

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭНДОТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ СВИНЬИ

Г. С. Батурина — ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук», старший научный сотрудник сектора молекулярной физиологии клетки, кандидат биологических наук; **Л. Е. Каткова** — ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук», научный сотрудник сектора молекулярной физиологии клетки, кандидат биологических наук; **Е. И. Соленов** — ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук», главный научный сотрудник сектора молекулярной физиологии клетки; ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», доцент кафедры физиологии, доктор биологических наук; **И. Г. Пальчикова** — ФГБНУ «Конструкторско-технологический институт научно-приборостроения Сибирского отделения Российской академии наук», главный научный сотрудник лаборатории 1–3; ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», профессор кафедры общей физики, доцент, доктор технических наук; **И. А. Исаков** — ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава России, Новосибирский филиал, заведующий операционным блоком, доктор медицинских наук.

CORNEAL ENDOTHELIUM FUNCTIONAL ACTIVITY IN PIGS

G. S. Baturina — Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian branch of the Russian Academy of Sciences, Senior Staff Researcher of the Group of Cell Molecular Physiology, PhD; **L. E. Katkova** — Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian branch of the Russian Academy of Sciences, Staff Researcher of the Group of Cell Molecular Physiology, PhD; **E. I. Solenov** — Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian branch of the Russian Academy of Sciences, Chief Staff Researcher of the Group of Cell Molecular Physiology; Novosibirsk State University, Associate Professor of the Department of Physiology, DSc; **I. G. Palchikova** — Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering of the Siberian branch of the Russian Academy of Sciences, Head Staff Researcher of the 1–3 laboratory; Novosibirsk State University, Professor of the Department of General Physics, Assistant Professor, DSc; **I. A. Isakov** — S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Novosibirsk branch, Head of Operating Department, DSc.

Дата поступления — 10.04.2020 г.

Дата принятия в печать — 04.06.2020 г.

Батурина Г. С., Каткова Л. Е., Соленов Е. И., Пальчикова И. Г., Исаков И. А. Функциональная активность эндотелия роговицы свиньи. Саратовский научно-медицинский журнал 2020; 16(2): 584–587.

Цель: исследовать возможность диагностики функциональной сохранности трансплантатов роговицы человека на основе оценки транспорта воды и ионов натрия клетками эндотелия роговицы свиньи. **Материал и методы.** Исследование проводилось на дисках роговицы свиньи. Оценка динамики объема клеток выполнялась методом, основанным на эффекте гашения флуоресценции красителя Calcein белками цитоплазмы. Содержание внутриклеточного натрия исследовалось методом флуоресцентной микроскопии с использованием специфического для натрия красителя Sodium Green. Для исследования динамики десвеллинга матрикса роговицы применяли микрофлюидную проточную камеру. **Результаты.** Повышение температуры с 20 до 37°C активирует Na/K-АТФазу, что запускает снижение объема клеток эндотелия роговицы. Экспоненциальная аппроксимация профиля флуоресценции дает траекторию, отражающую снижение клеточного объема с характерным временем $73,5 \pm 12,6$ секунды ($n=6$). Экспоненциальная аппроксимация профиля флуоресценции красителя Sodium Green, отражающая изменение относительной концентрации внутриклеточного натрия, соответствовала снижению концентрации этого иона с характерным временем $130,0 \pm 26,3$ секунды ($n=5$). Эксперименты с температурной активацией насосной активности клеток эндотелия позволили определить начальную скорость снижения объема матрикса: $0,36 \pm 0,006 \mu\text{m/s}$ ($n=5$). **Заключение.** Оценка динамики изменения объема клеток эндотелия и содержания в них натрия, динамика десвеллинга после прекращения холодовой консервации позволяют повысить качество анализа жизнеспособности препаратов роговицы глаза.

Ключевые слова: эндотелий роговицы, холодовая консервация, внутриклеточный натрий, объем клетки, десвеллинг.

Baturina GS, Katkova LE, Solenov EI, Palchikova IG, Isakov IA. Corneal endothelium functional activity in pigs. *Saratov Journal of Medical Scientific Research* 2020; 16(2): 584–587.

