

## Влияние нестероидных противовоспалительных глазных капель на клетки эпителия роговицы и конъюнктивы человека в условиях *in vitro*

О.И. Александрова<sup>1</sup>И.Н. Околов<sup>2</sup>Ю.И. Хорольская<sup>1</sup>И.Е. Панова<sup>2</sup>М.И. Блинова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Тихорецкий пр. 4, Санкт-Петербург, 194064, Российская Федерация

<sup>2</sup>Санкт-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(3):251–259

**Цель:** Изучить влияние глазных капель из группы НПВС с различными консервантами на жизнеспособность эпителиальных клеток глаза человека в условиях *in vitro*. **Материалы и методы.** Объектом исследования явились четыре препарата: *Бронксинан*®, *Аньюлар ЛС*®, *Динло-Ф*®, *Индоколлир*®. В качестве тест-систем были использованы постоянные трансформированные клеточные линии конъюнктивы (*Chang Conjunctiva, Clone 1-5c-4*) и роговицы (*HCEC*) человека. Цитотоксичность капель НПВС оценивали по морфологии и функциональной активности клеток методами фазово-контрастной микроскопии (ФКМ), МТТ-теста и клеточного анализа в режиме реального времени с использованием системы xCELLigence. **Результаты.** С помощью МТТ-теста было установлено, что клетки линии *HCEC* более чувствительны к цитотоксическому действию исследуемых препаратов, чем клетки линии *Chang Conjunctiva, Clone 1-5c-4*. У клеток конъюнктивы метаболическая активность в присутствии препаратов *Аньюлар*® и *Бронксинан*® была в три раза ниже, чем в контроле; в присутствии препаратов *Индоколлир*® и *Динло-Ф*® — в 20 раз ниже, чем в контроле. Метаболическая активность у клеток роговицы в присутствии препаратов *Аньюлар*® и *Бронксинан*® была в четыре раза ниже, чем в контроле; в присутствии же препаратов *Индоколлир*® и *Динло-Ф*® жизнеспособных клеток не выявлено. Препараты *Индоколлир*® и *Динло-Ф*® оказали очень высокое токсическое действие на оба типа клеток. Результаты клеточного анализа xCELLigence для обоих типов клеток согласуются с результатами МТТ-теста и прижизненного наблюдения за клетками методом ФКМ. **Заключение.** На основании полученных данных цитотоксический потенциал глазных капель из группы НПВС представлен следующим образом (по уменьшению токсичности): *Индоколлир*® = *Динло-Ф*® > *Аньюлар*® = *Бронксинан*®.

**Ключевые слова:** клеточные культуры, xCELLigence, конъюнктура, консерванты, НПВС, роговица, цитотоксичность, эпителий глазной поверхности

**Для цитирования:** Александрова О.И., Околов И.Н., Хорольская Ю.И., Панова И.Е., Блинова М.И. О Влияние нестероидных противовоспалительных глазных капель на клетки эпителия роговицы и конъюнктивы человека в условиях *in vitro*. *Офтальмология*. 2017;14(3):251–259. DOI: 10.18008/1816-5095-2017-3-251-259

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**

## Influence of Non-steroidal Anti-inflammatory Eye Drops on the Epithelium Cells of the Cornea and Conjunctiva *in vitro*

O.I. Aleksandrova<sup>1</sup>, I.N. Okolov<sup>2</sup>, Yu.I. Khorolskaya<sup>1</sup>, I.E. Panova<sup>2</sup>, M.I. Blinova<sup>1</sup>

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

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

**ABSTRACT****Ophthalmology in Russia. 2017;14(3):251–259**

**Objective:** to evaluate the effect of NSAIDs eye drops with different preservatives on the viability of epithelial cells of human eyes *in vitro*. **Materials and methods.** The object of the study was four of the drug Broxinac®, Acular LS®, Diclo-F®, Indocollyre®. As test-systems were used permanent cell lines of transformed conjunctival (Chang Conjunctiva, Clone 1-5c-4) and corneal (HCEC). The cytotoxicity of NSAID drops were assessed by the morphology and functional cells activity by the methods of phase contrast microscopy (PCM), MTT test and cell analysis in real time using the xCELLigence system. **Results.** It was found with MTT-test that cell lines HCEC are more sensitive to the cytotoxic action of the studied drugs than cell lines of Chang Conjunctiva, Clone 1-5C-4. The metabolic activity of conjunctiva cells in the presence of drugs, Acular LS® and Broxinac® was three times lower than in control; in the presence of drugs Indocollyre® and Diclo-F® — 20 times lower vs. the control. The metabolic activity of the cornea cells e in the presence of drugs, Acular LS® and Broxinac® was four times lower than in control; in the presence of drugs Indocollyre® and Diclo-F® viable cells were not identified. Drugs Indocollyre® and Diclo-F® has had a very high toxic effect on both cell types. The results of cell analysis xCELLigence for both types of cells are consistent with the results of MTT test and *in vivo* observation of cells. **Conclusion.** Based on these data, there is the following gradation of NSAID eye drop's cytotoxic potential: (reduce toxicity): Indocollyre® = Diclo-F® > Acular LS® = Broxinac®.

**Keywords:** Cell cultures, xCELLigence, conjunctiva, preservatives, NSAID, cornea, cytotoxicity, ocular surface epithelium

**For Citation:** Aleksandrova O.I., Okolov I.N., Khorolskaya Yu.I., Panova I.E., Blinova M.I. Influence of Non-steroidal Anti-inflammatory Eye Drops on the Epithelium Cells of the Cornea and Conjunctiva *in vitro*. *Ophthalmology in Russia*. 2017;14(3):251–259. DOI: 10.18008/1816-5095-2017-3-251-259

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**

Долгое время топические кортикостероиды считались стандартом в лечении послеоперационного воспаления в офтальмологии, имея при этом ряд нежелательных проявлений, выраженных в способности замедления заживления роговицы, повышения внутриглазного давления, образования катаракты и увеличения риска развития инфекции [1]. В последнее десятилетие использование нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) в виде глазных капель резко возросло, т.к. противовоспалительное действие данной группы препаратов сопоставимо с эффектом топических кортикостероидов [2, 3]. НПВС в настоящее время широко используются в офтальмологии в лечении и профилактике воспалительных заболеваний глаз, кистозного отека сетчатки в послеоперационном периоде, предотвращении развития миоза перед фактоэмульсификацией [4]. Глазные капли НПВС нашли применение в рефракционной хирургии [5, 6], в лечении посттравматической и послеоперационной боли, а также в терапии аллергических заболеваний глаз [7, 8].

