

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ КОМПЛЕКСА СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO*

И.Г. Трифаненкова¹, Е.В. Петерсен², С.В. Новиков³, Г.Ю. Усанова⁴

¹Калужский филиал ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова» Минздрава России (Калуга, Россия)

²ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет)» (Москва, Россия)

³ООО «Научно-экспериментальное производство Микрохирургия глаза» (Москва, Россия)

⁴ООО «Центр микрохирургии глаза» (Брянск, Россия)

Для цитирования: Трифаненкова И.Г., Петерсен Е.В., Новиков С.В., Усанова Г.Ю. Изучение воздействия комплекса сульфатированных гликозаминогликанов на пролиферацию клеток эпителия роговицы человека в эксперименте *in vitro*. *Аспирантский вестник Поволжья*. 2022;22(2):56-61. doi: 10.55531/2072-2354.2022.22.2.56-61

■ Сведения об авторах

Трифаненкова И.Г. – д-р мед. наук, заместитель директора по научной работе. ORCID: 0000-0001-9202-5181 E-mail: nauka@eye-kaluga.com

Петерсен Е.В. – канд. мед. наук, заведующая лабораторией молекулярно-биологических и нейробиологических проблем и биоскрининга Центра внедрения геномных технологий. ORCID: 0000-0003-1924-3582 E-mail: petersen.elena.v@gmail.com

Новиков С.В. – заместитель генерального директора по производству. ORCID: 0000-0003-4953-4663 E-mail: snovikov@ya.ru

Усанова Г.Ю. – заведующая отделением лазерной коррекции зрения, врач-офтальмохирург. ORCID: 0000-0001-8560-0651 E-mail: usanova-fit@mail.ru

Рукопись получена: 31.05.2022

Рецензия получена: 20.08.2022

Решение о публикации: 24.09.2022

■ Аннотация

Цель – изучить пролиферативное действие различных концентраций сульфатированных гликозаминогликанов на культуру клеток эпителия роговицы человека.

Материал и методы. Изучали свойства смеси сГАГ, состоящей из хондроитин-4-сульфатов, хондроитин-6-сульфатов и кератансульфатов, полученной путем выделения из прозрачной неизменной стромы роговиц сельскохозяйственных животных. Материалом для исследования *in vitro* послужили клетки переднего эпителия роговицы человека.

В опытной группе №1 в культуральную среду добавляли смесь сГАГ в концентрации 0,1%, в опытной группе №2 – в концентрации 0,5%, в опытной группе №3 – в концентрации 1%. В группе контроля №1 замена среды проводилась без добавления растворов, посев клеток проводился аналогично посевам с опытными образцами. К группе отрицательного контроля относились лунки планшета без добавления среды и раствора.

Результаты. Наибольшие показатели клеточного индекса были получены в опытной группе №3 (1% сГАГ) и составляли $2,86 \pm 0,11$ (суммарный прирост показателей составил 60,67%). В опытной группе №2 (0,5% сГАГ) показатели клеточного индекса составляли $2,65 \pm 0,24$ (суммарный прирост показателей 52,29%), что имело существенное отличие от опытной группы №1 (0,1% сГАГ) и группой контроля №1, где данные показатели составляли $2,54 \pm 0,21$ (35,81%) и $2,37 \pm 0,02$ (25,39%) соответственно.

Выводы. Конечные показатели клеточного индекса указывают на то, что растворы смеси сГАГ в концентрации 0,5% и 1% оказывают более выраженное пролиферативное действие на клетки эпителия роговицы человека *in vitro* из диапазона исследуемых концентраций. Полученные результаты открывают перспективы применения сГАГ в разработке новых подходов к лечению пациентов, находящихся на хронической медикаментозной терапии, или пациентов с сопутствующими заболеваниями роговицы.

■ **Ключевые слова:** сульфатированные гликозаминогликаны, пролиферация клеток, эпителий роговицы человека, эксперимент *in vitro*.

■ **Конфликт интересов:** не заявлен.

