

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, СНИЖАЮЩИХ ВНУТРИГЛАЗНОЕ ДАВЛЕНИЕ, НА ПЕРВИЧНУЮ КУЛЬТУРУ ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА И ИММОРТАЛИЗОВАННУЮ КЛЕТОЧНУЮ ЛИНИЮ A549

Фисенко Н.В.¹,
Суббот А.М.¹,
Юсеф Юсеф^{1,2},
Осипян Г.А.¹,
Панова А.Д.^{1,3},
Аглямудинов Р.Р.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова» (119021, г. Москва, ул. Россолимо, 11, корп. А, Б, Россия)

² ФGAOY BO «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) (119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2, Россия)

³ ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (123098, г. Москва, ул. Гамалеи, 18, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Фисенко Наталья Владимировна,
e-mail: natfisenko@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Глаукома как одно из наиболее распространённых глазных заболеваний может быть коморбидным состоянием эпителиального дефекта роговицы различной этиологии. Поддержание оптимального уровня офтальмотонуса включает в себя назначение гипотензивных лекарственных препаратов (ЛП), в том числе содержащих бензалкония хлорид (БХ).

Цель исследования. Сравнить влияние гипотензивных лекарственных препаратов, а также бензалкония хлорида на первичную культуру эпителия роговицы человека и immortalized клеточную линию A549.

Методы. Влияние бримонидина, дорзоламида и тимолола (разведения 1/100, 1/50, 1/20, 1/10; экспозиция 24 ч) на монослой первичной культуры эпителия роговицы человека (ЭпК) и immortalized клеточной линии A549 оценивали по структурным изменениям клеток (фазово-контрастная микроскопия) и данным МТТ-теста. Цитотоксический эффект БХ изучали в концентрациях, соответствующих его содержанию в этих разведениях ЛП. На модели линейного дефекта монослоя первичной культуры эпителия роговицы и immortalized клеточной линии A549 по миграционной активности клеток оценивали действие бримонидина, дорзоламида и тимолола (разведения 1/100, 1/20; экспозиция 48 ч).

Результаты. Среди ЛП (без БХ) дорзоламид (разведения 1/50, 1/20, 1/10) приводит к незначительным структурным изменениям ЭпК и immortalized клеток линии A549, тимолол (разведения 1/100, 1/50, 1/20, 1/10) – к незначительным структурным изменениям immortalized клеток линии A549. Структурные изменения обоих типов клеток, снижение их метаболической и миграционной активности возникают под действием дорзоламида, бримонидина и тимолола (с БХ) в разведениях 1/100, 1/50, 1/20, 1/10. БХ в изученных концентрациях проявляет сходный эффект.

Заключение. Цитотоксическое действие гипотензивных ЛП вызвано наличием БХ в их составе. Несмотря на сходные морфофункциональные изменения клеток, immortalized клеточная линия A549 более устойчива к воздействию ЛП, чем первичная культура эпителия роговицы человека. При использовании её как клеточной модели целесообразно изменение условий эксперимента (длительность экспозиции и концентрация исследуемого ЛП).

Ключевые слова: бримонидин, дорзоламид, тимолол, бензалкония хлорид, первичная культура эпителия роговицы, immortalized клеточная линия A549, цитотоксичность

Для цитирования: Фисенко Н.В., Суббот А.М., Юсеф Юсеф, Осипян Г.А., Панова А.Д., Аглямудинов Р.Р. Сравнительный анализ влияния лекарственных препаратов, снижающих внутриглазное давление, на первичную культуру эпителия роговицы человека и immortalized клеточную линию A549. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(2): 35-49. doi: 10.29413/ABS.2024-9.2.4

Статья поступила: 24.12.2023

Статья принята: 25.04.2024

Статья опубликована: 31.05.2024

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFECT OF DRUGS LOWERING INTRAOCULAR PRESSURE ON A PRIMARY CULTURE OF HUMAN CORNEAL EPITHELIUM AND A549 IMMORTALIZED CELL LINE

Fisenko N.V.¹,
Subbot A.M.¹,
Yusef Yusef^{1,2},
Osipyan G.A.¹,
Panova A.D.^{1,3},
Agliautdinov R.R.¹

¹ M.M. Krasnov Research Institute of Eye Diseases (Rossolimo str. 11A, B, Moscow 119021, Russian Federation)

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) (Trubetskaya str. 8, building 2, Moscow 119991, Russian Federation)

³ The Gamaleya National Center of Epidemiology and Microbiology (Gamaleya str. 18, Moscow 123098, Russian Federation)

Corresponding author:
Natalia V. Fisenko,
e-mail: natfisenko@mail.ru

ABSTRACT

Background. Glaucoma as one of the most common eye diseases can be a comorbid condition of an epithelial corneal defect of various etiologies. Maintaining an optimal level of ophthalmotonus includes the prescription of antiglaucoma drugs, including benzalkonium chloride-preserved drugs.

The aim of the study. To compare the effect of antiglaucoma drugs, as well as benzalkonium chloride (BC), on a primary culture of human corneal epithelium and A549 immortalized cell line.

Methods. The effect of brimonidine, dorzolamide and timolol (1/100, 1/50, 1/20 and 1/10 dilutions; exposure 24 hours) on a monolayer of a human corneal epithelial primary culture and A549 immortalized cell line was assessed by structural changes in cells (phase-contrast microscopy) and MTT assay data. The cytotoxic effect of BC was studied in concentrations corresponding to its content in these dilutions of the antiglaucoma drug. Using a model of a linear defect in the monolayer of a corneal epithelial primary culture and A549 immortalized cell line, the effects of brimonidine, dorzolamide and timolol (1/100 and 1/20 dilutions; exposure 48 hours) were assessed by cell migration activity.

Results. Among drugs (BC-free), dorzolamide (1/50, 1/20 and 1/10 dilutions) causes minor structural changes in human corneal epithelium and A549 immortalized cell line; timolol (1/100, 1/50, 1/20 and 1/10 dilutions) causes minor structural changes in A549 immortalized cell line. Structural changes in both types of cells, a decrease in their metabolic and migration activity occur under the influence of dorzolamide, brimonidine and timolol (BC-preserved) in 1/100, 1/50, 1/20 and 1/10 dilutions. BC at the studied concentrations exhibits a similar effect.

Conclusion. The cytotoxic effect of antiglaucoma drugs is caused by the presence of BC in their composition. Despite similar morphofunctional changes in cells, A549 immortalized cell line is more resistant to the effects of drugs than the human corneal epithelial primary culture. When using it as a cellular model, it is advisable to change the experimental conditions (duration of exposure and concentration of the studied drug).

Key words: brimonidine, dorzolamide, timolol, benzalkonium chloride, corneal epithelial primary culture, A549 immortalized cell line, cytotoxicity

Received: 24.12.2023

Accepted: 25.04.2024

Published: 31.05.2024

For citation: Fisenko N.V., Subbot A.M., Yusef Yusef, Osipyan G.A., Panova A.D., Agliautdinov R.R. Comparative analysis of the effect of drugs lowering intraocular pressure on a primary culture of human corneal epithelium and A549 immortalized cell line. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(2): 35-49. doi: 10.29413/ABS.2024-9.2.4

ВВЕДЕНИЕ

Современный подход к оценке цитотоксического действия лекарственных препаратов (ЛП) включает в себя использование органной и органотипической культуры, а также первичных или иммортализованных линий диссоциированных клеток в качестве экспериментальных моделей [1, 2]. К преимуществам первичной клеточной линии относят сохранение генотипических и фенотипических признаков. Однако в ряде случаев она может представлять собой клоны различного уровня дифференцировки и включать единичные клетки других типов [3, 4]. Кроме того, объём экспериментальной работы ограничен периодом поддержания способности клеточной линии к воспроизведению, снижающейся при достижении предела Хейфлика [5].

Иммортализация клеточной культуры включает в себя активацию экспрессии различных генов (*hTERT*, *Vmi-1*, *HPVE6/E7*, *c-Myc*), регулирующих действие фермента теломеразы. В результате клеточная линия приобретает неограниченный пролиферативный потенциал и может быть использована непрерывно как экспериментальная модель. Основным недостатком иммортализации является изменение восприимчивости клеток к различным воздействиям, возникающее при модификации экспрессии генов [6, 7].

В офтальмологии клеточные системы могут быть использованы при оценке токсичности ЛП, применяемых в виде растворов для инстилляций, введения под конъюнктиву, в переднюю камеру глаза и витреальную полость [8]. Перспективным направлением данных исследований служит разработка рациональной фармакотерапии коморбидных заболеваний (например, глаукомы и эпителиального дефекта роговицы) [9].

