

УДК 617.713

## НАРУШЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ ОБЪЕМА КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ ПРИ КЕРАТОКОНУСЕ

© 2024 г. И. М. Кузеина<sup>а</sup>, Л. Е. Каткова<sup>б</sup>, Г. С. Батурина<sup>а, б</sup>, И. Г. Пальчикова<sup>а, с</sup>,  
И. А. Искаков<sup>е</sup>, Е. И. Соленов<sup>а, б, д, \*</sup>

<sup>а</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск,  
630090 Россия

<sup>б</sup>Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
РАН, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>с</sup>Конструкторско-технологический институт научного приборостроения СО РАН, Новосибирск,  
630058 Россия

<sup>д</sup>Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, 630087 Россия

<sup>е</sup>Национальный медицинский исследовательский центр “Межотраслевой научно-технический  
комплекс “Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова” Минздрава России, Новосибирский филиал,  
Новосибирск, 630096 Россия

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

Поступила в редакцию 12.12.2023

После доработки 15.01.2024

Принята к публикации 18.01.2024

В работе проведено исследование проницаемости для воды и мочевины плазматических мембран клеток эндотелия нормальной роговицы и роговицы с выраженной формой кератоконуса. Клетки эндотелия роговицы человека, получали из операционного материала. Определение осмотической водной проницаемости ( $P_f$ ) клеток эндотелия в норме и при кератоконусе не выявило значительных различий этого показателя в обеих группах, где клетки имеют близкую по величине осмотическую водную проницаемость (контроль  $P_f = 0.53 \pm 0.045$  см/с; кератоконус  $P_f = 0.63 \pm 0.041$  см/с) ( $n = 25$ ;  $p \geq 0.05$ ). Коэффициенты проницаемости для мочевины в обеих группах также не имели статистически значимых различий (контроль  $P_u = 0.049 \pm 0.003$  см/с; кератоконус  $P_u = 0.056 \pm 0.003$  см/с) ( $n = 25$ ;  $p \geq 0.05$ ). Анализ динамики клеточного объема на основе экспоненциальной аппроксимации показал, что клетки эндотелия роговицы с кератоконусом снижают свой объем в гипертонической среде в большей степени по сравнению с клетками здоровой роговицы. Увеличение клеточного объема в результате изотонического входа мочевины в гипертонической среде также происходило до существенно более высоких значений по сравнению с нормальными клетками. Делается заключение о значительных изменениях в механизме регуляции объема клеток эндотелия роговицы при кератоконусе.

**Ключевые слова:** эндотелий роговицы, кератоконус, транспорт мочевины, водная проницаемость

**DOI:** 10.31857/S0233475524030042, **EDN:** csqpnk

### ВВЕДЕНИЕ

Кератоконус – болезнь, связанная с ухудшением зрения в результате развития неправильно-го астигматизма, вызываемого прогрессивным истончением и деформацией роговицы. В зависимости от региона болезнь может появляться с частотой от 1.5 до 25 случаев на 100 000 человек в год в возрасте около 20 лет у обоих полов и прогрессировать в более позднем возрасте. В настоящее время умеренные проявления кератоконуса компенсируют с помощью очков и контактных линз, а в более выраженных случаях применяют

хирургическое лечение. Результаты исследований изменений роговицы, возникающих при кератоконусе, носят противоречивый характер, отклонения от нормы описаны в эпителии, боуменовой мембране и строме, а в десцеметовой мембране и эндотелии нарушения наблюдаются значительно реже [1]. Гистопатологические исследования показали, что болезнь затрагивает все слои роговицы. В эпителии роговицы при кератоконусе происходят дегенеративные процессы. Клетки увеличиваются в размерах, теряют нормальную форму, плотность базального слоя клеток эпителия снижается [2, 3].

