УДК 617.72
DOI: 10.20310/1810-0198-2016-21-4-1672-1677

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ КОМПЛЕКСА СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ НА КУЛЬТУРУ ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

© А.В. Терещенко[1)], Ю.А. Белый[1)], Е.В. Петерсен[2)], Е.Х. Тахчиди[3)], С.В. Новиков[4)], Г.Ю. Усанова[3)]

[1)] Калужский филиал МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздрава России
248007, Российская Федерация. г. Калуга, ул. им. Святослава Федорова, 5
E-mail: nauka@mntk.kaluga.ru

[2)] Московский физико-технический институт (государственный университет)
141701, Российская Федерация, Москва, Керченская улица, 1А, корп. 1
E-mail: info@mipt.ru

[3)] МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова
127486, Российская Федерация, г. Москва, Бескудниковский бульвар, 59а
E-mail: nauka@mntk.ru

[4)] ООО «Научно-экспериментальное производство «Микрохирургия глаза»
127486, Российская Федерация, г. Москва, Бескудниковский бульвар, 59а
E-mail: nepmg@yandex.ru nep-mg@yandex.ru

Цель: изучение протекторных свойств различных концентраций смеси сульфатированных гликозаминогликанов (сГАГ) на клетки эпителия роговицы человека в условиях токсического воздействия раствора БХ в эксперименте in vitro.

Методы: экспериментальное исследование проводилось на культуре клеток эпителия роговицы человека. Через 48 часов культивирования проводили смену культуральной среды с добавлением исследуемых растворов. В 1 опытной группе добавляли 0,1 % сГАГ + 0,01 % БХ, во 2 – 0,5 % сГАГ + 0,01 % БХ, в 3 – 1 % сГАГ + БХ, в контрольной группе (КГ) – 0,01 % БХ. Жизнеспособность клеток оценивали путем подсчета показателей клеточного индекса (КИ) на приборе xCelligence в режиме реального времени с морфологическим контролем методом фазово-контрастной микроскопии.

Результаты: через 1 час показатели клеточного индекса в опытных группах № 3 (1,35 ± 0,26 КИ) и в ОГ № 2 (0,91 ± 0,06 КИ) показатель клеточного индекса был наибольшим, в ОГ № 1 и КГ клеточный индекс составлял 0,87 ± 0,01 КИ и 0,71 ± 0,15 КИ, соответственно. Через 2 часа наблюдалась выраженная тенденция к снижению количества жизнеспособных клеток во всех опытных группах, однако показатели КИ в группах с введением сГАГ (ОГ № 1 – 0,12 ± 0,01 КИ, ОГ № 2 – 0,15 ± 0,10 КИ, ОГ № 3 – 0,29 ± 0,01 КИ) превышали показатели контрольной группы (0,10 ± 0,07 КИ).

Заключение: результаты исследования доказали наличие протекторного действия сГАГ, что проявлялось в сохранности жизнеспособных клеток при использовании сГАГ на фоне токсического действия бензалкония хлорида.

Ключевые слова: сульфатированные гликозаминогликаны; бензалкония хлорид; токсичность; эпителий роговицы

ВВЕДЕНИЕ

Местная медикаментозная терапия глазных заболеваний может вызывать ятрогенное повреждение глазной поверхности [1–3], что необходимо учитывать при назначении терапии на длительный период времени, а также пациентам с сопутствующей патологией глазной поверхности. К основным повреждающим факторам на структуры глазной поверхности относят токсическое действие консервантов [4]. Несмотря на минимальные концентрации, применяемые в технологии производства глазных капель, консерванты могут оказывать токсическое действие на клетки эпителия роговицы за счет повреждения целостности их мембран [5–7].

Результаты многочисленных экспериментальных и клинических исследований определили актуальность разработки способов протекции и стимуляции репарации клеток эпителия роговицы, подверженных токсическому воздействию препаратов.

В последние годы большое количество исследований посвящено изучению свойств сульфатированных гликозаминогликанов (сГАГ), т. к. они являются естественными компонентами экстрацеллюлярного мартикса [8–9] и за счет свой уникальной полианионной структуры способны оказывать воздействие на многие биологические события в тканях, в т. ч. на пролиферацию клеток [10].