Одним из важных требований к любым лекарственным препаратам, которые используются в терапии различных заболеваний, является отсутствие повреждающего потенциала. Несмотря на то, что глазные капли НПВС являются безопасными и эффективными и значительно реже вызывают нежелательные реакции, чем глюкокортикоиды, в научной литературе имеются публикации об их побочных эффектах. Важно отметить, что возникновение большинства этих нежелательных реакций, как правило, связано с использованием НПВС off-label. По данным других исследователей, НПВС являются более цитотоксичными препаратами, чем стероиды [9]. Это может быть связано с тем, что некоторые стероидные препараты могут обладать цитопротекторным действием [10], а в составе большинства НПВС, применяемых в офтальмологии, широко используется в качестве консерванта

бензалконий хлорид (БАХ), реже — тиомерсал [11, 12]. БАХ, относящийся к категории детергентов, исторически имеет самый длительный период применения в качестве консерванта в составе глазных капель. Он обладает большим спектром антимикробной активности и широко использовался с 1940-х годов — сначала, как средство для хранения контактных линз [13], а затем в качестве консерванта практически во всех глазных каплях. Анти-септическое (бактерицидное) действие БАХ основывается на его способности разрушать клеточные мембраны, взаимодействуя с фосфолипидами и белками, что приводит к нарушению их целостности [14]. Однако цитотоксическое действие детергента, вызывающее апоптоз и некроз бактериальных клеток, может также оказывать неблагоприятное воздействие и на эпителиальные клетки конъюнктивы и роговицы, которые также восприимчивы к токсическому действию консерванта, как и бактериальные клетки [15]. В последние годы в научной литературе появились публикации, отражающие негативные стороны БАХ, входящего в состав глазных капель в различных концентрациях (0.01%–0,1%). Есть данные, что, несмотря на минимальные концентрации, применяемые в технологии производства глазных капель, БАХ оказывает токсическое действие на глазную поверхность, в том числе, на роговицу [16, 17]. Тиомерсал в настоящее время достаточно редко используется в качестве консерванта в составе глазных капель из-за его высокой токсичности. Тиомерсал в концентрации 0,004%–0,005% может вызывать реакцию гиперчувствительности, проявляющуюся в виде верхнего лимбического кератоконъюнктивита, гиперемии конъюнктивы, лимбических фолликулов, гигантского папиллярного конъюнктивита, инфильтратов роговицы, поверхностного точечного кератита, псевдодендритных повреждений роговицы, эпителиальных помутнений и неоваскуляризации [18].

Суммарные данные о возможных неблагоприятных системных и местных побочных эффектах глазных ле-

карственных форм из группы НПВС представлены в таблице 1.

**Таблица 1.** Возможные побочные действия глазных лекарственных форм из группы НПВС (%) [20].

**Tabl. 1.** Possible adverse event of ophthalmic medicinal forms from the Nonsteroidal antiinflammatory drug group [20].

Побочное действие Adverse Event	Бромфенак Bromfenac	Диклофенак Diclofenac	Кеторалак Ketorolac	Непафенак Nepafenac
Сердечно-сосудистая система Cardiovascular				
отек лица facial edema	-	≤3	-	-
повышение АД hypertension	-	-	-	1-4
ЦНС Central Nervous System				
лихорадка fever	-	≤3	-	-
головная боль headache	2-7	≤3	1-5	1-4
бессонница insomnia	-	≤3	-	-
боль pain	-	≤3	-	-
ЖКТ Gastrointestinal				
боль в животе abdominal pain	-	≤3	-	-
тошнота nausea	-	≤3	-	1-4
рвота vomiting	-	≤3	-	1-4
Опорно-двигательный аппарат Musculoskeletal				
боль pain	-	≤3	-	-
снижение тонуса мышц weakness	-	≤3	-	-
Глазные проявления Ophthalmic				
нарушение зрительного восприятия abnormal sensation	2-7	-	-	5-10
снижение остроты зрения abnormal vision	-	5	≤1	5-10
аллергия allergy	-	5	-	-
помутнение задней капсулы хрусталика capsular opacity	-	-	-	5-10
отек конъюнктивы conjunctival edema	-	-	-	1-5
гиперемия конъюнктивы conjunctival hyperemia	2-7	-	1-5	1-5
точечный кератит corneal deposits	-	5	1-5	-
отек роговицы corneal edema	-	5	1-10	1-5
инфильтрат роговицы corneal infiltrates	-	•	1-5	-

Побочное действие Adverse Event	Бромфенак Bromfenac	Диклофенак Diclofenac	Кеторалак Ketorolac	Непафенак Nepafenac
Глазные проявления Ophthalmic				
помутнение роговицы corneal opacity	-	5	-	-
ССГ dry eye	-	-	≤1	1-5
отек edema	-	-	1-5	-
припухлость век eyelid swelling	-	5	-	-
инфекция infection	-	5	1-10	-
воспаление inflammation	-	-	1-10	-
повышение ВГД intraocular pressure increased	-	15	-	5-10
ирит iritis	2-7	5	1-10	-
раздражение irritation	2-7	5	1-10	1-5
кератит keratitis	-	28	-	-
слезотечение lacrimation	-	30	-	1-5
краевой блефарит lid margin crusting	-	-	-	1-5
боль pain	2-7	-	1-10	1-5
светобоязнь photophobia	-	-	-	1-5
зуд pruritus	2-7	5	-	1-5
покраснение redness	2-7	-	-	-
поверхностный кератит superficial keratitis	-	•	1-10	-
жжение, покалывание transient burning, stinging	2-7	15	20-40	-
деструкция стекловидного тела vitreous detachment	-	-	-	1-5
Прочие проявления Other				
аллергия allergic reaction	-	-	1-10	1-10
вирусные инфекции viral infection	-	≤3	-	-
ринит rhinitis	-	≤3	-	-
синусит sinusitis	-	-	-	1-4

• Нет данных data is absent

- Нет данных или частота побочного действия меньше 1%.

