



## ВЛИЯНИЕ ЦИКЛОСПОРИНА А НА ФИБРОБЛАСТЫ ТЕНОНОВОЙ КАПСУЛЫ ЧЕЛОВЕКА: ИССЛЕДОВАНИЕ IN VITRO

<sup>1</sup>Россинская В.В., <sup>1</sup>Болтовская В.В., <sup>1,2</sup>Германова В.Н., <sup>1,2</sup>Карлова Е.В.,  
<sup>1</sup>Кулагина Л.Н.

<sup>1</sup>Самарский государственный медицинский университет, <sup>2</sup>Самарская областная клиническая офтальмологическая больница имени Т.И. Ерошевского, Самара, Россия, e-mail: rossinskaya\_v\_v@mail.ru

### Для цитирования:

Россинская В.В., Болтовская В.В., Германова В.Н., Карлова Е.В., Кулагина Л.Н. Влияние циклоsporина а на фибробласты теноновой капсулы человека: исследование in vitro. Морфологические ведомости. 2021;29(2):592. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2021.29\(2\).592](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2021.29(2).592)

**Резюме.** Анализ механизма действия циклоsporина А позволяет предположить, что местное пролонгированное применение этого иммунодепрессанта в хирургии глаукомы может повысить эффективность вмешательства. С целью оценки антипролиферативного эффекта и возможной цитотоксичности циклоsporина А для фибробластов теноновой капсулы человека, являющихся главным источником формирования рубца при заживлении послеоперационной раны, указанные клетки культивировали в питательной среде с добавлением препарата циклоsporина А до получения концентраций 0,05-2,00 мкг/мл в течение 7 дней. Группой контроля служили культуры фибробластов теноновой капсулы глазного яблока человека без добавления лекарственных препаратов. Антипролиферативную активность фибробластов оценивали с помощью определения плотности монослоя, индекса пролиферации, времени удвоения культуры и количества удвоений культуры. Для оценки цитотоксичности анализировали культуры, окрашенные трипановым синим, суданом IV и гематоксилином. Количественную оценку доли поврежденных клеток в культурах производили с помощью их окраски набором флуорофоров «Live/Dead». Также определяли ядерно-цитоплазматическое отношение. В результате исследования установлено, что в фазу логарифмического роста культур степень увеличения плотности монослоя находилась в обратной зависимости от концентрации препарата с коэффициентом корреляции Спирмена равным 0,9. Также была выявлена сильная корреляция между значениями индекса пролиферации, временем удвоения культуры, количеством удвоений культуры и концентрацией препарата в питательной среде. Ни в одной из исследуемых культур доля поврежденных клеток не превышала 5% и не была статистически значимо выше значений, полученных для контрольной группы. Таким образом, пролонгированное применение циклоsporина А оказывает дозозависимый антипролиферативный эффект на фибробласты теноновой капсулы человека в пределах концентраций 0,05-2,0 мкг/мл без выраженной цитотоксичности.

**Ключевые слова:** глаз человека; тенонова капсула; фибробласты; культура клеток; циклоsporин А

Статья поступила в редакцию 21 октября 2020

Статья принята к публикации 6 июля 2021

## THE EFFECT OF CYCLOSPORINE A ON THE TENON CAPSULE FIBROBLASTS OF A HUMAN: IN VITRO STUDY

<sup>1</sup>Rossinskaya VV, <sup>1</sup>Boltovskaya VV, <sup>1,2</sup>Germanova VN, <sup>1,2</sup>Karlova EV, <sup>1</sup>Kulagina LN

<sup>1</sup>Samara State Medical University, <sup>2</sup>Eroshevsky Samara Regional Clinical Ophthalmic Hospital,  
Samara, Russia, e-mail: rossinskaya\_v\_v@mail.ru

### For the citation:

Rossinskaya VV, Boltovskaya VV, Germanova VN, Karlova EV, Kulagina LN. The effect of cyclosporine a on human tenon fibroblasts: in vitro study. Morfologicheskie Vedomosti – Morphological Newsletter. 2021;29(2):592. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2021.29\(2\).592](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2021.29(2).592)