В связи с этим актуальными являются исследования токсичности ЛП, применяемых в инстилляциях для снижения внутриглазного давления (ВГД), на клеточных системах [10–12]. Сложности, возникающие на этапах получения первичной культуры клеток, проведения эксперимента и интерпретации данных, обуславливают необходимость использования иммортализованных клеточных линий. В настоящее время создано несколько иммортализованных линий клеток глазной поверхности (SV40-HCEC, hTCEpi и т. д.) [13]. В связи с тем, что их получение из основных депозиторов часто затруднено, целесообразной является оценка возможности использования других, близких по происхождению линий, доступных на территории Российской Федерации.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнить влияние гипотензивных лекарственных препаратов, а также бензалкония хлорида (БХ), являющегося вспомогательным компонентом, на первичную культуру эпителия роговицы человека и иммортализованную клеточную линию A549.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на первичной культуре эпителия роговицы человека и на иммортализованной клеточной линии A549 (карцинома лёгкого). Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова» (протокол № 59/4 от 15.04.2019).

Первичная культура эпителиальных клеток (ЭпК) была получена эксплантным методом из фрагментов лимбальной зоны кадаверных корнеосклеральных колец, не востребованных при кератопластике. На предварительном этапе для увеличения степени адгезии поверхность культурального пластика покрывали фибронектином (10 мкг/см²). Лимбальные фрагменты корнеосклеральных колец помещали по одному в лунки 24-луночного планшета эпителиальной стороной вниз. На первом этапе их выращивали на среде RPMI-1640 (с добавлением 10%-й фетальной бычьей сыворотки, глутамина, антибиотиков, антимикотиков), а после начала миграции ЭпК, на 4–5-е сутки эксперимента, её заменяли на бессывороточную среду K-SFM (производитель растворов – Gibco, Thermo Fisher Scientific, США). Поддерживали стандартные условия культивирования – 37 °C, 5 % CO₂, влажность 100 %. Замену среды осуществляли 1 раз в 2–3 дня. После достижения клеточным слоем 80–90%-й конфлюэнтности проводили пассирование культуры ЭпК. В исследовании использовали ЭпК третьего пассажа. Для подтверждения тканевой принадлежности клеток выполняли их иммуноцитохимическое окрашивание на специфические маркеры ЭпК – цитокератины 3-го и 19-го типов.

Иммортализованную клеточную линию A549 культивировали на среде RPMI-1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США), с добавлением 10%-й фетальной бычьей сыворотки, глутамина, антибиотиков, антимикотиков) в указанных ранее стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂, влажность 100 %, замена среды 1 раз в 2–3 дня). Пассирование проводили после достижения клеточным слоем 80–90%-й конфлюэнтности.

На первом этапе исследования оценивали токсический эффект гипотензивных ЛП и БХ на монослой первичной культуры эпителия роговицы и иммортализованной клеточной линии A549. Для этого клетки переносили в лунки 96-луночных планшетов (плотность – 20000 клеток/лунку) и на протяжении 24 ч проводили их экспозицию с бримонидином, дорзоламидом и тимололом, добавленными в ростовую среду. При выборе концентрации действующего вещества учитывали особенности фармакокинетики ЛП, используемых для инстилляций [14]. В связи с повышением проницаемости роговицы при нарушении целостности эпителия *in vivo*, а также при выполнении эксперимента на монослое клеток действие ЛП изучали в разведениях 1/100, 1/50, 1/20 и 1/10. Кроме того, оценивали влияние БХ (Merck KGaA, Германия) в концентрациях, соответствующих его содержанию в бримонидине, дорзоламиде и тимололе в изучаемых разведениях (табл. 1). В качестве контроля использовали клеточные слои обоих типов, находящиеся в лунках только в условиях ростовой среды. Все тесты проводили в 3–8 повторях.

ТАБЛИЦА 1
ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ГИПОТЕНЗИВНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

МНН изучаемых лекарственных средств	Состав лекарственного средства			Владелец регистрационного удостоверения	Концентрация действующего вещества ^а , бензалкония хлорида ^б в исследуемом разведении лекарственного средства			
	Действующее фармакологическое вещество	Вспомогательные вещества	Другие химические соединения		1/100	1/20	1/10	
Бримонидин	Бримонидина тартрат 2000 мкг/мл	–	Поливиниловый спирт, натрия цитрат, лимонной кислоты моногидрат, натрия хлорид, хлористоводородная кислота разведённая/натрия гидроксид	Pharmaceutical Works Polpharma S.A. (Польша)	20 мкг/мл ^а	40 мкг/мл ^а	100 мкг/мл ^а	200 мкг/мл ^а
	Бримонидина тартрат 2000 мкг/мл	52 мкг/мл	Поливиниловый спирт, натрия хлорид, натрия цитрата дигидрат, лимонной кислоты моногидрат	Бауш Хелс (Россия)	20 мкг/мл ^а 0,5 мкг/мл ^б	40 мкг/мл ^а 1 мкг/мл ^б	100 мкг/мл ^а 2,6 мкг/мл ^б	200 мкг/мл ^а 5 мкг/мл ^б
Дорзоламид	Дорзоламида гидрохлорид 20000 мкг/мл	–	Натрия гиалуронат, маннитол, натрия цитрат	Pharmaceutical Works Polpharma S.A. (Польша)	200 мкг/мл ^а	400 мкг/мл ^а	1000 мкг/мл ^а	2000 мкг/мл ^а
	Дорзоламида гидрохлорид 20000 мкг/мл	75 мкг/мл	Гизеллоза, маннитол, натрия цитрат	Santen Oy (Финляндия)	200 мкг/мл ^а 0,75 мкг/мл ^б	400 мкг/мл ^а 1,5 мкг/мл ^б	1000 мкг/мл ^а 3,75 мкг/мл ^б	2000 мкг/мл ^а 7,5 мкг/мл ^б
Тимолол	Тимолола малеат 5000 мкг/мл	–	Натрия дигидрофосфата дигидрат, натрия гидрофосфата декагидрат	Ursapharm Arzneimittel GmbH (Германия)	50 мкг/мл ^а	100 мкг/мл ^а	250 мкг/мл ^а	500 мкг/мл ^а
	Тимолола малеат 5000 мкг/мл	100 мкг/мл	Натрия гидрофосфат, натрия дигидрофосфат	Sentiss Pharma, Pvt. Ltd. (Индия)	5 мкг/мл ^а 1 мкг/мл ^б	100 мкг/мл ^а 2 мкг/мл ^б	250 мкг/мл ^а 5 мкг/мл ^б	500 мкг/мл ^а 10 мкг/мл ^б

Примечание. МНН – международное непатентованное наименование.

Через 24 ч после начала экспозиции оценивали структурные изменения клеток методом фазово-контрастной микроскопии без окрашивания (инвертированный микроскоп Zeiss Axio Vert.A1 (Германия), фотофиксация – Canon EOS 700D (Япония)). Для определения доли метаболически активных клеток выполняли колориметрический формазановый МТТ-тест (реагент МТТ, ПанЭко, Россия) на фотометре Muliscan FC (Thermo Scientific, США), длина волны 540 нм.

На втором этапе экспериментальной работы проводили сравнительный анализ влияния гипотензивных ЛП на миграционную активность клеток. Исследование выполняли на модели дозированного линейного дефекта монослоя. Клетки рассеивали в лунки 24-луночного планшета и после образования плотного монослоя (конфлюэнтность 98–100 %) наносили линейный дефект – «царапину» носиком пипетки. Далее на протяжении 48 ч проводили экспозицию ЭпК с бримонидином, дорзолаамидом и тимололом в разведениях 1/100 и 1/20 (табл. 1). Все тесты проводили в 3–8 повторах. Действие ЛП оценивали по динамике закрытия линейного дефекта монослоя (метод фазово-контрастной микроскопии, без окрашивания, инвертированный микроскоп Zeiss Axio Vert.A1, Германия), фотофиксация – Canon EOS 700D (Япония), обработка изображения – CorelDraw (Канада)). В качестве контроля использовали клеточные слои обоих типов со сформированным линейным дефектом, находящиеся в лунках только в условиях ростовой среды. Все тесты проводили в 3–5 повторах. Также оценивали морфологические изменения клеток. Статистический анализ данных осуществляли с использованием программы SPSS Statistics 26 (IBM Corp., США). При нормальном распределении количественные переменные были представлены в виде среднего арифметического (M) и стандартного отклонения (SD). Статистическую значимость различий между двумя независимыми выборками определяли с использованием t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный анализ цитотоксичности гипотензивных лекарственных препаратов и бензалкония хлорида на первичной культуре эпителия роговицы человека и иммортализованной клеточной линии A549

Бримонидин

По данным фазово-контрастной микроскопии первичной культуры эпителия роговицы человека и иммортализованной клеточной линии A549, бримонидин (независимо от наличия БХ в составе) в разведении 1/100 вызывает разрежение межклеточных контактов, в разведении 1/50 – конденсацию цитоплазматического содержимого некоторых клеток. Уровень метаболической

активности клеток во всех исследуемых образцах практически не отличается от контроля (табл. 2). Отсутствие выраженного цитотоксического эффекта согласуется с данными выживаемости ЭпК и клеток линии A549 после экспозиции с БХ, исследованным в концентрациях 0,5 мкг/мл и 1 мкг/мл, соответствующих его содержанию в бримонидине в указанных разведениях (табл. 3).

