

Оценка цитотоксичности слезозаместительных препаратов с использованием системы *in vitro*

О.И. Александрова¹И.Н. Околов²Ю.И. Хорольская¹И.Е. Панова²М.И. Блинова¹

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

²Санкт-Петербургский филиал ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова МЗ РФ
ул. Я.Гашека, 21, Санкт-Петербург, 192283, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Офтальмология. 2017;14(1):59-66

Цель: Анализ цитотоксического действия слезозаместительных глазных капель с различными консервантами и без них на эпителиальные клетки конъюнктивы и роговицы в условиях *in vitro*. **Материалы и методы.** Объектом исследования явились семь слезозаместительных препаратов: *Хилабак*[®], *Теалоз*[®], *Систейн Ультра*[®], *Натионорм*[®], *Офтолин*[®], *Артепан*[®] *Баланс*, *Оптив*[®]. В качестве тест-систем были использованы трансформированные клетки нормальных тканей глаза: постоянные трансформированные клеточные линии конъюнктивы (*Chang Conjunctiva*, *Clone 1-5c-4*) и роговицы (НСЕС) человека. Цитотоксичность «искусственных слез» оценивали по жизнеспособности клеток, культивируемых в питательных средах, содержащих в своём составе исследуемые препараты в концентрации 1, 5 и 10%. О жизнеспособности клеток судили по их морфологии и метаболической активности. **Результаты.** Наибольшую чувствительность к действию исследуемых слезозаместителей показала тест-система на основе клеток роговицы человека. Четыре из семи исследуемых препаратов (*Артепан*[®] *Баланс*, *Оптив*[®], *Натионорм*[®], *Офтолин*[®]) в концентрации 10% от объема питательной среды проявили высокую степень токсичности в отношении клеток роговицы. Глазные капли *Систейн Ультра*[®] оказали умеренное токсическое действие на клетки роговицы и конъюнктивы в концентрации 5 и 10% от объема питательной среды. Слезозаместители *Хилабак*[®] и *Теалоз*[®] в этой концентрации не оказали цитотоксического действия на клетки ни одной тест-системы и показали наилучшие результаты при исследовании. Независимо от концентрации, наиболее токсичными для всех типов клеток оказались препараты *Офтолин*[®] и *Артепан*[®] *Баланс*. **Заключение.** Установлена прямая зависимость между концентрацией исследуемых препаратов в питательной среде и их цитотоксичностью. Глазные капли *Хилабак*[®] и *Теалоз*[®], не содержащие в своем составе консервант, не оказывали цитотоксического действия на клетки обеих тест-систем при всех используемых концентрациях. Наименьшим токсическим эффектом из тестируемых слезозаместителей с «мягким» консервантом обладали глазные капли *Систейн Ультра*[®], содержащие *Полинвад*[®]. Среди «искусственных слез» наибольшее токсическое действие на все типы клеток при всех используемых концентрациях было отмечено у глазных капель *Офтолин* (БАК 0,01%) и *Артепан*[®] *Баланс* (Оксид). Проведённые исследования показали принципиальную возможность использования систем *in vitro* для сравнительной оценки цитотоксического действия слезозаместителей.

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

Для цитирования: 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):59-66. DOI: 10.18008/1816-5095-2017-1-59-66

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ №14-5000068

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

Конфликт интересов отсутствует

Cytotoxicity Evaluation of Tear Substitutes Using *in vitro* System

O.I. Aleksandrova¹, I.N. Okolov², Yu.I. Khorolskaya¹, I.E. Panova², M.I. Blinova¹

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

²Sv. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution
21Y. Gasheka st., Saint-Petersburg, 192283, Russia

ABSTRACT

Ophthalmology in Russia. 2017;14(1):59–66

Objective. The objective of the study is to evaluate *in vitro* the cytotoxic effect of different moisture eye drops (containing or without preservatives) on the epithelial cells of the conjunctiva and the cornea. **Materials and methods.** The objects of the study are moisture eye drops: Hylabak®, Thealoz®, Sistane Ultra®, Hationorm®, Oftolik®, Artelak® Balance, Optiv®. As test systems there were used the transformed cells of normal eye tissues: constant conjunctiva transformed cell lines (Chang Conjunctiva, Clone 1-5c-4) and the human cornea (HCEC). The cytotoxicity of the "artificial tears" was assessed by the viability of cells, cultured in substratum containing the solutions of the objects at concentrations 1, 5 and 10%. Cell viability was assessed by their morphology and metabolic activity. **Results.** The most sensitive to the investigated eye drops is considered to be the test system based on human corneal cells. Four of the seven investigated eye drops (Artelak® Balance, Optiv®, Hationorm®, Oftolik®) at a concentration of 10% (by volume) of the substratum showed a high degree of toxicity for cornea cells. Eyedrops Sistane Ultra® had moderate toxic effect on the cells of the cornea and conjunctiva at concentration 5 and 10% (by volume). Hylabak® and Thealoz® in this concentrations did not have any cytotoxic effect on the cells of all test system and showed the best results in the research. The most toxic of all cell types were eye drops Oftolik® and Artelak® balance. **Conclusion.** A direct relationship between the concentration of drug in culture medium and cell cytotoxicity was investigated. Eye drops Hylabak® and Thealoz®, that do not contain in its composition a preservative, had no cytotoxic effect on the cells of both test systems at all concentrations used. The lowest toxic effect of the test had eye drop Sistane Ultra® containing "soft" preservative Poliquad®. Among the "artificial tears", the greatest toxic effect on all cell types at all concentrations used, was observed in eye drops Oftolik (BAK 0.01%) and balance Artelak® (containing "soft" preservative Oxide). Studies have shown the possibility of using *in vitro* cell systems for the comparative evaluation of the cytotoxic effect of moisture eye drops.