- data is absent or the side effect frequency is less than 1%.

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 новых и уже существующих лекарственных препаратов в последнее время все чаще находят применение тест-системы *in vitro* с использованием монослойных клеточных культур [21, 22]. 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 его влияния на жизнеспособность клеток [23].

Целью настоящей работы явился анализ влияния глазных лекарственных форм из группы НПВС с различными консервантами на жизнеспособность эпителиальных клеток глаза человека в условиях *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Исследуемые препараты.** В данном исследовании представлена сравнительная оценка цитотоксичности четырех глазных форм НПВС: *Броксинак*<sup>®</sup> «Сентисс Фарма Пвт. Лтд.», Индия (БАХ 0,05 мг/мл); *Акьюлар*<sup>®</sup> ЛС «Аллерган Сейлс ЛЛС», США (БАХ 0,06 мг/мл); *Дикло-Ф*<sup>®</sup> «Сентисс Фарма Пвт. Лтд.», Индия (БАХ 0,1 мг/мл); *Индоколлир*<sup>®</sup> «Лаборатория Шовен», Франция (Тиомерсал 0,05 мг/мл).

**Используемые клеточные культуры.** В качестве модельных тест-систем были использованы трансформированные клетки нормальных тканей глаза человека: постоянные клеточные линии конъюнктивы (*Chang Conjunctiva*, *Clone 1-5c-4*) и роговицы (*HCEC*).

**Стандартные условия культивирования.** Клетки культивировали при 37°C в CO<sub>2</sub> инкубаторе в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в соответствующих питательных средах. Для клеток линии *Chang Conjunctiva*, *Clone 1-5c-4* это была среда Игла MEM («Биолот», Россия), содержащая 10% FBS («HyClone», США), для клеток линии *HCEC* — среда Keratinocyte-SFM (Gibco, США), содержащая 15% FBS («HyClone», США).

**Дизайн и методы исследования.** Влияние НПВС на жизнеспособность клеток эпителия конъюнктивы и роговицы человека изучали в условиях *in vitro* в процессе культивирования клеток в соответствующей питательной среде, содержащей исследуемые препараты в концентрации 3% от объема среды. Выбор концентрации НПВС для эксперимента базировался на данных клинического использования исследуемых препаратов и собственных исследований цитотоксического действия глазных капель в отношении культивируемых клеток [24,25,26,27].

Жизнеспособность клеток оценивали по их морфологии и функциональной активности с использованием метода фазово-контрастной микроскопии (ФКМ), МТТ-теста и системы xCELLigence.

**Метод фазово-контрастной микроскопии (ФКМ).** Метод прижизненного наблюдения под инвертированным микроскопом позволяет визуально оценить морфо-

логическое состояние клеток в процессе их культивирования в данных условиях и сравнить с контрольным вариантом. Прижизненное наблюдение с фотофиксацией в процессе культивирования клеток осуществляли под инвертированным микроскопом Nikon Eclipse TS100, оснащенным фотокамерой.

**МТТ-тест.** МТТ-тест широко известен, как скрининговый метод измерения выживаемости клеток и включенный в большинство протоколов методов молекулярной биологии и медицины, который позволяет оценить метаболическую активность клеток в данных условиях культивирования [28, 29]. Метод основан на способности дегидрогеназ живых клеток превращать желтый водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазаолин-2)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) в голубые кристаллы формазана, нерастворимые в воде. Количество образовавшегося формазана (определяемое колориметрическим методом после его растворения в органических растворителях) характеризует интенсивность окислительно-восстановительных процессов в клетках. Только клетки с живыми митохондриями могут осуществлять эту реакцию, следовательно, интенсивность окраски напрямую связана со степенью неповрежденности митохондрий. Измерение концентрации формазана в растворе после взаимодействия с диметилсульфоксидом (ДМСО) позволяет оценить количество жизнеспособных клеток. Для анализа метаболической активности клеток при помощи МТТ-теста клетки высевали в 96-луночные планшеты в 200 мкл соответствующей питательной среды. Исследуемые НПВС добавляли в питательную среду в момент посева клеток. Культивирование проводили при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Срок культивирования — 3 суток. Контролем служили клетки линий *Chang Conjunctiva*, *Clone 1-5c-4* и *HCEC*, 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 CO<sub>2</sub>-инкубатор на 2 час, после этого 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 референсной длине волны 630 нм.

Математическую обработку полученных данных проводили методами вариационной статистики при помощи программы Microsoft Excel 2007 с определением показателей: среднего значения (M), ошибки среднего (m), достоверности различий между группами сравнения с вычислением критерия Стьюдента (t) и уровня значимости (α), доверительного интервала (p). Различия считали достоверными при p<0,05. За 100%-ную жизнеспособность принимали интенсивность окраски в лунках с клетками, культивировавшимися без НПВС.

**Система xCELLigence.** Технология xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) основана на использовании

микроэлектронных клеточных сенсоров, интегрированных в дно лунок специальных культуральных планшетов (E-Plate). Сопротивление, измеренное между электродами в отдельной лунке, зависит от геометрии электрода, концентрации ионов в лунке и от того, прикреплены ли к электродам клетки. В отсутствие клеток сопротивление электрода в основном определяется ионной средой как на границе раздела электрод/раствор, так и во всем объеме. Клетки, прикрепленные к поверхностям электродов, действуют как изоляторы и таким образом изменяют локальную ионную среду на границе раздела электрод/раствор, что приводит к увеличению сопротивления. Таким образом, чем больше клеток, которые распластаны на электродах, тем больше значение сопротивления электродов. Присутствие клеток на электродах в лунках планшета E-Plate влияет на локальное состояние ионного окружения, что приводит к изменению сопротивления на электродах. Величина Cell Index (клеточный индекс) является показателем электрического потенциала, который отражает статус клеток. Cell Index можно использовать для наблюдения в режиме реального времени за жизнеспособностью клеток: их морфологией, степенью адгезии, динамикой роста клеточных культур (пролиферацией) и другими важными параметрами [30].

