



Исследование влияния гипотермической консервации на уровень натрия в клетках эндотелия трансплантата роговицы

Г.С. Батурина¹, И.Г. Пальчикова², А.А. Конев², Е.С. Смирнов², Л.Е. Каткова¹, Е.И. Соленов^{1, 3, 4}, И.А. Исаков⁵

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

² Конструкторско-технологический институт научного приборостроения Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия

⁵ Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова Минздрава России, Новосибирский филиал, Новосибирск, Россия

Транспорт воды и ионов клетками эндотелия роговицы определяет ее жизнеспособность и оптические свойства. Исследовали влияние гипотермической консервации роговицы глаза на концентрацию натрия в клетках эндотелия роговицы. С этой целью определяли внутриклеточную концентрацию натрия в клетках эндотелия роговицы глаза свиньи после гипотермической консервации при 4 °С в течение 1 и 10 суток и трансплантатов роговицы человека после 10 суток консервации. Концентрацию внутриклеточного натрия определяли флуориметрическим методом с помощью флуоресцентного красителя SodiumGreen в препаратах клеток эндотелия. Анализ флуоресцентных изображений клеток проводили с применением оригинальной программы CytoDynamics. Расчет концентраций натрия в клетках эндотелия роговицы свиньи выявил значительное повышение уровня внутриклеточного натрия после гипотермической консервации. Показано статистически значимое снижение проницаемости для натрия плазматических мембран клеток эндотелия после консервации. Уровень внутриклеточного натрия в клетках эндотелия препаратов роговицы человека после гипотермической консервации был выше, чем в аналогичных образцах эндотелия роговицы свиньи. Концентрация внутриклеточного натрия – перспективный интегральный показатель функциональной компетентности клеток эндотелия исследуемого образца роговицы.

Ключевые слова: гипотермическая консервация; трансплантат роговицы глаза; внутриклеточный натрий; эндотелий роговицы глаза.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Батурина Г.С., Пальчикова И.Г., Конев А.А., Смирнов Е.С., Каткова Л.Е., Соленов Е.И., Исаков И.А. Исследование влияния гипотермической консервации на уровень натрия в клетках эндотелия трансплантата роговицы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):433-437. DOI 10.18699/VJ18.379

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Baturina G.S., Palchikova I.G., Konev A.A., Smirnov E.S., Katkova L.E., Solenov E.I., Isakov I.A. Study of the effect of hypothermic conservation on the intracellular sodium concentration in the endothelium of corneal transplants. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):433-437. DOI 10.18699/VJ18.379 (in Russian)

Received 17.11.2017

Accepted for publication 12.02.2018

© AUTHORS, 2018

Study of the effect of hypothermic conservation on the intracellular sodium concentration in the endothelium of corneal transplants

G.S. Baturina¹, I.G. Palchikova², A.A. Konev², E.S. Smirnov², L.E. Katkova¹, E.I. Solenov^{1, 3, 4}, I.A. Isakov⁵

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia

⁵ S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Novosibirsk Branch, Novosibirsk, Russia

Endothelial keratoplasty has become the treatment of choice for corneal endothelial dysfunction. Advancements in the surgical treatment of corneal endothelial diseases depend on progress in graft conservation and its related advantages in assessing the suitability of grafts for transplantation. Transport of water and ions by cornea endothelium is important for the optic properties of cornea. In this work, we study the intracellular sodium concentration in cornea endothelial cells in samples of pig cornea that underwent hypothermic conservation for 1 and 10 days and endothelial cells of human cornea grafts after 10-day conservation. The concentration of intracellular sodium in preparations of endothelial cells was assayed using fluorescent dye SodiumGreen. The fluorescent images were analyzed with the custom-made computer program CytoDynamics. An increased level of intracellular sodium was shown in the endothelium after 10-day conservation in comparison with one-day conservation (pig samples). Sodium permeability of pig endothelial cell plasma membranes significantly decreased in these samples. Assessment of intracellular sodium in human cornea endothelium showed a higher level – as was in analogues pig samples of the corneal endothelium. The assay of the intracellular sodium balance concentration established in endothelial cells after hypothermic conservation in mediums L-15 and Optisol-GS showed a significant advantage of specialized medium Optisol-GS. The balanced intracellular concentration after 10 days of hypothermic conservation was significantly lower in cells incubated at 4 °C in Optisol-GS ($L-15, 128 \pm 14, n = 15$; Optisol-GS, $108 \pm 14, n = 11$; mM, $p < 0.001$). Intracellular sodium concentration could be a useful parameter for assessing cornea endothelium cell viability.

