in vitro* как критерий рационального выбора слезозаместительных препаратов. *Офтальмология.* 2018;15(2):167–175. https://doi.org/10.18008/1816-5095-2018-2-167-175

Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 14-5000068.

Прозрачность финансовой деятельности: Никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах

Конфликт интересов отсутствует

Cytotoxicity Evaluation Using *in vitro* System as a Criteria of Rational Choice of Tear Substitutes

O.I. Aleksandrova[1], I.N. Okolov[2], Yu.I. Khorolskaya[1], I.E. Panova[2], M.I. Blinova[1]

[1] Institute of Cytology of the Russian Academy of Science
Tikhoretsky ave., 4, Saint Petersburg, 194064, Russia

[2] Sv. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution
Gasheka str., 21, Saint Petersburg, 192283, Russia

CC BY 4.0

ABSTRACT **Ophthalmology in Russia. 2018;15(2):167–175**

Purpose: to evaluate the cytotoxic effect of a wide range of lubricant eye drops on the epithelial cells of the cornea *in vitro*. **Materials and methods.** The objects of the study were 11 moisture eye drops with various preservatives and 9 moisture eye drops without preservatives. As a test-system permanent transformed cell lines of corneal epithelial (HCEC) were used. The cytotoxicity of the "artificial tears" was assessed by the viability of the cells, cultured in substratum containing the solutions of the evaluated eye drops. **Results.** The most toxic for corneal epithelial cells among the moisture eye drops with preservatives were Lacrisifi, Slezin, Hypromelose-P and Ophtolique®. Close to them in toxicity were Cationorm®, Artelac® Balance and Optiv®. Eye drops Styllavit, Systane® Ultra and Blink® contacts showed moderate toxicity. Vismed® Light from the group of eye lubricants with preservatives did not exert a cytotoxic effect on the cells in vitro, as well as the non-preserved eye lubricants Hyabak®, Thealoz®, Thealoz Duo® and EvoTears™. Cytotoxic effect on corneal epithelial cells was detected for Hylozar Comod® and Hylo® Fresh eye drops, despite the absence of preservatives in them. **Conclusion.** The study showed a principal possibility of using in vitro systems for comparative evaluation of the cytotoxic effects of various medicines with a purpose of a rational choice of moisture eye drop.

Keywords: cell cultures, cytotoxicity, artificial tears, preservatives, buffer, cornea, ocular surface epithelium

For citation: Aleksandrova O.I., Okolov I.N., Khorolskaya Yu.I., Panova I.E., Blinova M.I. Cytotoxicity Evaluation Using *in vitro* System as a Criteria of Rational Choice of Tear Substitutes. *Ophthalmology in Russia.* 2018;15(2):167–175. https://doi.org/10.18008/1816-5095-2018-2-167-175

This work has been done within the framework of the project RSF № 14-5000068.

Financial Disclosure: No author has a financial or property interest in any material or method mentioned

There is no conflict of interests

ВВЕДЕНИЕ

Слезозаместительные препараты широко используются в настоящее время в офтальмологии и являются первой линией в терапии многофакторных проявлений, возникающих в различных случаях раздражения глазной поверхности, в том числе при синдроме сухого глаза (ССГ). В состав «искусственных слез» в качестве активных компонентов входят следующие: натрия гиалуронат карбомер, гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ), кармеллоза натрия, трегалоза, а также комбинация поливинилового спирта, повидона и ГПМЦ совместно с декстраном. Помимо активного вещества, для поддержания стабильности капель и подавления роста микроорганизмов добавляют различные консерванты: бензалкония хлорид (БАК), цетримид, цеталкония хлорид, поликвад, полигексанид, а также оксид, пурит, окупур. Вещества, увеличивающие вязкость (пролонгаторы), снижают скорость выведения субстанции с глазной поверхности. К ним относятся: повидон, поливиниловый спирт, глицерин, пропиленгликоль, желатин, декстран 70, карбоксиметилцеллюлоза. Следующим компонентом глазных капель являются антиоксиданты, они предотвращают распад активного вещества под воздействием кислорода воздуха. Среди антиоксидантов наиболее часто используют ЭДТА, бисульфит, тиосульфат, метабисульфит. Глазные капли могут содержать буферные вещества (системы), которые позволяют поддерживать pH препарата в пределах 6–8. Это необходимо для того, чтобы pH капель был приближен к нормальной кислотности слезы человека (7,14–7,82). При таком условии активные вещества способны легко проникать через роговицу в переднюю камеру глаза, не вызывая дискомфорта при закапывании. Примерами буферов являются цитратный, фосфатный, боратный и трис-буфер. Еще одним важным компонентом глазных капель являются осмотические агенты: пропиленгликоль, глицерин, декстроза, декстран. Эти вещества обеспечивают изотоничность глазных капель по отношению к слезной пленке и поддерживают осмотическое давление на уровне 305 мОсм/л. Изотоничные растворы лучше абсорбируются и хорошо переносятся пациентом.

Таким образом, помимо основного лекарственного вещества, глазные капли содержат ряд вспомогательных компонентов, некоторые из которых могут оказывать неблагоприятное воздействие на глазную поверхность. К таким веществам относятся консерванты, компоненты буферной системы и антиоксиданты.

Включение консервантов в состав глазных капель необходимо для поддержания стерильности и предотвращения бактериальной контаминации. Согласно международным стандартам, добавление консервантов является обязательным при производстве многодозовых лекарственных форм для местного применения. Концентрация консервантов в составе глазных капель является относительно низкой, однако кумулятивная доза за весь период использования, особенно при частом и длительном применении, может оказаться достаточно высокой. Это особенно важно помнить в контексте развития побочных эффектов, которые могут быть вызваны некоторыми вспомогательными ингредиентами, входящими в состав глазных капель, в том числе «искусственных слез» [1, 2]. Консерванты, входящие в состав глазных капель, можно разделить на три основных типа: детергенты, окислители и ионно-буферные системы. Консерванты детергентного типа обладают широким спектром антимикробного действия, что делает их достаточно токсичными для клеток роговицы и конъюнктивы [3]. Окислительные консерванты менее токсичны, чем детергенты, при этом они эффективны против бактерий даже при низких концентрациях, что позволяет минимизировать их неблагоприятное воздействие на эпителиальные клетки конъюнктивы и роговицы [4]. Ионно-буферный консервант, обладая антибактериальным и противогрибковым эффектом, по механизму действия похож на окислители [5]. Он менее цитотоксичен по отношению к клеткам глазной поверхности, чем традиционные кон-

серванты, но в состав слезозаместителей в настоящее время пока не включен [6].

