

DOI: 10.17586/1023-5086-2022-89-09-49-58

УДК 53.082.56+535.212+617.713+576.08

## Флуориметрическая установка и метод исследования функциональной активности эндотелиоцитов роговицы глаза

Ирина Георгиевна Пальчикова<sup>1</sup>✉, Евгений Сергеевич Смирнов<sup>2</sup>,  
Елена Викторовна Карамшук<sup>3</sup>, Вячеслав Сергеевич Гляненок<sup>4</sup>,  
Галина Сергеевна Батурина<sup>5</sup>, Любовь Евгеньевна Каткова<sup>6</sup>,  
Евгений Иванович Соленов<sup>7</sup>, Игорь Алексеевич Искаков<sup>8</sup>

<sup>1, 2, 3, 4</sup>Конструкторско-технологический институт научного приборостроения Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>5, 6, 7</sup>Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>8</sup>Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Фёдорова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирский филиал, Новосибирск, Россия

<sup>1</sup>Palchikova@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-9039-7157>

<sup>2</sup>evgenii.s.smirnov@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-4244-8474>

<sup>3</sup>elka-kti@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-5847-7368>

<sup>4</sup>g1234516@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0003-4883-9588>

<sup>5</sup>baturina@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0003-1289-5406>

<sup>6</sup>lle@ngs.ru

<https://orcid.org/0000-0002-2858-3215>

<sup>7</sup>eugsol@bionet.nsc.ru

<https://orcid.org/0000-0002-0595-3084>

<sup>8</sup>i.iskakov@mntk.nsk.ru

<https://orcid.org/0000-0002-6289-6362>

### Аннотация

**Предмет исследования.** Экспериментальные методы изучения степени сохранности и функциональности эндотелия роговицы глаза, которая определяется как водной проницаемостью клеток, так и активностью ионных насосов, в первую очередь натрий-калиевой аденозинтрифосфатазой. **Цель работы** заключалась в выявлении значимых измеряемых параметров, таких как интегральная по всему препарату роговицы интенсивность флуоресценции и ее динамика во времени, и в создании специализированной экспериментальной флуориметрической установки на основе волоконной оптики. **Метод.** В состав и конструкцию универсальной экспериментальной установки для исследования клеточных функций были внесены изменения, которые позволили реализовать флуоресцентный метод определения концентрации внутриклеточного натрия, минуя обработку цифрового изображения препарата роговицы. **Основные результаты.** Разработаны специализированная экспериментальная установка и метод исследования функций клеток эндотелия роговицы глаза и внутриклеточных сигнальных механизмов, активация или дисфункция которых в условиях травматического воспаления и после гипотермической консервации могут быть связаны с развитием отеков роговицы и болезнью трансплантата роговицы. **Практическая значимость.** Разработанные в настоящей работе специализированная экспериментальная установка и методы функционального тестирования клеток эндотелия роговицы глаза могут быть применены для определения степени пригодности роговицы как материала для трансплантации, а также как система тестов для определения эффективности методов ее консервации.

**Ключевые слова:** флуоресцентный метод, гипотермическая консервация, эндотелий роговицы глаза, внутриклеточный натрий

**Благодарность:** работа поддержана бюджетным проектом № FWNR-2022-0019 и грантами Российского фонда фундаментальных исследований № 19-08-00874, № 20-015-00147.

**Ссылка для цитирования:** Пальчикова И.Г., Смирнов Е.С., Карамшук Е.В., Глянченко В.С., Батурина Г.С., Каткова Л.Е., Соленов Е.И., Исаков И.А. Флуориметрическая установка и метод исследования функциональной активности эндотелиоцитов роговицы глаза // Оптический журнал. 2022. Т. 89. № 9. С. 49–58. DOI: 10.17586/1023-5086-2022-89-09-49-58

**Коды OCIS:** 120.3890, 170.1530, 170.6280

## ВВЕДЕНИЕ

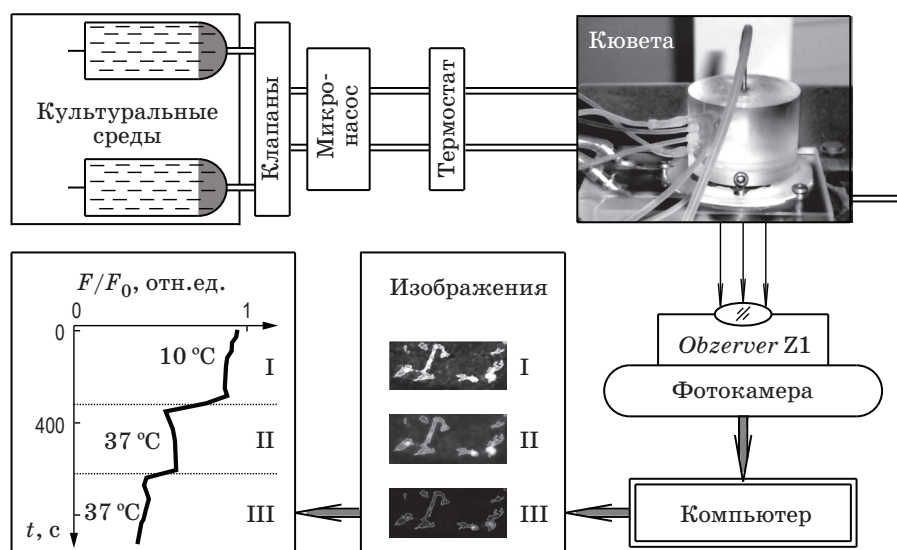
Разработка подходов, увеличивающих допустимую длительность консервации препаратов роговицы глаза для трансплантации, требует развития методов изучения степени сохранности и функциональности эндотелия роговицы [1, 2].

