

# Новые свойства слезозаместителя, содержащего гепарин, в условиях *in vitro* (потенциальный противовирусный и противовоспалительный эффект)

Г.М. Чернакова<sup>1</sup>Д.Ю. Майчук<sup>1</sup>Ю.Б. Слонимский<sup>2</sup>А.Ю. Слонимский<sup>3</sup>Е.А. Ключева<sup>2</sup>М.В. Мезенцева<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Беснудниковский бульвар, 59а, Москва, 127486, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
ул. Баррикадная, 2/1, Москва, 123995, Российская Федерация

<sup>3</sup> Московская глазная клиника  
Семеновский пер., 11, Москва, 107023, Российская Федерация

<sup>4</sup> ФГБОУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
ул. Гамалеи, 18, Москва, 123098, Российская Федерация

## РЕЗЮМЕ

Офтальмология. 2018;15(2):182–188

**Цель:** изучить цитотоксический, иммунологический и противовирусный эффект препарата хилопарин-комод® *in vitro*. **Материал и методы.** Для работы использовали перевиваемые культуры нормальных клеток конъюнктивы человека *Chang conjunctiva* и клеток почки обезьян *Vero*. Цитотоксическое действие препарата хилопарин-комод® определяли по влиянию на жизнеспособность клеток и оптической плотности (ОП) монослоя культуры клеток *Chang conjunctiva* методом иммуноферментного анализа (ИФА) с МТТ. Влияние препарата на функциональную активность клеток конъюнктивы оценивали по продукции цитокинов на уровне их транскрипции *in vitro*. Противовирусное действие препарата хилопарин-комод® изучали на линии клеток *Vero*, инфицированных вирусом простого герпеса тип 1 (ВПГ-1) и ВПГ тип 2 (ВПГ-2). Вирусную активность ВПГ-1 и ВПГ-2 и противогерпетический эффект после воздействия препарата оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). **Результаты.** Значительного цитотоксического влияния на метаболизм клеток конъюнктивы препарата хилопарин-комод® в разведениях от 1/2 до 1/2048 не выявлено (по сравнению с контролем). Воздействие препарата в разведениях 1/40 и 1/1000 на культуру клеток конъюнктивы приводило к подавлению продукция мРНК интерферона λ-1 (ИФНλ-1) и мРНК ИФНλ-2 по сравнению с контролем. В разведении препарата 1/1000 не определялась продукция мРНК интерлейкина-6 (ИЛ-6) при одновременном наличии мРНК ИЛ-10. В различных разведениях препарата количество копий вирусной ДНК ВПГ-1 снижалось по сравнению с контролем во всех случаях, наибольший противовирусный эффект достигнут в разведении 1:2. Воздействие препарата хилопарин-комод® на культуру клеток, зараженных ВПГ-2, в разведениях 1:2 и 1:5 приводило к снижению уровня репликации вируса в 300 и 40 раз, соответственно. **Заключение.** Препарат хилопарин-комод® обладает противовоспалительным эффектом, проявляющимся в подавлении синтеза мРНК острофазного провоспалительного цитокина ИЛ-6 и стимуляции продукции мРНК противовоспалительного ИЛ-10, не оказывая при этом цитотоксического действия на клетки конъюнктивы. Доказанный противовирусный эффект препарата позволяет рекомендовать включение хилопарин-комод® в схему терапии пациентов с вирусной офтальмопатологией.

**Ключевые слова:** клеточные культуры, цитотоксичность, клетки конъюнктивы человека, цитокины, вирус простого герпеса, противовирусный эффект, хилопарин-комод®

**Для цитирования:** Чернакова Г.М., Майчук Д.Ю., Слонимский Ю.Б., Слонимский А.Ю., Е.А. Ключева, Мезенцева М.В. Новые свойства слезозаместителя, содержащего гепарин, в условиях *in vitro* (потенциальный противовирусный и противовоспалительный эффект). *Офтальмология*. 2018;15(2):182–188. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2018-2-182-188>

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

**Конфликт интересов отсутствует**



# New Properties of the Heparin-Containing Drug *in vitro* (Potential Antiviral and Anti-Inflammatory Effects)

G.M. Chernakova<sup>1</sup>, D.Yu. Maychuk<sup>1</sup>, Yu.B. Slonimsky<sup>2</sup>, A.Yu. Slonimskiy<sup>3</sup>, E.A. Kleshcheva<sup>2</sup>, M.V. Mezentseva<sup>4</sup>

<sup>1</sup> The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution  
Beskudnikovskiy blvd, 59a, Moscow 127486, Russia

<sup>2</sup> Russian Medical Academy of Continuous Professional Education  
Barrikadnaya str., 2/1, Moscow, 125993, Russia

