

*Yu.V. Takhtaev, T.S. Khintuba, I.N. Okolov, Yu.I. Khorolskaya,
O.I. Aleksandrova, M.I. Blinova*

QUANTITATIVE AND QUALITATIVE ASSESSMENT OF CYTOTOXICITY OF ANTIBACTERIAL EYE DROPS OF FLUOROQUINOLONES *IN VITRO*

The research has been made within project RNF № 14-50-00068

Yuri Takhtaev – head of the Department of Ophthalmology, I. Mechnikov North-West State Medical University, member of Russian Academy of Natural Sciences, Doctor of Medicine, St. Petersburg; **e-mail: Yurii.Takhtaev@szgmu.ru.**

Tamara Khintuba – ophthalmologist, candidate for PhD, the Department of Ophthalmology, I. Mechnikov North-West State Medical University, St. Petersburg; **e-mail: Yurii.Takhtaev@szgmu.ru.**

Miralda Blinova – leading researcher, the Department of Cell Culture, the Laboratory of Cell Biology in Culture, the Group of cell biotechnology, Institute of Cytology of Russian Academy of Sciences, PhD in Biology, St. Petersburg; **e-mail: Yurii.Takhtaev@szgmu.ru.**

Igor Okolov – doctor of higher category, head of clinical biological laboratory of St. Petersburg branch of Fedorov Eye Microsurgery Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, PhD in Medicine, St. Petersburg; **e-mail: Yurii.Takhtaev@szgmu.ru.**

Yulia Khorolskaya – laboratory researcher, the Department of Cell Culture, the Laboratory of Cell Biology in Culture, the Group of cell biotechnology, Institute of Cytology of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg; **e-mail: Yurii.Takhtaev@szgmu.ru.**

Olga Aleksandrova – research assistant, the Department of Cell Culture, the Laboratory of Cell Biology in Culture, the Group of cell biotechnology, Institute of Cytology of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg; **e-mail: elga.aleks@gmail.com.**

Currently there is no single opinion concerning the toxicity of fluoroquinolones. Besides a wide coverage of antibacterial preparations and their pharmacodynamics and pharmacokinetic characteristics, the safety of the preparation is a vital aspect.

The research is aimed at comparing general cytotoxic effect of six types of eye drops of fluoroquinolones using in vitro methods. The research shows the possibility in principle to use the cultivated cells for comparative assessment of cytotoxic effect of various ophthalmologic preparations. We prove that tested antibacterial preparations can have cytostatic effect in vitro and differ from the point of view of their cytotoxic potential.

Keywords: *ophthalmologic preparations; cytotoxicity; assessment of cytotoxicity of medicinal preparation; fluoroquinolones; antibacterial eye drops.*

*Ю.В. Тахтаев, Т.С. Хинтуба, И.Н. Околов, Ю.И. Хорольская,
О.И. Александрова, М.И. Блинова*

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ И КАЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЛАЗНЫХ КАПЕЛЬ ФТОРХИНОЛОНОВОГО РЯДА *IN VITRO*

Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 14-50-00068

Юрий Викторович Тахтаев – зав. кафедрой офтальмологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, академик РАЕН, доктор медицинских наук, г. Санкт-Петербург; **e-mail: Yurii.Takhtaev@szgmu.ru.**

Тамара Славиковна Хинтуба – врач-офтальмолог, аспирант кафедры офтальмологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здраво-

охранения РФ, г. Санкт-Петербург; e-mail: Yurii.Takhtaev@szgmu.ru.

Миральда Ивановна Блинова – ведущий научный сотрудник Отдела клеточных культур Лаборатории биологии клетки в культуре, группа клеточной биотехнологии, ФГБУН «Институт цитологии РАН», кандидат биологических наук, г. Санкт-Петербург; e-mail: Yurii.Takhtaev@szgmu.ru.

Игорь Николаевич Околов – врач высшей категории, заведующий клинико-бактериологической лабораторией Санкт-Петербургского филиала ФГАУ «МНТК “Микрохирургия глаза” им. акад. С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, кандидат медицинских наук, г. Санкт-Петербург; e-mail: Yurii.Takhtaev@szgmu.ru.

Юлия Игоревна Хорольская – лаборант-исследователь Отдела клеточных культур Лаборатории биологии клетки в культуре, группа клеточной биотехнологии, ФГБУН «Институт цитологии РАН», г. Санкт-Петербург; e-mail: Yurii.Takhtaev@szgmu.ru.

Ольга Игоревна Александрова – младший научный сотрудник Отдела клеточных культур Лаборатории биологии клетки в культуре, группа клеточной биотехнологии, ФГБУН «Институт цитологии РАН», г. Санкт-Петербург; e-mail: elga.aleks@gmail.com.

