

УДК 617.713

## МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ АНТИОКСИДАНТ SKQ1 ПОВЫШАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ КОНСЕРВАЦИИ РОГОВИЦЫ

© 2021 Г.С. Батурина<sup>1,2</sup>, Л.Е. Каткова<sup>1</sup>, И.Г. Пальчикова<sup>2,3</sup>,  
Н.Г. Колосова<sup>1</sup>, Е.И. Соленов<sup>1,2,4\*</sup>, И.А. Искаков<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
Российской академии наук, 630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: eugsol@bionet.nsc.ru

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Конструкторско-технологический институт научного приборостроения Сибирского отделения  
Российской академии наук, 630058 Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> Новосибирский государственный технический университет, 630087 Новосибирск, Россия

<sup>5</sup> НМИЦ Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова»  
Минздрава России, Новосибирский филиал, 630096 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 28.07.2020

После доработки 16.10.2020

Принята к публикации 16.10.2020

Одной из основных причин слепоты в мире являются заболевания роговицы, лечение тяжёлых форм которых основано на кератопластике. Успех лечения зависит от жизнеспособности трансплантата роговицы, определяющейся эффективностью восстановления функций эндотелия после консервации, что делает актуальной разработку методов объективной оценки сохранности эндотелия и совершенствования консервационных сред. Проведено исследование влияния гипотермической консервации на равновесную концентрацию внутриклеточного натрия в клетках эндотелия роговицы, устанавливающуюся в них после прекращения консервации, и зависимости этого параметра от присутствия в консервационной среде митохондриального антиоксиданта SkQ1. Оценивали влияние SkQ1 на внутриклеточную концентрацию натрия в клетках эндотелия роговицы глаза свиньи после гипотермической консервации при 4 °С длительностью 1, 5 и 10 дней в стандартном растворе Eusol-C. Концентрацию внутриклеточного натрия определяли с помощью флуоресцентного красителя Sodium Green в препаратах клеток эндотелия. Флуоресцентные изображения клеток анализировали, используя оригинальную программу «CytoDynamics». В контрольных образцах после 10 дней гипотермической консервации выявлено значительное повышение концентрации внутриклеточного натрия в клетках эндотелия роговицы и снижение проницаемости для натрия их плазматических мембран. Консервация роговицы в присутствии 1 нМ SkQ1 приводила к установлению более низкого по сравнению с контролем уровня равновесной концентрации внутриклеточного натрия при температуре 37 °С, снижения проницаемости плазматических мембран не наблюдалось. Таким образом, SkQ1 повышает способность клеток эндотелия к восстановлению концентрации внутриклеточного натрия, что делает перспективным его использование для повышения сохранности функциональной компетентности клеток эндотелия роговицы при гипотермической консервации.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** эндотелий роговицы, гипотермическая консервация, SkQ1, внутриклеточный натрий.

**DOI:** 10.31857/S032097252103012X

### ВВЕДЕНИЕ

Пятое место в мире среди основных причин слепоты занимают заболевания роговицы, лечение тяжёлых форм которых основано на кератопластике [1]. Успешность кератопластики (сквозной, задней послойной) во многом зависит от функционального состояния эндотелия,

повреждение которого приводит к отеку роговицы, снижению её прозрачности и снижению жизнеспособности трансплантата. Эффективность восстановления роговичного трансплантата после операции зависит от интенсивности транспорта электролитов и воды через эндотелий роговицы, важной функцией которого является поддержание осмотического равновесия матрикса роговицы [2, 3]. Необходимость восстановления функциональных возможностей эндотелия после периода консервации делает актуальными исследования, направленные на совершенствование консервационных сред и

Принятые сокращения: ОИ – области интереса;  $[Na^+]_i$  – внутриклеточная концентрация ионов натрия; SkQ1 – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний.

\* Адресат для корреспонденции.

разработку методов объективной оценки сохранности транспортных функций клеток эндотелия роговицы. Методы определения жизнеспособных клеток с применением красителя «трипановый синий» или тест на фрагментацию ДНК (TUNEL assay) не позволяют оценивать собственно функциональность транспортных механизмов клеток эндотелия [4, 5]. В молекулярный механизм транспорта на стороне, обращённой к матриксу роговицы, 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 ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , *SLC9A6*, NHE1) [6, 7]. 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 [8]. Каналы проницаемы и для бикарбонат-иона в соотношении 4/1 ( $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ). В эндотелиальных клетках отмечают высокую плотность митохондрий. АТФ, производимый в клетках, является не только субстратом для Na/K-АТФазы, но и сигнальным фактором, который, наряду с внутриклеточным кальцием, через пуриnergические рецепторы способен повышать проводимость апикальной поверхности для  $\text{HCO}_3^-$ , активируя CaCC [9]. В механизме трансэпителиального переноса ионов и воды основным источником энергии для векторного транспорта является Na/K-АТФаза, создавая, наряду с другим электрогенным транспортером, NBCe1, градиент электрохимического потенциала натрия на плазматической мембране этих клеток, что является вторичным источником энергии для выполнения этими клетками функции «насоса». В этой связи естественно рассматривать концентрацию внутриклеточного натрия как результат баланса активности натрий-калиевого насоса и потоков через каналы и ионообменники плазматической мембраны клетки [10]. Исследование динамики снижения клеточного объёма эндотелия роговицы, а также содержания внутриклеточного натрия в клетках эндотелия после прекращения гипотермической консервации даёт объективное представление о транспортной компетентности этих клеток [11].