**Summary.** Analysis of the mechanism of action of cyclosporine A suggests that the local prolonged use of this immunosuppressant in glaucoma surgery may increase the effectiveness of interventions. In order to assess the antiproliferative effect and possible cytotoxicity of cyclosporine A for fibroblasts of the human tenon capsule, which are the main source of scar formation during postoperative wound healing, these cells were cultured in a nutrient medium supplemented with cyclosporine A until concentrations of 0.05-2.00 µg/ml were obtained within 7 days. The control group consisted of the culture of fibroblasts of the tenon capsule of the human eyeball without the addition of drugs. The antiproliferative activity of fibroblasts was assessed by determining the monolayer density, proliferation index, culture doubling time and the number of culture doublings. To assess cytotoxicity, cultures stained with trypan blue, Sudan IV, and hematoxylin were analyzed. The proportion of damaged cells in the cultures was quantified by staining them with a "Live/Dead" set of fluorophores. The nuclear-cytoplasmic ratio was also determined. As a result of the study, it was found that in the phase of logarithmic growth of cultures, the degree of increase in the density of the monolayer was inversely related to the concentration of the drug with Spearman's correlation coefficient equal to 0.9. A strong correlation was also found between the values of the proliferation index, the doubling time of the culture, the number of culture doublings and the concentration of the drug in the nutrient medium. In none of the studied cultures, the proportion of damaged cells did not exceed 5% and was not statistically significantly higher than the values obtained for the control group. Thus, prolonged use of cyclosporine A has a dose-dependent antiproliferative effect on human tenon's capsule fibroblasts within the concentration range of 0.05-2.0 µg/ml without pronounced cytotoxicity.

**Key words:** human eye; tenon's capsule; fibroblasts; cell culture; cyclosporine A

Article received 21 October 2020

Article accepted 6 July 2021

**Введение.** Рубцевание конъюнктивы и теноновой капсулы является нежелательным эффектом при выполнении мно-

гих вмешательств на переднем отрезке глаза. Данная проблема особенно актуальна в хирургии глаукомы, в которой послеопе-

рациональное рубцевание является главной причиной снижения эффективности гипотензивных операций с течением времени. Для улучшения исходов хирургии глаукомы было предложено применение различных противовоспалительных препаратов, антиметаболитов и цитостатиков [1-4]. Однако существующие на сегодняшний день методы коррекции заживления послеоперационной раны либо недостаточно эффективны, либо значительно увеличивают вероятность развития серьезных осложнений. На настоящем этапе развития науки избирательное воздействие на отдельные звенья сложного процесса воспаления считается наиболее перспективным в отношении снижения интенсивности избыточного разрастания соединительной ткани после операции [2, 3, 5]. К одним из таких веществ относится иммунодепрессант циклоsporин А (далее - ЦсА).

ЦсА является ингибитором кальцинейрина и оказывает иммунодепрессивное действие за счет ингибирования синтеза интерлейкина 2 (ИЛ-2) CD4+ Т-хелперами [6]. Рецепторы к ИЛ-2 обнаружены на многих иммунокомпетентных клетках, в том числе Т- и В-лимфоцитах и макрофагах, а также, по некоторым данным, на кератиноцитах и фибробластах [7]. На ранних этапах заживления раны комплексное действие ИЛ-2 как прямо, так и опосредованно приводит к увеличению интенсивности синтеза некоторых провоспалительных цитокинов и факторов роста, в том числе стимулирующих активацию и пролиферацию фибробластов (FGF, TGF- $\beta$ , IGF-1, TNF, ИЛ-1) [7-8]. Только через 10-14 дней после возникновения повреждения в ране, предположительно, появляются молекулы-ингибиторы ИЛ-2, которые способствуют снижению интенсивности воспаления и ограничивают избыточный синтез компонентов соединительной ткани [7]. Поэтому местное ингибирование синтеза ИЛ-2 в первые 10-14 дней после возникновения раны может дополнительно снизить интенсивность рубцевания.

Помимо основного иммунодепрессивного действия некоторыми авторами был обнаружен прямой антипролиферативный эффект ЦсА в отношении фибробластов. В частности, в концентрациях 1-

10 мкг/мл ЦсА подавлял пролиферацию фибробластов конъюнктивы, полученных от пациентов с весенним катаром и рубцующим пемфигоидом конъюнктивы. При концентрациях ЦсА более 10 мкг/мл наблюдали гибель большинства клеток в культуре [9]. При исследовании влияния ЦсА на фибробласты, полученные из тканей птеригиума, было выявлено нарушение жизнеспособности данных фибробластов через 6 дней после однократного воздействия ЦсА в концентрации 0,05% на культуру клеток [10].

Также было проведено несколько исследований по определению концентраций ЦсА, не оказывающих отрицательного воздействия на ткани глаза. Выявлено, что цитотоксичность препарата в отношении большинства клеток глаза, в том числе клеток Chang conjunctiva (клон 1-5 С-4 конъюнктивы), клеток заднего эпителия роговицы и пигментного эпителия сетчатки, проявляется при длительном воздействии ЦсА в концентрациях более 5 мкг/мл. Клетки стромы роговицы сохраняли свою жизнеспособность при концентрациях ЦсА до 250 мкг/мл [11,12].