Бримонидин (без БХ) в разведении 1/20 не обладает значимым цитотоксическим действием как на ЭпК, так и на иммортализованную клеточную линию A549. Однако при экспозиции обоих типов клеток с бримонидином (с БХ) в аналогичном разведении выявлено статистически значимое снижение метаболической активности только ЭпК (табл. 2). Светооптическая картина подтверждает полученные результаты: в ЭпК отмечены конденсация цитоплазматического содержимого и компактизация ядер. Подобные структурные изменения обнаружены только в единичных клетках линии A549. При фазово-контрастной микроскопии, выполненной после экспозиции обоих видов клеток с БХ (2,6 мкг/мл), выявлена аналогичная морфологическая картина, отражением которой является статистически значимо более низкий уровень выживаемости ЭпК по сравнению с иммортализованной линией A549 (табл. 3).

Бримонидин (без БХ) в разведении 1/10 вызывает нарушение целостности межклеточных контактов в образцах монослоя ЭпК и линии A549, у небольшого количества клеток обоих типов – конденсацию цитоплазмы и компактизацию ядер. По данным МТТ-теста, статистически значимого подавления метаболической активности не выявлено. Вместе с тем бримонидин (с БХ) в том же разведении приводит к тотальной гибели ЭпК и к выраженным деструктивным изменениям практически во всех клетках линии A549 (табл. 2). При оценке цитотоксического эффекта БХ как компонента бримонидина (разведение ЛП 1/10) выявлено, что в соответствующей концентрации (5 мкг/мл) он приводит к аналогичным изменениям изучаемых монослоев: практически полной гибели ЭпК и выраженному снижению метаболической активности клеток линии A549. Вместе с тем иммортализованная культура, по данным МТТ-теста, является более устойчивой к действию БХ, добавленного в ростовую среду, чем ЛП, имеющего его в составе.

Дорзолаамид

На светооптической картине первичной культуры эпителия роговицы человека и иммортализованной клеточной линии A549 после экспозиции с дорзолаамидом (без БХ) в разведении 1/100 во всех образцах отмечены разрежение и частичное нарушение целостности межклеточных контактов. По данным МТТ-теста выявлено небольшое снижение метаболической активности клеток обоих типов. Дорзолаамид (с БХ в качестве вспомогательного компонента) в том же разведении приводит к компактизации ядра и цитоплазмы некоторых ЭпК, при этом их метаболическая активность статистически значимо ниже, чем после экспозиции с аналогичным ЛП

без БХ в составе. Клетки линии А549 в этом случае претерпевают сходные морфологические изменения, однако статистически значимых различий в показателях МТТ-теста, свидетельствующих о более выраженном цитотоксическом действии дорзоламида (с БХ), не выявлено. Кроме того, отсутствуют статистически значимые различия в выживаемости ЭпК и клеток линии А549 после экспозиции с указанным ЛП (табл. 2). При анализе влияния БХ в концентрации 0,75 мкг/мл, соответствующей его содержанию в дорзоламиде (1/100), отмечены единичные ЭпК и клетки линии А549 с патологическими структурными изменениями цитоплазматического содержимого, что подтверждает его слабое негативное воздействие (табл. 3).

Дорзоламид (без БХ) в разведении 1/50 приводит к компактизации ядра и цитоплазмы некоторых ЭпК и клеток линии А549; показатели колориметрического теста практически одинаковы. Вместе с тем в обоих случаях отмечено статистически значимое снижение метаболической активности клеток под действием дорзоламида (с БХ в составе) в аналогичном разведении. По данным фазово-контрастной микроскопии обнаружены структурные изменения клеток в виде конденсации их цитоплазматического содержимого в перинуклеарной области, компактизации цитоплазмы и ядра и единичных апоптотических телец. Результаты МТТ-теста, выполненного после экспозиции с дорзоламидом (с БХ), свидетельствуют о большей устойчивости immortalized клеточной линии А549, чем первичной культуры ЭпК, к действию данного ЛП (табл. 2). Вместе с тем подобных статистически значимых различий в выживаемости клеток обоих типов при воздействии БХ (1,5 мкг/мл) не выявлено (табл. 3).

Уменьшение разведения дорзоламида (без БХ) до 1/20 и 1/10 не сопровождается усилением его цитотоксического эффекта в отношении как ЭпК, так и клеток линии А549. На светооптической картине монослоя во всех случаях отмечено частичное нарушение целостности межклеточных контактов, а также компактизация ядра и цитоплазмы некоторых клеток. Дорзоламид (с БХ) в аналогичном разведении приводит к практически тотальной гибели как ЭпК, так и клеток линии А549. Несмотря на выраженный цитотоксический эффект ЛП во всех случаях, по данным сравнительного МТТ-теста отмечена статистически значимо более высокая выживаемость клеток линии А549 (табл. 2). БХ в концентрациях 3,75 мкг/мл и 7,5 мкг/мл (соответствуют его содержанию как вспомогательного компонента в дорзоламиде – 1/20 и 1/10) проявляет сходное негативное действие в отношении клеток обоих типов, однако метаболическая активность immortalized клеточной линии А549 статистически значимо выше, чем таковая первичной культуры эпителия (табл. 3).

Тимолол

На светооптической картине монослоя ЭпК после экспозиции с тимололом (без БХ) в разведениях 1/100 и 1/50 определяются интактные клетки, а по данным

МТТ-теста зафиксировано увеличение их количества в некоторых образцах. Между тем указанный ЛП способствует разрежению межклеточных контактов и статистически значимо более низкому уровню метаболической активности immortalized линии А549 (табл. 2). При фазово-контрастной микроскопии обоих типов клеток выявлено, что во всех образцах тимолол (с БХ) в разведении 1/100 вызывает вакуолизацию цитоплазмы и проявляет более выраженный негативный эффект в отношении ЭпК. Данный ЛП в разведении 1/50 приводит к сходным по степени выраженности изменениям структуры ЭпК и immortalized клеточной линии А549 в виде компактизации ядра и цитоплазматического содержимого (табл. 2). Подобная светооптическая картина отмечена после экспозиции клеток обоих типов с БХ в концентрации 2 мкг/мл, соответствующей его содержанию в тимололе (разведение 1/50) (табл. 3).

Тимолол (без БХ) в разведении 1/20 и 1/10 обладает слабовыраженным токсическим действием на ЭпК, проявляющимся нарушением целостности межклеточных контактов и конденсации цитоплазмы в перинуклеарной области. Вместе с тем, по данным МТТ-теста отмечен статистически значимо более низкий уровень метаболической активности клеток линии А549 после экспозиции с тимололом (без БХ) в аналогичных разведениях (табл. 2). Тимолол (с БХ) в разведениях 1/20 и 1/10 приводит к гибели клеток обоих типов, показатели МТТ-теста резко снижены (табл. 2). При анализе влияния БХ как компонента тимолола выявлено, что данное вещество в концентрации 5,0 мкг/мл приводит к выраженному повреждению монослоя ЭпК и снижению их метаболической активности, при этом клетки линии А549 относительно устойчивы. БХ в концентрации 10 мкг/мл приводит к тотальной гибели обоих типов клеток (табл. 3).