В США было проведено множество сравнительных клинических испытаний по оценке эффективности слезозаместительных препаратов. В опубликованном отчете Dry Eye WorkShop было отмечено, что, несмотря на то что многие слезозаместители улучшают состояние глазной поверхности, достоверных доказательств того, что какой-либо из препаратов превосходит другой, установлено не было, но при этом было отмечено, что воспаление глазной поверхности может усугубляться при наличии консервантов в их составе [7].

В последнее время в исследованиях токсичности не только разрабатываемых, но и уже существующих лекарственных препаратов все чаще находят применение тест-системы *in vitro*, среди которых наиболее простыми и доступными являются модели с использованием монослойных клеточных культур [8–10]. Известно, что под воздействием различных биологически активных веществ, входящих в состав лекарственных препаратов, клетки могут претерпевать изменения, касающиеся морфологии, скорости клеточного роста, времени гибели, степени дезинтеграции, поэтому для каждой лекарственной формы, в том числе глазных капель, целесообразно выполнять тестирование их влияния на выживаемость клеток [11]. Для оценки безопасности офтальмологических препаратов наиболее информативными являются тест-системы на основе клеток тканей глаза человека [12–17].

Цель данного исследования состояла в сравнительном анализе цитотоксического действия двадцати препаратов слезозаместительной терапии в отношении эпителиальных клеток роговицы человека в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые препараты. Объектом исследования явились 11 слезозаместителей с различными системами консервантов (табл. 1) и буферных систем (табл. 2): Систейн® *Ультра Алкон Кузи С.А*; Артелак® Баланс *Бауш & Ломб*; Оптив® *Аллерган Инк*; Катионорм® *Сантэн;* Визмед® Лайт *ТРБ Чемедика АГ*; Блинк® контактс *ABBOTT*; Стиллавит *ООО «Компания Офтальм Ренессанс»;* Офтолик® *Сентисс Фарма Пвт. Лтд.;* Лакрисифи® *С.И.Ф.И. С.п. А*; Гипромелоза-П *Унимед Фарма с.р.о.*; Слезин *К.О. Ромфарм Компани С.Р.Л.* и 9 бесконсервантных слезозаместителей: Хилабак®, Теалоз®, Теалоз Дуо® — *Лабораторуар Теа;* Хило-Комод®, Хилопарин-Комод®, Хило®Фреш, Хилозар-Комод®, Хиломакс-Комод®, Эво Тиарс™ — *Урсафарм Арцнеймиттель ГмбХ.*

Клеточные культуры. В качестве тест-системы были использованы клетки постоянной клеточной линии эпителия роговицы человека (HCEC). Данная тест-система обладает более высокой чувствительностью к действию слезозаместителей по сравнению с тест-системой на основе постоянной клеточной линии конъюнктивы человека (Chang Conjunctiva, Clone 1-5c-4) [16]. Клетки линии HCEC были получены из коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Таблица 1. Основные группы консервантов, входящих в состав исследуемых слезозаместителей

Table 1. The main groups of preservatives included in moisture eye drops studied

Химический класс консерванта Chemical class of a preservative	Название консерванта, антиоксиданта Name of a preservative	Торговое название слезозаместителей Trade name of an eye lubricant
Детергенты/Detergents	БАК, ЭДТА/BAK, EDTA БАК, ЭДТА/BAK, EDTA БАК, ЭДТА/BAK, EDTA БАК, ЭДТА/BAK, EDTA	Слезин/Slezin Гипромелоза-П/Hypromellose-P Лакрисифи/Lacrisifi Офтолик®/Ophtolique®
	Полигексанид, ЭДТА Polyhexanide, EDTA	Визмед® Лайт / Vismed® Light
	Поликвад®/Polyquad®	Систейн® Ультра / Systane® Ultra
	Цеталкония хлорид/ Cetalkonium chloride	Катионорм®/Cationorm®
Окислители/Oxidant	Стабилизированный оксихлорокомплекс / Stabilized Oxychloro Complex	
	Пурит®/Purite®	Оптив®/Optive®
	ОкуПур®/OcuPure®	Блинк® контактс / Blink® contacts
	Стабилизированный хлоритный комплекс / Stabilized Chlorite Complex	
	Оксид®/Oxide®	Артелак® Баланс / Artelac® Balance
Прочие/Other	ЭДТА/EDTA	Стиллавит/Styllavit

Таблица 2. Буферные системы в исследуемых слезозаместительных препаратах

Table 2. Buffer systems included in moisture eye drops studied

Буферные системы Buffer system	Слезозаместитель Eye lubricant
Цитратный буфер Citrate buffer (C)	Хило-Комод®, Хилопарин-Комод®, Хиломакс-Комод®, Хилозар-Комод® Hylo Comod®, Hylo Parin®, Hylomax Comod®, Hylozar Comod®
Фосфатный буфер Phosphate buffer (P)	Лакрисифи Lacrisifi
Боратный буфер Borate buffer (B)	Систейн® Ультра, Блинк® контактс, Слезин, Хило®Фреш Systane® Ultra, Blink® contacts, Slezin, Hylo® Fresh
Трис-буфер Tris-buffer	Катионорм®, Хилабак®, Теалоз®, Теалоз Дуо® Cationorm®, Hyabak®, Thealoz ®, Thealoz Duo®
Сочетание буферов Mix buffer	Оптив® (B+C), Визмед® Лайт (P+C), Стиллавит (B+P) Optive® (B+C), Vismed® Light (P+C), Styllavit (B+P)
Отсутствие буфера No buffer	Артелак® Баланс, Офтолик®, Эво Тиарс™ Artelac® Balance, Ophtolique®, EvoTears™

Дизайн и методы исследования. Влияние глазных капель различных препаратов искусственной слезы на жизнеспособность клеток эпителия роговицы человека изучали в условиях *in vitro* в процессе культивирования клеток в питательной среде Keratinocyte-SFM (Gibco, США), содержащей исследуемые препараты в концентрации 10 % от объема среды при 37 °C в CO_2-инкубаторе в атмосфере 5 % CO_2. Контролем служили клетки, культивируемые в стандартных условиях без добавления препаратов. Выбор

концентрации слезозаместителей для эксперимента базировался на данных клинического использования исследуемых препаратов, а также собственных исследований по цитотоксичности различных препаратов «искусственной слезы» на клеточных культурах [16]. Жизнеспособность клеток оценивали по их морфологии и функциональной активности с использованием метода фазово-контрастной микроскопии (ФКМ), МТТ-теста и системы xCELLigence.