При хирургии глаукомы основным источником фибробластов, мигрирующих к месту операционной травмы и обеспечивающих синтез компонентов соединительной ткани, является тенонова капсула [13]. В современной литературе не описано влияние ЦсА на фибробласты теноновой капсулы человека, что и обусловило необходимость проведения исследования на данном виде культуры клеток.

**Цель исследования:** оценка антипролиферативного эффекта и цитотоксичности циклоsporина А на фибробласты теноновой капсулы человека при длительном воздействии.

**Материалы и методы исследования.** Исследование проводили в лаборатории культур клеток биотехнологического отдела Института экспериментальной медицины и биотехнологии человека Самарского госуниверситета. Для получения первичных культур клеток образцы теноновой капсулы человека были получены у 7 пациентов Самарской областной клинической офтальмологической больницы имени Т.И. Ерошевского путем биопсии во

время выполнения офтальмохирургических вмешательств после одобрения процедур исследования локальным комитетом по биоэтике Самарского госуниверситета и получения добровольного информированного согласия пациентов. Транспортировку материала осуществляли в стерильных условиях с последующим контролем стерильности. Клетки выращивали по методике первичных эксплантатов, описанной К.Н. Гринбергом [14], в собственной модификации. При этом использовали полную ростовую среду, включавшую в себя питательную среду 199, 10%-ю эмбриональную телячью сыворотку («Биолот», Россия) и гентамицин в концентрации 40 мкг/мл. Культивирование осуществляли в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (МСО-18АС, Sanyo, Япония) при постоянной влажности и температуре 37°C, при содержании CO<sub>2</sub> 5%.

Для определения антипролиферативной активности и цитотоксичности циклоспорина А фибробласты высевали в дозе  $2 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> на дно лунок культуральных планшетов и культивировали в полной ростовой среде. По достижении конfluence монослоя 80% питательную среду заменяли новой, в которую вводили циклоспорин А в составе концентрата для приготовления раствора для внутривенных инфузий (Сандиммун, Novartis Pharma, Швейцария) до получения концентраций ЦсА в среде от 0,05 мкг/мл до 2,0 мкг/мл. Далее культивирование продолжали в CO<sub>2</sub> инкубаторе в течение 7 дней. В питательную среду культур групп контроля не вносили дополнительных лекарственных препаратов. В каждой серии эксперимента исследовали по 5 повторов культур клеток.

Ежедневно с помощью аппаратно-программного комплекса на базе инвертированного микроскопа Olympus СКХ 41 производили морфологическую оценку и фоторегистрацию культур. На 7-е сутки для выявления клеток с поврежденными мембранами или с нарушенным метаболизмом производили окраску монослоя трипановым синим, суданом IV и гематоксилином, а также набором флуоресцентных красителей («Live/Dead Cell-Mediated Cytotoxicity Kit», Invitrogen, США).

Для оценки антипролиферативной активности и возможной цитотоксичности ЦсА определяли плотность монослоя, индекс пролиферации (IP) по формуле  $IP = N_t / N_1$ , время удвоения культуры (TD) по формуле  $TD = t \times \lg 2 / \lg(N_t / N_1)$ , количество удвоений культуры (KD) по формуле  $KD = (\lg(N_t) - \lg(N_1)) / \lg 2$ , в которой  $N_1$  – плотность клеток в монослое через 24 часа после посадки клеток,  $N_t$  – количество клеток монослоя на момент определения показателя,  $t$  – время роста культуры в часах. Время удвоения культуры и индекс пролиферации определяли с 1 по 3 дни эксперимента, когда культура клеток находилась в фазе логарифмического роста. Количество удвоений культуры определяли за весь период исследования – 7 дней. Также на 7 сутки определяли ядерно-цитоплазматическое соотношение (NCI) по формуле:  $NCI = S_N / S_c$ , в которой  $S_N$  – площадь ядра,  $S_c$  – площадь цитоплазмы. При определении вышеперечисленных показателей использовали программное обеспечение CellSens Standart 1.7 («Olympus», Япония). Статистическую обработку производили с помощью программного обеспечения STATISTICA 12.0. Поскольку распределение признаков, исследованное с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка, не было нормальным, для сравнения групп использовали непараметрические методы анализа. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и обсуждение.** В течение всего эксперимента клетки во всех исследуемых концентрациях ЦсА сохраняли хорошую адгезивную способность. Границы клеток были четкими, цитоплазма гомогенной. Хорошо визуализировались ядра. Исходное значение плотности монослоя до внесения в культуру ЦсА было определено через 24 часа после пересева по окончании лаг-фазы роста культуры и составило  $177,3 \pm 5,3$  кл/мм<sup>2</sup> без значимых различий между исследуемыми культурами. Однако уже в течение первых суток наблюдали различную реакцию культур на внесение ЦсА в питательную среду: в группах контроля, группах концентраций 0,5 и 1,0 мкг/мл отмечали незначительное снижение плотности моно-

