
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ КОНСЕРВАЦИИ НА ИЗМЕНЕНИЕ ОБЪЕМА КЛЕТОК
ЭНДОТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ В СРЕДЕ С ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ КАЛИЯ**

© 2024 г. Л. Е. Каткова¹, Г. С. Батурина^{1,2}, М. М. Тетерин³, А. И. Саханенко⁴,

И. Г. Пальчикова^{2,5}, И. А. Искаков⁶, Е. И. Соленов^{1,2,3,*}

¹Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

³Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия

⁴Институт математики им. С.Л. Соболева Сибирского отделения Российской Академии наук,
Новосибирск, Россия

⁵Конструкторско-технологический институт научного приборостроения Сибирского
отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁶Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. акад.
С. Н. Федорова Минздрава России, Новосибирский филиал, Новосибирск, Россия

*E-mail: eugsol@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 27.05.2024 г.

После доработки 22.07.2024 г.

Принята к публикации 26.07.2024 г.

Проведено экспериментальное исследование воздействия высокой (100 мМ) концентрации калия в среде на объем клеток эндотелия роговицы человека в зависимости от времени холодовой консервации донорского препарата. Приведены результаты исследования единичных образцов и значения, полученные на объединенном материале фрагментов донорских образцов после содержания препаратов в консервационной среде при 4 °С в течение 4 и 10 дней. Увеличение времени холодовой консервации препаратов привело к снижению процента клеток, способных набухать в среде с повышенным содержанием ионов калия (94.3% и 56.8% после 4 и 10 дней соответственно). Исследование клеток, способных к набуханию, показало, что увеличение времени их холодовой консервации привело к снижению средней величины ($M \pm SEM$) коэффициента набухания клеток в среде с высокой концентрацией калия с 1.055 ± 0.001 до 1.014 ± 0.001 после 4 и 10 дней соответственно. Высокую степень достоверности различия этих значений (p -value = 2E-76) показали с помощью t -критерия Стьюдента для независимых выборок.

По результатам исследования высказывается предположение, что величины набухания клеток эндотелия в калиевой среде могут служить показателями способности клеток к восстановлению электрогенного транспорта. Делается заключение, что исследование реакции клеток эндотелия роговицы на повышение концентрации ионов калия в среде может давать информацию для прогноза функциональности трансплантата.

Ключевые слова: эндотелий роговицы, трансплантация роговицы, холодовая консервация

ВВЕДЕНИЕ

Роговица – наружный преломляющий оптический элемент глаза – состоит из трех основных слоев: наружного слоя – эпителия, среднего стромального слоя и внутреннего слоя эндотелиальных клеток. Строма или матрикс образует основную часть структуры роговицы и составляет примерно 80–85% ее толщины. Она состоит из регулярно расположенных коллагеновых фибрилл и межфибриллярного пространства, содержащего гликозаминогликаны. Нарушение содержания воды в строме (в норме ~78%) изменяет степень гидратации коллагеновых волокон, что является критическим для прозрачности роговицы [1, 2]. При нарушении прозрачности роговицы наиболее распространенным методом восстановления зрения является кератопластика. Использование этого метода осложняет проблема дисфункции трансплантата, связанной с эндотелиальной недостаточностью в ближайшем и позднем послеоперационном периодах. Для преодоления этой проблемы усовершенствуют технологии консервации ткани, что в свою очередь делает актуальным развитие методов диагностики активности транспортных механизмов клеток эндотелия роговицы. Осмотический баланс матрикса роговицы определяется равновесием процессов выведения и поступления воды и осмолитов в строму. Эти процессы часто описывают с помощью механизма Pump-Leak транспорта осмолитов и воды [2, 3]. Поступление воды в матрикс (leak) происходит пассивно согласно проницаемости эндотелия для воды, осмолитов и градиенту осмотического давления между матриксом и жидкостью в передней камере глаза. Удаление воды из матрикса (pump) является активным процессом, который осуществляется клетками эндотелия. Эндотелий роговицы представляет собой монослой клеток на внутренней поверхности роговицы и является одной из наиболее метаболически активных тканей организма. Апоикальная и базолатеральная плазматические мембраны клеток эндотелия различаются по составу экспрессируемых молекулярных транспортеров [4]. Апоикальная поверхность обращена в переднюю камеру глаза, содержит хлоридные каналы и водный канал аквапорин 1 [5]. Базолатеральная поверхность обращена к десцеметовой мембране и содержит Na/K-АТФазу как часть механизма активного энергозависимого электрогенного транспорта [2]. Насосная функция эндотелия роговицы определяется интенсивностью энергозависимого транспорта в этих клетках [6, 7]. Активность натрий-калиевого насоса (Na/K-АТФазы) создает низкую, относительно наружной среды, внутриклеточную концентрацию ионов натрия, повышенную концентрацию ионов калия и градиент отрицательного электрического потенциала на плазматической мембране. Поскольку плазматическая мембрана обладает высокой проницаемостью для ионов калия [8], повышенная внутриклеточная концентрация этих ионов существует благодаря тому, что разность электрохимических потенциалов ионов калия внутри и снаружи клетки мала, и в норме их выход компенсируется активностью Na/K-АТФазы.