Морфологическое состояние клеток в процессе их культивирования с исследуемыми препаратами оценивали при помощи инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100, оснащенного фотокамерой. Для оценки методом МТТ влияния слезозаместителей на метаболическую активность эпителиальных клеток роговицы человека клетки линии *HCEC* высевали в 96-луночные планшеты в 200 мкл питательной среды, содержащей исследуемые препараты, и культивировали в обычном режиме в течение двух суток. По истечении срока культивирования проводили анализ МТТ. Оптическую плотность растворов измеряли с помощью анализатора Fluorofot "Charity" (Россия) при длине волны 570 нм и референсной длине волны 630 нм. Математическую обработку полученных данных проводили методами вариационной статистики при помощи программы Microsoft Exel 2007. Различия считали достоверными при $p < 0{,}05$.

Для оценки влияния слезозаместителей на адгезию и пролиферативную активность клеток эпителия роговицы при помощи системы xCELLigence *HCEC* высевали по 1×10^4 клеток на лунку планшета E-plate в 100 мкл питательной среды, содержащей исследуемые препараты. Планшеты помещали в клеточный анализатор RTCA-DP (The Real-Time Cell Analyzer Dual Purpose) ACEA Biosciences и проводили мониторинг динамики адгезии и пролиферации клеток в режиме реального времени в течение 24 часов. Анализ результатов выполняли с помощью программного обеспечения RTCA Software 1.2.1 (Roche). Изменение импеданса на микроэлектродах, обусловленного прикреплением и распластыванием клеток, выражали как Cell Index (клеточный индекс), величина которого автоматически вычисляется программой: Cell Index = (RnRb)/*t*, где Rb — исходное значение импеданса в лунке, содержащей только ростовую для клеток среду (отрицательный контроль), Rn — значение импеданса в любое время *t* в лунке, содержащей, помимо ростовой среды, тестируемые клетки (контроль). Клеточный индекс, таким образом, отражает изменения количества клеток, качества прикрепления клеток и морфологию клеток в лунке, которые могут меняться во времени. Данные представляли в виде среднего значения (*M*) ± стандартное отклонение, достоверность различий рассчитывали по *U*-критерию Манна — Уитни и считали значимыми при $p < 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

МТТ-тест. МТТ-тест, широко известный как скрининговый метод измерения выживаемости клеток и включенный в большинство протоколов методов молекулярной биологии и медицины [18], позволил выявить различия, касающиеся влиянии исследуемых слезозаместителей на метаболическую активность клеток эпителия роговицы. Результаты МТТ-теста представлены в виде гистограммы, в которой жизнеспособность клеток, культивируемых в питательных средах с добавлением глазных капель, выражена в процентах по отношению к контролю (рис. 1).

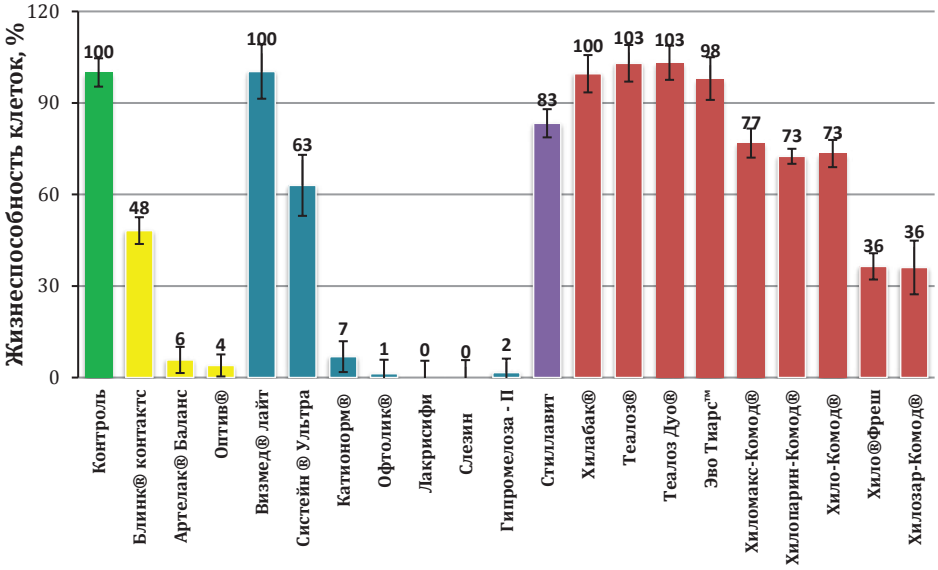


Рис. 1. Гистограммы оценки жизнеспособности HCEC на третьи сутки культивирования в среде с концентрацией исследуемых препаратов 10 % от объема питательной среды. Препараты добавлены в питательную среду в момент посева клеток

Fig. 1. Histograms of assessing the viability of HCEC at 3 days of cultivation in the medium with the concentration of the studied drugs 10 % by volume of the nutrient medium. Drugs added to the nutrient medium at the time of seeding cells

С помощью анализа МТТ было установлено, что наибольшей токсичностью в отношении клеток эпителия роговицы обладают слезозаместители, в состав которых входят консерванты из группы детергентов, особенно БАК, в различных концентрациях: Лакрисифи (0,1 мг/мл), Слезин (0,075 мг/мл), Офтолик® (0,1 мг/мл), Гипромелоза-П (0,1 мг/мл), а также Катионорм® (цеталкония хлорид). Жизнеспособность клеток в присутствии этих препаратов была близка к нулю. Исключение в этой группе составляли Визмед® Лайт (полигексанид), не проявляющий в исследованной концентрации токсического действия, и Систейн® Ультра (Поликвад®), обладающий умеренным токсическим действием. Это, вероятно, связано с тем, что в составе Визмед® Лайт в качестве консерванта присутствует полигексанид, который достаточно редко входит в состав слезозаместителей. Данный консервант имеет ограниченную противогрибковую активность и не оказывает раздражающего действия на клетки эпителия роговицы человека [19]. В глазных каплях Систейн® Ультра присутствует Поликвад® (хлорид полидрония), представляющий собой консервант детергентного типа, производный от БАК. Он уникален тем, что бактериальные клетки «притягивают» Поликвад®, в то время как эпителиальные клетки роговицы, как правило, «отталкивают» его. Несмотря на возникновение некоторых поверхностных эпителиальных повреждений, он лучше переносится, чем другие консервирующие агенты детергентного типа [20]. Крайне высокую токсичность в отношении клеток эпителия роговицы проявили также слезозаместители, в которых в качестве консервантов используют окислители: стабилизированный оксихлорокомплекс — Оптив® (Пурит®) и стабилизированный хлоритный комплекс — Артелак® Баланс (Оксид®). Наименее токсичным в этой группе оказался слезозаместитель Блинк® с консервантом ОкуПур®. Считается, что окислительные консерванты обладают «мягким» цитотоксическим эффектом, хорошей переносимостью и являются безопасными [21], тем не менее было установлено, что эта группа консервантов может вызывать поверхностный точечный кератит при длительном использовании [22]. В группу слезаместителей, в которую вошел только один препарат Стиллавит, показавший умеренную токсичность по сравнению с «искусственными слезами» с консервантами детергентного и окислительного типа, включен антиоксидант ЭДТА (эдетат натрия). Это хелатирующий агент, который, не являясь истинным консервантом, может увеличивать антимикробную активность основного дезинфицирующего средства, понижая его концентрацию. Он хелатирует двухвалентные катионы кальция и магния, делая микроорганизмы более уязвимыми к консерванту. Поскольку ЭДТА хелатирует ионы кальция и магния, он также может обладать незначительным токсическим действием на клетки роговицы, которым эти ионы нужны для метаболизма. Хотя ЭДТА, как правило, не обладает выраженным токсическим действием, имеются сведения, что пациенты с тяжелой формой ССГ часто жалуются на дискомфорт после применения препаратов, содержащих ЭДТА [23].

