ISSN 1816-5095 (print); ISSN 2500-0845 (online)
https://doi.org/10.18008/1816-5095-2020-3-473-480

поступила 22.04.19
was received 22.04.19

Экспериментальное сравнительное исследование цито- и фототоксичности различных агентов для хромовитрэктомии в условиях *in vitro*

Н.М. Кислицына[1] С.В. Новиков[2] С.В. Колесник[1] А.И. Колесник[1] М.П. Веселкова[1]
Н.В. Перова[3]

[1] ФГАУ «МНТК “Микрохирургия глаза” имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Бескудниковский бульвар, 59а, Москва, 127486, Российская Федерация

[2] ООО «Научно-экспериментальное производство “Микрохирургия глаза”» (ООО «НЭП МГ»)
Бескудниковский бульвар, 59а, Москва, 127486, Российская Федерация

[3] Автономная некоммерческая организация «Институт медико-биологических исследований и технологий» (АНО «ИМБИИТ»)
Б. Тишинский пер., 43/20, стр. 2, Москва, 123557, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ **Офтальмология. 2020;17(3):473–480**

Интравитреальное использование красителей в сочетании с действием источника эндоиллюминации может оказывать цито- и фототоксическое влияние на структуры заднего сегмента глаза. Актуальным остается поиск контрастирующего агента, имеющего максимальный профиль безопасности, при этом интенсивно и селективно окрашивающего структуры стекловидного тела и витреоретинального интерфейса. **Цель исследования:** провести исследование жизнеспособности клеток культуры фибробластов мыши линии NIH/3T3 при сравнительном воздействии традиционных агентов для хромовитрэктомии и суспензии «Витреоконтраст» изолированно и в условиях эндовитреального освещения. **Материалы и методы.** В культуру фибробластов мыши линии NIH/3T3 вносили агенты для хромовитрэктомии (MembraneBlue® Dual, Триамцинолона ацетонид (ТА), суспензию «Витреоконтраст»). Тестовый планшет подвергали облучению осветителем «Photon II», рабочее расстояние 5 мм. Контрольный планшет с внесенными препаратами облучению не подвергали. Далее клетки промывали и инкубировали, после чего оценивали морфологию и лизис клеток, а также количество пролиферирующих относительно отрицательного контроля фибробластов с помощью витального красителя PrestoBlue® Cell Viability Reagent. Отрицательным контролем служила полная ростовая среда для культивирования фибробластов мыши линии NIH/3T3. Полученные результаты цитотоксической реакции культуры фибробластов мыши линии NIH/3T3 интерпретировали с использованием таблицы «Степень ответной реакции клеток». **Результаты.** Проведенные исследования показали, что облучение источником эндовитреального освещения не влияет на цитотоксическое действие суспензии ТА и красителя MembraneBlue® Dual. Суспензия ТА как после облучения, так и без облучения оказывает умеренное цитотоксическое действие, а MembraneBlue® Dual не оказывает цитотоксического действия на культуру фибробластов мыши линии NIH/3T3. Без облучения суспензия «Витреоконтраст» не оказывает цитотоксического действия на культуру фибробластов мыши линии NIH/3T3. Облучение в течение 1 ч повышает цитотоксичность суспензии «Витреоконтраст» до уровня нерезкой цитотоксичности, допустимого ГОСТ ISO 10993-5-2011. **Заключение.** Профиль безопасности агентов для хромовитрэктомии MembraneBlue® Dual и «Витреоконтраст» позволяет рекомендовать их для использования в ходе эндовитреальной хирургии. Продемонстрированная в эксперименте цито- и фототоксичность суспензии ТА может снижать функциональные исходы хирургии сетчатки.

Ключевые слова: витреоконтраст, интравитреальные красители, триамцинолона ацетонид, витреомакулярный интерфейс, внутренняя пограничная мембрана

Для цитирования: Кислицына Н.М., Новиков С.В., Перова Н.В., Колесник С.В., Колесник А.И., Веселкова М.П. Экспериментальное сравнительное исследование цито- и фототоксичности различных агентов для хромовитрэктомии в условиях *in vitro*. *Офтальмология.* 2020;17(3):473–480. https://doi.org/10.18008/1816-5095-2020-3-473-480

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

Конфликт интересов отсутствует

CC BY 4.0

Experimental *in vitro* Comparative Study of Chromovitectomy Agents Cyto- and Phototoxicity

N.M. Kislitsyna[1], S.V. Novikov[2], N.V. Perova[3], S.V. Kolesnik[1], A.I. Kolesnik[1], M.P. Veselkova[1]

[1] The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution
Beskudnikovsky blvd, 59a, Moscow, 127486, Russian Federation

[2] Scientific-Production Experimental Eye Microsurgery (OOO "NEP MG")
Beskudnikovsky blvd, 59a, Moscow, 127486, Russian Federation

[3] Autonomous non-profit organization "Institute of Biomedical Research and Technology" (ANO "IMBIIT")
B. Tishinsky lane, 43/20, building 2, Moscow, 123557, Russian Federation