Key words: hypothermic conservation; corneal transplants; intracellular sodium; corneal endothelium.

Одна из проблем кератопластики – предупреждение отека трансплантата. Эффективность восстановления роговичного трансплантата зависит от интенсивности транспорта электролитов и воды через эндотелий роговицы, важной функцией которого является поддержание осмотического равновесия роговицы. Успешность сквозной кератопластики во многом зависит от функционального состояния эндотелия. Нарушение этого клеточного слоя ведет к болезни трансплантата. Эндотелий представляет собой клеточный монослой, целостность которого необходима для его функционирования как насоса, регулирующего осмотический баланс матрикса роговицы. Водно-электролитное равновесие матрикса роговицы определяется интенсивностью транспорта осмолитов и воды клетками роговичного эндотелия. Снижение транспорта воды и ионов этими клетками приводит к отеку роговицы и снижению ее прозрачности. Определение жизнеспособных эндотелиальных клеток с применением красителя трепановый синий с помощью теста на фрагментацию ДНК (TUNEL assay) не позволяет оценивать состояние собственно транспортных механизмов клеток эндотелия. В то же время не существует общепринятого метода прямой оценки транспортной функции эндотелия и направленного в переднюю камеру глаза потока воды и ионов (Bonanno, 2012; Schmedt et al., 2012). В молекулярный механизм этого транспорта на базальной, обращенной к матриксу роговицы, поверхности эндотелия входят: Na/K-АТФаза, электрогенный натрий-бикарбонат котранспортер ($1\text{Na}^+ : 2\text{HCO}_3^-$, *SLC4A4*, NBCe1), $\text{Na}^+ : \text{K}^+ : 2\text{Cl}^-$ (NKCC), ионообменники: хлорид-бикарбонат ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, *SLC4A2*, AE2) и натрий-протонный (Na^+/H^+ , *SLC9A6*, NHE1) (Riley et al., 1995; Kuang et al., 2004). На апикальной поверхности идентифицированы хлоридные каналы CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) и CaCC (Calcium activated Chloride Channel (CLCA1)), которые, по-видимому, не вносят значительного вклада в общий транспорт и активируются только в стрессовых ситуациях (Bonanno, 2003). Каналы проницаемы и для бикарбонат иона как $4/1 \text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. В эндотелиальных клетках роговицы отмечают высокую плотность митохондрий. Производимый ими АТФ служит не только субстратом для Na/K-АТФазы, но и сигнальным фактором, как и внутриклеточный кальций, через пуриnergические рецепторы способен повышать проводимость апикальной поверхности для HCO_3^- , активируя CaCC (Bonanno, 1999). В механизме трансэпителиального переноса ионов и воды основным источником энергии для векторного транспорта является Na/K-АТФаза. Наряду с другим электрогенным транспортером, NBCe1, Na/K-АТФаза создает градиент электрохимического потенциала натрия на плазматической мембране эндотелиальных клеток, что служит вторичным источником энергии для выполнения этими клетками функции «насоса». Таким образом, естественно рассматривать концентрацию внутриклеточного натрия как результат баланса активности натрий-калиевого насоса и потоков через каналы и ионообменники плазматической мембраны клетки.