В рамках проведенного исследования были получены результаты, свидетельствующие о цитотоксическом действии слезозаместителей с различными химическими группами консервантов, на клетки эпителия роговицы. В научной литературе эта проблема в настоящее время освещается достаточно объективно и полно. Помимо активного вещества, консервантов и некоторых других вспомогательных агентов, слезозаместители содержит различные буферные системы (табл. 2), которые могут также оказывать неблагоприятное действие на эпителиальные клетки роговицы и конъюнктивы. Информация о сравнительной токсичности буферных систем, входящих в состав глазных капель, практически отсутствует. Тем не менее в отдельных сообщениях представлены данные о возникновении кератопатий и отложении гидроксиапатита кальция в прозрачном слое роговицы после применения глазных капель, в составе которых присутствовал фосфатный буфер [24, 25]. Фосфатсодержащие слезозаместители широко используются в составе глазных лекарственных форм в странах ЕС, около трети всех забуференных препаратов содержат фосфаты в качестве буфера. Европейское агентство по лекарственным средствам для человека (CHMP) позиционирует преимущество в использовании фосфатсодержащих препаратов, мотивируя тем, что возникающие риски не превышают риск развития нежелательных реакций, возникающих в процессе их использования, так как доля осложнений составляет менее одного случая на 10 000 проданных флаконов слезозаместителей. Кальцификация является многофакторным осложнением, и может возникнуть без применения фосфатсодержащих препаратов. Предпочтение в выборе фосфатсодержащих слезозаместителей должно быть сопоставимо с низким риском развития кальцификации роговицы, особенно при серьезной патологии, принимая во внимание индивидуальные обстоятельства каждого случая. В настоящее время неясно, какая концентрация фосфата является критической для начала развития кальцификации роговицы. Относительно недавно предпочтение было отдано боратным буферам, которые, обладая антимикробной активностью, продемонстрировали хорошую биосовместимость с глазной поверхностью как *in vivo*, так и *in vitro* и считаются более безопасными [26, 27]. Трис-буферы также включены в состав некоторых лекарственных форм и были признаны эффективными и малотоксичными [28].

Как показали наши исследования, жизнеспособность клеток эпителия роговицы человека зависела в том числе и от состава буферной системы, используемой в слезозаместительных препаратах, не содержащих консервантов. Наиболее низкая метаболическая активность клеток при исследовании линейки бесконсервантных слезозаместителей наблюдалась в присутствии препарата Хило®Фреш, в состав которого входит боратный буфер, а также Хилозар-Комод® с цитратным

буфером совместно с декспантенолом. Выраженное цитотоксическое действие Хилозар-Комод® в отношении клеток эпителия роговицы может быть связано с чувствительностью данной тест-системы к сочетанию входящих в препарат компонентов. Этот вопрос требует дальнейшего изучения. Более высокий уровень метаболизма у клеток был выявлен в присутствии трех слезозаместителей без консерванта, с цитратным буфером (Хиломакс-Комод®, Хилопарин-Комод®, Хило-Комод®). Средний уровень жизнеспособности клеток здесь составил от 73 % до 77 %. Бесконсервантные слезозаместители Хилабак®, Теалоз®, Теалоз Дуо® с трис буфером и инновационный препарат Эво Тиарс™, не содержащий консервантов, буферов и эмульгаторов, как показали наши исследования, не проявили токсичности в отношении клеток эпителия роговицы (рис. 1).

На основании полученных с помощью МТТ-теста данных из широкой линейки слезозаместителей для анализа xCELLigence было выбрано восемь препаратов с разными типами консервантов: Артелак®Баланс и Блинк®контакс (окислители); Офтолик® и Систейн® Ультра (детергенты); Стиллавит (ЭДТА); Хило-Комод®, Теалоз Дуо® и Хилозар-Комод® (без консервантов). Данные препараты внутри своих групп проявили разную степень токсичности в отношении метаболической активности клеток эпителия роговицы. Технология xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) основана на использовании микроэлектронных клеточных сенсоров, интегрированных в дно лунок специальных культуральных планшетов (E-Plate). Сопротивление, измеренное между электродами в отдельной лунке, зависит от геометрии электрода, концентрации ионов в лунке и от того, прикреплены ли к электродам клетки. В отсутствие клеток сопротивление электрода в основном определяется ионной средой как на границе раздела электрод/раствор, так и во всем объеме. Клетки, прикрепленные к поверхностям электродов, действуют как изоляторы и, таким образом, изменяют локальную ионную среду на границе раздела электрод/раствор, что приводит к увеличению сопротивления. Итак, чем больше клеток, которые распластаны на электродах, тем больше значение сопротивления электродов. Присутствие клеток на электродах в лунках планшета E-Plate влияет на локальное состояние ионного окружения, что приводит к изменению сопротивления на электродах. Величина Cell Index (клеточный индекс) является показателем электрического потенциала, который отражает статус клеток. Cell Index можно использовать для наблюдения в режиме реального времени за жизнеспособностью клеток: их морфологией, степенью адгезии, динамикой роста клеточных культур (пролиферацией) и другими важными параметрами [11]. Непрерывный мониторинг влияния ПСТ на клетки линии HCEC в режиме реального времени при помощи системы xCELLIgence выявил, что исследуемые препараты в концентрации 10 % от объема питательной среды проявляют различную степень токсичности в отношении культивируемых клеток. В ходе мониторинга были получены графики зависимости клеточного индекса (Cell Index) от времени культивирования клеток, позволяющие судить о жизнеспособности клеток по степени их распластанности и пролиферативной активности (рис. 2).

