

УДК 57.085.23, 57.085.25

## IN VITRO СКРИНИНГ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЭХИНОХРОМА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГЛАЗ

© 2024 г. Э. И. Александер-Синклер<sup>1,\*</sup>, С. А. Александрова<sup>1</sup>, Д. М. Дарвиш<sup>1</sup>, Н. В. Едоменко<sup>1</sup>, В. И. Горбач<sup>2</sup>, А. О. Кравченко<sup>2</sup>, И. М. Ермак<sup>2</sup>, Н. А. Михайлова<sup>1</sup>, М. И. Блинова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия;

<sup>2</sup>Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, 690022, Россия

\*E-mail: elga.aleks@gmail.com

Поступила в редакцию 15.08.2022

После доработки 28.11.2023

Принята к публикации 01.03.2024

Важной задачей местного применения лекарств для лечения глаз является достижение компромисса между их эффективностью и безопасностью. Разработка новых многофункциональных местных офтальмологических систем доставки лекарств и скрининг *in vitro* потенциальных лекарственных глазных средств являются ключевыми направлениями в решении этой задачи. В настоящем исследовании был проведен первичный *in vitro* скрининг влияния эхинохрома (Ech), комплекса каррагинана (CRG) и Ech и его липосомной формы (CRG/Ech-Lip) на культивируемые эпителиальные клетки наружной оболочки глазного яблока — клетки эпителия конъюнктивы (Chang Conjunctiva, Clone 1—5c-4) и эпителия роговицы человека (HCE). Оценивали жизнеспособность клеток по их морфологии и метаболической активности с использованием световой микроскопии и МТТ-теста. Выявлена прямая зависимость интенсивности проявления цитотоксического действия Ech относительно его концентрации в питательной среде, формы использования, клеточной тест-системы и времени воздействия Ech на клетки. Ech в форме спиртового раствора в питательной среде в конечной концентрации 0.1 мг/мл проявляет выраженную цитотоксичность в отношении обеих клеточных тест-систем. Такая же концентрация Ech в питательной среде в составе комплекса CRG/Ech оказалась критичной только для жизнеспособности эпителиальных клеток роговицы, в то время как выживаемость клеток конъюнктивы в этом случае составляла около 50%. Выявлена высокая биосовместимость липосомной формы каррагинанового комплекса эхинохрома CRG/Ech-Lip с клетками обеих тест-систем и стимулирующее цитопротекторное действие в отношении клеток эпителия конъюнктивы.

**Ключевые слова:** каррагинан, эхинохром, каррагинановый комплекс эхинохрома, липосомы, системы доставки офтальмологических препаратов, цитотоксичность, клеточные культуры, эпителий глазной поверхности

**Принятые сокращения:** CRG — каррагинан; CRG/Ech — каррагинановый комплекс эхинохрома; CRG/Ech-Lip — липосомная форма комплекса CRG/Ech; Ech — эхинохром; Lip — липосомы.

**DOI:** 10.31857/S0041377124030085, **EDN:** PEBSAD

Заболевания глаз представляют собой обширный спектр разнородной патологии, поэтому для их лечения используют различные методы и средства. Многие глазные заболевания удается вылечить при помощи консервативного лечения. Для этого широко используются различные группы лекарственных средств местного применения: глазные капли, мази, иногда инъекции в ткани, окружающие глазное яблоко (Егоров, 2004). Тем не менее оптимальная рациональная фармакотерапия в офтальмологии до настоящего момента является проблемой из-за сложной природы и структуры глаза. Большинство лекарств для лечения заболевания переднего отрезка глаза применяется в виде глазных капель. Они

удобны в применении, однако быстро удаляются из конъюнктивальной полости. Время поглощения лекарства составляет всего несколько минут, при этом биодоступность лекарства очень низка. В итоге для достижения терапевтического эффекта требуется несколько применений в день. При заболеваниях заднего отдела глаза в большинстве случаев применяют интравитреальное введение высоких доз препаратов. Постоянное или непрерывное применение высоких концентраций лекарственных средств в течение определенного периода времени, необходимое для достижения терапевтического эффекта, сопряжено с риском возникновения побочных эффектов (Seyfoddin et al., 2010; Лепарская

и др., 2011). Достижение высоких терапевтически обусловленных концентраций препарата без повреждения поверхности глаза и других нежелательных реакций организма является важной задачей при лечении глаз (Mishra et al., 2011). На мировом фармацевтическом рынке представлено большое количество офтальмологических лекарственных средств и ежегодно появляются новые. Для возможности осуществления рационального выбора Всемирной Организацией Здравоохранения был разработан ряд критериев оценки лекарственных средств. Среди этих критериев, помимо эффективности и стоимости, важное место занимают биодоступность, приемлемость и безопасность (Фитилев и др., 2017). С учетом этих критериев в настоящее время активно разрабатываются как новые лекарственные средства, так и совершенствуются лекарственные формы уже используемых средств. Одним из таких способов совершенствования является разработка многофункциональных систем доставки лекарств.

Эхинохром (Ech) является одним из самых распространенных и наиболее фармакологически изученных хиноидных пигментов морских ежей, из панцирей и перивисцеральной жидкости которых он впервые был получен в 1883 г., а строение его молекулы установлено в 1939 г. (Anderson et al., 1969; Thomson, 1971). Несмотря на столь долгую историю, Ech, благодаря своим свойствам, остается флагманом в разработке новых лекарственных препаратов на основе морских продуктов (Ковалев и др., 2016; Kim et al., 2021). Исследования последних десятилетий демонстрируют, что Ech обладает антиоксидантными, противомикробными, противовирусными, противовоспалительными, противоопухолевыми и хелатирующими свойствами. Все это делает Ech интересным объектом для создания на его основе новых лекарственных препаратов для терапии широкого спектра заболеваний: офтальмологических, сердечно-сосудистых, цереброваскулярных, воспалительных, метаболических, онкологических и т. д. (Тедеева и др., 2014; Талалаева и др., 2017). В 1999 г. в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН на основе гидрофобного Ech разработаны лекарственные средства инъекционной формы серии Гистохром®, которые уже показали свою эффективность при лечении различных заболеваний, в том числе кардиологических и офтальмологических (Elyakov et al., 2002, 2004, 2007). Однако инъекционная форма препарата не всегда является оптимальной для его использования в клинической практике. Учитывая разнообразие вызываемых Ech терапевтических эффектов, перспективным становится создание новых

неинвазивных лекарственных форм на его основе. В то же время следует отметить, что еще одним препятствием для широкого применения Ech является его окисление и плохая растворимость. При разработке новых лекарственных форм Ech следует учитывать различные компоненты, которые могут быть использованы для повышения его растворимости и биодоступности при сохранении или усилении его фармакологических свойств (Kim et al., 2021).

Ранее было показано, что включение Ech в гранулы каррагинана (CRG) защищает его от окислительного разрушения (Yermak et al., 2021). CRG представляют собой семейство водорастворимых линейных сульфатированных галактанов, экстрагированных из красных водорослей, и ценятся за структурное разнообразие, связанное с большим набором физико-химических свойств и биологической активности. Они состоят из чередующихся G-звеньев (3-связанных  $\beta$ -D-галактопираноз) и D-звеньев (4-связанных  $\alpha$ -D-галактопираноз) или DA-звеньев (4-связанных 3,6-ангидро- $\alpha$ -D-галактопираноз), образующих дисахаридное повторяющееся звено CRG. Наиболее распространенные типы CRG называются каппа-, йота- и лямбда-CRG на основе структуры основных повторяющихся единиц дисахарида (Knutsen et al., 1994). У CRG многообещающее будущее в фармацевтической промышленности. Они уже включены в Европейскую фармакопею 7.0 (EP7.0), Британскую фармакопею 2012 (BP2012) и Фармакопею США 35 — Национальный формуляр 30 S1 (USP35-NF30 S1) (Knutsen et al., 1994). Известно, что фармацевтические полимеры в течение нескольких десятилетий успешно используются для создания новых мукоадгезивных лекарственных форм, в том числе и офтальмологических, с целью оптимизации доставки лекарств во время лечения глазных патологий (Khutoryanskiy, 2011). Предложено использовать CRG и в офтальмологической композиции (Lang et al., 1993).

В исследованиях *in vivo* и *in vitro* было показано, что гелеобразная смесь природных полисахаридов желатиновой камеди и каппа-CRG успешно взаимодействует с катионами слезной жидкости и длительное время остается на поверхности глаза. Кроме того, показана ее безопасность на офтальмологическом уровне и способность контролировать высвобождение лекарственного средства. Полученные данные свидетельствуют о высоком потенциале использования природных полисахаридов в составе офтальмологических препаратов, особенно тех, которые необходимо вводить часто для достижения эффективности (Fernández-Ferreiro et al., 2015).

Еще одним перспективным направлением фармацевтических технологий в области разработки форм направленной доставки лекарственных средств является наноструктурное направление. Для производства нанофармпрепаратов могут применяться различные наноструктурные компоненты: дендримеры, нанокристаллы, мицеллы, полимерные наночастицы, липосомы. Липосомы — одни из наиболее исследованных наночастиц, которые рассматривают в качестве эффективных средств доставки различных препаратов с минимальными побочными эффектами (Мельникова и др., 2018; Kaldybekov et al., 2018). Активному развитию этого направления послужило сходство липосом с клеточной мембраной и способность включать в себя самые разные вещества практически без каких-либо ограничений в отношении их химической природы, свойств и размера молекул (Tang et al., 2009). Положительным моментом является также тот факт, что заключенные в липосомы препараты высвобождаются постепенно, в нужных дозах и в течение требуемого промежутка времени. Это делает возможной контролируемую адресную доставку и повышает биодоступность лекарственного средства (Барсуков, 1998; Kaldybekov et al., 2018).