■ Список сокращений

сГАГ – сульфатированные гликозаминогликаны; ФК – фазовый контраст; МСК – мезенхимальные стволовые клетки; КИ – клеточный индекс.

THE EFFECT OF THE SULFATED GLYCOSAMINOGLYCANS COMPLEX ON THE HUMAN CORNEAL EPITHELIAL CELLS PROLIFERATION: AN *IN VITRO* EXPERIMENT

Irina G. Trifanenkova¹, Elena V. Petersen², Sergei V. Novikov³, Galina Yu. Usanova⁴

¹S.N. Fedorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Kaluga Branch (Kaluga, Russia)

²Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University) (Moscow, Russia)

³Scientific and experimental production Eye Microsurgery (Moscow, Russia)

⁴Eye Microsurgery Center (Bryansk, Russia)

Citation: Trifanenkova IG, Petersen EV, Novikov SV, Usanova GYu. The effect of the sulfated glycosaminoglycans complex on the human corneal epithelial cells proliferation: An *in vitro* experiment. *Aspirantskiy vestnik Povolzhya*. 2022;22(2):56-61. doi: 10.55531/2072-2354.2022.22.2.56-61

■ Information about authors

Irina G. Trifanenkova – PhD, Deputy Director for scientific work. ORCID: 0000-0001-9202-5181 E-mail: nauka@eye-kaluga.com

Elena V. Petersen – PhD, the Head of the Laboratory of Molecular Biological and Neurobiological Problems and Bioscreening of the Center for the

06.02.2023. Retracted by the Editorial board due to the Publication ethics violation in terms of authorship.

Abstract

Aim – to study the proliferative effect of various concentrations of sulfated glycosaminoglycans (sGAG) on the culture of human corneal epithelial cells.

Material and methods. The study focused on the properties of a mixture of sGAG consisting of chondroitin-4-sulfate, chondroitin-6-sulfates and keratan sulfates obtained by isolation from the transparent unchanged stroma of the cornea of farm animals. The material for the *in vitro* study was the cells of the anterior epithelium of the human cornea.

In the experimental group No.1, a mixture of sGAG was added to the culture medium at a concentration of 0.1%, in the experimental group No.2 – at a concentration of 0.5%, in the experimental group No.3 – at a concentration of 1.0%. In the control group No.1, the medium was replaced without the addition of solutions, cell seeding was carried out similarly to seeding with experimental samples. The negative control group included the holes of the tablet without the addition of medium and solution.

Results. The highest levels of the cellular index (CI) were obtained in the experimental group No.3 (1.00% of sGAG) and amounted to 2.86 ± 0.11 (the total increase in indicators was 60.67%). In the experimental group No.2 (0.50% sGAG), the cellular index levels were 2.65 ± 0.24 (the total increase in indicators was 52.29%), which was significantly different from the experimental group No.1 (0.10% sGAG) and the control group No.1, where these indicators were 2.54 ± 0.21 (35.81%) and 2.37 ± 0.02 (25.39%) respectively.

Conclusion. The final CI indicators show that solutions of the sGAG mixture at concentrations of 0.5% and 1.0% have a more pronounced proliferative effect on human corneal epithelial cells *in vitro* from the range of concentrations under study. The results obtained open up the prospects for the use of sGAG in the development of new approaches to the treatment of patients undergoing a chronic drug therapy or patients with concomitant corneal diseases.

Keywords: sulfated glycosaminoglycans, cell proliferation, human corneal epithelium, *in vitro* experiment.

Conflict of interest: nothing to disclose.

ВВЕДЕНИЕ

Длительная местная медикаментозная терапия глазных заболеваний может вызывать повреждение глазной поверхности [1]. Многочисленные исследования подтверждают, что основное цитотоксическое действие на структуры глазной поверхности оказывает бензалкония хлорид, который является наиболее часто применяемым консервантом в технологии производства офтальмологических препаратов [2]. Отмена медикаментозного лечения или замена препаратов на бесконсервантные аналоги не всегда представляется возможным, что определило актуальность разработки способов стимуляции репарации клеток эпителия роговицы для данной категории пациентов.