Сравнительный анализ влияния гипотензивных лекарственных препаратов на миграционную активность клеток, выполненный на моделях линейного дефекта монослоя первичной культуры эпителия роговицы человека и монослоя immortalized линии А549

Бримонидин (без БХ) в разведении 1/100 не оказывает цитотоксического действия на ЭпК и immortalized линию А549: межклеточные контакты сохранены, клетки интактны, монослой восстановлен на $103,05 \pm 2,63$ % и $101,96 \pm 1,78$ % соответственно ($p = 0,540$). После экспозиции ЭпК с бримонидином (с БХ) в том же разведении выявлены частичная потеря межклеточных контактов и вакуолизация цитоплазмы клеток, линейный дефект закрыт на $83,58 \pm 6,99$ %. Клетки линии А549 интактны после воздействия данного ЛП, монослой сформирован на $99,27 \pm 1,66$ % ($p = 0,002$). Кроме того, при сравнительном анализе воздействия бримонидина (1/100) выявлено, что наличие БХ в составе ЛП обуславливает замедление восстановления монослоя ЭпК

ТАБЛИЦА 2
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЫЖИВАЕМОСТИ
ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ
ЧЕЛОВЕКА И ИММОРТАЛИЗОВАННОЙ
КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ A549 ПОСЛЕ ЭКСПОЗИЦИИ
С ГИПОТЕНЗИВНЫМИ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ
ПРЕПАРАТАМИ В ТЕЧЕНИЕ 24 ЧАСОВ (MTT-ТЕСТ)

TABLE 2
COMPARATIVE ANALYSIS OF CELL VIABILITY IN HUMAN
CORNEAL EPITHELIUM PRIMARY CULTURE AND A549
IMMORTALIZED CELL LINE AFTER 24-HOUR EXPOSURE
TO ANTIGLAUCOMA DRUGS (MTT ASSAY)

Разведение лекарственного препарата	МНН лекарственного препарата	Бензалкония хлорид (в составе лекарственного препарата)	Метаболически активные клетки, % от исходного количества (M ± SD)		p	
			Первичная культура эпителия роговицы человека	Иммортилизованная клеточная линия A549		
1/100	Дорзоламид	-	84,60 ± 6,58	86,78 ± 8,84	$p_1 = 0,005$ $p_2 = 0,130$ $p_3 = 0,722$ $p_4 = 0,175$	
		+	69,30 ± 8,10	76,72 ± 2,37		
		-	85,08 ± 3,72	76,99 ± 4,24		
		+	89,43 ± 9,29	81,0 ± 8,19		
	Тимолол	-	106,87 ± 2,70	80,16 ± 2,36	$p_1 = 0,486$ $p_2 = 0,497$ $p_3 = 0,068$ $p_4 = 0,267$	
		+	86,65 ± 8,27	92,0 ± 3,28		
		-	84,60 ± 6,58	86,78 ± 8,84		$p_1 = 0,004$ $p_2 = 0,005$ $p_3 < 0,001$ $p_4 = 0,013$
		+	69,30 ± 8,10	76,72 ± 2,37		
1/50	Дорзоламид	-	78,58 ± 3,27	74,39 ± 3,53	$p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,039$ $p_3 = 0,165$ $p_4 = 0,032$	
		+	58,81 ± 5,06	61,82 ± 6,29		
		-	78,59 ± 5,63	77,93 ± 8,05		
		+	73,98 ± 5,72	83,39 ± 5,61		
	Тимолол	-	96,23 ± 2,76	77,62 ± 2,78	$p_1 = 0,337$ $p_2 = 0,390$ $p_3 = 0,913$ $p_4 = 0,082$	
		+	63,49 ± 3,46	61,78 ± 3,70		
		-	80,29 ± 5,56	81,01 ± 6,44		$p_1 \leq 0,001$ $p_2 = 0,04$ $p_3 = 0,001$ $p_4 = 0,534$
		+	37,07 ± 4,81	47,89 ± 4,38		
1/20	Дорзоламид	-	80,29 ± 5,56	81,01 ± 6,44	$p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,002$ $p_3 = 0,891$ $p_4 = 0,181$	
		+	37,07 ± 4,81	47,89 ± 4,38		
		-	80,63 ± 4,37	82,21 ± 3,42		
		+	57,11 ± 4,41	71,55 ± 6,29		
	Тимолол	-	84,81 ± 4,83	70,96 ± 4,81	$p_1 = 0,001$ $p_2 = 0,05$ $p_3 = 0,649$ $p_4 = 0,015$	
		+	8,62 ± 0,91	15,53 ± 2,8		
		-	84,81 ± 4,83	70,96 ± 4,81		$p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 = 0,013$ $p_4 = 0,043$
		+	8,62 ± 0,91	15,53 ± 2,8		
1/10	Дорзоламид	-	79,20 ± 7,87	84,15 ± 5,27	$p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 = 0,393$ $p_4 = 0,001$	
		+	7,02 ± 0,10	12,52 ± 0,43		
		-	76,96 ± 4,19	75,11 ± 4,28		
		+	2,95 ± 0,62	27,46 ± 2,52		
	Тимолол	-	79,40 ± 4,08	70,12 ± 3,31	$p_1 = 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 = 0,622$ $p_4 = 0,003$	
		+	1,67 ± 1,44	13,26 ± 4,35		
		-	79,40 ± 4,08	70,12 ± 3,31		$p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 = 0,038$ $p_4 = 0,032$
		+	1,67 ± 1,44	13,26 ± 4,35		

Примечание. МНН – международное непатентованное наименование; p_1 – показатель статистической значимости различий выживаемости первичной культуры эпителия роговицы в зависимости от наличия бензалкония хлорида в составе лекарственного препарата, p_2 – показатель статистической значимости различий выживаемости иммортилизованной клеточной линии A549 в зависимости от наличия бензалкония хлорида в составе лекарственного препарата, p_3 – показатель статистической значимости различий выживаемости первичной культуры эпителия роговицы и иммортилизованной клеточной линии A549 при экспозиции с лекарственным препаратом без бензалкония хлорида в составе, p_4 – показатель статистической значимости различий выживаемости первичной культуры эпителия роговицы и иммортилизованной клеточной линии A549 при экспозиции с лекарственным препаратом с бензалкония хлоридом в составе.

ТАБЛИЦА 3
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЫЖИВАЕМОСТИ
ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ
ЧЕЛОВЕКА И ИММОТАЛИЗОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ
ЛИНИИ A549 ПОСЛЕ ЭКСПОЗИЦИИ С БЕНЗАЛКОНИЯ
ХЛОРИДОМ В ТЕЧЕНИЕ 24 ЧАСОВ

Концентрация бензалкония хлорида (мкг/мл)	Метаболически активные клетки, % от исходного количества (M ± SD)		p
	Первичная культура эпителия роговицы человека	Иммортализованная клеточная линия A549	
0,5	81,53 ± 6,76	90,71 ± 8,66	0,105
0,75	80,25 ± 7,71	89,55 ± 7,14	0,165
1,0	80,76 ± 7,16	88,85 ± 4,74	0,08
1,5	76,44 ± 9,17	80,73 ± 1,55	0,469
2,0	63,33 ± 4,48	68,52 ± 2,41	0,087
2,6	49,55 ± 5,56	75,93 ± 3,44	< 0,001
3,75	25,79 ± 3,04	51,31 ± 6,53	< 0,001
5,0	9,43 ± 2,21	53,25 ± 6,72	< 0,001
7,5	1,51 ± 1,30	36,44 ± 6,64	0,002
10	0	3,41 ± 1,37	0,05

TABLE 3
COMPARATIVE ANALYSIS OF CELL VIABILITY IN HUMAN
CORNEAL EPITHELIUM PRIMARY CULTURE AND A549
IMMORTALIZED CELL LINE AFTER 24-HOUR EXPOSURE
TO BENZALKONIUM CHLORIDE

($p = 0,011$) и не является фактором, влияющим на процесс миграционной активности клеток линии A549 ($p = 0,052$). Уменьшение разведения бримонидина (без БХ) до 1/20 сопровождается изменениями ЭпК в виде разрежения и частичной потери межклеточных контактов, а также конденсации цитоплазматического содержимого ЭпК. При этом линейный дефект закрыт на $76,24 \pm 7,52\%$. Клетки иммортализованной линии A549 в аналогичных условиях интактны, монослой восстановлен на $98,86 \pm 1,70\%$ ($p = 0,008$). Выявлено, что бримонидин в том же разведении, но отличающийся присутствием БХ в составе, оказывает выраженное токсическое действие на обе экспериментальные модели. Так, в обоих случаях отмечено повреждение межклеточных контактов, компактизация ядра и цитоплазмы большинства клеток. Миграционная активность ЭпК и клеток линии A549 снижена, монослой восстановлен на $22,32 \pm 3,38\%$ и $31,63 \pm 4,08\%$ соответственно ($p = 0,038$). Установлено, что воздействие бримонидина (1/20), содержащего БХ, сопровождается более выраженным негативным эффектом в отношении обеих клеточных моделей по сравнению с аналогичным ЛП (1/20) без данного вспомогательного компонента в составе ($p < 0,001$) (рис. 1).