слоя, в то время как в группах концентраций 0,05, 0,2 и 2,0 мкг/мл наблюдали некоторое увеличение плотности (табл. 1). Различная реакция культур на внесение в питательную среду препарата вне зависимо-

сти от его концентрации может быть обусловлена процессами адаптации клеток к изменившимся условиям культивирования.

Таблица 1

**Динамика изменения плотности монослоя фибробластов при культивировании в различных концентрациях циклоспорина А**

| Концентрация ЦсА, мкг/мл | Плотность монослоя (кл/мм <sup>2</sup> ) |            |             |
|--------------------------|--|------------|-------------|
|                          | 0,0                                      | 0,05       | 0,2         |
| Исходная плотность       | 177,3±5,3                                |            |             |
| 1 сутки                  | 151,0±2,9                                | 235,4±5,9* | 224,2±4,4*  |
| 3 сутки                  | 341,0±18,9                               | 399,2±7,6  | 336,8±10,9  |
| 7 сутки                  | 446,2±0,7                                | 447,4±19,0 | 378,8±3,8*  |
| Концентрация ЦсА, мкг/мл | 0,5                                      | 1,0        | 2,0         |
| Исходная плотность       | 177,3±5,3                                |            |             |
| 1 сутки                  | 150,4±4,0                                | 135,4±2,2* | 237,6±6,7*  |
| 3 сутки                  | 220,2±2,9*                               | 189,8±0,9* | 287,7±3,8*  |
| 7 сутки                  | 233,2±5,5*                               | 75,0±1,6*  | 377,8±15,6* |

Примечание: \* -  $p < 0,05$  в сравнении с контрольной группой (0,00 мкг/мл)

С 1 по 3 сутки после добавления ЦсА в питательную среду исследуемые культуры находились в фазе логарифмического роста, в которую наблюдается наиболее интенсивная клеточная пролиферация. Поэтому, главным образом, именно в эту фазу определяли антипролиферативную активность ЦсА. Изменение плотности монослоя в фазу логарифмического роста находилось в обратной зависимости от концентрации ЦсА с коэффициентом корреляции Спирмена равным 0,9. Наибольшее увеличение плотности наблюдали в группе контроля, в которой ее прирост за данный промежуток времени составил  $190 \pm 21,6$  кл/мм<sup>2</sup>. Достоверно меньшие значения были получены в группе ЦсА:  $163,8 \pm 8,5$ ;  $112,6 \pm 9,1$ ;  $69,8 \pm 6,0$ ;  $54,4 \pm 2,9$  кл/мм<sup>2</sup> для концентраций 0,05; 0,2; 0,5 и 1,0, соответственно. Наименьшее изменение плотности было в группе с концентрацией ЦсА 2,0 мкг/мл -  $51,8 \pm 7,7$  кл/мм<sup>2</sup>.

С 4 по 7 сутки культуры переходили в стационарную фазу, в течение которой пролиферация клеток замедлялась во всех группах. К 7 суткам плотность монослоя была наибольшей в группе контроля -  $446,2 \pm 0,7$  кл/мм<sup>2</sup> и наименьшей в группе ЦсА с концентрацией 1,0 мкг/мл -  $75,0 \pm 1,6$  кл/мм<sup>2</sup> (табл. 1). При высоких концентрациях ЦсА в монослое наблюдали много

свободных от клеток пространств, отростки фибробластов были укорочены (рис. 1).