Результаты научных исследований, выполненных в последние десятилетия, позволили сформировать понимание о полифункциональном влиянии сульфатированных гликозаминогликанов (сГАГ) [3–6]. Экзогенно введенные сГАГ могут оказывать трофическую и структурную функции в тканях, а также оказывать регуляторное действие на многие физиологические и патологические процессы, в том числе на пролиферацию и дифференциацию клеток [7]. Влияние сГАГ на пролиферацию клеток эпителия роговицы ранее изучено не было, что определило цель настоящего исследования.

ЦЕЛЬ

Изучить пролиферативное действие различных концентраций сульфатированных гликозаминогликанов на культуру клеток эпителия роговицы человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В настоящем исследовании проводилось изучение свойств смеси сГАГ, состоящей из хондроитин-4-сульфатов, хондроитин-6-сульфатов и кератансульфатов, полученной путем выделения из прозрачной неизменной стромы роговицы сельскохозяйственных животных на базе ООО НЭП «Микрохирургия глаза». Составляющие смеси находились в том же стехеометрическом соотношении, что и в неизменной прозрачной роговице.

Материалом для исследования *in vitro* послужили клетки переднего эпителия роговицы человека. Клетки культивировались с использованием питательной среды DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки NuClone III, L-глутамин (2,5мМ) и антибиотиков пенициллин / стрептомицин (50 мкг/мл). Перед началом основного эксперимента проводили идентификацию эпителиальных клеток с использованием следующих методов: морфологическое исследование культуры методом световой микроскопии с фазовым контрастом (ФК) на инвертированном фазово-контрастном микроскопе Zeiss Axio Observer A1 (Zeiss, ФРГ), флуоресцентно-микроскопическое исследование с использованием флуоресцентного красителя DAPI (Invitrogen, США), окрашивающего А-Т регионы ДНК клеточных элементов, флуоресцентно-микроскопическое исследование со специфическим окрашиванием клеток моноклональными антителами на цитокератин 18 (СК18). В качестве отрицательного контроля были использованы мезенхимальные стволовые клетки (МСК) жировой ткани. Посев клеток в группе контроля проводился аналогично с опытной группой.

После проведения этапа идентификации эпителиальных клеток исследуемая клеточная культура эпителия роговицы человека 5-го пассажа была засеяна в лунки плоскодонного 24-луночного планшета в плотности $4,0 \times 10^4$ кл/лунка. Также клеточная культура была засеяна в специальные планшеты для клеточного анализатора RTCA xCELLigence System в плотности $1,5 \times 10^4$ кл/лунка. Подсчет количества жизнеспособных клеток производили автоматически в режиме реального времени при непрерывном измерении электрического сопротивления в исследуемой лунке планшета, находящегося на поверхности электрода, встроенного в реакционный модуль прибора. Цифровые показатели количества жизнеспособных клеток определялись автоматически с помощью программного обеспечения RTCA xCelligence Software 2.0 и выражались в виде показателей клеточного индекса (КИ). Измерение КИ производили через каждые 15 минут. Через 48 часов проводилась смена среды с добавлением исследуемых растворов. Исследование выполнено методом прямого контакта смеси сГАГ с культурой эпителия роговицы человека. В опытной группе №1 в культуральную среду добавляли смесь сГАГ в концентрации 0,1%, в опытной группе №2 – в концентрации 0,5%, в опытной группе №3 – в концентрации 1%. В группе контроля №1 замена среды проводилась без добавления растворов, посев клеток проводился аналогично посевам с опытными образцами. К группе отрицательного контроля относились лунки планшета без добавления среды и раствора, что необходимо для контроля работы прибора xCelligence. При интерпретации полученных данных в опытных группах №1, №2, №3 и контрольной группе №1 оценивалось пролиферативное действие смеси сГАГ на культуру клеток эпителия роговицы человека.

