

УДК 57.085.23

© Э. И. Лежнев, О. А. Пивоварова, А. А. Кудрявцев, М. К. Кузьмич

АППАРАТУРА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ВЛИЯНИЯ ГИПОКСИИ НА КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ В НОРМОТЕРМИЧЕСКИХ И ГИПЕРТЕРМИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Разработана, сконструирована и изготовлена специальная аппаратура, обеспечивающая исследование действия гипоксии и гипертермии на культуры клеток. Установка позволяет культивировать клетки в заданных условиях (температура, состав газовой фазы, влажность), создавать и поддерживать контролируемую гипоксию, оценивать фазовый состав и дыхательную активность клеточной культуры.

В условиях гипоксии предварительно исследовано действие антигипоксанта гипоксена — натриевой соли [поли (2,5-дегидроксифенилен)-4-тиосульфокислоты] (полидигидроксифенилентиосульфонат натрия) — на клеточную культуру 3Т3.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящей статье приводится описание аппаратуры, предназначенной для исследования влияния гипоксии на культуры клеток. Под гипоксией понимается патологическое состояние организма при дефиците кислорода во внешней среде или нарушениях функций дыхательной, сердечно-сосудистой систем и транспортной функции крови.

Результатом гипоксии является лавинообразное развитие регионарных и тотальных отклонений в организме и его системах от гомеостатических уровней, причем в зависимости от глубины и длительности гипоксии эти отклонения могут принимать необратимый характер с летальным исходом.

Изучение гипоксии с целью эффективного предотвращения ее последствий входит в число актуальных научных направлений биофизики и фундаментальной медицины. Несмотря на различие в типах гипоксии — экзогенная, циркуляторная, гемическая, тканевая, гипероксическая или смешанная — реакция организма при гипоксических состояниях различной этиологии носит неспецифический характер. Существенная роль в этих процессах отводится генерации активных форм кислорода [1, 2, 3]. В целях предупреждения или ослабления гипоксии разрабатываются и применяются природные и синтетические антигипоксанты прямого и непрямого действия и антиоксиданты [4, 5, 6].

Исследование на животных действия гипоксии и фармакологических средств, влияющих на развитие патологических процессов, затруднено многофакторностью процессов, адаптивными свойствами целостного организма и косвенным характером проводимых измерений [1]. Представляется

перспективным использование для этой цели культур клеток. Однако при этом должны быть учтены известные ограничения в экстраполяции на организм человека данных, полученных с помощью культуральной модели.

При исследовании культур клеток в условиях экзогенной гипоксии должны быть решены следующие вопросы:

- выбор культуры, обеспечивающей адекватное ее поведение в условиях гипоксии (соотношение аэробного дыхания и гликолиза);

- оценка состояния культуры по кинетическим показателям физиологического состояния (пролиферация, гибель клеток, фазовый состав популяции, окислительная деструкция клеточных элементов);

- обеспечение возможности проведения исследований в нормотермических и гипертермических условиях;

- разработка аппаратуры для исследования влияния гипоксии на культуры клеток.

В Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН разработана аппаратура, решающая эти вопросы и обеспечивающая всестороннее исследование действия гипоксии на культуры клеток.

ОПИСАНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАЗРАБОТАННОЙ АППАРАТУРЫ

Аппаратура предусматривает возможность культивирования клеток в заданных условиях (температура, состав газовой фазы и влажность), возможность создания и поддержания контролируемой гипоксии, возможность получения и экспонирования в условиях гипоксии достаточного

