

ГАЗОРАЗРЯДНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МОНОНУКЛЕАРОВ

О. В. Сорокин¹, В. В. Абрамов², В. Ю. Куликов¹, К. Г. Коротков³

¹ *ГУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет Росздрава» (г. Новосибирск)*

² *Институт клинической иммунологии СО РАМН (г. Новосибирск)*

³ *НИИ физической культуры и спорта (г. Санкт-Петербург)*

В статье описывается проверка гипотезы о связи метаболической активности клеток с параметрами оптико-электронной эмиссии в условиях пролиферативного ответа на митоген.

Ключевые слова: метаболическая активность клеток, пролиферативный ответ, динамика изменений ГРВ-параметров

Введение. Свечение объектов различной интенсивности в электромагнитных полях высокой напряжённости было обнаружено более 200 лет назад и с тех пор постоянно привлекало внимание исследователей (обзор литературы можно найти в [1]). Однако, только с созданием программно-аппаратных комплексов газоразрядной визуализации (ГРВ) в 1995 г. исследование этого свечения получило статус научного направления. С тех пор были детально исследованы физические механизмы формирования свечений, сертифицированы программно-аппаратные комплексы для приложений в медицине, биологии, материаловедении [1].

В частности, исходя из доказанной возможности метода ГРВ определять различия в физико-химических характеристиках растворов неорганических веществ и биологических жидкостей, была показана эффективность использования данного метода в количественной регистрации специфического взаимодействия антиген – антитело в реакции агглютинации [2].

Ранее нами было показано, что образцы с клетками имеют достоверные воспроизводимые различия по параметрам оптико-электронной эмиссии в отличие от контрольного образца, содержащего только среду. Кроме того, было обнаружено, что образцы, содержащие разное количество клеточного материала, имеют достоверные различия в параметрах оптико-электронной эмиссии. В рамках этой же серии экспериментов впервые были выявлены газоразрядные особенности фенотипически разных клеточных популяций, в частности, между спленоцитами и тимоцитами мышей в образцах с равным количеством клеток в одинаковом объёме [3].

Задачей настоящего исследования была проверка гипотезы о связи метаболической активности клеток с параметрами оптико-электронной эмиссии в условиях пролиферативного ответа на митоген.

Материалы и методы. Для регистрации параметров оптико-электронной эмиссии клеток мышей использована технология оценки характеристик газового разряда вокруг капли [1] заданного объёма (10 мкл), находящейся на капилляре одноразового инсулинового шприца с насадкой, получаемой путём её нанесения вариационной пипеткой.

Капля, содержащая клетки заданного цитоза, помещается на расстоянии 2,5 мм от поверхности диэлектрической кварцевой пластины, на которую подаются импульсы напряжения от импульсного генератора. При высокой напряжённости поля в газовой среде пространства контакта капли и пластины развивается разряд в газовой фазе, параметры которого определяются свойствами объекта. Свечение разряда в диапазоне 200–760 нм с помощью оптической системы и ПЗС-камеры преобразуется в видеосигналы, которые поступают в виде серии кадров в компьютер. Специализированный программный комплекс позволяет провести обработку изображений (ГРВ-грамм), представляющих собой пространственное распределение освещённости на ПЗС-матрице, зависящее от состояния исследуемого объекта.

Производилась запись 10 капель из различных проб (среда, клетки и т.д.) с частотой 20 кадров в секунду и продолжительностью воздействия электромагнитного поля 5 секунд. Дефектные видеозаписи сигнала подвергались визуальной выбраковке.

В качестве биологического материала были использованы спленоциты мышей линии (СВА*С57BL/6)F1, полученные по стандартной методике [4]. После выделения клеток производилась их сепарация на градиенте плотности фиколл-верографина (плотностью 1760), для получения мононуклеаров. Кроме того, данная процедура позволяет отделить живые клетки от нежизнеспособных и повреждённых клеток [4], что позволило в дальнейшем связать особенности оптико-электронной эмиссии именно с наличием в среде жизнеспособного клеточного материала. В качестве среды использовался раствор RPMI 1640 (Вектор, Новосибирск). Подсчёт клеток производился в камере Горяева по стандартной методике [4].