В настоящее время основным критерием пригодности роговицы глаза к трансплантации является морфологическая оценка целостности клеточного слоя эндотелия [3, 4]. Разрушение эндотелиального слоя ведет к болезни трансплантата.

Однако основной функцией эндотелия является регуляция осмотического баланса матрикса роговицы. Клетки эндотелия с помощью ионных насосов, каналов и обменников, так называемого «*pump-leak*» механизма [5, 6] предотвращают набухание матрикса, сохраняя его прозрачность. Для осуществления таких функций после консервации клетки должны восстановить механизм регуляции собственного осмотического гомеостаза. В регуляции баланса электролитов и, соответственно, клеточного объема участвуют характерные для каждого типа клеток каналы и транспортеры основных ионных осмолитов, находящиеся в плазматической мембране. Для регуляции осмотического баланса матрикса в клетках эндотелия необходима достаточная активность натрий-калиевой аденозинтрифосфатазы ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-аза), ионных обменников ( $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ), ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ), эпителиального натриевого канала ENaC [7]. В этой связи [2] естественно рассматривать концентрацию внутриклеточного натрия как индикатор способности клетки выполнять транспортную функцию. Поскольку эндотелий является клеточным монослоем, где клетки имеют между собой плотные контакты, что необходимо для осуществления его транспортной функции, функциональность эндотелия определяется как водопроницаемостью клеток, так и актив-

ностью ионных насосов, в первую очередь  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-аза. Исследование реакций клеток эндотелия на осмотические шоки может дать информацию о влиянии консервации на свойства плазматической мембраны и об активности транспортных механизмов, определяющих их насосные функции. В работах [8–10] получили развитие современные методы, основанные на применении внутриклеточных флуоресцентных индикаторов, позволяющих исследовать транспорт воды и ионов в индивидуальных клетках. Применение этих новых методов для оценки транспортных функций живых клеток эндотелия роговицы могут улучшить качество диагностики жизнеспособности и функциональной сохранности консервированной роговицы глаза.

Современный подход к оценке жизнеспособности роговицы глаза и метод измерения концентрации внутриклеточного натрия в клетках эндотелия роговицы впервые предложен в публикациях [11–13], он разрабатывался на универсальной экспериментальной установке для исследования клеточных функций, принципиальная схема которой приведена на рис. 1. Основной структурный элемент установки — это специально разработанная проточная кювета с контролируемой температурой. Конструкция кюветы позволяет устанавливать ее на столик флуоресцентного микроскопа *Observer-Z1* (объектив *Fluar 20x/0.75 M27, Zeiss, Germany*). Объем кюветы около 50 мкл, скорость протекания раствора 25 мл/мин, смена омывающего раствора в течение 100 мс. В кювету помещается препарат клеток эндотелия роговицы глаза, обращенный базальной стороной в сторону омывающего раствора. Температурный режим и загрузка клеток флуоресцентными зондами проводится по протоколу для клеточной культуры [12, 13]. Набор фильтров и дихроическое зеркало № 009 (*Zeiss, Germany*) устанавливаются в микроскоп для наблюдения флуоресцентных изо-



**Рис. 1.** Структурная схема установки, фрагменты изображений с контурами клеток в процессе эксперимента и экспериментально полученный профиль средней интегральной интенсивности флуоресценции клеток эндотелия роговицы глаза свиньи. В течение периодов I, II и III контролировалась температура препарата

бражений клеток. Изменение внутриклеточной концентрации натрия приводит к пропорциональному изменению интегральной интенсивности флуоресценции каждой клетки. Эти изменения регистрируются с интервалом 30 с монохромной камерой ПЗС<sup>1</sup> AxioCam HSm (Zeiss, Germany) с дигитализацией 12 бит в режиме линейного преобразования падающей интенсивности. Серии файлов изображений сохраняются на компьютере в формате <.tif> и затем обрабатываются специализированной программой CytoDynamics [14].

Программа CytoDynamics определяет контуры изображений соответственных индивидуальных клеток на последующих во времени снимках, рассчитывает нормированную интегральную интенсивность флуоресценции в пределах контура для каждой клетки на каждом снимке и заносит в результирующую таблицу Microsoft Excel, данные которой обрабатываются с помощью макросов Microsoft Excel. В левой нижней части рис. 1 приведены типичные данные эксперимента, в котором исследуется влияние гипотермической консервации роговицы глаза свиньи на способность эндотелиоцитов восстанавливать внутриклеточную концентрацию натрия после прекра-

щения гипотермии. Фрагменты изображений с контурами клеток иллюстрируют их изменение в процессе эксперимента. Изменение во времени интегральной относительной интенсивности флуоресценции  $F/F_0$ , усредненной по всему изображению, представлено в виде профиля флуоресценции. Кривая зависимости на графике рис. 1 демонстрирует три характерных стационарных участка (периоды I–III), на которых интенсивность флуоресценции практически сохраняется, что происходит вследствие неизменности внутриклеточной концентрации натрия в этих фазах/периодах эксперимента.

При температуре 10 °C (Период I) активность  $Na^+/K^+$ -АТФ-азы подавлена и в клетках устанавливается концентрация натрия, равновесная со средой. При повышении температуры до 37 °C (Период II) в результате активации фермента устанавливается более низкая равновесная концентрация внутриклеточного натрия. В третьей фазе эксперимента (Период III) в результате действия ионофора в клетке устанавливается концентрация натрия, соответствующая его концентрации в калибровочном растворе. Интенсивность флуоресценции в периоде II соответствует внутриклеточной концентрации натрия, которая устанавливается в клетке в результате баланса входа

<sup>1</sup> Прибор с зарядовой связью.