Для оценки влияния НПВС на пролиферативную активность клеток линий при помощи системы xCELLigence перед началом эксперимента вносили по 100 мкл питательной среды в каждую лунку 16-луночного планшета E-plate (Roche) и устанавливали фоновое значение (вычитание влияния культуральной среды/среды с исследуемым веществом на значение импеданса прибора). Затем высевали по  $1 \times 10^4$  клеток на лунку планшета E-plate в 100 мкл соответствующей питательной среды. Планшеты помещали в клеточный анализатор RTCA-DP (The Real-Time Cell Analyzer Dual Purpose) ACEA Biosciences и мониторировали динамику адгезии клеток в режиме реального времени в течение 2 часов. Затем проводили замену исходной среды в лунках E-plate на соответствующую среду, содержащую исследуемые НПВС в концентрации 3%, возвращали в RTCA Station и анализировали влияние НПВС на динамику пролиферации клеток в режиме реального времени в течение 40 часов. Анализ результатов выполняли с помощью программного обеспечения RTCA Software 1.2.1 (Roche). Изменение импеданса на микроэлектродах, обусловленного прикреплением и распластыванием клеток, выражали как Cell Index (клеточный индекс), величина которого автоматически вычисляется программой:  $\text{Cell Index} = (\text{RnRb})/t$ , где Rb — исходное значение импеданса в лунке, содержащей только ростовую для клеток среду (отрицательный контроль), Rn — значение импеданса в любое время t в лунке, содержащей помимо ростовой среды тестируемые клетки (контроль). Клеточный индекс, таким образом, отражает изменения количества клеток, качества прикреп-

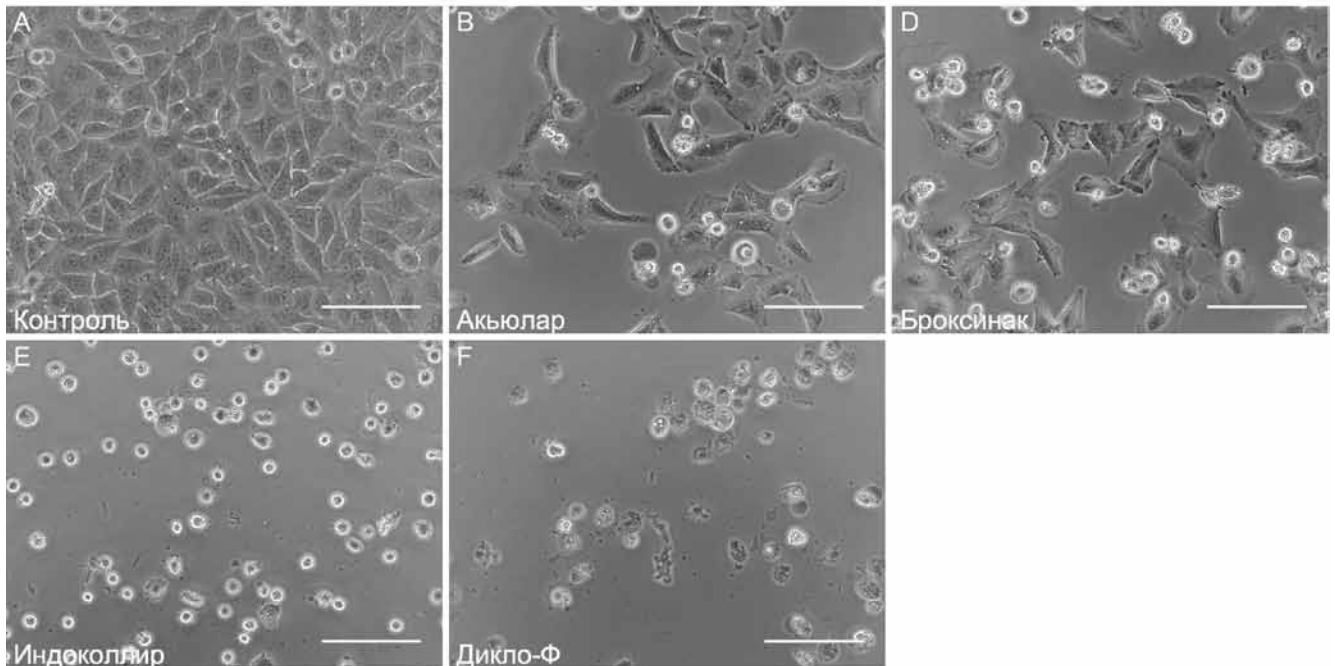
ления клеток и морфологию клеток в лунке, которые могут меняться во времени. Данные представляли в виде среднего значения (M)  $\pm$  стандартное отклонение, достоверность различий рассчитывали по U-критерию Манна Уитни и считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты прижизненного наблюдения за морфологическим состоянием клеток линий *Chang Conjunctiva*, *Clone 1-5c-4* и *HCEC* в процессе их культивирования в средах, содержащих 3% глазной формы НПВС, приведены на Рис. 1–2. На представленных фотографиях клетки конъюнктивы и роговицы человека в контрольном варианте имеют типичную эпителиоподобную морфологию и на 3-и сутки культивирования сформировали конфлюэнтный монослой. При культивировании обоих типов клеток в средах, содержащих 3% исследуемого НПВС, монослой сформирован не был. В присутствии препаратов *Акьюлар*<sup>®</sup> и *Броксинак*<sup>®</sup> клетки адгезировали, но их было меньше и распластаны они хуже, чем в контроле; выявлено много округлых и вытянутых клеток. Структура клеток зернистая, с вакуолями, что является признаком их угнетенного состояния. Наиболее выражены эти морфологические изменения были у клеток роговицы. В присутствии препаратов *Индоколлир*<sup>®</sup> и *Дикло-Ф*<sup>®</sup> все клетки линий *Chang Conjunctiva*, *Clone 1-5c-4* и *HCEC* имели округлую форму; большая часть клеток открепилась от дна культурального сосуда. В варианте с препаратом *Индоколлир*<sup>®</sup> наблюдалось уменьшение объема клеток и сморщивание цитоплазматической мембраны. В присутствии препарата *Дикло-Ф*<sup>®</sup> клетки, напротив, были разбухшими. В обоих вариантах клетки имели зернистую структуру и очень сильно были вакуолизированы. В питательной среде выявлено большое количество артефактов, которые могли являться фрагментами погибших клеток. Можно предположить, что присутствие данных препаратов в питательной среде активировало различные механизмы клеточной гибели за счет действия консервантов, принадлежащих к различным химическим классам.