В настоящей работе проведено исследование влияния гипотермической инкубации на равновесную концентрацию внутриклеточного натрия в клетках эндотелия

роговицы, устанавливающуюся в клетках после прекращения консервации, и зависимости этого параметра от среды, в которой ткань роговицы сохранялась в условиях гипотермии.

Материалы и методы

Культура клеток и микроскопия. Исследовали влияние гипотермической консервации роговицы свиньи и человека на способность эндотелиоцитов восстанавливать внутриклеточную концентрацию натрия ($[\text{Na}^+]_i$) после прекращения гипотермии. Фрагменты роговицы человека в виде трепанированных дисков получали в процессе выполнения сквозной кератопластики у пациентов с кератоконусом. Препараты роговицы свиньи помещали в чашки Петри, заполненные культуральной средой L-15 Leibovitz (Sigma, США). Препараты роговицы человека инкубировали в среде L-15 и Optisol-GS. Препараты роговицы свиньи – в течение 1 и 10 суток, человека – 10 суток инкубировали при 4°C . Переживающую культуру клеток эндотелия роговицы получали переносом клеток на покровное стекло. С этой целью фрагмент роговицы инкубировали в растворе коллагеназы (1 мг/мл Collagenase, Sigma (США) в PBS при 37°C , 30 мин), затем делали отпечаток эндотелия на покровное стекло, покрытое полилизинном (Poly-L-lysine solution 0.1 % (w/v) H_2O , Sigma, США). Таким методом получали препарат клеток эндотелия, обращенных базальной стороной в сторону омывающего раствора. Экспериментальная установка представляла собой проточную камеру, разработанную для использования с флуоресцентным микроскопом Observer-Z1 (объектив Fluor $20\times/0.75$ 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 $36.8\pm 0.2^\circ\text{C}$. Флуоресцентные изображения клеток записывали с помощью камеры AxioCam HSm, используя набор фильтров и дихроическое зеркало #009 (Zeiss, Германия). Регистрацию изображений производили с помощью монохромной ПЗС-камеры AxioCam HSm (Zeiss, Германия) с интервалом 30 с на протяжении всего эксперимента при низкой интенсивности возбуждающего света, что позволяло избежать выгорания флуорофора во время эксперимента. Серии цифровых изображений регистрировали с дигитализацией 12 бит в режиме линейного преобразования падающей интенсивности и сохраняли на компьютере в формате <.tif>. Измерения интенсивности флуоресценции проводили с помощью аналитической программы CytoDynamics с записью результатов измерения динамики интенсивностей индивидуальных клеток в формате таблиц Excel.

Измерение концентрации внутриклеточного натрия. Концентрацию натрия в клетках $[\text{Na}^+]_i$ определяли флуориметрическим методом с помощью флуоресцентного красителя SodiumGreen (MolecularProbes, США) согласно протоколу (Solenov, 2008). Сигнал калибровали, помещая клетки в фосфатный солевой буфер (PBS) с различной концентрацией Na^+ (138 и 10 мМ в присутствии 10^{-4} М Na^+ ионофора Nystatin (AppliChem, Германия)). Гипонатриевый раствор (10 мМ NaCl) готовили на основе изотонического PBS, в котором часть натрия замещали