Более объективным в отношении изучения антипролиферативного эффекта ЦсА было определение индекса пролиферации (IP), количества удвоений культуры (KD) и времени удвоения культуры (TD), то есть показателей, не зависящих от исходной разности в плотности клеток между культурами на начало фазы логарифмического роста и более точно отражающих динамику изменения данной конкретной культуры. В период с 1 по 3 сутки, когда культуры фибробластов теноновой капсулы человека находились в фазе логарифмического роста и наблюдалась наиболее активная пролиферация клеток, значения IP находились в обратной зависимости от дозы ЦсА в питательной среде с сильной связью по шкале Чеддока (коэффициент корреляции Спирмена 0,92). Также обнаруживали постепенное увеличение показателя TD с ростом концентрации ЦсА в пределах всего изучаемого диапазона - от 0,05 до 2,00 мкг/мл (коэффициент корреляции Спирмена 0,93). При этом время удвоения культур с добавлением ЦсА превышало данный показатель контрольной группы в 1,5-5,1 раз в зависимости от концентрации. Определение показателя KD за весь период эксперимента также показало дозозависимое уменьшение количества удвоений

культуры с высокой степенью корреляции (коэффициент корреляции Спирмена 0,78). При этом в концентрации ЦсА, равной 1,00 мкг/мл, зафиксировали полное отсутствие удвоения (табл. 2). Полученные

данные свидетельствуют о наличии прямого дозозависимого антипролиферативного эффекта ЦсА на фибробласты теноновой капсулы человека.

Таблица 2

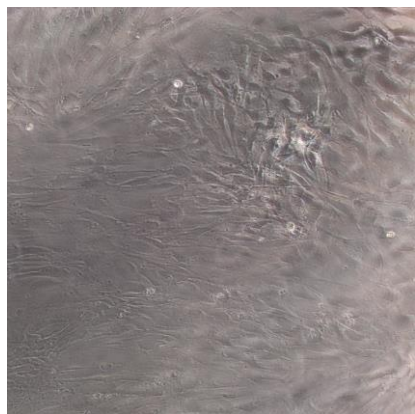
**Показатели пролиферативной активности фибробластов теноновой капсулы человека, культивируемых в различных концентрациях циклоспорина**

| Концентрация ЦсА, мкг/мл | IP, отн. ед. | TD, час       | KD, отн. ед. |
|--------------------------|--------------|---------------|--------------|
| 0,00                     | 2,27±0,17    | 42,51±3,84    | 1,56±0,03    |
| 0,05                     | 1,70±0,05*   | 63,65±3,42*   | 0,92±0,05*   |
| 0,20                     | 1,50±0,04*   | 83,53±5,63*   | 0,76±0,04*   |
| 0,50                     | 1,47±0,05*   | 89,82±7,72*   | 0,63±0,07*   |
| 1,00                     | 1,40±0,03*   | 99,61±5,28*   | -            |
| 2,00                     | 1,23±0,04*   | 214,97±47,67* | 0,64±0,06*   |

Примечание: \*-  $p < 0,05$  в сравнении с контрольной группой. IP – индекс пролиферации с 1 по 3 сутки, KD – количество удвоений культуры с 1 по 7 сутки, TD – время удвоения культуры с 1 по 3 сутки, «-» – удвоение отсутствует.

На 7 сутки эксперимента достоверных различий в значениях ядерно-цитоплазматического соотношения (NCI) между исследуемыми культурами не наблюдали. Полученные значения колебались в пределах 0,12-0,15, что свидетельствовало о том, что все исследуемые куль-

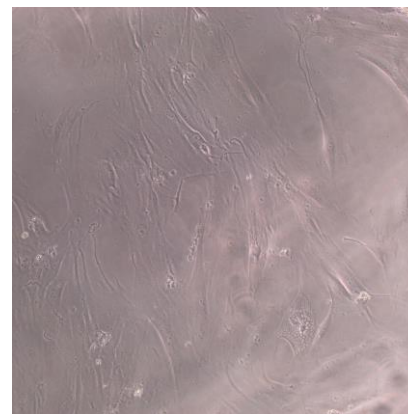
туры в данные сроки находились в стационарной фазе, а снижение плотности монослоя в культурах с добавлением ЦсА происходило за счет торможения пролиферации, а не за счет клеточной гибели (рис. 2).



**Рис. 1.** Фибробласты теноновой капсулы человека в присутствии различных концентраций ЦсА через 7 суток культивирования. Нативный препарат. Инвертированный микроскоп. Фазовый контраст. Ув. x100.



**Рис. 2.** Определение ядерно-цитоплазматического отношения фибробластов в программе CellSens Standart 1.7.



**Рис. 3.** Фибробласты теноновой капсулы человека в присутствии различных концентраций ЦсА на 7 сутки эксперимента. Окраска трипановым синим. Инвертированный микроскоп. Фазовый контраст. Ув.: x200.