<sup>3</sup> Moscow Ophthalmology Clinic  
Semenovskii lane, 11, Moscow, 107023, Russia

<sup>4</sup> Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya  
Gamalei str., 18, Moscow, 123098, Russia

## ABSTRACT

**Ophthalmology in Russia. 2018;15(2):182-188**

**Purpose:** to study the cytological, immunological and antiviral effects of the HILOPARIN-KOMOD® drug *in vitro*. **Material and methods.** We used transplantable cultures of normal cells of the human Chang conjunctiva, and the kidney cells of the Vero monkeys. The cytotoxic effect of the HILOPARIN-KOMOD® was determined by the effect on the cell viability, and by optical density (OP) of the monolayer of the Chang conjunctiva cell culture using the enzyme immunoassay (ELISA) with MTT. The effect of the drug on the functional activity of conjunctival cells was evaluated by the production of cytokines at the level of their *in vitro* transcription. The antiviral effect of the drug HILOPARIN-KOMOD® was studied on the Vero cell line infected with herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and HSV type 2 (HSV-2). The viral activity of HSV-1 and HSV-2 and the antiherpetic effect after the drug was evaluated by polymerase chain reaction (PCR). **Results.** No significant cytotoxic effect on the metabolism of conjunctival cells of the preparation HILOPARIN-KOMOD® in dilutions from 1/2 to 1/2048 was revealed (in comparison with the control). The effect of the drug in dilutions of 1/40 and 1/1000 on the culture of the conjunctival cells resulted in suppression of interferon  $\lambda$ -1 mRNA (IFN $\lambda$ -1) and IFN $\lambda$ -2 mRNA compared to the control. In the dilution of preparation 1/1000, the production of mRNA of interleukin-6 (IL-6) was not revealed with simultaneous presence of IL-10 mRNA. In different dilutions of the drug, the number of copies of HSV-1 virus DNA decreased in comparison with the control in all cases, the greatest antiviral effect was achieved in a 1: 2 dilution. The effect of the preparation HILOPARIN-KOMOD® on the culture of cells infected with HSV-2 in dilutions of 1: 2 and 1: 5 led to a decrease in the level of viral replication by 300 and 40 times, respectively. **The conclusion.** The drug HILOPARIN-KOMOD® has an anti-inflammatory effect that manifests itself in suppressing the synthesis of the mRNA of the acute phase proinflammatory cytokine IL-6 and stimulating the production of anti-inflammatory IL-10 mRNA, without having a cytotoxic effect on conjunctival cells. The proven antiviral effect of the drug makes it possible to recommend the inclusion of HILOPARIN-KOMOD® in the scheme of therapy of patients with viral ophthalmopathy.

**Keywords:** cell cultures, cytotoxicity, human conjunctival cells, cytokines, herpes simplex virus, antiviral effect, HILOPARIN-KOMOD®

**For citation:** Chernakova G.M., Maychuk D.Yu., Slonimsky Yu.B., Slonimskiy A.Yu., Kleshcheva E. A., Mezentseva M.V. New Properties of the Heparin-Containing Drug *in vitro* (Potential Antiviral and Anti-Inflammatory Effects). *Ophthalmology in Russia*. 2018;15(2):182-188. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2018-2-182-188>

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

**There is no conflict of interests**

## ВВЕДЕНИЕ

Оценка потенциального влияния офтальмологических препаратов на различные клеточные культуры становится рутинным методом изучения их свойств, при этом в качестве материала принято использовать различные клеточные линии [1–7]. Достаточно широко в культурах клеток проводят сравнение цитотоксичности различных групп препаратов (антимикробных капель, нестероидных противовоспалительных препаратов, слезозаместителей и проч.), но лишь единичные работы<sup>1</sup> посвящены как изучению местных цитокиновых реакций в клеточных культурах, зараженных вирусами,

так и влиянию офтальмологических препаратов на снижение вирусных титров [8, 9].

**Цель исследования:** изучить цитотоксический, иммунологический и противовирусный эффект препарата хилопарин-комод® *in vitro*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали перевиваемую культуру клеток почки обезьян Vero и перевиваемую культуру нормальных клеток конъюнктивы человека *Chang conjunctiva* (клон 1-5 C-4; каталожный номер ATCC-CCL 20.2). Клетки культивировали в 96-луночных планшетах Costar в среде Игла MEM производства Московского института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова с добавлением 10%-ной фетальной сыворотки телят фирмы «ПанЭко».

<sup>1</sup> Mezentseva M.V., Suetina I.A., Russu L.I., Firsova E.L., Gushhina E.A. Effect of Single-Walled Carbon Nanotubes on Biological Properties of the cell Cultures of Human Embryonic Fibroblasts. Third International Scientific and Practical Conference "Science and Society" ISPC. 2013;3:175–84.