натрия в клетку через транспортеры плазматической мембраны и выхода, определяемого активностью  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы. Степень восстановления транспортных функций в клетках эндотелия роговицы проявляется градиентами интегральной относительной интенсивности, усредненной по всему изображению.

Однако отдельные блоки универсальной экспериментальной установки вносят аппаратные ошибки в результаты измерений, а необходимость углубленной обработки цифровых изображений затрудняет работу в реальном времени.

В предшествующих работах [6, 12, 13] выявлено, что в разрабатываемом методе измерения концентрации внутриклеточного натрия в клетках эндотелия роговицы глаза значимыми параметрами являются интегральная по всему препарату роговицы интенсивность флуоресценции и ее динамика во времени. Однако в ходе экспериментов на универсальной экспериментальной установке порядок действий включает операции по получению дополнительных параметров, причем сами эти операции вносят ошибки в измерения.

Целью настоящей работы является создание специализированной экспериментальной флуориметрической установки и метода для исследования водной проницаемости клеток эндотелия и активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы по степени влияния ее на регуляцию объема клеток эндотелия роговицы глаза.

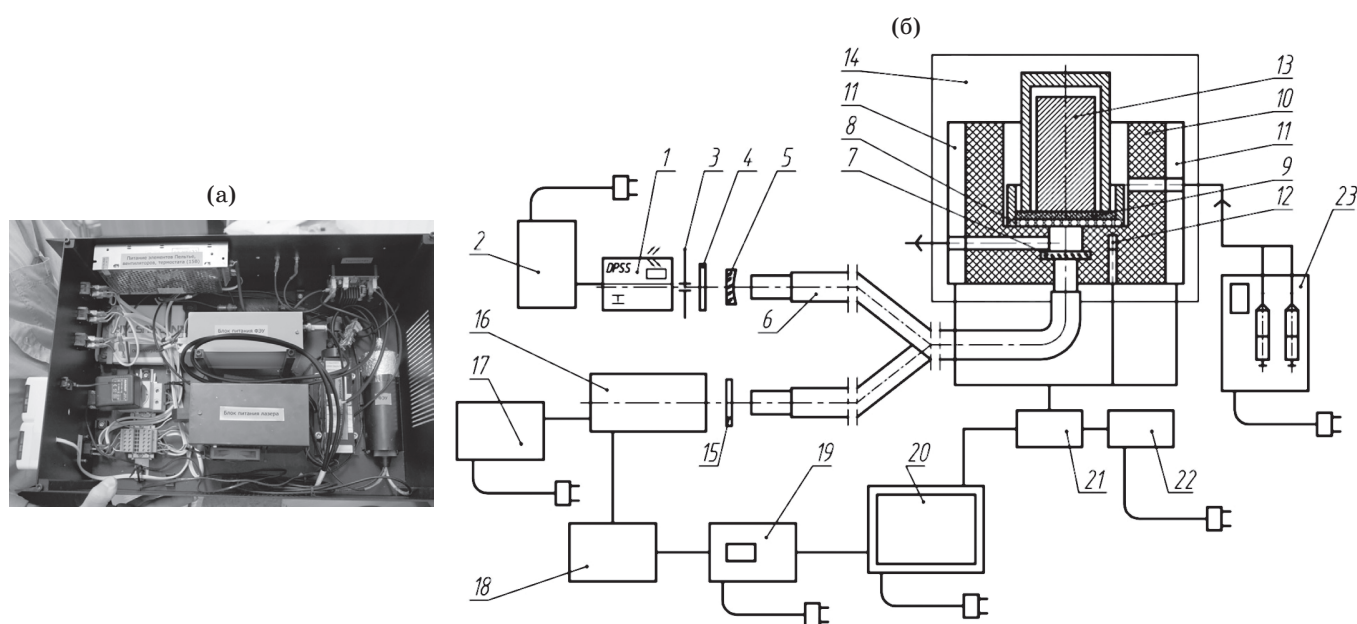
### **ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКАЯ УСТАНОВКА ДЛЯ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ ГЛАЗА**

Для выполнения протокола исследований специализированная экспериментальная установка должна обеспечить смену растворов в проточной кювете, контроль температуры среды и роговицы, возбуждение флуоресценции и измерение ее интегральной интенсивности. В ходе работ создана экспериментальная флуориметрическая установка для оценки состояния эндотелия роговицы глаза «ПостКР-3151». Ее компоненты размещены в дюралюминиевом корпусе размером 560×360×216 мм, термостатированная проточная кювета и два шприцевых насоса располагаются сверху корпуса. Фотография внутрен-

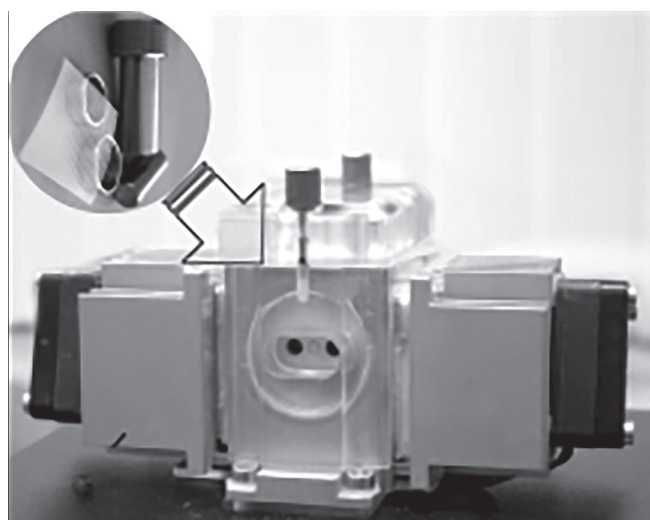
него объема корпуса установки «ПостКР-3151» приведена на рис. 2а, структурная схема установки – на рис. 2б. В отличие от универсальной экспериментальной установки в рассматриваемой схеме отсутствуют блоки микроскопа и цифровой фотокамеры, что упрощает конструкцию и исключает операции по обработке цифровых изображений.