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

For Citation: Aleksandrova O.I., Okolov I.N., Khorolskaya Yu.I., Panova I.E., Blinova M.I. Cytotoxicity Evaluation of Tear Substitutes Using *in vitro* System. *Ophthalmology in Russia*. 2017;14(1):59–66. DOI: 10.18008/1816-5095-2017-1-59-66

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

Синдром сухого глаза (ССГ) является актуальной проблемой, так как данная патология в настоящее время достаточно широко распространена среди взрослых и детей. По данным ряда исследователей ССГ в последние годы наблюдается у 4–8% подростков, 12–22% лиц старше 40 лет, 30–34% — старше 65 лет [1,2]. Только в США от ССГ страдают более 10 миллионов человек [3]. Ключевым звеном в патогенезе ССГ является нарушение стабильности прероговичной слезной пленки (ПСП), повышение ее испаряемости, что, в свою очередь, приводит к изменению осмолярности, развитию воспалительных процессов в клетках эпителия конъюнктивы и роговицы, и, соответственно, к его дегенерации и возникновению так называемого роговично-конъюнктивального ксероза, сопровождающегося необратимыми морфологическими изменениями [4]. Терапия ССГ должна основываться на патогенезе заболевания, включая противовоспалительную (в том числе, иммуносупрессивную), слезозаместительную, метаболическую терапию, коррекцию осмолярности слезной пленки, а также другие лечебные мероприятия, в том числе, хирургические. Применение препаратов «искусственной слезы» в лечении ССГ занимает существенное место в качестве средства, восполняющего дефицит влаги в конъюнктивальной полости, повышающего стабильность ПСП и снижающего осмолярность слезной

жидкости, препятствуя дегидратации эпителия глазной поверхности. Слезозаместительные препараты используют независимо от степени тяжести ССГ. Состав «искусственных слез» включает, как правило, три компонента: лубриканты, наполнители (буферы) и консерванты. Концентрация последних в составе глазных капель является относительно низкой, однако кумулятивная доза за весь период использования, особенно при частом и длительном их 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», например, консервантами или стабилизирующими агентами, некоторые из которых, как известно, обладают цитотоксическим действием [5,6,7]. Токсическое действие бензалкония хлорида (БАК) на ПСП, как наиболее часто используемого консерванта, было описано еще несколько десятилетий назад [8]. В настоящее время нет сомнений в том, что консерванты играют немаловажную роль в большинстве побочных эффектов, оказывая влияние на глазную поверхность. По-видимому, с этим связан интерес отдельных фармацевтических компаний к научным разработкам и производству слезозаместителей без добавления потенциально цитотоксических компонентов или поиску более «мягких» консервантов.

О.И. Александрова, И.Н. Околов, Ю.И. Хорольская, И.Е. Панова, М.И. Блинова

Контактная информация: Околов Игорь Николаевич oko99@mail.ru

Следует отметить, что ни один фармакологически эффективный препарат не может быть абсолютно лишён риска, и не все риски удаётся распознать до выхода препарата на рынок. В исследованиях токсичности новых и уже существующих лекарственных препаратов в последнее время все чаще находят применение тест-системы *in vitro*. Наиболее простыми и доступными среди них являются модели с использованием монослойных клеточных культур. [9,10,11,12]. Под воздействием физиологически активных веществ клетки могут претерпевать изменения в морфологии, скорости клеточного роста, времени гибели, степени дезинтеграции, поэтому для каждого вещества, являющегося потенциальным фармакологическим агентом, целесообразно выполнять оценку влияния на выживаемость клеток. [13]. Целью настоящей работы явился анализ цитотоксического действия слезозаместительных глазных капель с различными консервантами и без них в отношении эпителиальных клеток конъюнктивы и роговицы в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явились семь препаратов слезозаместительной терапии (ПСТ), содержащие различные консерванты в составе глазных капель и слезозаместители без консервантов: *Хилабак*[®] (система АБАК), *Теалоз*[®] (система АБАК), *Систейн Ультра*[®] (*Поликвад*[®]), *Катионорм*[®] (Цеталкония хлорид), *Офтолик*[®] (Бензалкония хлорид), *Артелак*[®] *Баланс* (Оксид), *Оптив*[®] (Пурит). Тестирование глазных капель «искусственных слез» проводили в условиях *in vitro* в процессе культивирования клеток по принципу «слепого метода» без указания названия, состава и производителя.

Расчет концентрации препаратов для эксперимента. Выбор концентрации слезозаместителей для эксперимента базировался на данных клинического использования исследуемых препаратов и собственных предыдущих исследований цитотоксичности офтальмологических препаратов на клеточных культурах [14,15,16]. Концентрация тестируемых препаратов составила 1, 5 и 10% от объема питательной среды.