В данной работе проведено исследование влияния гипотермической консервации на равновесную концентрацию внутриклеточного натрия, устанавливающуюся в клетках эндотелия роговицы после повышения температуры до 37 °С. Кроме того, была проведена оценка зави-

симости этого параметра от присутствия в консервационной среде митохондриального антиоксиданта 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфония (SkQ1). SkQ1 в форме глазных капель «Визомитин» используется для лечения синдрома «сухого глаза», оказывает мягкий противовоспалительный эффект и ускоряет регенерацию роговицы [12, 13]. Показано, что SkQ1 способен снижать связанные с ишемией и реперфузией повреждения тканей [14].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на дисках роговицы свиньи (*sus scrofa domesticus*). Трепанацию проводили с помощью трепана диаметром 8 мм через 6–8 ч после забоя животных (свинокомплекс «АО «Кудряшовское»», с. Криводановка, Новосибирская обл.). Иссечённые диски роговицы помещали в чашки Петри, заполненные средой Eusol-C («Alchimia», Италия) и на льду транспортировали в лабораторию.

**Гипотермическая консервация.** Исследовали влияние гипотермической консервации роговицы свиньи на способность эндотелиоцитов восстанавливать внутриклеточную концентрацию натрия ( $[\text{Na}^+]_i$ ) после прекращения гипотермии. Препараты (диски) роговицы инкубировали в консервационной среде Eusol-C в течение 1, 5 и 10 дней при 4 °С. В экспериментальных группах в среде присутствовал 1 нМ SkQ1 (использовали глазные капли «Визомитин», предоставленные ООО «НИИ Митоинженерии МГУ»). Диски инкубировали индивидуально, для каждого временного интервала использовали 4–5 дисков.

**Препарат переживающих клеток.** Препарат переживающих клеток эндотелия роговицы получали переносом клеток на покровное стекло. С этой целью диск роговицы инкубировали в растворе 1 мг/мл коллагеназы («Sigma», США) в PBS (138 мМ NaCl, 4,7 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,7 мМ KCl, 1,5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 5,5 мМ глюкоза, 1,0 мМ  $\text{CaCl}_2$ ) при 37 °С 30 мин, затем делали отпечаток эндотелия на покровное стекло, покрытое 0,1%-ным (w/v) раствором полилизина («Sigma», США) в воде. Таким методом получали препарат клеток эндотелия, обращённых базальной стороной в сторону омывающего раствора.

**Микроскопия.** Экспериментальная установка представляла собой проточную камеру, разработанную для использования с флуоресцентным микроскопом Observer-Z1 (объектив Fluor 25x/0,8 M27, «Zeiss», Германия). Объем камеры составлял ~50 мкл, скорость протекания раствора 25 мл/мин, поддерживаемая темпера-

тура  $36,80 \pm 0,2$  °С. Флуоресцентные изображения клеток записывали с помощью камеры AxioCam H5m, используя набор фильтров и дихроическое зеркало #009 («Zeiss», Германия). Регистрацию изображений производили 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 TIFF. Измерения интенсивности флуоресценции проводили с помощью программного пакета «CytoDynamics» с записью результатов измерения динамики интенсивностей индивидуальных клеток в формате таблиц Excel (Программа для ЭВМ 2016612766 РФ).

**Измерение концентрации внутриклеточного натрия.** Концентрацию  $[Na^+]_i$  в клетках определяли флуориметрическим методом с помощью флуоресцентного красителя Sodium Green AM («Molecular Probes», США), согласно установленному ранее протоколу [15].

Сигнал калибровали, помещая клетки в фосфатный солевой буфер (PBS) с различной концентрацией  $Na^+$  (147,4 мМ, и 10 мМ в присутствии 100 ед./мл  $Na^+$ -ионофора Nystatin («AppliChem», Германия). Гипонатриевый раствор (10 мМ NaCl) готовили на основе изотонического PBS, в котором часть натрия замещали на 137,4 мМ n-methyl-D-glucamine («ICN Biomedicals», США). Для измерения покровное стекло с клетками эндотелия переносили в раствор PBS. Клетки загружали флуоресцентным красителем Sodium Green AM (10 мкМ, 40 мин,

37 °С). Стекла с клетками помещали в камеру флуоресцентного микроскопа. В ходе эксперимента первые 5 мин (период I) клетки находились при температуре 10 °С, затем 5 мин – при температуре 37 °С (период II) и последующие 5 мин (период III) – в среде PBS, содержащего 10 мМ  $Na^+$  при температуре 37 °С в присутствии 100 ед./мл Nystatin (рис. 1). Для определения проницаемости плазматической мембраны для ионов натрия создавали ступенчатый градиент натрия сменой среды, содержащей 147,4 и 10 мМ натрия. Экспериментальные записи изменения флуоресценции Sodium Green для оценки скорости изменения внутриклеточного натрия нормировали по амплитуде и находили коэффициент линейной регрессии начального участка кривой флуоресценции, как это описано нами ранее [16].