The purpose of the study is to determine the potential for diagnostics of human corneal endothelial cells functional activity based on a study of the transport of water and sodium ions by the endothelial cells of a pig's cornea. Material and Methods. The study was conducted on the disks of pig's cornea. Evaluation of cell volume dynamics was studied with a method based on fluorescence quenching effect of Calcein dye by cytoplasmic proteins. The intracellular sodium concentration was investigated by fluorescence microscopy method using sodium-specific dye Sodium Green. Microfluidic flow chamber was used to study the dynamics of corneal matrix deswelling. **Results.** Increase of temperature from 20 to 37°C activates Na/K-ATPase and leads to a decrease in the volume of corneal endothelium cells (characteristic time 73.5 ± 12.6 s) ($n=6$). The relative concentration of intracellular sodium decreased with the characteristic time 130.0 ± 26.3 s ($n=5$). Studies with temperature activation of endothelial cell pumping activity allowed us to estimate the initial rate of the matrix volume reduction: $0.36 \pm 0.006 \mu\text{m/s}$ ($n=5$). **Conclusion.** The study of the dynamics of endothelial cells' volume and intracellular content of sodium in it during cold preservation allows to improve the quality of assessment of viability of a preserved cornea.

Key words: corneal endothelium, cold preservation, intracellular sodium, cell volume, deswelling.

Введение. Роговица является важным элементом оптической системы глаза. Строма роговицы в основном состоит из регулярно расположенных коллагеновых волокон, что обуславливает ее прозрачность. Критическим для прозрачности роговицы является поддержание осмотического равновесия в строме [1, 2]. Осмотический баланс матрикса роговицы определяется динамическим равновесием вы-

ведения и поступления воды и осмолитов в матрикс. Эндотелий представляет собой монослой клеток с плотными соединениями, разделяющий матрикс и жидкость передней камеры глаза. Интенсивность процессов водно-электролитного обмена в роговице в значительной мере определяется транспортными механизмами клеток эндотелия. Эти процессы часто описывают с помощью так называемого механизма “pump-leak” транспорта осмолитов и воды. Поступление воды в матрикс (leak) происходит пассивно согласно проницаемости эндотелия для воды и осмолитов и градиенту осмотического давления между

Ответственный автор — Исаков Игорь Алексеевич
Тел.: +7 (913) 9251173
E-mail: i.isakov@mntk.nsk.ru

матриксом и жидкостью в передней камере глаза. Удаление воды из матрикса (pump) обусловлено Na, K-АТФазой и системой, включающей транспорт HCO_3^- , Cl^- , а также активность карбоангидраз клеток эндотелия. Оба процесса определяются функцией клеток эндотелия роговицы. Поступление воды в матрикс зависит от водной проницаемости монослоя клеток эндотелия, а формирование градиента осмотического давления определяется интенсивностью энергозависимого транспорта в этих клетках.

Цель: исследовать возможность диагностики функциональной сохранности трансплантатов роговицы человека на основе оценки транспорта воды и ионов натрия клетками эндотелия роговицы свиньи.

Материал и методы. Исследование проводилось на дисках роговицы свиньи диаметром 8,0 мм (трепанация через 6–8 часов после забоя животных), сохраняемых 2 суток при 4°C во влажной камере в консервационной среде Eusol-C (Alchimia, Италия).

Исследование содержания натрия и изменения относительного объема клетки. Исследование содержания внутриклеточного натрия. Изменения концентрации внутриклеточного натрия исследовали флуоресцентным методом с использованием красителя Sodium Green. Клетки эндотелия загружали красителем 5,0 μM Sodium Green AM (Molecular Probes, США) при 37°C 30 минут, затем помещали в проточную камеру микроскопа (рис. 1) в изотоническом растворе фосфатно-солевого буфера (PBS: 138 mM NaCl, 4,7 mM Na_2HPO_4 , 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 0,5 mM MgCl_2 , 5,5 mM глюкоза, 0,1 mM CaCl_2) с нормальной концентрацией натрия и уравнивали в течение минимум 60 секунд. Флуоресценцию клеток эпителия регистрировали с помощью описанной установки.

Динамику изменения внутриклеточной концентрации натрия в клетках эндотелия записывали через 6–8 часов после забоя животных и после гипотермической консервации (4°C) препаратов роговицы глаза длительностью 2 суток.