ABSTRACT

Ophthalmology in Russia. 2020;17(3):473–480

Intravitreal use of vital dyes in combination with the action of endoillumination can induce a cyto- and phototoxic effect on posterior eye segment structures. The search for a staining agent with a maximum safety profile to retinal structures, intensively and selectively coloring vitreous body and vitreoretinal interface structure, remains relevant. **Objective:** to determine comparative viability of NIH / 3T3 mouse fibroblast cell culture with traditional agents for chromovitrectomy and "Vitreocontrast" suspension with and without endovitreal illumination. **Materials and methods.** NIH / 3T3 mouse fibroblast cultures contacted with agents for chromovitrectomy (MembraneBlue® Dual, Triamcinolone acetonide, "Vitreocontrast" suspension) and the corresponding controls in a volume of 50 μl / well. The test plate was irradiated with a Photon II illuminator (Synergetics, USA), working distance of 5 mm. The control tablet with the introduced preparations was not exposed to light. Next, the cells were washed and incubated, after which the morphology and lysis of the cells, as well as the number of proliferating relatively negative control of fibroblasts, were evaluated using the vital dye PrestoBlue Cell Viability Reagent. Negative control was the complete growth medium for the cultivation of mouse fibroblasts of the NIH / 3T3 line. The results of the cytotoxic reaction of a culture of mouse fibroblasts of the NIH / 3T3 line were interpreted using the table "The degree of cell response". **Results**. Studies have shown that exposure to a source of endovitual illumination does not affect the cytotoxic effect of TA suspension and MembraneBlue® Dual dye. The TA suspension, both after light source and without it, has a moderate cytotoxic effect, and MembraneBlue® Dual has no cytotoxic effect on the culture of mouse fibroblasts of the NIH / 3T3 strain. Without light, "Vitreocontrast" suspension does not have cytotoxic effect on mouse fibroblasts culture NIH / 3T3 line. Light irradiation for 1 h increases the cytotoxicity of "Vitreocontrast" suspension to the level of unsharp cytotoxicity allowed by ISO Standard 10993-5-2011. **Conclusion.** The safety profile of MembraneBlue® Dual and "Vitreocontrast" suspension allows them to be recommended for use in endovitreal surgery. The cyto- and phototoxicity demonstrated in the experiment with TA suspension can reduce the functional outcomes of retinal surgery.

Keywords: vitreocontrast, intravitreal dyes, triamcinolone acetonide, vitreomacular interface, inner boundary membrane

For citation: Kislitsyna N.M., Novikov S.V., Perova N.V., Kolesnik S.V., Kolesnik A.I., Veselkova M.P. Experimental *in vitro* Comparative Study of Chromovitectomy Agents Cyto- and Phototoxicity. *Ophthalmology in Russia.* 2020;17(3):473–480. https://doi.org/10.18008/1816-5095-2020-3-473-480

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

There is no conflict of interests

ВВЕДЕНИЕ

На современном этапе развития витреоретинальной хирургии стало возможным выполнение крайне тонких, деликатных манипуляций с нежными полупрозрачными структурами стекловидного тела (СТ) и витреоретинального интерфейса (удаление эпиретинальных мембран (ЭРМ), внутренней пограничной мембраны (ВПМ)), что позволило значительно расширить показания к оперативному вмешательству, включая состояния с достаточно высокой остротой зрения, с получением максимального функционального восстановления. Новые источники эндовитреального освещения на основе ксенона и паров ртути и введение различных агентов для хромовитрэктомии позволяют точно идентифицировать и прецизионно удалять оптически полупрозрачные слои ткани внутри витреальной полости даже в условиях хирургии малых разрезов. Однако стремление к максимальной освещенности операционного поля должно быть сбалансировано мерами, защищающими сетчатку от повреждения [1]. Известно, что интравитреальное использование красителей в сочетании с действием источника эндоиллюминации может оказывать цито- и фототоксическое влияние на структуры заднего сегмента глаза [2, 3].

По современным представлениям, основную фототоксическую опасность для сетчатки представляет свет в ультрафиолетовой и фиолетово-синей области спектра [4, 5]. Коммерчески доступные осветители имеют фильтры, отсекающие ультрафиолетовый и отчасти синий спектр света. Несмотря на использование светоотсекающих фильтров, ряд авторов отмечают проявление фототоксической макулопатии со слабо заметным изменением цвета сетчатки на беловато-желтый, депигментацию ПЭС и отек сетчатки [6].

В настоящее время для окраски интравитреальных и преретинальных структур используют водорастворимые красители и суспензии. Первым был предложен индоцианиновый зеленый (ИЦЗ), обеспечивающий выраженное и стойкое контрастирование полупрозрачных