Установка «ПостКР-3151» функционирует следующим образом: излучение твердотельного лазера с диодной накачкой модели BWB-10-OEM (B&W Tek Inc., Newark, DE, USA) с максимумом излучения на длине волны 477 нм используется для возбуждения флуоресценции красителя. Диафрагма служит в качестве ограничителя или прерывателя лазерного пучка, поляризатор осуществляет регулирование мощности излучения, которое через согласующую линзу и волоконно-оптический ответвитель попадает на роговицу через покровное стекло и защитную сетку. Грузик удерживает образец роговицы. Основной элемент установки «ПостКР-3151» — термостатированная проточная кювета. Корпус кюветы оснащен элементами Пельтье, которые регулируют температуру и позволяют выполнять термический протокол в процессе измерений. Здесь же располагается датчик температуры. Излучение флуоресценции поступает в световод и через обрезкающий светофильтр попадает на фотоэлектронный умножитель (ФЭУ). Электрический сигнал от ФЭУ через усилитель сигнала поступает на цифровой осциллограф, который передает его на персональный компьютер.

Внешний вид разработанной кюветы представлен на рис. 3. Через боковые поверхности кюветы происходит нагрев или охлаждение в пределах от +15 до +37 °С с помощью элементов Пельтье, радиаторов и вентиляторов. На врезке рис. 3 приведена фотография гильзы, в которой крепится препарат. Исследуемый препарат роговицы помещается на сетку, изготовленную из нефлуоресцирующего волокна, например, полипропилена или нейлона. Сетка крепится между кольцами из нержавеющей стали. Внутреннее кольцо навинчивается на полую гильзу. Внутри гильзы свободно перемещается грузик диаметром 7,5 и высотой 25 мм из нержавеющей стали. Грузик равномерно прижимает роговицу к сетке, не давая ей сместиться. Гильза с роговицей



**Рис. 2.** Специализированная экспериментальная установка «ПостКР-3151». Вид на внутренний объем корпуса «ПостКР-3151» — (а), структурная схема установки «ПостКР-3151» — (б). 1 — лазер BWB-10-OEM, 2 — блок питания лазера, 3 — диафрагма, 4 — поляририд, 5 — согласующая линза, 6 — световод — гибкий волоконно-оптический ответвитель с нерегулярной укладкой волокон и сечением светового торца, обращенного в сторону препарата, равным 6 мм (ПО Лыткаринский оптико-механический завод), 7 — покровное стекло, 8 — сетка, 9 — роговица, 10 — корпус кюветы, 11 — элемент Пельтье, 12 — датчик температуры, 13 — грузик, 14 — термостатированная проточная кювета, 15 — обрезаящий светофильтр BP 520 nm (*Edmund Optics, USA*) для фильтрации рассеянного излучения лазера, 16 — фотоэлектронный умножитель ФЭУ-55, 17 — блок питания ФЭУ, 18 — усилитель сигнала, 19 — осциллограф INSTRUSTAR ISDS 205 (*Electronic Technology Co., Ltd., China*), 20 — персональный компьютер, 21 — контроллер температуры, 22 — блок питания контроллера, 23 — шприцевые насосы *Perfusor compact S (B. Braun Melsungen A.G., Germany)*



**Рис. 3.** Внешний вид термостатированной проточной кюветы. На врезке в верхней части рисунка отдельно показаны гильза, грузик, сетка и кольца, которые служат для закрепления роговицы в кювете

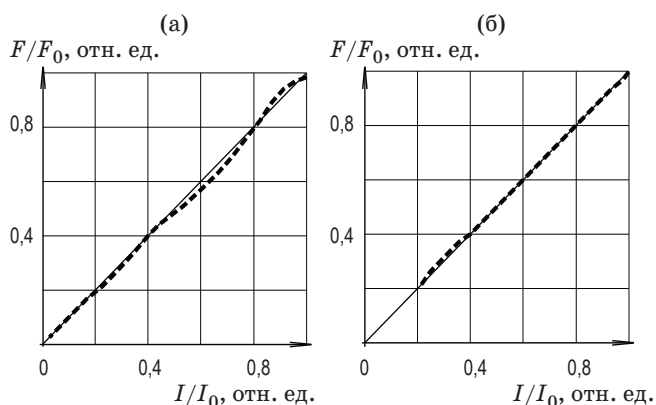
помещается во внутреннюю полость камеры, краситель и растворы смачивают роговицу сквозь сетку. На уровне роговицы на расстоянии 3 мм от внутренней полости камеры располагается датчик температуры, который подает сигнал на плату контроллера. Элементы Пельтье закреплены на термопасту по бокам корпуса проточной кюветы на расстоянии 11 мм от внутренней полости. Для отвода тепла к элементам Пельтье крепятся алюминиевые радиаторы.