При анализе препаратов, окрашенных трипановым синим, была отмечена тенденция к уменьшению количества клеток с поврежденными мембранами с увеличением концентрации ЦсА. При этом в концентрациях 1,0 и 2,0 мкг/мл повре-

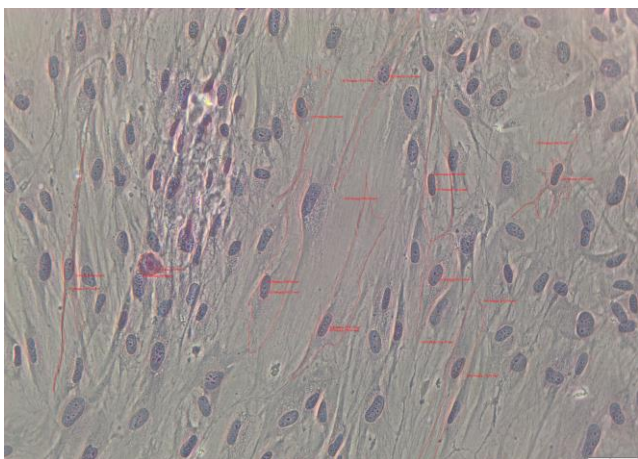
жденных клеток при данном виде окрашивания не обнаруживали. Таковую закономерность можно объяснить тем, что, вероятно, действию препарата более подвержены молодые пролиферирующие клетки, которых было больше в культурах с мень-

шими концентрациями препарата, чем стационарные клетки вне пролиферации. В концентрации ЦсА 1,0 мкг/мл согласно данным предыдущего этапа исследования пролиферация прекращалась. Тем не менее, во всех исследуемых концентрациях количество поврежденных клеток не превышало допустимого уровня для данного вида культуры клеток (рис. 3).

Окрашивание суданом IV и гематоксилином не выявило повреждения клеточных мембран. Морфология клеток характеризовалась как удовлетворительная: четкие границы, гомогенная цитоплазма, базофильные ядра с 2-4 ядрышками. Лишь в культуре с концентрацией ЦсА 0,5 мкг/мл обнаружили единичные фибробласты с красными липидными включениями (рис. 4).

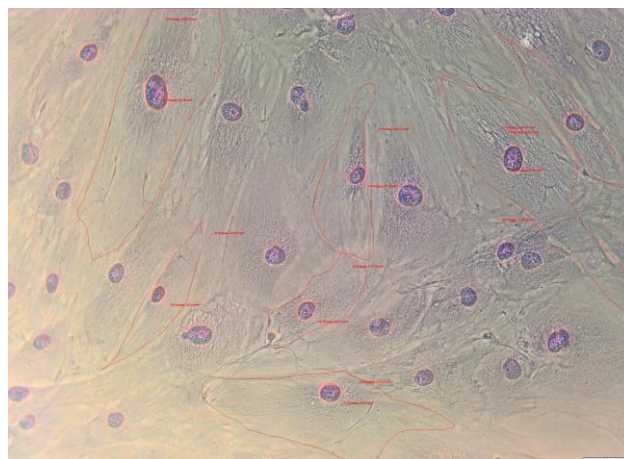
Количественное определение доли поврежденных клеток производили при

анализе препаратов, окрашенных флуоресцентными красителями набора «Live/Dead». Наименьший показатель наблюдали в концентрациях 0,05 и 1,0 мкг/мл –  $1,17 \pm 0,51\%$  и  $1,17 \pm 0,36\%$ , соответственно, наибольший показатель – в концентрации 0,2 мкг/мл –  $3,68 \pm 0,64\%$ . В контрольной группе доля поврежденных клеток составила  $3,55 \pm 0,82\%$ . Ни в одной из исследуемых культур доля клеток с поврежденными мембранами не достигала 5% (допустимой доли поврежденных клеток в стационарной культуре). Статистически достоверной разницы с группой контроля также не было обнаружено ни в одном случае (рис. 5). При анализе окрашенных препаратов также обращало на себя внимание визуально заметное снижение плотности клеточных элементов с увеличением концентрации ЦсА (рис. 3-5).



**Рис. 4.** Фибробласты теноновой капсулы человека в присутствии различных концентраций ЦсА на 7 сутки эксперимента. Инвертированный микроскоп. Синий указатель - делящаяся клетка. Красный указатель - клетка с липидными включениями. Окр.: суданом IV и гематоксилином. Ув.: x200.