Полученные в процессе прижизненного наблюдения данные о морфологическом состоянии клеток позволяют сделать вывод, что исследуемые препараты, присутствуя в питательной среде в концентрации 3% от её объема, оказывают на клетки линий *Chang Conjunctiva*, *Clone 1-5c-4* и *HCEC* цитотоксическое действие разной степени. Клетки роговицы более чувствительны к цитотоксическому действию изучаемых НПВС, чем клетки конъюнктивы. Наиболее токсичное действие на оба типа клеток оказали препараты *Индоколлир*<sup>®</sup> и *Дикло-Ф*<sup>®</sup>. МТТ-тест выявил различия во влиянии исследуемых НПВС на метаболическую активность клеток эпителия конъюнктивы и роговицы. Результаты МТТ-теста представлены в виде гистограмм, где количество жизнеспособных клеток, культивируемых в питательных средах с добавлением глазных капель, выражено в процентах по

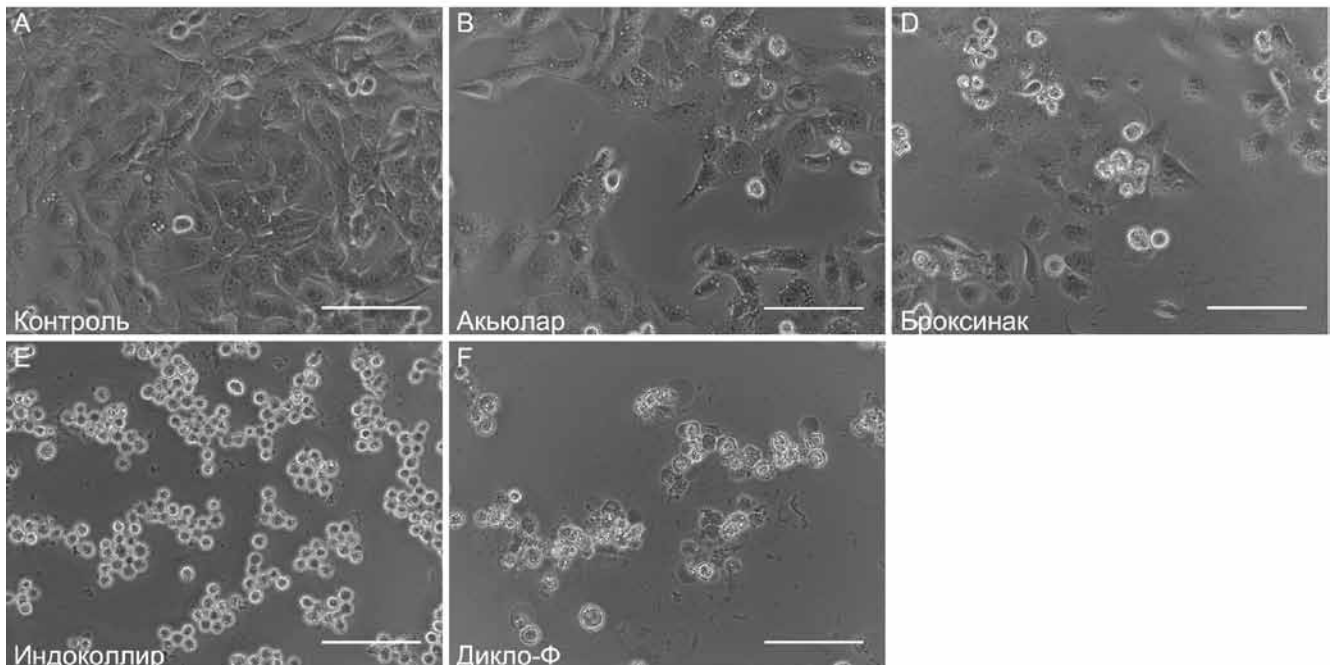
### Клетки конъюнктивы человека. Культивирование в среде, содержащей исследуемые препараты в концентрации 3% от объема питательной среды.



**Рис. 1.** Морфология клеток линии Chang Conjunctiva, Clone 1-5c-4 на 3-и сутки культивирования в питательной среде, содержащей 3% тестируемых НПВС, добавленных в среду в момент посева клеток; (X20). ФКМ

**Fig. 1.** Morphology of cells of the Chang Conjunctiva line, Clone 1-5c-4 on the 3rd day of cultivation in a nutrient medium containing 3% of the tested NSAIDs added to the medium at the time of seeding cells; (X20). PCM

### Клетки роговицы человека. Культивирование в среде, содержащей исследуемые препараты в концентрации 3% от объема питательной среды.