Определение изменения относительного объема клетки. Для изучения изменений объема клетки применяли метод, основанный на эффекте гашения флуоресцентного красителя Calcein белками цитоплазмы [4]. Загрузка клеток красителем (Calcein AM, Sigma, Германия) производилась в среде L-15 Leibovitz с конечной концентрацией Calcein AM 10 мкМ, DMSO 1%. Время инкубации 15 минут при 37°C. Установку собрали на микроскопе Axiovert 40 (Zeiss, Германия). Для регистрации флуоресценции использовали комплект фильтров Zeiss #09, объектив $\times 40$, 0,5 N.A. Проточную камеру микроскопа и растворы термостатировали при 20°C или 37°C.

Эмитируемый свет регистрировали с помощью фотоприемника на основе ФЭУ-71, оборудованного полевой диафрагмой для измерения интенсивности флуоресценции в интересующей группе клеток. Измерения производили с помощью цифрового осциллографа АСК-3102 (Актаком®, Россия) с записью на компьютер.

Ранее нами было показано, что изменения относительной флуоресценции (F/F_0) линейно пропорциональны изменениям относительного объема клеток (V/V_0) [3]. Изменения объема клетки выражали в относительных величинах флуоресценции.

Исследование влияния интегральной функции эндотелия на объем матрикса роговицы. Для исследования влияния интегральной "pump-leak" функции эндотелия фрагмент препарата роговицы помещали в проточную камеру, в которой поверхность препарата формирует микроканальную систему. В данной системе контакт препарата роговицы с протекающей средой осуществляется таким образом,

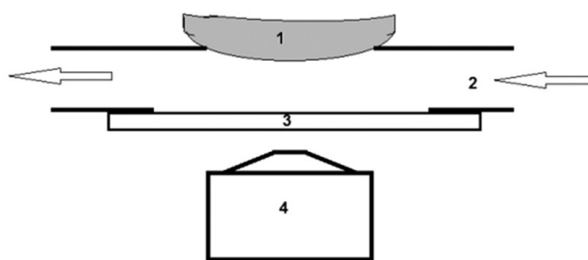


Рис. 1. Схема микроканальной проточной камеры: 1 — препарат роговицы; 2 — поток среды с флуоресцентным красителем; 3 — покровное стекло; 4 — микроскоп

что водно-электролитный обмен между средой и матриксом происходит через эндотелий (см. рис. 1). Среда представляет собой PBS, содержащий 10^{-6} M Calcein в ионизированной форме, препятствующей его проникновению в клетки. Микроканальная система монтируется на стол инвертированного флуоресцентного микроскопа (Axiovert 40, Zeiss, объектив $\times 10$, 0,25 N. A.) и представляет собой канал с глубиной 0,25 N. A. и шириной 2000 микрон. Среда протекает со скоростью 0,1 мл/мин. Дно канала выполнено из покровного стекла, противоположную сторону формирует поверхность образца роговицы. В этой связи глубина канала не постоянна и зависит от степени набухания препарата. В наших экспериментах она изменялась в интервале 200–400 микрон. Амплитуда флуоресцентного сигнала в такой системе зависит от глубины протекающей среды, содержащей флуоресцентный краситель.

Для оценки вариабельности измеряемых величин рассчитывали стандартную ошибку среднего на основе несмещенной оценки дисперсии. Все величины выражены как $M \pm m$, n — количество препаратов роговицы. Процедура исследования соответствовала стандартам этического комитета, изложенным в Хельсинкской декларации 1975 г. и ее пересмотре 1983 г.

Результаты. Повышение температуры с 20 до 37°C активирует Na/K-АТФазу, что запускает снижение объема клеток, определяемого как изменение относительной флуоресценции красителя Calcein (F/F_0), в клетках эндотелия роговицы с характерным временем снижения клеточного объема $73,5 \pm 12,6$ секунды ($n=6$) и начальной скоростью снижения $0,0017 \pm 0,0004$ секунды $^{-1}$ ($n=6$) (рис. 2а).