Используемые клеточные культуры. В качестве тест-систем были использованы трансформированные клетки нормальных тканей глаза: постоянные трансформированные клеточные линии конъюнктивы (*Chang Conjunctiva*, *Clone 1-5c-4*) и роговицы (*HCEC*) человека. Применение коллекционных паспортизированных линий клеток с известными свойствами обеспечивает воспроизводимость результатов опытов по изучению характера биологической активности тестируемых соединений непосредственно на клеточном уровне, позволяет оценивать состояние клеток-мишеней прижизненно, а не «*post factum*» [17]. Клетки линии *Chang Conjunctiva*, *Clone 1-5c-4* были получены из коллекции НИИ вирусологии РАМН (Москва). Клетки культивировали в питательной среде Игла MEM («Биолот», Россия), содержащей 2 ммоль/л глутамина (*GlutaMax*, США), 10% FBS («HyClone», США) и 1% рас-

твор антибиотиков *PenStrep* (*Gibco*, США). Клетки линии *HCEC* были получены из коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в питательной среде *Keratinocyte-SFM* (*Gibco*, США), содержащей 2 ммоль/л глутамина (*GlutaMax*, США), 15% FBS («HyClone», США) и 1% раствор антибиотиков *PenStrep* (*Gibco*, США). Все типы клеток культивировали при 37°С в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂.

Оценка цитотоксичности. Цитотоксичность «искусственных слез» оценивали по жизнеспособности клеток, культивируемых в питательных средах, содержащих в своём составе исследуемые препараты. О жизнеспособности клеток судили по их метаболической активности, используя метод МТТ [18], широко известный как скрининговый метод измерения выживаемости клеток и включенный в большинство протоколов методов молекулярной биологии и медицины [19,20].

МТТ-тест. Для анализа цитотоксического действия слезозаместителей в отношении эпителиальных клеток конъюнктивы и роговицы человека с помощью МТТ-теста клетки линий *Chang Conjunctiva*, *Clone 1-5c-4* и *HCEC* высевали в 96-луночные планшеты в 200 мкл соответствующей питательной среды с добавлением 10% FBS. Исследуемые препараты добавляли в питательную среду в момент посева клеток. Культивирование проводили при 37°С в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂. Срок культивирования — 2 суток. Контролем служили клетки, культивируемые в стандартных условиях. По истечении срока культивирования проводили смену питательной среды на среду с МТТ (0,5 мг/мл) по 200 мкл на лунку. Планшет помещали в CO₂-инкубатор на 4 часа, после чего среду с МТТ отбирали, в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора ДМСО и экстрагировали образовавшийся формазан в течение 20 мин. при постоянном шейкировании. Оптическую плотность полученного раствора формазана в ДМСО измеряли с помощью анализатора *Fluorofot «Charity»* (Россия) при длине волны 570 нм и референтной длине волны 630 нм. С каждым типом клеток было выполнено несколько серий экспериментов с различной концентрацией тестируемых ПСТ: в 1, 5 и 10% от объема питательной среды.

Статистический анализ. Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы *MS Excel*. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. За 100% жизнеспособность принимали интенсивность окраски в лунках с клетками, культивировавшимися без слезозаместительных препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты всех серий экспериментов с различной концентрацией тестируемых препаратов, полученные при помощи МТТ-теста, приведены на рис. 1. Количество жизнеспособных клеток, культивируемых в питательных средах с добавлением глазных капель, выражено в процентах по отношению к контролю.