структур сетчатки, в особенности внутренней пограничной мембраны в ходе хромовитрэктомии. Доказано, что ИЦЗ проявляет токсические свойства и способен вызывать повреждение фоторецепторов сетчатки, нарушение целостности клеточных мембран, атрофию клеток пигментного эпителия сетчатки, приводя к снижению остроты зрения [7, 8]. Кроме того, в работах M. Morales и соавт. в эксперименте *in vitro* было доказано фототоксическое действие ИЦЗ. Авторы установили, что 3-минутная экспозиция 2 % ИЦЗ (20 мг/мл) в присутствии света вызывает морфологические изменения культуры клеток пигментного эпителия сетчатки (линия ARPE-19) [9], что ограничивает применение данного красителя. Впоследствии были предложены водорастворимые красители трипановый синий (ТС) и бриллиантовый синий, Brilliant blue G (БС, BBG). Несмотря на отсутствие каких-либо интра- и послеоперационных осложнений, при использовании ТС данные о цито- и фототоксичности агента являются противоречивыми и вопрос о допустимой для сетчатки концентрации красителя остается открытым [10]. Проникая через нарушенную цитоплазматическую мембрану поврежденных клеток, ТС преимущественно контрастирует ЭРМ и в значительно меньшей степени ВПМ [11–13]. Наиболее безопасным водорастворимым красителем в настоящее время считают BBG. Экспериментально показано, что этот краситель не вызывает интраоперационные осложнения и апоптоз клеточных структур сетчатки. Кроме того, BBG не обладает флюоресцентными свойствами и не оказывает фототоксическое действие. БС способен окрашивать как ВПМ, так и ЭРМ, однако сродство агента к ЭРМ значительно ниже, чем у ТС. В связи с этим наиболее удобной, эффективной и при этом максимально безопасной формой для контрастирования как мембраны, так и фиброзных волокон на ее поверхности является разработанный краситель MembraneBlue-Dual TM (DORC International, Zuidland, Нидерланды), сочетающий в себе 0,025 % БС и 0,15 % ТС, а в качестве компонента, повышающего вязкость и плотность раствора, этот краситель дополнительно содержит в своем составе полиэтиленгликоль (ПЭГ). Водорастворимый MembraneBlue-Dual TM обеспечивает эффективное окрашивание синим цветом ВПМ и волокон ЭРМ на поверхности ВПМ, при этом не оказывает токсического действия в отношении структур сетчатки при кратковременной экспозиции и не вызывает интра- и послеоперационные осложнения [14].

Кроме того, среди синтетических красителей для визуализации интравитреальных структур применяют суспензии глюкокортикостероидов. Так, Triamcinolone acetonide (TA) нашел применение в качестве контрастирующего вещества для структур стекловидного тела. Кристаллическая структура частиц ТА позволяет им проникать между волокнами СТ, оседать на них и создавать эффект «пейзажа после первого снегопада», тем самым контрастируя их и обеспечивая лучшую визуализацию. Несмотря на высокую эффективность, применение ТА ограничено значимыми побочными эффектами, главными из которых считают ускорение катарактогенеза, повышение внутриглазного давления, возникновение эффекта «взбалтывания» в витреальной полости со снижением визуализации сетчатки и опасностью ее ятрогенного повреждения [15]. Изначально суспензия ТА разработана не для интравитреального введения, отмечено развитие эндофтальмита (или псевдоэндофтальмита) после введения ТА [16].

ТА может обнаруживаться более 1 года в витреальной полости в форме перифовеолярного кольца из отложений кристаллов бело-желтого цвета четкой формы, что описано как случаи триамцинолоновой кристаллической макулопатии. У пациентов после предшествующего введения ТА также был найден в фовеоле после хирургии макулярного разрыва по данным ОКТ. Нельзя исключить токсичность и индукцию клеточного апоптоза за счет ТА в отношении структур сетчатки при его длительном присутствии [17].

Известно, что ТА высокофотореактивен как в твердом состоянии, так и в органических растворителях. При воздействии излучения с длиной волны 312 нм в присутствии ТА на цельную кровь мыши был определен фотогемолиз [18].

Таким образом, актуальным остается поиск контрастирующего агента, который не оказывает цито- и фототоксического действия на ткани глаза при интенсивном и селективном окрашивании структур стекловидного тела и сетчатки.

В качестве альтернативного агента для проведения хромовитрэктомии в ООО «НЭП МГ» и ФГАУ «МНТК “Микрохирургия глаза” им. академика С.Н. Федорова» Минздрава России разработана композиция для контрастирования СТ «Витреоконтраст» (ТУ № 9398-017-29039336-2009). «Витреоконтраст» представляет собой ультрадисперсную суспензию на основе нерастворимой в воде и физиологических жидкостях нейтральной нетоксичной неорганической соли сульфата бария в изотоническом растворе с осмолярностью 300–350 мОсм. Сульфат бария представляет собой кристаллическое вещество белого цвета с молекулярным весом 233,43 г/моль, размером частиц в суспензии «Витреоконтраст» менее 5 микрон и плотностью 4,4 г/см^3. В каждом 1,0 мл стерильного раствора содержится 140 мг сухого вещества (сульфата бария). Благодаря своим физико-химическим свойствам он способен окрашивать как волокна СТ, так и структуры витреомакулярного интерфейса.

Цель исследования: провести изучение жизнеспособности клеток культуры фибробластов мыши линии NIH/3T3 при сравнительном воздействии традиционных агентов для хромовитрэктомии и суспензии «Витреоконтраст» изолированно и в условиях эндовитреального освещения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено согласно межгосударственному стандарту ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Изделия

медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*» и было проведено на базе отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России под руководством старшего научного сотрудника отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России кандидата физико-математических наук В.А. Сургученко и научного сотрудника отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России кандидата биологических наук А.С. Пономаревой.

СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА

В асептических условиях клетки (фибробласты мыши линии NIH/3T3) высевали в культуральные плоскодонные 96-луночные планшеты (CELLSTAR®GreinerBio-One, Германия) и инкубировали 24 ± 2 ч при температуре 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5 ± 1 % CO_2 до образования 80 ± 10 % монослоя. В полученную культуру вносили агенты для хромовитрэктомии и соответствующие контроли в объеме 50 мкл/лунку. На каждый препарат — 4 лунки.