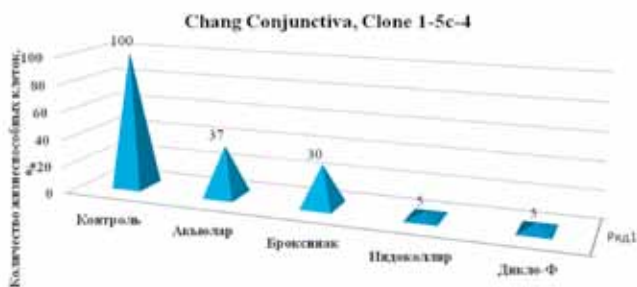


**Рис. 2.** Морфология клеток линии HCEC на 3-и сутки культивирования в питательной среде, содержащей 3% тестируемых НПВС, добавленных в среду в момент посева клеток; (X20). Фазово-контрастная микроскопия (ФКМ)

**Fig. 2.** Morphology of HCEC line cells on the 3rd day of cultivation in a culture medium containing 3% of the tested NSAIDs added to the medium at the time of seeding cells; (X20). Phase contrast microscopy (PCM)

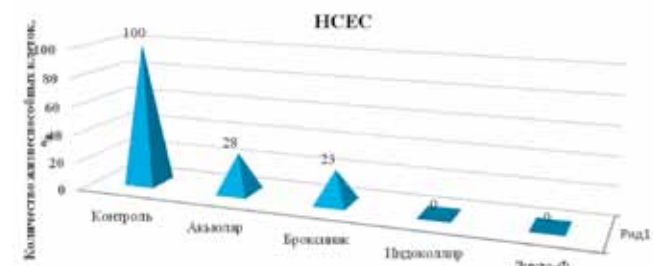
отношению к контролю (Рис. 3 и Рис. 4). Данные МТТ-теста подтвердили результаты, полученные при оценке морфологии клеток, о более высокой чувствительности к цитотоксическому действию исследуемых препаратов клеток роговицы, по сравнению с клетками конъюнктивы. У клеток конъюнктивы метаболическая активность в присутствии препаратов *Акьюлар*<sup>®</sup> и *Броксинак*<sup>®</sup> была в три раза ниже, чем в контроле; в присутствии препаратов *Индоколлир*<sup>®</sup> и *Дикло-Ф*<sup>®</sup> — в 20 раз ниже, чем в контроле (Рис. 3). Метаболическая активность у клеток роговицы в присутствии препаратов *Акьюлар*<sup>®</sup> и *Броксинак*<sup>®</sup> была в четыре раза ниже, чем в контроле; в присутствии препаратов *Индоколлир*<sup>®</sup> и *Дикло-Ф*<sup>®</sup> жизнеспособных клеток не выявлено (Рис. 4). Непрерывный мониторинг относительно влияния НПВС на клетки линий *Chang Conjunctiva*, *Clone 1-5c-4* и *HCEC* в режиме реального времени при помощи системы *xCELLigence* выявил, что исследуемые препараты в концентрации 3% от объема питательной среды проявляют различную степень токсичности в отношении культивируемых клеток. В ходе мониторинга были получены графики зависимо-

сти клеточного индекса (Cell Index) от времени культивирования клеток, позволяющие судить о жизнеспособности клеток (степени их распластанности и пролиферативной активности) (Рис. 5 и Рис. 6). Эпителиальные клетки роговицы оказались более чувствительны к цитотоксическому действию исследуемых препаратов, чем клетки конъюнктивы. Пролиферативная активность клеток обоих типов в присутствии препаратов *Акьюлар*<sup>®</sup> и *Броксинак*<sup>®</sup> оказалась ниже, чем в контроле. Причём, жизнеспособность клеток роговицы стала отличаться от контроля через пять часов после добавления этих препаратов. Жизнеспособность клеток конъюнктивы в эти сроки была сопоставима с контролем и стала отличаться от него только через восемь часов. Препараты *Индоколлир*<sup>®</sup> и *Дикло-Ф*<sup>®</sup> оказали очень высокое токсическое действие на оба типа клеток. Жизнеспособность клеток конъюнктивы в присутствии этих препаратов была ниже, чем в контроле уже в впервые часы после добавления препаратов в питательную среду, а жизнеспособных клеток роговицы в эти же сроки наблюдения не выявлено вообще.



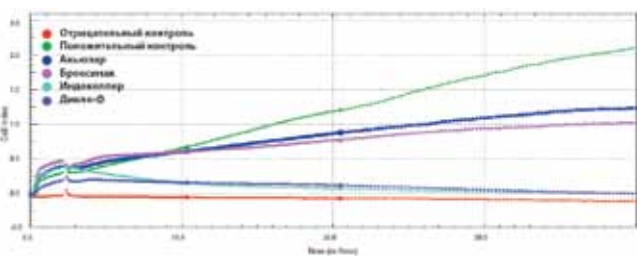
**Рис. 3.** Гистограммы оценки жизнеспособности эпителиальных клеток конъюнктивы человека на 3-и сутки культивирования в питательной среде, содержащей 3% тестируемых НПВС, добавленных в среду в момент посева клеток. МТТ-тест

**Fig. 3.** Histograms of the evaluation of the viability of epithelial cells of a human conjunctiva on the 3rd day of cultivation in a nutrient medium containing 3% of the tested NSAIDs added to the medium at the time of seeding cells. MTT test



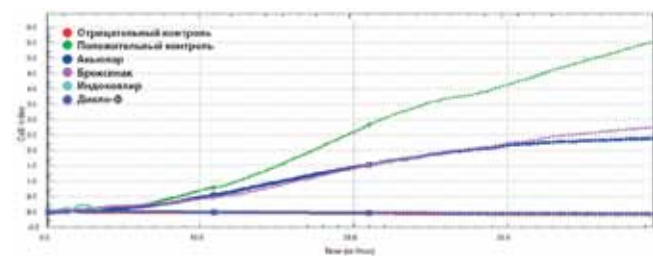
**Рис. 5.** Гистограмма оценки жизнеспособности эпителиальных клеток роговицы человека на 3-и сутки культивирования в питательной среде, содержащей 3% тестируемых НПВС, добавленных в среду в момент посева клеток. МТТ-тест

**Fig. 5.** Histogram of the evaluation of the viability of human corneal epithelial cells on the 3rd day of cultivation in a nutrient medium containing 3% of the tested NSAIDs added to the medium at the time of seeding cells. MTT test



