

УДК 57.085.23

МОДЕЛИРОВАНИЕ ГИПОКСИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИГИПОКСАНТОВ НА КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ

Попов Д.Ю. (лаборатория клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедицинской фотоники Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева), **Беляков Д.Ю.** (лаборатория клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедицинской фотоники Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева)

Научный руководитель – кандидат технических наук, Винокуров А.Ю. (лаборатория клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедицинской фотоники Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева)

Введение. В настоящее время, в хирургической практике при проведении операций по резекции органов используется искусственное снижение кровенаполнения тканей за счет нарушения кровотока по артериям (тепловая ишемия) для снижения кровопотерь и улучшения визуализации поврежденных участков [1]. Последствием такого воздействия является гипоксия - патологическое состояние, характеризующееся недостаточностью клеточного дыхания и, как следствие, нарушением синтеза АТФ [2]. Это сильно ограничивает время, в течение которого хирург может проводить операцию с применением тепловой ишемии [1]. В таком случае могут использоваться соединения из группы антигипоксантов, которые позволяют увеличить время операции. Причем механизмы защиты данных соединений могут различаться, а для некоторых препаратов они остаются предметом исследований. Помимо этого малоизученным вопросом являются изменения, происходящие при последующей реоксигенации [3]. Это и делает актуальным создание модельных условий гипоксии для скрининговых исследований антигипоксантов на клеточных культурах.

Существующие методы создания гипоксических условий либо требуют специального оборудования [4, 5], либо моделируют уже последствия гипоксии, т.е. ингибируют процессы с участием кислорода [6-8]. С другой стороны, в литературе описаны способы удаления кислорода из среды с помощью химических соединений [4, 5], в частности дитионита натрия, что, по нашему мнению, обладает рядом преимуществ (прямое моделирование недостатка кислорода, относительная простота и дешевизна). Однако, это соединение недостаточно изучено и, ввиду высокой реакционной способности, требует исследования с точки зрения как воздействия на клеточную культуру, так и методологии применения при длительных экспериментах. Немаловажным аспектом рассматриваемой задачи является выбор метода оценки происходящих в клетке изменений, обусловленных именно гипоксией, а не следующей за ней реоксигенацией. Так, используемое сегодня определение НФ-1а в скрининговых исследованиях использовать сложно, поэтому альтернативой может выступать определение некроза или апоптоза, которые развиваются вследствие влияния гипоксических условий на клетки [9].

Основная часть. Для моделирования гипоксических условий на клеточной культуре нами был выбран химический метод с использованием дитионита натрия с концентрацией 5 мМ [5]. Полярографические исследования с использованием датчика Кларка позволили определить, что 5 мМ раствор дитионита натрия при высоте столба жидкости 9 и 4,5 мм поддерживает концентрацию кислорода на уровне менее 1% от максимальной растворимости в течение 116 и 52 минут соответственно. Для проведения более длительных экспериментов решением могут выступать две стратегии - регулярная замена раствора дитионита или единоразовое связывание кислорода с механическим исключением поступления его в среду инкубирования. В дальнейших наших исследованиях мы использовали вторую стратегию.

С целью поиска метода оценки изменения состояния клеточной культуры в условиях гипоксии использовали двойное окрашивание с помощью Hoechst 33342 и йодида пропидия для определения общего количества и числа некротических клеток соответственно. В контрольном и экспериментальном образцах (инкубирование в условиях гипоксии в течение 3 часов) процент некротических клеток от общего количества составлял менее 0,1 %. Таким

образом, контроль данного параметра не может выступать в качестве объективного критерия оценки различий состояния культуры для задач нашего исследования. Вероятно, развитие экспериментально определяемых признаков некроза требует большего времени, чем собственно выдерживание клеток в условиях гипоксии. Однако при этом могут накладываться и последствия реоксигенации, что не позволит нам выявить результат собственно удаления кислорода из среды. Вторым методом оценки влияния гипоксии на клеточную культуру было выбрано определение доли апоптотических клеток. Одним из достаточно широко применяемых и доступных подходов является выявление фрагментации ядер и конденсации хроматина с использованием Hoechst 33342 [10]. Проведенное исследование влияния гипоксических условий на развитие апоптоза показало, что контрольная культура, которая была выдержана в течение 3 часов в сбалансированном солевом растворе Хэнкса со свободным поступлением кислорода, содержала около 10% апоптотических клеток, в то время как культура с добавлением дитионита натрия (5 мМ) и ограничением контакта с воздухом - 85 %.

Выводы. Таким образом можно сделать вывод о том, что метод моделирования гипоксических условий с использованием 5 мМ раствора дитионита натрия и ограничением контакта культуры с воздухом с последующей детекцией апоптоза с помощью зонда Hoechst 33342 можно использовать для скрининговых исследований антигипоксантов при клеточных исследованиях.

Список использованных источников:

1. Попов С.В. и др. Тепловая ишемия почки // Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2021 - 272 с.
2. Литвицкий П. Ф. Гипоксия // Вопросы современной педиатрии. – 2016 – Т. 15 – №. 1 – С. 45-58.
3. Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury //Critical care medicine. – 1988 – Т. 16 – №. 10 – С. 947-953.
4. Rinderknecht H. et al. The art of inducing hypoxia //Oxygen. – 2021 – Т. 1 – №. 1 – С. 46-61.
5. Zhao R. Z. et al. Comparison of hypoxic effects induced by chemical and physical hypoxia on cardiomyocytes //Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. – 2019 – Т. 97 – №. 10 – С. 980-988.
6. Muñoz-Sánchez J., Chánez-Cárdenas M. E. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model //Journal of Applied Toxicology. – 2019 – Т. 39 – №. 4 – С. 556-570.
7. Al Okail M. S. Cobalt chloride, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1 α in U251 human glioblastoma cell line //Journal of Saudi Chemical Society. – 2010 – Т. 14 – №. 2 – С. 197-201.
8. Tuboly E. et al. Methane biogenesis during sodium azide-induced chemical hypoxia in rats //American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2013 – Т. 304 – №. 2 – С. 207-214.
9. Shimizu S. et al. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL //Cancer research. – 1996 – Т. 56 – №. 9 – С. 2161-2166.
10. Ishikawa Y., Kitamura M. Inhibition of glomerular cell apoptosis by heparin //Kidney international. – 1999. – Т. 56. – №. 3. – С. 954-963.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации №075-15- 2022-1095.

Попов Д.Ю. (автор)

Подпись

Винокуров А.Ю. (научный руководитель)

Подпись