Посадка клеточного материала проводилась из расчёта 100 тыс. клеток на 50 мкл полной культуральной среды в лунку, куда добавлялся 50 мкл митогена КонА в базовой концентрации 60 мг / 1 мл. В качестве полной культуральной среды использовался раствор RPMI с внесением HEPES и FSC.

Проводилась экспозиция в 24, 48 и 72 часа с параллельной оценкой степени пролиферативной активности по включению тимидиновой метки и характеристик газоразрядных параметров суспензии клеток в условиях контроля (без стимуляции митогеном) и опыта (при стимуляции митогеном – конконавалином А).

Особенностью данного этапа было уравнивание образцов по количеству клеток, таким образом, контроль и опыт отличались только по степени метаболической активности. Кроме того, после экспозиции клетки в опыте и контроле отмывались и разводились в одинаковой среде для исключения влияния продуктов секреции спленоцитов во время экспозиции. Данные условия позволяли предположить, что полученные различия в газоразрядных характеристиках спленоцитов мышей в большей степени связаны с разным уровнем метаболической активности клеток при нахождении последних в фазе

физиологического покоя (G0) и в условиях пролиферативного ответа (M). Статистические результаты представлены на графиках в виде $M \pm SD$ (среднее и стандартное отклонение)

Результаты и их обсуждение. При оценке спонтанной пролиферативной активности классическим методом по включению тимидиновой метки наблюдаются достоверные различия между 24-, 48-часовыми пробами и 72-часовой пробой. Причём в условиях трёхдневной экспозиции параметры счёта приблизительно соответствуют фоновым значениям (рис. 1).

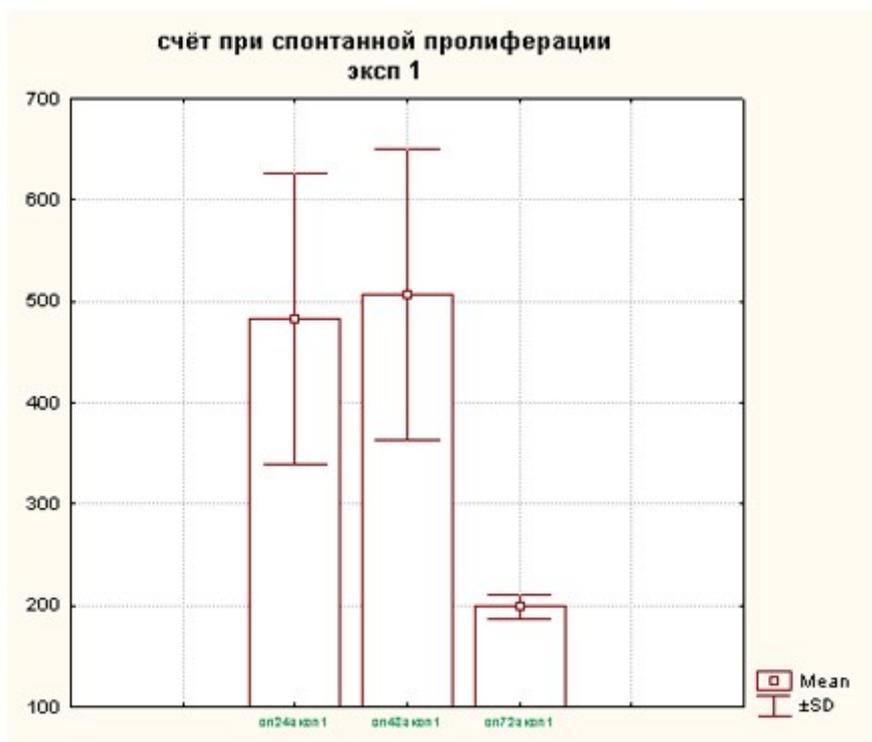


Рис. 1. Динамика изменения счёта (включения тимидиновой метки) при спонтанной пролиферации спленоцитов

На графиках здесь и далее показаны значения: столбец 1 – счёт при 24-часовой экспозиции; столбец 2 – счёт при 48-часовой экспозиции; столбец 3 – счёт при 72-часовой экспозиции.

При оценке этих же образцов методом газоразрядной визуализации было обнаружено, что площадь оптико-электронной эмиссии достоверно снижается при 48-часовой экспозиции в сравнении с 24- и 72-часовыми пробами (рис. 2).