на *n*-methyl-D-glucamine (NMDG) (ICN Biomedicals, США). Для измерения покровное стекло с клетками эндотелия перенесли в раствор PBS (138 мМ NaCl, 4.7 мМ Na₂HPO₄, 2.7 мМ KCl, 1.5 мМ KH₂PO₄, 0.5 мМ MgCl₂, 5.5 мМ глюкоза, 0.1 мМ CaCl₂). Клетки загружали флуоресцентным красителем Sodium Green TA (10⁻⁵ М, 40 мин 37 °С, Molecular Probes, США). Стекля с клетками помещали в камеру флуоресцентного микроскопа. В ходе эксперимента клетки первые 10 мин (период I) находились при температуре 10 °С, затем 10 мин – при 37 °С (период II) и последующие 10 мин (период III) – в среде PBS, содержащей 10 мМ Na⁺, а часть натрия была замещена органическим катионом (10 мМ натрия, 128 мМ NMDG) при температуре 37 °С и 10 мин в присутствии 100 ед./мл нистатина (Sigma, США). Для оценки проницаемости плазматической мембраны для ионов натрия создавали ступенчатый градиент сменой среды, содержащей 138 и 10 мМ натрия. Экспериментальные записи изменения флуоресценции нормировали по амплитуде и определяли скорость изменения как внутриклеточного натрия, так и клеточного объема, находили коэффициент линейной регрессии начального участка кривой флуоресценции, как это описано нами ранее (Шуаскин et al., 2014).

Анализ экспериментальных данных по динамике внутриклеточной концентрации натрия с целью получения количественных оценок проницаемости мембраны клеток для ионов натрия производили с помощью математической модели главных клеток собирательных трубок почки, разработанной нами ранее (Иляскин и др., 2011). Исходя из средних значений интенсивности флуоресценции на стационарных участках профиля, соответствующих внутриклеточной концентрации натрия, равной 138 мМ при температуре 10 °С и 10 мМ в присутствии 100 ед./мл нистатина, рассчитывали стационарную концентрацию натрия в клетках при 37 °С.

Анализ микроизображений с помощью программы CytoDynamics. Для реализации компьютерной флуориметрии нами был разработан специализированный программный пакет CytoDynamics (№ государствен-



Fig. 1. Processed digital image of the preparation with outlined areas of interest.

ции 2016612766). Для математической обработки берутся файлы, получаемые непосредственно с камеры, пакет CytoDynamics определяет контуры групп и индивидуальных клеток (области интереса (ОИ)) на начальном кадре серии и удерживает контур изображения на последующих во времени снимках (рис. 1). На изображении каждой ОИ программа определяет периметр, площадь и интегральную интенсивность флуоресценции, которая пропорциональна внутриклеточной концентрации натрия (Winslow et al., 2002; Конев, Пальчикова, 2015; Пальчикова и др., 2015). Осреднение интенсивности выполняется по всем изображениям одного кадра.

Статистика. Для интенсивности флуоресценции рассчитывали среднее значение, дисперсию и стандартную ошибку среднего. Для профилей, построенных на основании средних значений флуоресценции, в каждой точке рассчитывали среднее значение и стандартную ошибку среднего ($M \pm SD$). Достоверности различий определяли с применением пакета ANOVA и *t*-критерия.

Результаты

На рис. 2 приведены профили средней интегральной интенсивности флуоресценции клеток эндотелия роговицы свиньи.

В эксперименте по изучению эффекта гипотермической консервации на баланс натрия в клетках эндотелия роговицы свиньи кривая интенсивности флуоресценции имеет три характерных квазистационарных участка, на которых интенсивность флуоресценции изменяется незначительно. Это отражает стабилизацию внутриклеточной концентрации натрия в эти интервалы. Интенсивность флуоресценции в периоде II соответствует величинам равновесной внутриклеточной концентрации натрия, которая устанавливается в клетке после входа натрия через транспортеры плазматической мембраны и выхода, определяемого активностью Na/K-АТФазы. При температуре 10 °С активность Na/K-АТФазы подавлена, и в клетках устанавливается концентрация натрия, равновесная со средой (138 мМ), при повышении температуры до 37 °С в результате активации натрий-калиевого насоса устанавливается более низкая равновесная концентрация внутриклеточного натрия, которая зависит от времени консервации (1 сутки: 27.3 ± 1.9 мМ, $n = 110$; 10 суток: 69.2 ± 4.7 мМ, $n = 70$). В третьей фазе эксперимента в присутствии ионофора в клетке устанавливается концентрация натрия, соответствующая его концентрации в калибровочном растворе (10 мМ). Из анализа результатов измерений