В настоящее время нет единого мнения о токсичности фторхинолонов. Помимо широты спектра активности антибактериальных препаратов (АБП), а также их фармакодинамических и фармакокинетических особенностей, важным аспектом является безопасность лекарственного средства.

*Цель данного исследования состояла в сравнении общего цитотоксического действия шести антибактериальных глазных капель фторхинолонового ряда с использованием методов *in vitro*. Исследование показало принципиальную возможность использования культивируемых клеток для сравнительной оценки цитотоксического действия различных офтальмологических препаратов. Установлено, что протестированные АБП могут оказывать цитостатический эффект в условиях *in vitro* и отличаются по своему цитотоксическому потенциалу.*

Ключевые слова: офтальмологические препараты; цитотоксичность; оценка цитотоксичности лекарственных препаратов; фторхинолоны; антибактериальные глазные капли.

Введение. Выбор антибактериальных глазных капель является важным этапом профилактики послеоперационных инфекционных осложнений.

Фторхинолоны различных поколений занимали и продолжают занимать существенное место в профилактике эндофтальмитов после проведения офтальмохирургических операций. Глазные капли, содержащие в качестве МНН ципрофлоксацин, офлоксацин и левофлоксацин, достаточно давно используются в офтальмологии. В последние годы из-за развития резистентности микроорганизмов к фторхинолонам «ранних» поколений во многих клиниках мира офтальмохирурги стали использовать в своей практике фторхилоны IV поколения – моксифлоксацин и гатифлоксацин, а также безифлоксацин, который в настоящее время имеет ограниченное применение, пока только в Североамериканском регионе [4]. Помимо широты спектра и активности антибактериальных препаратов (АБП), а также их фармакодинамических и фармакокинетических особенностей, важным аспектом для их выбора является безопасность лекарственного средства. Выбирая антибактериальные глазные капли для профилактики послеоперационных осложнений офтальмохирургических операций, необходимо учитывать возможность возникновения нежелательных реакций, которые могут быть следствием токсического действия препарата на эпителиальные клетки конъюнктивы, роговицы и эн-

дотелий роговой оболочки глаза.

Оценка цитотоксичности лекарственных препаратов в рамках стандартов Надлежащей лабораторной практики (GLP) является необходимым этапом их исследования на доклиническом этапе [18]. Под цитотоксичностью понимают появление патологических изменений в клетках при действии физических, химических и биологических агентов. В зависимости от силы и мишени воздействия возможна широкая гамма изменений, ограниченная, с одной стороны, цитостатическим эффектом, нарушающим прохождение клетки по клеточному циклу, а с другой стороны – цитотоксическим эффектом, ведущим клетку к гибели [17; 20].

На уровне организма понимание цитотоксичности усложняется, поскольку конечный эффект цитотоксического действия химического вещества на клетки может зависеть от множества различных процессов и факторов [12].

Анализ научных публикаций, в которых приводятся сравнительные данные по оценке токсического воздействия офтальмологических фторхинолонов на различные клеточные структуры глаза, показал, что в настоящее время нет единого мнения по данному вопросу [8]. В отдельных работах цитотоксичность антибактериальных глазных капель связывают с наличием в их составе бензалкония хлорида (БАХ). Данный консервант, как известно, может оказывать неблагоприятное воздей-

ствии на эпителий поверхности глаза и подлежащие структуры [14; 15]. Другие авторы считают, что сама молекула АБП может оказывать цитотоксическое действие [6].

Цель данного исследования состояла в сравнении общего цитотоксического действия шести антибактериальных глазных капель фторхинолонового ряда, зарегистрированных в Российской Федерации: 1. Ципромед™ (ципрофлоксацин 3 мг/мл; консервант БАХ 0,1 мг/мл; производитель: «Сентисс Фарма Пвт. Лтд.», Индия), далее — «ципрофлоксацин»; 2. Флоксал™ (офлоксацин 3 мг/мл; консервант БАХ 0,025 мг/мл; производитель: «Др. Герхард Манн, Химикофармацевтическое предприятие ГмбХ», Германия), далее — «офлоксацин»; 3. Офтаквикс™ (левофлоксацин 5 мг/мл; консервант БАХ 0,05 мг/мл; производитель: «АО Сантэн», Финляндия), далее — «левофлоксацин (оригинальный)»; 4. Сигницеф® (левофлоксацин 5 мг/мл; консервант БАХ 0,1 мг/мл; производитель «Сентисс Фарма Пвт. Лтд.», Индия), далее — «левофлоксацин (генерик)»; 5. Вигамокс® (моксифлоксацин 5 мг/мл; без консервантов; производитель: «Алкон Лабораториз, Инк.», США), далее — «моксифлоксацин»; 6. Зимар® (гatifлоксацин 3 мг/мл; консервант БАХ 0,05 мг/мл; производитель: «Аллерган Сейлс ЛЛС», США), далее — «гatifлоксацин».