Целью настоящего исследования стало изучение протекторного действия различных концентраций раствора смеси сульфатированных гликозаминогликанов на культуру клеток эпителия роговицы человека в условиях токсического воздействия раствора бензалко-

ния хлорида на клеточном анализаторе xCELLigence System в режиме реального времени.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В данном исследовании использован комплекс хондроитинсульфатов с кератансульфатом, разработанный ООО «НЭП «Микрохирургия глаза». Оригинальная субстанция выделялась из прозрачной (неизмененной) стромы роговиц сельскохозяйственных животных (свиньи, крупный рогатый скот) по оригинальной технологии, описанной во временной фармакопейной статье 422678-96.

Материалом для исследования послужили клетки переднего эпителия роговицы человека. Клетки культивировались с использованием питательной среды DMEM/F12 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки HyClone III, L-глутамина (2,5 мМ) и антибиотиков пенициллин/стрептомицин (50 мкг/мл).

Визуальная оценка проводилась с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Zeiss Axio Observer A1 (Zeiss, Германия). Анализ клеточной пролиферации проводился с помощью клеточного анализатора xCELLigence RTCA DP (ACEA, США). В результате были построены графики зависимости клеточного индекса от времени.

Исследование выполнено методом прямого контакта смеси сГАГ с культурой эпителия роговицы человека (в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993.5-99. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы in vitro).

За два дня до начала эксперимента клеточная культура эпителия роговицы человека 5-го пассажа была рассажена в лунки плоскодонного 24-луночного планшета в плотности $4{,}0 \cdot 10^4$ кл/лунка. Также клеточная культура была рассажена в специальные планшеты для клеточного анализатора xCELLigence в плотности $1{,}5 \cdot 10^4$ кл/лунка. Измерения клеточного индекса происходили через каждые 15 минут. Через два дня проводилась смена среды с добавлением субстанций.

В культуру клеток группы 1 добавляли композицию сГАГ с концентрацией действующего вещества 0,1 % + 0,01 % раствор БХ. В культуру клеток группы 2 – сГАГ с концентрацией действующего вещества 0,5 % + 0,01 % раствор БХ, в культуру клеток группы 3 – сГАГ с концентрацией действующего вещества 1 % + 0,01 % раствор БХ. В качестве контроля (группа 4) использовалась культура клеток, в которую добавляли 0,01 % раствор БХ без добавления раствора сГАГ. В качестве отрицательного контроля использовалась питательная среда без клеток (обязателен для работы с xCELLigence).

Изменение импеданса на микроэлектродах, обусловленного прикреплением и распластыванием клеток, выражали как клеточный индекс (КИ), величина которого автоматически вычисляется программой: КИ = $(Rn - Rb)/t$, где Rb – исходное значение импеданса в лунке, содержащей только ростовую для клеток среду, Rn – значение импеданса в любое время t в лунке, содержащей помимо ростовой среды тестируемые клетки. КИ, таким образом, отражает изменения количества клеток, качества прикрепления клеток и морфологию клеток в лунке, которые могут меняться во времени. Данные представляли в виде среднего значения (M) ± стандартное отклонение, достоверность различий рассчитывали по U-критерию Манна–Уитни и считали значимыми при $p < 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Перед основной частью экспериментального исследования было изучено наличие прямого цитотоксического эффекта активного вещества смеси сГАГ на клетки эпителия роговицы. Как показали тесты на выявление цитотоксичности при времени инкубации 24 часа, в исследуемых образцах в разведении 20, 10, 8, 4 и 2 раза не было обнаружено ни качественных, ни количественных изменений эпителиоцитов в культуре клеток. Это позволило сделать вывод, что исследуемая смесь сГАГ не обладает цитотоксичным эффектом.

При изучении функционального влияния различных концентраций сГАГ на культуру клеток эпителия роговицы в условиях токсического воздействия раствора бензалкония хлорида учитывали два критерия: количественный – изменение клеточного индекса в режиме реального времени, и качественный – морфологический контроль клеток в культуре под действием различных концентраций сГАГ в условиях токсического воздействия раствора БХ в динамике исследования.

Изменение показателей клеточного индекса клеток эпителия роговицы человека в динамике представлены в табл. 1.