Липосомные препараты уже успешно используются в различных областях медицины при наружном и системном применении. Использование липосом в качестве средств доставки лекарственных препаратов для местного лечения заболеваний глаз также является актуальным, т. к. препараты, включенные в липосомы, обеспечивают значительно большую концентрацию лекарственного средства в средах глаза по сравнению с растворами. В связи с этим различные офтальмологические препараты (антибиотики, антимиотики, противовирусные препараты, иммунодепрессанты, антиметаболиты) были исследованы в липосомной форме (Schaffer, Krohn, 1982; Pleyer et al., 1991; Ebrahim et al., 2005; Nurul Alimah et al., 2013; Аляутдин и др., 2014). В настоящее время известны такие липосомные препараты для лечения заболеваний переднего отрезка глазного яблока, как липосомный баларпан (протектор роговицы глаза) и липосомная форма циклоспорина — циклолип (иммунодепрессант). Для фотодинамической терапии в офтальмологии применяют липосомную форму вертепорфина визудин (Лепарская и др. 2011).

Однако, несмотря на то что липосомы полностью биоразлагаемы и относительно нетоксичны, до недавнего времени существовал ряд ограничений возможности широкого применения их в терапевтических целях. Одним из основных ограничений является

вопрос об их химической и физической стабильности: липосомы могут стать нестабильными как из-за гидролиза или окисления составляющих их ненасыщенных липидов, так и из-за утечки лекарственного средства (Agarwal et al., 2016). Следует отметить, что покрытие липосом различными полимерами может значительно улучшить также и долговременную стабильность самих липосом (Adamczak et al., 2017).

Ранее нами была показана возможность включения в липосомы водонерастворимого Ech в составе его комплекса CRG/Ech, для создания которого были использованы анионные сульфатированные полисахариды красных водорослей (Yermak et al., 2018). Липосомные лекарственные формы, как правило, отличаются меньшей токсичностью, возможностью адресной доставки лекарственного средства и меньшим риском развития нежелательных реакций. Вместе с тем увеличение сложности структуры лекарственного средства, как следствие приводит к увеличению числа критических точек производства, а также к расширению списка параметров, подлежащих контролю (Мельникова и др., 2018). Независимо от предполагаемых целей дальнейшего применения, любое новое химическое соединение должно быть охарактеризовано с точки зрения его биологической активности и возможной токсичности. В первую очередь это касается потенциальных лекарственных средств (Киселев и др. 2006).

В офтальмологии вопрос безопасности лекарственного средства требует особого внимания, так как при местном введении препаратов в конъюнктивальную полость происходит их непосредственное воздействие на эпителий конъюнктивы и роговицы (Александрова и др., 2015). Данные экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют, что длительное применение местных препаратов может вызывать нежелательные изменения глазной поверхности (Pellegrini et al., 2014). Поэтому достижение компромисса между эффективностью и безопасностью является важной задачей местного применения лекарств при лечении глаз.

В течение многих лет в разработках и исследованиях офтальмологических препаратов и систем их доставки приоритетными являются эксперименты *in vivo* на животных. Однако исследования, проводимые с использованием животных моделей, нельзя считать корректными из-за анатомо-биохимических различий глаза человека и животных. Кроме того, они имеют этические ограничения и высокую стоимость. Поэтому в последние годы разрабатывается множество альтернативных методов для точной оценки токсичности и эффективности офтальмологических

препаратов (Shafaie et al., 2016; Lieto et al., 2022; Van Meenen et al., 2022). Целый ряд новых возможностей напрямую связан с развитием клеточных технологий. В частности, стратегию на основе культивируемых клеток человека успешно используют для создания эквивалентов тканей глазной поверхности разных уровней сложности, которые могут быть использованы в качестве потенциальных моделей *in vitro* для исследования механизмов реэпителизации глазной поверхности и скрининга фармакологических и токсикологических свойств лекарственных препаратов (Rönkkö et al., 2016). Монослойные культуры клеточных линий человека хорошо зарекомендовали себя для первичного скрининга токсичности. Их преимущества включают в себя скорость, низкую стоимость, воспроизводимость результатов и возможность сравнить их с данными обширной литературы (Bonneau et al., 2022; Lieto et al., 2022).

Целью данного исследования был первичный скрининг с использованием клеточных тест-систем *in vitro* потенциальных систем доставки Ech (комплексов CRG/Ech и его липосомной формы CRG/Ech-Lip), разрабатываемых для местной терапии заболеваний глаз, позволяющий получить сведения об их влиянии на эпителиальные клетки наружной оболочки глазного яблока человека.

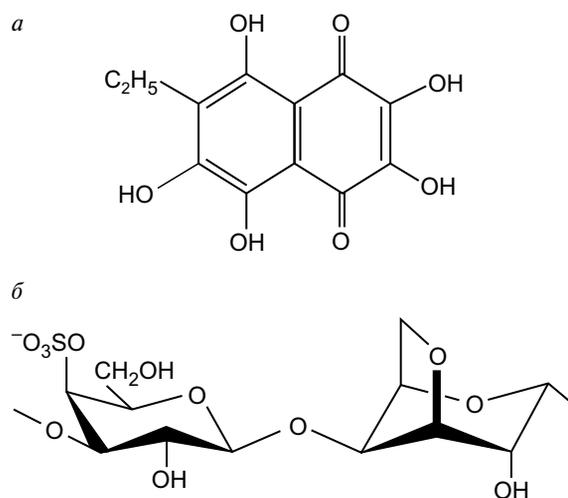
## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Объектом исследования** служили комплекс CRG/Ech, его липосомная форма CRG/Ech-Lip и отдельные структурные компоненты, используемые при разработке этих систем: Ech, этанол, CRG, липосомы. Ech — стандартизированное вещество (2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинон) (рис. 1а), регистрационный номер в РФ Р N002362/01 (Российский государственный реестр лекарственных средств по состоянию на 5 декабря 2016 г., часть 2), был получен в виде порошка в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН. Исходный раствор (10 мг/мл) готовили в 96 %-ном этаноле. Использовали этанол качества Medical Grade. CRG экстрагирован из красной водоросли *Chondrus armatus* (семейство *Gigartinales*), разделен на фракции в 4 %-ном KCl с последующим центрифугированием и отделением желирующего слоя (нерастворимой фракции) от нежелирующего (растворимой фракции). Растворимую в KCl фракцию очищали от низкомолекулярных примесей фильтрованием через мембрану Vivaflow200 (Sartorius, Германия) с размером пор по мол. массе 100 кДа. Строение растворимого в KCl полисахара

ряда исследовали методами ЯМР-спектроскопии ( $^{13}\text{C}$ -ЯМР, спектрометр DRX 500; Bruker, Германия) и ИК-Фурье-спектроскопии (спектрометр Equinox 55; Bruker, Германия). Полученные спектры сравнивали со спектрами полисахаридов, выделенных ранее из этих видов водорослей (Yermak et al., 1999). Согласно полученным данным, выделенный полисахарид представляет собой каппа-CRG, молекулярная структура которого показана на рис. 1б.

В работе использовали лиофилизированный CRG. Исходный раствор готовили растворением лиофилизата CRG в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) в концентрации 10 мг/мл. Комплекс CRG/Ech получали путем смешивания исходных растворов CRG и Ech в соотношении 10:1. При смешивании эти компоненты вступают во взаимодействие по ионному механизму, а также посредством межмолекулярных водородных связей. Взаимодействие CRG и Ech с образованием комплекса подтверждено ранее спектрофотометрически (Yermak et al., 2017).

Липосомы получены из растворов яичного лецитина и холестерина в смеси хлороформа и метанола с использованием стандартной тонкопленочной гидратации и метода обработки ультразвуком, как описано ранее (Yermak et al., 2018). Для уменьшения гетерогенности липосом использовали метод экструзии, пропуская их через мембраны с порами 0.4 мкм. Полученную полидисперсную суспензию частиц со средним гидродинамическим диаметром  $430.3 \pm 29.8$  нм лиофилизировали. Для получения липосомной формы комплекса (CRG/Ech-Lip) водный раствор комплекса CRG/Ech помещали в липосомы стандартным тонкопленочным методом



**Рис. 1.** Структура эхинохрома (Ech, а) и дисахаридного повторяющегося звена каппа-карагинана ( $\kappa$ -CRG, б).

вслед за сонификацией (Yermak et al., 2018). Путем экструзии получали полидисперсную суспензию частиц CRG/Ech-Lip со средним гидродинамическим диаметром  $419.5 \pm 12.0$  нм. Суспензию лиофильно высушивали в течение 12 ч.

Концентрацию содержащихся в липосомах действующих веществ (CRG и Ech) определяли следующим образом. Высушенные CRG/Ech-Lip суспендировали в воде и добавляли к суспензии н-бутанол. Затем смесь подкисляли 3 М раствором HCl, встряхивали, выдерживали 10 мин на ультразвуковой бане и центрифугировали 20 мин при 15000 g. Верхний бутанольный слой использовали для определения концентрации Ech спектрофотометрически (спектрофотометр Unicam 2 UV/VIS, Великобритания) по спектрам поглощения при 468 нм по калибровочной кривой. Для определения концентрации CRG липосомы суспендировали в воде и определяли содержание полисахарида фенол-серным методом, используя галактозу в качестве стандарта, согласно протоколу (DuBois et al., 1956). В соответствии с полученными данными, в лиофилизованном комплексе CRG/Ech-Lip содержится 15.4 % CRG и 1.2 % Ech.