Значительные изменения, происходящие в строме и влияющие на оптические свойства роговицы, не затрагивают размер клеток эндотелия и, по-видимому, могут быть связаны с изменениями во внутриклеточных механизмах [4–6]. Вопрос об изменении количества клеток эндотелия при кератоконусе остается дискуссионным: в работах одних исследователей этот параметр оставался неизменным [7–9], другие авторы отмечали снижение этого показателя [10–12]. Изучение экспрессии белков роговицы выявило, что болезнь оказывает влияние на экспрессию более 100 белков, на содержание коллагена в строме, на процессы апоптоза и некроза кератоцитов [13–15]. Плотность коллагеновых фибрилл стромы и содержание протеогликанов в матриксе, отмечаемые при кератоконусе, зависят от осмотического равновесия роговицы. Так, в случаях нарушения целостности монослоя эндотелия происходит гипергидратация матрикса – гидропс роговицы (corneal hydrops), который требует хирургического лечения [16, 17]. Высказывают предположение, что нарушения фибриллярной структуры стромы могут быть связаны с наблюдаемыми изменениями градиента осмотического давления, что указывает на повреждение в механизме регуляции осмотического равновесия матрикса [18]. Известно, что в регуляции осмотического баланса стромы роговицы определяющая роль принадлежит транспортной функции клеток эндотелия, которую часто описывают в терминах модели “насос-утечка” (pump-leak) [19]. Насосная функция клеток эндотелия определяется интенсивностью процессов активного транспорта и проницаемостью плазматической мембраны для воды и осмолитов. При этом поток ионов и воды через мембрану этих клеток, необходимый для поддержания осмотического баланса матрикса роговицы, не должен нарушать собственный водно-электролитный гомеостаз клетки, определяющий постоянство ее объема. Поддержание клеточного объема у теплокровных животных осуществляется исключительно регуляцией потоков через плазматическую мембрану неорганических ионов и низкомолекулярных органических осмолитов [20–22]. Органические осмолиты условно разделяют на совместимые, которые минимально влияют на функционирование молекулярных механизмов клетки, и такие как мочевины, которые способны влиять на конформацию функциональных макромолекул, влиять на функции ферментов и приводить к дезадаптации клеток [21, 23]. Роль транспорта мочевины в функционировании клеток эндотелия роговицы может быть значительна, поскольку есть данные о связи экспрессии генов семейства SLC (SLC4A11, SLC14A1) с нарушениями

зрения. Показано, что в клетках эндотелия роговицы интенсивно экспрессируется ген SLC14A1, который кодирует транспортер мочевины UT-A [24]. Изучение транспортеров мочевины и их функции осложняется тем, что в результате альтернативного сплайсинга в клетке может существовать множество изоформ этих белков [25, 26]. Изучение общего транспорта мочевины, осуществляемого не только изоформами UT-A, но и менее изученными транспортерами, представляется необходимым для понимания роли этого осмолита в регуляторной функции клеток эндотелия роговицы.

В настоящей работе мы поставили задачу исследовать транспорт мочевины в клетках эндотелия методом, который независим от того, какие изоформы транспортера UT-A экспрессируются в этих клетках, включая транспорт другими путями. Мы провели сравнительное исследование проницаемости для воды и мочевины плазматических мембран клеток эндотелия нормальной роговицы и роговицы с выраженной формой кератоконуса.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на клетках эндотелия роговицы человека, полученных из роговичных дисков, иссеченных у пациентов с кератоконусом в ходе сквозной кератопластики.

**Препарат переживающих клеток.** Эндотелий наносили на покровное стекло, покрытое полилизинном методом отпечатка. С этой целью фрагмент роговицы инкубировали в растворе 1 мг/мл коллагеназы (Sigma, США) в PBS (138 мМ NaCl, 4.7 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 мМ KCl, 1.5 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5.5 мМ глюкоза, 1.0 мМ CaCl<sub>2</sub>) при 37°C 30 мин, затем методом отпечатка переносили клетки эндотелия на покровное стекло, покрытое 0.1% (w/v) раствором полилизина (Sigma) в воде. Стекло с клетками эндотелия, ориентированными базолатеральной поверхностью в сторону омывающей среды, помещали в проточную камеру микроскопа. Затем загружали клетки Calcein AM (10<sup>-5</sup>М, 20 мин, 37°C). Изменения клеточного объема определяли с помощью метода, основанного на эффекте гашения флуоресцентного красителя Calcein белками цитоплазмы [27, 28]. Для определения водной проницаемости клетки уравнивали в нормотонической среде с осмотической концентрацией 280 мОсм/кг H<sub>2</sub>O и записывали профиль флуоресценции, отражающий снижение объема при быстрой (<100 мс) смене среды на гипертоническую (560 мОсм/кг H<sub>2</sub>O). Гипертоническую среду создавали маннитолом (280 мМ, Sigma). Водную проницаемость рассчитывали исходя из уравнения потока [29]. Площадь поверхности,

через которую идет поток, мы принимали равной площади изображения клетки, учитывая, что клетки лежат на стекле и только открытая часть их поверхности доступна для обмена.

$$dV/dt = -S V_w P_f \text{grad}\Phi,$$

где  $P_f$  – коэффициент осмотической проницаемости (см/с),  $S$  – площадь поверхности,  $V_w$  – молярный объем воды,  $\Phi$  – осмотическое давление.