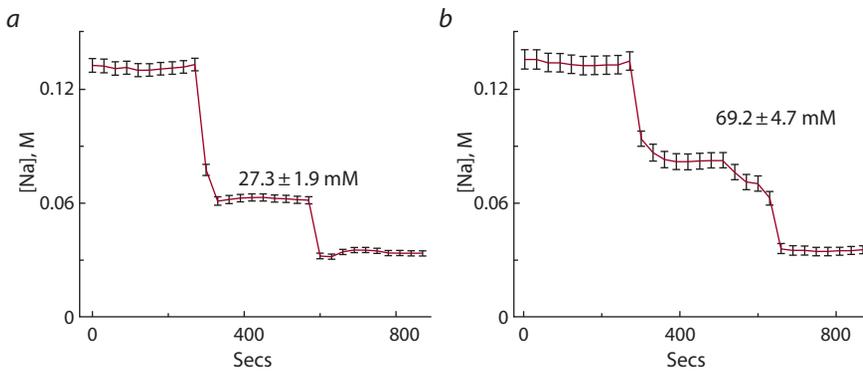


Fig. 2. Sodium Green fluorescence profiles in endothelial cells of porcine cornea after incubation at 4 °C for (a) one day, (b) ten days.

Intracellular sodium concentration: (a) 27.3 ± 1.9 mM, $n = 110$; (b) 69.2 ± 4.7 mM, $n = 70$. The experimental design is described in Methods.

$[Na^+]_i$ следует, что в клетках, подвергавшихся гипотермической инкубации в течение 10 суток, происходит значительное повышение $[Na^+]_i$ по сравнению с однодневной консервацией. Определение проницаемости плазматической мембраны клеток для натрия по скорости входа иона в экспериментах со ступенчатым градиентом этого иона в изотонической среде показывает, что гипотермическая консервация в течение 10 суток привела к снижению проницаемости плазматической мембраны клеток (одни сутки: 1.8 ± 0.021 , $n = 10$; 10 суток: $1.2 \pm 0.015 (\times 10^{-6})$ см/с, $n = 8$, $p < 0.01$) (рис. 3).

В этом протоколе проведен эксперимент по влиянию состава среды на баланс внутриклеточного натрия в клетках эндотелия роговицы человека после гипотермической консервации в средах L-15 и Optisol-GS. Для эксперимента каждый фрагмент роговицы был разделен на две части, и обе части подвергались гипотермии в соответствующих средах. Как показали измерения равновесной внутриклеточной концентрации натрия после 10-суточной инкубации при 4 °C, транспортная активность клеток эндотелия значительно лучше сохранилась в специализированной среде (128 ± 14 , $n = 15$; 108 ± 14 , $n = 11$; мМ, $p < 0.001$, L-15 и Optisol-GS соответственно). Ввиду малого количества материала проницаемость для натрия в эндотелии роговицы человека не определяли. В экспериментах с роговицей свиньи были установлены значения проницаемости для натрия и его равновесная концентрация в клетках после гипотермической консервации. Согласно полученным данным, гипотермическая консервация в среде L-15, которая была контролем по отношению к специализированной консервационной среде Optisol-GS, приводила к значительному повышению равновесной концентрации натрия. Можно предположить, что это обусловлено снижением транспортной активности Na/K-АТФазы.