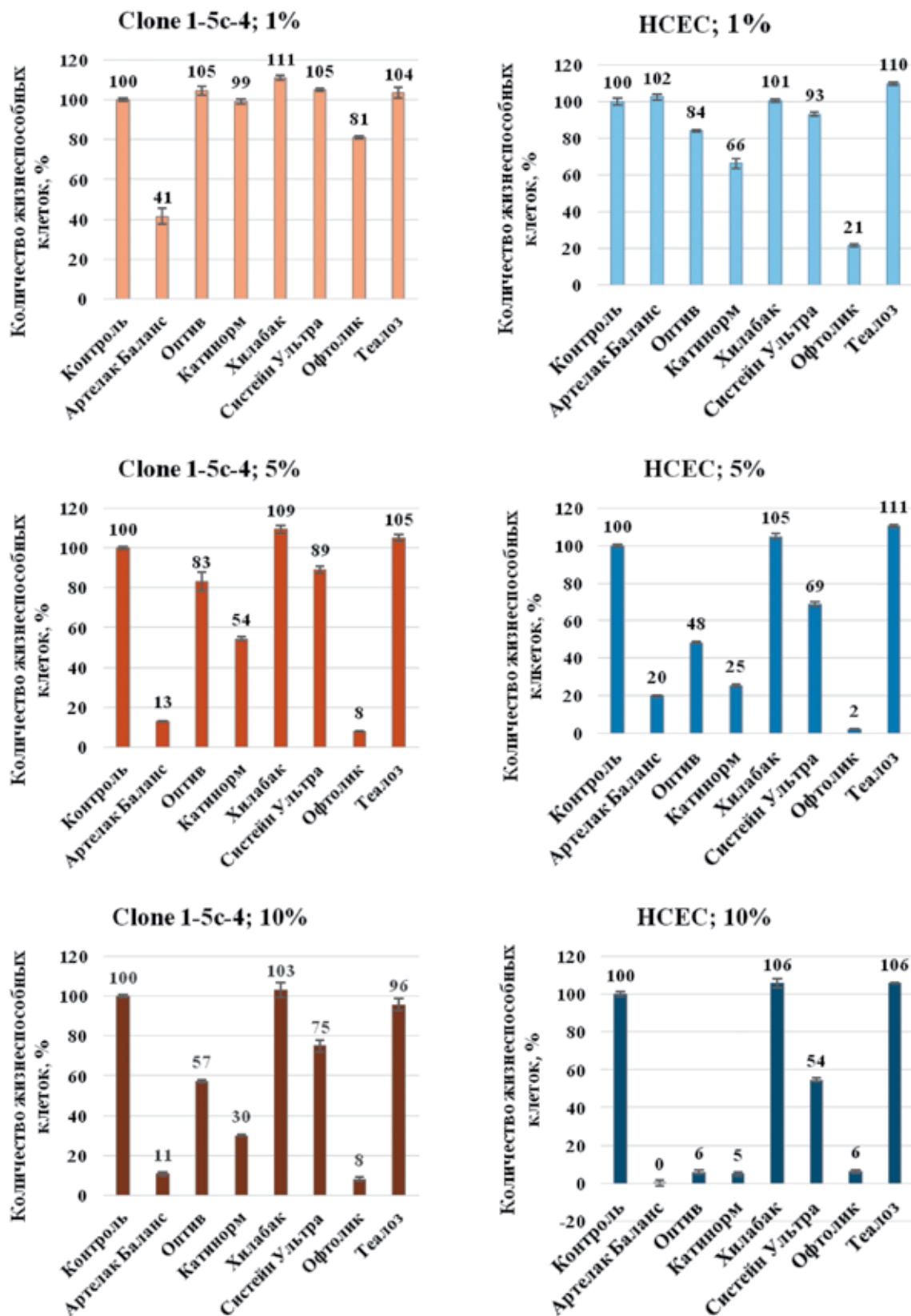


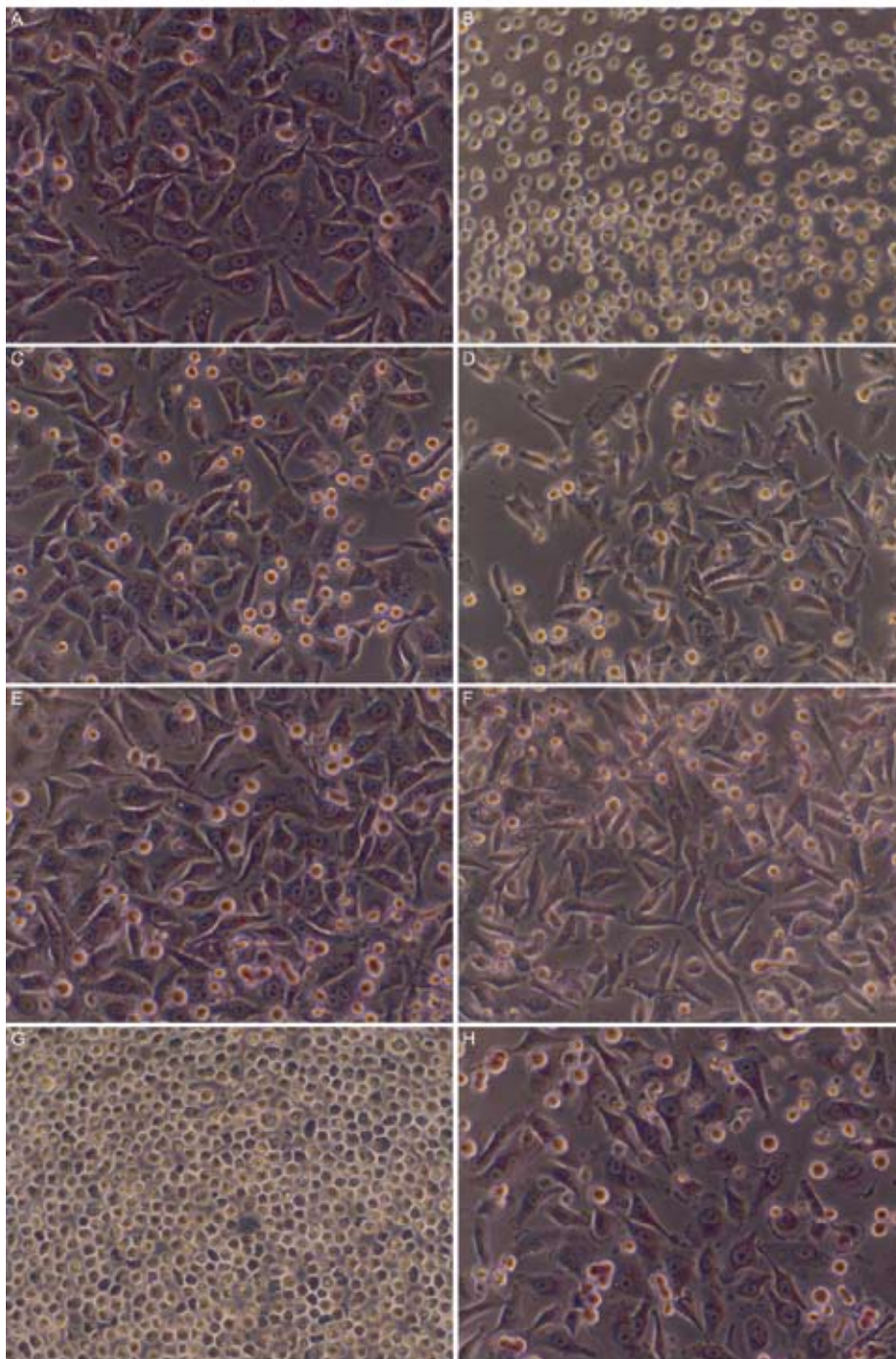
Рис. 1. Гистограммы оценки жизнеспособности различных типов клеток на 3-и сутки культивирования в среде с концентрацией исследуемых препаратов 1–10% от объема питательной среды. Препараты добавлены в питательную среду в момент посева клеток