Анализ экспериментальных данных по динамике внутриклеточной концентрации ионов  $Na^+$  с целью получения количественных оценок проницаемости мембраны клеток для ионов натрия производили с помощью математической модели главных клеток собирательных трубок почки, разработанной нами ранее [17]. Усреднённые профили флуоресценции клеток в экспериментальных группах ( $M \pm SD$ ) строили, рассчитывая средние значения соответствующих точек профилей области интереса (ОИ). В каждой экспериментальной группе рассчитывали стационарную концентрацию натрия в клетках при 37 °С в интервале II, исходя из средних значений интенсивности флуоресценции на квазистационарных участках профиля, соответствующих интервалам I и III, и внутриклеточной концентрации натрия, равной 147,4 мМ при

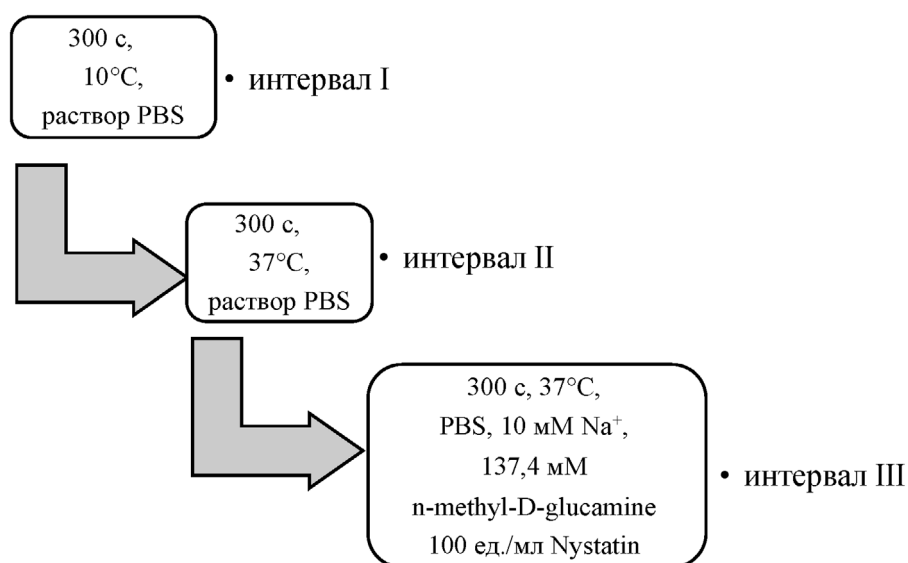
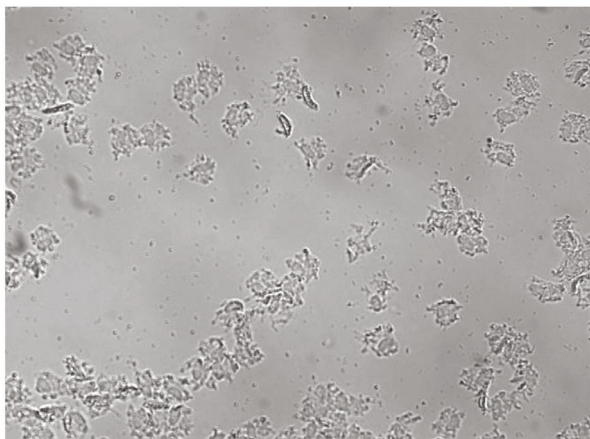
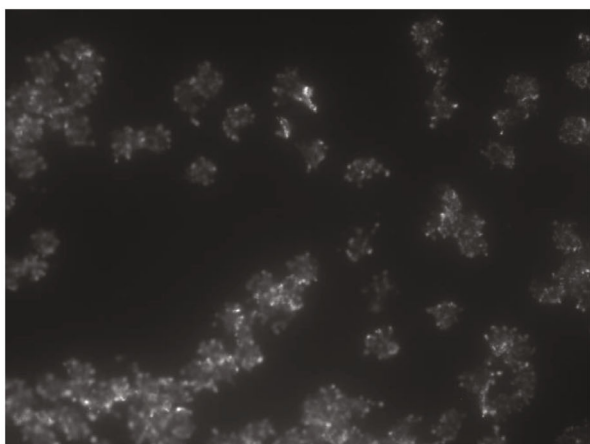


Рис. 1. Схема эксперимента по измерению стационарной концентрации внутриклеточного натрия