Материалы и методы. Исторически сложилось, что токсикологическая экспертиза проводится на основании данных острых, подострых, хронических и других специальных исследований на теплокровных животных (мыши, крысы, морские свинки, кролики, реже — кошки и собаки, как исключение — обезьяны) [3].

До недавнего времени токсикологические исследования на животных считались «золотым стандартом», однако эти исследования являются трудоемкими и дорогостоящими, они травмируют подопытных животных и приводят к их гибели. Кроме того, исследования цитотоксичности лекарственных препаратов с использованием систем *in vivo* осложняются наличием структурной и функциональной гетерогенности клеток и не могут быть использованы для раскрытия точных молекулярных механизмов действия лекарств. Поэтому в последние годы все чаще обосновываются предложения о разумном сочетании экспериментов *in vivo*, *in vitro* и *in silico* (компьютерное моделирование) для оптимизации оценки цитотоксичности лекарственных препаратов и биологически активных веществ [1]. Интерес к исследованиям *in vitro* постоянно повышается с этической точки зрения, так как это позволяет уменьшить количество используемых животных для биологического тестирования. Преимущество методов *in vitro* состоит в том, что они являются достаточно информативными для оценки общей цитоток-

сичности лекарственных препаратов и выявления их специфической токсичности. Высокая технологичность процесса исследований позволяет проводить быстрый скрининг одновременно нескольких препаратов непосредственно на клетках и тканях человека.

В настоящее время существуют множество различных тест-систем для исследований *in vitro*: 1) изолированные перфузируемые органы; 2) тканевые срезы; 3) клеточные культуры/суспензии; 4) изолированные органеллы/мембраны/ферменты; 5) системы беспозвоночных; 6) non-living системы; 7) компьютерные модели. Наиболее простыми и доступными системами являются монослойные клеточные культуры [2; 5]. Исследования на клеточных культурах позволяют проводить количественную оценку цитотоксичности и имеют практическое значение при выборе и обосновании применения лекарственных препаратов.

В эксперименте были использованы два типа клеток: клетки постоянной трансформированной клеточной линии СНО-К1 (клетки опухоли яичника китайского хомячка) и нормальные фибробласты кожи человека (ФК). Выбор данных клеточных культур обусловлен тем, что к общей токсичности чувствительны все клетки независимо от их происхождения и специализации в организме. Клетки СНО-К1, имеющие высокую эффективность клонирования и стабильный уровень спонтанных мутаций, активно применяются в качестве модельной тест-системы для скрининга потенциальной мутагенности и канцерогенности у млекопитающих (OECD, Test № 476:1997, IDT). Нормальные фибробласты, сохраняющие на протяжении всего срока культивирования постоянный диплоидный набор хромосом и характерную морфологию, являются одной из наиболее перспективных моделей тест-систем для биохимико-токсикологических исследований *in vitro*. Гистологически в конъюнктиве различают эпителиальный слой (epithelium conjunctivae) и соединительнотканную основу — собственную пластинку конъюнктивы (lamina propria conjunctivae). Используемые для тестирования в данной работе клеточные культуры являются элементами таких тканей: клетки СНО-К1 — эпителиальной, а фибробласты — соединительной.

Методы оценки воздействия тестируемых АБП на клетки. Для определения жизнеспособности клеток использовали количественные и качественные методы оценки:

- количественная оценка — метод клонирования клеток и колориметрический метод оценки пролиферации клеток;

- качественная оценка — прижизненное визуальное наблюдение под инвертированным микроскопом за морфологическим состоянием клеток в процессе культивирования с фотофиксацией их в момент наблюдения.

Метод клонирования. Клон – популяция клеток, произошедших из одной клетки. Четкие клоны образуются при редком посеве отдельных клеток. Эффективность клонирования определяется процентным отношением числа образовавшихся клонов через N суток культивирования к числу посеянных клеток. Эффективность клонирования характеризует жизнеспособность клеток в данных условиях культивирования. Влияние тестируемых препаратов на эффективность клонирования проверяли на клетках линии СНО-К1. Клетки линии СНО-К1 высевали на чашки Петри диаметром 3 см из расчёта 100 клеток в 2 мл среды. Культивирование проводили на среде F12 с добавлением 10%-й эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота при 37°C в CO₂-инкубаторе в газовой среде с 5% CO₂. Тестируемые препараты добавляли в питательную среду в момент посева клеток. Контролем служили клетки той же линии СНО-К1, культивировавшиеся в стандартных условиях без добавления препаратов. Срок культивирования составил 5 суток. Колонии, образовавшиеся за 5 суток культивирования, фиксировали 70%-м раствором этанола и окрашивали 0,1%-м раствором генцианвиолета. Эффективность клонирования определяли как выраженную в процентах долю числа сформировавшихся колоний, состоящих из 10 и более клеток, по отношению к числу посеянных клеток.

