

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА ДЛЯ ОЦЕНКИ ТРАНСПОРТНЫХ ФУНКЦИЙ ЖИВЫХ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ ГЛАЗА

Ирина Георгиевна Пальчикова

Конструкторско-технологический институт научного приборостроения Сибирского отделения Российской академии наук (КТИ НП СО РАН), 630058, Россия, г. Новосибирск, ул. Русская, д. 41, д.т.н., г.н.с., зав. лабораторией, тел. (383) 306-58-74, e-mail: palchikova@gmail.com

Елена Викторовна Карамшук

Конструкторско-технологический институт научного приборостроения Сибирского отделения Российской академии наук (КТИ НП СО РАН), 630058, Россия, г. Новосибирск, ул. Русская, д. 41, конструктор 1 кат., тел. (383) 306-58-66, e-mail: Elka-kti@yandex.ru

Евгений Сергеевич Смирнов

Конструкторско-технологический институт научного приборостроения Сибирского отделения Российской академии наук (КТИ НП СО РАН), 630058, Россия, г. Новосибирск, ул. Русская, д. 41, н.с., тел. (383) 306-62-20, e-mail: evgenii.s.smirnov@yandex.ru

Вячеслав Сергеевич Гляненько

Конструкторско-технологический институт научного приборостроения Сибирского отделения Российской академии наук (КТИ НП СО РАН), 630058, Россия, г. Новосибирск, ул. Русская, д. 41, вед. электроник, тел. (383) 306-62-12, e-mail: g1234516@yandex.ru

Евгений Иванович Соленов

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), 630090, Россия, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, д. 10/2, корп. 5, д. б. н., г.н.с., зав. лабораторией, тел. (383) 363-49-71, e-mail: eugsol@bionet.nsc.ru

Игорь Алексеевич Искаков

Новосибирский филиал ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, 630096, Россия, г. Новосибирск, ул. Колхидская, д. 10, д.м.н., врач-офтальмолог, зав. операционным блоком, тел. (383) 209-00-44, e-mail: i.iskakov@mntk.nsk.ru

В работе кратко сформулированы требования и дано описание экспериментальной установки, позволяющей проводить исследование динамики концентрации внутриклеточного натрия в эндотелии роговицы глаза.

Ключевые слова: эндотелий роговицы, гипотермическая консервация, внутриклеточный натрий

EXPERIMENTAL SETUP FOR EVALUATING THE TRANSPORT FUNCTIONS OF LIVING CORNEAL ENDOTHELIAL CELLS

Irina G. Palchikova

Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering SB RAS, 41, Russkaya St., Novosibirsk, 630058, Russia, D.Sc. (Technology), Chief Researcher, Head of laboratory, phone: (383) 306-58-74, e-mail: palchikova@gmail.com

Elena V. Karamshuk

Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering SB RAS, 41, Russkaya St., Novosibirsk, 630058, Russia, Designer, phone: (383) 306-58-66, e-mail: Elka-kti@yandex.ru

Evgenii S. Smirnov

Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering SB RAS, 41, Russkaya St., Novosibirsk, 630058, Russia, Researcher, phone: (383) 306-62-20, e-mail: evgenii.s.smirnov@yandex.ru

Viacheslav S. Glianenko

Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering SB RAS, 41, Russkaya St., Novosibirsk, 630058, Russia, Leading electronic, phone: (383) 306-62-12, e-mail: g1234516@yandex.ru

Evgeny I. Solenov

Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 10, Ac. Lavrentieva ave., Novosibirsk, 630090, Russia, D.Sc. (Biology), Chief Researcher, Head of laboratory, phone: (383) 363-49-71, e-mail: eugsol@bionet.nsc.ru

Igor A. Iskakov

S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Novosibirsk branch, 10, Kolhidskaya St., Novosibirsk, 630096, Russia, D.Sc. (Medicine), ophthalmologist, Operating Room Manager, phone: (383) 209-00-44, e-mail: i.iskakov@mntk.nsk.ru

The paper summarizes the requirements and describes an experimental setup that allows us to study the dynamics of the concentration of intracellular sodium in the endothelium of the cornea.