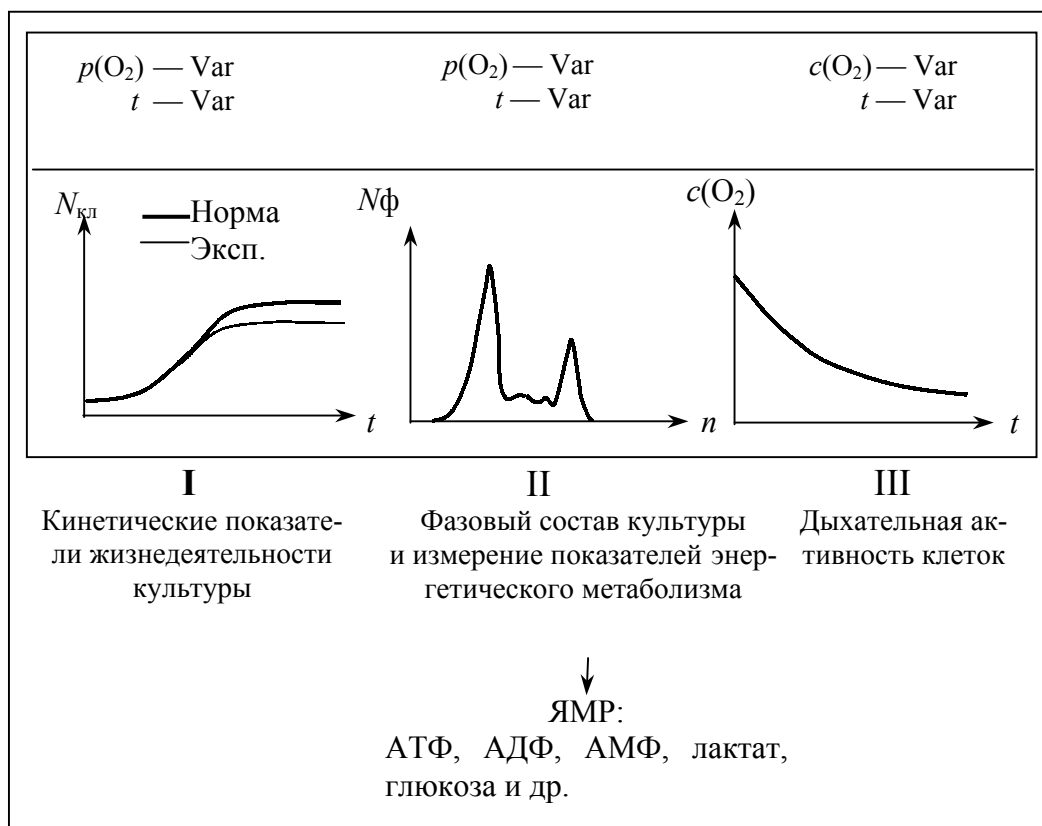


Рис. 1. Функциональный состав аппаратуры для исследования гипоксии.

$p(O_2)$ — парциальное давление кислорода; $c(O_2)$ — концентрация растворенного кислорода; $N_{кл}$ — концентрация клеток; t — время; n — номер канала проточного цитофлюориметра (характерный признак: содержание ДНК, объем клетки, количество белка и т. д.); $N_{ф}$ — количество клеток с характерным признаком

количества клеток для измерения показателей энергетического метаболизма и для оценки фазового состава культуры, возможность оценки дыхательной активности клеток. На рис. 1 представлен функциональный состав аппаратуры.

Для создания и поддержания контролируемых условий культивирования (температура, парциальное давление O_2 в газовой фазе) разработан специальный O_2 -инкубатор, схема которого приведена на рис. 2.

Поддержание температуры в контейнере с точностью до 0.2 % обеспечивается двухступенчатым регулированием и размещением контейнера 4 с культуральными сосудами 6 в термостате 2. Парциальное давление кислорода в диапазоне 1–100 % от парциального давления в атмосфере воздуха измеряется электролитической ячейкой с электродом Кларка 5. O_2 -инкубатор дает возможность устанавливать парциальное давление O_2 в контейнере в широких пределах, в том числе

и на уровне гипоксических значений. Подсчет клеток осуществляется при помощи стандартного гемоцитометра. Подсчет живых и мертвых клеток — методами флуоресцентной микроскопии с дифференциальным окрашиванием.

Для измерения содержания клеток в фазах клеточного цикла [7] и показателей энергетического метаболизма в зависимости от времени и уровня оксигенации культуры разработан специальный биореактор, схема которого приведена на рис. 3.

В термостатируемом герметичном объеме 1 обеспечивается перемешивание клеточной суспензии с одновременным измерением концентрации растворенного кислорода электродом Кларка 5 при продувке реактора газовой смесью заданного состава.