По истечении 48 часов от начала эксперимента показатели клеточного индекса во всех исследуемых культурах не имели статистического различия между собой, после чего в культуральную среду вводились исследуемые растворы согласно представленному дизайну исследования.

Через 1 час после введения исследуемых препаратов были выявлены различия между показателями клеточного индекса как в опыте при воздействии на них

Таблица 1

Показатели клеточного индекса в культуре клеток эпителия роговицы человека в зависимости от времени инкубации с исследуемыми образцами растворов сГАГ в условиях токсического действия раствора БХ ($M \pm m$)

Показатели	Клеточный индекс			
	48 ч (введение растворов)	49 ч	50 ч	51 ч
сГАГ 0,1 % + БХ	1,84 ± 0,01	0,87 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,01 ± 0,01
сГАГ 0,5 % + БХ	1,84 ± 0,00	0,91 ± 0,06	0,15 ± 0,10	0,02 ± 0,24
сГАГ 1 % + БХ	1,80 ± 0,00	1,35 ± 0,26	0,29 ± 0,01	0,07 ± 0,01
БХ	1,76 ± 0,15	0,71 ± 0,15	0,10 ± 0,07	0,01 ± 0,00
Отрицательный контроль	–0,04 ± 0,01	–0,04 ± 0,01	–0,05 ± 0,02	–0,05 ± 0,02

различных концентраций сГАГ в присутствии раствора бензалкония хлорида, так и в группе контроля.

Наибольшее внимание привлекли опытные группы с концентрациями 1 % сГАГ, где показатель клеточного индекса был наибольшим – 1,35 ± 0,26 (снижение показателей по сравнению с исходными данными на 25 %) и с концентрацией 0,5 % сГАГ, где показатель клеточного индекса составлял 0,91 ± 0,06 (снижение показателей по сравнению с исходными данными 50,55 %). В опытной (сГАГ 0,1 %) и контрольной группах показатели клеточного индекса были наименьшими, а снижение показателей по сравнению с исходными данными – наибольшим, и составляли 0,87 ± 0,01 (51,94 %) и 0,71 ± 0,15 (59,66 %), соответственно.

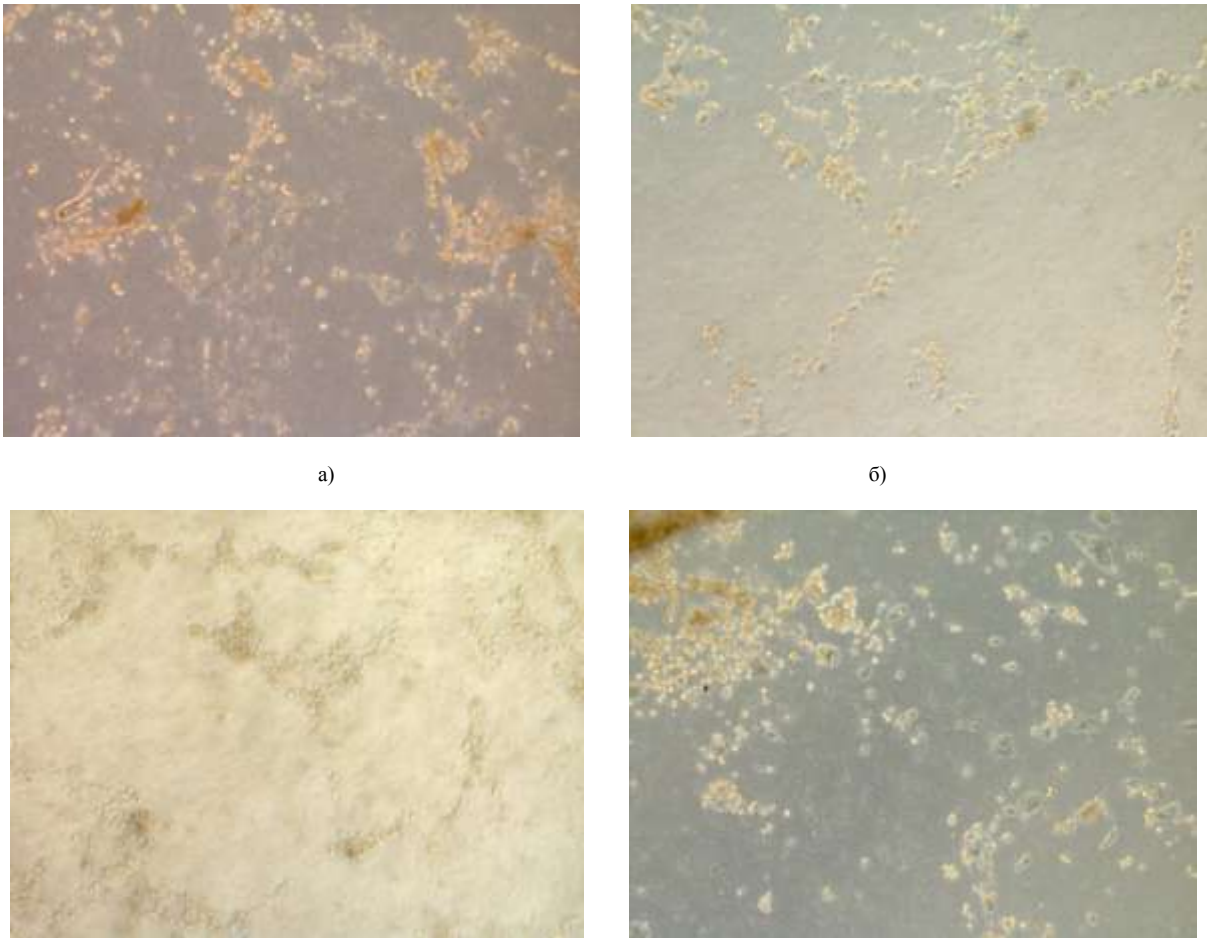
Через 2 часа после введения исследуемых образцов во всех экспериментальных группах отмечалось значительное снижение показателей клеточного импеданса клеток, что указывало на резкое снижение количества жизнеспособных клеток в культуре (рис. 1). Наибольшие показатели клеточного индекса были отмечены в опытной группе с 1 % сГАГ и составляли 0,29 ± 0,01 (снижение показателей по сравнению с исходными данными 83,89 %).