В качестве материала для трансплантации используют препараты донорской роговицы из глазных банков, где они хранятся в консервационной среде при температуре 4 °C (холодовая консервация) [9]. Водно-электролитный обмен в клетках эндотелия при пониженной температуре нарушен, поскольку транспортные механизмы клеток подавлены, что приводит к деполяризации плазматической мембраны. Способность клеток эндотелия к восстановлению электрогенного транспорта может служить критерием функциональной сохранности трансплантата.

Замещение части ионов натрия на ионы калия в наружной среде вызывает поток ионов калия в клетку и ведет к набуханию клетки и деполяризации ее плазматической мембраны. В клетках с ослабленной функцией Na/K-АТФазы эффект повышения концентрации ионов калия в среде на клеточный объем ослаблен, поскольку клетки содержат повышенную концентрацию ионов натрия и в значительной мере деполяризованы.

Попытки теоретически моделировать такой эффект не дают конкретных результатов из-за отсутствия точных значений параметров транспортных механизмов клетки [10].

В настоящей работе исследовали влияние длительности холодовой консервации донорского препарата роговицы человека на динамику изменения объема клеток эндотелия в среде с повышенным содержанием калия.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фрагменты роговицы человека в виде трепанированных дисков получали в процессе выполнения сквозной фемтокератопластики. Препараты роговицы находились в консервационной среде Eusol-C (Alchimia, Италия) 4 и 10 суток при температуре около 4 °С. Фрагменты десцеметовой мембраны с сохраненным эндотелием переносили на покровное стекло и помещали в проточную камеру микроскопа. Таким методом получали препарат клеток эндотелия, обращенных апикальной стороной в сторону омывающего раствора. Затем загружали клетки флуоресцентным красителем кальцеином (Calcein AM, 10^{-5} M, 20 мин, 37 °С). Для определения изменений клеточного объема использовали методический подход, основанный на эффекте гашения флуоресценции кальцеина белками цитоплазмы. Принцип метода описан нами ранее [11, 12]. В процессе эксперимента клетки помещали в буферный фосфатный солевой раствор (PBS) следующего состава (mM): NaCl 125, Na_2HPO_4 4.7, KCl 2.7, KH_2PO_4 1.5, MgCl_2 0.5, глюкоза 5.5, CaCl_2 1, pH 7.4. Среду с повышенным содержанием калия создавали раствором PBS, в котором 100 mM NaCl было заменено на 100 mM KCl.