Перед проведением исследований анализируемые вещества стерилизовали. Стерилизацию лиофилизированного CRG проводили озонированием в течение 1 ч 30 мин. Лиофилизированные липосомы и CRG/Ech-Lip стерилизовали УФ-облучением в течение 15 мин. Этанол и раствор Ech не стерилизовали.

CRG и Ech анализировали в диапазоне концентраций 0.016—1.0 мкг/мл (табл. 1). Рабочие растворы получали путем разбавления исходных растворов соответствующим количеством питательной среды. Для оценки влияния этанола, входящего в состав Ech в качестве растворителя, исследовали растворы этанола в диапазоне концентраций, эквивалентных раствору Ech. Для приготовления комплекса CRG/Ech исходный раствор CRG в PBS разбавляли питательной средой для получения растворов с концентрациями 1.0 и 0.1 мг/мл. Затем исходный раствор Ech в этаноле добавляли к соответствующим растворам CRG, доводя концентрацию Ech до 0.1 и 0.01 мг/мл при соотношении CRG/Ech в каждом растворе — 10:1; содержание этанола в этих растворах составляло 1 и 0.1 % соответственно (табл. 2). Смесь растворов CRG и Ech инкубировали в течение 30 мин. Для скрининга липосом и CRG/Ech-Lip лиофилизаты разводили питательной средой до получения следующих концентраций: 0.1, 0.5 и 1 мг/мл. Содержание CRG и Ech в CRG/Ech-Lip, согласно полученным данным и расчетам, приведено в табл. 3.

**Таблица 1.** Концентрации исследуемых веществ

Вещество	Концентрация						
	0.016	0.031	0.062	0.125	0.25	0.5	1.0
Ech, мг/мл	0.016	0.031	0.062	0.125	0.25	0.5	1.0
Этанол, % (v/v)	0.16	0.31	0.62	1.25	2.5	5.0	10
CRG, мг/мл	0.016	0.031	0.062	0.125	0.25	0.5	1.0

**Таблица 2.** Концентрации компонентов комплекса CRG/Ech в тестируемых растворах

Компонент комплекса CRG/Ech	Концентрация, мг/мл
CRG, мг/мл	10.1
Ech, мг/мл	0.10.01
Этанол, % (v/v)	10.1

**Таблица 3.** Концентрации компонентов CRG/Ech-Lip в тестируемых растворах

Компонент	Концентрация, мг/мл
CRG	0.0150.0770.154
Ech	0.0010.0060.12

**Клеточные культуры.** В качестве клеточных тест-систем в исследовании использовали иммортализованные линии эпителиальных клеток наружной оболочки глазного яблока человека: HCE (эпителий роговицы) и Chang Conjunctiva, Clone 1-5c-4 (эпителий конъюнктивы). HCE получены Araki-Sasaki (Araki-Sasaki et al., 1995) и любезно предоставлены нам д-ром. P. Reined (США). Клетки Chang Conjunctiva, Clone 1-5c-4 получены из Коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных (НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, Москва). Клетки выращивали при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> в соответствующих питательных средах. Для HCE это среда Keratinocyte-SFM (Gibco, США), содержащая 15 % фетальной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США); для Clone 1-5c-4 — Игла MEM («Биолот», Россия), содержащая 10 % FBS (HyClone, США).

Для скрининга исследуемых веществ клетки HCE высевали в 96-луночные платы (TPP, Швейцария) при плотности 15 тыс./луночка, а клетки Clone 1-5c-4 — 10 тыс./луночка в 100 мкл соответствующей полной питательной среды и культивировали до формирования субконфлюэнтного монослоя. Затем среду заменяли на ту же (100 мкл), но содержащую исследуемое

вещество в соответствующей концентрации и культивировали клетки далее в течение 24 и 48 ч; контролем служили клетки, культивируемые в соответствующих питательных средах без добавления исследуемых веществ. В процессе культивирования анализировали общепринятыми методами световой микроскопии морфологию клеток. По истечении 24 ч и 48 ч культивирования методом МТТ с использованием реактива thiazolyl blue tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с общеизвестным протоколом (Mosmann, 1983), проводили анализ метаболической активности клеток.

**Статистическую обработку** данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism версии 8.0.0 для Windows (GraphPad, Сан-Диего, Калифорния, США). Различия между группами определяли с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по критерию Бенджамини–Кригера–Иекутелли и считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании был проведен первичный *in vitro* скрининг потенциальных офтальмологических систем доставки Ech (CRG/Ech и CRG/Ech-Lip) и отдельных структурных компонентов, использованных при разработке этих систем. МТТ-тест, широко известный как скрининговый метод измерения выживаемости клеток и включенный в большинство протоколов и методов молекулярной биологии и медицины (Langdon, 2004), выявил что направленность и сила воздействия исследуемых веществ на культивируемые клетки зависят от самих объектов исследования, их концентрации, времени воздействия на клетки и клеточных тест-систем.

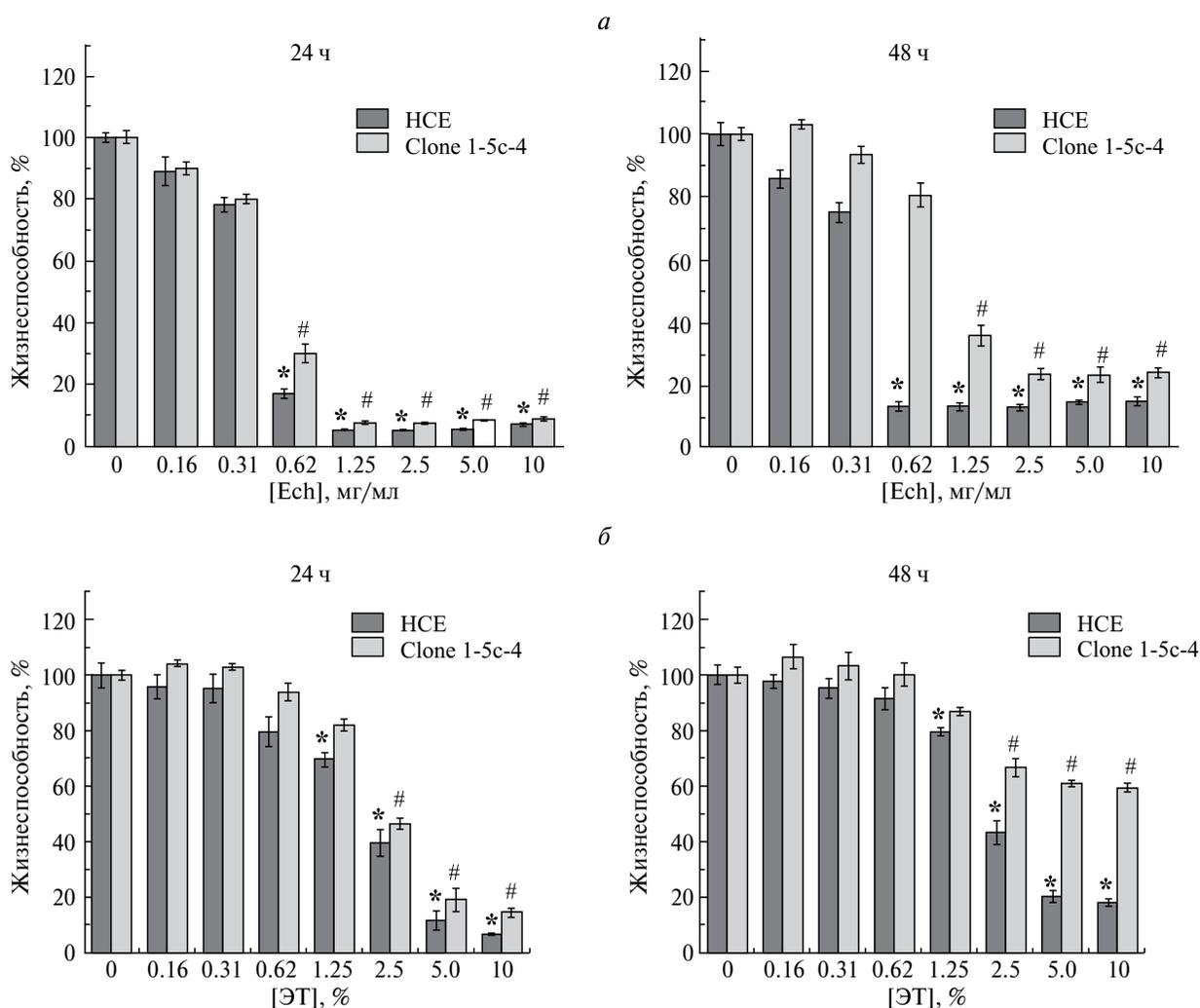
Нами выявлено, что Ech в форме спиртового раствора в питательной среде в диапазоне конечных концентраций Ech от 0.016 до 1 мг/мл оказывает различное по интенсивности цитотоксическое действие в отношении клеток НСЕ и Clone 1-5с-4, культивируемых в его присутствии в течение 24 и 48 ч (рис. 2а). Во временной точке 48 ч клетки эпителия роговицы оказались менее жизнеспособными, чем клетки эпителия конъюнктивы, хотя в целом жизнеспособность клеток обеих клеточных тест-систем при 48-часовом культивировании была выше, чем в случае 24 ч. Относительно безопасными концентрациями Ech в форме спиртового раствора для культивируемых клеток оказались концентрации 0.016 и 0.032 мг/мл. Для НСЕ критичным для жизнеспособности клеток

оказалось присутствие Ech в диапазоне концентраций 0.062–1 мг/мл, для Clone 1-5с-4 — в диапазоне концентраций 0.125–1 мг/мл.