Колориметрический метод оценки пролиферации клеток. Степень пролиферации (т.е. размножения и роста клеток) характеризует жизнеспособность клеток в данных условиях культивирования и определяется по оптической плотности красителя (генцианвиолет), связанного с клеточными белками и экстрагированного из клеток, окрашенных после фиксации их через N суток культивирования. Влияние тестируемых препаратов на пролиферацию определяли на клетках линии СНО-К1 и нормальных фибробластах кожи человека (ФК). Культивирование клеток проводили в 96-луночных планшетах. Клетки высевали из расчёта 400 клеток на лунку в 200 мкл среды. Культивирование клеток линии СНО-К1 проводили в среде F12 с добавлением 10%-й эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота при 37°C в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂. ФК культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10%-й эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота также при 37°C в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂. Тестируемые препараты добавляли в питательную среду в момент посева клеток. Контролем служили клетки линии СНО-К1 и ФК, культивировавшиеся в стандартных условиях. Срок культивирования – 6 суток. На 6-е сутки культивирования клетки фиксировали 70%-м раствором этанола и окрашивали 0,1%-м раствором генцианвиолета. Количест-

во клеток, выросших за время культивирования, определяли методом фотоколориметрического анализа с помощью анализатора Fluorofot «Charity» (Россия) по оптической плотности красителя (генцианвиолета), связанного с клеточными белками. Измерения проводили при длине волны 570 нм. Предварительно была построена калибровочная кривая, с помощью которой по величине оптической плотности растворов в лунках судили о количестве клеток. Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы MS Excel. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Метод прижизненного наблюдения под инвертированным микроскопом с фотофиксацией позволяет визуально оценить морфологическое состояние клеток в процессе их культивирования в данных условиях и сравнить с контрольным вариантом. Прижизненное наблюдение под инвертированным микроскопом с фотофиксацией осуществляли в процессе культивирования обоих типов клеток как в средах, содержащих тестируемые АБП, так и в контроле.

Расчет концентрации препаратов для эксперимента. Для выявления различия в активности тестируемых АБП возникла необходимость в выборе тех концентраций глазных капель, при которых можно было наблюдать их действие на клетки. В зависимости от конструкции флакона объём одной капли варьирует от 25 до 50 мкл (как известно, конъюнктивальный мешок может вместить около 10 мкл жидкости). Концентрация АБП в капле принималась за 100%. Для тестирования были выбраны две концентрации АБП от объёма питательной среды – 12,5 и 1,25%, то есть разведение препаратов в 8 и в 80 раз.

Расчёт концентраций исследуемых препаратов в клинике и в эксперименте *in vitro* представлен в таблице.

Результаты. Влияние тестируемых АБП на эффективность клонирования оценивали на клетках линии СНО-К1 в двух сериях экспериментов с различной концентрацией тестируемых препаратов в объёме питательной среды – 12,5 и 1,25%.

Результаты серии экспериментов по эффективности клонирования клеток линии СНО-К1 с концентрацией тестируемых препаратов от объёма питательной среды 12,5% показали, что ни в одном из опытных вариантов данной серии экспериментов клетки линии СНО-К1 клоны не образовали. Все препараты в такой концентрации проявили высокую степень цитотоксичности при редком посеве клеток.

В процессе культивирования клеток линии СНО-К1 в питательной среде, содержащей 1,25% тестируемых препаратов, было установлено, что эффективность клонирова-

Соотношение концентраций исследуемых АБП в клинике и эксперименте

| Клиника | | Эксперимент | | | |
|---|------------------------------------|---------------------------------------|---|----------------------------------|---|
| Терапевтическая доза однократного применения (1 капля в конъюнктивальный мешок) | | Метод клонирования | | Колориметрический метод | |
| Доза препарата в конъюнктивальном мешке (мкл) | Концентрация препарата в капле (%) | Доза препарата в чашке Петри (мкл/мл) | Концентрация препарата в объеме питательной среды (%) | Доза препарата в лунке (мкл/мкл) | Концентрация препарата в объеме питательной среды (%) |
| 25 | 100 | 250/2 | 12,5 | 25/200 | 12,5 |
| 10 | 100 | 25/2 | 1,25 | 2,5/200 | 1,25 |

ния в экспериментальных вариантах была ниже, чем в контроле. По эффективности клонирования по отношению к контролю препараты распределились следующим образом: ципрофлоксацин (74%) = офлоксацин (74%) > левофлоксацин (оригинальный) (56%) > гатифлоксацин (51%) > левофлоксацин (генерик) (45%) > моксифлоксацин (18%). Результаты представлены на рис. 1.