Экспериментальная установка представляла собой проточную камеру, разработанную для использования с флуоресцентным микроскопом Observer-Z1 (объектив LD LCI "Plan-Apochromat" 25x/0.8 Imm Corr DIC M27, Zeiss, Германия). Объем камеры составлял около 50 мкл, скорость протекания раствора – 25 мл/мин, смена омывающего раствора происходила в течение 100 мс, поддерживаемая температура: $36,8 \pm 0,2$ °С. Флуоресцентное изображение клеток записывали с помощью монохромной цифровой камеры, используя набор фильтров и дихроическое зеркало #009 (AxioCam HSm, 660 x 490 пикселей, Zeiss, Германия). Регистрацию флуоресцентного изображения проводили при низкой интенсивности возбуждающего света, что позволяло избежать выгорания флуорофора во время эксперимента. Сигнал регистрировали и сохраняли на компьютере.

Протокол эксперимента и анализ изображений

Регистрировали флуоресцентное изображение препарата клеток, предварительно загруженных кальцеином и уравновешенных в среде PBS. Затем производили замену раствора на PBS с повышенной концентрацией калия (100 mM) и через 10 с делали второе изображение препарата. После записи изображения в среде с повышенной концентрацией калия препарат возвращали в основную среду PBS и производили запись изображения для выявления клеток, потерявших флуоресцентный краситель. Такие клетки исключали из статистического анализа. Измерение интенсивности флуоресценции на записях изображений проводили с помощью программы ImageJ (НИН, США).

На рис. 1 показаны типичные кривые результатов сканирования интенсивности флуоресценции единичной клетки в среде PBS (1) и в среде PBS с повышенным содержанием калия (2). На изображении каждой клетки выделяли точку максимальной интенсивности – центроид.

При анализе флуоресцентного изображения клетки определяли интегральную флуоресценцию как суммарную освещенность области диаметром 5 мкм вокруг центроида (d) (рис. 1). Суммарную светимость в этой области в среде PBS обозначали как a1, в среде PBS с повышенным содержанием калия – a2.

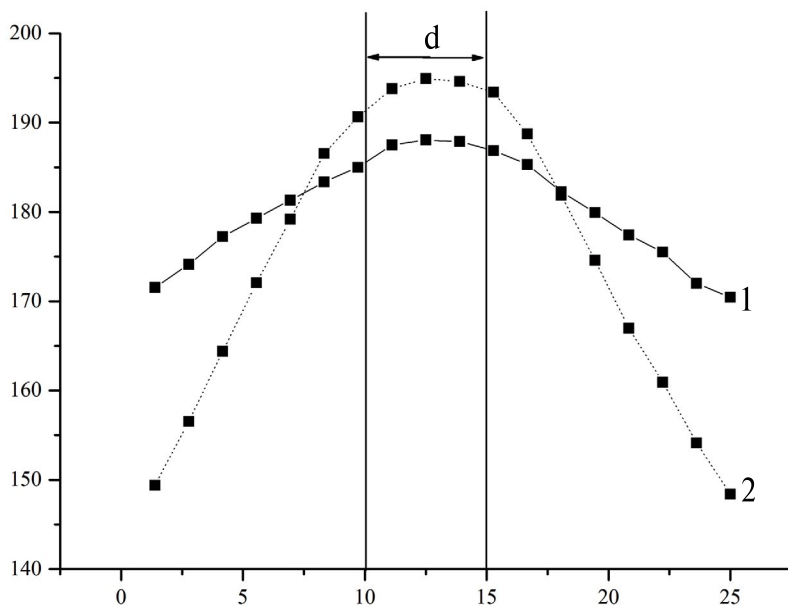


Рис. 1. Типичные кривые интенсивности флуоресцентного изображения клетки при сканировании через район центроида. Кривая 1 – контроль PBS. Кривая 2 – PBS с повышенной концентрацией калия (100 мМ). d – диаметр области считывания флуоресценции (5.0 мкм.). Оси: ординат – интенсивность флуоресценции усл. ед.; абсцисс – расстояние, мкм.