Результаты исследования подтвердили литературные данные о том, что ЦсА может оказывать непосредственное антипролиферативное действие на фибробласты при отсутствии выраженной цитотоксичности в изолированной культуре клеток [9,10]. При этом антипролиферативное действие препарата в отношении фибробластов теноновой капсулы человека вы-



**Рис. 5.** Фибробласты теноновой капсулы человека в присутствии различных концентраций ЦсА на 7 сутки эксперимента. Клетки с зеленым свечением жизнеспособны. Клетки со светящимися красными ядрами имеют поврежденные мембраны (указатели). Люминесцентная микроскопия. Окр.: флуоресцентными красителями. Ув.: x100.

явлено впервые. Однако механизм подобного действия ЦсА до сих пор неизвестен. В нашем исследовании ЦсА достоверно снижал пролиферативную активность фибробластов теноновой капсулы человека во всех изученных концентрациях от 0,05 до 2,0 мкг/мл с полной остановкой пролиферации без нарушения жизнеспособности клеток при культивировании фибробла-

стов в питательной среде с содержанием ЦсА 1,0 мкг/мл. При этом антипролиферативный эффект ЦсА имел дозозависимый характер, наиболее выраженный в пределах концентраций 0,05-1,0 мкг/мл, что соответствует общепринятым терапевтическим концентрациям препарата, оказывающим иммуносупрессивное действие.

В ходе данного эксперимента не обнаружено признаков цитотоксичности ЦсА в отношении фибробластов теноновой капсулы человека в пределах изученных концентраций (0,05-2,0 мкг/мл). Ни в одной из исследуемых групп количество поврежденных клеток не превышало 5% и не было достоверно выше значений, полученных для контрольных культур клеток в питательной среде без добавления лекарственных препаратов. Результаты данного этапа исследования соответствует литературным данным, согласно которым пер-

вые признаки цитотоксичности ЦсА в отношении наиболее чувствительных к действию неблагоприятных факторов клеток глаза наблюдали при длительном культивировании их в концентрациях ЦсА, превышающих 5 мкг/мл, а признаки снижения жизнеспособности фибробластов конъюнктивы наблюдали при концентрациях более 10 мкг/мл.

**Заключение.** Таким образом, пролонгированное применение ЦсА оказывает антипролиферативный эффект на фибробласты теноновой капсулы человека в концентрациях 0,05-2,0 мкг/мл без выраженного цитотоксического эффекта. Поэтому местное применение ЦсА в хирургии глаукомы в пределах данных концентраций может быть перспективной стратегией в борьбе с послеоперационным рубцеванием.

## Литература References

1. Petrov SYu. *Sovremennaya kontseptsiya bor'by s izbytochnym rubtsevaniem posle fistuliziruyushchey khirurgii glaukomy. Protivovospalitel'nye preparaty i novye tendentsii. Oftal'mologiya.* 2017;14(2):99-105. DOI:10.18008/1816-5095-2017-2-99-105. Russian.
2. Holló G. *Wound Healing and Glaucoma Surgery: Modulating the Scarring Process with Conventional Antimetabolites and New Molecules. Glaucoma Surgery.* 2017;80-89. DOI:10.1159/000458488
3. Zada M, Pattamatta U, White A. *Modulation of Fibroblasts in Conjunctival Wound Healing. Ophthalmology.* 2018;125(2):179-192. DOI: 10.1016/j.opthta.2017.08.028.
4. Bikbov MM, Babushkin AE, Orenburkina OI. *Sovremennyye vozmozhnosti profilaktiki izbytochnogo rubtsevaniya posle antiglaukomnykh operatsiy s ispol'zovaniem antimetabolitov. Natsional'nyy zhurnal glaucoma.* 2019;18(3):55-60. DOI:10.25700/NJG.2019.03.06
5. Masoumpour M, Nowroozzadeh M, Razeghinejad M. *Current and Future Techniques in Wound Healing Modulation after Glaucoma Filtering Surgeries. Open Ophthalmol J.* 2016;10:68-85. DOI:10.2174/1874364101610010068.
6. Faulds D, Goa KL, Benfield P. *Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. Drugs.* 1993;45(6):953-1040.
7. Doersch KM, DelloStritto DJ, Newell-Rogers MK. *The contribution of interleukin-2 to effective wound healing. Exp Biol Med (Maywood).* 2017;242(4):384-396. DOI: 10.1177/1535370216675773
8. Khan SH, Martin MD, Starbeck-Miller GR, Xue HH, Harty JT, Badovinac VP. *The Timing of Stimulation and IL-2 Signaling Regulate Secondary CD8 T Cell Responses. PLoS Pathog.* 2015;11(10):e1005199. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005199.
9. Leonardi A, DeFranchis G, Fregona IA, Violato D, Plebani M, Secchi AG. *Effects of Cyclosporin A on Human Conjunctival Fibroblasts. Arch Ophthalmol.* 2001;119(10):1512-1517. DOI: 10.1001/archophth.119.10.1512.
10. Viveiros MMH, Kakizaki FY, Hércules LA. *In vitro study of cyclosporine A 0.05 % on primary and recurrent pterygium fibroblasts. Int Ophthalmol.* 2016;36:237-242. DOI:10.1007/s10792-015-0106-2.
11. Tang-Liu DD, Acheampong A. *Ocular pharmacokinetics and safety of ciclosporin, a novel topical treatment for dry eye. Clin Pharmacokinet.* 2005;44(3):247-61. DOI: 10.2165/00003088-200544030-00003.

