

Оценка влияния комбинации офтальмологических препаратов на культуру клеток конъюнктивы человека (chang conjunctiva)



И.А. Суетина¹ Г.М. Чернакова² Д.Ю. Майчук² Л.И. Руссу¹ Е.А. Ключева^{3,4} С.М. Муртазалиева³ М.В. Мезенцева¹

¹Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава, ул. Гамалеи, 18, Москва, 123098, Российская Федерация

²ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава РФ, Бескудниковский бульвар, 59А, Москва, 127486, Российская Федерация

³ГБУЗ ГНБ им. С.П. Боткина Филиал №1 Офтальмологический центр Департамента здравоохранения города 2-й Боткинский пр-д, 5 Москва, 125284, Российская Федерация.

⁴ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России ул. Баррикадная, 2/1, Москва, Российская Федерация, 123995

РЕЗЮМЕ

Офтальмология. 2017;14(4):368–374

Цель: изучить цитологический и иммунологический эффекты, оказываемые одновременным воздействием на культуру нормальных клеток конъюнктивы человека Chang conjunctiva офтальмологических препаратов Броксинан® и Офтальмоферон® для совершенствования методики оценки комбинаций офтальмологических лекарственных средств in vitro. **Материал и методы.** Для работы использована перевиваемая культура нормальных клеток конъюнктивы человека Chang conjunctiva, клон 1-5 C-4. Действие препаратов Броксинан® и Офтальмоферон® количественно определяли по их влиянию на жизнеспособность клеток с помощью МТТ-метода; для изучения изменения морфологии клеток в процессе культивирования использовали метод прижизненного визуального наблюдения. Влияние комбинации препаратов на функциональную активность клеток конъюнктивы оценивали с помощью изучения продукции цитокинов на уровне их транскрипции in vitro. **Результаты.** Два исследуемых препарата при инкубации с клетками конъюнктивы в течение 48 часов не вызывают угнетение ростовой активности и жизнеспособности нормальных клеток человека Chang conjunctiva в разведениях 1\512-1/2048 (3 мкг/мл и менее — Броксинан) и 1/32 –1/2048 (625 МЕ/мл и менее — Офтальмоферон). Внесение исследуемых лекарственных средств в культуру клеток Chang conjunctiva в данных концентрациях не изменяло морфологию клеток, и испытуемый образец не отличался от состояния клеток в контроле. Исследование продукции цитокинов клетками конъюнктивы при изолированном использовании Броксинана выявило стимуляцию продукции противовирусных ИФН-α и ИФН-λ и угнетение выработки провоспалительных ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-12. Офтальмоферон стимулировал выработку ИФН-α и Vegf R1. При совместном применении препаратов наблюдали продукцию РНК ИФН-α, ИФН-λ2, ИЛ-2, ИЛ-12. **Заключение.** Совместное использование Броксинана и Офтальмоферона в культуре клеток конъюнктивы человека Chang приводит к формированию адекватного противовирусного и противовоспалительного цитокинового ответа — наблюдается усиление продукции ИФН-α, ИФН-λ, ИЛ-2 и ИЛ-12.

Ключевые слова: клеточные культуры, цитотоксичность, клетки конъюнктивы человека, цитокины, бромфенан, офтальмоферон

Для цитирования: Суетина И.А., Чернакова Г.М., Майчук Д.Ю., Руссу Л.И., Ключева Е.А., Муртазалиева С.М., Мезенцева М.В. Оценка влияния комбинации офтальмологических препаратов на культуру клеток конъюнктивы человека (chang conjunctiva). Офтальмология. 2017;14(4):368–374. DOI: 10.18008/1816-5095-2017-4-368-374

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

Конфликт интересов отсутствует

Evaluation of the Effect of the Ophthalmic Remedies Combination on the Viability of Human Conjunctival Cell Culture Chang Conjunctiva

I.A. Suetina¹, G.M. Chernakova², D.Yu. Maychuk², M.V. Mezentsseva¹, L.I. Russu¹, E.A. Kleshcheva^{3,4}, S.M. Murtazalieva³

¹D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology.

Ministry of health of the Russia

Gamaleya st., 18, Moscow, 123098, Russia

²S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Ministry of Health of the Russian Federation
Beskudnikovskiy Boulevard, 59a, Moscow, 127486 Russia

³Moscow City Clinical Hospital named after S.P. Botkin Department of Health of Moscow,
2-nd Botkinsky passage, 5, Moscow, 125284, Russia.

⁴Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Ministry of Health of the Russian Federation
2/1 Barrikadnaya St., Moscow, 123995, Russia

ABSTRACT

Ophthalmology in Russia. 2017;14(4):368-374

Objective. Investigation of the cytological and immunological effects, caused by the simultaneous exposure of normal Chang conjunctiva cells to ophthalmic drugs Broxinac® and Ophthalmoferon®, in order to improve the evaluation techniques of ophthalmic drugs combinations in vitro. **Material and methods.** A transplantable culture of normal Chang conjunctiva cells, clone 1-5 C-4, was used. The drugs Broksinak® and Oftalmoferon® were quantified by their effect on cell viability using the MTT method. The change in cell morphology during the cultivation process was studied by intravital visual observation. The effect of the combination of drugs on the functional activity of conjunctival cells was assessed by production of cytokines at the level of their in vitro transcription.