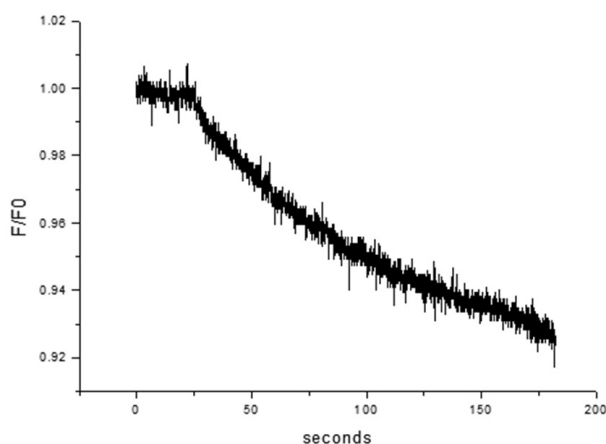


Рис. 2а. Типичный график флуоресценции красителя Calcein при повышении температуры препаратов в эндотелиальных клетках роговицы свиньи с 20 до 37°C. Оси: абсцисс — секунды, ординат — относительная флуоресценция

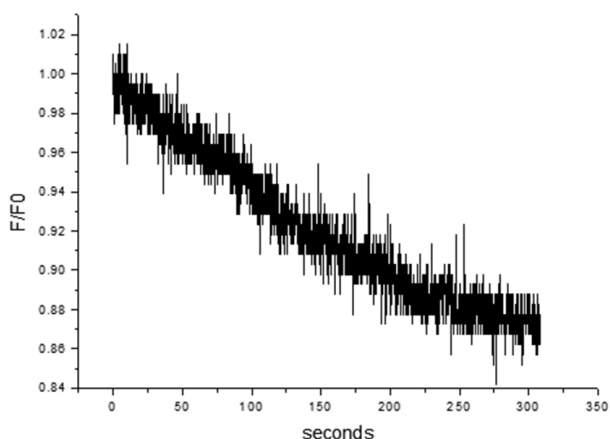


Рис. 2б. Типичный график флуоресценции красителя Sodium Green при повышении температуры препаратов в эндотелиальных клетках роговицы свиньи с 20 до 37°C. Оси: абсцисс — секунды, ординат — внутриклеточная концентрация натрия, усл. ед.

Относительная концентрация внутриклеточного натрия, определяемая как величина относительной флуоресценции красителя Sodium Green (F/F_0), при экспоненциальной аппроксимации профиля флуоресценции (рис. 2б) снижалась с характерным временем экспоненты $130 \pm 26,3$ секунды ($n=5$).

Эксперименты с температурной активацией насосной активности клеток эндотелия позволили сделать оценку начальной скорости снижения объема матрикса (десвеллинга) (рис. 3). Определение скорости снижения объема матрикса ($0,36 \pm 0,006 \mu\text{m/s}$, $n=5$) позволяет сделать заключение, что кинетика этого процесса отражает эффективность интегральной насосной функции эндотелия.

Обсуждение. Основным источником энергии для векторного транспорта ионов через плазматическую мембрану является Na/K-АТФаза, создающая градиент электрохимического потенциала натрия, что является вторичным источником энергии для транспортных процессов в клетке и выполнения клетками насосной функции (pump) [5, 6]. В состоянии холодной консервации Na/K-АТФаза не активна и клетки находятся в деполяризованном состоянии, следствием чего является набухание клетки в результате входа ионов натрия, поскольку в охлажденной, деполяризованной клетке устанавливается равновесная со средой концентрация ионов. В настоящей работе мы исследовали кинетику снижения относительного объема эндотелиальных клеток в результате выведения ионов натрия из клетки при температурной активации Na/K-АТФазы. Снижение клеточного объема в процессе выведения ионов натрия из клетки определяли по снижению флуоресцентного сигнала красителя Calcein. В препарате роговицы свиньи (2 суток после забоя животных), помещенном в изотонический раствор PBS, происходило снижение клеточного объема при повышении температуры. Эти результаты указывают на интенсивные процессы транспорта ионов натрия, приводящие к снижению клеточного объема (см. рис. 2а).