Исследование пролиферативного действия смеси сГАГ проводилось по следующему протоколу: морфологическое исследование культуры методом световой микроскопии с ФК на инвертированном фазово-контрастном микроскопе Zeiss Axio Observer A1 (Zeiss, ФРГ), анализ клеточной пролиферации с помощью клеточного анализатора RTCA xCELLigence System (ACEA, США) и фоторегистрация цифровой фотокамерой, интегрированной с инвертированным микроскопом (Zeiss, ФРГ). Полученные числовые значения клеточного индекса в опытных и контрольных группах суммировались в виде таблицы и подвергались статистической обработке. Те же данные представляли в виде графиков. Числовые значения клеточного индекса в группах сравнивались друг с другом в соответствующие сроки наблюдения. Динамику изменения показателей оценивали при помощи программного обеспечения Statistica 7.0 (Statsoft) и Excel (Microsoft Office).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Перед началом основного эксперимента проводили исследование на идентификацию эпителиальных клеток в культуре. Первым этапом проводили морфологическую оценку клеток методом световой микроскопии с фазовым контрастом. Культура клеток переднего эпителия роговицы формировала монослой, представленный популяцией округлых и полигональных клеток эпителиального фенотипа, плотно прилегающих друг к другу, с единичными биполярными клетками фибропластического типа. В качестве контрольной группы использовалась культура МСК из жировой ткани, где визуализировались гомогенные культуры клеток, характеризующиеся веретеновидной фибробластоподобной морфологией с четко различимым ядром, ядрышками и цитоплазматической перинуклеарной зернистостью.

Вторым этапом проводили флуоресцентно-микроскопическое исследование с использованием флуоресцентного красителя DAPI, обладающего селективностью к двуцепочечной ДНК, для прижизненной окраски клеточных ядер, изучения их локализации и морфологии ядра. При визуальной оценке выявлено, что распределение и интенсивность флуоресценции клеточных ядер в поле зрения равномерны, что подтверждает жизнеспособность клеток в обеих клеточных культурах. Третьим этапом идентификации эпителиальных клеток было флуоресцентно-микроскопическое исследование клеток со специфическим окрашиванием моноклональными антителами на Цитокератин 18. В опытной группе у большинства клеток в поле зрения отмечалась позитивная реакция на Цитокератин 18. В культуре контроля была зарегистрирована негативная реакция на специфическое окрашивание моноклональными антителами.

При изучении функционального влияния различных концентраций сГАГ на культуру клеток эпителия

Таблица 1 / Table 1

Показатели клеточного индекса в культуре клеток эпителия роговицы человека в зависимости от времени инкубации с исследуемыми образцами растворов сГАГ
Indicators of the cellular index in the culture of human corneal epithelial cells depending on the incubation time with the studied samples of sGAG solutions

Группы исследования	Клеточный индекс			
	48 ч 48 h	49 ч 49 h	50 ч 50 h	51 ч 51 h
Опытная группа №1 (сГАГ 0,1%)	1,87±0,2	1,33±0,10	2,38±0,06	2,54±0,21
Опытная группа №2 (сГАГ 0,5%)	1,74±0,14	1,33±0,16	2,64±0,26	2,65±0,24
Опытная группа №3 (сГАГ 1%)	1,78±0,08	1,22±0,13	2,55±0,09	2,86±0,11
Контрольная группа №1	1,89±0,01	1,55±0,02	2,16±0,01	2,37±0,02
Отрицательный контроль	-0,04±0,01	-0,04±0,01	-0,05±0,02	-0,05±0,02

Примечание: данные представлены в форме $M \pm \sigma$.