В опытной группе с 0,5 % сГАГ показатели клеточного индекса составляли 0,15 ± 0,10 (снижение показателей по сравнению с исходными данными 91,85 %), что имело существенное отличие от опытной группы с 0,1 % сГАГ и группой контроля, где данные показатели составляли 0,12 ± 0,01 (96,18 %) и 0,10 ± 0,07 (94,45 %) соответственно.

Через 3,5 часа с момента введения исследуемых растворов в опытной группе 0,1 % сГАГ и в группе контроля показатели клеточного индекса были отрицательными, при морфологическом изучении методом световой микроскопии с фазовым контрастом жизнеспособные клетки не визуализировались, вследствие чего эксперимент был прекращен.

По полученным результатам выявлена линейная зависимость, демонстрирующая динамику изменения показателей клеточного индекса клеток эпителия роговицы человека от концентрации смеси сГАГ в условиях токсического воздействия раствора бензалкония хлорида (рис. 2).

На построенном графике линейной зависимости видно, что введение растворов смеси сГАГ в диапазоне концентраций от 0,1–1 % в культуральную среду оказывает протекторное действие на культуру клеток эпителия роговицы человека по сравнению с группой контроля, о чем можно судить по показателям клеточного индекса в разные сроки эксперимента.



а) б) в) г)

Рис. 1. Морфологический контроль клеток в культуре под действием различных концентраций сГАГ в условиях токсического воздействия раствора бензалкония хлорида. Световая микроскопия с фазовым контрастом, ув. ×10: а) опытная группа 1 сГАГ 0,1 % + БХ; б) опытная группа 2 сГАГ 0,5 % + БХ; в) опытная группа 3 сГАГ 1 % + БХ; г) контроль БХ

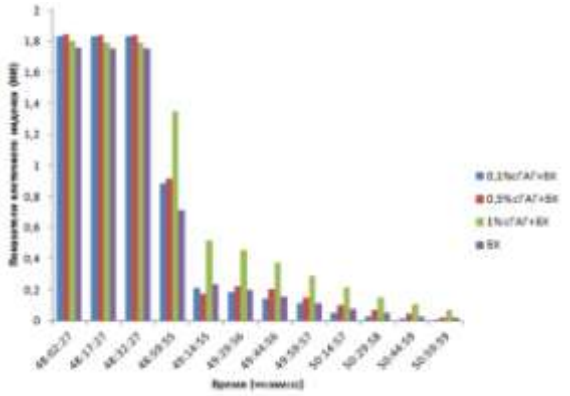


Рис. 2. Зависимость показателей клеточного индекса от времени инкубации с исследуемыми образцами смеси растворов сГАГ в условиях токсического воздействия раствора бензалкония хлорида