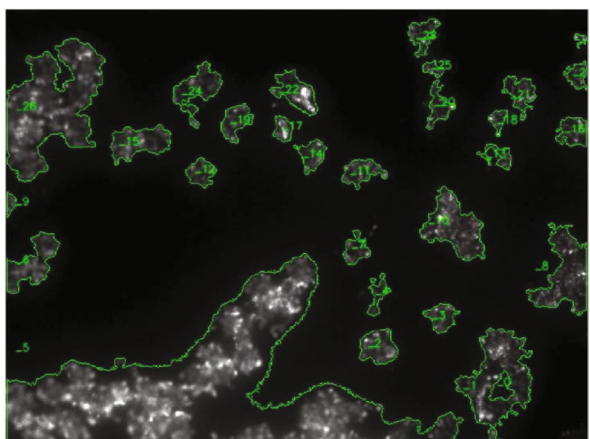
а



б



в



**Рис. 2.** Фрагмент препарата переживающих клеток эндотелия роговицы. ( $\times 25/0,8$  Plan-apochromat, Zeiss). а – Фазово-контрастное изображение; б – флуоресцентное изображение; в – флуоресцентное изображение с выделенными зонами интереса. (С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

температуре  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  и  $10\text{ mM}$  в присутствии  $100\text{ ед./мл}$  Nystatin.

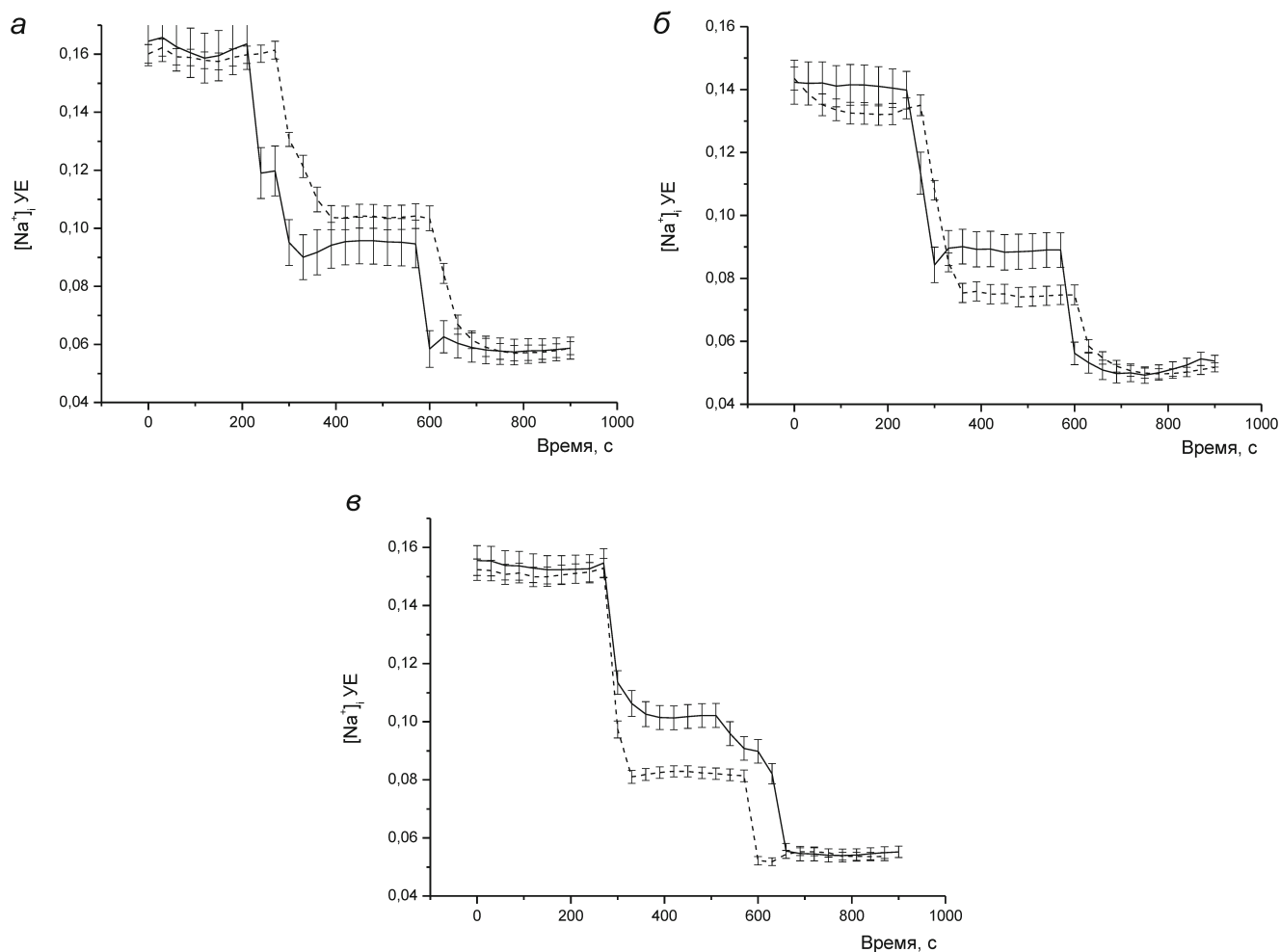
**Анализ микроизображений с помощью программы «CytoDynamics».** Для реализации компьютерной флуориметрии применяли специализированный программный пакет «CytoDynamics» (госрегистрация № 2016612766). Для цифровой обработки берутся файлы, получаемые непосредственно с камеры. «CytoDynamics» определяет контуры групп и индивидуальных клеток – области интереса (ОИ) – на начальном кадре серии и удерживает контур изображения на последующих во времени снимках (рис. 2) [18].