Флуоресцентный профиль ( $F$ ) аппроксимировали функцией  $y = y_0 + Ae^{(-t/\tau)}$ . С учетом того, что, как нами показано ранее,  $V/V_0 = F/F_0$  [22], где  $V_0$  – начальный объем клетки, а  $F_0$  – начальный уровень флуоресцентного сигнала.

$P_f$  – коэффициент осмотической проницаемости рассчитывали исходя из соотношения:

$$dV/dt = V_0 Kr = P_f S V_w \Delta C, \\ P_f = V_0 Kr / (S V_w \Delta C),$$

где  $Kr$  – коэффициент линейной регрессии начального участка профиля относительной флуоресценции ( $F/F_0$ ),  $\Delta C$  – разность осмотических концентраций (Осм/кг  $H_2O$ ) на плазматической мембране клетки.

Коэффициент проницаемости для мочевины определяли, анализируя кинетику увеличения объема клетки в гипертонической среде при изотоническом входе мочевины. Увеличение клеточного объема в такой системе приближенно можно описать уравнением:

$$V/V_0 \approx 1 + C_u / \Pi_{out} \approx 1 + [(SP_u \Delta C) / (V_0 \Pi_{out})] t;$$

тогда

$$\Delta C = C_{out} - C_u; \\ (V/V_0 - 1) / t \Rightarrow (F/F_0) / t = Kr_u; \\ P_u \approx Kr_u (V_0 \Pi_{out}) / (S C_{out}),$$

где:  $Kr_u$  – коэффициент регрессии объема клетки в присутствии мочевины.  $C_u$  – концентрация мочевины в клетке.  $C_{out}$  – концентрация мочевины в среде.  $\Pi_{out}$  – осмотическая концентрация среды.  $V_0$  – начальный объем клетки.  $P_u$  – коэффициент проницаемости для мочевины.

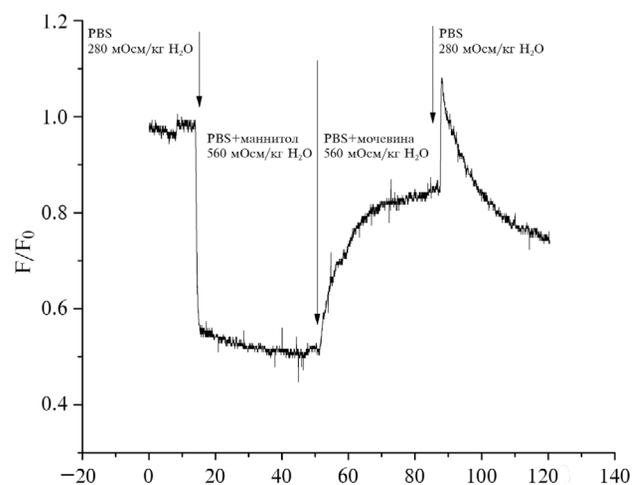
**Протокол эксперимента.** Клетки уравнивали в среде PBS (280 мОсм/кг  $H_2O$ ), меняли среду на PBS+маннитол (560 мОсм/кг  $H_2O$ ) и уравнивали клетки в этой гипертонической среде, изотонически меняли среду на PBS+мочевина (560 мОсм/кг  $H_2O$ ), записывали возрастание флуоресценции в течение 20–30 с, возвращали в среду PBS (280 мОсм/кг  $H_2O$ ) (рис. 1).

**Микроскопия.** Экспериментальная установка представляла собой проточную камеру, разработанную для использования с флуоресцентным микроскопом Observer-Z1 (объектив Fluor 25×/0.8 M27, Zeiss, Германия). Конструкция проточной камеры описана нами ранее [29]. Объем камеры составлял ~50 мкл, скорость протекания раствора 25 мл/мин, поддерживаемая температура  $36.8 \pm 0.2^\circ C$ . Флуоресцентные сигналы клеток записывали с помощью фотосенсора Hamamtsu H7827, используя набор фильтров и дихроическое зеркало #009 (Zeiss, Германия).