Поскольку снижение объема клетки при температуре 37°C в основном связано с активацией Na, K-АТФазы и выведением из клеток эндотелия ионов натрия, мы провели исследование динамики выхода натрия из клетки с помощью специфического для натрия флуоресцентного красителя Sodium Green. Согласно полученным результатам, харак-

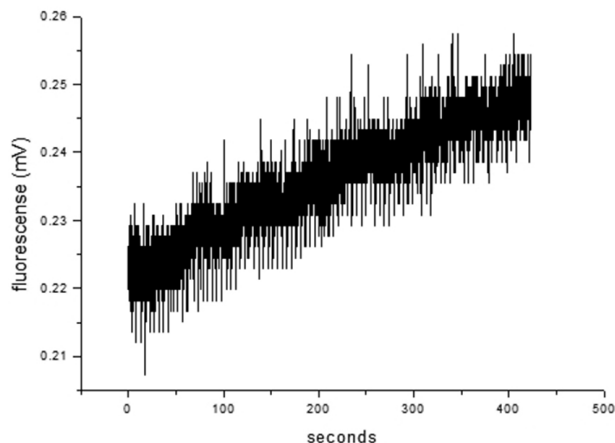


Рис. 3. Динамика флуоресцентного сигнала в микроканальной камере в процессе снижения объема матрикса роговицы при повышении температуры с 20 до 37°C

терное время снижения относительного клеточного объема при экспоненциальной аппроксимации профиля флуоресценции начального этапа позволяет дать оценку потенциальной эффективности эндотелия трансплантата в процессе послеоперационного восстановления функции (см. рис. 2б). Скорость снижения относительной концентрации внутриклеточного натрия меньше, но близка по порядку величины к тем значениям, которые были получены в экспериментах по снижению объема, что согласуется с предположением об определяющем влиянии натрия на изменение клеточного объема. Таким образом, динамика внутриклеточной концентрации натрия может являться параметром, отражающим жизнеспособность и функциональную активность клеток эндотелия трансплантата роговицы.

Наши ранние исследования процесса выведения ионов натрия из клеток эндотелия показывают, что холодовая консервация в зависимости от длительности снижает интенсивность выведения натрия, а в сочетании с повышением проницаемости плазматической мембраны для этого иона ведет к установлению более высокого стационарного уровня внутриклеточного натрия в клетках эндотелия [7]. Результаты исследования интегральной "pump-leak" функции эндотелия фрагмента препарата роговицы, проведенные в экспериментальной микроканальной системе, также позволяют говорить о перспективности такого подхода. Эксперименты с температурной активацией насосной активности клеток эндотелия позволили сделать оценку скорости снижения объема матрикса (десвеллинг) (см. рис. 3). Кинетика снижения объема матрикса, представленная на рис. 3, характерна, по-видимому, для образцов с не поврежденным клеточным монослоем и отражает максимальную эффективность эндотелия. Такое заключение можно сделать на основании наших предыдущих исследований насосной функции клеток, из которых следует, что применяемый метод консервации приводит к постепенному снижению интенсивности, но тем не менее позволяет сохранять функцию клеточного транспорта более 10 дней [8]. В этой связи можно предположить, что в образцах с нулевой или низкой кинетикой десвеллинга доминирующим фактором является «утечка» (leak), т.е. поток воды через разрывы в эндотелии шунтирует и делает неэффективной работу клеточных насосов. Важным свойством такого подхода является его требователь-

ность к целостности клеточного монослоя и плотных соединений между клетками, поскольку проницаемость эндотелия для успешности такого теста (leak) должна быть достаточно низкой. Резюмируя, можно отметить, что высокая кинетика десвеллинга в таком тесте с высокой вероятностью свидетельствует о высоком качестве образца как материала для трансплантации.

Заключение. Исследование динамики снижения клеточного объема эндотелия роговицы, содержания внутриклеточного натрия в клетках эндотелия, десвеллинга матрикса роговицы при восстановлении функции после холодовой консервации, дает объективное представление о транспортной компетентности этих клеток и пригодности консервированной роговицы для трансплантации.

Конфликт интересов отсутствует. Работа поддержана бюджетным проектом №0324-2019-0041 и грантами Российского фонда фундаментальных исследований №20-015-00147; №19-08-00874.

References (Литература)

1. Maurice DM. The location of the fluid pump in the cornea. *J Physiol* 1972; 221 (1): 43–54.
2. Bonanno JA. Molecular Mechanisms Underlying the Corneal Endothelial Pump. *Exp Eye Res* 2012; 95 (1): 2–7.

3. Zarogiannis SG, et al. Regulatory volume decrease of rat kidney principal cells after successive hypo-osmotic shocks. *Math Biosci* 2013; 244 (2): 176–87.

4. Solenov E, et al. 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; 286 (2): 426–32.

5. Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev* 2009; 89 (1): 193–277.

