

IN VITRO МОДЕЛИРОВАНИЕ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИГИПОКСАНТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРИ ТЕПЛОВОЙ ИШЕМИИ ПОЧКИ

Беляков Д.Ю.¹, Попов Д.Ю.¹, Никулин А.С.²

¹Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

elderly_fighter@vk.com

Тепловая ишемия, применяемая при проведении частичной нефрэктомии на ранних стадиях развития рака почки, позволяет существенно улучшить условия проведения операции, но приводит к острой кислородной недостаточности, а после восстановления кровообращения – к ещё более жёстким последствиям реоксигенации. Для снижения указанных отрицательных эффектов разрабатываются препараты с антигипоксическим эффектом, исследование которых требует использования адекватной модели гипоксии. Для этой цели могут быть использованы способы удаления кислорода из среды с помощью химических соединений, в частности дитионита натрия. Однако его достаточно высокая реакционная способность и, соответственно, низкая стабильность ставят вопросы об оптимальных концентрациях и времени, в течение которого данное соединение может обеспечивать необходимый уровень связывания кислорода. Немаловажным аспектом рассматриваемой задачи являются методы оценки изменений, происходящих в клетке в условиях недостатка кислорода. Для этой цели может быть использовано выявление развития клеточной гибели.

В целях моделирования гипоксии использовали раствор дитионита натрия с концентрацией 5 мМ, которая обеспечивает развитие признаков гипоксии, но не оказывает иного токсического влияния на клетки. Как следует из экспериментов с использованием датчика Кларка, ввиду невысокой стабильности кислородсвязывающая способность дитионита натрия ограничена по времени и в случае раствора с толщиной слоя 9 мм концентрация кислорода удерживается на уровне менее 1 % от максимальной растворимости в течение около 100 минут с последующим быстрым увеличением до значения, не позволяющего говорить о наличии гипоксии в системе. Для проведения более длительных экспериментов оптимальным решением может быть герметизация среды для предотвращения поступления кислорода.

Как показали исследования с применением клеточной линии эпителия почек MDCK, указанные модельные условия приводят к существенно большему снижению способности клеток к обеспечению энергопотребляющих процессов, чем это происходит в условиях полного блокирования гликолиза и окислительного фосфорилирования одновременно. Данные различия могут объясняться расходом АТФ на поддержание величины митохондриального мембранного потенциала за счет инверсного режима работы комплекса V дыхательной цепи, что находит отражение в деполяризации митохондрий под влиянием олигомицина А.

Исчерпание запасов АТФ приводит в конечном итоге к гибели клеток. Как показывает анализ с использованием Hoechst 33342 и йодида пропидия, развитие некроза нехарактерно для рассматриваемых модельных условий (доля окрашенных йодидом пропидия клеток не превышала 0,1% как в контрольной культуре, так и культуре, которую выдерживали в присутствии дитионита натрия в течение 3 ч). Однако длительная гипоксия приводит к значительным изменениям как морфологии ядер, так и интенсивности флуоресценции Hoechst 33342, которые могут рассматриваться в качестве признаков апоптоза.

На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что описанный метод моделирования гипоксических условий с использованием раствора дитионита натрия и детектированием уровня некроза можно использовать для скрининговых исследований антигипоксантов при клеточных исследованиях.

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