Как следует из графиков, из всех тестируемых при помощи системы xCELLIgence препаратов самой высо-

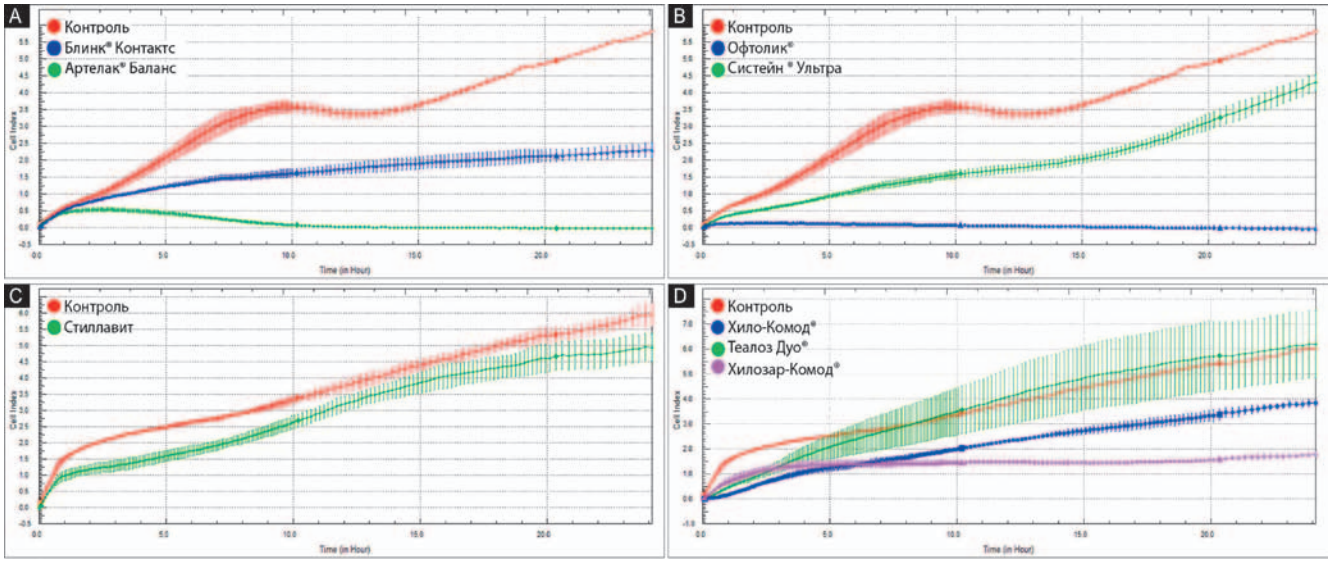


Рис. 2. Мониторинг влияния слезозаместителей с различными видами консервантов (A — окислители; B — детергенты; C — ЭДТА; D — бесконсервантные препараты) на жизнеспособность эпителиальных клеток роговицы в режиме реального времени (кривые пролиферации). Клеточный анализ xCELLIgence

Fig. 2. Monitoring of the effect of tear-replacement agents with various types of preservatives (A — oxidizing agents, B — detergents, C — EDTA, D — non-conservative preparations) on the viability of epithelial cells of the cornea in real time (proliferation curves). Cell analysis xCELLIgence

кой токсичностью по отношению к клеткам роговицы обладает слезозаместитель Офтолик® с БАК (рис. 2B). Клеточный индекс, равный нулю, на протяжении всего срока наблюдения свидетельствовал о том, что адгезии клеток так и не произошло. В присутствии препарата Артелак® Баланс (рис. 2A) с консервантом Оксид® адгезия происходила в течение одного часа, однако через пять часов клетки начинали открепляться от дна лунок, а через 10 часов жизнеспособных клеток уже не было выявлено. Анализ xCELLIgence выявил неблагоприятное воздействие на клеточную культуру и бесконсервантного препарата Хилозар-Комод®, содержащего цитратный буфер с декспантенолом (рис. 2D). Он оказался наиболее токсичным препаратом из группы бесконсервантных слезозаместителей; его цитотоксический эффект был сопоставим с препаратом Блинк® контактс, содержащим консервант окислительного типа (рис. 2A). В присутствии этих препаратов клетки смогли только адгезировать и распластываться. В присутствии препаратов Хило-Комод® (рис. 2D) и Систейн® Ультра (рис. 2B) эпителиальные клетки роговицы адгезировали, распластывались, однако динамика пролиферации была невысокой. Показатели пролиферации клеток в присутствии Стиллавита (рис. 2C) были чуть ниже, чем в контроле, а в присутствии Теалоз Дуо® (рис. 2D) — сопоставимы с контролем, что свидетельствует о том, что Стиллавит умеренно токсичен, а Теалоз Дуо® не проявляет токсичности при данной концентрации в отношении клеток эпителия роговицы.

Результаты прижизненного наблюдения за морфологическим состоянием клеток линии HCEC в процессе их культивирования в средах, содержащих 10 % ПСТ с различными системами консервантов, приведены на рис. 3. На представленных фотографиях клетки роговицы человека в контроле хорошо распластаны, имеют типичную эпителиоподобную морфологию и на третьи сутки культивирования сформировали конфлюэнтный монослой (рис. 3E).