Морфологическое состояние клонов и клеток в них представлено на рис. 2.

В представленных на рис. 2 photographиях наблюдаются различия в морфологии клонов и отдельных клеток в контроле и экспериментальных вариантах. В контроле: колонии плотные, эпителиоподобной формы, сформированы из 100 и более клеток типичных для линии СНО-К1. Наиболее близкими к контролю по морфологическим признакам клонов и клеток следует отметить клоны, культивировавшиеся при добавлении ципрофлоксацина и офлоксацина. В обоих вариантах присутствуют как плотные, так и диффузные по структуре клоны, сформированные из 50–80 клеток. В варианте с левофлоксацином (оригинальным) клоны имеют более диффузную структуру и

состоят из 20–50 клеток, не всегда имеющих характерную эпителиоподобную морфологию. В колониях преобладают округлившиеся и вытянутые клетки, с зернистой структурой, вакуолями. В вариантах с левофлоксацином (генерик) и гатифлоксацином наблюдается наиболее сильная вакуолизация клеток, а в варианте с моксифлоксацином колонии очень мелкие, диффузные и содержат менее 10 клеток. Полученные результаты показали, что тестируемые АБП в концентрации 1,25% от объема питательной среды оказывают на клетки линии СНО-К1 цитотоксическое действие разной степени. Наиболее цитопатогенное действие на клетки линии СНО-К1 оказывал моксифлоксацин.

Влияние тестируемых АБП на пролиферацию определяли на клетках линии СНО-К1 и нормальных фибробластах кожи человека (ФК). С каждым типом клеток было выполнено по две серии экспериментов с различной концентрацией тестируемых препаратов 12,5 и 1,25% от объема питательной среды. Проведение фотоколориметрического анализа выявило очень высокую степень токсичности всех тестируемых АБП, присутст-

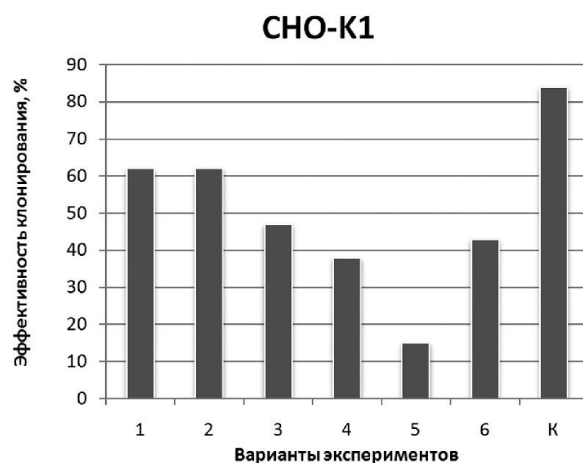


Рис. 1. Гистограмма эффективности клонирования клеток линии СНО-К1 на 5-е сутки культивирования в питательной среде, содержащей 1,25% тестируемых препаратов. Варианты экспериментов: 1 – ципрофлоксацин, 2 – офлоксацин, 3 – левофлоксацин (оригинальный), 4 – левофлоксацин (генерик), 5 – моксифлоксацин, 6 – гатифлоксацин, К – контроль.

вующих в составе питательной среды в концентрации 12,5%, как для клеток линии СНО-К1, так и для ФК. Результаты обеих серий экспериментов на клетках линии СНО-К1 и ФК с концентрацией тестируемых АБП 1,25% от объема питательной среды, полученные с помощью метода фотоколориметрического анализа, приведены на рис. 3.

При концентрации тестируемых препаратов 1,25% от объема питательной среды было установлено цитотоксическое действие АБП на клетки линии СНО-К1 в следующей после-

довательности (по убыванию токсичности): моксифлоксацин > левофлоксацин (оригинальный) > левофлоксацин (генерик) > гатифлоксацин > ципрофлоксацин > офлоксацин.

Цитотоксическое действие АБП в той же концентрации на ФК представлено следующим образом (по убыванию токсичности): ципрофлоксацин > моксифлоксацин = гатифлоксацин > левофлоксацин (генерик) = левофлоксацин (оригинальный) > офлоксацин.