На изображении каждой ОИ программа определяет периметр, площадь и интегральную интенсивность флуоресценции, которая пропорциональна внутриклеточной концентрации натрия [19]. Соответствие интенсивности флуоресценции и  $[\text{Na}^+]_i$  определяли в каждой экспериментальной группе.

**Статистический анализ.** Усреднённые профили флуоресценции строили по средним значениям точек индивидуальных профилей ОИ. На графиках усреднённых профилей точки представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ). Количество профилей, усредняемых в каждой точке экспериментального профиля в группе с соответствующим временем консервации, указано в разделе. Средние величины, полученные таким образом, рассматривали как независимые. Размер выборки ( $n$ ) для определения статистических достоверностей различия  $[\text{Na}^+]_i$  определялся количеством точек на плато в периоде II и был равен  $9$  ( $n = 9$ ). Достоверности различий определяли с применением  $t$ -критерия Стьюдента для двух независимых групп. Соответствие полученных значений флуоресценции нормальному распределению определяли с помощью теста Shapiro–Wilk (Statistica 6.1, statsoft.com).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальный профиль флуоресценции Sodium Green имеет три характерных квазистационарных участка, которые соответствуют внутриклеточной концентрации натрия в этих участках (рис. 3). В интервалах I и III внутриклеточная концентрация натрия соответствует его концентрации в среде. В интервале I энергозависимый транспорт остановлен, поскольку при температуре  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  активность Na/K АТФазы подавлена, и в клетках устанавливается  $[\text{Na}^+]_i$ , равновесная со средой ( $147,4\text{ mM}$ ). В интервале III равновесие со средой устанавливается в результате повышения проницаемости плазматиче-

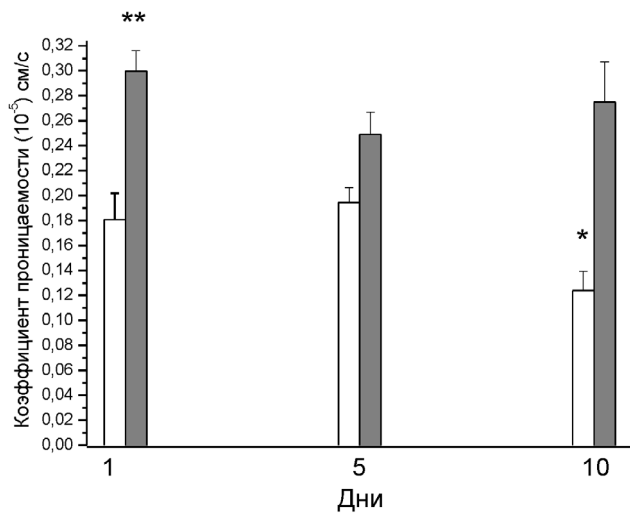


**Рис. 3.** Усреднённые профили интенсивности флуоресценции Sodium Green (условные единицы – YE). Влияние присутствия 1 нМ SkQ1 в среде консервации. *а* – 1 день (количество индивидуальных профилей ОИ: контроль – 110; эксперимент – 90), *б* – 5 дней (количество индивидуальных профилей ОИ: контроль – 100; эксперимент – 70), *в* – 10 дней (количество индивидуальных профилей ОИ: контроль – 70; эксперимент – 60). Сплошная линия – профиль препаратов, инкубированных в среде Eusol-C; пунктирная линия – профиль препаратов, инкубированных в среде Eusol-C, содержащей 1 нМ SkQ1

ческой мембраны, вызванной присутствием Nystatin. Интенсивность флуоресценции в интервале II соответствует величинам равновесной внутриклеточной концентрации натрия, которая устанавливается в клетке в результате баланса потоков ионов натрия в клетку и из клетки. Таким образом, величина  $[Na^+]_i$  определяется активностью Na/K АТФазы и скоростью входа, которая зависит от проницаемости плазматической мембраны (интервал II). В клетках эндотелия, подвергавшихся гипотермическому воздействию в консервационной среде EusolC, при 37 °С устанавливалась равновесная концентрация внутриклеточного натрия в зависимости от времени консервации и присутствия в консервационной среде 1 нМ SkQ1: 1 день –  $27,3 \pm 1,9$  и  $44,2 \pm 3,1$ ; 5 дней –  $63,2 \pm 4,8$  и  $47,3 \pm 3,2$ ; 10 дней –  $69,2 \pm 4,7$  и  $44,1 \pm 3,5$  (контрольная и

экспериментальная (1 нМ SkQ1) группы соответственно) ( $p < 0,01$ ,  $n = 9$ ). Присутствие в консервационной среде 1 нМ SkQ1 обусловило пониженный по сравнению с контролем стационарный уровень  $[Na^+]_i$  в клетках эндотелия при температуре 37 °С.