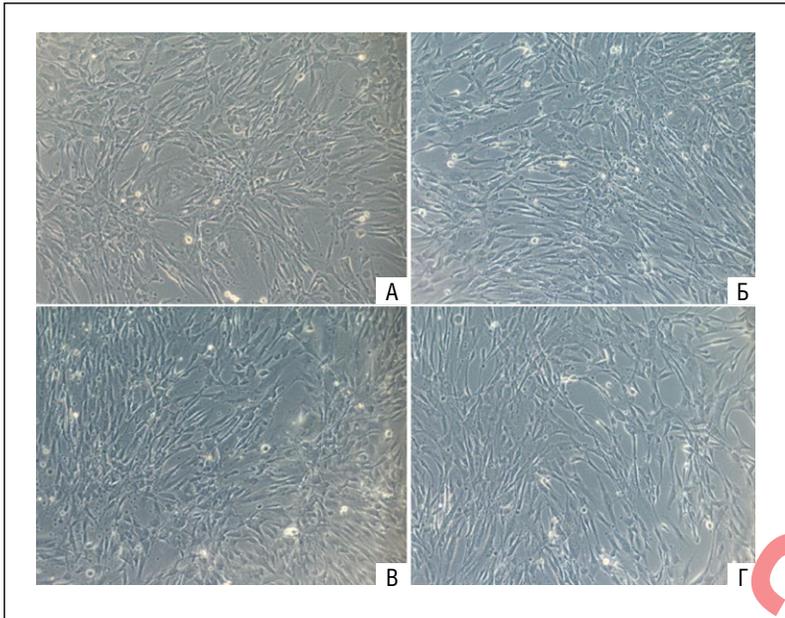


Рисунок 1. Морфологический контроль клеток в культуре под действием различных концентраций сГАГ. Световая микроскопия с фазовым контрастом, ув. х 100: А – опытная группа №1 (сГАГ 0,1%); Б – опытная группа №2 (сГАГ 0,5%); В – опытная группа №3 (сГАГ 1%); Г – контрольная группа №1 (культура клеток).

Figure 1. Morphological control of cells in culture under the influence of various concentrations of sGAG. Light microscopy with phase contrast, mag. x 100: A – experimental group No.1 (sGAG 0.1%); B – experimental group No.2 (sGAG 0.5%); C – experimental group No.3 (sGAG 1.0%); D – control group No.1 (cell culture).

роговицы учитывали два критерия: количественный – изменение КИ в режиме реального времени, и качественный – морфологический контроль клеток в культуре под действием различных концентраций сГАГ в динамике исследования.

По истечении 48 часов от начала эксперимента показатели клеточного индекса во всех исследуемых культурах не имели статистического различия между собой, после чего проводилась замена среды с добавлением исследуемых растворов, согласно представленному дизайну исследования.

Через 2 часа после введения исследуемых препаратов (50 час от начала эксперимента) были выявлены различия между показателями клеточного индекса как в опытных группах, при воздействии на них смеси сГАГ, так и в группе контроля №1.

Наибольшее внимание привлекли опытные группы с концентрациями 0,5% сГАГ, где показатель клеточного индекса был наибольшим – $2,64 \pm 0,26$ (прирост показателей составил 51,72%) и с концентрацией 1% сГАГ, где показатель клеточного индекса составлял $2,55 \pm 0,09$ (прирост показателей составил 43,2%). В опытной группе №1 (сГАГ 0,1%) и контрольной группе №1 показатели клеточного индекса и его прироста были наименьшими и составляли $2,38 \pm 0,06$ (27,27%) и $2,16 \pm 0,01$ (14,28%) соответственно.

Через 3 часа после введения исследуемых образцов (51 час от начала эксперимента) во всех экспериментальных группах отмечалось достижение пика пролиферативной активности (таблица 1).

При морфологическом исследовании методом световой микроскопии с фазовым контрастом во всех опытных группах были зафиксированы следующие изменения: во всех опытных группах клетки вытягивались, становились биполярными, приобретали фибробластоподобный фенотип, что свидетельствовало о вовлечении клеток в процесс эпителиомезенхимальной трансформации. Наличие делящихся клеток указывало на наличие пролиферативной активности в момент исследования, что подтверждает полученные результаты изменения клеточного индекса в различные сроки эксперимента (рисунок 1).

Известно, что по сравнению с эпителиоцитами клетки фибробластоподобного фенотипа отличаются хорошей пролиферативной активностью и стабильностью фенотипа. Однако, поскольку во всех опытных образцах клетки имели общность фенотипа, полученные нами результаты были приняты как правомерные.

Наибольшие показатели клеточного индекса были отмечены в опытной группе №3 (1% сГАГ) и составляли $2,86 \pm 0,11$ (суммарный прирост показателей составил 60,67%).