6. Wehner F, et al. Hypertonic activation of a non-selective cation conductance in HeLa cells and its contribution to cell volume regulation. *FEBS Lett* 2003; 551 (1): 20–4.

7. Baturina GS, Palchikova IG, Konev AA, et al. Study of the effect of hypothermic conservation on sodium levels in corneal graft endothelium cells. *Vavilov's Journal of Genetics and Selection* 2018; 22 (4): 433–437. Russian (Батурина Г.С., Пальчикова И.Г., Конев А.А. и др. Исследование влияния гипотермической консервации на уровень натрия в клетках эндотелия трансплантата роговицы. *Вавиловский журнал генетики и селекции* 2018; 22 (4): 433–7).

8. Baturina GS, Katkova LE, Palchikova IG, et al. New approaches to the study of the functional activity of endothelial cells of the cornea preparations. *Modern Technologies in the Ophthalmology* 2019; 5 (30): 262–265. Russian (Батурина Г.С., Каткова Л.Е., Пальчикова И.Г., Соленов Е.И., Исаков И.А. Новые подходы к исследованию функциональной активности клеток эндотелия препаратов роговицы глаза. *Современные технологии в офтальмологии* 2019; 5 (30): 262–5).

УДК 617.77–006.6

Оригинальная статья

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ВЕК ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА АУТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

А. Н. Бочкарева — ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава России, Хабаровский филиал, врач-офтальмолог отделения реконструктивно-восстановительной хирургии; **В. В. Егоров** — ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава России, Хабаровский филиал, главный консультант; КГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации специалистов здравоохранения» минздрава Хабаровского края, заведующий кафедрой офтальмологии, профессор, доктор медицинских наук; **Г. П. Смолякова** — ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава России, Хабаровский филиал, врач-офтальмолог клинико-экспертного отдела; КГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации специалистов здравоохранения» минздрава Хабаровского края, профессор кафедры офтальмологии, профессор, доктор медицинских наук; **П. А. Банщиков** — ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава России, Хабаровский филиал, заведующий отделением реконструктивно-восстановительной хирургии, врач-офтальмолог.

IMPROVEMENT OF SURGICAL TREATMENT EFFICIENCY FOR MALIGNANT EYELID TUMORS OF EPITHELIAL ORIGIN USING AUTOFLUORESCENCE IMAGING

A. N. Bochkareva — S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Khabarovsk branch, Ophthalmologist of the Reconstructive Plastic Surgery Department; **V. V. Egorov** — S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Khabarovsk branch, Head Consultant; Postgraduate Institute for Public Health Workers, Head of the Department of Ophthalmology, Professor, DSc; **G. P. Smoliakova** — S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Khabarovsk branch, Ophthalmologist of the Clinical-Expert Department; Postgraduate Institute for Public Health Workers, Professor of the Department of Ophthalmology, Professor, DSc; **P. A. Banshchikov** — S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Khabarovsk branch, Head of the Reconstructive Plastic Surgery Department, Ophthalmologist.

Дата поступления — 10.04.2020 г.

Дата принятия в печать — 04.06.2020 г.

Бочкарева А. Н., Егоров В. В., Смолякова Г. П., Банщиков П. А. Повышение эффективности хирургического лечения злокачественных новообразований век эпителиального происхождения при использовании метода аутофлуоресценции. *Саратовский научно-медицинский журнал* 2020; 16 (2): 587–591.

Цель: оценить возможность аутофлуоресцентной диагностики (АФД) для определения границ опухоли и объема операции у пациентов с новообразованиями век эпителиального происхождения. **Материал и методы.** Исследование включало три части: анализ частоты рецидивов базально-клеточного рака век (БКР); анализ медицинских карт пациентов, которым на первичном приеме с целью дифференциальной диагностики между злокачественным и доброкачественным новообразованием проводилась их АФД; оценка точности определения границ опухоли при использовании визуальной диагностики и АФД на основе изучения морфологических срезов фрагментов опухоли, полученных после резекции века. **Результаты.** При сроках диспансерного наблюдения 1,5 года после хирургического удаления БКР с визуальной диагностикой его границ у 18% пациентов выявлен рецидив заболевания. Использование АФД для проведения дифференциальной диагностики между злокачественным и доброкачественным новообразованием кожи век и периорбитальной области показало, что метод