Передаточная характеристика устройства определялась в экспериментах с фантомом вместо препарата роговицы. Изготовленный фантом представляет собой краситель, заключенный между стеклами, причем концентрация красителя подбиралась таким образом, чтобы при тестировании его на универсальной экспериментальной установке для исследования клеточных функций интенсивность

излучения флуоресценции была близка к таковой для препарата роговицы глаза. Изменение интенсивности флуоресценции достигалось с помощью светофильтров, помещаемых сразу за лазером. Набор из 11-ти светофильтров был отобран из Стандартного набора образцовых оптических цветных стекол (ГОСТ 9411-91). Пропускание образцов стекла составило соответственно 90,32, 81,03, 71,31, 62,27, 53,45, 43,1, 35,76, 24,88, 16,01, 8,72 и 2,96% от мощности излучения лазера (100%), которая составляет 4,06 мВт.

Мощность излучения на длине волны 477 нм измерялась USB-датчиком «Ophir» (*Ophir Spiricon Europe GmbH Ophir, Germany*). Интенсивность флуоресценции регистрировалась в канале ФЭУ-55 — USB-осциллограф в режиме самописца, и программно обрабатывалась для каждого образца стекла. Эксперимент повторялся многократно. Зависимость нормированного на максимум сигнала флуоресценции фантома от нормированной на максимум интенсивности лазерного излучения представлена на рис. 4а.

Измерения интенсивности флуоресценции при непрерывном изменении интенсивности лазерного излучения проводились многократ-



**Рис. 4.** Зависимости сигнала флуоресценции  $F/F_0$  фантома от интенсивности лазерного излучения  $I/I_0$  освещающего лазерного пучка. Ослабление излучения достигается с помощью набора светофильтров; достоверность линейной аппроксимации  $R^2 = 99,92\%$ , среднее среднеквадратическое отклонение (СКО) экспериментальных данных  $0,12\%$  — (а). Ослабление излучения достигается с помощью перемещаемого фотометрического серого клина;  $R^2 = 99,99\%$ , среднее СКО экспериментальных данных  $0,08\%$  — (б)

но с помощью фотометрического клина серого № 750192 с параметром оптической плотности  $D = 1,8$  ед. и углом клина  $1^\circ 57'$ , который плавно перемещался шаговым двигателем. Зависимость получаемого нормированного сигнала флуоресценции фантома от нормированной интенсивности лазерного излучения приведена на рис. 4б. Результаты экспериментов показали, что интенсивность флуоресценции линейно зависит от интенсивности лазерного пучка и передаточная характеристика устройства так же является линейной.

Таким образом, эксперименты с фантомом препарата роговицы подтвердили работоспособность установки «ПостКР-3151», линейность ее передаточной характеристики и воспроизводимость получаемых экспериментальных данных.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РОГОВИЦЫ ГЛАЗА

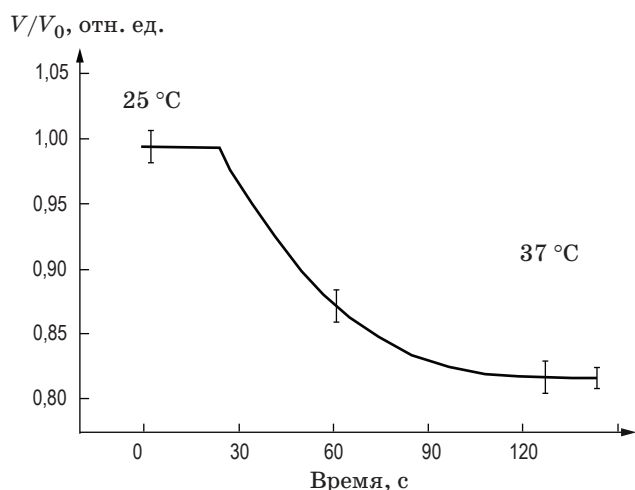
Эксперименты на установке «ПостКР-3151» проводились с препаратами роговицы. Диски роговицы свиньи (*sus scrofa domesticus*) получены трепанацией с помощью трепана диаметром 8 мм через 6–8 часов после забоя животных. Фрагменты роговицы человека в виде трепанированных дисков получены в процессе выполнения сквозной кератопластики у пациентов с кератоконусом, удаленным в процессе лечения. Препараты роговицы сохранялись в консервационной среде *Eusol-C* при температуре 4–6 °С.

Для изучения изменений объема эндотелиальных клеток применялся метод [10], основанный на эффекте гашения флуоресценции красителя *Calcein* белками цитоплазмы. Загрузка клеток красителем (*Calcein AM, Sigma, Germany*) проводилась в среде L-15 *Leibovitz* с конечной концентрацией *Calcein AM* 10 мкМ, DMSO 1%. Время инкубации 15 мин при 37 °С. Проточная кювета установки и растворы термостатировались при 15 или 37 °С. Изменения объема клеток выражались в относительных величинах флуоресценции. Экспериментальные записи изменения флуоресценции нормировались по амплитуде и для оценки скорости изменения клеточного объема определялся коэффициент линейной регрессии начального участка кривой флуоресценции, как это описано в работе [15].

Основным источником энергии для векторного транспорта ионов является  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-аза, создающая градиент электрохимического потенциала натрия на плазматической мембране клеток, что является вторичным источником энергии для выполнения клетками эндотелия функции «насоса».

Исследовалось влияние сроков консервации на способность клеток восстанавливать свой объем при повышении температуры до  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Исследовалась регуляция относительного объема эндотелиальных клеток в результате температурной активации  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы. Выведение ионов натрия из клетки приводило к снижению клеточного объема, что регистрировалось по снижению флуоресцентного сигнала красителя (рис. 5).