Обсуждение

Клетки эндотелия роговицы формируют клеточный монослой, от целостности которого зависит способность эндотелия выполнять его транспортную функцию и, соответственно, регулировать осмотический баланс стромы роговицы. Так как клетки эндотелия остановлены в фазе клеточного цикла G1, они не проходят митотическое деление (Маускок, Marshall, 2014). С возрастом часть клеток гибнет и целостность клеточного слоя сохраняется за счет оставшихся живых клеток, которые также формируют сплошной клеточный слой, но с меньшим количеством клеток. В связи этим до настоящего времени одним из основных критериев функциональности эндотелия и пригодности препарата роговицы для трансплантации является плотность клеток эндотелия (ECD), которая снижается с возрастом донора (Vianna et al., 2016). В различных глазных банках приняты минимальные пороговые значения ECD: от 2500 до 2000 (мм⁻²). (Whitcher et al., 2001; Boynton, Woodward, 2014). Этот показатель дает принципиальное представление о пригодности роговицы для транспланта-

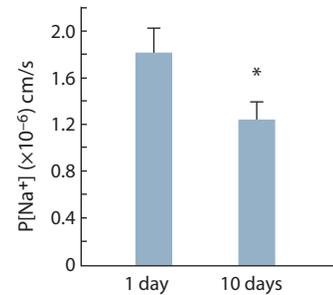


Fig. 3. Plasma membrane permeability to sodium in endothelial cells of porcine cornea after incubation at 4 °C: for one day, 1.8 ± 0.021 , $n = 10$; for ten days, $1.2 \pm 0.015 (\times 10^{-6})$ см/с, $n = 8$.

* $p < 0.01$. Y-Axis: permeability coefficient for sodium ($\times 10^{-6}$ см/с).

ции, но не позволяет оценивать функциональность эндотелия как регулятора осмотического баланса матрикса. В то же время возможность определения транспортного потенциала клеток эндотелия будет иметь значение как для установления пригодности транспланта после периода консервации, так и в исследовательских целях при изучении эффективности создаваемых рецептур новых сред для консервации. Предлагаемый в настоящей работе подход основан на анализе баланса потоков натрия индивидуальных клеток эндотелия. Трансмембранный электрохимический градиент натрия создается натрий-калиевой АТФазой и служит значимым вторичным источником энергии для транспортных процессов в клетке. Таким образом, поскольку внеклеточная концентрация натрия в организме – гомеостатическая величина, можно считать внутриклеточную активность ионов натрия адекватным показателем функциональной возможности транспортного механизма клетки.

Этот подход открывает возможность исследовать функциональное состояние транспортных систем клеток эндотелия роговицы при использовании незначительного количества исследуемой ткани. Принятое в настоящее время описание функции эндотелия посредством rmp-leak модели разделяет потоки активного и осмотического переноса. Поскольку интенсивность активных транспортных процессов в клетке определяется функцией Na/K-АТФазы, анализ ба-

ланса потоков натрия на уровне клетки может отражать «насосную» функцию эндотелия. Способность поддерживать градиент электрохимического потенциала натрия на плазматической мембране может служить достаточно надежным критерием функционального состояния транспортных систем клетки в целом.

Суммарные потоки натрия через плазматическую мембрану зависят от соотношения потоков натрия из клетки, что определяется активностью Na/K-АТФазы и поток натрия в клетку через транспортеры, находящиеся в мембране. Суммарная активность определяется проницаемостью мембраны для натрия (Bachmann et al., 1999; Féraille, Doucet, 2001; Solenov 2008). Повышение стационарной концентрации ионов натрия в клетках эндотелия указывает на повреждающее воздействие гипотермической консервации на транспортные механизмы. Это может объяснять высокие концентрации натрия в клетках эндотелия роговицы человека, обнаруженные нами. Поскольку в экспериментах гипотермическому воздействию подвергались препараты роговицы человека, страдавшего кератоконусом, их эндотелий исходно мог иметь сниженную функциональную активность, с чем и могут быть связаны более высокие уровни концентрации внутриклеточного натрия, выявленные в эндотелиоцитах роговицы человека. Относительно эффекта среды консервации, естественно предположить, что он связан с протекторным действием совокупности ее компонентов, повышающим сохранность и последующее восстановление активности транспортеров. Полученные результаты подтверждают исходное предположение о том, что степень восстановления транспортных функций в клетках эндотелия роговицы зависит от продолжительности гипотермического воздействия. Вопрос, в какой мере способность индивидуальных клеток эндотелия регулировать баланс внутриклеточного натрия связана с функцией регуляции осмотического баланса трансплантата, нуждается в дальнейшем изучении.