Results. The investigated drugs (dilutions 1/512-1/2048 Broksinak® and 1/32-1/2048 Oftalmoferon®) were incubated with human Chang conjunctiva cells for 48 hours and did not cause an inhibition of growth activity or viability, and did not change the morphology of the cells, and the test sample was not different from the state of the control cells. Cytokine production by cells of the conjunctiva when exposed to Broksinak® alone stimulated secretion of antiviral IFN-α and IFN-λ and inhibition of production of proinflammatory IFN-γ, IL-2, IL-8, IL-12. Ophthalmoferon stimulated the production of IFN-α and VEGF R1. The production of RNA IFN-α, IFN-λ2, IL-2, IL-12 was observed in drug's combination. **Conclusions.** The combined use of Broksinak® and Oftalmoferon® on human Chang conjunctiva cells results in the formation of an adequate antiviral and anti-inflammatory cytokine response: i.e. increase of IFN-α production, IFN-λ, IL-2 and IL-12.

Keywords: cell cultures, cytotoxicity, human conjunctival cells, cytokines, bromfenac

For citation: Suetina I.A., Chernakova G.M., Maychuk D.Yu., Mezentsseva M.V., Russu L.I., Kleshcheva E.A., Murtazalieva S.M. Evaluation of the Effect of the Ophthalmic Remedies Combination on the Viability of Human Conjunctival Cell Culture Chang Conjunctiva. *Ophthalmology in Russia*. 2017;14(4):368-374. DOI: 10.18008/1816-5095-2017-4-368-374

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

There is no conflict of interests

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время оценка цитотоксичности офтальмологических лекарственных препаратов в рамках стандартов Надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice) является необходимым этапом доклинических испытаний. Среди различных способов оценки токсичности существенную роль играют лабораторные методы, основанные на феномене изменения степени адсорбции клеточной культурой определенных красителей в зависимости от функционального состояния клеток, которое, в свою очередь, зависит, прежде всего, от токсичности испытуемых лекарственных средств. Эти колориметрические методы важны для оценки токсичности и потенциальной опасности лекарственных веществ в условиях *in vivo*, и в частности, для определения предварительных нетоксических концентраций с целью дальнейшего применения у лабораторных животных на следующем этапе доклинических испытаний. В качестве материала принято использовать различные клеточные

линии, содержащие клетки роговицы (эпителий, эндотелий) и конъюнктивы (эпителий, фибробласты, бокаловидные клетки) [1, 2, 3, 4].

Кроме доклинических исследований, данные методы актуальны и на постклиническом этапе. В частности, в работах Ayaki M. с соавт., Sawazaki R. с соавт., Qu M. с соавт., Kinnunen с соавт., Александровой О.И. с соавт. большое внимание уделено оценке цитотоксичности готовых офтальмологических лекарственных форм разных фармакологических групп (антибиотики, нестероидные противовоспалительные средства, корнепротекторы), а также зависимости жизнеспособности клеток от наличия в составе глазных капель консервантов [5, 6, 7, 8, 9, 10, 11]. Так, Qu M. с соавт., сравнивая токсичность четырех нестероидных противовоспалительных препаратов, выявили наименьшую — у бромфенака, а Kinnunen с соавт. [8, 9] показали, что катионное соединение цеталкония хлорида и поликвад обладают значительно меньшей токсичностью по сравнению с бензалконием хлоридом.

Существенную информацию о том, как именно влияют исследуемые препараты (или потенциальные лекарственные вещества) на жизненную активность клеток конъюнктивы или роговицы может обеспечить изучение продукции цитокинов как *in vivo*, так и *in vitro*. Исследование продукции цитокинов *in vivo* для оценки иммунных эффектов офтальмологических препаратов были проведены Акберовой С.И. с соавт., Кочергиным С.А. с соавт., Майчуком Д.Ю. с соавт. [12, 13, 14, 15]. Результаты аналогичных исследований на клеточных культурах были опубликованы Leonardi A с соавт., Li J с соавт., Contreras-Ruiz L с соавт., Lambiasi A. с соавт., Guzman-Aranguiz A с соавт. [16, 17, 18, 19, 20].

Весьма ограниченное количество работ посвящено изучению местных цитокиновых реакций и эффектов воздействия готовых глазных капель (и их комбинаций) на клеточные культуры, в частности, при вирусных инфекциях глаз; нами обнаружены единичные работы с использованием подобных методик [1, 21]. На наш взгляд, недостаточно внимания в отечественной литературе уделяется развитию научно-обоснованных подходов к терапии воспалительных заболеваний глаз вирусной природы с использованием общепринятых фундаментальных биологических методов, тогда как обилие готовых лекарственных форм создает условия для развития полипрагмазии и лекарственной аллергии в офтальмологии [22, 23, 24].