Fig. 1. Histograms of Assessing the Viability of Different Cell Types at 3 Days of Cultivation in the Medium with the Concentration of the Studied Drugs 1–10% by Volume of the Nutrient Medium. Drugs Added to the Nutrient Medium at the Time of Seeding Cells

С помощью МТТ-теста было установлено, что клетки постоянных трансформированных клеточных линий конъюнктивы (*Chang Conjunctiva*, Clone 1-5c-4) и роговицы (HCEC) человека являются чувствительными к цитотоксическому действию исследуемых препаратов. Наибольшую чувствительность к действию исследуемых слезозаместителей показала тест-система на основе клеток роговицы человека. При использовании этой тест-системы четыре из семи исследуемых препаратов (*Артелак®* *Баланс*, *Оптив®*, *Катионорм®*, *Офтолик®*) в концентрации 10% от объема питательной среды проявили высокую степень токсичности в отношении культивируемых клеток. Среди этой группы протестированных препаратов с различными видами консервантов были получены самые низкие результаты метаболической активности клеток по сравнению с контролем. Глазные капли *Систейн Ультра®* оказывали наименьшее токсическое действие на клетки линий HCEC и *Chang Conjunctiva*, Clone 1-5c-4 в концентрации 5 и 10% от объема питательной среды. Безконсервантные слезозаместители *Хилабак®* и *Теалоз®* в этой концентрации не оказали цитотоксического действия на клетки ни одной тест-системы и показали наилучшие результаты при исследовании. Независимо от концентрации, наиболее токсичными для всех типов клеток оказались препараты *Офтолик®* и *Артелак®* *Баланс*.

Результаты прижизненного наблюдения за морфологическим состоянием клеток линии *Chang Conjunctiva*, Clone 1-5c-4 и HCEC в процессе их культивирования в среде, содержащей 10% тестируемых слезозаместителей, приведены на Рис. 2–3.

Clone 1-5c-4; концентрация препаратов в питательной среде 10%



А - контроль; В - Артелак Баланс; С - Оптив; D - Катионорм; Е - Хилабак; F - Систейн Ультра; G - Офтолик; H - Теалоз