Известно, что Ech является витаминоподобным природным веществом, сходным по химическому строению с витаминами группы К и С (El'kin et al., 2011). Он может проникать в клетку теми же транспортными путями, что витамин С, а его ферментативная модификация в клетке сопровождается снижением уровня  $O_2$  и образованием  $H_2O_2$ , выполняющей роль вторичного месенджера, индуцирующей выработку пероксисомами транскрипционных факторов (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  и PPAR $\gamma$ ), играющих ключевую роль в регуляции метаболизма клетки и снижении воспаления. Вместе с тем показана способность Ech участвовать в прекращении цепных реакций перекисного окисления липидов в клетках, причем сразу несколькими способами. Во-первых, он может перехватывать свободные радикалы, хелатировать металлы — основные инициаторы неферментативного процесса окисления мембранных липидов. Во-вторых, может ингибировать ферменты липоксигеназы, от активности которых во многом зависит окислительный статус клеток. Кроме того, он способен синергически активироваться фосфолипидами плазматических мембран (Бочков и др., 2016; Ковалев и др., 2016). Выполнение Ech в клетке функций витаминов группы К и антиоксидантов позволяет отнести его к лекарственным препаратам группы корректоров метаболизма (Кривошапко, Попов, 2011).

В биологических исследованиях при скрининге потенциальных лекарственных препаратов, слаборастворимых в воде, необходимы органические растворители. Для этих целей чаще всего применяют диметилсульфоксид, метанол или этанол. Хотя все они в разной степени токсичны для клеток *in vitro*, они по-прежнему необходимы для растворения лекарственных средств в биологических исследованиях (Nguyen et al., 2020). Для растворения липофильного Ech мы использовали этанол. Несмотря на свою токсичность, этанол часто используется в качестве растворителя растительных экстрактов и компонентов растительного происхождения (Liu, 2008).

Мы предположили, что воздействие раствора Ech на культивируемые клетки может быть связано с его растворителем этанолом. Известно, что этанол, вмешиваясь в структуру холестерина — мажорного липида клеточной мембраны — разжижает ее. Это приводит к нарушению потока трансмембранных белков и вызывает функциональные клеточные изменения (Ingram, 1976; Cartwright et al., 1986). Такое



**Рис. 2.** Жизнеспособность клеток линий HCE и Clone 1-5c-4 при культивировании в присутствии эхинохрома (Ech, *a*) и этанола (ЭТ, *б*) в течение 24 и 48 ч. МТТ-тест. Различия с контролем (точка 0) для клеток HCE (\*) и Clone 1-5c-4 (#) достоверны при  $P < 0.05$  ( $n = 5$ ).

действие этанола в отношении клеточной мембраны может усилить действие растворенного в нем лекарственного средства, что, в свою очередь, приведет к искажению результатов.

Для правильной оценки эффективности или цитотоксичности потенциального лекарственного средства в эксперименте необходимо определить оптимальные концентрации его растворителя (Nguyen et al., 2020). Поэтому мы исследовали влияние на клетки самого этанола в диапазоне концентраций 0.16–10%, что соответствует концентрациям этанола в спиртовом растворе Ech (табл. 1). Было выявлено, что в его присутствии в течение 48 ч клетки HCE менее жизнеспособны, чем Clone 1-5c-4, хотя в целом жизнеспособность клеток обеих тест-систем была выше, чем во временной точке 24 ч (рис. 2б). Эти данные совпали с данными, полученными при исследовании спиртового раствора Ech. Критичным

для жизнеспособности клеток оказалось присутствие этанола в питательной среде только в концентрации 5 и 10%: для клеток HCE — в обеих временных точках, а для Clone 1-5c-4 — только при 24-часовом культивировании. Это соответствовало конечным концентрациям 0.5 и 1 мг/мл Ech в форме спиртового раствора. Таким образом, можно предположить, что выраженный цитотоксический эффект Ech (0.062–0.25 мг/мл) в отношении клеточных тест-систем, выявленный нами при исследовании его спиртового раствора связан не с токсичностью самого этанола, а с его возможным взаимодействием с Ech, или с токсичностью самого Ech при этих концентрациях.

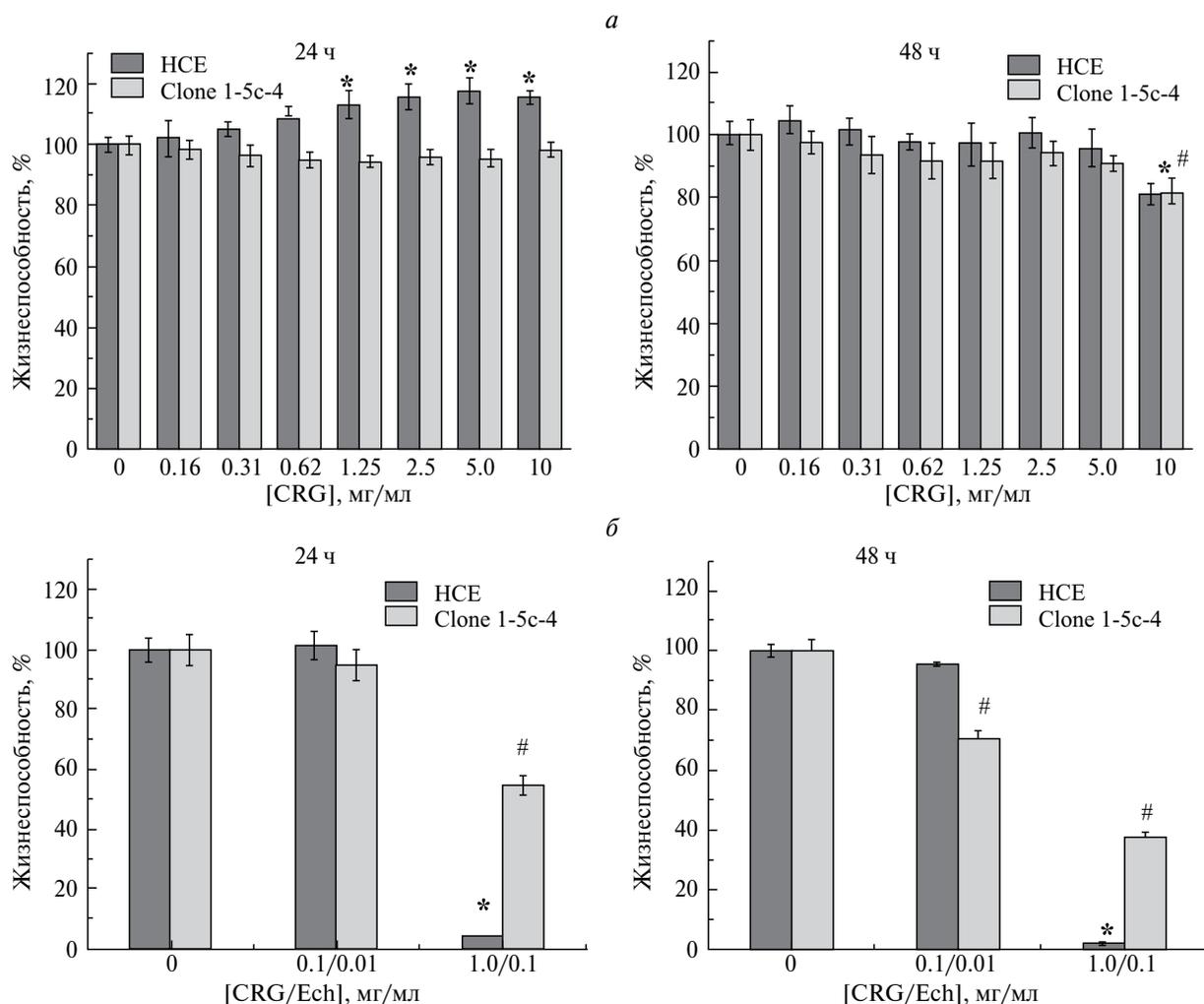
На цитотоксичность или терапевтическую эффективность разрабатываемых лекарственных препаратов помимо растворителя может влиять их модификация с помощью полимерных систем. Природные

полимеры в этом отношении интересны тем, что для них характерна высокая адгезивность, биосовместимость, способность образовывать гидрогели. Все это актуально при разработке систем доставки лекарств (Shit, Shah, 2014). В качестве такой модификации для Ech были предложены системы полимерных матриц на основе полисахаридов из красных водорослей — CRG (Yermak et al., 2017). Мы изучали влияние на жизнеспособность культивируемых клеток как комплекса CRG/Ech, так и самого CRG, который является основным по массовой доле структурным компонентом CRG/Ech (табл. 2).

При исследовании влияния на клетки CRG в диапазоне конечных концентраций 0.016—1 мг/мл среды был выявлен незначительный цитотоксический эффект в отношении клеток обеих тест-систем, культивируемых в течение 48 ч при концентрации CRG 1 мг/мл (рис. 3а). В то же время при 24-часовом

культивировании выявлено стимулирующее действие CRG при концентрации от 0.125 до 1 мг/мл на клетки HCE: жизнеспособность клеток возрастала, составляя 112—123 % от контроля. При этом CRG не оказал значимого действия на жизнеспособность клеток линии Clone 1-5c-4 во всем диапазоне концентраций (0.016—1 мг/мл) в обеих временных точках (24 ч и 48 ч).