Данное исследование не претендует на решение указанных крупных клинико-фармакологических задач, тем не менее, мы попытались изучить возможности классических, давно существующих методов оценки токсичности лекарственных препаратов на культурах тканей в сочетании с использованием новых иммунологических методик. Вышесказанное определило цель данного исследования — изучить цитологический и иммунологический эффект, оказываемый за счет одновременного воздействия на культуру нормальных клеток конъюнктивы человека Chanq conjunctiva офтальмологических препаратов Броксинак® и Офальмоферон® для совершенствования методики оценки комбинаций офтальмологических лекарственных средств *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Культура клеток и питательные среды. Для экспериментов из коллекции культур клеток ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ была выбрана перевиваемая культура нормальных клеток конъюнктивы человека Chanq conjunctiva, клон 1-5 C-4 (каталожный номер ATCC — CCL 20.2). Культивирование клеток проводили на стандартной питательной среде Игла MEM производства Московского института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) фирмы «ПанЭко».

Для оценки метаболической активности клеток использовали колориметрический МТТ-тест, который служит биологическим стандартом и рекомендован в этом

качестве для оценки цитотоксического действия на клетки различных чужеродных веществ [25]. Этот тест основан на наличии прямой коррекции количества жизнеспособных клеток и интенсивности метаболизма специального реактива МТТ до водорастворимого темноокрашенного формазана под действием митохондриальной сукцинатдегидрогеназы, в то время как мертвые клетки и клетки со сниженной жизнеспособностью такой способностью не обладают. Проведение последующей спектрофотометрии растворенного с помощью ДМСО формазана позволяет получить данные для точного сопоставления изменений оптической плотности раствора по отношению к контролю, с изменением количества жизнеспособных клеток. В цитотоксических исследованиях имеется возможность оценить специфическую гибель клеток, индуцированную тем или иным цитотоксическим агентом [25]. Клетки рассевали на 96-луночную панель фирмы «Costar» (США) в концентрации 200 тыс. кл/мл в каждую лунку в объеме 100 мкл культуральной среды с 10% ЭТС и инкубировали в CO₂-термостате с 5% CO₂ при 37°C. Через 24 часа после посадки и образования субконфлюэнтного монослоя клеток перед внесением исследуемых препаратов инкубационную среду меняли, добавляя в лунку по 100 мкл среды с 1% ЭТС.

В работе были использованы коммерческие офтальмологические препараты в виде глазных капель: Броксинак® (Швейцария) и Офальмоферон® (РФ). Действие препаратов Броксинак и Офальмоферон *in vitro* на культуру конъюнктивальных клеток оценивали количественно (МТТ-тест) и качественно (морфологически).

Жизнеспособность клеток и МТТ-метод. После инкубации клеток с данными препаратами в течение 48 часов в CO₂ термостате при 37°C культуральную среду отсасывали из лунок, добавляли по 100 мкл среды с 20 мкл МТТ (3[4,5-диметил-тиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия, Sigma) в исходной концентрации 5 мг/мл и инкубировали в течение 4 часов. Затем среду с МТТ удаляли и добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) для растворения образовавшихся кристаллов формазана. Осадок клеток ресуспендировали в течение 5 мин. пипетированием. Жизнеспособность клеток оценивали по интенсивности окраски раствора синего формазана, измеряя оптическую плотность с использованием фотометра Immunochem 2100 (США) при длине волны 545 нм. Оценку результатов МТТ-теста проводили путем сопоставления оптической плотности в опытных и контрольных лунках, процент жизнеспособных клеток рассчитывали как отношение оптической плотности обработанных и контрольных клеток.

Качественная оценка результатов теста. Для визуального контроля изменений морфологии клеток их выращивали на стерильных покровных стеклах в 6-луночных панелях, оценивали под микроскопом их морфологическое состояние в процессе культивирования с препаратами Броксинак и Офальмоферон по сравнению с контролем, проводили фотофиксацию.

Изучение продукции цитокинов. Влияние комбинации препаратов на функциональную активность клеток конъюнктивы оценивали путем изучения продукции цитокинов на уровне их транскрипции *in vitro*. Изучаемые препараты в исходной концентрации: Броксинак — 0,9 мг/мл и Офтальмоферон — 10000 МЕ/мл растиривали в двукратных разведениях от 1/2 до 1/4096 с помощью внесения по 100 мкл в лунку панели и инкубировали с клетками в течение 48 часов в CO₂-термостате при 37°C. Эксперименты выполняли трижды. Контролем служили интактные клетки конъюнктивы человека Chanq conjunctiva, культивируемые параллельно с опытными. За 100% жизнеспособность принимали интенсивность окраски в лунках панели с контрольными клетками. Изменение функциональной клеточной активности изучали по продукции цитокинов на уровне их транскрипции *in vitro* в клеточной культуре после инкубации клеток с препаратами в течение 48 часов.