Важным выводом выполненного исследования является заключение о том, что концентрацию внутриклеточного натрия можно рассматривать как перспективный интегральный показатель функциональной компетентности клеток эндотелия исследуемого образца роговицы.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0016 and by the Russian Foundation for Basic Research, project 17-04-00328.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Bachmann S., Bostanjoglo M., Schmitt R., Ellison D.H. Sodium transport-related proteins in the mammalian distal nephron – distribution, ontogeny and functional aspects. *Anat. Embryol. (Berl.)*. 1999; 200(5):447-468.

- Bonanno J.A. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Prog. Retin Eye Res.* 2003;22(1):69-94.
- Bonanno J.A. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp. Eye Res.* 2012;95:2-7.
- Boynnton G.E., Woodward M.A. Eye-bank preparation of endothelial tissue. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 2014;25(4):319-324.
- Féraille E., Doucet A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol. Rev.* 2001;81(1):345-418.
- Ilyaskin A.V., Baturina G.S., Medvedev D.A., Ershov A.P., Solenov E.I. A mathematical model of the response of principal cells of collecting ducts to hypotonic shock. *Biofizika = Biophysics*. 2011;56(3):550-560. (in Russian)
- Ilyaskin 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;33(1):13-28.
- Konev A.A., Palchikova I.G. The OPENCV library and its use on cytophotometry tasks. The panel “Remote Sensing of the Earth, photogrammetry, environmental monitoring, and geoecology”. The 11th International congress “Interexpo Geo-Siberia-2015”, in two volumes. Novosibirsk: SSUGT, 2015;2:71-76. (in Russian)
- Kuang K., Li Y., Yiming M., Sánchez J.M., Iserovich P., Cragoe E.J., Diecke F.P., Fischbarg J. Intracellular [Na⁺], Na⁺ pathways, and fluid transport in cultured bovine corneal endothelial cells. *Exp. Eye Res.* 2004;79(1):93-103.
- Maycock N.J., Marshall J. Genomics of corneal wound healing: a review of the literature. *Acta Ophthalmol.* 2014;92(3):e170-e184.
- Otsu N.A. Threshold Selection method from gray-level histograms. *IEEE Trans. Syst. Man Cyber.* 1979;9(1):62-66.
- Palchikova I.G., Konev A.A., Smirnov E.S. Image segmentation in the computer cytophotometry. The panel “Remote Sensing of the Earth, photogrammetry, environmental monitoring, and geoecology”. The 11th International congress “Interexpo Geo-Siberia-2015”, in two volumes. Novosibirsk: SSUGT, 2015;2:49-55. (in Russian)
- Riley M., Winkler B., Czajkowski C., Peters M. The roles of bicarbonate and CO₂ in transendothelial fluid movement and control of corneal thickness. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1995;36:103-112.
- Schmedt T., Silva M.M., Ziaei A., Jurkunas U. Molecular bases of corneal endothelial dystrophies. *Exp. Eye Res.* 2012;95:24-34.
- Solenov E.I. Cell volume and sodium content in rat kidney collecting duct principal cells during hypotonic shock. *J. Biophys.* 2008; 2008:420963.
- 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):37-41.
- Whitcher J.P., Srinivasan M., Upadhyay M.P. Corneal blindness: a global perspective. *Bull. World Health Organ.* 2001;79(3):214-221.
- Winslow J.L., Cooper R.L., Atwood H.L. Intracellular ionic concentration by calibration from fluorescence indicator emission spectra, its relationship to the K(d), F(min), F(max) formula, and use with Na-Green for presynaptic sodium. *J. Neurosci. Methods.* 2002; 118(2):163-175.