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время более широкое распространение среди пациентов получили офтальмологические препараты, содержащие в своем составе консерванты, что связано с их доступностью в экономическом аспекте. На сегодняшний день наиболее распространенным консервантом является бензалкония хлорид. Бензалкония хлорид подавляет контаминацию микробной флоры во флаконах многоразового использования [11], а также способствует повышению биодоступности активной субстанции препаратов через слабопроницаемую роговицу [12].

Антисептическое действие бензалкония хлорида основывается на его способности разрушать клеточные мембраны, взаимодействуя с фосфолипидами и белками, что приводит к нарушению их целостности [4].

Несмотря на минимальные концентрации, применяемые в технологии производства, бензалкония хлорид оказывает токсическое действие на структуры глазной поверхности, в т. ч. на роговицу [5; 7].

В настоящем исследовании мы подтвердили токсическое действие бензалкония хлорида на клетки эпителия роговицы, что проявлялось в резком снижении показателей клеточного импеданса и характерными изменениями морфологической картины после добавления в среду раствора бензалкония хлорид.

Однако введение в среду различных концентраций сГАГ способствовало снижению клеточной гибели в опытных образцах, что указывает на наличие протекторного действия сГАГ на клетки эпителия роговицы в условиях токсического воздействия бензалкония хлорида.

Сульфатированные гликозаминогликаны – это полианионные гетеросахариды, состоящие из повторяющихся дисахаридных единиц. Основу дисахаридов, входящих в состав сГАГ, составляют гексуроновая кислота (D-глюкуроновая кислота или L-идуроновая) и производное аминосахара (глюкоз- или галактозамина) с обязательным наличием сульфатных групп в виде О-эфиров или N-сульфата [9], что определяет их полианионное строение.

Ранее в литературе были представлены данные о протекторном действии несульфатированных гликозаминогликанов (гиалуроновой кислоты) на эпителиальные клеточные линии [13]. Протекторное действие сульфатированных гликозаминогликанов на клетки эпителия роговицы человека было изучено впервые. Уникальная полианионная химическая структура сГАГ позволяет им связывать токсические вещества в межклеточном матриксе, блокируя поступление их в клетку [14–15].

Также экзогенно введенные сГАГ могут создавать высокую концентрацию углеводов на клеточной поверхности клеток, что служит сетевым барьером для токсичных веществ, тем самым выполняя защитную функцию.

В литературе также представлены данные о противовоспалительном действии сГАГ, которое связано со способностью подавлять действие клеточных ферментов за счет изменения их конформации аллостерическим, мостиковым или подложковым способом, а также способности связывать положительно заряженные фрагменты поврежденных клеточных мембран, адсорбировать на себе продукты распада, тем самым блокируя хемотаксис. Антиоксидантное действие сГАГ реализуется за счет стабилизации активности восстанавливающих НАДФ дегидрогеназ и обмена ДНК [8], а также за счет наличия в их составе карбоксильных и сульфатных групп, сГАГ могут образовывать хелатные комплексы с ионами переходных металлов, таких как Cu^{2+} или Fe^{2+}, которые являются внеклеточными источниками активных форм кислорода путем инициации реакций Фентона и Габера–Вейса.

Результаты настоящего исследования доказали наличие протекторного действия сГАГ, что проявлялось в сохранности жизнеспособных клеток при использовании сГАГ на фоне бензалкония хлорида. Для определения области применения сГАГ необходимо изучение данной смеси в эксперименте in vivo на лабораторных животных.