Клетки (Chanq conjunctiva) высевали в 6-луночные панели в посевной дозе 200 тыс. кл/мл, инкубировали 24 часа до образования монослоя и затем, после смены среды, изучаемые препараты в выбранных концентрациях вносили в лунки по отдельности или вместе. Экспрессию генов интерлейкинов ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18, фактора некроза опухоли (ФНО)-α, интерферона (ИФН)-α, ИФН-β, ИФН-γ, ИФН-λ1, ИФН-λ2, ИФН-λ3, а также факторов

роста эндотелия сосудов VEGF-A, VEGF-C, их рецепторов VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3, оценивали по активности мРНК. Определение активности мРНК цитокинов и 3-х рецепторов проводили с использованием методов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). В качестве положительного контроля использовали β-актин. Регистрацию результатов ПЦР осуществляли электрофоретически в 2,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Для идентификации нуклеотидных последовательностей использовали маркер для электрофореза фирмы Promega (G 1758).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel, «Statistica 6.0». Достоверность различия средних величин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента при уровне значимости $p \leq 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы при оценке цитотоксического действия готовых лекарственных препаратов *in vitro* на жизнеспособность клеток Chanq conjunctiva с помощью МТТ-теста мы стремились получить ориентировочные нетоксичные для данной клеточной культуры концентрации готовых лекарственных форм препаратов Броксинак и Офтальмоферон с целью дальнейшего изучения цитокиновых реакций клеток при комбинированном применении препаратов в искомых концентрациях. Полученные данные представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Определение влияния препарата Броксинак на жизнеспособность клеток конъюнктивы человека с помощью МТТ-метода

Table 1. Determination of the Broxinak effect on the human conjunctival cells viability using the MTT method

Препарат/Разведения Remedies/dilutions	Показатели оптической плотности (ОП) при длине волны 545 нм Optical density at 545 nm										
	1\2	1\4	1\8	1\16	1\32	1\64	1\128	1\256	1\512	1\1024	1\2048
Броксинак/Broxinak	0*	0*	0*	0.543±0.11*	0.711±0.08*	0.973±0.06*	1.026±0.11*	1.217±0.06*	1.24±0.2	1.307±0.07	1.3±0.09
Контроль/control	1.361±0.013										

* различия достоверны при уровне значимости $p \leq 0,01$

Таблица 2. Определение влияния препарата Офтальмоферон на жизнеспособность клеток конъюнктивы человека с помощью МТТ-метода

Table 2. Determination of the Ophthalmoferon effect on the human conjunctival cells viability using the MTT method

Препарат/Разведения Remedies/dilutions	Показатели ОП при длине волны 545 нм Optical density at 545 nm										
	1\2	1\4	1\8	1\16	1\32	1\64	1\128	1\256	1\512	1\1024	1\2048
Офтальмоферон Ophthalmoferon	0.512±0.01*	0.83±0.07*	1.1±0.01*	1.216±0.04*	1.15±0.2	1.26±0.1	1.3±0.04	1.331±0.003	1.3±0.1	1.303±0.04	1.32±0.044
Контроль/control	1.361±0.013										

* различия достоверны при уровне значимости $p \leq 0,01$

Полученные данные свидетельствуют о том, что оба исследуемых препарата при инкубации с клетками в течение 48 часов вызывают угнетение ростовой активности и жизнеспособности нормальных клеток человека Chang conjunctiva в разведениях 1\2-1\256 (свыше 3 мкг/мл Броксинак) и 1/2 — 1/16 (свыше 625 МЕ/мл Офталь-

моферон). Данные показатели концентрации послужили дальнейшим ориентиром для изучения влияния комбинации препаратов Броксинак и Офтальмоферон на продукцию цитокинов клетками конъюнктивы в культуре.

При визуальном анализе клеток в процессе их культивирования с изучаемыми препаратами с помощью

микроскопа Olympus CKX41 было показано, что клетки в контрольных лунках через 72 часа сформировали кон-флюэнтный монослой и не отличались от исходной пе-реживаемой культуры нормальных клеток конъюнктивы человека Chang conjunctiva, состоящей из эпителиоподобных клеток с крупными округлыми ядрами. В ядрах содержалось 1–4 ядрышка и хроматиновая зернистость, встречались четырехъядерные клетки, цитоплазма была зернистая. В серии последующих экспериментов было показано, что при одновременном внесении в лунки пре-паратов в субтоксичных концентрациях (3 мкг/мл Брок-синака и 625 МЕ/мл Офтальмоферона) и инкубации с клетками в течение 48 часов имеет место достоверное падение значений ОП 545 нм, что свидетельствует о не-котором снижении жизнеспособности клеток конъюн-ктивы. Это наглядно иллюстрирует феномен усиления токсичности глазных инстилляций при совместном при-менении двух лекарственных препаратов. Полученные данные нельзя непосредственно экстраполировать на ситуацию *in vivo*, так как в культуре клеток отсутствует вымывание препарата со слезой, интратканевая адсорб-

ция, лимфатический дренаж и т.д. Тем не менее, эти фак-ты необходимо принимать во внимание при разработке оптимальных схем комбинированного применения пре-паратов в офтальмологической практике, а также для определения схем длительной реабилитации с помощью этих препаратов при воспалительных заболеваниях глаз.