**Рис. 4.** Мониторинг влияния НПВС на жизнеспособность эпителиальных клеток конъюнктивы в режиме реального времени. Концентрация НПВС 3% от объема питательной среды. Препараты добавляли в питательную среду после адгезии клеток. Клеточный анализ *xCELLigence*

**Fig. 4.** Monitoring the effect of NSAIDs on the viability of conjunctival epithelial cells in real time. The concentration of NSAIDs is 3% of the volume of the nutrient medium. The preparations were added to the nutrient medium after cell adhesion. Cell analysis *xCELLigence*



**Рис. 6.** Мониторинг влияния НПВС на жизнеспособность эпителиальных клеток роговицы в режиме реального времени. Концентрация НПВС 3% от объема питательной среды. Препараты добавляли в питательную среду после адгезии клеток. Клеточный анализ *xCELLigence*

**Fig. 6.** Monitoring the effect of NSAIDs on the viability of epithelial cells in the cornea in real time. The concentration of NSAIDs is 3% of the volume of the nutrient medium. The preparations were added to the nutrient medium after cell adhesion. Cell analysis *xCELLigence*

Таким образом, результаты клеточного анализа xCELLigence для обоих типов клеток согласуются с данными МТТ-теста и анализом морфологического состояния клеток при помощи методов ФКМ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основываясь на результатах собственных исследований, большого числа публикаций в зарубежной литературе, посвященных изучению цитотоксичности глазных капель, в том числе и НПВС, можно предположить, что возникновение послеоперационных лекарственно-индуцированных эпителиопатий, а также других нежелательных реакций со стороны глазной поверхности, наиболее вероятно, может быть связано с действием отдельных видов консервантов. В последнее время практически не применяя в качестве консервантов производные ртути (тиомерсал), борную кислоту и бораты, поскольку эти вещества, как известно, обладают выраженным токсическим действием на глазную поверхность. Более безопас-

ными считаются хлоргексидин, хлорбутанол и БАХ в небольших концентрациях. Цитотоксический потенциал протестированных в данной работе глазных капель из группы НПВС распределился следующим образом (по уменьшению токсичности): Индоколлир® = Дикло-Ф® > Акьюлар® = Броксинак®. Исследования влияния офтальмологических препаратов на жизнеспособность клеток тканей глаза в условиях *in vitro* могут способствовать правильному подбору глазных капель, при использовании которых в комплексной терапии глазной патологии минимизируется риск реализации цитотоксических эффектов консервантов, входящих в их состав.

## УЧАСТИЕ АВТОРОВ

Александрова Ольга Игоревна — сбор и обработка материала; написание текста; подготовка иллюстраций.

Околов Игорь Николаевич — концепция и дизайн исследования; написание текста.

Хорольская Юлия Игоревна — статистическая обработка; подготовка иллюстраций.