Keywords: corneal endothelium, hypothermic preservation, intracellular sodium

Введение

Эндотелий представляет собой сплошной клеточный слой, целостность которого необходима для его функционирования как насоса, регулирующего осмотический баланс матрикса роговицы глаза. В этой связи, одним из основных критериев пригодности препарата роговицы (после гипотермической консервации) для трансплантации является плотность клеток эндотелия, которая снижается с возрастом донора. Обычный метод [1] оценки жизнеспособности эндотелия заключается в прямом наблюдении его под оптическим микроскопом и подсчете количества клеток на мм^2 . Однако, осмотический баланс матрикса роговицы определяется прежде всего интенсивностью транспорта осмолитов и воды клетками ее эндотелия. Снижение транспортной функции этих клеток приводит к снижению прозрачности и отеку роговицы. В то же время, не существует общепринятого метода прямой оценки транспортной функции эндотелия и направленного во внутриглазную жидкость транспорта воды и ионов. В механизме трансэпителиального переноса ионов и воды основным источником энергии для векторного транспорта является Na/K-АТФазы, создавая наряду с другим электрогенным транспортером NBCe1-A градиент электрохимического потенциала натрия на плазматической мембране этих клеток, что является вторичным источником энергии для выполнения этими клетками функции «насоса». В этой связи [2] естественно рассматривать концентрацию внутриклеточного натрия как индикатор способности клетки выполнять транспортную функцию.

В работах [3-5] экспериментально доказано, что исследование динамики объема клеток эндотелия и содержания натрия в эндотелиальных клетках при холодной консервации позволяет повысить качество оценки жизнеспособности консервированной роговицы. В [3-5] предложен и апробирован протокол определения концентрации натрия в клетках $[Na^+]_i$ флуориметрическим методом с помощью флуоресцентного красителя SodiumGreen (MolecularProbes, США) для натрия. Исследуемый препарат эндотелия роговой оболочки глаза подготавливается согласно методике, подробно описанной в [3]. Стекла с клетками помещаются в микрофлюидную камеру флуоресцентного микроскопа Observer-Z1 (объектив Fluor 20x/0.75 M27, Zeiss, Germany) с контролируемой температурой. Флуоресцентные изображения клеток регистрируются ПЗС камерой с дигитализацией 12 бит в режиме линейного преобразования падающей интенсивности, используя набор фильтров и дихроическое зеркало №009 (Zeiss, Germany). Интегральная интенсивность флуоресценции каждой клетки пропорциональна внутриклеточной концентрации натрия.

Схема протокола измерения концентрации внутриклеточного натрия приведена на рис. 1.

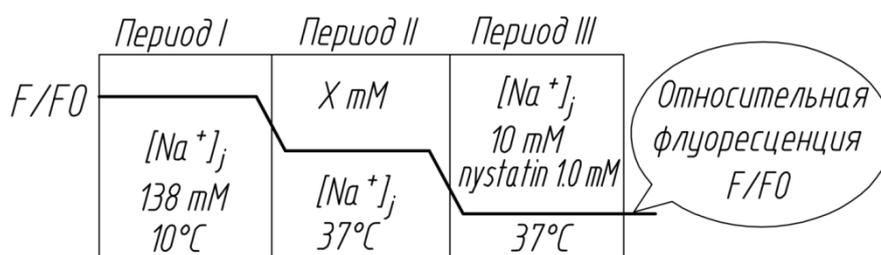


Рис. 1. Схема протокола измерений

Кривая интенсивности флуоресценции имеет три характерных стационарных участка, на которых интенсивность флуоресценции практически сохраняется, что происходит вследствие стабилизации внутриклеточной концентрации натрия в эти периоды. При температуре 10°C (Период I) активность Na/K-АТФазы 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 величинам внутриклеточной концентрации натрия, которая устанавливается в клетке в результате баланса входа натрия в клетку через транспортеры плазматической мембраны и выхода определяемого активностью Na/K-АТФазы.

Для выполнения протокола экспериментальная установка должна обеспечить смену растворов в микрофлюидной камере, контроль температуры среды и роговицы, возбуждение флуоресценции и измерение ее интегральной интенсивности. Ниже приводится описание разработанной экспериментальной специализированной установки (Пост контроля роговицы 3151 – Пост КР 3151) и микрофлюидных камер для определения функциональности препарата роговицы согласно разработанному протоколу.

Техническое решение

Пост КР 3151 представляет собой термостатированную микрофлюидную камеру, два шприцевых насоса и массивный дюралюминиевый корпус 560 x 360 x 216 мм, в котором размещены оптоэлектронные компоненты. Блок-схема экспериментальной установки показана на рис. 2.