Исследования *in vitro* проводили с использованием вирусов из Государственной коллекции вирусов ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи: вирус простого герпеса тип 1 (ВПГ-1) и вирус простого герпеса тип 2 (ВПГ-2), размноженные на клетках *Vero*. Инфекционную активность вирусов определяли по методу Рида и Менча, инфицируя монослой клеточных культур десятикратными разведениями вирусной суспензии. Культуры клеток, инфицированные вирусами, инкубировали при температуре 37 °С, влажности 98 % и содержании в атмосфере углекислого газа не более 5 %. Время инкубации для клеток, инфицированных ВПГ-1, составляло 24 часа, ВПГ-2 — 48 часов.

Культуру клеток *Chang conjunctiva* использовали для определения цитотоксичности раствора увлажняющего офтальмологического хилопарин-комод® (гиалуроновой кислоты натриевая соль 1 мг + гепарин натрия 1300 ед., лимонная кислота безводная, натрия цитрат дигидрат, глицерол, вода). Кроме того, определяли влияние препарата на экспрессию генов цитокинов клетками культуры *Chang conjunctiva*. Противовирусную активность препарата хилопарин-комод® исследовали на инфицированной ВПГ-1 и ВПГ-2 культуре клеток *Vero*.

**Определение цитотоксического действия препарата.** Токсичность изучали при внесении разных концентраций препарата хилопарин-комод® на монослой культуры клеток *Chang conjunctiva*. Цитопатическое действие (ЦПД) лекарственного средства оценивали по количеству жизнеспособных клеток. Для этой цели использовали инвертированный микроскоп. Кроме того, проводили исследование оптической плотности (ОП) монослоя клеток методом иммуноферментного анализа (ИФА) с МТТ. Монослой культуры клеток культивировали в присутствии лекарственного препарата, добавленного в соответствующих концентрациях, в течение 72 часов при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>. Концентрацию препарата, ингибирующую значение ОП на 50 % по сравнению с клеточным контролем, принимали за 50%-ную цитотоксическую дозу (ЦТД<sub>50</sub>).

**Исследование экспрессии генов цитокинов в клеточных культурах.** Влияние препарата хилопарин-комод® на экспрессию генов цитокинов проводили в клеточных культурах *Chang Conjunctiva* после их инкубации с препаратами в течение 36 часов. Клеточные линии рассеивали в 24-луночные панели в посевной дозе (200 000 кл./мл) с последующей инкубацией в течение 24 часов до образования монослоя. Далее после смены среды в лунки вносили препарат в разведении 1/2, 1/10, 1/40, 1/1000. Экспрессия генов интерлейкина (ИЛ)-1β, ИЛ-2, -4, -6, -8, -10, -12, -17, -18, фактора некроза опухоли (ФНО)-α, интерферона (ИФН)-α, ИФН-β, -γ, -λ1, -λ2, -λ3 оценивали с использованием метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) по активности их матричной РНК (мРНК) [10, 11]. В качестве положительного контроля использовали β-актин. Фрагменты ДНК после проведения ОТ-ПЦР определяли электрофоретически в 2,5%-ном агарозном геле с до-

бавлением бромистого этидия (3,8-диамино-6-этил-5-фенилфенантридиумбромид). Маркер для электрофореза фирмы Promega (G 1758) использовали для идентификации нуклеотидных последовательностей.

**Определение противовирусной активности препарата *in vitro*.** Противовирусное действие препарата хилопарин-комод® изучали на перmissive линии клеток для герпеса *Vero*. Оценку противовирусной эффективности используемого лекарственного препарата осуществляли в соответствии с требованиями МЗСР РФ и ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»<sup>2</sup>. Система оценки противовирусного действия веществ в культуре клеток включала в себя количественное изучение подавления развития репродукции вирусов герпеса в культуре клеток. Вирусную активность ВПГ-1 и ВПГ-2 и противогерпетический эффект после воздействия препарата оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в полуколичественной модификации с использованием тест-системы «Ампли-Сенс ВПГ I, II-430» (Центральный НИИ эпидемиологии МЗ РФ, Москва). Учет продуктов ПЦР-амплификации проводили с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле в УФ-свете (λ = 302 нм) по наличию или отсутствию на электрофореграммах специфических полос амплифицированной ДНК. В качестве красителя использовали бромистый этидий.

Длина амплифицированных специфических фрагментов ДНК для ВПГ-1, -2 составляла 430 пн. Положительными считали образцы, содержавшие специфическую полосу на уровне 430 пн большей или меньшей интенсивности. Отрицательными считали образцы, не содержавшие полосы на указанном уровне. Противовирусную эффективность препарата также определяли по цитопатическому действию (ЦПД) в инвертированном микроскопе и методом ИФА с МТТ. Инфекционный титр вируса TCID<sub>50</sub> исследовали общепринятым методом десятикратных разведений. Математическую обработку результатов исследований выполняли с использованием статистических программ Biostat, позволяющих объективно оценить количественные результаты [12].