Панова Ирина Евгеньевна — редактирование

Блинова Миральда Ивановна — редактирование

## ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

- Chan C., Lam D. The comparison of efficacies of topical corticosteroids and nonsteroidal anti-inflammatory drops on dry eye patients: a clinical and immunocytochemical study. *Am J Ophthalmol.* 2004;137:1157-1158. DOI: 10.1016/j.ajo.2004.01.038
- Lee J., Jung W., Choi Y., Kim Y. The effects of steroids and nonsteroidal anti-inflammatory agents on proliferation of human ocular fibroblast. *J Korean Ophthalmol Soc.* 1999;40:1496-1502.
- Yülek F., Ozdek S., Gürelik G., Hasanreisöglu B. Effect of topical steroids on corneal epithelial healing after vitreoretinal surgery. *Acta Ophthalmol Scand.* 2006;84:319-322. DOI: 10.1111/j.1600-0420.2005.00632.x
- Nowak J. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in ophthalmology: pharmacological and clinical characteristics. *Mil Pharm Med.* 2012;5:4:33-50.
- Иошин И.Э., Хачатрян Г.Т., Артамонова А.В., Молчанова Е.А. Нестероидные противовоспалительные средства в коррекции послеоперационного периода при рефракционной хирургии. [Ioshin I. E., Khachatryan G. T., Artamonova A. V., Molchanova E. A. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in correction the postoperative period in refractive surgery Cataract & Refractive Surgery=Kataraktal'naja i refrakcionnaja hirurgija. 2013;13;3:24-30. (In Russ.)].
- Shorstein N., Liu L., Waxman M., Herrinton L. Comparative effectiveness of three prophylactic strategies to prevent clinical macular edema following phacoe multification surgery. *Ophthalmology.* 2015;122:12:2450-2456. DOI: 10.1016/j.ophtha.2015.08.024
- Dehar N., Gupta A., Singh G. Comparative study of the ocular efficacy and safety of diclofenac sodium (0.1%) ophthalmic solution with that of ketorolac tromethamine (0.5%) ophthalmic solution in patients with acute seasonal allergic conjunctivitis. *International Journal of Applied and Basic Medical Research.* 2012;2:1:25-30. DOI:10.4103/2229-516X.96799.
- Razmjou H., Khalilian A., Peyman A., Abtahi S., Abtahi M., Akbari M., Sadri L. Preoperative Topical Diclofenac and Ketorolac in Prevention of Pain and Discomfort Following Photorefractive Keratectomy: A Randomized Double-masked Placebo-controlled Clinical Trial. *International Journal of Preventive Medicine.* 2012;3:11:199-206.
- Ayaki M., Taguchi Y., Soda M., Yaguchi S., Iwasawa A., Koide R. Cytotoxicity of topical medications used for infection and inflammation control after cataract surgery in cultured corneal endothelial cells. *Biocontrol Sci.* 2010;15:3:97-102.
- Naumann U., Durka S., Weller M. Dexamethasone-mediated protection from drug cytotoxicity: association with p21 WAF1/CIP1 protein accumulation? *Oncogene.* 1998;17:12:1567-1575.
- Ayaki M., Iwasawa A. Critical concentration of benzalkonium chloride in eye drop for toxicity in cultured ocular surface cell lines [abstract]. *Investigative Ophthalmology and Visual Science.* 2011;52:1955.
- Pauly A., Brasnu E., Riancho L., Brignole-Baudouin F., Baudouin C. Multiple endpoint analysis of BAC-preserved and unpreserved antiallergic eye drops on a 3D-reconstituted corneal epithelial model. *Mol Vis.* 2010;17:745-755.
- Domagk G. Eine neue Klasse von Desinfektionsmitteln. *Deutsche Medizin Wissenschaftler.* 1935;61:829-832.
- Baudouin C. Detrimental effect of preservatives in eyedrops: implications for the treatment of glaucoma. *Acta Ophthalmol.* 2008; 86:16-726. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2008.01250.x
- De Saint Jean., Brignole F., Bringuier A., Bauchet A., Feldmann G., Baudouin C. Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:3:619-630.
- Ichijima H., Petroll W., Jester J., Cavanagh H. Confocal microscopic studies of living rabbit cornea treated with benzalkonium chloride. *Cornea.* 1992;11:221-225.
- Pauly A., Meloni M., Brignole-Baudouin F., Warnet J.M., Baudouin C. Multiple endpoint analysis of the 3D-reconstituted corneal epithelium after treatment with benzalkonium chloride: early detection of toxic damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009;50:1644-1652. DOI: 10.1167/iov.08-2992
- Fisher A. Allergic reactions to merthiolate (thimerosal). *Cutis.* 1981; 27:6:580: 582-587.
- Sertoli A., Di Fonzo, Spallanzani P., Panconesi E. Allergic contact dermatitis from thimerosal in a soft contact lens wearer. *Contact Dermatitis.* 1980;6:4:292-293.
- Therapeutic Class Review Ophthalmic Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs at: [http://one.aao.org/CE/PracticeGuidelines/PPP\\_Content.aspx?cid=0f20807f-bc61-4f11-b570-01ae26990edb](http://one.aao.org/CE/PracticeGuidelines/PPP_Content.aspx?cid=0f20807f-bc61-4f11-b570-01ae26990edb)
- Данченко Е.О. Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций с использованием клеточных культур. [Danchenko E.O. Evaluation of cytotoxicity of pharmaceutical substances using cell cultures. Immunopathology, allergology, infectology=*Immunopatologija, Allergologija, Infekologija.* 2012;2:22-31(In Russ.)]
- Еропкина М.Ю., Еропкина Е.М. Клеточные культуры как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов. СПб.: Морсар, 2003. [Eropkina 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.)].
- Аникина Л.В., Пухов С.А., Дубровская Е.С., Афанасьева С.В., Клочков С.Г. Сравнительное определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ и резазурина. 2014;12:1423-1427. [Anikina L.V., Puhov S.A., Dubrovskaja E.S., Afanasjeva S.V., Klochkov S.G. Comparative determination of cell viability using the MTT and Resazurin. Fundamental research=*Fundamental'nye issledovaniya.* 2014;12:1423-1427. (In Russ.)]
- Александрова О.И., Околов И.Н., Тахтаев Ю.В., Хорольская Ю.И., Хинтуба Т.С., Блинова М.И. Сравнительная оценка цитотоксичности антимикробных глазных капель. 2015;8:1:89-97. [Aleksandrova O.I., Okolov I.N., Tahtaev Ju.V., Horol'skaja Ju.I., Hintsuba T.S., Blinova M.I. Comparative evaluation of the cytotoxicity of antimicrobial eye drops. *Ophthalmology journal=Ofal'mologicheskije vedomosti.* 2015;8:1:89-97. (In Russ.)].
- Александрова О.И., Хорольская Ю.И., Майчук Д.Ю., Блинова М.И. Исследование общей цитотоксичности антибиотиков аминогликозидного и флюорохинолонового ряда на клеточных культурах. 2015;5:39-48. [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. *Annals of Ophthalmology=Vestnik ofal'mologii* 2015;5:39-48. (In Russ.)] DOI: 10.17116/ofal'ma2015131543-53
- Александрова О.И., Околов И.Н., Хорольская Ю.И., Блинова М.И., Чураков Т.А. Оценка влияния бензалкония хлорид на цитотоксичность глазных капель неттатин и тобрекс в условиях *in vitro*. 2016;3:163-166. [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*. [Modern technologies in ophthalmology=*Sovremennye tekhnologii v ofal'mologii.* 2016;3:163-166. (In Russ.)]
- Александрова О.И., Околов И.Н., Хорольская Ю.И., Панова И.Е., Блинова М.И. Оценка цитотоксичности слезозаместительных препаратов с использованием системы *in vitro*. 2017;14(1):59-66. [Aleksandrova O.I., Okolov I.N., Horol'skaja Ju.I., Panova I.E., Blinova M.I. Cytotoxicity Evaluation of Tear



- Substitutes Using in vitro System. *Ophthalmology in Russia=Oftal'mologija*. 2017;14(1):59–66. (In Russ.) DOI: 10.18008/1816-5095-2017-1-59-66.
28. Cancer cell culture: methods and protocols / Ser. Methods in Molecular Medicine. (Ed. S.P. Langdon). Totowa, NJ: Humana Press, 2003;88:165-169.
29. In vitro toxicity testing protocols / Ser. Methods in Molecular Biology. (Eds S.O'Hare, C.K. Atterwill). Totowa, NJ: Humana Press, 1995;43:138–149.
30. Urcan E., Haertel U., Styllou M., Hickel R., Scherthan H., Reichl F. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dent Mater*. 2010;26:1:51-58. DOI: 10.1016/j.dental.2009.08.007.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

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

Санкт-Петербургский филиал ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова МЗ РФ  
Околов Игорь Николаевич — к.м.н., заведующий клинично-бактериологической лабораторией  
ул. Я. Гашека, 21, Санкт-Петербург, 192283,  
Российская Федерация

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

Санкт-Петербургский филиал ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова МЗ РФ  
Панова Ирина Евгеньевна  
доктор медицинских наук, профессор, зам. директора по научной работе  
ул. Я. Гашека, 21, Санкт-Петербург, 192283,

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

## ABOUT THE AUTHORS

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

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

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

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

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