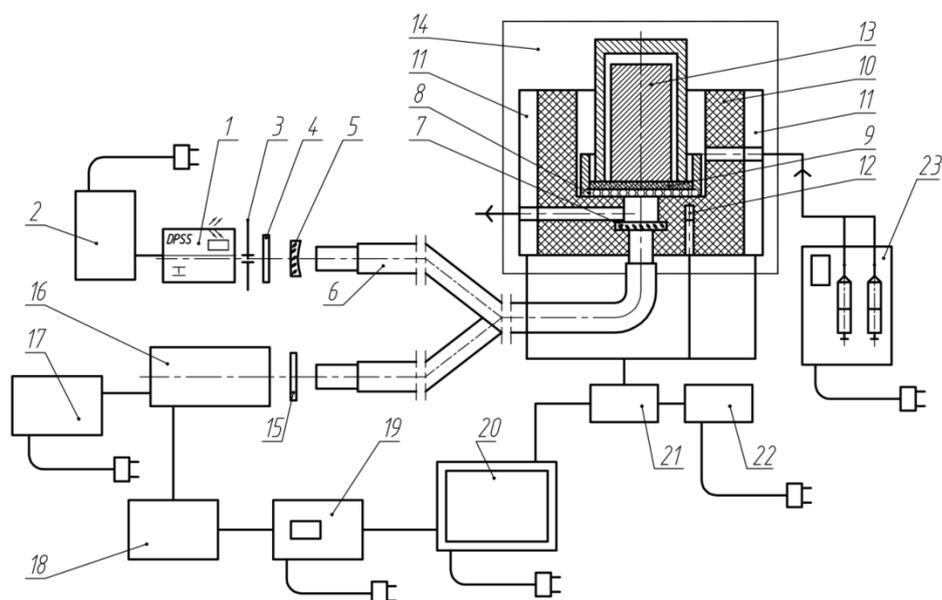


Рис. 2. Блок-схема установки Пост КР 3151:

1 – излучатель лазера BWB-10-OEM (B&W Tek Inc., Newark, DE, USA); 2 – блок питания лазера; 3 – диафрагма; 4 – поляририд; 5 – согласующая линза; 6 – световод–волоконно-оптический ответвитель; 7 – покровное стекло; 8 – сетка; 9 – роговица; 10 – корпус кюветы; 11 – элемент Пельтье; 12 – датчик температуры; 13 – грузик; 14 – термостатированная микрофлюидная камера; 15 – обрезаящий светофильтр EP-3; 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

На передней панели устройства расположены плата контроллера температуры, светодиоды и блок питания контроллера. На правой боковой панели управления находятся две розетки питания шприцевых насосов Perfusor compact S, се-

тевой разъем 703W-00/04 для питания внутренних элементов, розетка DB9 под модуль RS232, 3 клавишных переключателя и выходная панель осциллографа.

Внутри корпуса помещаются твердотельный лазер с диодной накачкой модели BWB-10-OEM (B&W Tek Inc., Newark, DE, USA) с максимумом излучения на длине волны $\lambda = 477$ нм блоком питания, фотоэлектронный умножитель ФЭУ-55 с блоком питания и усилителем, осциллограф INSTRUSTAR ISDS 205 (Electronic Technology Co., Ltd. China), DIN-рейка длиной 15 см с 7 клеммниками и розеткой M1173 (см. рис. 3). Перфорированные боковые панели позволяют избежать перегрева расположенных внутри приборов. Схема монтажа электрических соединений позволяет при необходимости произвести наладку прибора при снятых боковых панелях, не разбирая всего корпуса.

Лазерный пучок с длиной волны 477 нм ограничивается диафрагмой до диаметра 1 мм и его интенсивность регулируется поляридом, расположенными в герметичной насадке, на которую навинчивается фланец крепления световода. Для формирования нужной конфигурации лазерного пучка предусмотрен наклон крепления фланца световода в 0° ; $1,5^\circ$; 3° ; $4,5^\circ$ и 6° .

На столешнице сверху корпуса устанавливаются два шприцевых насоса и микрофлюидная камера. С нижней стороны столешницы размещена переходная плата, на которую приходят кабели датчика температуры, элементов Пельтье и вентиляторов. Конструктивно камера термостатированная микрофлюидная КПБМ.3151.01 состоит из массивного металлического корпуса из дюралюминия, к которому крепятся два элемента Пельтье с радиаторами и вентиляторами. В качестве термоизолятора использована пластина из оргстекла толщиной 2 мм, а также крышка и два изолятора из оргстекла. К кювете подводятся через патрубки две трубки от шприцевых насосов. По одной трубке подается краситель, по другой – рабочий раствор (по протоколу).



Рис. 3. Вид на внутренний объем корпуса

Жидкости подаются во внутреннюю полость кюветы диаметром 16,5 мм и глубиной 26 мм. Оработанная жидкость стекает по выводному патрубку.

Внутренняя полость кюветы ограничена снизу герметично приклеенным защитным стеклом толщиной 1 мм. При помощи оригинального крепежного фланца световод крепится ниже защитного стекла. Световод имеет две ветви с торцами диаметром 4 мм. Входной торец световода закреплен на лазере и, соответственно, выходной торец закреплен на ФЭУ. Объединенный общий торец световода диаметром 6 мм закреплен на кювете.