Расчет коэффициента подавления (КП) вируса проводили по формуле:

$$K = \text{титр вируса в контроле (lg)} / \text{титр вируса в опыте (lg)},$$

$$КП = (K - 1) / K \times 100\%.$$

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В нашей предыдущей публикации мы изложили алгоритм работы с клеточными культурами при исследовании свойств офтальмологических препаратов, включающий два последовательных этапа: 1) получение ориентировочных нетоксичных для данной клеточной культуры концентраций готовых лекарственных форм

<sup>2</sup> Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. Министерство здравоохранения и социального развития РФ. ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» под общей редакцией А.Н. Миронова, 2012.

препаратов с помощью МТТ-метода; 2) изучение продукции цитокинов при определенных разведениях (концентрациях) глазных капель [2]. Аналогичного алгоритма мы придерживались и в данной серии экспериментов: на первом этапе работы мы получили спектр нетоксичных разведений изучаемого препарата, а в дальнейшем провели изучение продукции цитокинов с учетом полученных данных.

Как следует из табл. 1, при использовании стандартной методики по методу МТТ в культуре клеток конъюнктивы во всех разведениях препарата в диапазоне от 1/2 до 1/2048 не определялось значительного цитотоксического влияния на метаболизм клеток в культуре (по сравнению с контролем). Это позволило на втором этапе работы проводить изучение цитокинового статуса в клеточной культуре в широком диапазоне концентраций.

**Таблица 1.** Определение влияния препарата хилопарин-комод® на клетки Chang conjunctiva с помощью МТТ-метода

**Table 1.** Determination of the effect of hiloparin-komod® on the Chang conjunctiva cells using the MTT method

Препарат разведения Remedies dilutions	Показатели оптической плотности (ОП) при длине волны 545 нм Optical density at 545 nm										
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Хилопарин-комод® Hiloparin-komod®	0.61 ± 0.028	0.82 ± 0.041	0.922 ± 0.028	0.922 ± 0.056	0.835 ± 0.038	0.9 ± 0.042	0.898 ± 0.04	0.867 ± 0.028	0.835 ± 0.11	0.75 ± 0.08	0.738 ± 0.033
Контроль Control	0.776 ± 0.074										

Для простоты эксперимента нами были взяты только четыре целых разведения препарата (1/2–1/1000) (табл. 2). В разведениях препарата 1/2 и 1/10 продукция генов цитокинов была непоказательной (результаты в таблице не приводятся). В разведениях 1/40 и 1/1000 в клеточной культуре определялась продукция генов ИФН-α и ИФН-β, вместе с тем эти же мРНК определялись и в контроле (отмечено в таблице синим цветом). В разведении 1/1000 при добавлении хилопарин-комод® определялись мРНК ИЛ-18 и мРНК ФНО-α (синий цвет), но они также присутствовали и в контрольных лунках. В разведениях 1/40 и 1/1000 не определялась продукция мРНК ИФН-λ1 и мРНК ИФН-λ2 по сравнению с контролем (выделено зеленым цветом). В разведении препарата 1/1000 не определялась продукция мРНК ИЛ-6 при одновременном наличии мРНК ИЛ-10 (выделено желтым цветом).

#### Оценка эффекта подавления размножения вирусов герпеса 1-го и 2-го типа при добавлении препарата хилопарин-комод® в культуру клеток Vero

Результаты оценки эффекта подавления размножения вирусов герпеса при добавлении в культуру клеток препарата хилопарин-комод® отражены в табл. 3. В различных разведениях препарата количество копий вирусной ДНК снижалось по сравнению с контролем (выделено красным) во всех случаях, наибольший противовирусный эффект был достигнут в разведении 1:2 (желтый цвет). При этом уровень репликации ВПГ-1 снизился в 800 раз и составил  $1,1 \cdot 10^4$  копий ДНК в 1 мл. Размножение вируса при этом подавлялось на 2lg, коэффициент подавления вируса составил 36 %. При разведениях препарата 1:5 и 1:10 отмечалось подавление размножения вируса на 1,5lg и 1,25lg, соответственно, и снижение уровня репликации ВПГ-1 в 30–50 раз ( $1,7 \cdot 10^5$  и  $2,8 \cdot 10^5$ , соответственно). В разведении 1:20 подавления размножения вируса практически не отмечалось (минимальный среди всех разведений КП — 4,9 %).