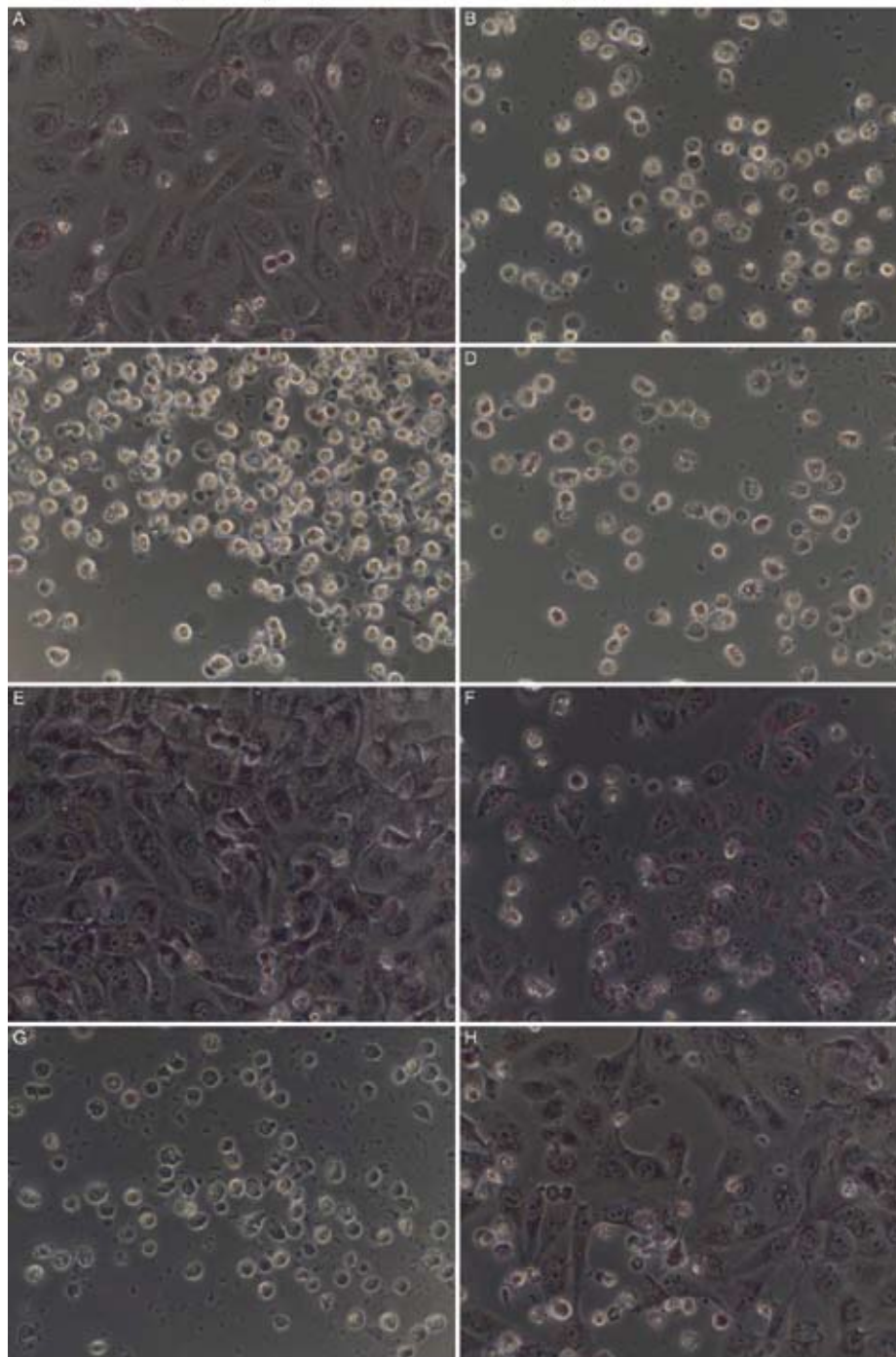
Рис. 2. Морфология клеток линии *Chang Conjunctiva*, Clone 1-5c-4 на 3-и сутки культивирования в питательной среде, содержащей 10% тестируемых препаратов, добавленных в среду в момент посева клеток; (x20). Фазово-контрастная микроскопия (ФЧМ)

Fig. 2. The Morphology of the Cell Line Clone 1-5c-4 on the 3rd Day of Cultivation in a Nutrient Medium Containing 10% of the Test Drugs Added to the Media When Seeding Cells; (x20). Phase-Contrast Microscopy (FCM)

На представленных фотографиях (Рис. 2) клетки линии *Chang Conjunctiva, Clone 1-5c-4* в контрольном варианте имеют типичную эпителиоподобную морфологию и на 3-и сутки культивирования сформировали конфлюэнтный монослой. Варианты с препаратами *Хилабак®* и *Теалоз®* сопоставимы с контролем. В присутствии препаратов *Систейн Ультра* и *Оптив®* клетки сохраняют эпителиоподобную форму, но распластаны хуже, чем в контроле. С препаратом *Систейн Ультра®* ярко выражена вакуолизация клеток, что может быть связано с нарушением клеточного обмена. В присутствии препарата *Оптив®* выраженной вакуолизации клеток не наблюдается, но много открепившихся клеток округлой формы с инвагинированной цитоплазматической мембраной. В варианте с препаратом *Катионорм®* клетки плохо распластаны, имеет место потеря межклеточных контактов. Структура клеток зернистая, они сильно вакуолизированы; выявлено много открепившихся клеток округлой формы со сморщенной цитоплазматической мембраной. В присутствии препаратов *Артелак®* *Баланс* и *Офтолик®* распластанные клетки не найдены. Все клетки имеют округлую форму. Структура клеток зернистая, с вакуолями; наблюдается инвагинация цитоплазматической мембраны.

Визуальное наблюдение за морфологией клеток линии *НСЕС* в контрольном варианте отразило типичную эпителиоподобную морфологию, при этом на 3-и сутки культивирования сформировался конфлюэнтный монослой (Рис. 3). Варианты с препаратами *Хилабак®* и *Теалоз®* сопоставимы с контролем. В присутствии препарата *Систейн Ультра®* клетки сохранили эпителиоподобную форму, но были распластаны хуже, чем в контроле; монослой не сформирован.