Клетки эндотелия роговицы формируют клеточный монослой, важной функцией которого является регуляция осмотического баланса стромы роговицы. В настоящее время принято описание функции эндотелия посредством так называемой «rimp-leak» модели [7, 8], которая разделяет потоки активного и осмотического переноса. Нарушение целостности клеточного монослоя эндотелия приводит к резкому возрастанию парацеллюлярных потоков, описываемых как «утечка», что вызывает отёк и снижение прозрачности роговицы. Клетки эндотелия



**Рис. 4.** Влияние гипотермической консервации на проницаемость плазматической мембраны клеток эндотелия роговицы для ионов натрия. Неокрашенные столбцы – контроль; серые столбцы – присутствие 1 нМ SkQ1 в среде консервации. \* Снижение проницаемости в контрольной группе ( $p < 0,05$ ); \*\* превышение над контрольной группой ( $p < 0,01$ )

остановлены в фазе клеточного цикла G1, и по этой причине не проходят митотическое деление [20]. С возрастом часть клеток гибнет, и целостность клеточного слоя сохраняется за счёт оставшихся живых клеток, которые также формируют сплошной клеточный слой, но с меньшим количеством клеток [21, 22]. В этой связи до настоящего времени одним из основных критериев функциональности эндотелия и пригодности роговицы для трансплантации является морфологический критерий – плотность эндотелиальных клеток, которая снижается с возрастом донора [23]. Однако этот показатель не позволяет оценивать функциональные возможности эндотелия как регулятора осмотического баланса матрикса. Возможность определить транспортный потенциал клеток эндотелия может иметь значение как для определения пригодности ткани для трансплантации после периода консервации, так и в исследовательских целях для проверки эффективности создаваемых рецептур новых сред для консервации.

В настоящей работе проводили изучение влияния присутствия в среде консервации SkQ1 на восстановление баланса потоков натрия индивидуальных клеток эндотелия после окончания гипотермического хранения. Трансмембранный электрохимический градиент натрия создаётся Na/K-АТФазой и является значимым вторичным источником энергии для транспортных процессов в клетке. Таким образом, можно считать внутриклеточную концентрацию дан-

ного иона адекватным показателем функциональной возможности транспортного механизма клетки. Результаты исследования этого показателя в контрольных образцах позволяют говорить о значительном возрастании величины равновесной  $[Na^+]_i$ , устанавливающейся при 37 °С в клетках эндотелия по мере нарастания срока гипотермической консервации. Как показали результаты наших экспериментов, проницаемость плазматической мембраны клеток эндотелия для натрия после гипотермической консервации в течение 10 дней снижается в контрольных группах, но остаётся повышенной в группах с SkQ1 (рис. 4).

Это позволяет сделать вывод, что повышение в клетках равновесной  $[Na^+]_i$  в контрольных группах связано со снижением транспортной функции Na/K-АТФазы. Присутствие в консервационной среде SkQ1 оказывает значительное и несколько неоднозначное влияние на равновесную  $[Na^+]_i$ , которая устанавливается при 37 °С в зависимости от длительности гипотермической консервации.

Как можно видеть из результатов экспериментов, препараты, хранившиеся в присутствии SkQ1, показывают близкие значения  $[Na^+]_i$  во всех экспериментальных группах. И если для одного дня гипотермической консервации эти значения превышают показатели контрольной группы (рис. 3, а), что, по-видимому, связано с повышенной проницаемостью плазматической мембраны для натрия, то в экспериментальных группах 5 и 10 дней они значительно ниже значений в контрольных группах (рис. 3, б и в). Наиболее вероятным механизмом такого эффекта может быть протекторное действие SkQ1 на функции митохондрий и обеспечение энергией функции натрий-калиевого насоса. Как было показано в ряде работ по исследованию катионных производных пластохинона (SkQ, «Скулачев-ионов»), эти производные, обладающие высокой антиоксидантной активностью, являются возобновляемыми антиоксидантами [24, 25].

Заметный антиоксидантный эффект SkQ наблюдался уже при концентрации 1 нМ. Было показано, что соединения группы SkQ (в частности, SkQ1) способны проникать через плоские бислоиные мембраны, электрофоретически накапливаться в митохондриях с высокой избирательностью и восстанавливаться дыхательной цепью. В изолированных митохондриях в наномолярных концентрациях SkQ1 чрезвычайно эффективно снижает активность радикалов  $OH\cdot$  [26]. Можно предположить, что при гипотермической консервации эффект SkQ1, обуславливающий высокую эффективность нат-

рий-калиевого насоса, объясняется высокой степенью восстановления энергетической функции митохондрий в клетках эндотелия. Производные пластохинона, включая SkQ1, в низких концентрациях способны блокировать развитие апоптоза, вызванного оксидативным стрессом: транслокацию проапоптозного белка bax в митохондрии и выход цитохрома c из митохондрий [26, 27]. Антиапоптозный эффект SkQ1, по-видимому, также может способствовать сохранению целостности клеточного монослоя и тем самым сохранению осморегулирующей функции эндотелия в процессе гипотермической консервации. Эффект SkQ1 на проницаемость клеток для ионов натрия, вероятно, вызван тем, что катионные производные пластохинона способны взаимодействовать с транспортерами плазматической мембраны и влиять на их функцию, но эти механизмы нуждаются в более глубоком исследовании.