**Таблица 2.** Продукция генов цитокинов (мРНК) клетками культуры Chang conjunctiva с разведениями препарата хилопарин-комод®

**Table 2.** Production of cytokine genes (mRNA) by cells of Chang conjunctiva culture with dilutions of the hiloparin-komod®

мРНК цитокинов mRNA of the cytokines	Разведения препарата Dilutions drug		Контроль Control
	1/40	1/1000	
ИФН-α IF-α	+	+	+
ИФН-γ IF-γ	-	-	-
ИФН-β IF-β	+	+	+
ИФН-λ1 IF-λ1	-	-	+
ИФН-λ2 IF-λ2	-	-	+
ИФН-λ3 IF-λ3	-	-	-
ИЛ-1 IL-1	-	-	-
ИЛ-2 IL-2	-	-	-
ИЛ-4 IL-4	-	-	-
ИЛ-6 IL-6	-	-	+
ИЛ-8 IL-8	-	-	-
ИЛ-10 IL-10	-	+	-
ИЛ-12 IL-12	-	-	-
ИЛ-17 IL-17	-	-	-
ИЛ-18 IL-18	-	+	+
ФНО-α TNF-α	-	+	+

При добавлении препарата хилопарин-комод® в культуру клеток, зараженных ВПГ-2, в разведениях 1:2 и 1:5 отмечено снижение уровня репликации ВПГ-2 в 300 и 40 раз, соответственно. При этом определялось подавление размножения вируса на 2–2,5lg (коэффициент подавления равен 50 %). При разведении препарата 1:10 отмечено только снижение уровня репликации ВПГ-2 в 30 раз (КП равен 12,5 %), в разведении 1:20 подавления вирусной популяции не отмечено (КП = 0 %).

**Таблица 3.** Оценка эффекта подавления репликации ВПГ-1 и ВПГ-2 в культуре клеток Vero при добавлении препарата хилопарин-комод®

**Table 3.** Evaluation of the effect of suppressing the replication of HSV-1 and HSV-2 in Vero cell culture with the addition of the drug hiloparin-komod®

Разведения препарата Dilutions drug	Инфекционный титр TCID <sub>50</sub> (lg) Infectious titre TCID <sub>50</sub> (lg)	Dlg	Коэффициент подавления размножения вируса (КП, %) Viral suppression ratio	Копии ДНК, мл Copies of DNA, ml
Вирус герпеса 1-го типа (ВПГ-1 ВН-5) Herpes simplex virus type 1				
1:2	3,5	2,0	36,3	1,1·10 <sup>4</sup>
1:5	4,0	1,5	27,5	1,7·10 <sup>5</sup>
1:10	4,25	1,25	22,7	2,8·10 <sup>5</sup>
1:20	5,25	0,25	4,9	1,1·10 <sup>6</sup>
Контроль ВПГ-1 ВН-5 Control HSV-1	5,5	0	0	8,7·10 <sup>6</sup>
Вирус герпеса 2-го типа (ВПГ-2 УС-1) Herpes simplex virus type 2				
1:2	1,5	2,5	50,1	6,6·10 <sup>2</sup>
1:5	2,0	2,0	50,0	5,5·10 <sup>3</sup>
1:10	3,5	0,5	12,5	7,8·10 <sup>3</sup>
1:20	4,0	0	0	1,9·10 <sup>5</sup>
Контроль ВПГ-2 УС-1 Control HSV-2	4,0	0	0	2,2·10 <sup>5</sup>

## ОБСУЖДЕНИЕ

В целом, исследование спектра продукции генов цитокинов клетками культуры конъюнктивы под воздействием комбинированных офтальмологических препаратов с ожидаемым иммунотропным влиянием на ткани дает возможность прогнозировать эти эффекты *in vivo*. В нашей предыдущей работе при изучении в таких условиях влияния комбинации Офтальмоферон + Броксинак нами было показано, что совместное использование этих препаратов приводит к формированию адекватного противовирусного и противовоспалительного цитокинового ответа — наблюдается продукция мРНК ИФН-α, ИФН-λ, ИЛ-2 и ИЛ-12, что является научным обоснованием для успешного применения данной комбинации лекарственных препаратов для лечения воспалительных заболеваний конъюнктивы и роговицы [2].