Статистический анализ

Для каждой клетки рассчитали коэффициент набухания $Q = a_2/a_1$, который мы далее рассматривали как важный показатель изменения объема клетки после повышения концентрации калия в среде.

После этого все исследуемые клетки разделяли на две группы в зависимости от того, $Q \geq 1$ или $Q < 1$. Клетки с показателем $Q \geq 1$ считали потенциально активными. Клетки с коэффициентом Q ниже 1 рассматривали как утратившие функциональность, поскольку у них, очевидно, недостаточное формирование электрохимического потенциала ионов натрия необходимого для осуществления клеточного транспорта.

Введённые выше показатели Q мы проверяли на соответствие нормальному распределению при помощи теста Шапиро–Вилка из программы Статистика 6.1. Достоверность различий средних величин у коэффициентов Q в выборках после 4 и 10 дней консервации оценивали с помощью t -критерия Стьюдента для независимых выборок, у которых не предполагается равенства дисперсий.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Флуоресцентные изображения монослоя эндотелиальных клеток роговицы представлены на рис. 2. Повышение концентрации калия в среде приводило к увеличению интенсивности флуоресценции в районе центроида клетки. Измерение яркости флуоресцентных изображений, которые проводили в контроле (PBS) и изотонической среде с повышенным содержанием калия, позволило рассчитать относительное увеличение объема клеток в результате их деполяризации, вызванной входом ионов калия.

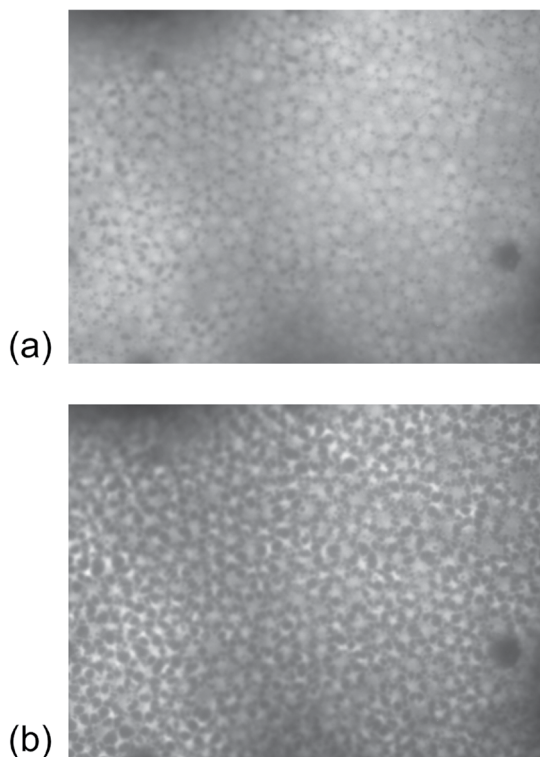


Рис. 2. Флуоресцентные изображения клеток препарата эндотелия в контроле (PBS) (a) и в PBS с повышенным содержанием калия (100 мМ) (b). Масштабный отрезок – 100 мкм.

Каждую исследованную выборку клеток, полный объём которой мы обозначали N , разделяли на две группы в зависимости от того, $Q \geq 1$ или $Q < 1$. В дальнейшем исследовали только числовую выборку из коэффициентов Q с $Q \geq 1$. Для этой числовой выборки стандартным образом находили стандартное отклонение SD и стандартную ошибку среднего SEM .

В табл. 1 приведены результаты исследования единичных образцов, а также значения, полученные на объединенных материалах. Можно видеть, что при увеличении на 6 дней времени нахождения препаратов в консервационной среде при 4°C происходило снижение средней величины Q , а также снижение доли клеток, превышающих пороговое значение этого показателя. Такой результат, полученный с высокой достоверностью, позволяет думать, что применяемый экспериментальный подход может давать устойчивые результаты, надежность которых возрастает при увеличении объемов выборки.