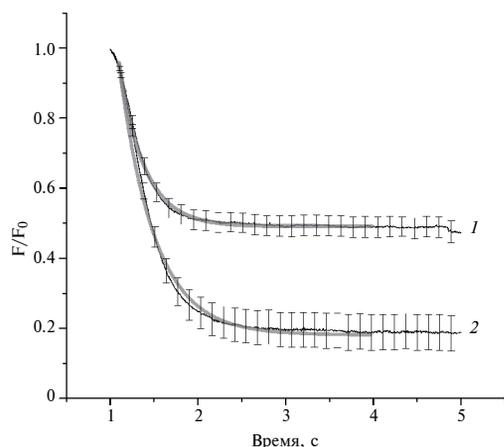
**Статистический анализ.** Анализ профилей флуоресценции проводили с помощью пакета Origin 5.0. Статистические расчеты производили с использованием пакета программ Statistica 6.0 для Windows. Полученные данные были проанализированы с помощью t-критерия Стьюдента. Результаты представлены как  $M \pm SEM$ . Результаты считали значимыми при  $p < 0.05$ . Проверку нормальности распределения проводили в тесте Shapiro–Wilk в программе Statistica 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 2 приведены усредненные профили флуоресценции красителя Calcein с применением экспоненциальной аппроксимации, отражающие изменения клеточного объема эндотелиоцитов роговицы в гипертонической среде. Анализ профилей показал, что клетки роговицы с кератоконусом снижают объем до более низких значений по сравнению с клетками здоровой роговицы. Очевидно осмотическое равновесие эндотелиоцитов роговицы с патологией достигается при меньшем клеточном объеме по сравнению с нормой.



**Рис. 1.** Схема эксперимента. По оси ординат – относительная флуоресценция ( $F/F_0$ ).

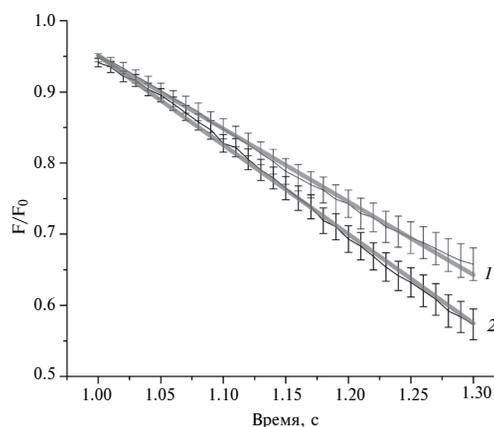


**Рис. 2.** Усредненные профили динамики относительной флуоресценции красителя Calcein в гипертонической среде, отражающие изменения объема клеток эндотелия роговицы. 1 – Контроль ( $n = 25$ ); 2 – кератоконус ( $n = 21$ ). Линией серого цвета приведена экспоненциальная аппроксимация профилей ( $y = y_0 + Ae^{(-t/\tau)}$ ).

Анализ экспоненциальной аппроксимации профилей динамики клеточного объема показал, что клетки нормального эндотелия достигают осмотического равновесия в гипертонической среде быстрее (характерное время ( $\tau$ ) контроль  $0.29 \pm \pm 0.004$ ; кератоконус  $0.38 \pm 0.005$  с,  $p < 0.0001$  ( $n = 25$ ,  $t = 14$ )) и при меньшем снижении объема (параметр “амплитуда” контроль  $0.57 \pm 0.004$ ; кератоконус  $0.92 \pm 0.006$ ,  $p < 0.0001$  ( $n = 25$ ,  $t = 48$ ) ( $F/F_0$ )). При кератоконусе более выраженное снижение объема в таких условиях отражает, по-видимому, меньшее содержание осмолитов в клетках эндотелия, что может быть связано с вызванными патологией нарушениями в механизме регуляции клеточного объема.

Графики линейной аппроксимации начальных участков усредненных профилей снижения клеточного объема в гипертонической среде приведены на рис. 3. Сравнение величин осмотической водной проницаемости ( $P_f$ ) клеток эндотелия в норме и при кератоконусе, рассчитанных с учетом коэффициентов регрессии начальных участков профилей флуоресценции, не выявило достоверных различий этого показателя (контроль  $P_f = 0.53 \pm \pm 0.045$  см/с; кератоконус  $P_f = 0.63 \pm \pm 0.041$  см/с) ( $n = 25$ ;  $p \geq 0.05$ ).

Проницаемость плазматической мембраны эндотелиальных клеток роговицы для мочевины изучали в экспериментах с регистрацией изменений клеточного объема, который увеличивался в результате входа в клетку мочевины в соответствии с ее градиентом концентрации при отсутствии градиента осмотического давления. Согласно

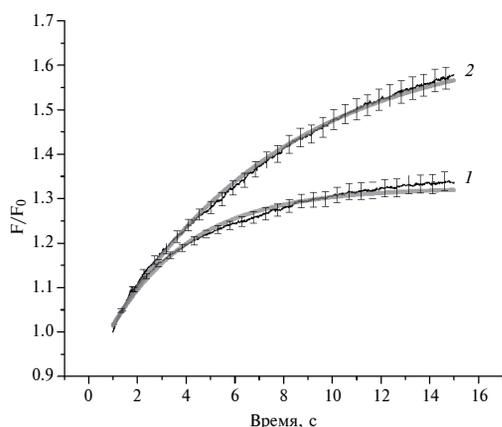


**Рис. 3.** Начальные участки усредненных профилей динамики относительной флуоресценции красителя Calcein в гипертонической среде, отражающие снижение объема клеток эндотелия роговицы. 1 – Контроль ( $n = 25$ ); 2 – кератоконус ( $n = 21$ ). Линией серого цвета приведена линейная аппроксимация профилей.