Влияние комплекса CRG/Ech на культивируемые клетки мы исследовали в двух концентрациях: 0.1 и 1 мг/мл, рассчитанных по концентрации CRG в комплексе, содержание Ech в которых соответствовало 0.01 и 0.1 мг/мл (табл. 2). Присутствие Ech в концентрации 0.1 мг/мл в составе CRG/Ech не было критичным для клеток Clone 1-5c-4: их жизнеспособность составила около 55 % через 24 ч и около 37 % через 48 ч (рис. 6). В то время как такая же концентрация Ech вне комплекса с CRG была критичной



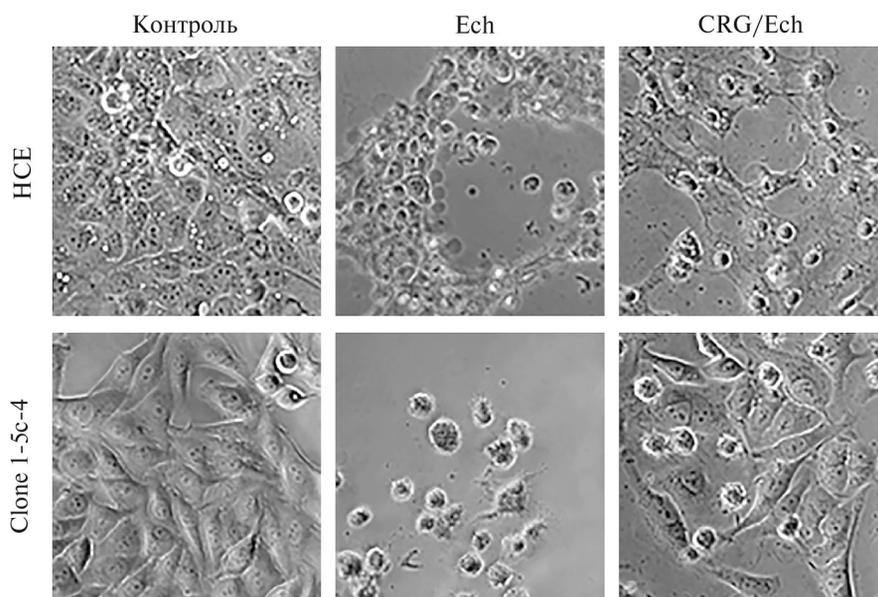
**Рис. 3.** Жизнеспособность клеток линий HCE и Clone 1-5c-4 при культивировании в присутствии каппа-каррагинана (CRG, а) и каррагинанового комплекса CRG/Ech (б) в течение 24 и 48 ч. МТТ-тест. Различия с контролем (точка 0) для клеток HCE (\*) и Clone 1-5c-4 (#) достоверны при  $P < 0.05$ ;  $n = 5$  (а) и  $n = 10$  (б).

для жизнеспособности этих клеток при 24-часовом культивировании (рис. 3б). Для клеток НСЕ такой закономерности не было: Ech в концентрации 0.1 мг/мл как в составе комплекса CRG/Ech, так и вне его проявил сильное цитотоксическое действие.

Результаты МТТ теста согласуются с результатами оценки морфологического состояния клеток. На рис. 4 представлены данные прижизненного наблюдения, полученные через 24 ч культивирования клеток в присутствии Ech в концентрации 0.1 мг/мл как в составе комплекса CRG/Ech, так и вне его. Как можно видеть на фотографиях, клетки обеих линий в контроле имеют типичную эпителиоподобную морфологию, хорошо распластаны и в процессе культивирования (24 ч) сформировали конфлюэнтный монослой. Воздействие Ech в течение 24 ч на клетки НСЕ и Clone 1-5с-4 различается по характеру и силе, которые, в свою очередь, зависят от формы применения Ech. Присутствие в питательной среде Ech в концентрации 0.1 мг/мл во всех его формах (в составе комплекса CRG/Ech и вне его) спровоцировало деструкцию монослоя эпителия роговицы с образованием пустот. Большая часть клеток округлилась и флотирует. Морфологическое состояние сохранившегося монослоя свидетельствует о процессах дегенерации: структура клеток зернистая, ядра набухшие, а сами клетки уплощенные; в среде вокруг клеток много артефактов. Все это может свидетельствовать, что Ech в концентрации 0.1 мг/мл вне зависимости

от формы его применения оказывает сильное цитотоксическое действие на клетки эпителия роговицы человека. Присутствие в питательной среде Ech в концентрации 0.1 мг/мл оказалось также критичным для клеток эпителия конъюнктивы. Но при этом наблюдали полную деструкцию монослоя: клетки округлились и практически все открепилась от поверхности. В то же время присутствие в среде Ech в этой же концентрации, но в составе комплекса CRG/Ech уже не было столь фатальным для клеток эпителия конъюнктивы. В этом случае деструкция монослоя частичная: лишь половина клеток округляется и флотирует. Прикрепленные клетки хорошо распластаны, однако их морфологическое состояние отличается от контроля: структура клеток зернистая, с вакуолями, что является признаком угнетенного состояния клеток. В питательной среде вокруг клеток выявлено много артефактов. Все это позволяет предположить, что Ech в концентрации 0.1 мг/мл в составе комплекса CRG/Ech оказывает цитотоксическое действие на клетки эпителия конъюнктивы человека, но менее выраженное, чем в той же концентрации вне комплекса. Известно, что Ech, взаимодействуя с CRG, встраивается в его структуру. Включение Ech в комплексы с CRG повышает его растворимость и уменьшает окислительную деструкцию (Yermak et al., 2017).

Липосомы представляют собой многофункциональную систему доставки лекарств, которую можно моделировать, изменяя липидный состав и размер

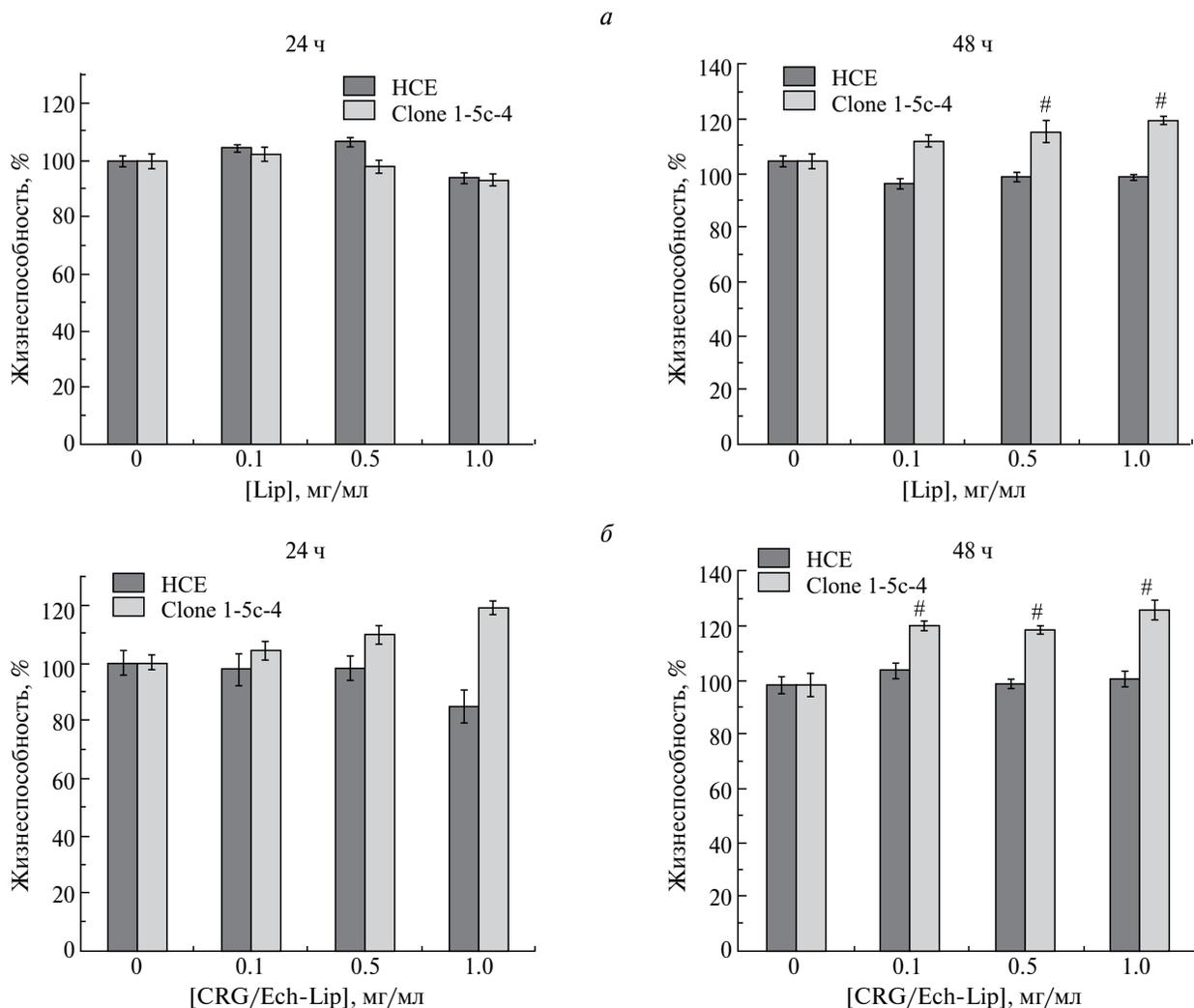


**Рис. 4.** Морфология клеток линий НСЕ и Clone 1-5с-4, культивируемых в течение 24 ч в питательной среде, содержащей эхинохром в концентрации 0.1 мг/мл в форме спиртового раствора (Ech) и его каррагинанового комплекса (CRG/Ech). Световая микроскопия. Увел. об.: 20х.