Хилопарин-комод® — офтальмологический препарат с успешным и длительным опытом применения в качестве увлажняющего поверхность глаза и слезозаместительного средства [13]. Попытка рассмотрения его с точки зрения «противовирусного» или как минимум иммунотропного средства неслучайна. Во-первых, у нас имеется собственный эмпирический положительный опыт его использования в клинической практике в качестве препарата с мощным реабилитационным эффектом, а во-вторых, в состав препарата входят такие активные биохимические вещества с многочисленными эффектами, как гепарин и гиалуроновая кислота [14–16]. С этой точки зрения детальное изучение свойств препарата в клеточных культурах представляет как научный, так и практический интерес. Примечательно, что в разведениях препарата 1/2 и 1/10 ни один из цитокинов вообще не определялся, а в меньших концентрациях нами обнаружена продукция некоторых из них. Так, например, в разведениях 1/40 и 1/1000 обращает на себя внимание выработка клетками культуры мРНК ИФН-α и -β, но продукция этих же цитокинов определяется и в контроле, поэтому говорить о стимулирующем эффекте хилопарин-комод® этих двух видов ИФН неправомерно. Аналогично нельзя утверждать, что хилопарин-комод® стимулирует выработку мРНК ИЛ-18 и ФНО-α, поскольку они определяются и в контрольных пробах. Судя по отсутствию продукции мРНК ИФН-λ1 и -λ2 по сравнению с контролем, препарат может оказывать ингибирующее действие на эти виды ИФН.

Самым неожиданным результатом изучения продукции генов цитокинов клетками конъюнктивы оказался противовоспалительный эффект препарата, проявившийся в подавлении синтеза острофазного провоспалительного цитокина мРНК ИЛ-6 и стимуляции продукции мРНК ИЛ-10 (в разведениях 1/40 и 1/1000), обладающего, наоборот, противовоспалительными свойствами. ИЛ-10 — это цитокин с выраженным противовоспалительным эффектом [18]. Он способен подавлять лихорадку как проявление воспалительной реакции. Вырабатывают ИЛ-10 Т-клетки и моноциты (макрофаги). ИЛ-10 ингибирует продукцию ИФН-γ Т-лимфоцитами и ЕК, продукцию всех провоспалительных цитокинов макрофагами, экспрессию рецепторов ФНО-α и ИЛ-12 на естественных киллерах. Способность ИЛ-10 ингибировать продукцию ИЛ-1, -6, ФНО-α макрофагами и их окислительный взрыв связан с его способностью угнетать продукцию ИЛ-12. Таким образом, иммунологический ответ, который получен от клеток конъюнктивы человека при добавлении препарата хилопарин-комод®, свидетельствует о преимущественно противовоспалительном действии препарата, что может быть обусловлено как самим гепарином, так и высокомолекулярной гиалуроновой кислотой, входящей в его состав [17].

Ключевой цифрой, на которую стоит обратить внимание при оценке потенциального противовирусного

эффекта в культуре клеток *Vero* при добавлении препарата хилопарин-комод®, является количество вируса в контрольном образце (выделено красным цветом). Для культуры, зараженной ВПГ 1-го типа, это количество составляет  $8,7 \cdot 10^6$  копий ДНК в 1 мл. При добавлении препарата хилопарин-комод® в различных разведениях количество копий вирусной ДНК снижалось во всех случаях, но все-таки наибольший противовирусный эффект достигнут в разведении 1:2 — уровень репликации ВПГ-1 снижался в 800 раз и составлял  $1,1 \cdot 10^4$  копий ДНК в 1 мл. При добавлении хилопарин-комод® в культуру клеток, зараженных ВПГ-2, наибольший эффект отмечен в разведении 1:2 — уровень репликации ВПГ-2 снижался в 300 раз ( $6,6 \cdot 10^2$  коп./мл). Собственно, разведения препарата в данном научном эксперименте являются некой аналогией вполне реального практического факта —

разведения слезой любых препаратов, попадающих на глазную поверхность [19, 20]. Полученные данные позволяют дать объективное научное объяснение хорошему клиническому эффекту, наблюдаемому при лечении препаратом хилопарин-комод® пациентов с вирусной патологией переднего отрезка глаза (аденовирусным кератоконъюнктивитом, герпетическим кератитом). Доказанный в ходе экспериментов достаточно мощный противовирусный потенциал можно использовать, включая препарат хилопарин-комод® (гиалуроновой кислоты натриевая соль 1 мг + гепарин натрия 1300 МЕ) в схему терапии пациентов с данной патологией.

#### УЧАСТИЕ АВТОРОВ:

Майчук Д.Ю., Слонимский А.Ю., Слонимский Ю.Б. — научное редактирование; Чернакова Г.М., Мезентцева М.В. — написание текста; Клещева Е.А. — техническое редактирование, оформление библиографии; подготовка таблиц.