Тестовый планшет подвергали облучению осветителем Photon II (Synergetics, США), рабочее расстояние 5 мм. Контрольный планшет с внесенными препаратами облучению не подвергали. После облучения исследуемые препараты и контроли удаляли из лунок, клетки промывали стерильным раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ, pH = 7,4), лунки заполняли полной ростовой средой и инкубировали 24 ± 2 ч при температуре 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5 ± 1 % CO_2. Через 24 ± 2 ч инкубации оценивали морфологию и лизис клеток, а также количество пролиферирующих относительно отрицательного контроля фибробластов с помощью витального красителя PrestoBlue® Cell Viability Reagent (Invitrogen™, США) (табл. 2). Отрицательным контролем служила полная ростовая среда для культивирования фибробластов мыши линии NIH/3T3.

Предоставленные на исследование образцы были промаркированы в соответствии с таблицей 1.

Все процедуры проводили в асептических условиях.

1. Перед экспериментом фибробласты мыши линии NIH/3T3 культивировали в стандартных культуральных флаконах из полистирола площадью 25 см^2 или 75 см^2 (CELLSTAR®GreinerBio-One, Германия) в полной ростовой среде (ПРС), состоящей из культуральной среды DMEM («ПанЭко», Россия), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone, SV30160.03, США), антибиотика и антимикотика Anti-Anti (Gibco® by Life Technologies™, СК), 1 мМ HEPES (Gibco® by Life Technologies™, СК) и 2 мМ глютамина («ПанЭко», Россия) в CO_2-инкубаторе при стандартных условиях: 37 °C, во влажной атмосфере, содержащей 5 ± 1 % CO_2.

2. Перед экспериментом клетки удаляли с поверхности культурального пластика с помощью диссоциирую-

Таблица 1. Распределение маркировки агентов для хромовитрэктомии

Table 1. The distribution of agents for chromo-vitrectomy labeling

Наименование образца Nome of specimen	Маркировка Labeling	Количество представленных на испытания образцов Number of presented specimens
Суспензия «Витреоконтраст» Vitreocontrast Suspension	№ 1	1 флакон, содержащий примерно 5 мл суспензии 1 bottle with about 5 ml suspension
Кеналог® 40 (Триамцинолона ацетонид), суспензия для инъекций 40 мг/мл в/м, внутрисуставно, (KRKA, Словения) Kenalog® 40 Triamcinolon acetonid), suspension for injections 40 mg/ml i/m, intra-joint, (KRKA, Slovenia)	№ 2	2 ампулы × 1 мл 2 ampoules × 1 ml
MembraneBlue® Dual, раствор окрашивающий для офтальмологической хирургии (DORC, Нидерланды) MembraneBlue® Dual, staining solution for ophthalmic surgery (DORC, Netherlands)	№ 3	3 шприца × 0,5 мл 3 syringes × 0,5 ml

Таблица 2. Степень ответной реакции клеток

Table 2. The degree of cell response

Степень реакции Degree of reaction	Реакция Reaction	Наблюдения Observations	
0	Отсутствует Absent	Единичные интрацитоплазматические гранулы / Single intracytoplasmatic granules Пролиферирующих клеток более 90 % / Proliferated cells more than 90%	Нет лизиса No lysis
1	Незначительная Insignificant	Не больше 20 % клеток круглые, слабо прикрепленные, без интрацитоплазматических гранул Round cells not more that 20 %, weak fixed, without intracytoplasmatic granules Пролиферирующих клеток более 80 %, но меньше 90 % / Proliferated cells more than 80 %, but less than 90 %	Лизис не больше 20 % Lysis not more than 20 %
2	Нерезкая Not clear	Не больше 50 % клеток круглые, не имеющие интрацитоплазматических гранул Round cells not more that 50 %, having no intracytoplasmatic granules Пролиферирующих клеток более 50 %, но меньше 80 % / Proliferated cells more than 50 % but less than 80 %	Лизис не больше 50 % Lysis not more than 50 %
3	Умеренная Moderate	Не больше 70 % монослоя содержат круглые клетки / Not more than 70 % of monolayer has round cellls Пролиферирующих клеток более 30 %, но меньше 50 % / Proliferated cells more than 30 % but less than 50 %	Лизис не больше 70 % Lysis not more than 70 %
4	Резкая Clear	Практически полностью разрушенный монослой / Practically complete destruction of monolayer Пролиферирующих клеток менее 30 % / Proliferated cells less than 30%	Лизис больше 70 % Lysis more than 70 %

щего реагента TrypLE™ Express Enzyme (Gibco® by Life Technologies™, СК), после этого ресуспендировали в ПРС.

3. Готовили суспензию клеток в ПРС с необходимой концентрацией (1–2)×10^5 кл/мл. Исходное количество фибробластов мыши NIH/3T3 в суспензии определяли с использованием автоматического счетчика клеток (TC20™ Automated Cell Counter, BIO RAD, Сингапур) с одновременным определением жизнеспособности по исключению красителя трипанового синего (BIO RAD, Сингапур).

4. Клетки высевали в культуральные 96-луночные плоскодонные планшеты, добавляя по 50 мкл суспензии необходимой концентрации в каждую лунку.

5. Планшеты инкубировали 24 ± 2 ч при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5 ± 1 % CO_2, до образования клетками 80 ± 10 % монослоя.

6. Уровень конфлюэнтности монослоя оценивали с помощью бинокулярного инвертированного флюоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TS100 (Япония).