липосом, электрический заряд, текучесть мембраны и конъюгацию со слоями поверхностного покрытия (Manconi et al., 2007). Мы использовали липосомные композиции, содержащие фиксированное количество яичного лецитина и холестерина, которые готовили методом тонкопленочной гидратации. Для получения CRG/Ech-Lip водные растворы CRG/Ech загружали в состав приготовленных липосом с использованием стандартного тонкопленочного метода с последующей обработкой ультразвуком. Липосомы, как правило, нетоксичны, биodeградебельны, их мембрана может сливаться с клеточной мембраной, что способствует внутриклеточной доставке содержимого липосом. При правильном подборе компонентов липосом их введение в организм не вызывает негативных реакций (Fielding, 1991; Свистельник, Ханин, 2014). Однако их физико-химическая характеристика

не гарантирует отсутствия цитотоксических побочных эффектов, которые должны быть проверены *in vitro* (Angius, Floris, 2015). Поэтому наравне с исследованием влияния разрабатываемой липосомной формы комплекса (CRG/Ech-Lip) на культивируемые клетки необходимо было оценить влияние на них самой потенциальной системы доставки лекарственной композиции — пустых липосом.

Результаты выявили ряд различий в ответах модельных клеточных тест-систем (рис. 5а, б). Присутствие в питательной среде липосом или CRG/Ech-Lip в диапазоне концентраций 0.1–1.0 мг/мл не оказало значимого действия на клеточную тест-систему HCE. Жизнеспособность клеток линии Clone 1-5c-4, культивируемых в течение 24 ч в среде, содержащей пустые липосомы, также была сопоставима с контролем. Однако через 48 ч, согласно МТТ-



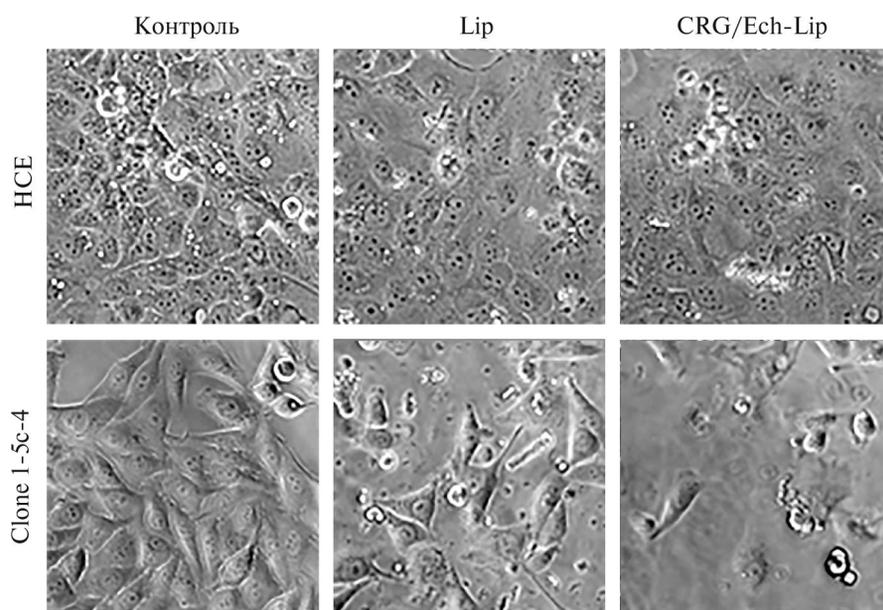
**Рис. 5.** Жизнеспособность клеток линий HCE и Clone 1-5c-4 при культивировании в присутствии липосом (Lip, а) и липосомной формы CRG/Ech-комплекса (CRG/Ech-Lip) (б) в течение 24 и 48 ч. МТТ-тест. Различия с контролем (точка 0) для клеток HCE (\*) и Clone 1-5c-4 (#) достоверны при  $P < 0.05$ ;  $n = 10$ .

анализу, жизнеспособность клеток увеличивалась от 110 до 120 % с увеличением концентрации липосом (рис. 5а). Комплекс CRG/Ech-Lip при концентрации 1 мг/мл оказывал стимулирующее действие на эту модельную систему уже через 24 ч: жизнеспособность клеток составила 120 %. Во второй временной точке (48 ч) при всех исследуемых концентрациях CRG/Ech-Lip жизнеспособность клеток составила от 120 % до 128 % (рис. 5б).

Результаты МТТ-теста в целом согласуются с результатами оценки морфологического состояния клеток. На рис. 6 представлены данные прижизненного наблюдения, полученные через 24 ч культивирования клеток в присутствии в питательной среде как пустых липосом, так и CRG/Ech-Lip в концентрации 0.5 мг/мл. Как можно видеть на фотографиях, клетки обеих линий в контроле имеют типичную эпителиоподобную морфологию, хорошо распластаны и в процессе культивирования (24 ч) формируют конфлюэнтный монослой. Морфологическое состояние клеток эпителия роговицы, культивируемых в питательной среде, содержащей пустые липосомы или CRG/Ech-Lip в концентрации 0.5 мг/мл сопоставимо с контролем. То же относится к морфологическому состоянию клеток эпителия конъюнктивы, культивируемых в этих же условиях, однако монослой визуально выглядит более плотным, чем в контроле. Последний факт хорошо согласуется с приведенными выше результатами МТТ-теста.

Вместе с тем в литературе приводятся данные, которые показывают, что клетки, инкубированные даже с пустыми липосомами, могут более интенсивно по отношению к контролю восстанавливать МТТ до формазана, значения которого увеличиваются с увеличением концентрации липосом. Однако это может быть связано не с увеличением жизнеспособности клеток, обусловленным стимулирующим цитопротекторным действием на них липосом, а с прямым вмешательством их в анализ МТТ из-за их липидной природы (Soenen, De Cuyper, 2009; Angius, Floris, 2015). Известно, что внутриклеточное хранение формазана зависит от наличия внутриклеточных липидов и липидных капель: формазан в силу своей липофильной природы накапливается в липидных каплях и в клеточных мембранах с появлением в цитоплазме мелких темных гранул (Diaz et al., 2007; Stockert et al., 2012). Сделано предположение (Angius, Floris, 2015), что по этой же причине МТТ может проникать в липосомы, взвешенные в питательной среде, накапливаться в них, а далее в их составе проникать в клетки по эндо (лизосомному) пути. Таким образом, липосомы вызывают увеличение запасов формазана в клетках, что приводит к явному увеличению показателей их жизнеспособности (Angius, Floris, 2015).

В свете этих данных более интенсивное не только в контроле, но и в эксперименте с пустыми липосомами восстановление МТТ до формазана, демонстрируемое клетками эпителия конъюнктивы



**Рис. 6.** Морфология клеток линий HCE и Clone 1-5c-4, культивируемых в течение 24 ч в питательной среде, содержащей пустые липосомы (Lip) и липосомную форму комплекса CRG/Ech-Lip в концентрации 0.5 мг/мл. Световая микроскопия. Увел. об.: 20×.

при действии на них CRG/Ech-Lip, можно связать с повышением стабильности самих Lip, покрытых полимерами (Adamczak et al., 2017), и, как следствие, увеличением количества липосом, способных взаимодействовать с монослоем клеток. Этот вопрос требует дальнейшего изучения. Различия в ответах модельных клеточных тест-систем могут быть связаны с более высокими мукоадгезивными свойствами клеток эпителия конъюнктивы по сравнению с клетками эпителия роговицы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках разработки потенциальных офтальмологических систем доставки эхинохрома проведено исследование *in vitro* влияния на культивируемые клетки эпителия роговицы и конъюнктивы человека комплекса CRG/Ech, его липосомной формы и отдельных структурных компонентов этих систем. Показано, что первичный скрининг *in vitro* с использованием тест-систем на основе иммортализованных линий эпителиальных клеток наружной оболочки глазного яблока человека (HCE и Chang Conjunctiva, Clone 1-5c-4) является оптимальным инструментом для изучения цитотоксичности потенциальных офтальмологических препаратов, в том числе Ech, CRG/Ech и CRG/Ech-Lip. Изучение их потенциальной эффективности при местном применении в офтальмологии — тема комплекса дальнейших исследований.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 21-74-20019).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе отсутствуют исследования человека или животных.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Александрова О. И., Хорольская Ю. И., Майчук Д. Ю., Блинова М. И. 2015. Исследование общей цитотоксичности антибиотиков аминогликозидного и фторхинолонового ряда на клеточных культурах. Вестник оф-

тальмологии. Т. 131. № 5. С. 43. (Alexandrova O. I., Khorolskaya Y. I., Maychuk D. Y., Blinova M. I. 2015. Study of common cytotoxicity of aminoglycoside and fluoroquinolone antibiotics in cell cultures. Vestnik oftal'mol. V. 131. No. 5. P. 43.) <https://doi:10.17116/oftalma2015131543-53>

Аляутдин Р. Н., Иежица И. Н., Агарвал Р. 2014. Транспорт лекарственных средств через роговицу глаза: перспективы применения липосомных лекарственных форм. Вестник офтальмологии. Т. 130. № 4. С. 117. (Aliautdin R. N., Iezhitsa I. N., Agarval R. 2014. Transcorneal drug delivery: prospects for the use of liposomes. Vestnik Oftalmologii. V. 130. No. 4. P. 117.)