Внешний вид кюветы представлен на рис. 4. Через боковые поверхности кюветы происходит нагрев-охлаждение в пределах от +15°C до +40°C с помощью элементов Пельтье, радиаторов и вентиляторов.

Исследуемый препарат роговицы помещается на нейлоновую сетку, закрепленную между кольцами из нержавеющей стали. Внутреннее кольцо навинчивается на полую гильзу. Внутри гильзы свободно перемещается грузик диаметром 7,5 мм и высотой 25 мм из нержавеющей стали. Грузик равномерно прижимает роговицу к сетке, не давая ей сместиться (см. рис. 5). Гильза с роговицей помещается во внутреннюю полость камеры, краситель и растворы смачивают роговицу сквозь сетку. Сверху камера закрывается крышкой из оргстекла, которая фиксируется двумя винтами. Крышка также выполняет функцию термоизолятора.

На уровне роговицы на расстоянии 3 мм от внутренней полости камеры располагается датчик температуры, который подает сигнал на плату контроллера, расположенную на передней панели.

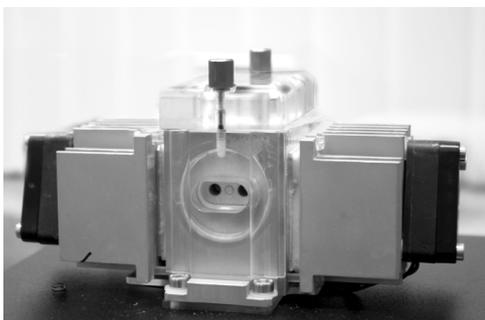


Рис. 4. Внешний вид термостатированной микрофлюидной камеры

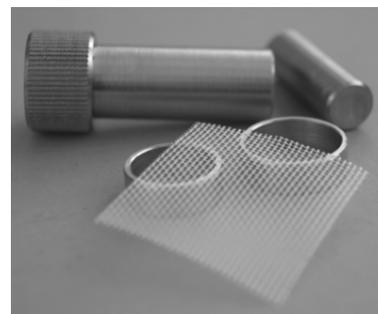


Рис. 5. Гильза, грузик, сетка и кольца

Элементы Пельтье находятся по бокам корпуса микрофлюидной камеры на расстоянии 11 мм от внутренней полости и крепятся на термопасту. Для отвода тепла к элементам Пельтье крепятся алюминиевые радиаторы с вентиляторами 40 x 40 x 10 мм.

Узел ФЭУ КПБМ.3151.03 представляет собой плиту с крепежными кронштейнами. Непосредственно к ФЭУ подводится световод с крепежным фланцем, в который вклеен светофильтр EP-3 (Korea, Democratic People's Republic) с полосой поглощения 190-540 нм для фильтрации рассеянного излучения лазера.

Заключение

Испытания оптоэлектронных компонентов и разработанных электронных устройств в специализированной установке подтвердили ее работоспособность в экспериментах с фантомом препарата роговицы.

В настоящее время Пост КР 3151 передан в ИЦиГ СОРАН для апробации и отработки методики измерения внутриклеточной концентрации натрия с помощью внутриклеточного флуоресцентного зонда Sodium Green для натрия (Mol Probes, USA) с различными культуральными средами и средствами воздействия на клетки.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант №19-08-00874а.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. 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. – 79 (1). P. 37–41. – DOI: 10.5935/0004-2749.20160011.
2. Батурина Г. С., Каткова Л. Е., Соленов Е. В., Исаков И. А. Восстановление функции эндотелия роговицы глаза (обзор литературы) // *Сибирский научный медицинский журнал.* – 2019. – Т. 39, № 3. – С. 28–33. – DOI: 10.15372/SSMJ20190304
3. Батурина Г. С., Пальчикова И. Г., Конев А. А., Смирнов Е. С., Каткова Л. Е., Соленов Е. И., Исаков И. А. Исследование влияния гипо термической консервации на уровень натрия в клетках эндотелия трансплантата роговицы // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* – 2018. – Т. 22, № 4. – С. 433–437. – DOI: 10.18699/VJ18.379.
4. Новые подходы к исследованию функциональной активности клеток эндотелия препаратов роговицы глаза [Электронный ресурс] / Батурина Г. С., Каткова Л. Е., Пальчикова И. Г., Соленов Е. И., Исаков И. А. // *Современные технологии в офтальмологии.* – 2019. – № 5. – С. 262–265. – URL: <https://eyepress.ru/article.aspx?41040> (дата обращения 06.12.2019). – DOI: <https://doi.org/10.25276/2312-4911-2019-5-262-265>.
5. 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. – Т. 16, № 2. – С. 584–587.

© И. Г. Пальчикова, Е. В. Карамшук, Е. С. Смирнов,
В. С. Глянченко, Е. И. Соленов, И. А. Исаков, 2021