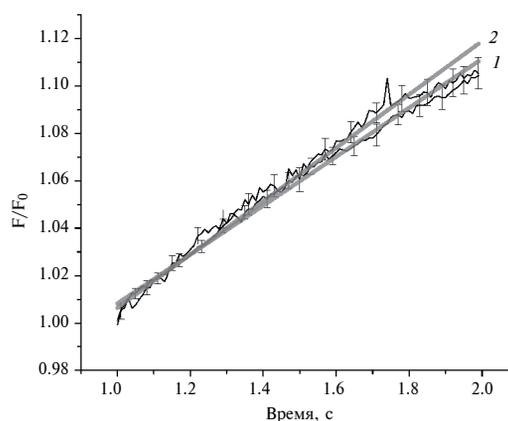
полученным результатам при этих условиях в клетках роговицы с патологией кератоконуса объем возрастал до значительно более высоких значений по сравнению с контролем (рис. 4).

На основе экспоненциальной аппроксимации профилей изотонического изменения клеточного объема в гипертонической среде мочевины (рис. 4) были определены значения амплитуды и характерного времени ( $\tau$ ), что выявило различие динамики объема клеток эндотелия контрольных образцов и роговицы с кератоконусом. По сравнению с контрольными образцами клетки эндотелия роговицы с кератоконусом увеличивали объем дольше (характерное время ( $\tau$ ) контроль  $4.27 \pm 0.024$  с; кератоконус  $8.45 \pm 0.033$  с,  $p < 0.0001$  ( $n = 25$ ,  $t = 102$ )) и до больших значений (“амплитуда” контроль  $0.31 \pm 0.0006$ ; кератоконус  $0.67 \pm 0.001$ ,  $p < 0.0001$  ( $n = 25$ ,  $t = 308$ ) ( $F/F_0$ )).

Более выраженное увеличение объема клеток роговицы с кератоконусом в гипертонической мочеvine позволяет предположить, что этот эффект также обусловлен нарушениями в механизме регуляции клеточного объема. Значения коэффициентов проницаемости для мочевины ( $P_u$ ) в обеих группах не имели между собой статистически значимых различий (контроль  $P_u = 0.049 \pm 0.003$  см/с; кератоконус  $P_u = 0.056 \pm 0.003$  см/с) ( $n = 25$ ;  $p \geq 0.05$ ), как следует из графиков линейной аппроксимации начальных участков профилей изотонического увеличения объема клеток эндотелия роговицы в гипертонической среде мочевины, приведенных на рис. 5.



**Рис. 4.** Усредненные профили динамики относительной флуоресценции красителя Calcein в гипертонической среде мочевины, отражающие изотоническое увеличение объема клеток эндотелия роговицы. 1 – Контроль ( $n = 26$ ); 2 – кератоконус ( $n = 20$ ). Линией серого цвета приведена экспоненциальная аппроксимация профилей ( $y = y_0 + Ae^{(-t/\tau)}$ ).



**Рис. 5.** Начальные участки усредненных профилей динамики относительной флуоресценции красителя Calcein, отражающие повышение объема клеток эндотелия роговицы в гипертонической среде мочевины. 1 – Контроль ( $n = 26$ ); 2 – кератоконус ( $n = 20$ ). Линией серого цвета приведена линейная аппроксимация профилей.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Прозрачность матрикса роговицы обусловлена упорядоченной структурой коллагеновых волокон, расстояния между которыми определяются наличием протеогликанов и степенью гидратации матрикса, что нарушается при кератоконусе [4]. Согласно принятой модели механизма регуляции осмотического баланса матрикса роговицы “насос-утечка”, степень гидратации матрикса определяется соотношением потоков ионов и воды, обусловленных активным транспортом, и потоков, движущей силой которых является градиент осмотического давления. Наши наблюдения указывают на возможные нарушения насосной функции клеток эндотелия. Поток воды и ионов, определяющих осмотическое давление среды в матриксе роговицы, зависит от активности ионных насосов клетки и водной проницаемости ее плазматической мембраны. Потоки воды и ионов, проходящих через клетку эндотелия, не только определяют осмотическую концентрацию матрикса, но и представляют собой риск для осмотического баланса собственно клетки. Способность регулировать свой осмотический гомеостаз, что эквивалентно регуляции объема клетки, является ее жизненно важной функцией.