Барсуков Л. И. Липосомы. Соросовский образовательный журнал. № 10. С. 2. (Barsukov L. I. 1998. Liposomy. (in Russian). Sorosovskii obrazovatel'nyi jurnal. No. 10. P. 2.)

Егоров Е. А. (ред.). 2004. Рациональная фармакотерапия в офтальмологии: Руководство для практикующих врачей. М.: Литтерра. Т. 7. (Egorov E. A. (Ed.) 2004. Rational pharmacotherapy in ophthalmology: handbook for practicing doctors. Moscow: Litterra. Vol. 7.)

Бочков П. О., Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Жердев В. П., Шевченко Р. В. 2016. Влияние высокомолекулярных вспомогательных веществ на оптимизацию фармакокинетических свойств лекарственных препаратов. Фармакокинетика и фармакодинамика. № 1. С. 3. (Bochkov P., Kolyvanov G., Litvin A., Zherdev V., Shevchenko R. 2016. Effects of the high-molecular excipients on optimization of the pharmacokinetic properties of drugs. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. (In Russian). No. 1. P. 3.)

Киселев О. И., Еропкина Е. М., Смирнова Т. Д., Еропкина М. Ю., Ильинская Е. В., Сухинин В. П., Прочуханова А. Р., Зарубаев, В. В. 2006. Оценка метаболических показателей *in vitro* как модельная система тестирования цитотоксичности противовирусных препаратов. Экспериментальная и клиническая фармакология. Т. 69. № 1. С. 65. (Kiselev O. I., Eroпкиna E. M., Smirnova T. D., Eroпкиn M. Yu., Ilyinskaya E. V., Sukhinin V. P., Prochukhanova A. R., Zarubaev, V. V. 2006. Assessment of metabolic parameters *in vitro* as a model system for testing the cytotoxicity of antiviral drugs. Exper. Clinical Pharmacol. (in Russian). V. 69. No. 1. P. 65.) <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2006-69-1-65-70>

Ковалев Н. Н., Крыжановский С. П., Кузнецова Т. А., Костецкий Э. Я., Беседнова Н. Н. 2016. Морские ежи: биомедицинские аспекты практического применения. Владивосток: Дальнаука. (Kovalev N. N., Kryzhanovskiy S. P., Kuznetsova T. A., Kostetsky E. Ya., Besednova N. N. 2016. Sea urchins: biomedical aspects of practical application. Vladivostok: Dalnauka.)

Кривошапко О. А., Попов А. М. 2011. Лечебные и профилактические свойства липидов и антиоксидантов, выделенных из морских гидробионтов. Вопр. питания. № 2. С. 4. (Krivoshapko O. A., Popov A. M. 2011. Therapeutic and preventive properties of lipids and antioxidants isolated from marine aquatic organisms. Question nutrition. No. 2. P. 4.)

- Лепарская Н. Л., Сорокоумова Г. М., Сычева Ю. В., Хорошилова-Маслова И. П., Каплун А. П., Кереев И. И., Гундорова Р. А., Нероев В. В., Швец В. И. 2011. Липосомы, содержащие дексаметазон: получение, характеристика и использование в офтальмологии. Вестник МИТХТ им. МВ Ломоносова. Т. 6. № 2. С. 37. (*Leparskaya N. L., Sorokoumova G. M., Sycheva Y. V., Khoroshilova-Maslova I. P., Kaplun A. P., Kereev I. I., Gundorova R. A., Neroev V. V., Shvets V. I.* 2011. Liposomes containing dexamethasone: obtaining, characterization and use in ophthalmology. Vestnik Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, V. 7. P. 37.)
- Мельникова Е. В., Горячев Д. В., Чапленко А. А., Водякова М. А., Сайфутдинова А. Р., Меркулов В. А. 2018. Разработка липосомных форм лекарственных препаратов: методы оценки и показатели качества. Вестник Российского государственного медицинского университета. № 6. С. 35. (*Melnikova E. V., Goryachev D. V., Chaplenko A. A., Vodyakova M. A., Sayfutdinova A. R., Merkulov V. A.* 2018. Development of liposomal drug formulations: quality attributes and methods for quality control. Bulletin of Russian State Medical University. No. 6. P. 33.)  
<https://doi.org/10.24075/brsmu.2018.092>
- Свистельник А. В., Ханин А. Л. 2014. Липосомные лекарственные препараты: возможности и перспективы. Медицина в Кузбассе. № 2. С. 7. (*Svistelnik A. V., Khanin A. L.* 2014. Liposomal drugs: opportunities and prospects. Medicine in Kuzbass. No. 2. P. 7).
- Талалаева О. С., Зверев Я. Ф., Брюханов В. М. 2017. Клеточно-молекулярные механизмы, обеспечивающие терапевтическую эффективность гистохрома. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. Т. 15. № 4. С. 58. (*Talalaeva O. S., Zverev Y. F., Bryukhanov V. M.* 2017. The cellular and molecular mechanisms providing therapeutic efficiency of gistokhrom (in Russian). Rev. Clinical Pharmacol. Drug Ther. Vol. 15. No. 4. P. 58–68.)  
<https://doi.org/10.17816/RCF15458-68>
- Тедеева Н. С., Мельников В. Я., Догадова Л. П. 2014. Применение гистохрома в офтальмологии. Тихоокеанский медицинский журнал. Т. 4. № 58. С. 17. (*Tedeeva N. S., Melnikov V. Y., Dogadova L. P.* 2014. Using of histochrom in ophthalmology. Pacific Medical Journal. V. 4. No. 58. P. 17.)
- Фитилев С. Б., Шкробнева И. И., Возжаев А. В. 2017. Основы рациональной фармакотерапии. Проблемный метод преподавания клинической фармакологии. М: РУДН. (*Fitilev S. B., Shkrebneva I. I., Vozzhaev A. V.* 2017. Fundamentals of rational pharmacotherapy (in Russian). Moscow: RUDN Med. Institute.)
- Adamczak M. I., Martinsen Ø. G., Smistad G., Hiorth M. 2017. Polymer coated mucoadhesive liposomes intended for the management of xerostomia. Int. J. Pharmaceutics. V. 527. P. 72. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.032>
- Agarwal R., Iezhitsa I., Agarwal P., Abdul Nasir N. A., Razali N., Alyauidin R., Ismail N. M. 2016. Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update. Drug Deliv. V. 23. No. 4. P. 1075. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.943336>
- Anderson H. A., Mathieson J. W., Thomson R. H. 1969. Distribution of spinochrome pigments in echinoids. Compar. Biochem. Physiol. V. 28. P. 333. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(69\)91347-4](https://doi.org/10.1016/0010-406X(69)91347-4)
- Angius F., Floris A. 2015. Liposomes and MTT cell viability assay: an incompatible affair. Toxicol In Vitro. V. 29. No. 2. P. 314.  
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.11.009>
- Araki-Sasaki K., Ohashi Y., Sasabe T., Hayashi K., Watanabe H., TaNo. Y., Handa H. 1995 An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. V. 36. No. 3. P. 614.
- Bonneau N, Baudouin C, Réaux-Le Goazigo A, Brignole-Baudouin F. 2022. An overview of current alternative models in the context of ocular surface toxicity. J. Appl. Toxicol. V. 42. No. 5. P. 718.
- Cartwright C. P., Juroszek J.-R., Beavan M. J., Ruby F. M. S., De Moraes S. M. F., Rose A. H. 1986. Ethanol dissipates the proton-motive force across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. V. 132. I. 2. P. 369.
- Diaz G., Melis M., Musin A., Piludu M., Piras M., Falchi A. M. 2007. Localization of MTT formazan in lipid droplets. An alternative hypothesis about the nature of formazan granules and aggregates. Eur. J. Histochem. V. 51. No. 3. P. 213.
- DuBois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. V. 28. No. 3. P. 350. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Ebrahim S., Peyman G. A., Lee P. J. 2005. Applications of liposomes in ophthalmology. Surv. Ophthalmol. V. 50. No. 2. P. 167.
- El'kin Yu. N., Cherednichenko A. I., Kol'tsova E. A., Artyukov A. A. 2011. Electron capture mass spectrometry of echinochrome. A. J. Anal. Chem. V. 66. P. 1477. <https://doi.org/10.1134/S1061934811140073>
- Elyakov G., Maximov O., Mischenko N., Koltsova E., Fedoreev S., Glebko L., Krasovskaya N., Artjukov A. 2002. Histochochrome and its therapeutic use in ophthalmology. U. S. Patent 6384084.
- Elyakov G., Maximov O., Mischenko N., Koltsova E., Fedoreev S., Glebko L., Krasovskaya N., Artjukov A. 2004. Composition comprising di- and trisodium salts of echinochrome for treating ocular conditions. Eur. Patent EP 1 121 929 B1.
- Elyakov G. B., Maximov O. B., Mischenko N. P., Koltsova E. A., Fedoreev S. A., Glebko L. I., Krasovskaya N., Artjukov A. 2007. Drug preparation "Histochochrome" for treating acute myocardial infarction and ischemic heart diseases. Eur. Patent 1121930.
- Fernández-Ferreiro A., González Barcia M., Gil-Martínez M., Vieites-Prado A., Lema I., Argibay B., Blanco Méndez J., Lamas M. J., Otero-Espinar F. J. 2015. In vitro and in vivo ocular safety and eye surface permanence determination by direct and magnetic resonance imaging of ion-sensitive hydrogels based on gellan gum and kappa-carrageenan. Eur. J. Pharm. and Biopharm. V. 94. P. 342.
- Fielding R. M. 1991. Liposomal drug delivery. Advantages and limitations from a clinical pharmacokinetic and therapeutic perspective. Clin. Pharmacokinet. V. 21. No. 3. P. 155.