После экспозиции с дорзоламидом (без БХ) в разведении 1/100 во всех образцах первичной культуры эпителия и иммортализованной линии A549 визуализируются интактные клетки, монослой восстановлен на $98,56 \pm 2,25\%$ и $101,21 \pm 1,79\%$ соответственно ($p = 0,145$). По данным фазово-контрастной микроскопии ЭпК, дорзоламид (с БХ в составе) в разведении 1/100 вызывает конденсацию цитоплазматического содер-

жимого в перинуклеарной области отдельных клеток, линейный дефект закрыт на $84,01 \pm 3,44\%$. В аналогичных условиях воздействия ЛП иммортализованные клетки линии A549 интактны, монослой восстановлен на $97,63 \pm 2,28\%$ ($p = 0,001$). Кроме того, отмечено статистически значимое снижение миграционной активности ЭпК под воздействием дорзоламида, содержащего БХ, по сравнению с указанным ЛП без данного вспомогательного компонента. Дорзоламид (без БХ) в разведении 1/20 приводит к частичной потере межклеточных контактов, конденсации цитоплазматического содержимого в перинуклеарной области ЭпК, монослой восстановлен на $88,67 \pm 3,46\%$. При этом негативный эффект данного ЛП на клетки линии A549 отсутствует, линейный дефект закрыт на $99,84 \pm 1,46\%$ ($p = 0,145$). Дорзоламид (с БХ в составе) в том же разведении приводит к тотальной гибели клеток обеих моделей, с высокой долей вероятности – в первые часы эксперимента (рис. 2).

Светооптическая картина ЭпК и клеток иммортализованной линии A549 после их экспозиции с тимололом (без БХ) в разведении 1/100 свидетельствует об отсутствии их структурных изменений, линейный дефект закрыт на $91,73 \pm 4,03\%$ и $95,41 \pm 4,68\%$ соответственно ($p = 0,327$). Тимолол (с БХ) в том же разведении приводит к вакуолизации цитоплазмы ЭпК, частичной потере межклеточных контактов, монослой восстановлен на $79,15 \pm 4,53\%$. После аналогичного воздействия клетки линии A549 интактны. Вместе с тем монослой закрыт на $90,32 \pm 1,85\%$ ($p = 0,006$), что отражает снижение их миграционной активности. При сравнительной оценке полученных результатов воздействия тимолола

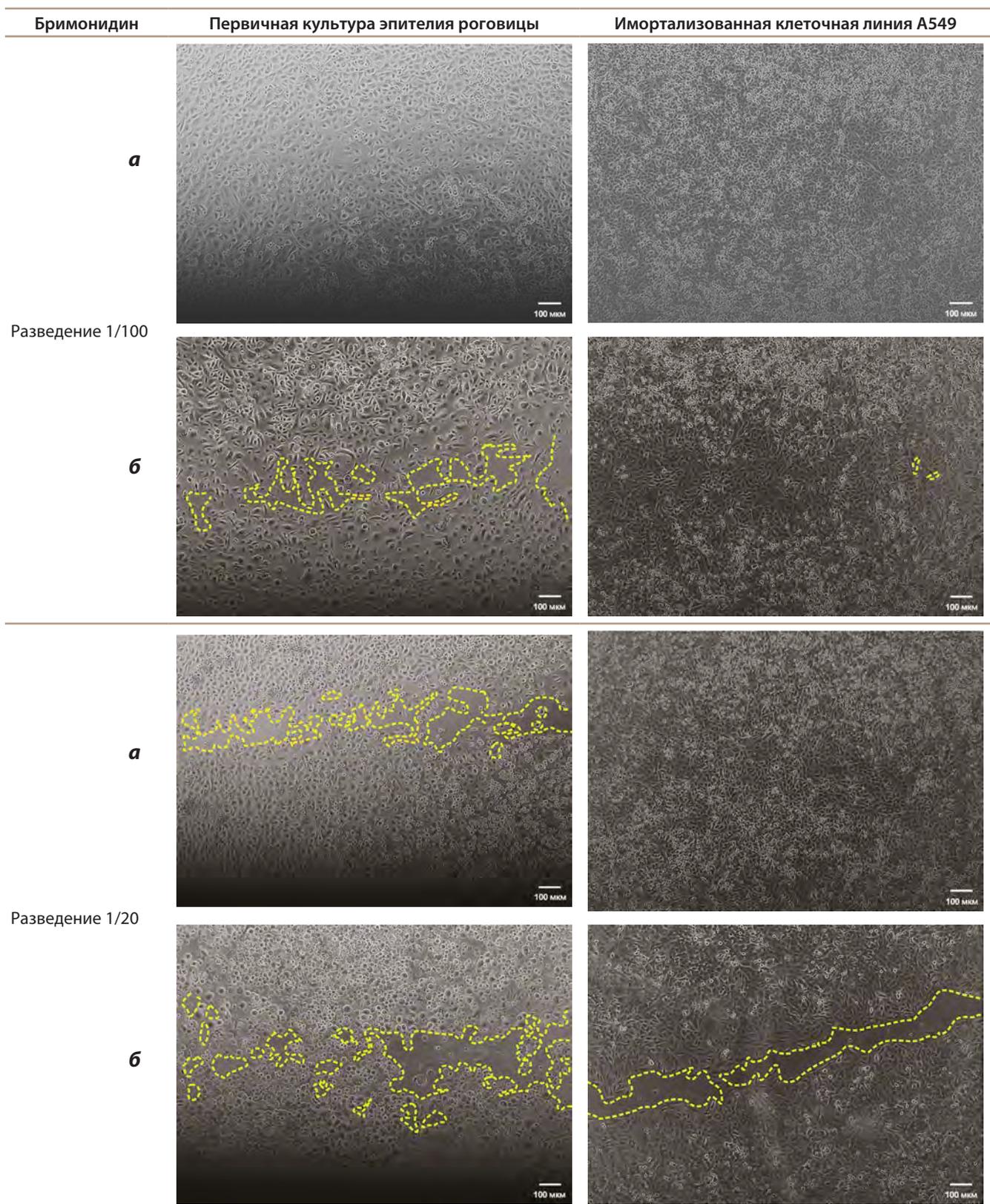


РИС. 1.
 Морфологическая картина первичной культуры эпителия роговицы человека и immortalизованной клеточной линии A549 (модель линейного дефекта монослоя) после экспозиции с бримонидином без бензалкония хлорида (**а**) и с бензалкония хлоридом (**б**) в составе в течение 48 часов (фазово-контрастная микроскопия). Границы дефекта – жёлтая пунктирная линия

FIG. 1.
 Morphological pattern of human corneal epithelium primary culture and A549 immortalized cell line (cellular models of intact monolayer) after 48-hour exposure to benzalkonium chloride-free (**a**) and benzalkonium chloride-preserved (**b**) brimonidine (phase-contrast microscopy). The borders of linear cell defect are shown with yellow dotted line