При проверке гипотезы о равенстве средних в двух объединённых выборках значение t -критерия Стьюдента оказалось очень большим ($t > 34$), что соответствовало $p = 2\text{E-}76$.

Таким образом, увеличение на 6 дней времени нахождения препаратов в условиях холодильной консервации привело к снижению средней величины M показателя Q с очень высокой достоверностью. Эти результаты позволяют нам с большой уверенностью высказать предположение, что средние величины M набухания клеток эндотелия

в калиевой среде могут служить показателями способности клеток к восстановлению электрогенного транспорта и давать информацию для прогноза функциональности трансплантата.

Таблица 1. Влияние времени консервации на набухание клеток эндотелия роговицы в среде с концентрацией ионов калия 100 мМ

Выборка	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>SEM</i>	<i>n</i>	<i>N</i>	% ($Q \geq 1$)
4 дня						
1	1.055	0.021	0.002	166	167	99.4
2	1.071	0.023	0.002	155	160	96.9
3	1.045	0.020	0.002	155	169	91.7
4	1.050	0.017	0.001	197	198	99.5
5	1.062	0.039	0.002	253	288	87.8
Объединенная выборка	1.055	0.028	0.001	926	982	94.3
10 дней						
1	1.017	0.007	0.001	11	34	32.4
2	1.021	0.010	0.001	56	75	74.7
3	1.015	0.006	0.001	36	57	63.2
4	1.020	0.011	0.001	45	78	57.7
5	1.018	0.011	0.002	21	49	42.9
6	1.023	0.013	0.002	23	45	51.1
Объединенная выборка	1.014	0.010	0.001	192	338	56.8

В таблице: *N* – количество клеток в рассматриваемой выборке; *n* – количество клеток в выборке с $Q \geq 1$; ($Q \geq 1$) – процент клеток в выборке с $Q \geq 1$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При хирургическом лечении роговицы методом кератопластики серьезной проблемой является риск дисфункции трансплантата, связанный с недостаточной интенсивностью процессов активного транспорта в клетках эндотелия роговицы. Активный электрогенный транспорт определяет способность эндотелия регулировать осмотический баланс матрикса [2]. Поддержание клеточного объема у теплокровных животных осуществляется исключительно регуляцией потоков через плазматическую мембрану неорганических ионов и низкомолекулярных органических осмолитов и зависит от активного электрогенного транспорта в клетках [13, 14]. Основным источником энергии для транспорта ионов

через плазматическую мембрану является Na/K-АТФаза, она создает градиент электрохимического потенциала для ионов натрия, что является вторичным источником энергии для многих транспортных процессов в клетке. Разность электрических потенциалов на плазматической мембране клетки зависит от соотношения активности Na/K-АТФазы и проницаемости мембраны для ионов натрия и калия [12]. Можно думать, что эти параметры в значительной мере определяют и насосную функцию клеток в эндотелии роговицы. Таким образом, способность клетки эндотелия формировать трансмембранный градиент электрического потенциала необходима для ее возможности осуществлять насосную функцию эндотелия в целом. При резком повышении концентрации ионов калия в среде формируется новый электрохимический градиент. Возникший градиент создает движущую силу для потока ионов калия в клетку, что вызывает увеличение клеточного объема в результате поступления воды, в том числе в составе гидратной оболочки ионов. Поток ионов калия в клетку приводит к деполяризации плазматической мембраны. Возникающее при этом набухание клетки вызывает реакцию регуляторного снижения клеточного объема. Повышение клеточного объема можно регистрировать фотометрически, поскольку при этом повышается яркость флуоресценции кальцеина, находящегося в клетке. Таким образом, возможно проведение исследования динамики объема клеток эндотелия роговицы при деполяризации ионами калия, что позволит получать информацию об исходном уровне поляризации плазматической мембраны и служить индикатором активности электрогенного транспорта.