Постоянство клеточного объема поддерживается главным образом за счет регуляции содержания в клетке низкомолекулярных органических осмолитов [22]. Таким образом, увеличение амплитуды снижения относительной флуоресценции Calcein

в клетках эндотелия в гипертонической среде, что соответствует снижению объема этих клеток, может означать меньшее по сравнению с нормой содержание низкомолекулярных органических осмолитов при кератоконусе. Такое заключение можно сделать и на основании результатов по увеличению объема клеток эндотелия в гипертонической среде, создаваемой маннитолом, при изотонической замене маннитола на мочевины. Профили флуоресценции, наблюдаемые в наших экспериментах, также указывают на значительные изменения в механизме регуляции объема этих клеток при кератоконусе. Следует отметить, что предполагаемые сдвиги регуляции клеточного объема происходят без значительных изменений проницаемости плазматической мембраны клеток как для воды, так и для мочевины. Поскольку объем клетки в состоянии осмотического равновесия в значительной мере определяется содержанием в клетке органических осмотически активных молекул, изменения, обнаруживаемые в регуляции объема клеток эндотелия роговицы в состоянии кератоконуса, связаны, вероятно, с изменениями их метаболизма и, возможно, состава. Исследование состава и метаболизма органических осмолитов в клетках эндотелия роговицы, находящейся в состоянии кератоконуса, возможно, является необходимым этапом изучения механизма этого заболевания. В этой связи, полученные нами высокие показатели проницаемости для мочевины в клетках эндотелия также ставят вопрос о возможной связи уровня мочевины в крови с патологическими изменениями в этих клетках, поскольку,

в отличие от клеток почки, эндотелий роговицы не функционирует в условиях высокой концентрации мочевины и ее градиента. Клетки почечного эпителия, резистентные к потокам мочевины, возможно, обладают защитным механизмом от денатурирующего действия мочевины. Насколько развит защитный механизм у клеток эндотелия роговицы, в настоящее время не ясно, но то, что проницаемость этих клеток для мочевины высока, делает исследование такого механизма актуальным. Вопрос о влиянии интенсивности потока мочевины через клетки эндотелия роговицы на функционирование этих клеток в настоящее время не решен и требует специального исследования. Величины осмотической проницаемости плазматической мембраны клеток эндотелия роговицы человека для воды, полученные в нашем исследовании, больше, чем полученные для клеток у крыс как эндотелия роговицы ( $P_f = 0.029-0.035$  см/с) [29], так и главных клеток собирательных трубок эпителия почки ( $P_f = 0.024-0.012$  см/с), как показано нами ранее [29, 30]. Можно предположить, что более высокие значения водной проницаемости у клеток эндотелия роговицы человека по сравнению с крысой могут означать и более эффективный транспорт, а также то, что функции этих клеток по эффективности транспорта могут быть сравнимы с клетками эпителия почки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование не выявило различий проницаемости плазматической мембраны клеток эндотелия роговицы для воды и мочевины в норме и при кератоконусе. Анализ динамики клеточного объема в условиях осмотического шока показал, что клетки эндотелия роговицы с кератоконусом изменяют свой объем в значительно более выраженной степени по сравнению с клетками эндотелия здоровой роговицы. Увеличение клеточного объема в результате изотонического входа мочевины в гипертонической среде также происходило до значительно более высоких значений по сравнению с нормальными клетками. Значительные изменения в механизме регуляции объема клеток эндотелия роговицы при кератоконусе, возможно, связаны с нарушениями в метаболизме органических осмолитов этих клеток при патологии.

**Вклад авторов.** Идея работы и планирование эксперимента (Е.И. Соленов, И.А. Исаков), сбор данных (Г.С. Батурина, Л.Е. Каткова, И.М. Кузеина, Е.И. Соленов), обработка данных и написание манускрипта (Г.С. Батурина, Л.Е. Каткова, И.М. Кузеина, Е.И. Соленов), обсуждение и редактирование манускрипта (Г.С. Батурина,

Л.Е. Каткова, Е.И. Соленов, И.Г. Пальчикова, И.А. Исаков).