ВЫВОДЫ

Данные, полученные при анализе линейных зависимостей показателей клеточного индекса в настоящем эксперименте, подтверждают выраженное токсическое действие раствора бензалкония хлорида. Соотношение показателей в опытных и контрольной группах указывает на наличие протекторного действия смеси сГАГ на клетки эпителия роговицы человека в условиях токсического воздействия раствора бензалкония хлорида.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Егоров А.Е., Огородникова В.Ю.* Изменение глазной поверхности под влиянием длительного применения антиглаукоматозных препаратов (обзор литературы) // Клиническая офтальмология. 2011. № 1. С. 41-43.
2. *Майчук Д.Ю.* Эрозии роговицы: клинические формы, новые методы лечения // Клиническая офтальмология. 2004. Т. 5. № 1. С. 17-20.
3. *Онищенко А.Л., Лихачева И.Г., Пластинина С.Л., Ткачев В.А.* Причины низкой комплаентности больных глаукомой и пути ее коррекции // Глаукома. 2009. № 4. С. 39-42.
4. *Baudouin C.* Detrimental effect of preservatives in eyedrops: implications for the treatment of glaucoma // Acta Ophthalmol. 2008. V. 86. № 7. P. 716-726.
5. *Ichijima H., Petroll W.M., Jester J.V., Cavanagh H.D.* Confocal microscopic studies of living rabbit cornea treated with benzalkonium chloride // Cornea. 1992. № 11. P. 221-225.
6. *Liang H., Baudouin C., Dupas B., Brignole-Baudouin F.* Live conjunctiva-associated lymphoid tissue analysis in rabbit under inflammatory stimuli using in vivo confocal microscopy // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2010. V. 51. № 2. P. 1008-1015.

7. *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. P. 1644-1652.
8. *Зимницкий А.Н., Башкатов С.А.* Гликозаминогликаны в биохимических механизмах адаптации организма к некоторым физиологическим и патологическим состояниям. М.: Фармацевтический бюллетень, 2004. 235 с.
9. *Северина Е.С. и др.* Биохимия. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 784 с.
10. *Тахчиди Х.П., Новиков С.В., Шацких А.В., Тахчиди Е.Х., Горбунова К.С.* Функциональное значение комплекса сульфатированных гликозаминогликанов в регуляции пролиферации фибробластов in vitro // Морфология. 2012. № 5. С. 49-53.
11. *Charnock C.* Are multidose over-the-counter artificial tears adequately preserved? // Cornea. 2006. № 25. P. 432-437.
12. *Rathore M.S., Majumdar D.K.* Effect of formulation factors on in vitro transcorneal permeation of gatifloxacin from aqueous drops // AAPSPharm. Sci. Tech. 2006. № 7. P. 57.
13. *Pauloin T., Dutot M., Warnet J.M., Rat P.* In vitro modulation of preservative toxicity: high molecular weight hyaluronan decreases apoptosis and oxidative stress induced by benzalkonium chloride // Eur. J. Pharm. Sci. 2008. V. 7. № 34. P. 263-273.
14. *Лабори Г.* Регуляция обменных процессов (теоретический, экспериментальный, фармакологический и терапевтический аспекты). М.: Медицина, 1970. 384 с.
15. *Переверзев А.Е.* Кроветворные колониеобразующие клетки и физические стресс-факторы. Л.: Наука, 1986. 172 с.

Поступила в редакцию 27 апреля 2016 г.

UDC 617.72
DOI: 10.20310/1810-0198-2016-21-4-1672-1677

STUDY OF THE EFFECTS OF COMPLEX SULPHATED GLYCOSAMINOGLYCAN ON THE CULTURE OF THE EPITHELIUM OF THE HUMAN CORNEA IN VITRO

© A.V. Tereshchenko[1)], Y.A. Belyy[1)], E.V. Petersen[2)], E.H. Takhchidi[3)], S.V. Novikov[4)], G.Y. Usanova[3)]

[1)] Academician S.N. Fyodorov FSAE ISTC "Eye Microsurgery", Kaluga branch of Ministry of Health of Russia
5 Svyatoslava Fedorova St., Kaluga, Russian Federation, 248007
E-mail: nauka@mntk.kaluga.ru

[2)] Moscow Institute of Physics and Technology (State University)
1A, building 1, Kerchenskaya St., Moscow, Russian Federation, 141701
E-mail: info@mipt.ru

[3)] Academician S.N. Fyodorov IRTC "Eye Microsurgery"
59a Beskudnikovskiy Blvd., Moscow, Russian Federation, 127486
E-mail: nauka@mntk.ru