Обсуждение. Помимо токсического действия, которое могут оказывать фторхиноло-

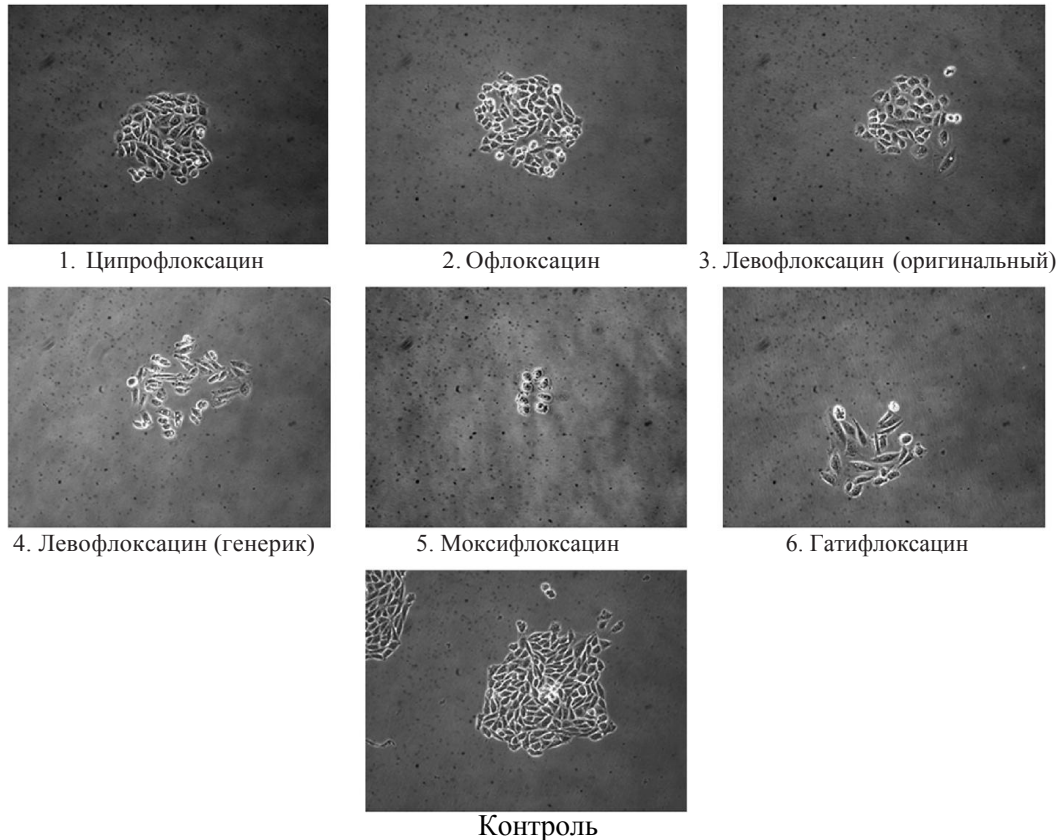


Рис. 2. Морфология клеток линии СНО-К1 в клонах, образовавшихся через 5 суток культивирования в среде содержащей 1,25% тестируемых препаратов, (×20)

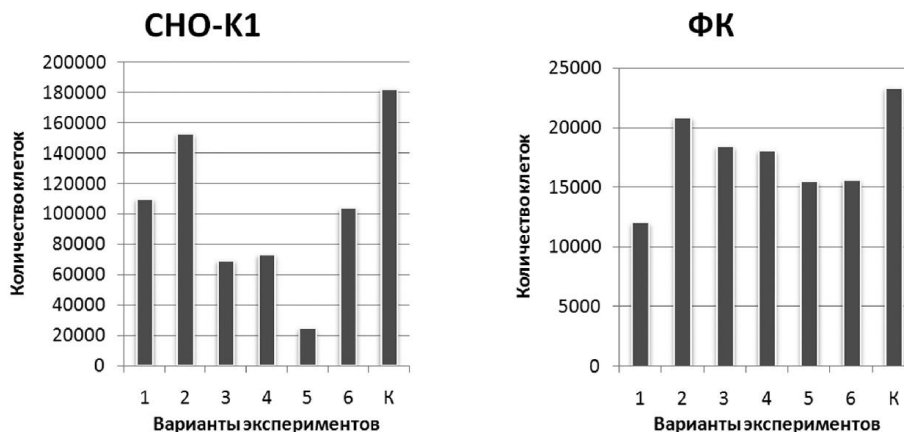


Рис. 3. Гистограммы оценки пролиферации клеток линии СНО-К1 и ФК в присутствии тестируемых АБП в питательной среде в концентрации 1,25%. Варианты экспериментов: 1 – ципрофлоксацин, 2 – офлоксацин, 3 – левофлоксацин (оригинальный), 4 – левофлоксацин (генерик), 5 – моксифлоксацин, 6 – гатифлоксацин, К – контроль

ны при системном применении: суставные и мышечные боли, разрывы сухожилий, нефро- и гепатотоксичность, действие на лимфатическую систему, имеются сообщения о нежелательных реакциях при местном применении антибактериальных глазных капель фторхинолонового ряда: синдром «сухого глаза», кровоизлияния под конъюнктиву, деструкция стекловидного тела, увеит, диплопия, оптическая нейропатия, депигментация радужки, а в отдельных случаях отслойка сетчатки и перфорация роговицы.