Резюмируя результаты настоящей работы, можно сказать, что они дают основания для развития дальнейших исследований механизма действия SkQ1 на эндотелии роговицы и возможности применения этого агента в консервационных средах.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 19-08-00874 и 20-015-00147-а) и бюджетного финансирования по государственному заданию (проект № 0259-2021-0016).

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

**Соблюдение этических норм.** Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maghsoudlou, P., Sood, G., and Akhondi, H. (2020) Cornea transplantation, in *StatPearls [Internet]*, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
2. Bourne, W. M. (1998) Clinical estimation of corneal endothelial pump function, *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, **96**, 229-239.
3. Riley, M. V., Winkler, B. S., and Starnes, C. A. (1998) Regulation of corneal endothelial barrier function by adenosine, cyclic AMP, and protein kinases, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **39**, 2076.
4. Bonanno, J. A. (2012) Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump, *Exp. Eye Res.*, **95**, 2-7, doi: 10.1016/j.exer.2011.06.004.
5. Schmedt, T., Silva, M. M., Ziaei, A., and Jurkunas, U. (2012) Molecular bases of corneal endothelial dystrophies, *Exp. Eye Res.*, **95**, 24-34, doi: 10.1016/j.exer.2011.08.002.
6. Kuang, K., Li, Y., Yiming, M., Sánchez, J. M., Iserovich, P., et al. (2004) Intracellular  $[Na^+]$ ,  $Na^+$  pathways, and fluid transport in cultured bovine corneal endothelial cells, *Exp. Eye Res.*, **79**, 93-103, doi: 10.1016/j.exer.2004.02.014.
7. Riley, M., Winkler, B., Czajkowski, C., and Peters, M. (1995) The roles of bicarbonate and  $CO_2$  in transendothelial fluid movement and control of corneal thickness, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **36**, 103-112.
8. Bonanno, J. A. (2003) Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium, *Prog. Retin Eye Res.*, **22**, 69-94, doi: 10.1016/s1350-9462(02)00059-9.
9. Bonanno, J. A., Guan, Y., Jelamskii, S., and Kang, X. J. (1999) Apical and basolateral  $CO_2$ - $HCO_3^-$  permeability in cultured bovine corneal endothelial cells, *Am. J. Physiol.*, **277**, C545-C553, doi: 10.1152/ajpcell.1999.277.3.C545.
10. Baturina, G. S., Pal'chikova, I. G., Konev, A. A., Smirnov, E. S., Katkova, L. E., et al. (2018) Examining effects of hypothermic conservation on sodium level in corneal graft endothelial cells [in Russian], *Vavilovskiy Zhurnal Genetiki i Selektii*, **22**, 433-437, doi: 10.18699/VJ18.379.
11. Baturina, G. S., Katkova, L. E., Pal'chikova, I. G., Solenov, E. I., and Iskakov, I. A. (2019) New approaches to examining functional activity of endothelial cells in corneal preparations [in Russian], *Sovremennye Tekhnologii v Oftal'mologii*, **5**, 262-265, doi: 10.25276/2312-4911-2019-5-262-265.
12. Wei, Y., Troger, A., Spahiu, V., Spahiu, V., Perekhvatova, N., et al. (2019) The role of SKQ1 (Visomitin) in inflammation and wound healing of the ocular surface, *Ophthalmol. Ther.*, **8**, 63-73, doi: 10.1007/s40123-018-0158-2.
13. Brzheskiy, V. V., Efimova, E. L., Vorontsova, T. N., Alekseev, V. N., gusarevich, O. G., et al. (2015) Results of a multicenter, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical study of the efficacy and safety of Visomitin eye drops in patients with dry eye syndrome, *Adv. Ther.*, **32**, 1263-1279, doi: 10.1007/s12325-015-0273-6.
14. Silachev, D. N., Plotnikov, E. Y., Pevzner, I. B., Zorova, L. D., Balakireva, A. V., et al. (2018) Neuroprotective effects of mitochondria-targeted plastoquinone in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury, *Molecules*, **23**, 1871, doi: 10.3390/molecules23081871.
15. Solenov, E. I. (2008) Cell volume and sodium content in rat kidney collecting duct principal cells during hypotonic shock, *J. Biophys.*, **2008**, 420963, doi: 10.1155/2008/420963.
16. Ilyaskin, A. V., Karpov, D. I., Medvedev, D. A., Ershov, A. P., Baturina, G. S., et al. (2014) Quantitative estimation of transmembrane ion transport in rat renal collecting duct principal cells, *Gen. Physiol. Biophys.*, **33**, 13-28, doi: 10.4149/gpb\_2013063.
17. Ilyackin, A. V., Batupina, G. C., Medvedev, D. A., Epshov, A. P., Colenov, E. I. (2011) Examining reaction of renal collecting duct main cells to hypotonic shock. Experiment and mathematical modeling [in Russian], *Biofizika*, **56**, 550-560, doi: 10.1134/S0006350911030092.
18. Palchikova, I. G., Smirnov, E. S., and Konev, A. A. (2017) Analyses of DNA image cytometry uncertainty caused by diffractive blurring, *Appl. Mech. Mater.*, **870**, 369-374, doi: 10.4028/www.scientific.net/AMM.870.369.
19. Winslow, J. L., Cooper, R. L., and Atwood, H. L. (2002) 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.*, **118**, 163-175, doi: 10.1016/s0165-0270(02)00100-0.