В препарате роговицы свиньи, помещенном в нормотонический раствор PBS, происходит снижение клеточного объема при повышении температуры до  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Эти данные указывают на интенсивные процессы регуляции клеточного объема, поскольку в охлажденной, деполяризованной клетке устанавливается равновесная со средой концентрация ионов. Снижение объема клеток при повышении температуры до  $37\text{ }^\circ\text{C}$  в основном связано с выведением из клеток эндотелия ионов натрия. Результаты, получаемые на установке

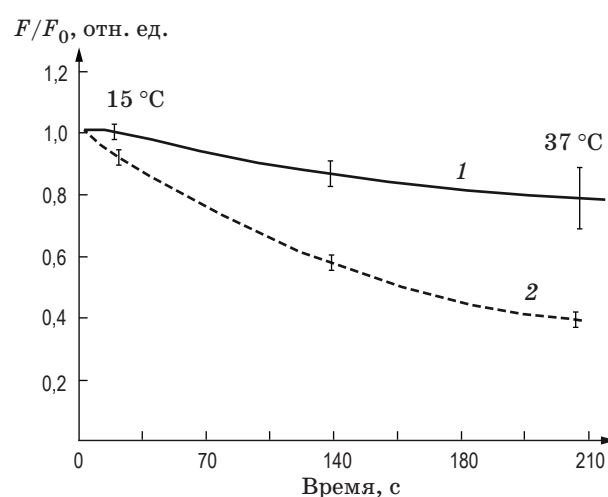


**Рис. 5.** Типичный профиль изменения относительного объема клеток эндотелия препаратов роговицы свиньи  $V/V_0$ , определяемый флуоресцентным методом (флуоресценция красителя *Calcein*) при повышении температуры среды от  $25$  до  $37\text{ }^\circ\text{C}$

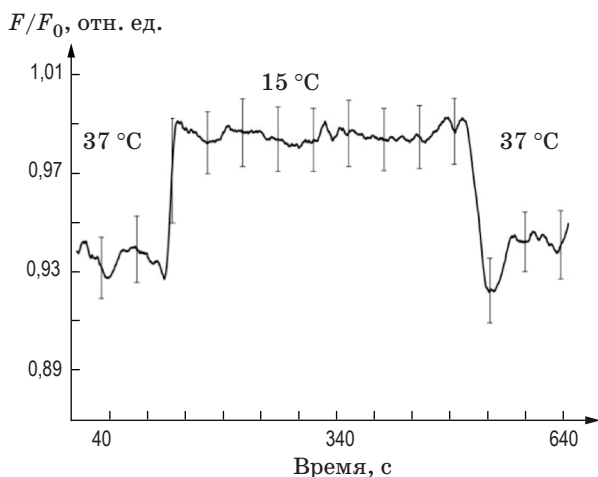
«ПостКР-3151», согласуются с результатами, опубликованными в работе [6].

Концентрация натрия  $[\text{Na}^+]_i$  в эндотелиальных клетках определялась флуориметрическим методом с использованием флуоресцентного красителя *Sodium Green* (*Molecular Probes*, USA) согласно протоколу [16]. Для измерения препарат (диск) роговицы переносился в раствор PBS ( $138\text{ mM NaCl}$ ,  $4,7\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $2,7\text{ mM KCl}$ ,  $1,5\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,5\text{ mM MgCl}_2$ ,  $5,5\text{ mM}$  глюкозы,  $0,1\text{ mM CaCl}_2$ ). Клетки загружались флуоресцентным красителем *Sodium Green TA* ( $10^{-5}\text{ M}$ ,  $40\text{ мин}$ ,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ ). Камера с диском помещалась в держатель установки «ПостКР-3151». В ходе эксперимента клетки находились в среде PBS, запись их флуоресценции проводилась в зависимости от температуры препарата. Результаты исследования динамики выхода натрия из клеток эндотелия приведены на рис. 6 и 7.

Результаты тестирования образцов роговицы свиньи разного срока консервации в среде *Eusol-C* (типичные профили на рис. 6) демонстрируют динамику и амплитуду снижения концентрации внутриклеточного натрия при температурной активации клеток эндотелия в зависимости от срока консервации. Длительная гипотермическая консервация (кривая 1) привела к значительному снижению интенсивности восстановления клеточного объема, что вероятно связано со снижением



**Рис. 6.** Профили относительной интенсивности флуоресценции *Sodium Green* образцов роговицы глаза свиньи в зависимости от времени консервации (1 — 12 суток, 2 — 2 суток) в среде *Eusol-C*



**Рис. 7.** Профиль относительной интенсивности флуоресценции *Sodium Green* образцов роговицы глаза человека в зависимости от времени консервации

интенсивности выведения натрия из клеток, и установлению более высокого стационарного уровня внутриклеточного натрия в клетках эндотелия. Этот результат, по-видимому, отражает частичную потерю активности транспортных механизмов выведения ионов натрия из клетки и в первую очередь  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы при длительной гипотермической консервации. Эти данные согласуются с полученными нами ранее в работе [2].

На рис. 7 представлены результаты тестирования образцов роговицы человека согласно разработанного протокола. Изменения активности внутриклеточного натрия пропорциональны относительной флуоресценции красителя *Sodium Green*. График демонстрирует температурную зависимость внутриклеточной концентрации ионов натрия, в основном определяемой активностью натрий-калиевого насоса клеток эндотелия роговицы человека. Снижение температуры с 37 до 15 °C ведет к накоплению ионов натрия в клетках. Повышение температуры с 15 до 37 °C активирует  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азу, что запускает интенсивное выведение ионов натрия из эндотелиальных клеток. Это типичный профиль для препарата роговицы человека.