[4)] JSC "Scientific and Experimental Production "Eye Microsurgery"
59a Beskudnikovskiy Blvd., Moscow, Russian Federation, 127486
E-mail: nepmg@yandex.ru nep-mg@yandex.ru

Purpose: to investigate in vitro protective effect of sulfated glycosaminoglycans (sGAG) on human corneal epithelial cells exposed to BAK in vitro.
Methods: experiment was carried out on the culture of the epithelium of the human cornea. In about 48 hours of culture alternation of culture medium with adding sample solution was made. In 1st test group was exposed to BAK 0.01 % + sGAG 0.1 %, in 2nd test group –BAK 0.01 %+sGAG 0.5 %, in 3d test group – BAK 0.01 % + sGAG 1 %, in 1st control group – 0.01 % BAK. For the real-time monitoring of cell growth and death we used the xCelligence real-time cell analysis system and phase-contrast microscopic study.
Results: after 1 hour of treatment the cell index (CI) values in 1st test group (BAK + 0.1 % sGAG) reached of 0.87 ± 0.01 CI, in 2nd test group (BAK + 0.5 % sGAG) 0.91 ± 0.06 CI, in 3d test group (BAK + 1 % sGAG) 1.35 ± 0.26 CI , in 1st control group (BAK) – 0.71 ± 0.15 CI.
After 2 hour of treatment the cell index (CI) values in 1st test group (BAK + 0.1 % sGAG) reached of 0.12 ± 0.01 CI, in 2nd test group (BAK + 0.5 % sGAG) 0.15 ± 0.10 CI, in 3rd test group (BAK + 1 % sGAG) 0.29 ± 0.01 CI, in control group (BAK) – 0.10 ± 0.07 CI.
Conclusions: in this study, we determined the protective effects of sGAG on the corneal epithelial cell line exposed to BAK in vitro.
Key words: sulfated glycosaminoglycans; benzalkonium chloride; toxicity; corneal epithelium

REFERENCES

1. Egorov A.E., Ogorodnikova V.Yu. Izmenenie glaznoy poverkhnosti pod vliyaniem dlitel'nogo primeneniya antiglaukomatoznykh preparatov (obzor literatury). *Russkiy meditsinskiy zhurnal. Klinicheskaya oftal'mologiya – Russian Medical Journal. Clinical Ophthalmology*, 2011, no. 1, pp. 41-43.
2. Maychuk D.Yu. Erozii rogovitsy: klinicheskie formy, novye metody lecheniya. *Russkiy meditsinskiy zhurnal. Klinicheskaya oftal'mologiya – Russian Medical Journal. Clinical Ophthalmology*, 2004, vol. 5, no. 1, pp. 17-20.

3. Onishchenko A.L., Likhacheva I.G., Plastinina S.L., Tkachev V.A. Prichiny nizkoy komplaentnosti bol'nykh glaukomoy i puti ee korrektsii. *Glaukoma – National Journal of Glaucoma*, 2009, no. 4, pp. 39-42.
4. Baudouin C. Detrimental effect of preservatives in eyedrops: implications for the treatment of glaucoma. *Acta Ophthalmol.*, 2008, vol. 86, no. 7, pp. 716-726.
5. Ichijima H., Petroll W.M., Jester J.V., Cavanagh H.D. Confocal microscopic studies of living rabbit cornea treated with benzalkonium chloride. *Cornea*, 1992, no. 11, pp. 221-225.
6. Liang H., Baudouin C., Dupas B., Brignole-Baudouin F. Live conjunctiva-associated lymphoid tissue analysis in rabbit under inflammatory stimuli using in vivo confocal microscopy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2010, vol. 51, no. 2, pp. 1008-1015.
7. 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, no. 50, pp. 1644-1652.
8. Zimnitskiy A.N., Bashkatov S.A. *Glikozaminoglikany v biokhimicheskikh mekhanizmakh adaptatsii organizma k nekotorym fiziologicheskim i patologicheskim sostoyaniyam*. Moscow, Russian pharmalicensing group Publ., 2004. 235 p.
9. Severina E.S. et al. *Biokhimiya*. Moscow, GEOTAR-MED Publ., 2004. 784 p.
10. Takhchidi Kh.P., Novikov S.V., Shatskikh A.V., Takhchidi E.Kh., Gorbunova K.S. Funktsional'noe znachenie kompleksa sul'fatirovannykh glikozaminoglikanov v regulyatsii proliferatsii fibroblastov in vitro. *Morfologiya – Neuroscience and Behavioral Physiology*, 2012, no. 5, pp. 49-53.
11. Charnock C. Are multidose over-the-counter artificial tears adequately preserved? *Cornea*, 2006, no. 25, pp. 432-437.
12. Rathore M.S., Majumdar D.K. Effect of formulation factors on in vitro transcorneal permeation of gatifloxacin from aqueous drops. *AAPSPharm. Sci. Tech.*, 2006, no. 7, p. 57.
13. Pauloin T., Dutot M., Warnet J.M., Rat P. In vitro modulation of preservative toxicity: high molecular weight hyaluronan decreases apoptosis and oxidative stress induced by benzalkonium chloride. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2008, vol. 7, no. 34, pp. 263-273.
14. Labori G. *Regulyatsiya obmennykh protsessov (teoreticheskiy, eksperimental'nyy, farmakologicheskiy i terapevticheskiy aspekty)*. Moscow, Meditsina Publ., 1970. 384 p.
15. Pereverzev A.E. *Krovetvornye kolonieobrazuyushchie kletki i fizicheskie stress-faktory*. Leningrad, Nauka Publ., 1986. 172 p.