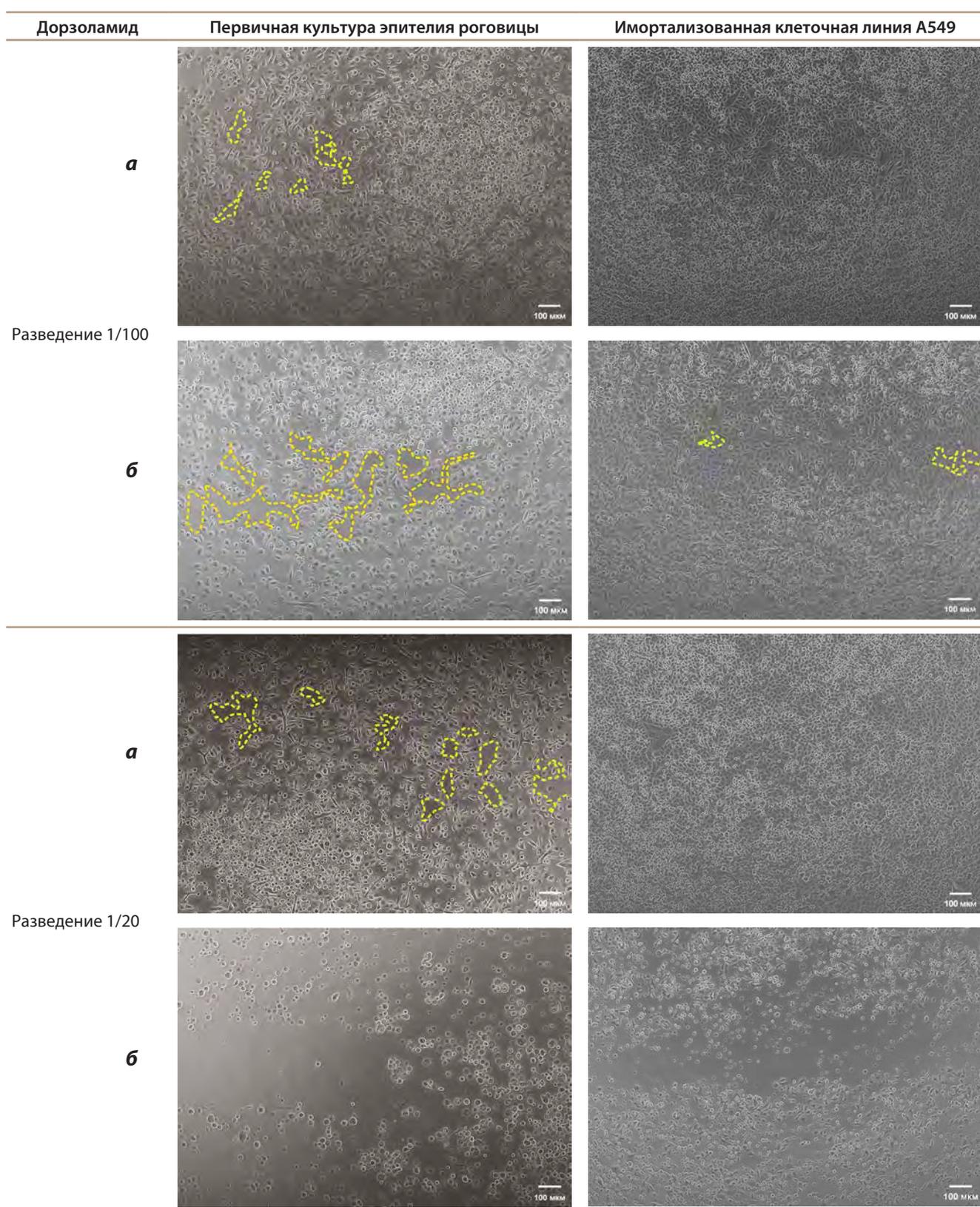


РИС. 2.
Морфологическая картина первичной культуры эпителия роговицы человека и immortalизованной клеточной линии A549 (модель линейного дефекта монослоя) после экспозиции с дорзоламидом без бензалкония хлорида (**а**) и с бензалкония хлоридом (**б**) в составе в течение 48 часов (фазово-контрастная микроскопия). Границы дефекта – жёлтая пунктирная линия

FIG. 2.
Morphological pattern of human corneal epithelium primary culture and A549 immortalized cell line (cellular models of intact monolayer) after 48-hour exposure to benzalkonium chloride-free (**a**) and benzalkonium chloride-preserved (**b**) dorzolamide (phase-contrast microscopy). The borders of linear cell defect are shown with yellow dotted line

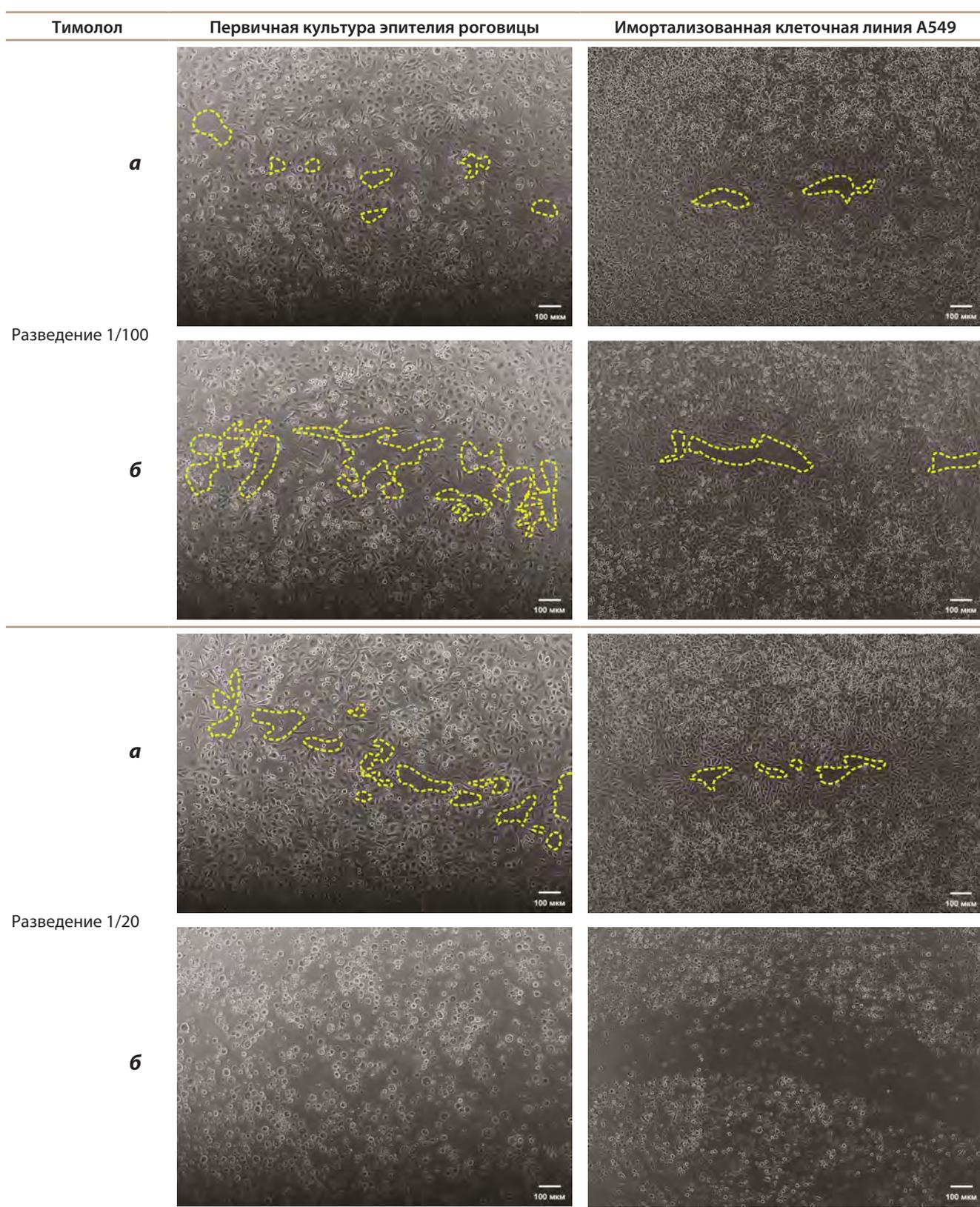


РИС. 3.
 Морфологическая картина первичной культуры эпителия роговицы человека и immortalизованной клеточной линии A549 (модель линейного дефекта монослоя) после экспозиции с тимололом без бензалкония хлорида (**а**) и с бензалкония хлоридом (**б**) в составе в течение 48 часов (фазово-контрастная микроскопия). Границы дефекта – жёлтая пунктирная линия

FIG. 3.
 Morphological pattern of human corneal epithelium primary culture and A549 immortalized cell line (cellular models of intact monolayer) after 48-hour exposure to benzalkonium chloride-free (**a**) and benzalkonium chloride-preserved (**b**) timolol (phase-contrast microscopy). The borders of linear cell defect are shown with yellow dotted line

(1/100) без и при наличии БХ в составе выявлено, что данный вспомогательный компонент определяет более выраженный цитотоксический эффект ЛП в отношении первичной культуры эпителия роговицы ($p = 0,023$) и не влияет на восстановление монослоя клеток линии A549 ($p = 0,115$). Уменьшение разведения Тимолола (без БХ) до 1/20 приводит к восстановлению монослоя ЭпК на $85,33 \pm 2,46 \%$, линии A549 – на $93,61 \pm 2,44 \%$ ($p = 0,014$). По данным фазово-световой микроскопии, выполненной после экспозиции обеих экспериментальных моделей с тимололом (с БХ) в разведении 1/20, обнаружена тотальная гибель клеток, произошедшая, вероятно, в первые часы эксперимента (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы были представлены результаты оценки токсичности ЛП, используемых в инстилляциях для снижения ВГД, которые были выполнены на различных клеточных культурах роговицы, конъюнктивы и трабекулярной сети. Среди данных ЛП (часть из которых содержали бензалкония хлорид) необходимо выделить тафлупрост и латанопрост (аналоги простагландина F_{2α}), дорзоламид и бринзоламид (ингибитор карбоангидразы), бримонидин (α₂-адреномиметик) и тимолол (β-адреноблокатор) [10–12, 15]. Учитывая их широкое применение у пациентов с дефектами эпителиального слоя роговицы различной этиологии, актуальным является исследование воздействия бримонидина, дорзоламида и тимолола (без БХ и при наличии его в составе), а также БХ на первичной культуре эпителия роговицы человека и на immortalized клеточной линии A549, в том числе для изучения возможности её использования в качестве модели.