Плунжер 2 позволяет удалить остатки газа из реактора и периодически отбирать пробы для проточной цитометрии и биохимических анализов без нарушения герметизации.

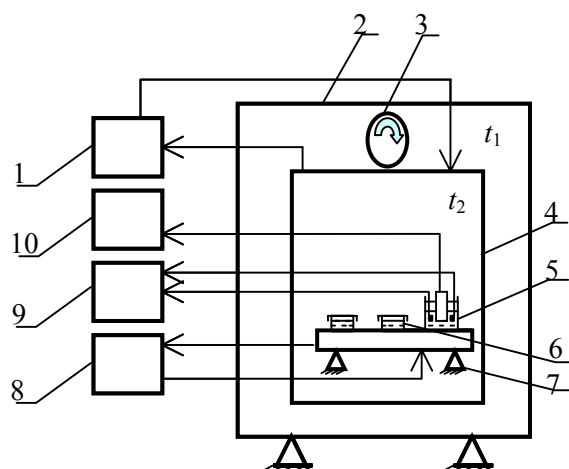


Рис. 2. O₂-инкубатор.

1 — устройство продувки контейнера азотом; 2 — воздушный термостат; 3 — вентилятор; 4 — биоконтейнер; 5 — электролитическая ячейка (измерение растворенного O₂); 6 — культуральные сосуды; 7 — термостатируемый столик; 8 — ультратермостат; 9 — блок контроля уровня воды в ячейке для измерения O₂; 10 — блок измерения $p(\text{O}_2)$

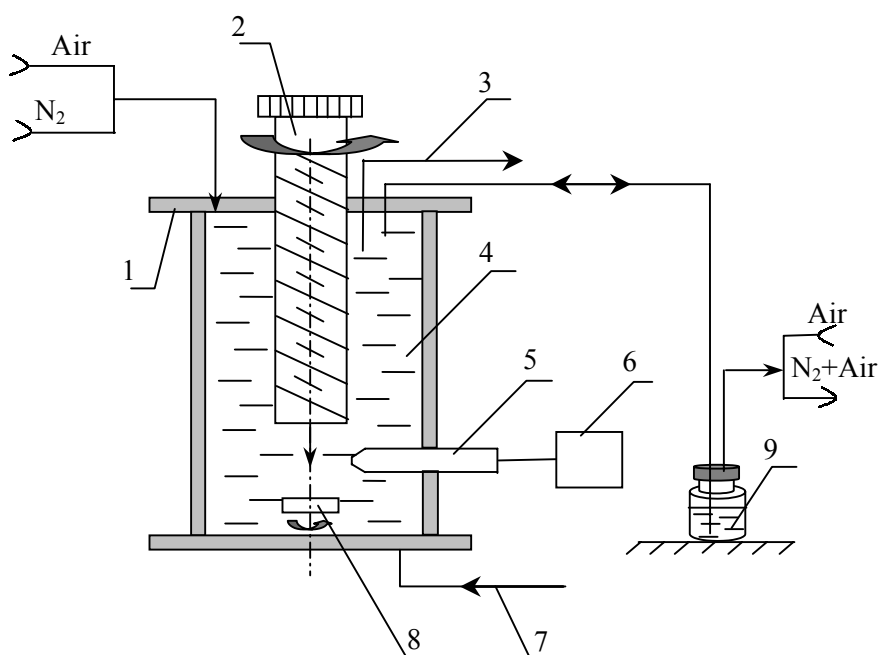


Рис. 3. Биореактор.

1 — корпус биореактора; 2 — плунжер; 3 — отбор среды с клетками; 4 — суспензия; 5 — измерительный электрод; 6 — блок измерения $p(\text{O}_2)$; 7 — заливка среды; 8 — побудитель перемешивания; 9 — вспомогательный сосуд