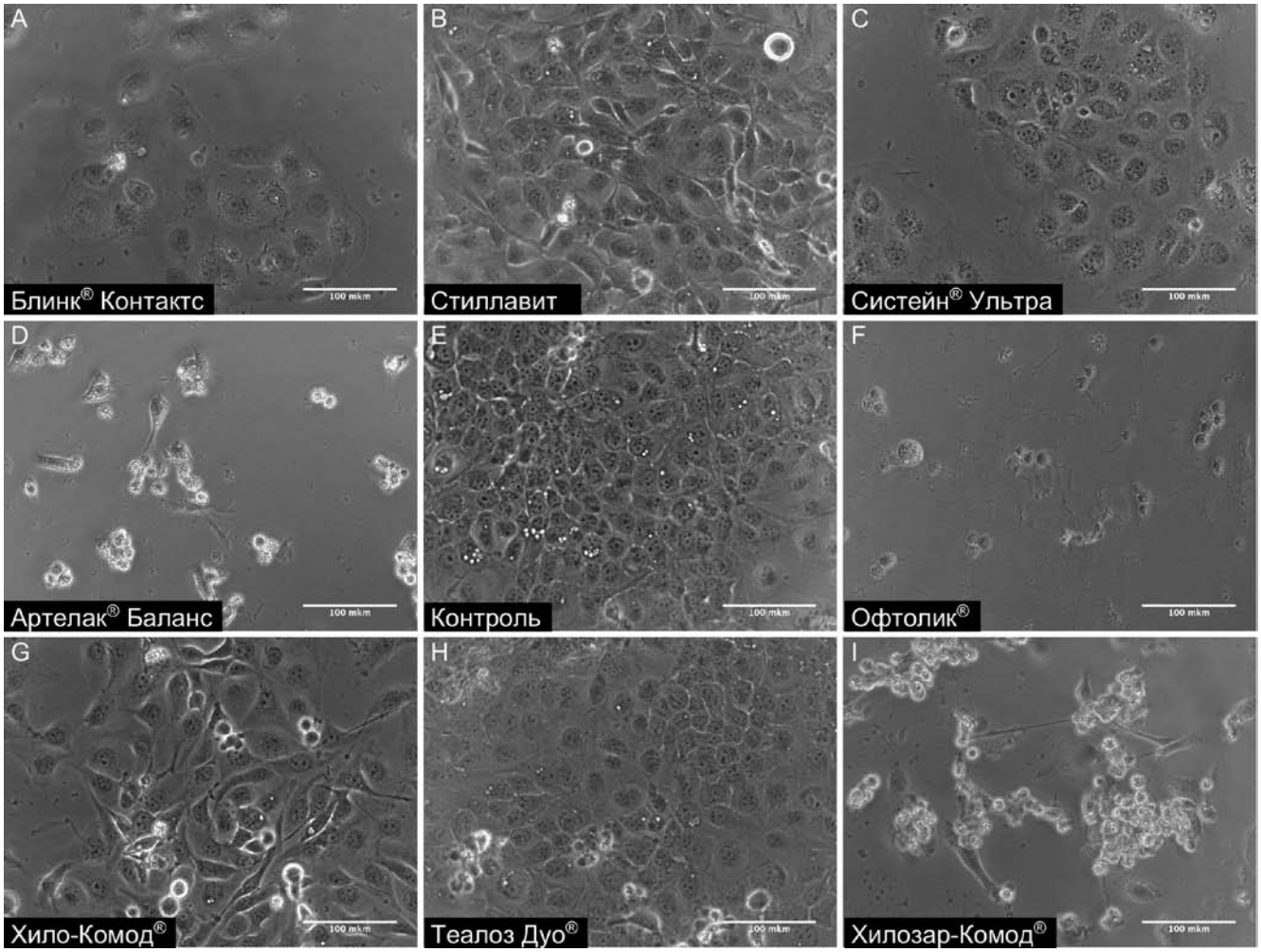


Рис. 3. Морфология клеток линии HCEC на третьи сутки культивирования в питательной среде, содержащей 10 % тестируемых слезозаместителей с различными видами консервантов: окислители (A, D), детергенты (C, F), ЭДТА (B), бесконсервантные препараты (G, H, I). Масштабная линейка 100 нм (×20). ФКМ

Fig. 3. Morphology of HCEC line cells on the 3rd day of cultivation in a nutrient medium containing 10 % of tested artificial tears with various kinds of preservatives: oxidants (A, D), detergents (C, F), EDTA (B), non-conservative drugs (G, H, I). Scale ruler 100 nm (×20). FCM

Морфологическое состояние клеток в присутствии слезозаместителя Теалоз Дуо® сопоставимо с контролем. Чуть менее плотный монослой, чем в контроле, сформировали клетки в питательной среде препарата Стиллавит. С Хило-Комод® монослой клеток был менее плотный, чем в присутствии Теалоз Дуо® и Стиллавита. Большая часть клеток в присутствии этого препарата хорошо распластана, однако их цитоплазма имела зернистую структур и было визуализировано много не прикрепившихся клеток. В присутствии слезозаместителей Блинк® контакс и Систейн® Ультра монослой был сформирован примерно на 50 %, клетки имели зернистую вакуолизированную цитоплазму, что свидетельствовало об их угнетенном состоянии. В варианте с Хилозар-Комод® часть клеток адгезировала, между ними выявлены межклеточные контакты; в присутствии слезозаместителя Артелак® Баланс определены только единичные адгезировавшие клетки, а в присутствии препарата Офтолик® распластанных клеток не выявлено совсем, большая часть клеток имела округлую форму. Структура клеток была зернистой, с вакуолями; наблюдалась инвагинация цитоплазматической мембраны. В питательной среде найдено много клеточных фрагментов. Эти наблюдения позволяют сделать предположение о запуске процессов клеточной гибели. Таким образом, результаты МТТ-теста согласуются с результатами клеточного анализа xCELLIgence и анализом морфологического состояния клеток при помощи методов ФКМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На фармацевтическом рынке в настоящее время доступно большое количество препаратов «искусственной слезы». Выбор оптимального препарата, который подходит пациенту, остается проблемой как для врача, так и для самого пациента. В настоящем исследовании представлены результаты по оценке цитотоксичности слезозаместителей, которые демонстрируют, что данные препараты могут оказывать цитостатический эффект в условиях *in vitro* и отличаются по своему цитотоксическому потенциалу. Сопоставление цитотоксичности препаратов «искусственной слезы» необходимо для рационального подбора препарата, чтобы получить максимальную клиническую эффективность и иметь более высокий профиль безопасности. Слезозаместители Хилабак®, Теалоз®, Теалоз Дуо® и Эво Тиарс™, не содержащие в своем составе консервант, не оказывали цитотоксическое действие на клетки. Нетоксичным оказался также Визмед® Лайт с консервантом полигексанид. Установлено, что так называемые «мягкие» консерванты также могут оказывать неблагоприятное воздействие на глазную поверхность. Среди «искусственных слез» наибольшее токсическое действие на клетки эпителия роговицы было отмечено у слезозаместителей Офтолик®, Лакрисифи, Гипромелоза и Слезин, содержащих в качестве консерванта БАХ в различных концентрациях, а также Катионорм® (циталкония хлорид), Артелак® Баланс (Пурит®) и Оптив® (Оксид®). Проведенное исследование показало принципиальную возможность использования систем *in vitro* для сравнительной оценки цитотоксического действия препаратов слезозаместительной терапии. Учитывая, что проблема медикаментозной терапии больных с ССГ в последние годы привлекает все большее внимание офтальмологов в связи с ростом распространенности ССГ и увеличением ассортимента препаратов «искусственной слезы», скрининг цитотоксичности широкой линейки слезозаместительных препаратов с использованием тест-систем на основе клеточных культур может способствовать рациональному выбору этих препаратов. Кроме оценки токсичности слезозаместителей *in vitro* представляется интересным исследование защитных свойств этих препаратов на модели ССГ *in vitro*.