Результаты исследования цитотоксического действия препаратов на морфологию клеток Chang conjunctiva, окрашенных по Романовскому, полученные при све-товой микроскопии, представлены на Рис. 1. Клетки в контроле не отличаются от исходной культуры, также состоят из эпителиоподобных клеток с крупными окру-глыми ядрами, ядра и клетки имеют четко выраженную границу. В ядрах содержится 1–4 ядрышка и хроматино-вая зернистость. Из представленных фотографий следу-ет, что в течение 48 часов инкубации с клетками препа-раты в нетоксичных концентрациях (Броксинак 3 мкг/мл — Рис. 1б и Офтальмоферон 625 МЕ/мл — Рис. 1в) не оказывают цитотоксического действия, видимые из-менения морфологии клеток не выявляются.

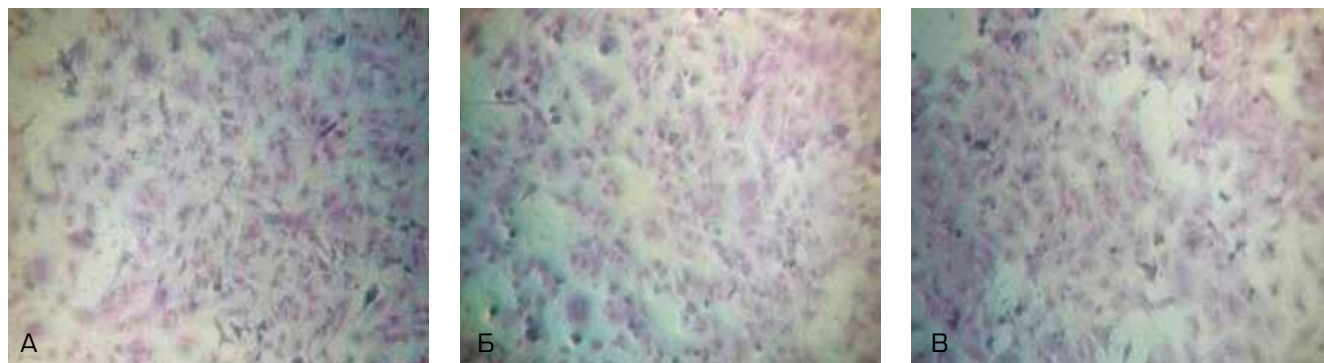


Рис. 1. Фотоизображение клеток Chang conjunctiva через 48 часов после культивирования с препаратами, окраска по Романовскому. Контроль (а), 3 мкг/мл Броксинака (б), 625 МЕ/мл Офтальмоферона (в)

Fig. 1. Image of Chang conjunctiva cells after 48 hours after cultivation with remedies, stained by Romanovsky. Control (a), 3 µg/ml Broxinak (b), 625 IU/ml Oftalmoferon (v).

Как было указано выше, ориентировочные неток-сичные концентрации готовых лекарственных форм препаратов Броксинак и Офтальмоферон дали возмож-ность изучения цитокиновых реакций клеток, как при изолированном, так и при комбинированном приме-нении препаратов в диапазоне концентраций от искомым нетоксичных и ниже (Таблица 3). Были получены до-статочно неожиданные результаты двоякого действия препарата Броксинак на клетки конъюнктивы — пре-парат стимулировал продукцию основных двух типов противовирусного ИФН, а именно, ИФН-α и ИФН-λ, одновременно подавляя выработку некоторых провос-палительных цитокинов, необходимых для формиро-вания адекватного иммунного ответа по клеточному типу (ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-12). Примечательно, что при совместном применении препаратов в культуре подобного ингибирующего эффекта Броксинака не на-

блюдалось. Офтальмоферон в диапазоне субтоксиче-ских концентраций стимулировал выработку ИФН-α и VEGF-R1, что убедительно свидетельствует о том, что рекомбинантный ИФН-α2b в составе препарата Офтальмоферон не только выполняет заместительную функцию, восполняя дефицит эндогенного ИФН, но и стимулирует его продукцию по принципу аутокринной регуляции. Стимуляция Офтальмофероном рецептор-ного белка VEGF-R1 может свидетельствовать, как ни странно, об антипролиферативном эффекте данного препарата, поскольку рецептор VEGF-R1 может вы-ступать в качестве ингибитора самого фактора роста эндотелия. При совместном применении в клеточной культуре комбинации Броксинака+Офтальмоферон на-блюдается продукция противовирусного ИФН типа I (ИФН-α) и типа III (ИФН-λ2), а также провоспали-тельных цитокинов ИЛ-2 и ИЛ-12; при этом не выяв-

лено подавление продукции цитокинов. Вышеуказанные процессы, наблюдаемые нами в культуре клеток конъюнктивы, выявили феномен перекрестного взаимодействия двух лекарственных веществ на уровне клеточных цитокиновых реакций. Таким образом, можно предполагать, что синергидный положительный эффект данной комбинации препаратов *in vivo* может обеспечивать адекватную противовирусную защиту клеток без потери иммунологического потенциала.