Received 27 April 2016

Терещенко Александр Владимирович, Калужский филиал МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, г. Калуга, Российская Федерация, доктор медицинских наук, директор, заслуженный врач РФ, e-mail: nauka@mntk.kaluga.ru

Tereshchenko Aleksandr Vladimirovich, Academician S.N. Fyodorov FSBI IRTC “Eye Microsurgery”, Kaluga branch, Kaluga, Russian Federation, Doctor of Medicine, Director, Honored Doctor of Russian Federation, e-mail: nauka@mntk.kaluga.ru

Белый Юрий Александрович, Калужский филиал МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, г. Калуга, Российская Федерация, доктор медицинских наук, профессор, зам. директора по научной работе, заслуженный врач РФ, e-mail: nauka@mntk.kaluga.ru

Belyj Yuriy Aleksandrovich, Academician S.N. Fyodorov FSBI IRTC “Eye Microsurgery”, Kaluga branch, Kaluga, Russian Federation, Doctor of Medicine, Professor, Deputy Director on Scientific Work, Honored Doctor of Russian Federation, e-mail: nauka@mntk.kaluga.ru

Петерсен Елена Владимировна, Московский физико-технический институт (государственный университет), г. Москва, Российская Федерация, кандидат медицинских наук, зам. декана факультета биологической и медицинской физики по науке и инновациям, e-mail: nauka@mntk.kaluga.ru

Petersen Elena Vladimirovna, Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow, Russian Federation, Candidate of Medicine, Deputy Dean of the faculty of biological and medical physics on science and innovation, e-mail: nauka@mntk.kaluga.ru

Тахчиди Елена Христовна, МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, г. Москва, Российская Федерация, кандидат медицинских наук, врач-офтальмолог отделения глаукомы, e-mail: nauka@mntk.kaluga.ru

Tahchidi Elena Hristovna, Academician S.N. Fyodorov FSBI IRTC “Eye Microsurgery”, Moscow, Russian Federation, Candidate of Medicine, Ophthalmologist of Glaucoma Department, e-mail: nauka@mntk.kaluga.ru

Новиков Сергей Викторович, ООО «Научно-экспериментальное производство «Микрохирургия глаза», г. Москва, Российская Федерация, зам. генерального директора по производству, e-mail: nauka@mntk.kaluga.ru

Novikov Sergej Viktorovich, JSC “Scientific and Experimental production “Eye Microsurgery”, Moscow, Russian Federation, Deputy General Director for production, e-mail: nauka@mntk.kaluga.ru

Усанова Галина Юрьевна, МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, г. Москва, Российская Федерация, аспирант, e-mail: nauka@mntk.kaluga.ru

Usanova Galina Jur'evna, Academician S.N. Fyodorov FSBI IRTC “Eye Microsurgery”, Moscow, Russian Federation, Post-graduate Student, e-mail: nauka@mntk.kaluga.ru