НСЕС; концентрация препаратов в питательной среде 10%



А - контроль; В - Артелак Баланс; С - Оптив; D - Катионорм; Е - Хилабак; F - Систейн Ультра; G - Офтолик; H - Теалоз

Рис. 3. Морфология клеток линии НСЕС на 3-и сутки культивирования в питательной среде, содержащей 10% тестируемых препаратов, добавленных в среду в момент посева клеток; (x20). Фазово-контрастная микроскопия (ФНМ)

Fig. 3. The Morphology of the Cell Line HCEC on the 3rd Day of Cultivation in a Nutrient Medium Containing 10% of the Test Drugs Added to the Media When Seeding Cells; (x20). Phase-Contrast Microscopy (FCM)

СУХОСТЬ ГЛАЗ

Мы учимся, наблюдая за природой

Теалоз

Трегалоза 3%



Естественная
защита

 **Théa**
Driving innovation

 **Théa**

ООО «Теа Фарма»
115280, Россия, г. Москва,
ул. Ленинская Слобода, д. 26, стр. 28, офис 202
Тел: +7 495 787 75 35

Регистрационное удостоверение РЗН
2013/1031 от 18.09.2013

Выявлены открепившиеся клетки округлой формы с выраженной вакуолизацией и инвагинированной цитоплазматической мембраной. В присутствии препаратов *Артелак® Баланс*, *Оптив®*, *Катионорм®* и *Офтолик®* все клетки открепились от дна культурального сосуда, распластанных клеток не выявлено. Форма клеток округлая; клетки набухшие, структура зернистая, с вакуолями; цитоплазматическая мембрана с инвагинациями. В питательной среде выявлено большое количество артефактов, которые могут являться фрагментами погибших клеток. Результаты прижизненного наблюдения за морфологическим состоянием всех типов клеток в процессе их культивирования в среде, содержащей тестируемые слезозаместители, сопоставимы с результатами МТТ-теста. Наиболее токсичными для всех клеточных тест-систем оказались препараты *Офтолик®* и *Артелак® Баланс*, а слезозаместители *Хилабак®* и *Теалоз®* по нашим данным не оказывали цитотоксического действия на клетки при исследованных концентрациях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в работе результаты исследований по оценке цитотоксичности слезозаместителей демонстрируют, что данные препараты могут оказывать цитостатический эффект в условиях *in vitro* и отличаются по своему цитотоксическому потенциалу. Глазные капли *Хилабак®* и *Теалоз®*, не содержащие в своем составе консервантов, не оказывали цитотоксического действия на клетки обеих тест-систем при всех используемых кон-

центрациях. Наименьшим токсическим эффектом из тестируемых слезозаместителей с «мягким» консервантом обладали глазные капли *Систейн Ультра®*, содержащие *Поликвад®*. Среди «искусственных слез» наибольшее токсическое действие на все типы клеток при используемых концентрациях оказывали глазные капли *Офтолик* (БАК 0,01%) и *Артелак® Баланс* (Оксид). Установлена прямая зависимость между концентрацией исследуемых препаратов в питательной среде и их цитотоксичностью. Это позволяет предположить, что увеличение токсического действия слезозаместительных препаратов на культивированные клетки в питательной среде может быть связано с разницей концентрации консерванта в составе тестируемых препаратов. Проведённые пилотные исследования показали принципиальную возможность использования систем *in vitro* для сравнительной оценки цитотоксического действия слезозаместителей.

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», представляется целесообразным проведение скрининга цитотоксичности широкой линейки слезозаместительных препаратов с использованием тест-систем на основе клеточных культур, а также исследование свойств этих препаратов на модели «сухого глаза» *in vitro*.