В опытной группе №2 (0,5% сГАГ) показатели клеточного индекса составляли $2,65 \pm 0,24$ (суммарный прирост показателей 52,29%), что имело существенное отличие от опытной группы №1 (0,1% сГАГ) и группой контроля №1, где данные показатели составляли $2,54 \pm 0,21$ (35,81%) и $2,37 \pm 0,02$ (25,39%) соответственно.

Во всех опытных группах через 51 час от начала эксперимента наблюдалось достижение пика пролиферативной активности и сохранность ее в течение последующих 1,5 час. наблюдения, вследствие чего эксперимент был прекращен.

По полученным результатам выявлена линейная зависимость, демонстрирующая динамику изменений показателей КИ клеток эпителия роговицы человека во времени при добавлении различных концентраций смеси сГАГ (рисунок 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время большую часть офтальмологических препаратов продолжают составлять лекарственные средства, содержащие в своем составе консерванты [2]. Консерванты подавляют контаминацию бактерий во флаконе многократного использования, а также увеличивают биодоступность препаратов [8]. Несмотря на минимальные концентрации

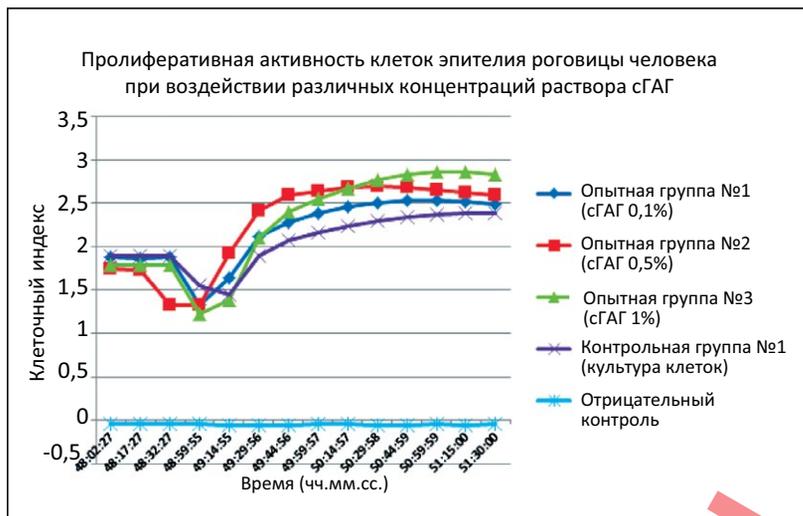


Рисунок 2. Зависимость показателей клеточного индекса от времени инкубации с исследуемыми образцами смеси растворов сГАГ.

Figure 2. The dependence of the cellular index indicators on the incubation time with the studied samples of a mixture of sGAG solutions.

консервантов в составе глазных капель, многочисленные исследования доказывают токсическое действие консервантов на глазную поверхность, в том числе на роговицу [9], что обуславливает актуальность поиска путей защиты роговичной ткани от подобного воздействия.

Выбор смеси сульфатированных гликозаминогликанов как материала для исследования основывался на анализе литературных данных, где выдвигается множество гипотез о полифункциональном влиянии сГАГ на различные ткани и клеточные структуры, в том числе о способности сГАГ влиять на пролиферацию клеток [10, 11].

Ранее влияние сГАГ на пролиферацию и дифференцировку клеток было изучено на культуре клеток миелоидной лейкемии человека U-937. N. Volpi с соавт. определили, что хондроитинсульфат и дерматансульфат (от 0.01 до 100 мкг/мл) стимулируют пролиферацию клеток [12]. Также биологическая активность сГАГ изучалась *in vitro* на клетках соединительной ткани роговицы человека и фибробластах кожи телят. Полученные при этом результаты показали, что сГАГ усиливают биосинтез РНК (синтез белка), стимулируют секрецию клетками коллагена и протеогликанов. Комплекс коллаген-сГАГ способствует адгезии клеток фибробластического ряда и увеличивает пролиферацию фибробластов более чем в 4 раза [13].