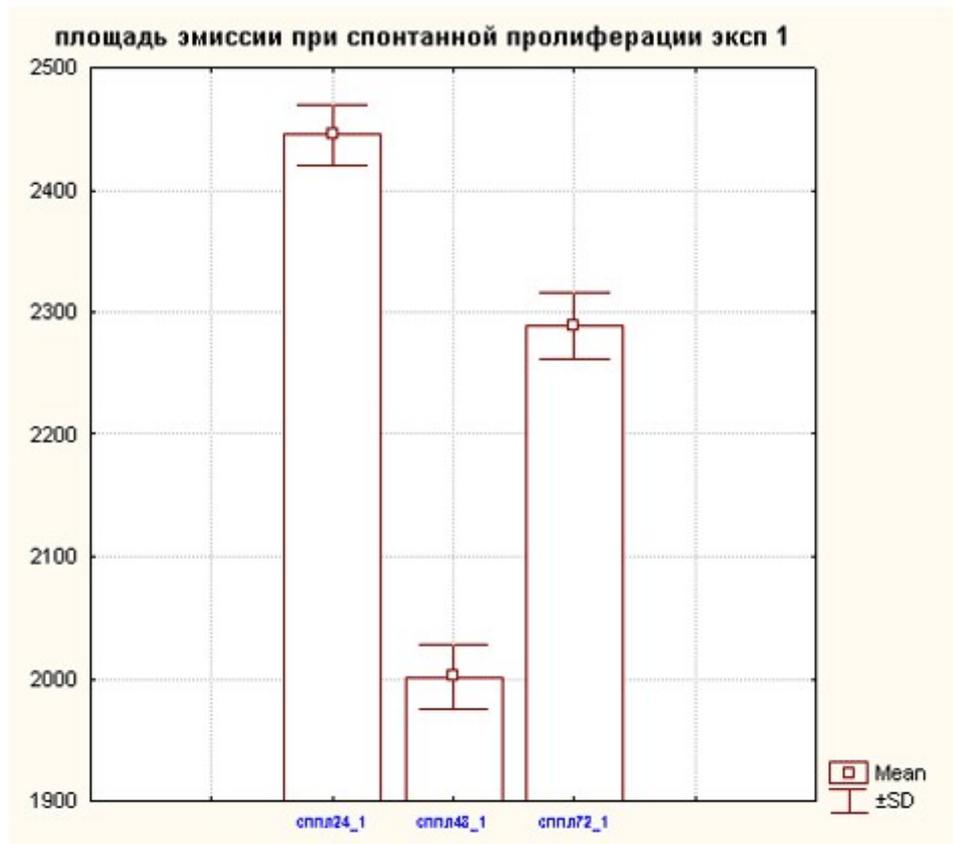


Рис. 2. Динамика изменения площади опико-электронной эмиссии суспензии спленоцитов при спонтанной пролиферации

Кроме того, наблюдалось последовательное достоверное снижение интенсивности опико-электронной эмиссии суспензии спленоцитов при увеличении времени экспозиции (рис. 3).