12. Garweg JG, Wegmann-Burns M, Goldblum D. Effects of daunorubicin, mitomycin C, azathioprine and cyclosporin A on human retinal pigmented epithelial, corneal endothelial and conjunctival cell lines. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2006;244(3):382-389. DOI: 10.1007/s00417-005-0017-4.
13. Trelford CB, Denstedt JT, Armstrong JJ, Hutnik CML. The Pro-Fibrotic Behavior of Human Tenon's Capsule Fibroblasts in Medically Treated Glaucoma Patients. *Clin Ophthalmol.* 2020;14:1391-1402. DOI: 10.2147/OPTH.S245915.
14. Grinberg KN, Kukharensko VI. *Metody kul' tivoirovaniya kletok.* Leningrad: Nauka, 1987.- S. 250-257.

Авторы заявляют об отсутствии каких-либо конфликтов интересов при планировании, выполнении, финансировании и использовании результатов настоящего исследования.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Самарской области, Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере.

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Россинская Виктория Викторовна**, кандидат медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник, лаборатория культур клеток биотехнологического центра «БиоТех», Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия;  
**e-mail: rossinskaya\_v\_v@mail.ru**

**Болтовская Виолетта Викторовна**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, лаборатория культур клеток биотехнологического центра «БиоТех», Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия;  
**e-mail: violetta.boltovskaya@yandex.ru**

**Германова Виктория Николаевна**, аспирант, кафедра офтальмологии, Самарский государственный медицинский университет; врач-офтальмолог, офтальмологическое отделение № 3, Самарская областная клиническая офтальмологическая больница имени Т.И. Ерошевского, Самара, Россия;  
**e-mail: vngermanova@gmail.com**

**Карлова Елена Владимировна**, доктор медицинских наук, доцент, кафедра офтальмологии, Самарский государственный медицинский университет; заместитель главного врача по инновационно-технологическому развитию, Самарская об-

The authors declare that they have no conflicts of interest in the planning, implementation, financing and use of the results of this study.

The research was carried out with the support of the Ministry of Education and Science of the Samara Region and the Foundation for Assistance to the Development of Small Forms of Enterprises in the Scientific and Technical area.

#### INFORMATION ABOUT AUTHORS

**Victoria V. Rossinskaya**, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory of Cell Cultures of the Biotechnological Center «BioTech», Samara State Medical University, Samara, Russia;  
**e-mail: rossinskaya\_v\_v@mail.ru**

**Violetta V. Boltovskaya**, Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Cell Cultures of the Biotechnological Center «BioTech», Samara State Medical University, Samara, Russia;  
**e-mail: violetta.boltovskaya@yandex.ru**

**Viktoriya N. Germanova**, postgraduate student, Department of Ophthalmology, Samara State Medical University; ophthalmologist, ophthalmological department No. 3, Eroshevsky Samara Regional Clinical Ophthalmic Hospital, Samara, Russia;  
**e-mail: vngermanova@gmail.com**

**Elena V. Karlova**, Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Department of Ophthalmology, Samara State Medical University, Deputy Chief Physician for Innovative and Technological Development of the Eroshevsky Samara Regional Clinical Ophthalmic Hospital,



ластная клиническая офтальмологическая  
больница имени Т.И. Ерошевского, Самара,  
Россия;

**e-mail: karlova@inbox.ru**

**Кулагина Лариса Николаевна**, главный  
специалист, лаборатория культур клеток  
биотехнологического центра «БиоТех»,  
Самарский государственный медицинский  
университет, Самара, Россия;

**e-mail: lnkulagina07@mail.ru**

Samara, Russia;

**e-mail: karlova@inbox.ru**

**Larisa N. Kulagina**, Chief Specialist, Laborato-  
ry of Cell Cultures of the Biotechnological Cen-  
ter «BioTech», Samara State Medical University,  
Samara, Russia;

**e-mail: lnkulagina07@mail.ru**