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Суббот А.М., Габашвили А.Н., Нестерова Т.В. Первичные культуры клеток из ткани роговицы как тест-системы для оценки действия офтальмологических препаратов и материал для изучения патогенеза заболеваний *in vitro*. Точка зрения. Восток — Запад. 2017;3:90–94. [Subbot A.M., Gabashvili A.N., Nesterova T.N. Cornea primary cell culture as test systems for assessment ophthalmological drugs and material for study of disease pathogenesis *in vitro*. East-Vest=Tochka zreniya. Vostok — Zapad. 2017;3:90–94. (In Russ.)]
2. Суетина И.А., Чернакова Г.М., Майчук Д.Ю., Руссу Л.И., Клещева Е.А., Муртазалиева С.М., Мезентцева М.В. Оценка влияния комбинации офтальмологических препаратов на культуру клеток конъюнктивы человека (chang conjunctiva). Офтальмология. 2017;14(4):368–374. [Suetina I.A., Chernakova G.M., Maychuk D.Y., Mezentseva M.V., Russu L.I., Kleshcheva E.A., Murtazaliev S.M. Evaluation of the effect of the ophthalmic remedies combination on the viability of human conjunctival cell culture chang conjunctiva]. Ophthalmology in Russia=Oftalmologiya. 2017;14(4):368–374. (In Russ.) DOI: 10.18008/1816-5095-2017-4-368-374
3. Антонов А.А., Макарова А.С., Решикова В.С. Экспериментальные исследования эффективности ретиналамина. Национальный журнал глаукома. 2017;16(3):98–102. [Antonov A.A., Makarova A.S., Reshchikova V.S. Experimental studies of Retinalamin efficacy. National Journal glaucoma=Natsional'nyi zhurnal glaukoma. 2017;16(3):98–102. (In Russ.)]
4. Александрова О.И., Околов И.Н., Тахтаев Ю.В., Хорольская Ю.И., Хинтуба Т.С., Блинова М.И. Сравнительная оценка цитотоксичности антимикробных глазных капель. Офтальмологические ведомости. 2015;8(1):89–97. [Aleksandrova O.I., Okolov I.N., Takhtaev Yu.V., Khorolskaya Ju.I., Hintuba T.S., Blinova M.I. A comparative evaluation of antimicrobial eye drops cytotoxicity. Ophthalmology journal=Oftalmologicheskie vedomosti. 2015;8(1):89–97. (In Russ.)]
5. Тахтаев Ю.В., Хинтуба Т.С., Околов И.Н., Хорольская Ю.И., Александрова О.И., Блинова М.И. Количественная и качественная оценка цитотоксичности антибактериальных глазных капель фторхинолонового ряда *in vitro*. Вестник образования и развития науки Российской академии естественных наук. 2016;2:83–90. [Takhtaev Yu.V., Khintuba T.S., Okolov I.N., Khorolskaya Yu.I., Aleksandrova O.I., Blinova M.I. Quantitative and qualitative assessment of cytotoxicity of antibacterial eye drops of fluoroquinolones *in vitro*. Herald of education and science development of Russian Academy of Natural Sciences=Vestnik obrazovaniya i razvitiya nauki Rossiiskoi akademii estestvennykh nauk. 2016;2:83–90. (In Russ.)]
6. Александрова О.И., Околов И.Н., Хорольская Ю.И., Панова И.Е., Блинова М.И. Оценка цитотоксичности слезозаместительных препаратов с использованием системы *in vitro*. Офтальмология. 2017;14(1):59–66. [Aleksandrova O.I., Okolov I.N., Khorolskaya Y.I., Panova I.E., Blinova M.I. Cytotoxicity Evaluation of Tear Substitutes Using *in vitro* System. Ophthalmology in Russia=Oftalmologiya. 2017;14(1):59–66. (In Russ.)] DOI: 10.18008/1816-5095-2017-1-59-6621
7. Александрова О.И., Околов И.Н., Хорольская Ю.И., Панова И.Е., Блинова М.И. Влияние нестероидных противовоспалительных глазных капель на клетки эпителия роговицы и конъюнктивы человека в условиях *in vitro*. Офтальмология. 2017;14(3):251–259. [Aleksandrova O.I., Okolov I.N., Khorolskaya Y.I., Panova I.E., Blinova M.I. Influence of non-steroidal anti-inflammatory eye drops on the epithelium cells of the cornea and conjunctiva *in vitro*. Ophthalmology in Russia=Oftalmologiya. 2017;14(3):251–259. (In Russ.)] DOI: 10.18008/1816-5095-2017-3-251-25922
8. Ме́йхи Б. Вирусология. Москва: Мир; 1988. [Mahy B.W.J. Virology. Moscow: Mir; 1988. (In Russ.)]
9. Davies H.W., Appleyard G., Cunningham P., Pereira M.S. The use of a continuous cell line for the isolation of influenza viruses. Bull World Health Organ. 1978;56(6):991–3.
10. Chomezynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical biochemistry. 1987;162(1):156–9. DOI: 10.1006/abio.1987.9999
11. Gelder C.M., Thomas P.S., Yates D.H., Adcock I.M., Morrison J.F., Barnes P.J. Cytokine expression in normal, atopic and asthmatic subject using the combination of sputum induction and the polymerase chain reaction. Thorax. 1995;50(10):1033–7.
12. Glantz S.A. Primer of Biostatistics. Seventh Edition. The McGraw-Hill Companies, Inc.; 2012.
13. Ткаченко Н.В., Астахов С.Ю. Опыт применения «Хилопарина» в клинической практике. Офтальмологические ведомости. 2014;7(4):53–62. [Tkachenko N.V., Astakhov S.Yu. The experience of “Hyloparin” use in clinical practice. Ophthalmology journal=Oftalmologicheskie vedomosti. 2014;7(4):53–62. (In Russ.)]
14. Jiang Z., Dong X., Yan X., Liu Y., Zhang L., Sun Y. Nanogels of dual inhibitor-modified hyaluronic acid function as a potent inhibitor of amyloid  $\beta$ -protein aggregation and cytotoxicity. Scientific reports. 2018;8(1):3505. DOI: 10.1038/s41598-018-21933-6
15. Neuman M.G., Nanau R.M., Oruna-Sanchez L., Coto G. Hyaluronic acid and wound healing. Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences. 2015;18(1):53–60.
16. Бокарев И.Н., Попова Л.В. Опыт применения низкомолекулярных гепаринов при лечении тромбоза глубоких вен. Трудный пациент. 2008;6(10):42–48. [Bokarev I.N., Popova L.V. Experience in the use of low molecular weight heparins in the treatment of deep vein thrombosis. Difficult patient=Trudnyi patsient. 2008;6(10):42–48. (In Russ.)]
17. Базарный В.В., Михайлова Н.П., Кочурова И.В., Исайкин А.И. Оценка влияния гиалуроновой кислоты на состояние гуморального иммунитета. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2012;2(39):18. [Bazarny V.V., Mikhailova N.P., Kochurova I.V., Isaikin A.I. Assessment of hyaluronic acid effect on humoral immunity. Journal of Ural Medical Academic Science=Vestnik Ural'skoi meditsinskoj akademicheskoi nauki. 2012;2(39):18. (In Russ.)]
18. Кетлинский С.А. Симбирцев А.С. Цитокины. Санкт-Петербург: Фолиант, 2008. [Ketlinskiy S.A. Simbirtsev A.S. Cytokines. Sankt-Peterburg: Foliant, 2008. (In Russ.)]
19. Nagataki S., Sugaya M. Methylcellulose and ointment vehicles: their effects on ocular pharmacokinetics. Nippon Ganka Gakkai Zasshi. 1978;82(2):127–34.
20. Chrai S.S., Patton T.F., Mehta A., Robinson J.R. Lacrimal and instilled fluid dynamics in rabbit eyes. Journal of pharmaceutical sciences. 1973;62(7):1112–21.

**СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ**

ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Чернакова Галина Мэлсовна  
кандидат медицинских наук, доцент  
Бескудниковский бульвар, 59а, Москва, 127486, Российская Федерация

ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Майчук Дмитрий Юрьевич  
доктор медицинских наук, руководитель терапевтического отдела  
Бескудниковский бульвар, 59а, Москва, 127486, Российская Федерация

ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Слонимский Юрий Борисович  
доктор медицинских наук, профессор  
ул. Баррикадная, 2/1, Москва, 123995, Российская Федерация

Московская глазная клиника  
Слонимский Алексей Юрьевич  
доктор медицинских наук, профессор  
Семеновский пер., 11, Москва, 107023, Российская Федерация

ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Клещева Елена Александровна  
кандидат медицинских наук  
ул. Баррикадная, 2/1, Москва, 123995, Российская Федерация

ФГБОУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Мезенцева Марина Владимировна  
доктор биологических наук, заведующая лабораторией  
ул. Гамалеи, 18, Москва, 123098, Российская Федерация

**ABOUT THE AUTHORS**

The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution  
Chernakova Galina M.  
PhD, docent  
Beskudnikovskiy blvd, 59a, Moscow 127486, Russia

The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution  
Maychuk Dmitriy Yu.  
MD, head of therapy department  
Beskudnikovskiy blvd, 59a, Moscow 127486, Russia

Russian Medical Academy of Continuous Professional Education  
Slonimsky Yuriy B.  
MD, professor  
Barrikadnaya str., 2/1, Moscow, 125993, Russia

Moscow Ophthalmology Clinic  
Slonimskiy Aleksei Yu.  
MD, professor  
Semenovskii lane, 11, Moscow, 107023, Russia

Russian Medical Academy of Continuous Professional Education  
Kleshcheva Elena A.  
PhD  
Barrikadnaya str., 2/1, Moscow, 125993, Russia

Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya  
Mezentseva Marina V.  
doctor of biol. sci., head of the laboratory  
Gamalei str., 18, Moscow, 123098, Russia