Исследование динамики снижения клеточного объема эндотелия роговицы и содержания внутриклеточного натрия в его клетках при повышении температуры и прекращении холодной консервации дает объективное

представление об интегральной эффективности насосной функции клеток эндотелия и транспортной компетентности этих клеток, а значит и о сохранности консервированной роговицы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны экспериментальная база и специализированная флуориметрическая установка «ПостКР-3151» для исследования функций клеток эндотелия роговицы глаза при гипотермической консервации. Исследование основано на оценке внутриклеточных сигнальных механизмов, активация или дисфункция которых может быть связана с развитием отека трансплантированной роговицы и последующей болезни трансплантата роговицы.

Результаты экспериментов выявили, что изменения показателей транспорта воды и содержания натрия в клетках эндотелия роговицы в процессе тестирования позволяют делать заключение о способности эндотелиальных клеток восстанавливать их транспортные функции, что может служить прогностическим показателем пригодности образца для трансплантации.

Результаты исследования позволяют сделать заключение, что протоколы функционального тестирования клеток эндотелия могут быть полезны для определения степени пригодности препаратов роговицы как материала для трансплантации, а также в качестве системы тестов для определения эффективности методов их консервации.

Для улучшения качества диагностики жизнеспособности и функциональной сохранности консервированной роговицы предполагается сравнительное исследование таких фундаментальных характеристик транспортных механизмов клеток эндотелия роговицы свиньи и человека как водная проницаемость, активация транспорта натрия из клетки после консервации и способность клеток к восстановлению объема при активации транспортных механизмов клеток эндотелия при температуре 37 °C. Актуальность этих планируемых исследований обусловлена необходимостью иметь экспериментальную модель роговицы человека, с помощью которой будет возможно проведение ряда экспериментов для четкой формулировки критериев жизнеспособности.



способности эндотелия. В качестве экспериментальной модели предполагается использовать роговицу глаза свиньи. Планируемые эксперименты позволят определить направления совершенствования экспериментальной базы,

математической обработки и представления данных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов и финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Батурина Г.С., Каткова Л.Е., Соленов Е.В., Искаков И.А. Восстановление функции эндотелия роговицы глаза (обзор литературы) // Сибирский научный медицинский журнал. 2019. Т. 39. № 3. С. 28–33. DOI: 10.15372/SSMJ20190304
2. Батурина Г.С., Каткова Л.Е., Пальчикова И.Г., Соленов Е.И., Искаков И.А. Новые подходы к исследованию функциональной активности клеток эндотелия препаратов роговицы глаза [электронный ресурс] / Современные технологии в офтальмологии. 2019. № 5. С. 262–265. Режим доступа: URL: <https://eyeexpress.ru/article.aspx?41040>, свободный Яз. рус. (дата обращения 21.03.2022). DOI: <https://doi.org/10.25276/2312-4911-2019-5-262-265>
3. Schroeter J., Rieck P. Endothelial evaluation in the cornea bank // Dev. Ophthalmol. 2009. V. 43. P. 47–62. <https://doi.org/10.1159/000223838>
4. Vianna L.M., Li H.D., Holiman J.D., Stoeger C., Belfort R.Jr., Jun A.S. Characterization of cryopreserved primary human corneal endothelial cells cultured in human serum-supplemented media // Arq. Bras. Oftalmol. 2016. V. 79. P. 37–41. DOI: 10.5935/0004-2749.20160011
5. Bonanno J.A. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump // Exp. Eye Res. 2012. V. 95. № 1. P. 2–7. DOI: 10.1016/j.exer.2011.06.004
6. Батурина Г.С., Каткова Л.Е., Соленов Е.И., Пальчикова И.Г., Искаков И.А. Функциональная активность эндотелия роговицы свиньи // Саратовский научно-медицинский журнал. 2020. Т. 16. № 2. С. 584–587.
7. Liebovitch L.S., Fischbarg J. Effects of inhibitors of passive Na<sup>+</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> fluxes on electrical potential and fluid transport across rabbit corneal endothelium // Current Eye Research. 1982. V. 2. № 3. P. 183–186.
8. Hoffmann E.K., Lambert I.H., Pedersen S.F. Physiology of cell volume regulation in vertebrates // Physiol. Rev. 2009. V. 89. № 1. P. 193–277.
9. June C.H., Moore J.S. Measurement of intracellular ions by flow cytometry // Current Protocols in Immunology. N.Y.: J. Wiley & Sons, 2004. Chap. 5. Unit 5.5.
10. Solenov E., Watanabe H., Manley G.T., and Verkman A.S. Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2004. V. 286. № 2. P. 426–432.
11. Konev A.A., Palchikova I.G., Iskaikov I.A., Katkova L.E., Baturina G.S., Solenov E.I. IT analysis of cornea endothelium transport ability in corneal transplants after hypothermic conservation // BGRS\SB-2016. The 10th Intern. Conf. Bioinformatics Genome Regulation and Structure\Systems Biology (Novosibirsk, 29 Aug. – 2 Sept. 2016): Abstr. Novosibirsk, 2016. P. 136.
12. Батурина Г.С., Пальчикова И.Г., Конеv А.А., Смирнов Е.С., Каткова Л.Е., Соленов Е.И., Искаков И.А. Исследование влияния гипотермической консервации на уровень натрия в клетках эндотелия трансплантата роговицы // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. Т. 22. № 4. С. 433–437.
13. Батурина Г.С., Каткова Л.Е., Пальчикова И.Г., Колосова Н.Г., Искаков И.А., Соленов Е.И. Митохондриальный антиоксидант SKQ1 повышает эффективность гипотермической консервации роговицы // Биохимия. 2021. Т. 86. Вып. 3. С. 443–450. DOI: 10.31857/S032097252103012X
14. Конеv А.А., Пальчикова И.Г., Соленов Е.И., Смирнов Е.С. Программа обработки серии микроскопических изображений живых клеток в клеточных культурах «CytoDynamics» // Программа для ЭВМ 2016612766 РФ № 2016610153. Гос. регистрация в Реестре программ для ЭВМ 09.03.2016.
15. Pyaskin A.V., Karpov D.I., Medvedev D.A., Ershov A.P., Baturina G.S., Katkova L.E., Solenov E.I. Quantitative estimation of transmembrane ion transport in rat renal collecting duct principal cells // Gen. Physiol. Biophys. 2014. V. 33. P. 13–28. DOI: 10.4149/gpb\_2013063
16. Solenov E.I. Cell volume and sodium content in rat kidney collecting duct principal cells during hypotonic shock // Hindawi Publishing Corp. J. Biophysics. 2008. V. 2008. Article ID 420963. DOI:10.1155/2008/420963