- Ingram L. O. 1976. Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J. Bacteriol.* V. 125. No. 2. P. 670.
- Kaldybekov D. B., Tonglairoum P., Opanasopit P., Khutoryanskiy V. V. 2018. Mucoadhesive maleimide-functionalised liposomes for drug delivery to urinary bladder. *Eur. J. Pharmac. Sc.* V. 111. P. 83. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.039>
- Khutoryanskiy V. V. 2011. Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. *Macromol. Biosci.* V.11. P. 748. <https://doi.org/10.1002/mabi.201000388>
- Kim H. K., Vasileva E. A., Mishchenko N. P., Fedoreyev S. A., Han J. 2021. Multifaceted clinical effects of echinochrome. *Marine Drugs.* V. 19. P. 412. <https://doi.org/10.3390/md19080412>
- Knutsen S. H., Myslabodski D. E., Larsen B., Usov A. I. 1994. A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Botanica Marina.* V. 37. No. 2. P. 163
- Lang J. C., Keister J. C., Missel P. J. T., Stancioff D. J. 1993. Use of carrageenans in topical ophthalmic compositions. Patent US5403841A.
- Langdon S. P. (Ed.). 2004. Cancer cell culture: methods and protocols. Seiten: Humana Press Inc. (Hersteller).
- Lieto K., Skopek R., Lewicka A., Stelmasiak M., Klimaszewska E., Zelent A., Szymański Ł., Lewicki S. 2022. Looking into the eyes — in vitro models for ocular research. *Int. J. Mol. Sc.* V. 23. No. 16. P. 9158. <https://doi.org/10.3390/ijms23169158>
- Liu Z. 2008. Preparation of botanical samples for biomedical research. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets.* V. 8. P. 112. <https://doi.org/10.2174/187153008784534358>
- Manconi M., Isola R., Falchi A. M., Sinico C., Fadda A. M. 2007. Intracellular distribution of fluorescent probes delivered by vesicles of different lipidic composition. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* V. 57. No. 2. P. 143.
- Mishra G. P., Bagui M., Tamboli V., Mitra A. K. 2011. Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *J. Drug Delivery.* V. 2011. P. 1. <https://doi.org/10.1155/2011/863734>
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Methods.* V. 65. P. 55.
- Nguyen S. T., Nguyen H. T.-L., Truong K. D. 2020. Comparative cytotoxic effects of metanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. *Biomed. Res. Ther.* V. 7. P. 3855. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v7i7.614>
- Nurul Alimah A. N., Alyautdin R., Agarwal R. 2013. Ocular tissue distribution of liposomes containing lipophilic dye: pegylated versus non-pegylated. In: Proc. Int. Symposium Ocular Pharmacol. Therap. 7–10th March 2013, Paris (additionally enclosed pages).
- Pellegrini G., Rama P., Rocco A., Panaras A., Luca M. 2014. Concise review: hurdles in a successful example of limbal stem cell-based regenerative medicine. *Stem Cells.* V. 32. P. 26. Pleyer U., Rückert D., Bachmann W., Schmidt K. H., Thiel H. J. 1991. Intraokulare verfügbare liposomenverkapselfter monoklonare antikerper in kanunuchenmodel. Ergebnisse einer pilotstude (Germany). *Fortschr. Ophthalmol.* V. 88. P. 870.
- Rönkkö S., Vellonen K. S., Järvinen K., Toropainen E., Urtti A. 2016. Human corneal cell culture models for drug toxicity studies. *Drug Deliv. Transl. Res.* V. 6. No. 6. P. 660. <https://doi.org/10.1007/s13346-016-0330-y>
- Schaffer Y. E., Krohn D. L. 1982. Liposomes in topical drug delivery. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* V. 22. P. 220.
- Seyfoddin A., Shaw J., Al-Kassas R. 2010. Solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery. *Drug delivery.* V. 17. P. 467. <https://doi.org/10.3109/10717544.2010.483257>
- Shafaie S., Hutter V., Cook M. T., Brown M. B., Chau D. Y. 2016. In vitro cell models for ophthalmic drug development applications. *Biores. Open Access.* V. 5. No. 1. P. 94. <https://doi.org/10.1089/biores.2016.0008>
- Shit S. C., Shah P. M. 2014. Edible polymers: challenges and opportunities. *J. Polymers.* V. 2014. P. 1. <https://doi.org/10.1155/2014/427259>
- Soenen S. J., De Cuyper M. 2009. Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. *Contrast Media Mol. Imaging.* V. 4. No. 5. P. 207. <https://doi.org/10.1002/cmim.282>
- Stockert J. C., Blázquez-Castro A., Cañete M., Horobin R. W., Villanueva A. 2012. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* V. 114. No. 8. P. 785.
- Tang B. C., Dawson M., Lai S. K., Wang Y.-Y., Suk J. S., Yang M., Zeitlin P., Boyle M. P., Fu J., Hanes J. 2009. Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* V. 106. P. 19268.
- Thomson R. H. (Ed.) 1971. Naturally Occurring Quinones. London: Academic Press.
- Van Meenen J., Ni Dhubghaill S., Van den Bogerd B., Koppen C. 2022. An Overview of advanced in vitro corneal models: implications for pharmacological testing. *Tissue Eng. Part B Rev.* V. 28. No. 3. P. 506. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2021.0031>
- Yermak I., Gorbach V., Glazunov V., Kravchenko A., Mishchenko N., Pimenova E., Davydova V. 2018. Liposomal form of the echinochrome-carrageenan complex. *Mar. Drugs.* V. 16. P. 324. <https://doi.org/10.3390/md16090324>
- Yermak I., Mischchenko N., Davydova V., Glazunov V., Tarbeeva D., Kravchenko A., Pimenova E., Sorokina, I. 2017. Carrageenans-sulfated polysaccharides from red seaweeds as matrices for the inclusion of echinochrome. *Marine Drugs.* V. 15. P. 337.
- Yermak I. M., Gorbach V. I., Karnakov I. A., Davydov V. N., Pimenova E. A., Chistyulin, D. A.; Isako, V. V., Glazunov V. P. 2021. Carrageenan gel beads for Echinochrome inclusion: Influence of structural features of carrageenan. *Carbohydrate Polymers.* V. 272: 118479. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118479>
- Yermak I. M., Kim Y. H., Titlynov E. A., Isakov V. V., Solov'eva T. F. 1999. Chemical structure and gel properties of carrageenans from algae belonging to the *Gigartinales* and *Tichocarpaceae*, collected from the Russian Pacific Coast. *J. Applied Phycol.* V. 11. P. 41. <https://doi.org/10.1023/A:1008071925884>

## IN VITRO SCREENING OF POTENTIAL ECHINOCHROME DELIVERY SYSTEMS FOR THE TREATMENT OF EYE DISEASES

E. I. Alexander-Sinklair<sup>a, \*</sup>, S. A. Aleksandrova<sup>a</sup>, D. M. Darvish<sup>a</sup>, N. V. Edomenko<sup>a</sup>, V. I. Gorbach<sup>b</sup>,  
A. O. Kravchenko<sup>b</sup>, I. M. Yermak<sup>b</sup>, N. A. Mikhailova<sup>a</sup>, and M. I. Blinova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences,*

*St. Petersburg, 194064, Russia*

<sup>b</sup> *Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,*

*Vladivostok, 690022, Russia*

*\*e-mail: elga.aleks@gmail.com*

An important task of topical application of medicines in the treatment of eyes is to achieve a compromise between their effectiveness and safety. The development of new multifunctional local ophthalmic drug delivery systems and in vitro screening of potential medicinal eye products are key areas in solving this problem. In this study, primary in vitro screening of the effect of echinochrome (Ech), the carrageenan complex of echinochrome (CRG/Ech) and its liposomal form (CRG/Ech-Lip) was performed on cultured epithelial cells of the outer shell of the eyeball: conjunctival epithelial cells (Chang Conjunctiva, Clone 1-5c-4) and corneal epithelium human (HCE). The cell viability was assessed by their morphology and metabolic activity using light microscopy and MTT test methods. The direct dependence of the intensity of the cytotoxic effect of Ech on its concentration in the nutrient medium, the form of use, the cellular test system and the incubation time of cells was revealed. Ech in the form of an alcoholic solution in its final concentration of 0.1 mg/ml of the nutrient medium exhibits pronounced cytotoxicity against both cellular test systems. The same final concentration of Ech in the nutrient medium, but already as part of the carrageenan complex of echinochrome (CRG/Ech), turned out to be critical only for the viability of corneal epithelial cells, the survival rate of conjunctival cells under these conditions was about 50%. A high biocompatibility of the liposomal form of the carrageenan complex of echinochrome (CRG/Ech-Lip) with cells of both test systems and a stimulating cytoprotective effect against the cells of the conjunctiva epithelium was revealed.

**Keywords:** carrageenan, echinochrome, echinochrome carrageenan complex, liposomes, ophthalmic drug delivery systems, cytotoxicity, cell cultures, ocular surface epithelium