Анализируя результаты настоящего исследования, можно предположить, что увеличение срока холодовой консервации приводит к снижению как доли клеток, отвечающих критерию возникновения электрической поляризации в нормальных условиях, так и к снижению величины коэффициента набухания клеток при воздействии среды с повышенной концентрацией калия. Полученные результаты ставят вопрос о том, какие изменения в молекулярных механизмах, определяющих поляризацию плазматической мембраны клеток эндотелия роговицы, происходят в процессе консервации при пониженной температуре. В регуляции баланса электролитов и разности электрических потенциалов на плазматической мембране и клеточного объема участвуют характерные для каждого типа клеток каналы и транспортеры основных ионных осмолитов, находящиеся в плазматической мембране [6, 15]. Множественность параллельных путей переноса ионов через клеточную мембрану делает изучение механизма клеточного транспорта в каждом конкретном типе клеток самостоятельной задачей. В процессе консервации снижается не только степень набухания в калиевой среде, что, по-видимому, отражает постепенную потерю клетками способности к восстановлению поляризации плазматической мембраны. При этом также возрастает доля деполяризованных клеток с $Q < 1$, что может указывать на существование полиморфизма клеточных структур, определяющих электрогенную активность в этих клетках. Это ставит вопрос о значении функционального полиморфизма клеток, о значимости вклада клеток с разной выраженностью реакции на калиевую среду в транспортной функции эндотелия. Реакция повышения объема в калиевой среде отсутствует у деполяризованных клеток, что означает отсутствие потока ионов калия в клетку. Снижение интенсивности флуоресценции связано, по-видимому, с повышенной проницаемостью плазматической мембраны и выходом красителя наряду с другими органическими анионами. Клетки с реакцией этого типа, хотя и сохраняют форму, и, следовательно, не имеют разрыва плазматической мембраны, быстро приходят в осмотическое равновесие со средой, что указывает на высокую неселективную проницаемость для воды и ионов.

Результаты проведенного исследования указывают на то, что коэффициент набухания клеток эндотелия в среде с высокой концентрацией калия может служить показателем способности клеток к восстановлению электрогенного транспорта. Делается заключение, что исследование изменения объема клеток эндотелия роговицы в среде с повышенной концентрацией ионов калия является перспективным для прогноза функциональности трансплантата.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е. И. С., И. А. И.), сбор данных (Г. С. Б., Л. Е. К., Е. И. С.), обработка данных (М. М. Т., Г. С. Б., Л. Е. К., А. И. С., Е. И. С.), обсуждение и редактирование манускрипта (Г. С. Б., Л. Е. К., Е. И. С., А. И. С., И. Г. П., И. А. И.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета программы фундаментальных научных исследований СО РАН, проекты № FWNF-2022-0010 и FWNR-2022-0019, а также при частичной поддержке в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 124041900016–2). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maurice DM (1972) The location of the fluid pump in the cornea. *J Physiol* 221: 43–54. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1972.sp009737>
2. Bonanno JA (2012) Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp Eye Res* 95: 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.06.004>
3. Klyce SD (2020) Endothelial pump and barrier function. *Exp Eye Res* 198: 108068. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108068>
4. Srinivas SP (2010) Dynamic regulation of barrier integrity of the corneal endothelium. *Optom Vis Sci* 87: E239–E254. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e3181d39464>
5. Verkman AS, Ruiz-Ederra J, Levin MH (2008) Functions of aquaporins in the eye. *Prog Retin Eye Res* 27: 420–433. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.04.001>
6. Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF (2009) Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev* 89: 193–277. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2007>
7. Wehner F, Shimizu T, Sabirov R, Okada Y (2003) Hypertonic activation of a non-selective cation conductance in HeLa cells and its contribution to cell volume regulation. *FEBS Lett* 551: 20–24. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00868-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00868-8)
8. Hoffmann EK (2011) Ion channels involved in cell volume regulation: effects on migration, proliferation, and programmed cell death in non adherent EAT cells and adherent ELA cells. *Cell Physiol Biochem* 28: 1061–1078. <https://doi.org/10.1159/000335843>
9. Борзенко СА, Малюгин БЭ, Гаврилова НА, Комах ЮА, Тонаева ХД (2018) Алгоритм заготовки трупных роговиц человека для трансплантации: Методические рекомендации. Москва. Офтальмология. [Borzenok SA, Maljugin BJ, Gavrilova NA, Komah JA, Tonaeva HD (2018) Algorithm for harvesting cadaveric human corneas for transplantation: Guidelines. *M. Oftalmologija*. (In Russ)].
10. Mori Y (2012) Mathematical properties of pump-leak models of cell volume control and electrolyte balance. *J Math Biol* 65: 875–918. <https://doi.org/10.1007/s00285-011-0483-8>
11. Solenov E, Watanabe H, Manley GT, Verkman AS (2004) 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* 286: C426–C432. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00298.2003>