Первый этап исследования включал в себя анализ цитотоксичности бримонидина, дорзоламида и тимолола (без БХ и при наличии его в составе) в разведениях 1/100, 1/50, 1/20 и 1/10 на монослое ЭпК и на аналогичной по плотности колонии клеток immortalized линией A549.

Согласно полученным результатам, бримонидин (без БХ) во всех изученных разведениях способствует небольшому снижению метаболической активности ЭпК и immortalized клеточной линии A549, однако не приводит к значимым структурным изменениям обоих типов моделей. Бримонидин (с БХ) в разведении 1/20 вызывает морфофункциональные нарушения состояния только ЭпК, а в разведении 1/10 – тотальную гибель ЭпК и резкое снижение выживаемости клеток линии A549. Проведённое А. Кусикодук и соавт. исследование цитотоксичности бримонидина (без БХ) на immortalized культуре роговицы человека показывает, что при концентрации действующего вещества 1500 мкг/мл через 15 мин после начала экспозиции выживаемость клеток составляет около 25 %, а затем значительно снижается на протяжении 24 ч [16]. Результаты данного эксперимента не сопоставимы с полученными нами данными в связи с тем, что изученная нами макси-

мальная концентрация действующего вещества составляет 200 мкг/мл (разведение ЛП 1/10). В доступной нам литературе других результатов оценки цитотоксичности бримонидина *in vitro* не обнаружено.

Дорзоламид (без БХ) приводит к незначительным структурным нарушениям ЭпК и immortalized клеток линии A549. В то же время дорзоламид (с БХ) в разведении 1/100 вызывает морфофункциональные изменения только монослоя ЭпК, а в остальных разведениях (1/50, 1/20 и 1/10) – ЭпК и immortalized клеток линии A549. Выявленные нами изменения состояния экспериментальных моделей частично согласуются с результатами анализа состояния монослоя immortalized клеточной линии эпителия роговицы человека после 24-часовой экспозиции с дорзоламидом (БХ в составе ЛП). Так, по данным D. Pozarowska и соавт., этот ЛП в разведении 1/100 приводит к гибели практически всех клеток апоптозом, в разведении 1/10 – некрозом [17]. Подобные различия результатов могут быть обусловлены более выраженной исходной устойчивостью immortalized клеточной линии A549 и особенностями первичной культуры эпителия роговицы, связанными с состоянием донорского материала.

Тимолол (без БХ) во всех разведениях не оказывает значимого токсического влияния на ЭпК, в то же время при аналогичном воздействии на immortalized клеточную линию A549 отмечены умеренные изменения структуры клеток и снижение их метаболической активности. Ранее было описано негативное действие селективных и неселективных β-адреноблокаторов (в виде апоптоза или некроза) на immortalized клеточную линию A549 [18]. Согласно данным M. Ayaki и соавт., тимолол (без БХ) в разведении 1/10 вызывает статистически значимое снижение выживаемости immortalized линии эпителия роговицы человека [10]. Экспозиция обоих типов клеточных моделей с тимололом (с БХ в составе) в разведениях 1/20 и 1/10 приводит к гибели обоих типов клеток, при этом зафиксирована метаболическая активность единичных клеток immortalized линии A549. Сходные результаты были получены в ходе нескольких исследований (экспериментальная модель – immortalized клетки эпителия роговицы человека): слабый цитотоксический эффект тимолола (с БХ) в разведении 1/100 и практически тотальная гибель клеток после воздействия указанного препарата в разведении 1/10 [17, 19].

Таким образом, все ЛП, имеющие в составе БХ, обладают более выраженным негативным действием на состояние первичной культуры эпителия роговицы человека и immortalized клеточной линии A549. БХ представляет собой четвертичное аммониевое соединение (катионный детергент), которое обладает значительной активностью в отношении широкого спектра микроорганизмов. Механизм действия данного вещества связан с повреждением клеточной мембраны, денатурацией белков и ингибированием ферментов. Его основная роль как вспомогательного компонента ЛП заключается в обеспечении стабильности действующего фармакологического вещества и препятствовании росту микрофлоры в растворе [20].

По данным фазово-контрастной микроскопии и МТТ-теста, увеличение концентрации БХ (при уменьшении разведении ЛП) приводит к постепенному усилению его цитотоксического эффекта в отношении обеих экспериментальных моделей. Вместе с тем статистически значимые различия в метаболической активности клеток, свидетельствующие о более выраженной устойчивости immortalized линии A549, зафиксированы при воздействии БХ в концентрациях 2,6 мкг/мл, 3,75 мкг/мл, 5 мкг/мл и 7,5 мкг/мл. Подобные результаты согласуются с описанными в проведённых ранее исследованиях и свидетельствуют о том, что негативное действие ЛП на метаболическую активность клеток зависит от его концентрации и в большинстве случаев обусловлено наличием в составе вспомогательного компонента – БХ [21–23].

Второй этап нашего исследования состоял в анализе влияния бримонидина, дорзоламида и тимолола (без БХ и при его наличии в составе) в разведениях 1/100 и 1/20 на миграционную активность клеток и был выполнен на моделях линейного дефекта монослоя первичной культуры эпителия роговицы человека и монослоя immortalized линии A549. Выявлено, что все ЛП (без БХ в составе) в разведении 1/100 не оказывают токсического эффекта на клетки, и через 48 ч после начала экспозиции линейный дефект практически во всех случаях закрыт. Уменьшение разведения всех ЛП до 1/20 способствует замедлению миграционной активности ЭпК по сравнению с линией A549. Бримонидин, дорзоламид и тимолол (все ЛП – с БХ в составе) в разведении 1/100 не оказывают статистически значимого негативного эффекта на обе клеточные модели. Вероятно, это обусловлено концентрацией БХ (0,5 мкг/мл, 0,75 мкг/мл и 1,0 мкг/мл соответственно), в которой он, согласно данным первого этапа исследования, не проявляет цитотоксического действия в отношении ЭпК и immortalized клеточной линии A549. Вместе с тем, при анализе динамики закрытия линейного дефекта обнаружено, что наличие БХ в составе ЛП приводит к умеренному замедлению миграционной активности только ЭпК, что свидетельствует об их меньшей, чем у immortalized клеточной линии A549, устойчивости к воздействию. Бримонидин (с БХ) в разведении 1/20 вызывает замедление восстановления монослоя обоих типов клеток, более выраженное в случае первичной культуры эпителия роговицы. Воздействие дорзоламида и тимолола (оба – с БХ в составе) в разведении 1/20 приводит к гибели ЭпК и immortalized клеточной линии A549 в первые часы эксперимента. В основе описанного цитотоксического эффекта лежит патологическое воздействие БХ, содержащегося в указанных ЛП в концентрациях 3,75 и 5 мкг/мл соответственно. При анализе опубликованных данных по влиянию ЛП, снижающих ВГД, на миграционную активность клеток было обнаружено только одно исследование, выполненное Н. Liang и соавт. [24]. Сравнительный анализ состояния ЭпК после экспозиции с ЛП (аналоги простагландинов) в разведениях 1/10, содержащих (латанопрост, травапрост и биматопрост) и не содержащих (тафлупрост, латанопрост,

траватан) БХ в составе, а также БХ в различных концентрациях показал замедление восстановления монослоя клеток после 30-минутной экспозиции с ЛП, содержащими БХ. При этом авторами были выявлены сходные морфологические изменения клеток, экспонированных с БХ в представленных концентрациях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведённый сравнительный анализ состояния первичной культуры эпителия роговицы человека и immortalized клеточной линии A549 свидетельствует о том, что бримонидин, дорзоламид и тимолол (все ЛП содержат БХ) обладают цитотоксическим действием. Негативный эффект данных ЛП обусловлен наличием в их составе БХ. Несмотря на сходные структурные изменения клеток, а также снижение их метаболической и миграционной активности, immortalized клеточная линия A549 более устойчива к воздействию ЛП, чем первичная культура эпителия роговицы человека. В связи с этим при проведении дальнейших исследований возможно её использование как клеточной модели только с учётом изменения условий эксперимента (длительность экспозиции и концентрация исследуемого ЛП).