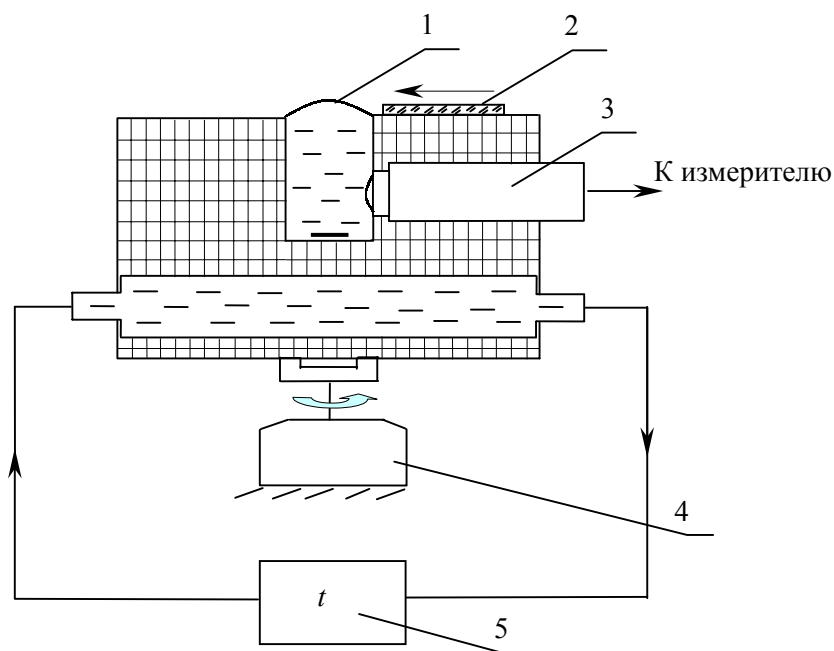


Рис. 4. Камера для оценки дыхательной активности.

1 — суспензия клеток; 2 — покровное стекло; 3 — электрод; 4 — магнитная мешалка; 5 — ультратермостат

Для измерений потребления клетками кислорода разработана камера, показанная на рис. 4. Рабочий объем камеры 1.5 см^3 заполняется средой с клетками до выпуклого мениска. Излишек среды удаляется покровным стеклом, притертым к поверхности камеры. При этом устраняются воздушные пузырьки, которые могут стать источником погрешности, и исключается поступление кислорода в камеру из окружающего воздуха. Температура в камере поддерживается на заданном уровне. Собственное потребление кислорода измерительным электродом в среде $U_{\text{автопотр}}$ составляет $0.00045 \text{ ммоль}/(\text{л} \cdot \text{мин})$.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Иллюстрацией работоспособности описанной выше аппаратуры и ее пригодности к исследованию влияния гипоксии на культуры клеток могут служить некоторые результаты, полученные на клеточной культуре ЗТЗ [8] в условиях гипоксии при воздействии на клетки в качестве антигипоксанта гипоксена [9] в терапевтических концентрациях.

Выбор клеточной культуры продиктован необходимостью использования минимально транс-

формированной линии, сохраняющей способность к регуляции пролиферации и достаточно изученной в условиях длительного культивирования. Для того чтобы исключить сложности, связанные с необходимостью использования многокомпонентной газовой смеси — O_2 , N_2 , CO_2 — для поддержания необходимого значения pH, была применена среда L-15, допускающая рост клеток в атмосфере воздуха [10, 11].

Потребление кислорода определялось по формуле

$$U_{\text{п}} = ((C_1 - C_2) - U_{\text{автопотр}} \cdot \Delta t) / (\Delta t \cdot N_{\text{кл}}),$$

где C_1 — начальная концентрация кислорода в камере; C_2 — конечная концентрация кислорода в камере; Δt — время измерения потребления кислорода; $N_{\text{кл}}$ — концентрация клеток в камере.

Экспериментальное определение собственного потребления кислорода измерительным электродом:

C_1 , ммоль/л	— 0.197
C_2 , ммоль/л	— 0.188
ΔC , ммоль/л	— 0.009
Δt , мин	— 20
$U_{\text{автопотр}}$, ммоль/(л·мин)	— 0.00045

Распределение клеток по фазам клеточного цикла

Фаза Условия	G1, %	S, %	G2+M, %
Норма (N)	51 ± 3	32 ± 5	17 ± 3
Гипоксия (H)	50.5 ± 1	39.5 ± 2	10 ± 1

Измерение дыхания клеток линии NIH 3T3:

Объем среды в камере, мл	— 1.5
$N_{\text{кл}}$, млн	— 2.25
Δt , мин	— 30
C_1 , ммоль/л	— 0.197
C_2 , ммоль/л	— 0.136
$U_{\text{п}}$, ммоль/(кл.·мин)	— $7.03 \cdot 10^{-10}$

При этом установлено:

— удельная скорость роста культуры клеток в условиях гипоксии составляет 20 % от нормы;

— потребление кислорода клетками при инкубировании с гипоксеном снижается по сравнению с инкубированием без гипоксена в среднем на 30 %;

— происходит изменение фазового состава культуры 3T3 в условиях гипоксии (таблица), так что следствием гипоксии может быть значительное перераспределение клеток в фазах G2+M.

Таким образом, аппаратура в приведенном в настоящей статье составе методически и метрологически позволяет исследовать влияние гипоксии на культуры клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ № 01-04-97035 и грантом "Наукоград 2004" № 04-04-97296.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Медведев Ю.В., Толстой А.Д. Гипоксия и свободные радикалы в развитии патологических состояний организма. М.: ООО "Терра-Календер и Промоушн", 2000. 232 с.
2. Бураков Е.Б., Храпова Н.Г. Перекисное окис-

ление липидов и природные антиоксиданты // Успехи химии. 1985. Т. 54, № 9. С. 1540–1558.

3. Лукьянова Л.Д. Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции // Бюлл. эксп. биол. и мед. 1997. Т. 124, № 9. С. 244–254.
4. Мануйлов С.Е., Нестерев Л.А., Орлов Е.И. и др. Действие цитохрома C, галактозы и уридин-трифосфата на рост прививаемых опухолей // Вопросы онкологии. 1973. Т. 19, № 7. С. 62–65.
5. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Биологическая роль глутатиона // Успехи совр. биол. 1990. Т. 110, вып. 1. С. 20–32.
6. Пальмина Н.П., Мальцева Е.Л., Курнакова Н.В. и др. Влияние α -токоферола в широком спектре концентраций (10^{-2} – 10^{-17} М) на активность протеинкиназы C. Связь с пролиферацией и опухолевым ростом // Биохимия. 1994. Т. 59, вып. 2. С. 134–200.
7. Лежнев Э.И., Кудрявцев А.А. и др. Сравнительное изучение цитотоксического действия гипертермии на культивируемые клетки на разных фазах клеточного цикла в непрерывном и периодическом режимах гипертермических воздействий // Клеточные культуры: Информ. бюлл. 2002. Вып. 17. С. 4–9.
8. Баркан Р.С., Никольский Н.Н. Минимально трансформированные клеточные линии 3T3 как объект исследования механизмов пролиферации // Цитология. 1985. Т. XXVII, № 1. С. 5–26.
9. Смирнов В.С., Кузьмич М.К. Гипоксен. СПб.—М.: ФАР Миндекс, 2001. 104 с.
10. Пинаев Г.П. Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. 320 с.
11. Leibovitz A. The growth and maintenance of tissue-cell cultures in the free gas exchange with the atmosphere // Am. J. Hyg. 1963. V. 78. P. 173–178.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино (Лежнев Э.И., Пивоварова О.А., Кудрявцев А.А.)

ЗАО "Корпорация Олифен", г. Москва (Кузьмич М.К.)

Материал поступил в редакцию 26.11.2003.

EQUIPMENT FOR INVESTIGATION OF THE HYPOXIA INFLUENCE ON CELLULAR CULTURES IN NORMOTHERMAL AND HYPERTHERMAL CONDITIONS

E. I. Lezhnev, O. A. Pivovarova, A. A. Kudryavtsev, M. K. Kuzmich^{*}

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino

^{}OLIFEN Corporation (Close Joint-Stock Company), Moscow*

Special equipment to study the effect of hypoxia and hyperthermia on cell cultures is developed, designed and made. The installation allows one to cultivate cells in special conditions (temperature, gas phase composition, humidity), create and maintain controllable hypoxia, estimate the cellular culture phase composition and respiratory activity.

The action of the antyhypoxant Hypoxen (poly(dihydroxyphenylenethiosulfonate sodium)) on the cellular culture 3T3 is preliminarily investigated in hypoxia conditions.