Таблица 3. Изменение транскрипции цитокинов в клетках Chang conjunctiva под действием препаратов Броксинак и Офтальмоферон

Table 3. The change in the transcription of cytokines in Chang conjunctiva cells under the action of remedies Broxinak and Ophthalmoferon

Препараты/ концентрации Remedies/ concentrations	Активация (наличие) мРНК цитокинов по сравнению с контролем* Activation (Presence) of cytokine mRNA in comparison with the control	Подавление (отсутствие) мРНК цитокинов по сравнению с контролем* Suppression (Absence) of cytokine mRNA compared with the control
Броксинак в диапазоне 0.4–3 мкг/мл Broxinak µg/ml	ИФН-α, ИФН-β, ИФН-λ2,3 IFN-α, IFN-β, IFN-λ2,3	ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-12 IFN-γ, IL-2, IL-8, IL-12 Vegf R2, Vegf R3 ИЛ-1β, ИЛ-10 IL-1β, IL-10
Офтальмоферон в диапазоне от 78 до 625 МЕ/мл Ophthalmoferon IU/ml	ИФН-α, Vegf R1 IFN-α, Vegf R1	ИФН-γ, ИФН-λ3, ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-10 IFN-γ, IFN-λ3, IL-1β, IL-2, IL-8, IL-12, IL-10
Комбинация Броксинак 3 мкг/мл + Офтальмоферон 625 МЕ/мл Broxinak 3 µg/ml + Ophthalmoferon 625 IU/ml	ИФН-α ИФН-λ2, ИЛ-2, ИЛ-12 IFN-α, IFN-λ2, IL-2, IL-12	Нет изменений Without changes

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты данного исследования позволяют сделать вывод, что методы оценки жизнеспособности клеток конъюнктивы человека Chang могут быть использованы для изучения влияния комбинаций офтальмологиче-

ских препаратов, применяемых для лечения воспалительных (вирусных) инфекций глаз на функциональную активность клеток. Для изучения цитокиновых реакций в клеточных культурах целесообразно определять нетоксичные для данной клеточной культуры концентрации препаратов с помощью МТТ-теста, что и было сделано на первом этапе работы. Второй этап работы — изучение цитологии клеток конъюнктивы человека при внесении препаратов Броксинак и Офтальмоферон в субтоксичных концентрациях подтвердил отсутствие морфологических изменений клеток в культуре (сохранными были форма и размеры ядер и клеток). И, наконец, третий этап — изучение функциональной активности клеток при раздельном и совместном применении препаратов выявил три разных цитокиновых профиля. Броксинак стимулировал продукцию основных двух типов противовирусного ИФН — ИФН-α и ИФН-λ, одновременно подавляя выработку некоторых провоспалительных цитокинов, необходимых для формирования адекватного иммунного ответа по клеточному типу (ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-12). Офтальмоферон в диапазоне субтоксических концентраций стимулировал выработку ИФН-α, что свидетельствует об эффекте индукции эндогенного ИФН рекомбинантным ИФН-α26 в составе данного препарата.

Совместное использование Броксинака и Офтальмоферона в клеточной культуре приводит к формированию адекватного противовирусного и противовоспалительного цитокинового ответа, а именно, наблюдается усиление продукции ИФН-α, ИФН-λ, ИЛ-2 и ИЛ-12, что является научным обоснованием в отношении успешного применения данной комбинации лекарственных препаратов для лечения воспалительных заболеваний конъюнктивы и роговицы.

УЧАСТИЕ АВТОРОВ

концепция и дизайн исследования — Чернакова Г.М., Мезенцева М.В., Майчук Д.Ю.,
сбор и обработка материала — Муртазалиева С.М., Руссу Л.И.,
статистическая обработка; написание текста — Сутина И.А., Чернакова Г.М.,
Клещева Е.А.,
подготовка иллюстраций, таблиц — Сутина И.А., Клещева Е.А.

ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

1. Yawata N, Selva KJ, Liu YC, Tan KP, Lee AW, Siak J, Lan W, Vania M, Arundhati A, Tong L, Li J, Mehta JS, Yawata M. Dynamic change in natural killer cell type in the human ocular mucosa in situ as means of immune evasion by adenovirus infection. *Mucosal immunology*. 2016;9(1):159–170. DOI: 10.1038/mi.2015.47.
2. Diebold Y, Calonge M, Enriquez de Salamanca A., Callejo S, Corrales RM, Saez V, Siemasko KF, Stern ME. Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Investigative ophthalmology and visual science*. 2003;44(10):4263–4274.
3. Ammar DA., Kahook MY. Effects of benzalkonium chloride- or polyquad-preserved fixed combination glaucoma medications on human trabecular meshwork cells. *Journal Molecular Vision*. 2011;17:1806–1813.
4. Schuerer N, Stein E, Inic-Kanada A, Pucher M, Hohenadl C, Bintner N, Ghasemian E, Montanaro J, Barisani-Asenbauer T. Implications for Ophthalmic Formulations: Ocular Buffers Show Varied Cytotoxic Impact on Human Corneal-Limbal and Human Conjunctival Epithelial Cells. *Cornea*. 2017;36(6):712–718. DOI: 10.1097/ICO.0000000000001199.
5. Ayaki M, Iwasawa A, Soda M, Yaguchi S, Koide R. Cytotoxicity of five fluoroquinolone and two nonsteroidal anti-inflammatory benzalkonium chloride-free ophthalmic solutions in four corneconjunctival cell lines. *Clinical ophthalmology* (Auckland, N.Z.). 2010;4:1019–1024.
6. Ayaki M, Yaguchi S, Iwasawa A, Koide R. Cytotoxicity of ophthalmic solutions with and without preservatives to human corneal endothelial cells, epithelial cells and conjunctival epithelial cells. *Clinical and experimental ophthalmology*. 2008;36(6):553–559. DOI: 10.1111/j.1442-9071.2008.01803.x
7. Sawazaki R, Ishihara T, Usui S, Hayashi E, Tahara K, Hoshino T, Higuchi A, Nakamura S, Tsubota K, Mizushima T. Diclofenac protects cultured human corneal epithelial cells against hyperosmolarity and ameliorates corneal surface damage in a rat model of dry eye. *Investigative ophthalmology and visual science*. 2014;55(4):2547–2556. DOI: 10.1167/iovs.13-13850.
8. Qu M, Wang Y, Yang L, Zhou Q Different cellular effects of four anti-inflammatory eye drops on human corneal epithelial cells: independent in active components. *Molecular vision*. 2011;17:3147–3155.
9. Kinnunen K, Kauppinen A, Piippo N, Koistinen A, Toropainen E, Kaarniranta K Cationorm shows good tolerability on human HCE-2 corneal epithelial cell cultures. *Experimental eye research*. 2014;120:82–89. DOI: 10.1016/j.exer.2014.01.006.
10. Александрова О.И., Околов И.Н., Тактаев 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 OI, Okolov IN, Takhtaev YuV, Khorolskaya YuI, Khintuba TS, Blinova MI. A comparative evaluation of antimicrobial eye drops cytotoxicity.

- Ophthalmology journal=*Ofial'mologicheskie vedomosti*.2015;8(1):89-97. (in Russ)].
11. 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;131(5):43-53. [Aleksandrova OI, Khorol'skaya YuI, Maychuk DYU, Blinova MI. Study of common cytotoxicity of aminoglycoside and fluoroquinolone antibiotics in cell cultures. *Annals of Ophthalmology=Vestnik oftalmologii*. 2015;131(5):43-53(in Russ)].
 12. Акберова С.И., Ершов Ф.И., Мусаев Галбинур П.И. Динамика интерферонового статуса у больных с герпетическими кератитами при лечении новым индуктором интерферона актиполом. Вестник офтальмологии. 2001;117(1):33-35. [Akberova SI, Ershov FI, Musaev Galbinur PI. Dynamics of interferon status in patients with herpetic keratitis in the treatment of a new interferon inducer actipol. *Annals of Ophthalmology=Vestnik oftalmologii*. 2001;117(1):33-35. (in Russ)].
 13. Кочергин С.А., Чернакова Г.М., Клещева Е.А., Шаповал И.М., Мезенцева М.В. Локальный цитокиновый статус при хронических формах аденовирусной инфекции глаз. Вестник Российской академии естественных наук. 2012;1:61-67. [Kochergin SA, Chernakova GM, Kleshcheva EA, Shapoval IM, Mezentseva MV. Local cytokine status of the chronic forms of adenoviral eye infection. *Bulletin of the Russian Academy of Natural Science=Vestnik Rossiiskoi akademii estestvennykh nauk*. 2012;1:61-67. (in Russ)].
 14. Майчук Д.Ю., Васильева О.А., Руссу Л.И., Мезенцева М.В. Сравнительная клинико-иммунологическая оценка вариантов терапии инфильтративного поражения роговицы после перенесенного аденовирусного кератоконъюнктивита. Вестник офтальмологии. 2015;131(4): 49-55. [Maychuk DYU, Vasileva OA, Russu LI, Mezentseva MV. Clinical and immunological comparisons of therapeutic regimens for corneal infiltrates secondary to adenoviral keratoconjunctivitis. *Annals of Ophthalmology=Vestnik oftalmologii*.2015;131(4): 49-55. (in Russ)].
 15. Lin Y, Zhang M, Barnes PF. Chemokine production by human alveolar epithelial cell line in response by Mycobacterium tuberculosis. *Infection and Immunity*. 1998;66(3):1121-1126. DOI: 10.1128/IAI.70.2.577-583.2002
 16. Leonardi A, DeFranchis G, Fregona IA, Violato D, Plebani M, Secchi AG. Effects of cyclosporin A on human conjunctival fibroblasts. *Archives of ophthalmology*. 2001;119(10):1512-1517.
 17. Li J, Lehmann C, Chen X, Romero F, Lu W. Total chemical synthesis of human interferon alpha-2b via native chemical ligation. *Journal of peptide science*. 2015;21(7):554-560. DOI: 10.1002/psc.2760.
 18. Contreras-Ruiz L, Schulze U, Garcia-Posadas L, Arranz-Valsero I, Lopez-Garcia A, Paulsen F, Diebold Y. Structural and functional alteration of corneal epithelial barrier under inflammatory conditions. *Current eye research*. 2012;37(11):971-981. DOI: 10.3109/02713683.2012.700756.
 19. Lambiase A, Micera A, Bonini S Multiple action agents and the eye: do they really stabilize mast cells? *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2009;9(5):454-465. DOI: 10.1097/ACI.0b013e3283303ebb.
 20. Guzman-Aranguiz A, Calvo P, Ropero I, Pintor J. In vitro effects of preserved and unpreserved anti-allergic drugs on human corneal epithelial cells. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*. 2014;30(9):790-798. DOI: 10.1089/jop.2014.0030.
 21. Choi WS, Koh JW, Chung TY, Hyon JY, Wee WR, Shin YJ Cytotoxicity of ganciclovir on cultured human corneal endothelial cells. *Antiviral therapy*. 2013;18(6):813-820. DOI: 10.3851/IMP2556.
 22. Майчук, Ю. Ф. Фармакотерапия аллергических заболеваний глаз. М., 1997. [Maychuk, YuF. *Pharmacotherapy of allergic eye diseases*. Moscow, 1997. (in Russ)].
 23. Сычев Д.А., Отделенов В.А., Андреев Д.А., Борова О.Т., Бордовский С.П., Салпагарова З.К., Головина О.В., Данилина К.С., Захарова Г.Ю., Ильина Е.С., Клейменова Е.Б., Краснова Н.М., Назаренко Г.И., Орехов Р.Е., Паюшник С.А., Сосновский Е.Е., Шуев Г.Н., Яшина Л.П. Полипрагмазия в клинической практике: проблема и решения. Санкт-Петербург: ЦОП «Профессия»; 2016. [Sychev DA, Otdelenov VA, Andreev DA, Bogova OT, Bordovskiy SP, Salpagarova ZK, Golovina OV, Danilina KS, Zakharova GYu, Il'ina ES, Kleyменова EB, Krasnova NM, Nazarenko GI, Orekhov RE, Payushchik SA, Sosnovskiy EE, Shuev GN, Yashina LP. *Polypharmacy in clinical practice: problem and solutions*. St.petersburg: TsOP «Professiya»; 2016. (in Russ)].
 24. Сычев Д.А. Как избежать «фармагеддона». электронный ресурс <http://gmpnews.ru/2015/07/dmitrij-sychev-kak-izbezhat-farmageddona/>. Ссылка активна на 17.10.2017. [Sychev DA. How to avoid "Farmageddon". electronic resource <http://gmpnews.ru/2015/07/dmitrij-sychev-kak-izbezhat-farmageddona/>. Link is active on 05.06.2017. (in Russ)].
 25. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина; 2005. [Khabriev RU. *Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances*. Moscow, Meditsina; 2005. (in Russ)].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского / ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России
Суетина Ирина Александровна
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
Москва, 123098, ул. Гамалеи, 18, Российская Федерация

ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава РФ
Чернакова Галина Мэлсовна
кандидат медицинских наук, доцент
Бескудниковский бульвар, 59А, Москва, 127486, Российская Федерация

ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава РФ
Майчук Дмитрий Юрьевич
доктор медицинских наук, руководитель терапевтического отдела
Бескудниковский бульвар, 59А, Москва, 127486, Российская Федерация

Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского / ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России
Руссу Леонид Иванович
научный сотрудник
ул. Гамалеи, 18, Москва, 123098, Российская Федерация

ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последилового образования» Минздрава России
Клещева Елена Александровна
кандидат медицинских наук, ассистент кафедры
ул. Баррикадная, 2/1, Москва, 123995, Российская Федерация

ГБУЗ ГКБ им. С.П. Боткина Филиал №1 Офтальмологический центр Департамента здравоохранения города
Муртазалиева Саняет Магомедовна
врач-офтальмолог
2-й Боткинский пр-д, 5, Москва, 125284, Российская Федерация

Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского / ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва
Мезенцева Марина Владимировна
доктор биологических наук, заведующий лабораторией
ул. Гамалеи, 18, Москва, 123098, Российская Федерация

ABOUT THE AUTHORS

D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F.Gamaley Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology
Suetina Irina. A
Ph.D., Leading Researcher,
Gamaleya st, 18, Moscow, 123098, Russia

S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution
Chernakova Galina. M.
Ph.D, Docent
Beskudnikovsky Boulevard, 59a, Moscow, 127486, Russia,

S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution
Maychuk Dmitry.Yu.
MD, Head of Therapy Department
Beskudnikovsky Boulevard, 59a, Moscow, 127486, Russia,

D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F.Gamaley Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology
Russu Leonid. I.
Researcher
Gamaleya st.,18, Moscow, 123098, Russia

Russian Medical Academy of Postgraduate Education
Klesheva Elena. A.
Ph.D.
2/1 Barrikadnaya St., Moscow, Russian Federation, 123995

Moscow City Clinical Hospital named after S.P. Botkin
S.M. Murtazaliev
Ophthalmologist
2-nd Botkinsky passage, 5, Moscow, 125284, Russia

D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F.Gamaley Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology
Mezentseva Marina. V.
MD, Head of the Laboratory
Gamaleya st.,18, Moscow, 123098, Russia