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0019.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации “Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека”, Федеральным законом Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. № 323 ФЗ “Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации”, а также требованиями Федерального закона от 27.07.2006 № 152-ФЗ (ред. от 21.07.2014) “О персональных данных” (с изм. и доп., вступ. в силу с 01.09.2015). Забор материала осуществляли сотрудники Новосибирского филиала ФГАУ НМИЦ “МНТК “Микрохирургия глаза” им. акад. С.Н. Федорова” Минздрава России. На проведение исследования получено разрешение Биоэтического комитета Новосибирского филиала ФГАУ НМИЦ “МНТК “Микрохирургия глаза”. Все пациенты дали письменное информированное согласие на исследование биологического материала и использование полученных данных в научных целях.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Santodomingo-Rubido J., Carracedo G., Suzaki A., Villa-Collar C., Vincen S.J., Wolffsohn J.S. 2022. Keratoconus: An updated review. *Cont. Lens Anterior Eye*. **45**(3), 101559.
2. Scroggs M.W., Proia A.D. 1992. Histopathological variation in keratoconus. *Cornea* **11** (6), 553–559.
3. Bitirgen G., Ozkagnici A., Bozkurt B., Malik R.A. 2015. *In vivo* corneal confocal microscopic analysis in patients with keratoconus. *Int. J. Ophthalmol.* **8**, 534–539.
4. Khaled M.L., Helwa I., Drewry M., Seremwe M., Estes A., Liu Y. 2017. Molecular and histopathological changes associated with keratoconus. *Biomed. Res. Int.* **2017**, 7803029.
5. Rabinowitz Y.S. 1998. Keratoconus. *Surv. Ophthalmol.* **42**, 297–319.
6. Ghosh S., Mutalib H.A., Kaur S., Ghoshal R., Retnasabapathy S. 2017. Corneal cell morphology in keratoconus: A confocal microscopic observation. *Malays J. Med. Sci.* **24** (2), 44–54.
7. Weed K.H., MacEwen C.J., Cox A., McGhee C.N.J. 2007. Quantitative analysis of corneal microstructure in keratoconus utilising *in vivo* confocal microscopy. *Eye*. **21** (5), 614–623.

8. Efron N., Hollingsworth J.G. 2008. New perspectives on keratoconus as revealed by corneal confocal microscopy. *Clin. Exp. Optom.* **91** (1), 34–55.
9. El-Agha M.S.H., Sayed Y.M.E., Harhara R.M., Essam H.M. 2014. Correlation of corneal endothelial changes with different stages of keratoconus. *Cornea.* **33** (7), 707–711.
10. Marianne O.P., Jodhbir S.M., Ula V.J., Francis W.P. 2021. Corneal endothelial dysfunction: Evolving understanding and treatment options. *Progr. Retinal Eye Res.* **82**, 100904.
11. Fernandes B.F., Logan P., Zajdenweber M.E., Santos L.N., Cheema D.P., Burnier M.N. 2008. Histopathological study of 49 cases of keratoconus. *Pathology.* **40** (6), 623–626.
12. Mocan M.C., Yilmaz P.T., Irkeç M., Orhan M. 2008. *In vivo* confocal microscopy for the evaluation of corneal microstructure in keratoconus. *Curr. Eye Res.* **33** (11), 933–939.
13. Loukovitis E., Kozeis N., Gatziofas Z., Kozei A., Tsoitridou E., Stoila M., Koronis S., Sfakianakis K., Tranos P., Balidis M., Zachariadis Z., Mikropoulos D.G., Anogeianakis G., Katsanos A., Konstas A.G. 2019. The proteins of keratoconus: A literature review exploring their contribution to the pathophysiology of the disease. *Adv. Ther.* **36** (9), 2205–2222.
14. Yam G.H.F., Fuest M., Zhou L., Liu Y.C., Deng L., Chan A.S., Ong H.S., Khor W.B., Ang M., Mehta J.S. 2019. Differential epithelial and stromal protein profiles in cone and non-cone regions of keratoconus corneas. *Sci. Rep.* **9** (1), 2965
15. Srivastava O.P., Chandrasekaran D., Pfister R.R. 2006. Molecular changes in selected epithelial proteins in human keratoconus corneas compared to normal corneas. *Mol. Vis.* **12**, 1615–1625.
16. Fan Gaskin J.C., Patel D.V., McGhee C.N.J. 2014. Acute corneal hydrops in keratoconus – new perspectives. *Am.J. Ophthalmol.* **157** (5), 921–928.
17. Yahia Chérif H., Gueudry J., Afriat M., Delcampe A., Attal P., Gross H., Muraine M. 2015. Efficacy and safety of pre-Descemet's membrane sutures for the management of acute corneal hydrops in keratoconus. *Br.J. Ophthalmol.* **99** (6), 773–777.
18. Mathew J.H., Goosey J.D., Söderberg P.G., Bergman J.P.G. 2015. Lamellar changes in the keratoconic cornea. *Acta Ophthalmol.* **93** (8), 767–773.
19. Bonanno J.A. 2012. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp. Eye Res.* **95** (1), 2–7.
20. Lang F., Busch G.L., Ritter M., Volkl H., Waldegger S., Gulbins E., Haussinger D. 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* **78**, 247–306.
21. O'Neill W.C. 1999. Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am.J. Physiol. Cell Physiol.* **276**, C995–C1011.
22. Strange K. 2004. Cellular volume homeostasis. *Adv. Physiol. Educ.* **28** (1–4), 155–159.
23. Gulotta M., Qiu L., Desamero R., Rösger J., Bollen D.W., Callender R. 2007. Effects of cell volume regulating osmolytes on glycerol 3-phosphate binding to triosephosphate isomerase. *Biochemistry.* **46** (35), 10055–10062.
24. Alvarez B.V., Piché M., Aizouki C., Rahman F., Derry J.M.J., Brunette I., Casey J.R. 2021. Altered gene expression in slc4a11<sup>-/-</sup> mouse cornea highlights SLC4A11 roles. *Sci. Rep.* **11** (1), 20885. doi 10.1038/s41598-021-98921-w.
25. Nakayama Y., Naruse M., Karakashian A., Peng T., Sands J.M., Bagnasco S.M. 2001. Cloning of the rat Slc14a2 gene and genomic organization of the UT-A urea transporter. *Biochim. Biophys. Acta.* **1518** (1–2), 19–26
26. Bagnasco S.M., Peng T., Janech M.G., Karakashian A., Sands J.M. 2001. Cloning and characterization of the human urea transporter UT-A1 and mapping of the human Slc14a2 gene. *Am.J. Physiol. Renal Physiol.* **281** (3), F400–6.
27. Solenov E., Watanabe H., Manley G.T., Verkman A.S. 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** (2), 426–432.
28. Батурина Г.С., Каткова Л.Е., Колосова Н.Г., Соленов Е.И. 2017. Изменение транспорта воды клетками эндотелия роговицы у крыс при старении. *Успехи геронтол.* **30** (5), 659–664.
29. Zarogiannis S.G., Ilyaskin A.V., Baturina G.S., Katkova L.E., Medvedev D.A., Karpov D.I., Ershov A.P., Solenov E.I. 2013. Regulatory volume decrease of rat kidney principal cells after successive hypo-osmotic shocks. *Math. Biosci.* **244** (2), 176–187.
30. Solenov E.I., Baturina G.S., Ilyaskin A.V., Katkova L.Y., Ivanova L.N. 2011. Cell volume regulation of rat kidney collecting duct epithelial cells in hypotonic medium. *Dokl. Biol. Sci.* **436**, 13–55.