Конфликт интересов

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Lieto K, Skopek R, Lewicka A, Stelmasiak M, Klimaszewska E, Zelent A, Szymański Ł, et al. Looking into the eyes – *in vitro* models for ocular research. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(16): 9158. doi: 10.3390/ijms23169158
2. Алпеева Е.В., Сидоренкова А.Ф., Воротеляк Е.А. Экспериментальные клеточные системы: от органов в чашке Петри до «органов-на-чипах». *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология.* 2017; 72(4): 187-198. [Alpeeva EV, Sidorenkova AF, Vorotelyak EA. Overview of cell models: From organs cultured in a Petri dish to “organs-on-chips”. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya.* 2017; 72(4): 187-198. (In Russ.)].
3. Shafae S, Hutter V, Cook MT, Brown MB, Chau DY. *In vitro* cell models for ophthalmic drug development applications. *Biores Open Access.* 2016; 5(1): 94-108. doi: 10.1089/biores.2016.0008
4. Zhou T, Yuan Z, Weng J, Pei D, Du X, He C, et al. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. *J Hematol Oncol.* 2021; 14(1): 24. doi: 10.1186/s13045-021-01037-x
5. Voloshin N, Tyurin-Kuzmin P, Karagyaur M, Akopyan Z, Kulebyakin K. Practical use of immortalized cells in medicine: Current advances and future perspectives. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(16): 12716. doi: 10.3390/ijms241612716
6. Maqsood MI, Matin MM, Bahrami AR, Ghasroldasht MM. Immortality of cell lines: Challenges and advantages of establishment. *Cell Biol Int.* 2013; 37(10): 1038-1045. doi: 10.1002/cbin.10137

7. Zhao C. Cell culture: *In vitro* model system and a promising path to *in vivo* applications. *J Histotechnol.* 2023; 46(1): 1-4. doi: 10.1080/01478885.2023.2170772
8. Wilson SL, Ahearne M, Hopkinson A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicology.* 2015; 327: 32-46. doi: 10.1016/j.tox.2014.11.003
9. European Glaucoma Society terminology and guidelines for glaucoma; 5th ed. *Br J Ophthalmol.* 2021; 105(Suppl 1): 1-169. doi: 10.1136/bjophthalmol-2021-egsguidelines
10. 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. *Clin Exp Ophthalmol.* 2008; 36(6): 553-559. doi: 10.1111/j.1442-9071.2008.01803.x
11. Ayaki M, Iwasawa A, Inoue Y. Toxicity of antiglaucoma drugs with and without benzalkonium chloride to cultured human corneal endothelial cells. *Clin Ophthalmol.* 2010; 4: 1217-1222. doi: 10.2147/OPHTH.S13708
12. Yuan XL, Wen Q, Zhang MY, Fan TJ. Cytotoxicity of pilocarpine to human corneal stromal cells and its underlying cytotoxic mechanisms. *Int J Ophthalmol.* 2016; 9(4): 505-511. doi: 10.18240/ijo.2016.04.05
13. Rönkkö S, Vellonen KS, Järvinen K, Toropainen E, Urtili A. Human corneal cell culture models for drug toxicity studies. *Drug Deliv Transl Res.* 2016; 6(6): 660-675. doi: 10.1007/s13346-016-0330-y
14. Durairaj C. Ocular pharmacokinetics. *Handb Exp Pharmacol.* 2017; 242: 31-55. doi: 10.1007/164_2016_32
15. Tabak S, Schreiber-Avissar S, Beit-Yannai E. Influence of anti-glaucoma drugs on uptake of extracellular vesicles by trabecular meshwork cells. *Int J Nanomedicine.* 2021; 16: 1067-1081. doi: 10.2147/IJN.S283164
16. Kucukoduk A, Durmus IM, Aksoy M, Karakurt S. Cytotoxic, apoptotic, and oxidative effects of preserved and preservative-free brimonidine in a corneal epithelial cell line. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2022; 38(8): 576-583. doi: 10.1089/jop.2022.0053
17. Pozarowska D, Pozarowski P, Darzynkiewicz Z. Cytometric assessment of cytostatic and cytotoxic effects of topical glaucoma medications on human epithelial corneal line cells. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010; 78(2): 130-137. doi: 10.1002/cyto.b.20493
18. Sidorova M, Petrikaitė V. The effect of beta adrenoceptor blockers on viability and cell colony formation of non-small cell lung cancer cell lines A549 and H1299. *Molecules.* 2022; 27(6): 1938. doi: 10.3390/molecules27061938
19. Абышева Л.Д., Авдеев Р.В., Александров А.С., Арапиев М.У., Бакунина Н.А., Баранова Н.А., и др. Влияние местной гипотензивной терапии глаукомы на развитие и прогрессирование синдрома «сухого глаза». *РМЖ. Клиническая офтальмология.* 2017; 17(2): 74-82. [Abysheva LD, Avdeev RV, Alexandrov AS, Arapiev MU, Bakunina NA, Baranova NA, et al. Influence of local hypotensive glaucoma therapy on the development and progression of dry eye syndrome. *RMJ. Clinical Ophthalmology.* 2017; 17(2): 74-82. (In Russ.).] doi: 10.21689/2311-7729-2017-17-2-74-82
20. Goldstein MH, Silva FQ, Blender N, Tran T, Vantipalli S. Ocular benzalkonium chloride exposure: Problems and solutions. *Eye (Lond).* 2022; 36(2): 361-368. doi: 10.1038/s41433-021-01668-x
21. Ammar DA, Noecker RJ, Kahook MY. Effects of benzalkonium chloride-preserved, polyquad-preserved, and sofZia-preserved topical glaucoma medications on human ocular epithelial cells. *Adv Ther.* 2010; 27(11): 837-845. doi: 10.1007/s12325-010-0070-1
22. Epstein SP, Ahdoot M, Marcus E, Asbell PA. Comparative toxicity of preservatives on immortalized corneal and conjunctival epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2009; 25(2): 113-119. doi: 10.1089/jop.2008.0098
23. Meloni M, Cattaneo G, De Servi B. Corneal epithelial toxicity of antiglaucoma formulations: *In vitro* study of repeated applications. *Clin Ophthalmol.* 2012; 6: 1433-1440. doi: 10.2147/OPHTH.S35057
24. Liang H, Baudouin C, Daull P, Garrigue JS, Brignole-Baudouin F. *In vitro* corneal and conjunctival wound-healing assays as a tool for antiglaucoma prostaglandin formulation characterization. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2022; 27(5): 147. doi: 10.31083/j.fbl2705147

Сведения об авторах

Фисенко Наталья Владимировна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела патологии оптических сред глаза, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова», e-mail: natfisenko@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7198-4498>

Суббот Анастасия Михайловна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова», e-mail: kletkagb@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8258-6011>

Юсеф Юсеф – доктор медицинских наук, директор, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова»; профессор кафедры глазных болезней, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: info@eyeacademy.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4043-456X>

Осиян Григорий Альбертович – доктор медицинских наук, заведующий отделом патологии оптических сред глаза, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова», e-mail: gregor79@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1056-4331>

Панова Анна Дмитриевна – лаборант-исследователь, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова»; младший научный сотрудник, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, e-mail: ainushgnomello@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9322-6273>

Агямутдинов Рустем Рафикович – ординатор, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова», e-mail: rustamzip@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0002-1834-9916>

Information about the authors

Natalia V. Fisenko – Cand. Sc. (Med.), Senior Research Officer at the Department of Ocular Media Pathology, M.M. Krasnov Research Institute of Eye Diseases, e-mail: natfisenko@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7198-4498>

Anastasia M. Subbot – Cand. Sc. (Med.), Senior Research Officer at the Laboratory of Cell Technologies, M.M. Krasnov Research Institute of Eye Diseases, e-mail: kletkagb@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8258-6011>

Yusef Yusef – Dr. Sc. (Med.), Director, M.M. Krasnov Research Institute of Eye Diseases; Professor at the Department of Eye Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, e-mail: info@eyeacademy.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4043-456X>

Grigory A. Osipyay – Dr. Sc. (Med.), Head of the Department of Ocular Media Pathology, M.M. Krasnov Research Institute of Eye Diseases, e-mail: gregor79@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1056-4331>

Anna D. Panova – Clinical Research Assistant, M.M. Krasnov Research Institute of Eye Diseases; Junior Research Officer, The Gamaleya National Center of Epidemiology and Microbiology, e-mail: ainushgnomello@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9322-6273>

Rustem R. Agliamutdinov – Medical Resident, M.M. Krasnov Research Institute of Eye Diseases, e-mail: rustamzip@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0002-1834-9916>

Вклад авторов

Фисенко Н.В. – сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста.

Суббот А.М. – сбор и обработка материала, редактирование.

Юсеф Ю. – концепция и дизайн исследования.

Осипян Г.А. – концепция и дизайн исследования, редактирование.

Панова А.Д. – сбор и обработка материала.

Аглиамудинов Р.Р. – сбор и обработка материала.