Контакт с образцами

1. Через 24 ± 2 ч в лунки вносили образцы и соответствующие контроли в объеме 50 мкл/лунку.

2. Тестовый планшет с внесенными образцами без крышки подвергали облучению осветителем Photon II (Synergetics, США), рабочее расстояние 5 мм. Контрольный планшет с внесенными препаратами облучению не подвергали.

3. После облучения исследуемые препараты и контроли удаляли из лунок тестового и контрольного планшетов, клетки промывали стерильным раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ, pH = 7,4, «ПанЭко», Россия), лунки заполняли ПРС и инкубировали 24 ± 2 ч при температуре 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5 ± 1 % CO_2.

Метод витальной окраски. Критерии оценки цитотоксичности экстрактов

1. Через 24 ± 2 ч инкубации в лунки тестового и контрольного планшета добавляли по 10 мкл витального реагента PrestoBlue® Cell Viability Reagent (Invitrogen™, США).

2. Планшеты инкубировали с PrestoBlue® в течение 3 ч при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5 ± 1 % CO_2. PrestoBlue® — витальный краситель, в состав которого входит индикатор окислительно-восстановительных процессов. Пролиферирующие клетки восстанавливают PrestoBlue®, вследствие этого происходит изменение его цвета с индиго на розовый.

3. Изменение поглощения среды регистрировали с использованием ридера для микропланшета Spark 10M (Tecan, Австрия) с программным обеспечением SparkControl™ Magellan V1.2.20 на длинах волн 570 и 600 нм. Процент восстановленного PrestoBlue® характеризует метаболическую активность клеток. Относительная разница в процентах между метаболической активностью клеток в отрицательном контроле и после воздействия образца характеризует цитотоксичность исследуемого образца и вычисляется по формуле (1):

$$\frac{117{,}216 \times A_{570\ \text{Обр.}} - 80{,}586 \times A_{600\ \text{Обр.}}}{117{,}216 \times A^0_{570} - 80{,}586 \times A^0_{600}} \times 100\ \%,$$

где 117,216 и 80,586 — значения молярных коэффициентов экстинкции для окисленной формы витального реагента PrestoBlue® на длинах волн 600 и 570 нм соответственно;

$A_{570\ \text{Обр.}}$ и $A_{600\ \text{Обр.}}$ — поглощение ростовой среды после контакта с исследуемыми образцами на длинах волн 570 и 600 нм соответственно;

A^0_{570} и A^0_{570} — поглощение отрицательного контроля на длинах волн 570 и 600 нм соответственно.

4. Количественную и статистическую обработку полученных данных проводили с помощью приложения Microsoft Excel 2007. Все результаты представлены в виде среднего значения ± среднеквадратичное отклонение.

5. Полученные результаты цитотоксической реакции культуры фибробластов мыши линии NIH/3T3 интерпретировали с использованием таблицы «Степень ответной реакции клеток» (табл. 2).

6. Фотографирование культуры фибробластов мыши линии NIH/3T3 осуществляли с помощью цветной цифровой камеры Nikon DS-Vi1 (Япония) при увеличении ×200.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рисунке представлены фотографии культуры фибробластов мыши линии NIH/3T3, отмытые от образцов и культивированные в течение 24 ч после проведения облучения и без облучения. Отрицательный контроль в ПРС представлен плотным монослоем фибробластов. На рисунке видно, что представленные препараты в виде суспензии (образец 1) плохо отмывались, поскольку частицы суспензии адгезировали на поверхности клеток, но не приводили к их видимому морфологическому повреждению. Более интенсивная отмывка способствовала удалению вместе с образцом самого клеточного монослоя. Адгезированные частицы суспензии затрудняют визуализацию клеток после контакта с образцом 1. Из рисунка следует, что образец 2 как после облучения, так и без облучения оказывает цитотоксическое действие на культуру фибробластов мыши NIH/3T3, что выражается в изменении морфологии клеток и нарушении клеточного монослоя. Клетки после контакта с образцом 3 после и без облучения так же, как и отрицательный контроль, представлены плотным монослоем фибробластов.

Количественный анализ результатов проводился согласно оценочной шкале степени ответной реакции клеток согласно ГОСТ ISO 10993-5-2011 (табл. 2). Отрицательный контроль должен соответствовать степени реакции 0. Степень ответной реакции исследуемого образца не должна превышать 2.

В таблице 3 представлены значения, характеризующие пролиферативную активность фибробластов мыши линии NIH/3T3 относительно отрицательного контроля