Кроме того, выдвигалась гипотеза о репаративном действии сГАГ на роговицу человека за счет усиления миграции эпителиальных клеток с неповрежденных участков и увеличения митотической активности базальных клеток [14].

Диапазон исследуемых концентраций сГАГ в настоящем эксперименте основывался на исследовании

данной смеси на культуре клеток фибробластов мыши линии L929 [5]. Группой авторов был выявлен бимодальный эффект экзогенно введенных сГАГ на пролиферацию клеток в зависимости от концентрации смеси: низкие концентрации сГАГ (0,1–0,5%) стимулировали пролиферацию фибробластов, а высокие концентрации сГАГ (1–5%) оказывали антипролиферативный эффект.

Введение смеси сГАГ в культуральную среду вызывало увеличение пролиферативной активности эпителиальных клеток во всех опытных группах по сравнению с группой контроля. Пролиферативное действие сГАГ на клетки эпителия роговицы в эксперименте *in vitro* в настоящем эксперименте было изучено впервые. Максимальная пролиферативная активность наблюдалась в опытных группах №2 (сГАГ 0,5%) и №3 (сГАГ 1%), что выразилось в увеличении числового значения клеточного индекса. Наличие пролиферативной активности сГАГ возможно предположить за счет их способности активировать хемокины и взаимодействовать с регуляторными молекулами, такими как ферменты и факторы роста, усиливая или подавляя их действие [6, 15]. Наличие высокой пролиферативной активности сГАГ в опытной группе №3 (сГАГ 1%) противоречит данным, полученным при изучении данной смеси на культуре фибробластов мыши [5], что требует дальнейшего изучения. Для определения области применения сГАГ в клинической практике также требуется последующее изучение смеси в эксперименте на лабораторных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании было доказано влияние оригинальной смеси сГАГ на пролиферацию эпителия роговицы человека. Данные, полученные при анализе линейной зависимости показателей клеточного индекса от сроков наблюдения, показали, что введение растворов смеси сГАГ в диапазоне концентраций от 0,1% до 1% в культуральную среду стимулирует пролиферацию клеток эпителия роговицы человека по сравнению с группой контроля.

Конечные показатели КИ указывают на то, что растворы смеси сГАГ в концентрации 0,5% и 1% оказывают более выраженное пролиферативное действие на клетки эпителия роговицы человека *in vitro* из диапазона исследуемых концентраций.

Полученные результаты открывают перспективы применения сГАГ в разработке новых подходов к лечению пациентов, находящихся на хронической