В настоящее время не существует стандартных методик по определению цитотоксичности глазных капель, в т.ч. антибактериальных. Стоит также отметить, что интерпретация результатов экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo* не всегда коррелирует с клинической картиной нежелательных реакций, возникающих при использовании местных лекарственных форм [10].

Результаты оценки цитотоксичности антибактериальных глазных капель фторхинолонового ряда, полученные в данном исследовании *in vitro*, показали, что антибактериальные глазные капли имеют различную степень цитотоксичности. Все протестированные препараты обладали ярко выраженным цитотоксическим действием на клетки линии СНО-К1 (клетки опухоли яичника китайского хомячка) и на нормальные фибробласты кожи человека (ФК) в концентрации 12,5% от объёма питательной среды. При концентрации тестируемых препаратов 1,25% от объёма питательной среды нами были установлены различия в степени их токсичности: наиболее цитотоксичным для клеток линии СНО-К1 оказался моксифлоксацин, а для ФК – ципрофлоксацин.

Несмотря на некоторые отличия в методологии проведения эксперимента по оценке цитотоксичности антибактериальных глазных капель, наши данные во многом совпадают с результатами, опубликованными в зарубежной научной литературе. Проведённые ранее зарубежные исследования показали, что фторхинолоны в различной степени способны подавлять пролиферацию кератоцитов [16] и при высоких концентрациях оказывать цитотоксический эффект на эндотелий роговицы [13]. В ранних работах по оценке цитотоксичности фторхинолонов было установлено, что ципрофлоксацин обладал наименьшей цитотоксичностью по отношению к роговичному эпителию в сравнении с норфлоксацином и офлоксацином, а также гентамицином и тобрамицином [9]. В последние годы в научной литературе появились публикации, в которых оценивалась цитотоксичность фторхинолонов III–IV поколений. В экспериментальных исследованиях было установлено, что левофлоксацин является менее токсичным фторхинолоном, чем моксифлоксацин или гатиф-

локсацин [7]. По данным других авторов, из пяти офтальмологических фторхинолонов левофлоксацин также показал наименьшую цитотоксичность по отношению к клеткам эндотелия роговицы человека и к кератоцитам, а ципрофлоксацин оказался наиболее цитотоксичным [8]. S. Kim и соавторы (2007) установили, что жизнеспособность эпителиоцитов роговицы человека через 24 часа экспозиции культуры клеток в присутствии левофлоксацина составила 64%, в то время как только 5% клеток были жизнеспособными после экспозиции в присутствии моксифлоксацина. Кроме того, оценка миграционной способности клеток показала, что в течение 24 часов в присутствии левофлоксацина реэпителизация проходила на 95%, что существенно не отличалось от контроля, а для моксифлоксацина этот показатель составил 60% [14]. Этот факт имеет важное значение, поскольку быстрая реэпителизация роговицы помогает предотвратить вторичное инфицирование глазной поверхности и другие возможные осложнения [11].

Несмотря на опубликованные результаты экспериментальных исследований, свидетельствующие о потенциальной цитотоксичности офтальмологических фторхинолонов IV поколения, в последнее время появляются сообщения, в которых данная информация подвергается сомнению. Так, по данным R. Watanabe и соавторов (2010), не было установлено статистически достоверных различий между токсичностью левофлоксацина и моксифлоксацина и неблагоприятного воздействия этих АБП на эпителий и эндотелий роговицы здоровых добровольцев. Оба препарата хорошо переносились и были безопасными при инстилляциях [19].

Эти данные согласуются с результатами другого исследования, в котором также не было выявлено достоверных различий в скорости заживления роговицы среди двух групп пациентов, которые в послеоперационном периоде после факоэмульсификации катаракты получали инстилляции глазных капель моксифлоксацина и левофлоксацина, хотя и наблюдалась тенденция к более быстрому темпу эпителизации в группе левофлоксацина [11]. Авторы сделали вывод, что профилактическое применение фторхинолонов IV поколения в форме антибактериальных глазных капель пациентам в послеоперационном периоде не должно вызывать серьёзных опасений по поводу кератотоксичности этих АБП.