12. Zarogiannis SG, Ilyaskin AV, Baturina GS, Katkova LE, Medvedev DA, Karpov DI, Ershov AP, Solenov EI (2013) Regulatory volume decrease of rat kidney principal cells after successive hypotonic shocks. *Math Biosci* 244: 176–187.
<https://doi.org/10.1016/j.mbs.2013.05.007>
13. O'Neill WC (1999) Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 276: C995–C1011.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.276.5.C995>
14. Strange K (2004) Cellular volume homeostasis. *Adv Physiol Educ* 28: 155–159.
<https://doi.org/10.1152/advan.00034.2004>
15. Jentsch TJ, Maritzen T, Zdebik AA (2005) Chloride channel diseases resulting from impaired transepithelial transport or vesicular function. *J Clin Invest* 115(8): 2039–2046.
<https://doi.org/10.1172/JCI25470>

Effect of preservation on Changes in the Volume of Corneal Endothelial Cells in an Environment with a High Concentration of Potassium

L. E. Katkova^a, G. S. Baturina^{a, b}, M. M. Teterin^c, A. I. Sakhanenko^d, I. G. Palchikova^{b, e},
I. A. Iskakov^f, and E. I. Solenov^{a, b, c, *}

^a*Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russia*

^b*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

^c*Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia*

^d*Sobolev Institute of Mathematics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russia*

^e*Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering of the Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

^f*Fedorov NMRC MNTK "Eye Microsurgery", Novosibirsk, Russia*

*e-mail: eugsol@bionet.nsc.ru

The experimental study of preservation length on the effect of high potassium concentration in the medium on the volume of human corneal endothelial cells was done. The results of the study of individual samples of fragments of donor material and the values calculated using joined data after hypothermic preservation for 4 and 10 days are presented. The increase of the time when cornea samples are kept in preservation medium (Eusol-C) at 4°C led to a decrease in the average value ($M \pm SEM$) of cell swelling indicator (N) in a potassium medium from 1.055 ± 0.001 ; $n = 982$ to 1.014 ± 0.001 ; $n = 338$; after 4 and 10 days, respectively. Student's- t test for independent samples showed a high degree of significance for the difference between these values ($p = 2E-76$). Identification of the proportion of cells capable to swell in a medium with a high content of potassium ions ($N > 1$), reflecting the electrogenic activity in these cells, showed a decrease of this indicator in the studied groups with increasing duration of preservation (94.3% and 56.8% after 4 and 10 days, respectively).

Based on the results of the study, it is suggested that the values of endothelial cells swelling in a potassium environment can serve as indicators of the cells' ability to restore electrogenic transport. It is concluded that the study of cell swelling in a medium with a high content of potassium ions can provide information for predicting the functionality of the graft.

Keywords: corneal endothelium, corneal transplantation, hypothermic preservation