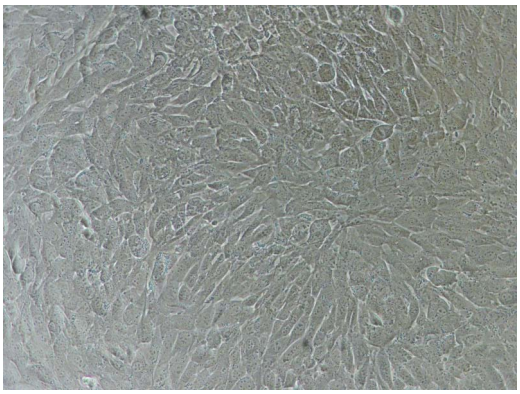
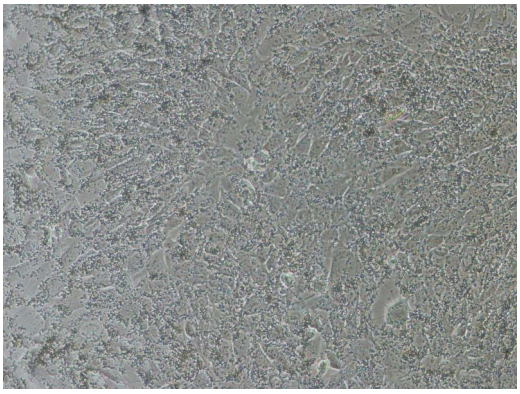
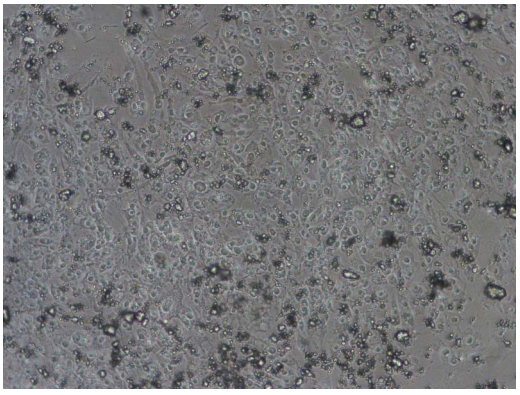
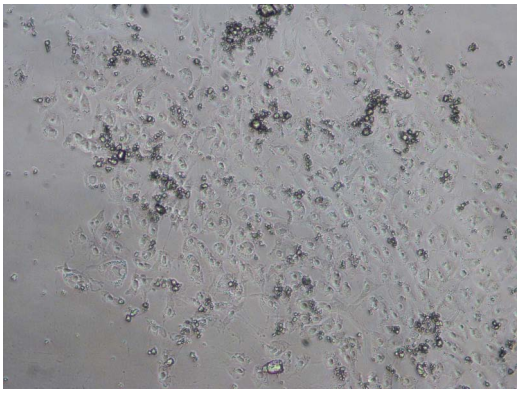
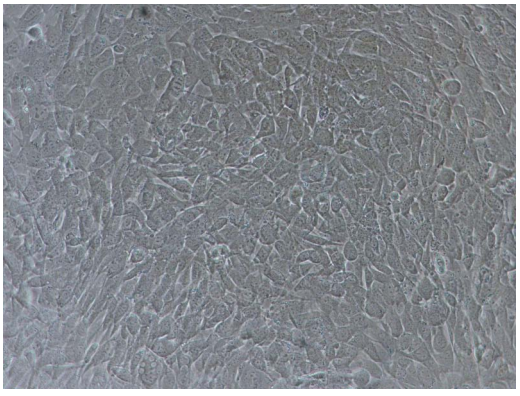
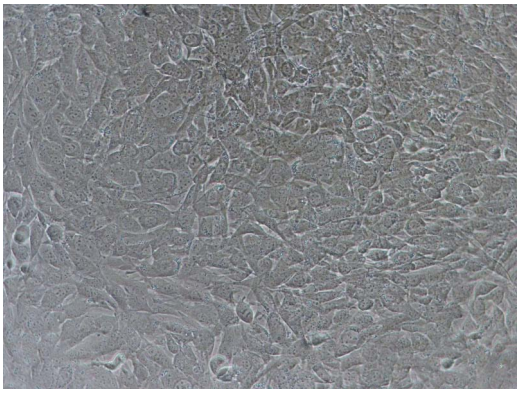
Образец / Sample	Тест / Test	Контроль (без облучения) / Control (no exposure)
К (ПРС)		
Образец 1 («Витреоконтраст») Sample 1 (Vitreocontrast)		
Образец 2 (Кеналог®) Sample 2 (Kenalog®)		
Образец 3 Sample 3 (MembraneBlue®)		

Рис. Фибробласты мыши линии NIH/3T3 через 24 ч после контакта с образцами агентов для хромовитрэктомии. Фазовый контраст. Увеличение ×200

Fig. Mouse fibroblasts line NIH / 3T3 24 hours after contact samples of chromovitrectomy agents. Phase contrast. Magnification ×200

Таблица 3. Процент пролиферирующих фибробластов мыши линии NIH/3T3 относительно отрицательного контроля

Table 3. The percentage of proliferating fibroblasts of NIH / 3T3 mouse line in relation to the negative control

№ п/п No.	Наименование образца Name of specimen	% пролиферирующих клеток относительно отрицательного контроля ± стандартное отклонение % of proliferative cells relatively negative control ± standard deviation	Степень ответной реакции клеток Degree of respond reaction of cells
1	Образец 1 тест А Specimen 1 test A	75,81 ± 2,35	2
2	Образец 2 тест Specimen 2 test	39,70 ± 2,52	3
3	Образец 3 тест Specimen 3 test	90,16 ± 1,68	0
4	Образец 1 контроль (без облучения) Specimen 1 control (without radiation)	91,40 ± 2,50	0
5	Образец 2 контроль (без облучения) Specimen 2 control (without radiation)	43,25 ± 1,59	3
6	Образец 3 контроль (без облучения) Specimen 3 control (without radiation)	91,39 ± 3,38	0

(ПРС). После контакта с образцом 3 как после облучения, так и без облучения пролиферативная активность фибробластов относительно отрицательного контроля оставалась выше 90 %, что соответствует степени реакции 0 и отсутствию цитотоксического действия образца 3. Цитотоксическое действие образца 2 на культуру фибробластов после облучения и без облучения было оценено как умеренное, соответствующее степени реакции 3. Образец 1 без облучения также не показал цитотоксичность (количество пролиферирующих клеток выше 90 %), но после облучения количество пролиферирующих клеток относительно отрицательного контроля снизилось до 75,81 ± 2,35 %, что соответствует степени 2 — нерезкая цитотоксичность. Данное значение цитотоксичности является допустимым и удовлетворяет требованиям ГОСТ ISO 10993-5-2011.