Заключение. Проведённое исследование показало принципиальную возможность использования культивируемых клеток для сравнительной оценки цитотоксического действия различных офтальмологических препаратов *in vitro*. Представленные в работе результаты исследований по оценке цитотоксичности антибактериальных глазных капель

из группы фторхинолонов II–IV поколений демонстрируют, что данные АБП могут оказывать цитостатический эффект в условиях *in vitro* и отличаются по своему цитотоксическому потенциалу. Офтальмологи должны представлять, что любой офтальмологический препарат, в том числе и антибактериальный, может потенциально оказывать цитотоксическое действие на ткани глаза. Анализ и оценку полученных результатов следует экстраполировать на клинические признаки, которые, как правило, являются неспецифическими. Отмена лекарственного средства или его замена на менее токсичный препарат может решить проблему устранения нежелательных реакций, возникающих при использовании глазных капель.

ЛИТЕРАТУРА

1. Данченко Е.О. Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций с использованием клеточных культур // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2012. № 2. С. 22–31.
2. Еропкин М.Ю., Еропкина Е.М. Культуры клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов. СПб.: Морсар АВ, 2003.
3. Курляндский Б.А., Филатов В.А. Общая токсикология. М.: Медицина, 2002.
4. Околов И.Н., Поляк М.С. Моксифлоксацин как средство профилактики и лечения инфекции глаз // Новое в офтальмологии. 2011. № 3. С. 64–71.
5. Романова С.Г., Серебренникова Г.А., Штиль А.А. Синтез, изучение цитотоксических свойств и гемолитической активности катионных глицеролипидов алкильного типа // Вестник МИТХТ. 2008. № 3 (5). С. 101–105.
6. Ayaki M., Iwasawa A., Soda M. [et al.]. Cytotoxicity of five fluoroquinolone and two nonsteroidal anti-inflammatory benzalkonium chloride-free ophthalmic solutions in four corneoconjunctival cell lines // Clinical Ophthalmology. 2010. № 4. P. 1019–1024.
7. Ayaki M., Iwasawa A., Niwano Y. In vitro assessment of the cytotoxicity of six topical antibiotics to four cultured ocular surface cell lines // Biocontrol Sci. 2012. Jun. № 17 (2). P. 93–99.
8. Bezwada P., Clark L., Schneider S. Intrinsic cytotoxic effects of fluoroquinolones on human corneal keratocytes and endothelial cells //

Current Medical Research and Opinion. 2008. № 24. P. 1–6.

9. Cutarelli P., Lass J., Lazarus H. [et al.]. Topical fluoroquinolones: antimicrobial activity and *in vitro* corneal epithelial toxicity // Curr Eye Res. 1991. Jun. № 10 (6). P. 557–563.

10. Dart J. Corneal toxicity: the epithelium and stroma in iatrogenic and factitious disease // Eye. 2003. № 17. P. 886–892.

11. Han K., Chung W., Kim T. [et al.]. Epithelial wound healing after cataract surgery comparing two different topical fluoroquinolones // Yonsei Med J. 2014. № 55 (1). P. 197–202.

12. Johnson P.J., Marshall W.J., Bangert S.K. [et al.]. Acute and chronic liver disease. Metabolic and Clinical Aspects // Clinical Biochemistry. Churchill Livingstone. 1995. P. 237–256.

13. Kaji Y., Oshika T. Fluoroquinolone Toxicities to Corneal Endothelial Cells. Atarashii Ganka // Journal of the Eye. 2007. № 24 (9). P. 1229–1232.

14. Kim S., Lim J., Choi J. [et al.]. Comparison of antibiotic effect and corneal epithelial toxicity between levofloxacin and moxifloxacin *in vitro* // Cornea. 2007. № 26. P. 720–725.

15. Oum B., Kim N., Lee J., Park Y. Effects of fluoroquinolone eye solutions without preservatives on human corneal epithelial cells *in vitro* // Ophthalmic Res. 2014. № 51 (4). P. 216–223.

16. Sakurai M., Hatou S., Mochizuki H. In vitro effects of fluoroquinolones on corneal epithelial cells and keratocytes // Atarashii Ganka. 2006. № 23. P. 1209–1212.

17. Sturgill M.G., Lambert G.H. Xenobiotic induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function // Clinical Chemistry. 1997. № 43 (8). P. 1512–1526.

18. Tweedale A.C. Uses of «Good Laboratory Practices» by regulated industry and agencies, and the safety of bisphenol // A. J. Epidemiol. Community Health. 2011. № 65 (6). P. 475–476.

19. Watanabe R., Nakazawa T., Yokokura S. [et al.]. Fluoroquinolone antibacterial eye drops: effects on normal human corneal epithelium, stroma, and endothelium // Clinical Ophthalmology. 2010. № 4. P. 1181–1187.

20. Zimmerman H.J. Hepatotoxicity: The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1999.