**АВТОРЫ**

**Ирина Георгиевна Пальчикова** — доктор технических наук, доцент, главный научный сотрудник, Конструкторско-технологический институт научного приборостроения Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630058, Россия; Scopus ID 6602427879; <https://orcid.org/0000-0002-9039-7157>; [Palchikova@gmail.com](mailto:Palchikova@gmail.com)

**Евгений Сергеевич Смирнов** — научный сотрудник, Конструкторско-технологический институт научного приборостроения Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630058, Россия; Scopus ID 55658396400; <https://orcid.org/0000-0002-4244-8474>; [evgenii.s.smirnov@yandex.ru](mailto:evgenii.s.smirnov@yandex.ru)

**Елена Викторовна Карамшук** — конструктор, Конструкторско-технологический институт научного приборостроения Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630058, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-5847-7368>; [elka-kti@yandex.ru](mailto:elka-kti@yandex.ru)

**Вячеслав Сергеевич Гляненько** — ведущий электроник, Конструкторско-технологический институт научного приборостроения Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630058, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-4883-9588>; [g1234516@yandex.ru](mailto:g1234516@yandex.ru)

**Галина Сергеевна Батурина** — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090, Россия; Scopus ID 6506319391; <https://orcid.org/0000-0003-1289-5406>; [baturina@yandex.ru](mailto:baturina@yandex.ru)

**Любовь Евгеньевна Каткова** — кандидат биологических наук, научный сотрудник, Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090, Россия; Scopus ID 25227195700; <https://orcid.org/0000-0002-2858-3215>; [Ile@ngs.ru](mailto:Ile@ngs.ru)

**Евгений Иванович Соленов** — доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник, Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-0595-3084>; [eugsol@bionet.nsc.ru](mailto:eugsol@bionet.nsc.ru)

**Игорь Алексеевич Искаков** — доктор медицинских наук, заведующий операционным блоком, Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Фёдорова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирский филиал, Новосибирск, 630096, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-6289-6362>; [i.iskakov@mntk.nsk.ru](mailto:i.iskakov@mntk.nsk.ru)

**AUTHORS**

**Irina G. Palchikova** — Doctor of Science, Associate Professor, Key Researcher, Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering Sib. Br. RAS, Novosibirsk, 630058, Russia; Scopus ID 6602427879; <https://orcid.org/0000-0002-9039-7157>; [Palchikova@gmail.com](mailto:Palchikova@gmail.com)

**Evgenii S. Smirnov** — Researcher, Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering Sib. Br. RAS, Novosibirsk, 630058, Russia; Scopus ID 55658396400; <https://orcid.org/0000-0002-4244-8474>; [evgenii.s.smirnov@yandex.ru](mailto:evgenii.s.smirnov@yandex.ru)

**Elena V. Karamshuk** — Designer, Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering Sib. Br. RAS, Novosibirsk, 630058, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-5847-7368>; [elka-kti@yandex.ru](mailto:elka-kti@yandex.ru)

**Viacheslav S. Glianenko** — Lead Electronics, Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering Sib. Br. RAS, Novosibirsk, 630058, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-4883-9588>; [g1234516@yandex.ru](mailto:g1234516@yandex.ru)

**Galina S. Baturina** — PhD, Senior Researcher, Institute of cytology and genetics SB RAS, Novosibirsk, 630090, Russia; Scopus ID 6506319391; <https://orcid.org/0000-0003-1289-5406>; [baturina@yandex.ru](mailto:baturina@yandex.ru)

**Liubov E. Katkova** — PhD, Researcher, Institute of cytology and genetics SB RAS, Novosibirsk, 630090, Russia; Scopus ID 25227195700; <https://orcid.org/0000-0002-2858-3215>; [Ile@ngs.ru](mailto:Ile@ngs.ru)

**Evgeniy I. Solenov** — PhD, Doctor of Science, Associate Professor, Major Staff Member, Institute of cytology and genetics SB RAS, Novosibirsk, 630090, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-0595-3084>; [eugsol@bionet.nsc.ru](mailto:eugsol@bionet.nsc.ru)

**Igor A. Iskakov** — Doctor of Science, Head of Operating Department, The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Novosibirsk Branch, Novosibirsk, 630096, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-6289-6362>; [i.iskakov@mntk.nsk.ru](mailto:i.iskakov@mntk.nsk.ru)