Таким образом, проведенные исследования показали, что облучение не влияет на цитотоксическое действие суспензии Кеналог® 40 и красителя MembraneBlue® Dual. Суспензия ТА как после облучения, так и без облучения оказывает умеренное цитотоксическое действие, а MembraneBlue® Dual не оказывает цитотоксического действия на культуру фибробластов мыши линии NIH/3T3. Без облучения образец 1 не проявлял цитотоксическое действие на культуру фибробластов мыши линии NIH/3T3. Облучение повышает цитотоксичность образца 1 (суспензия «Витреоконтраст») до уровня «нерезкая цитотоксичность», допустимого ГОСТ ISO 10993-5-2011.

Следует отметить, что частицы суспензии «Витреоконтраст» обладают выраженной адгезией к структурам витреоретинального интерфейса, превосходящей таковую суспензии ТА, что доказано авторами экспериментально. Это является интраоперационным преимуществом суспензии «Витреоконтраст», что позволяет контрастировать структуры, не визуализируемые другими агентами. В эксперименте *in vitro*, ограниченном протоколом по времени, высокая адгезия суспензии «Витреоконтраст» затрудняет оценку морфологии клеток и требует отмывания образца с возможным механическим повреждением клеток. При отсутствии ограничения по времени, при естественном растворении красителя, в условиях более длительного эксперимента будет возможна более полная оценка морфологии клеток. Тем не менее даже в условиях кратковременного эксперимента суспензия «Витреоконтраст» имеет преимущество перед суспензией ТА, что позволяет рекомендовать ее для контрастирования как волокон СТ, так и ВПМ и ЭРМ наряду с красителем MembraneBlue® Dual.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное экспериментальное сравнительное исследование цито- и фототоксичности различных агентов для хромовитэктомии в условиях *in vitro* продемонстрировало, что ТА как после облучения, так и без облучения оказывает цитотоксическое действие на культуру фибробластов мыши NIH/3T3. Водорастворимый краситель MembraneBlue® Dual не оказывает цито- и фототоксического действия на культуру фибробластов мыши линии NIH/3T3. Суспензия на основе сульфата бария «Витреоконтраст» не оказывает цитотоксического действия без облучения, но высокая степень адгезии затрудняет оценку цитофототоксического действия, при этом при облучении определяется нерезкая цитотоксичность, допустимая ГОСТ ISO 10993-5-2011.

УЧАСТИЕ АВТОРОВ:

Кислицына Н.М. — разработка концепции и дизайна исследования, анализ полученных данных, научное редактирование статьи;
Перова Н.В. — разработка дизайна исследования, организация проведения исследования;
Колесник С.В. — научное редактирование статьи;
Новиков С.В. — разработка концепции и дизайна исследования, организация проведения исследования, разработка материалов исследования;
Колесник А.И. — научное редактирование статьи;
Веселкова М.П. — анализ и сбор литературы, статистическая обработка данных, подготовка текста статьи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Chow D.R. Tips on improving your use of endoillumination. *Retin Physician.* 2011;8(4):43–46.
2. Rodrigues E.B., Meyer C.H., Mennel S., Farah M.E. Mechanisms of intravitreal toxicity of indocyanine green dye: implications for chromovitrectomy. *Retina.* 2007;27(7):958–970. DOI: 10.1097/01.iae.0000253051.01194.ab
3. Albini T., Abd-El-Barr M., Carvounis P.E., Iyer M.N., Lakhanpal R.R., Pennesi M.E., Chevez-Barrios P., Wu S.M., Holz E.R. Long-term Retinal Toxicity of Intravitreal Commercially Available Preserved Triamcinolone Acetonide (Kenalog) in Rabbit Eyes. Invest. *Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007;48:390–395. DOI: 10.1167/iovs.06-0145
4. Островский М.А. Молекулярные механизмы повреждающего действия света на структуры глаза и системы защиты от такого повреждения. *Успехи биологической химии.* 2005;45:173–204. [Ostrovsky M.A. Molecular mechanisms of the damaging effect of light on the structure of the eye and the system of protection against such damage. Advances in biological chemistry = *Uspehi biologicheskoy himii.* 2005;45:173–204 (In Russ.)].
5. Algvere P.V., Marshall J., Seregard S. Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard. *Acta Ophthalmol Scand.* 2006;84(1):4–15. DOI: 10.1111/j.1600-0420.2005.00627.x
6. Ham W.T., Ruffolo J.J., Mueller H.A., et al. The nature of retinal radiation damage: dependence on wavelength, power level and exposure time. *Vision Res.* 1980;20:1105–1111.
7. Haritoglou C., Gandorfer A., Gass C.A. Indocyanine green-assisted peeling of the internal limiting membrane in macular hole surgery affects visual outcome: A clinicopathologic correlation. *Am. J. Ophthalmol.* 2002;134:836–841.
8. Mackenzie S.E., Gandorfer A., Rohleder M. Ultrastructure and retinal imaging of epiretinal membrane: a clinicopathologic correlation of Trypan Blue staining in epiretinal membrane surgery. *Retina.* 2010;30(4):640–647. DOI: 10.1097/IAE.0b013e3181bceda9
9. Rodrigues E.B., Meyer C.H., Maia M. Historical aspects and evolution of the application of vital dyes invitreoretinal surgery and chromovitrectomy. *Dev. Ophthalmol.* 2008;42:29–34. DOI: 10.1159/000138911
10. Balayre S., Boissonnot M., Curutchet L., Dighiero P. Role of trypan blue in epiretinal membrane surgery. *J. Fr. Ophtalmol.* 2005;28:290–297.
11. Joondeph B. Use of membrane blue in ILM and ERM peeling. *Retinal Physician.* 2009;6(7):54–56.
12. Lee K.L., Dean S., Guest S. A comparison of outcomes after indocyanine green and trypan blue assisted internal limiting membrane peeling during macular hole surgery. *Br. J. Ophthalmol.* 2005;89(4):420–422. DOI: 10.1136/bjo.2004.049684
13. Rodrigues E.B., Meyer C.H., Schmidt J.C., Kroll P. Trypan blue stains the epiretinal membrane but not the internal limiting membrane. *Br J Ophthalmol.* 2003;87(11):1431–1432.
14. Mohr A., Bruinsma M., Oellerich S. International Chromovitrectomy Collaboration. Dyes for eyes: hydrodynamics, biocompatibility and efficacy of 'heavy' (dual) dyes for chromovitrectomy. *Ophthalmologica.* 2013;230(suppl 2):51–58. DOI: 10.1159/000353870
15. Bakri S.J., Beer P.M. The effect of intravitreal triamcinolone acetonide on intraocular pressure. *Ophthalmic Surg. Lasers Imag.* 2003;34:386–390.
16. Sutter F.K., Gillies M.C. Pseudo-endophthalmitis after intravitreal injection of triamcinolone. *Br. J. Ophthalmol.* 2003;87:972–974.
17. Koto T., Inoue M., Shinoda K., Ishida S., Tsubota K. Residual crystals of triamcinolone acetonide in macular hole may prevent complete closure. *Acta Ophthalmologica Scandinavica.* 2008;85(8):913–914.
18. Miolo G., Ricci A., Caffieri S., Levorato L., Fasani E., Albini A. Invitro phototoxic properties of triamcinolone 16,17-acetonide and its mainphotoproducts. Photochem Photobiol. 2003;78:425–430.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ФГАУ «МНТК "Микрохирургия глаза" имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Кислицына Наталья Михайловна
кандидат медицинских наук, офтальмохирург отдела витреоретинальной хирургии и диабета глаза
Бескудниковский бульвар, 59а, Москва, 127486, Российская Федерация

ООО «Научно-экспериментальное производство "Микрохирургия глаза"» (ООО «НЭП МГ»)
Новиков Сергей Викторович
заместитель генерального директора по производству
Бескудниковский бульвар, 59а, Москва, 127486, Российская Федерация

ФГАУ «МНТК "Микрохирургия глаза" имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Колесник Светлана Валерьевна
кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела витреоретинальной хирургии и диабета глаза
Бескудниковский бульвар, 59а, Москва, 127486, Российская Федерация

ФГАУ «МНТК "Микрохирургия глаза" имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Колесник Антон Игоревич
кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела витреоретинальной хирургии и диабета глаза
Бескудниковский бульвар, 59а, Москва, 127486, Российская Федерация

ФГАУ «МНТК "Микрохирургия глаза" имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Веселкова Мария Павловна
аспирант отдела витреоретинальной хирургии и диабета глаза
Бескудниковский бульвар, 59а, Москва, 127486, Российская Федерация

Автономная некоммерческая организация «Институт медико-биологических исследований и технологий» (АНО «ИМБИИТ»)
Перова Надежда Викторовна
доктор биологических наук
заместитель директора по научно-практической работе.
Б. Тишинский пер., 43/20, стр. 2. Москва, 123557, Российская Федерация

ABOUT THE AUTHORS

The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution
Kislitsyna Natalia M.
PhD, vitreoretinal surgion and diabetes of the eye department
Beskudnikovsky blvd, 59a, Moscow 127486, Russian Federation

Scientific-Production Experimental Eye Microsurgery
(Ltd "NEP MG")
Novikov Sergey V.
Deputy general director
Beskudnikovsky blvd, 59a, Moscow, 127486, Russian Federation

The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution
Kolesnik Svetlana V.
PhD, researcher, vitreoretinal surgery and diabetes of the eye department
Beskudnikovsky blvd, 59a, Moscow, 127486, Russian Federation

The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution
Kolesnik Anton I.
PhD, researcher, vitreoretinal surgeon and diabetes of the eye department
Beskudnikovsky blvd, 59a, Moscow, 127486, Russian Federation

The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution
Veselkova Maria P.
postgraduate, vitreoretinal surgeon and diabetes of the eye department resident
Beskudnikovsky blvd, 59a, Moscow, 127486, Russian Federation

Autonomous non-profit organization "Institute of Biomedical Research and Technology" (ANO "IMBIIT").
Perova Nadezhda V.
Doctor of Biological Sciences, deputy director for scientific and practical work
B. Tishinsky lane, 43/20, building 2. Moscow, 123557, Russian Federation