## Cell Volume Regulation of Endothelial Cells Is Impaired in Keratoconus Cornea

© 2024 г. I. M. Kuseina<sup>1</sup>, L. E. Katkova<sup>2</sup>, G. S. Baturina<sup>1, 2</sup>, I. G. Palchikova<sup>1, 3</sup>, I. A. Iskakov<sup>5</sup>,  
E. I. Solenov<sup>1, 2, 4, \*</sup>

<sup>1</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>2</sup>Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>3</sup>Tecnological Design Institute of Scientific Instrument Engineering of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630058 Russia

<sup>4</sup>Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, 630087 Russia

<sup>5</sup>Fedorov Eye Microsurgery Clinic (Novosibirsk Department), Novosibirsk, 630096 Russia

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

In this work the permeability to water and urea of plasma membranes of endothelial cells of normal corneas and corneas with keratoconus was investigated. The endothelial cells were obtained from surgery material. Measurements of osmotic aqueous permeability ( $P_f$ ) of endothelial cells in normal and in keratoconus did not reveal significant differences of this parameter in the two studied groups. The control cells and the cells from keratoconus cornea have similar osmotic water permeability (control cells,  $P_f = 0.53 \pm 0.045$  cm/s; keratoconus cells,  $P_f = 0.63 \pm 0.041$  cm/s;  $n = 25$ ;  $p \geq 0.05$ ). Neither coefficient of urea permeability differed significantly in these groups (control,  $P_u = 0.049 \pm 0.003$  cm/s; keratoconus,  $P_u = 0.056 \pm 0.003$  cm/s;  $n = 25$ ;  $p \geq 0.05$ ). Analysis of cell volume dynamics based on exponential approximation showed a more pronounced decrease of the cell volume of endothelial cells from keratoconus cornea in hypertonic medium in comparison with the cells from normal cornea. The increase of cell volume caused by isotonic entering of urea into the cells in hypertonic medium also was more pronounced in these cells in comparison with the normal ones. We conclude that there are significant changes in cell volume regulating mechanism in keratoconus cornea endothelial cells.

**Keywords:** corneal endothelium, keratoconus, urea transport, water permeability.