Мнение авторов может не совпадать с позицией редакции

ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

1. Tsubota K., Kawashima M., Inaba T. The antiaging approach for the treatment of dry eye. *Cornea*. 2012;31:1:3–8. DOI:10.1097/ICO.0b013e31826a05a8
2. Versura P., Profazio V., Giannaccare G. Discomfort symptoms reduction and ocular surface parameters recovery with Artelac Rebalance treatment in mild-moderate dry eye. *Europ. J. Ophthalmol.* 2013;23:4:488–495. DOI:10.5301/ejo.5000267
3. Bron A., Tomlinson A., Foulks G., Pepose J., Baudouin C., Geerling G. Rethinking dry eye disease: a perspective on clinical implications. *Ocul Surf.* 2014;12:1-31. DOI: 10.1016/j.jtos.2014.02.002
4. Brzheshkij V. V., Kalinina I. V., Popov V. Yu. [New possibilities of drug therapy of patients with corneal conjunctival xerosis]. [Clinical Ophthalmology]. *Klinicheskaya oftalmologiya*. 2016;1:39-46. (In Russ.).
5. Baudouin C., Labbé A., Liang H., Pauly A., Brignole-Baudouin F. Preservatives in eye drops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res.* 2010;9:312-334. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2010.03.001.
6. Epstein S., Ahdoot M., Marcus E., Asbell P. Comparative toxicity of preservatives on immortalized corneal and conjunctival epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2009; 25:113-119. DOI: 10.1089/jop.2008.0098.
7. Whitson J., Petroll W. Corneal epithelial cell viability following exposure to ophthalmic solutions containing preservatives and/or antihypertensive agents. *Adv Ther.* 2012;29:874-888. DOI: 10.1007/s12325-012-0057-1
8. Wilson W., Duncan A., Jay J. Effect of benzalkonium chloride on the stability of the precorneal tear film in rabbit and man. *Br J Ophthalmol.* 1975;59:11:667-669.
9. Danchenko E.O. [Assessment of cytotoxicity pharmaceuticals using cell cultures] Otsenka tsitotoksichnosti farmatsevticheskikh substansiy s ispol'zovaniem kletochnykh kul'tur. [Immunology, Allergology, Infectology]. *Immunopatologiya, Allergologiya, Infektologiya* 2012;2: 22-31. (In Russ.).
10. Dроздов F.V., Mekhtiev A.R., Morozovich G.E., Timofeev V.P., Misharin A.Yu. [Cytotoxic derivatives (22R, 23R) — digidroksistigmastana]. Tsitotoksichnye proizvodnye (22R, 23R) — digidroksistigmastana. [Bioorgan. Chemistry]. *Bioorgan. khimiya*. 2007; 33: 349-356. (In Russ.).
11. Eropkin M.Ju., Eropkina E.M. The cell cultures as a model system toxicity studies and screening of cytoprotective drugs. — SPb.: Morsar AV, 2003. (In Russ.).
12. Romanova S.G., Serebrennikova G.A., Shtil' A.A. [Synthesis and study of properties of cytotoxic and hemolytic activity of cationic glycerolipids alkyl type]. Sintez, izuchenie tsitotoksicheskikh svoystv i gemoliticheskoy aktivnosti kationnykh glitserolipidov alkil'nogo tipa. [Annals of Moscow Technological University]. *Vestnik Moskovskogo tekhnologicheskogo universiteta*. 2008;3:5:101-105. (In Russ.).
13. 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]. Sravnitel'noe opredelenie zhiznesposobnosti kletok s pomoshch'yu mtt i resazurina. [Fundamental research]. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014; 12: 1423-1427. (In Russ.).
14. Aleksandrova O.I., Okolov I.N., Tahtaev Ju.V., Horol'skaja Ju.I., Hintuba T.S., Blinova M.I. [Comparative evaluation of the cytotoxicity of antimicrobial eye drops]. Sravnitel'naya otsenka tsitotoksichnosti antimikrobnnykh glaznykh kapel'. [Ophthalmology journal]. *Oftalmologicheskie vedomosti*. 2015;8:1:89-97. (In Russ.).
15. Aleksandrova O.I., Horol'skaja Ju.I., Majchuk D.Ju., Blinova M.I. [The study of general cytotoxicity of aminoglycoside antibiotics and fluoroquinolone in cell cultures]. Issledovanie obshchey tsitotoksichnosti antibiotikov aminoglikozidnogo i ftorkhinolonovogo ryada na kletochnykh kul'turakh. [Annals of Ophthalmology]. *Vestnik oftalmologii* 2015;5:39-48. (In Russ.).
16. Aleksandrova O.I., Okolov I.N., Horol'skaja Ju.I., Blinova M.I., Churakov T.K. [Assessing the impact of benzalkonium chloride and cytotoxicity Nettatsin Tobrex eyedrops under conditions in vitro]. Otsenka vliyaniya benzalkoniya khlorida na tsitotoksichnost' glaznykh kapel' Nettatsin i Tobrex v usloviyakh in vitro. [Modern technologies in ophthalmology]. *Sovremennye tekhnologii v oftalmologii*. 2016;3:163-166. (In Russ.).
17. Vechkanov E.M., Sorokina I.A. [Basics of Cell Engineering, Rostov-on-Don]. 2012. (In Russ.).
18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Meth.* 1983;65:1-2:55-63.
19. Cancer cell culture: methods and protocols / Ser. Methods in Molecular Medicine. (Ed. S.P. Langdon). Totowa, NJ: Humana Press, 2003; 88:165-169.
20. In vitro toxicity testing protocols / Ser. Methods in Molecular Biology. Vol. 43. (Eds S.O'Hare, C.K. Atterwill). Totowa, NJ: Humana Press, 1995;43:138-149.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Александрова Ольга Игоревна — младший научный сотрудник, отдел клеточных культур, лаборатория биологии клетки в культуре, группа клеточной биотехнологии, ФГБУН Институт цитологии РАН

Околов Игорь Николаевич — к.м.н., заведующий клинико-бактериологической лабораторией, СПб филиал ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» МЗ РФ.

Хорольская Юлия Игоревна — лаборант-исследователь, отдел клеточных культур, лаборатория биологии клетки в культуре, группа клеточной биотехнологии, ФГБУН Институт цитологии РАН

Панова Ирина Евгеньевна — д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе, СПб филиал ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» МЗ РФ

Блинова Миральда Ивановна — к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела клеточных культур, лаборатория биологии клетки в культуре, группа клеточной биотехнологии, ФГБУН Институт цитологии РАН

ABOUT THE AUTHORS

Aleksandrova Olga I. — Junior research scientist, Department of cell cultures, Laboratory of cell biology in culture, Group of cell biotechnology, Institute of Cytology of the Russian Academy of Science

Okolov Igor N. — PhD, Head of the Clinical Bacteriological Laboratory, Sv. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution

Khorolskaya Juliya I. — laboratory assistant-scientist, Department of cell cultures, Laboratory of cell biology in culture, Group of cell biotechnology, Institute of Cytology of the Russian Academy of Science

Panova Irina E. — MD, professor, Vice-director, Sv. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution

Blinova Miralda I. — PhD, leading research scientist, Department of cell cultures, Laboratory of cell biology in culture, Group of cell biotechnology, Institute of Cytology of the Russian Academy of Science