20. Maycock, N. J., and Marshall, J. (2014) Genomics of corneal wound healing: a review of the literature, *Acta Ophthalmol.*, **92**, e170-e184, doi: 10.1111/aos.12227.
21. Edelhofer, H. F. (2000) The resiliency of the corneal endothelium to refractive and intraocular surgery, *Cornea*, **19**, 263–273, doi: 10.1097/00003226-200005000-00002.
22. Joyce, N. C. (2003) Proliferative capacity of the corneal endothelium, *Prog. Retin. Eye Res.*, **22**, 359–389, doi: 10.1016/s1350-9462(02)00065-4.
23. Vianna, L. M., Li, H. D., Holiman, J. D., Stoeger, C., Belfort, R. Jr., and Jun, A. S. (2016) Characterization of cryopreserved primary human corneal endothelial cells cultured in human serum-supplemented media, *Arg. Bras. Oftalmol.*, **79**, 37–41, doi: 10.5935/0004-2749.20160011.
24. Ptushenko, V. V., Solovchenko, A. E., Bychkov, A. Y., Chivkunova, O. B., Golovin, A. V., et al. (2019) Cationic penetrating antioxidants switch off Mn cluster of photosystem II in situ, *Photosynth. Res.*, **142**, 229–240, doi: 10.1007/s11120-019-00657-2.
25. Rokitskaya, T. I., Murphy, M. P., Skulachev, V. P., and Antonenko, Y. N. (2016) Ubiquinol and plastoquinol triphenylphosphonium conjugates can carry electrons through phospholipid membranes, *Bioelectrochemistry*, **111**, 23–30, doi: 10.1016/j.bioelechem.2016.04.009.
26. Antonenko, Y. N., Avetisyan, A. V., Bakeeva, L. E., Chernyak, B. V., Chertkov, V. A., et al. (2008) Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. I. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and *in vitro* studies, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1273–1287, doi: 10.1134/s0006297908120018.
27. Saretzki, G., Murphy, M. P., and von Zglinicki, T. (2003) MitoQ counteracts telomere shortening and elongates lifespan of fibroblasts under mild oxidative stress, *Aging Cell*, **2**, 141–143, doi: 10.1046/j.1474-9728.2003.00040.x.

## MITOCHONDRIAL ANTIOXIDANT SkQ1 IMPROVES HYPOTHERMIC PRESERVATION OF CORNEA

**G. S. Baturina<sup>1,2</sup>, L. E. Katkova<sup>1</sup>, I. G. Palchikova<sup>2,3</sup>,  
N. G. Kolosova<sup>1</sup>, E. I. Solenov<sup>1,2,4\*</sup>, and I. A. Iskakov<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: eugsol@bionet.nsc.ru*

<sup>2</sup> *Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia*

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

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

<sup>5</sup> *Fedorov NMRC MNTK “Eye Microsurgery”, 630096 Novosibirsk, Russia*

Diseases affecting the cornea are frequent cause of blindness worldwide and keratoplasty is important way for healing of heavy affected cornea. For successful grafting functional competence of cornea endothelial cells is crucial. It makes important improvement the mediums for hypothermic storage and methods for evaluation of functional competence of cornea. Transport of water and ions by cornea endothelium is important for viability and optic properties of cornea. The effect of SkQ1 on recovering sodium concentration in endothelial cells after hypothermic preservation of cornea was studied. For this purpose, the effect of SkQ1 on intracellular sodium concentration of pig corneal endothelium cells after hypothermic preservation at 4°C during 1, 5, and 10 days in standard Eusol-C solution was determined. Concentration of intracellular sodium in preparation of endothelial cells was assayed using fluorescent dye Sodium Green. The fluorescent images were analyzed with custom made computer program “CytoDynamics”. The estimation of sodium concentrations in pig corneal endothelium cells revealed a significant increase in the level of intracellular sodium in control samples after 10 days of hypothermic preservation. Preservation in the presence of 1.0 nM SkQ1 led to set up a lower level of the equilibrium concentration of intracellular sodium in comparison with the control at the temperature 37°C. Statistically significant decrease of plasma membrane sodium permeability of endothelial cells after 10 days of hypothermic preservation in control samples was shown. No decrease in permeability was observed in samples subjected to preservation in the presence of 1 nM SkQ1. The presence of SkQ1 increases the ability of endothelial cells to restore the concentration of intracellular sodium. SkQ1 is a promising agent that helps to preserve the functional competence of endothelial cells during cold preservation.

**Keywords:** corneal endothelium, hypothermic preservation, SkQ1, intracellular sodium