медикаментозной терапии, и пациентов с сопутствующими заболеваниями роговицы.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Baudouin C. Detrimental effect of preservatives in eyedrops: implications for the treatment of glaucoma. *Acta Ophthalmology*. 2008;86:716-726. doi: 10.1111/j.1755-3768.2008.01250.x
2. Petrov SYu, Safonova DM. Ophthalmic preservatives: from benzalkonium chloride to polyquaternium. *RMJ. Clinical ophthalmology*. 2014;2:82-96. (In Russ.). [Петров С.Ю., Сафонова Д.М. Консерванты в офтальмологических препаратах: от бензалкония хлорида к поликватернию. *РМЖ. Клиническая офтальмология*. 2014;2:82-96].
3. Larionov EV, Glybina TA. The role of sulfated glycosaminoglycans (sGAG) in the physiology and pathophysiology of periodontal tissues. In: Dentistry today. М., 2007:32-33. (In Russ.). [Ларионов Е.В., Глыбина Т.А. Роль сульфатированных гликозаминогликанов (сГАГ) в физиологии и патофизиологии тканей пародонта. В кн.: *Стоматология сегодня*. М., 2007:32-33]. <http://osteoplast.com/userfiles/file/glycodentart1.pdf>
4. Panasyuk AF, Larionov EV. Chondroitin sulfates and their role in the exchange of chondrocytes and intercellular matrix of cartilage tissue. *Scientific and practical rheumatology*. 2000;2:46-55. (In Russ.). [Панасюк А.Ф., Ларионов Е.В. Хондроитинсульфаты и их роль в обмене хондроцитов и межклеточного матрикса хрящевой ткани. *Научно-практическая ревматология*. 2000;2:46-55].
5. Takhchidi HP, Novikov SV, Shatskikh AV, et al. Features of the functional significance of the complex of sulfated glycosaminoglycans in the regulation of fibroblast proliferation *in vitro*. *Morphology*. 2012;142(5):49-54. (In Russ.). [Тахчиди Х.П., Новиков С.В., Шацких А.В. и др. Особенности функционального значения комплекса сульфатированных гликозаминогликанов в регулировании пролиферации фибробластов *in vitro*. *Морфология*. 2012;142(5):49-54].
6. Sasaki T, Watanabe C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by highmolecular hyaluronic acid. *Bone*. 1995;16:915. doi: 10.1016/s8756-3282(94)00001-8
7. Takhchidi EH, Gorbunova KS. Application of sulfated glycosaminoglycans in ophthalmology. *Bulletin of Orenburg State University*. 2012;148(12):201-204. (In Russ.). [Тахчиди Е.Х., Горбунова К.С. Применение сульфатированных гликозаминогликанов в офтальмологии. *Вестник ОГУ*. 2012;148(12):201-204].
8. Charnock C. Are multidose over-the-counter artificial tears adequately preserved? *Cornea*. 2006;25:432-437. doi: 10.1097/01.ico.0000183538.53017.69
9. Lebedev OI, Kalizhnikova EA, Yavorsky AE. Mechanisms and results of the action of benzalkonium chloride on eye tissue. *RMJ. Clinical ophthalmology*. 2013;13(2):63-66. (In Russ.). [Лебедев О.И., Калижникова Е.А., Яворский А.Е. Механизмы и результаты действия бензалкония хлорида на ткани глаза. *РМЖ. Клиническая офтальмология*. 2013;13(2):63-66].
10. Adams JC, Watt PM. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*. 1993;117:1183-1198. doi: 10.1242/dev.117.4.1183
11. Billings PC, Pacifici M. Interactions of signaling proteins, growth factors and other proteins with heparin sulfate: mechanisms and mysteries. *Tissue Res*. 2015;56(4):272-280. doi: 10.1007/s00420-015-1045-6
12. Volpi N, Petrini M, Conte A, Valentini P, et al. Effects of glycosaminoglycans on U-937 leukemia cell proliferation and differentiation: structure-function relationship. *Exp Cell Res*. 1994;1(215):119-130. doi: 10.1006/excr.1994.1323
13. Grudyanov AI, Grigor'yan AS, Erokhin AI. The use of human fibroblast culture in the surgical treatment of inflammatory periodontal diseases. *Parodontology*. 2003;2(27):13-18]. (In Russ.). [Грудянов А.И., Григорьян А.С., Ерохин А.И. Использование культуры фибробластов человека при хирургическом лечении воспалительных заболеваний пародонта. *Пародонтология*. 2003;2(27):13-18].
14. Astakhov YuS. *Preparations stimulating trophic and regenerative processes (for topical use)*. SPb, 2012:42-44. (In Russ.). [Астахов Ю.С. Препараты, стимулирующие трофические и регенерационные процессы (для местного применения). СПб., 2012:42-44].
15. Damsky CH, Werb Z. Signal transduction by adhesion receptors: co operative processing of extracellular information. *Curr Opin Cell Biol*. 1992;4:772-781. doi: 10.1016/0955-0674(92)90100-q

■ Автор для переписки

Трифаненкова Ирина Георгиевна
Адрес: Калужский филиал ФГАУ «НМИЦ «МНТК
«Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова»,
ул. С. Федорова, 5, г. Калуга, Россия, 248007.

■ Corresponding Author

Irina G. Trifanenkova
Address: S.N. Fedorov Eye Microsurgery Federal State Institution,
Kaluga Branch, 5 S. Fedorova st., Kaluga, Russia, 248007.

E-mail: nauka@eye-kaluga.com