УЧАСТИЕ АВТОРОВ:

Александрова О.И. — сбор и обработка материала, написание текста, подготовка иллюстраций;
Околов И.Н. — концепция и дизайн исследования; написание текста;
Хорольская Ю.И. — статистическая обработка, подготовка иллюстраций;
Панова И.Е. — редактирование;
Блинова М.И. — редактирование.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Baudouin C., Labbe A., Liang H., Pauly A., Brignole-Baudouin F. Preservatives in eye drops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res.* 2010;9:312–34. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2010.03.001
2. Whitson J., Petroll W. Corneal epithelial cell viability following exposure to ophthalmic solutions containing preservatives and/or antihypertensive agents. *Adv Ther.* 2012;29:874–88. DOI: 10.1007/s12325-012-0057-1
3. Tu E. Balancing antimicrobial efficacy and toxicity of currently available topical ophthalmic preservatives. *Saudi J Ophthalmol.* 2014;28(3):182–7. DOI: 10.1016/j.sjopt.2014.06.006
4. Elder D., Crowley P. Antimicrobial Preservatives Part One: Choosing a Preservative System. *American Pharmaceutical Review.* 2012, available from http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/38886-Antimicrobial-Preservatives-Part-One-Choosing-a-Preservative-System/
5. Freeman P., Kahook M. Preservatives in Topical Ophthalmic Medications: Historical and Clinical Perspectives. *Expert Review of Ophthalmology* 2009;4(1):59–64.
6. Ammar D., Noecker R., Kahook M.. Effects of benzalkonium chloride-preserved, polyquad-preserved, and sofZia-preserved topical glaucoma medications on human ocular epithelial cells. Adv Ther. 2010 Nov; 27(11):837–45. DOI: 10.1007/s12325-010-0070-1.
7. Schiffman R., Christianson M., Jacobsen G., Hirsch J., Reis B. Reliability and validity of the ocular surface disease index. *Arch Ophthalmol.* 2000;118:615–21.
8. Management and therapy of dry eye disease: report of the Management and Therapy Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf.* 2007 Apr;5(2):163–78.
9. Данченко Е.О. Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций с использованием клеточных культур. Иммунология, аллергология, инфектология. 2012;2:22–31. [Danchenko E.O. Evaluation of cytotoxicity of pharmaceutical substances using cell cultures. Immunopathology, allergology, infectology=*Immunopatologija, Allergologija, Infektologija.* 2012;2:22–31. (In Russ.)]
10. Еропкин М.Ю., Еропкина Е.М. Клеточные культуры как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов. Санкт-Петербург: Морсар, 2003. [Eropkin M.Ju., Eropkina E.M. The cell cultures as a model system toxicity studies and screening of cytoprotective drugs. St. Petersburg: Morsar AV, 2003. (In Russ.)]
11. Аникина Л.В., Пухов С.А., Дубровская Е.С., Афанасьева С.В., Клочков С.Г. Сравнительное определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ и ресазурина. *Фундаментальные исследования.* 2014;12:1423–1427. [Anikina L.V., Puhov S.A., Dubrovskaja E.S., Afanas'eva S.V., Klochkov S.G. Comparative determination of cell viability using the MTT and Resazurin. Fundamental research=*Fundamental'nye issledovaniya.* 2014;12:1423–1427. (In Russ.)]
12. Urcan E., Haertel U., Styllou M., Hickel R., Scherthan H., Reichl F. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite

components on human gingival fibroblasts. *Dent Mater.* 2010;26:1:51–8. DOI: 10.1016/j.dental.2009.08.007
13. Александрова О.И., Околов И.Н., Тахтаев Ю.В., Хорольская Ю.И., Хинтуба Т.С., Блинова М.И. Сравнительная оценка цитотоксичности антимикробных глазных капель. *Офтальмологические ведомости.* 2015;8(1):89–97. [Aleksandrova O.I., Okolov I.N., Tahtaev Ju.V., Horol'skaja Ju.I., Hintuba T.S., Blinova M.I. Competitive evaluation of cytotoxicity of antibacterial eye drops. Sravnitel'naja ocenka citotoksichnosti antimikrobnyh glaznyh kapel'. *Oftal'mologicheskie vedomosti.* 2015;8(1):89–97. (In Russ.)]
14. Александрова О.И., Хорольская Ю.И., Майчук Д.Ю., Блинова М.И. Исследование общей цитотоксичности антибиотиков аминогликозидного и фторхинолонового ряда на клеточных культурах. Вестник офтальмологии. 2015;5:39–48. [Aleksandrova O.I., Horol'skaja Ju.I., Majchuk D.Ju., Blinova M.I. Study of the general cytotoxicity of antibiotics of aminoglycoside fluoroquinolone groups on cell cultures. Annals of Ophthalmology=*Vestnik oftal'mologii* 2015;5:39–48. (In Russ.)] DOI: 10.17116/oftalma2015131543-53
15. Александрова О.И., Околов И.Н., Хорольская Ю.И., Блинова М.И., Чураков Т.К. Оценка влияния бензалкония хлорида на цитотоксичность глазных капель Неттацин и Тобрекс в условиях *in vitro. Современные технологии в офтальмологии.* 2016;3:163–166. [Aleksandrova O.I., Okolov I.N., Horol'skaja Ju.I., Blinova M.I., Churakov T.K. Evaluation of BAK influence on cytotoxicity of eye drops Nettacin and Tobrex *in vitro*. Ocenka vlijanija benzalkonija hlorida na citotoksichnost' glaznyh kapel' Nettacin i Tobreks v uslovijah *in vitro*. *Sovremennye tehnologii v oftal'mologii*, 2016;3:163–166. (In Russ.)]
16. Александрова О.И., Околов И.Н., Хорольская Ю.И., Панова И.Е., Блинова М.И. Возможности клеточных технологий для рациональной фармакотерапии глазных патологий. *Современные технологии в офтальмологии.* 2017;7:5–7. [Aleksandrova O.I., Okolov I.N., Horol'skaja Ju.I., Panova I.E., Blinova M.I. Possibilities of cell technologies for rational pharmacotherapy of eye pathologies. Vozmozhnosti kletochnyh tehnologij dlja racional'noj farmakoterapii glaznyh patologij. *Sovremennye tehnologii v oftal'mologii.* 2017;7:5–7. (In Russ.)]
17. Александрова О.И., Околов И.Н., Хорольская Ю.И., Панова И.Е., Блинова М.И. Оценка цитотоксичности слезозаместительных препаратов с использованием системы in vitro. *Офтальмология.* 2017;14(1):59–64). [Aleksandrova O.I., Okolov I.N., Horol'skaja Ju.I., Panova I.E., Blinova M.I. Cytotoxicity evaluation of tear substitutes using *in vitro* system. Ocenka citotoksichnosti slezozamestitel'nyh preparatov s ispol'zovaniem sistemy *in vitro*. Ophthalmology in Russia=*Oftal'mologiya*. 2017;14(1):59–64). DOI: 10.18008/1816-5095-2017-1-59-66. (In Russ.).] DOI: http://dx.doi.org/10.18008/1816-5095-2017-1-59-66
18. Александрова О.И., Околов И.Н., Хорольская Ю.И., Панова И.Е., Блинова М.И. Влияние нестероидных противовоспалительных глазных капель на клетки эпителия роговицы и конъюнктивы человека в условиях *in vitro. Офтальмология.* 2017;15(3):251–259. [Aleksandrova O.I., Okolov I.N., Horol'skaja Ju.I., Panova I.E., Blinova M.I. Influence of NSAID eye drops on corneal epithelial cells *in vitro.* Ophthalmology in Russia=*Oftal'mologiya*. 2017;15(3):251–259. (In Russ.)] DOI: 10.18008/1816-5095-2017-3-251-259
19. Cancer cell culture: methods and protocols / Ser. Methods in Molecular Medicine. Vol. 88. (Ed. S.P. Langdon). Totowa, NJ: Humana Press, 2003. 165–169 p.,
20. Kahook M. Preservatives in Topical Ophthalmic Medications: Historical and Clinical Perspectives. *Expert Review of Ophthalmology.* 2009;4(1):59–64.
21. Epstein S., Ahdoot M., Marcus E., Asbell P. Comparative toxicity of preservatives on immortalized corneal and conjunctival epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 2009;25(2):113–9.
22. Noecker R. Effects of common ophthalmic preservatives on ocular health. *Adv Ther.* 2001 Sep-Oct; 18(5):205–15.
23. Schrage N., Frentz M., Spoeler F. The Ex Vivo Eye Irritation Test (EVEIT) in evaluation of artificial tears: Purite-preserved versus unpreserved eye drops. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2012 Sep; 250(9):1333–40. DOI: 10.1007/s00417-012-1999-3
24. Samar K. Basak Preservatives and Ocular Surface Diseases. *Kerala Journal of Ophthalmology.* 2016;18(4):311–6.
25. Schrage N., Frentz M., Reim M. Changing the composition of buffered eye-drops prevents undesired side effects. *Br J Ophthalmol.* 2010;94:1519–22. DOI: 10.1136/bjo.2009.177386
26. Mueller-Lierheim. Traenenersatz- und Kontaktlinsenbenetzungsloesungen. In: Köln Biermann, ed. Aktuelle Kontaktologie. 2015:8–15.
27. Houlsby R., Ghajar M., Chavez G. Antimicrobial activity of boratebuffered solutions. Antimicrob Agents Chemother. 1986;29:803–6.
28. Lehmann D., Cavet M., Richardson M. Nonclinical safety evaluation of boric acid and a novel borate-buffered contact lens multi-purpose solution, Biotrue™ multi-purpose solution. *Cont Lens Anterior Eye.* 2010 Dec; 33 Suppl 1:S24–32. DOI: 10.1016/j.clae.2010.06.010
29. Graupner O., Hausmann C. The alternation of the pH in the anterior chamber of the rabbits eye burned with smallest volumes of high concentrated acid and base [in German]. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.* 1968;176:48–53.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ФГБУН Институт цитологии РАН
Александрова Ольга Игоревна
младший научный сотрудник отдела клеточных культур, лаборатория биологии клетки в культуре, группа клеточной биотехнологии
Тихорецкий пр., 4, Санкт-Петербург, 194064, Российская Федерация

СПб филиал ФГАУ «МНТК "Микрохирургия глаза" им. академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Околов Игорь Николаевич
кандидат медицинских наук, заведующий клинико-бактериологической лабораторией
ул. Я. Гашека, 21, Санкт-Петербург, 192283, Российская Федерация

ФГБУН Институт цитологии РАН
Хорольская Юлия Игоревна
лаборант-исследователь, отдел клеточных культур, лаборатория биологии клетки в культуре, группа клеточной биотехнологии
Тихорецкий пр., 4, Санкт-Петербург, 194064, Российская Федерация

СПб филиал ФГАУ «МНТК "Микрохирургия глаза" им. академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Панова Ирина Евгеньевна
доктор медицинских наук, профессор, зам. директора по научной работе
ул. Я. Гашека, 21, Санкт-Петербург, 192283, Российская Федерация

ФГБУН Институт цитологии РАН
Блинова Миральда Ивановна
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела клеточных культур, лаборатория биологии клетки в культуре, группа клеточной биотехнологии
Тихорецкий пр., 4, Санкт-Петербург, 194064, Российская Федерация

ABOUT THE AUTHORS

Institute of Cytology of the Russian Academy of Science
Aleksandrova Olga I.
junior research scientist, department of cell cultures, laboratory of cell biology in culture, group of cell biotechnology
Tikhoretsky ave., 4, Saint Petersburg, 194064, Russia

Sv. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution
Okolov Igor N.
PhD, Head of the Clinical Bacteriological Laboratory
Gasheka str., 21, Saint Petersburg, 192283, Russia

Institute of Cytology of the Russian Academy of Science
Khorolskaya Yuliya I.
laboratory assistant-scientist, department of cell cultures, laboratory of cell biology in culture, group of cell biotechnology
Tikhoretsky ave., 4, Saint Petersburg, 194064, Russia

Sv. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution
Panova Irina E.
MD, professor, vice-director
Gasheka str., 21, Saint Petersburg, 192283, Russia

Institute of Cytology of the Russian Academy of Science
Blinova Miralda I.
PhD, leading research scientist, department of cell cultures, laboratory of cell biology in culture, group of cell biotechnology
Tikhoretsky ave., 4, Saint Petersburg, 194064, Russia