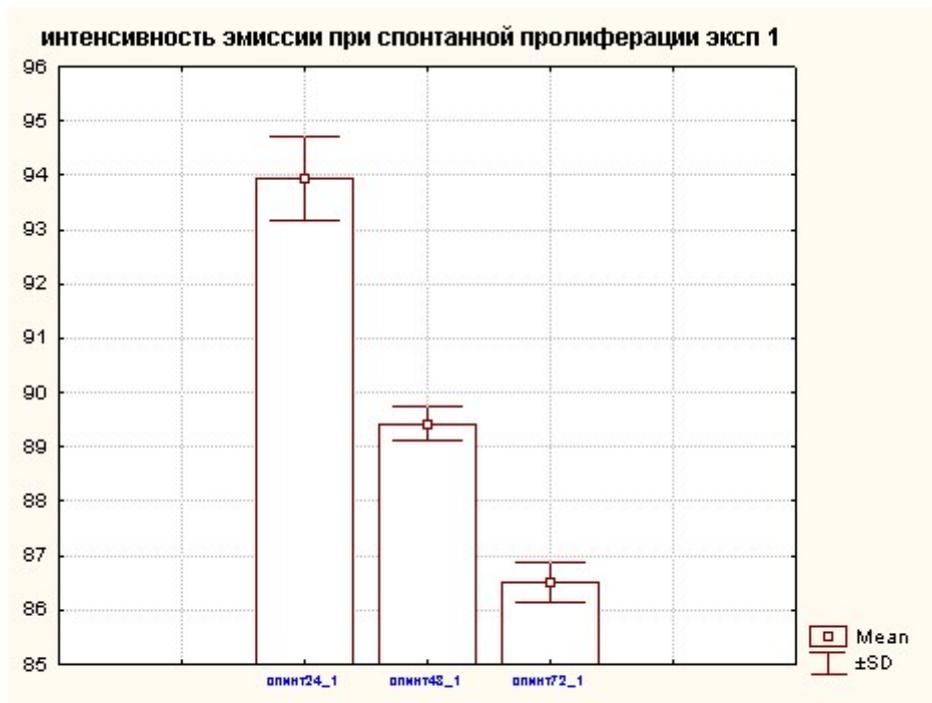


Рис. 3. Интенсивность ГРВ-эмиссии суспензии спленоцитов при спонтанной пролиферации

Таким образом, в условиях спонтанной пролиферации (без добавления митогена) наблюдается сопряжение между степенью пролиферативной / метаболической активностью и параметрами оптико-электронной эмиссии суспензии клеток.

При оценке пролиферативной активности клеток после стимуляции митогеном наблюдаются достоверные различия во всех трёх пробах между собой по количеству включённой тимидиновой метки (рис. 4).

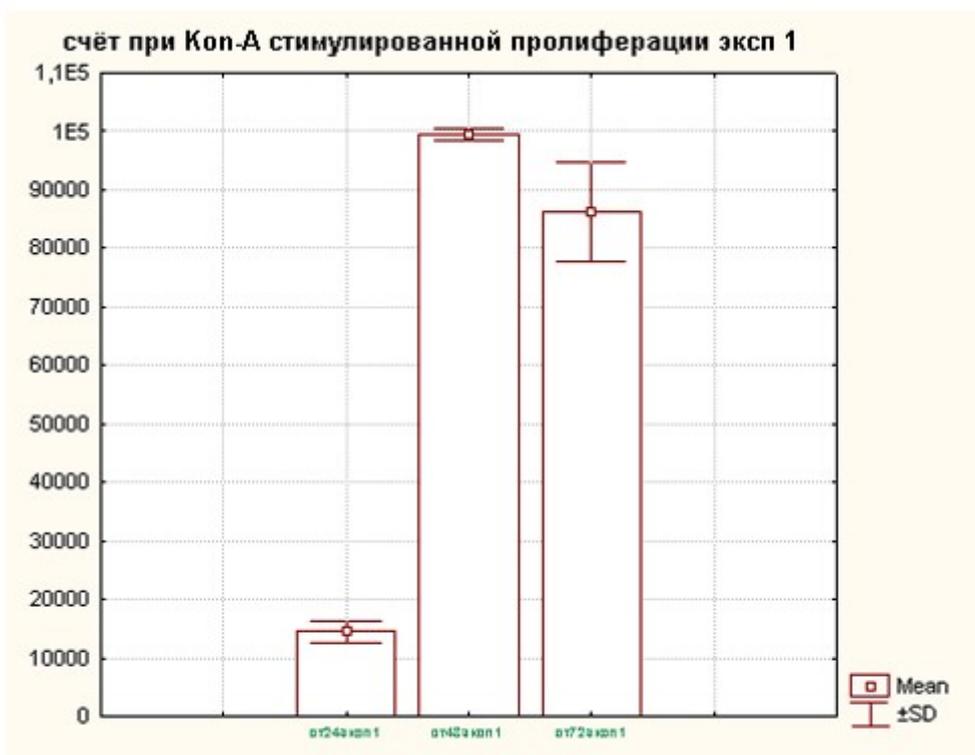


Рис. 4. Динамика изменения счёта при КонА стимулированной пролиферации спленоцитов

При этом наблюдаются достоверные различия площади эмиссии во всех трёх пробах между собой, причём наименьшая площадь регистрируется при 48-часовой экспозиции (рис. 5).

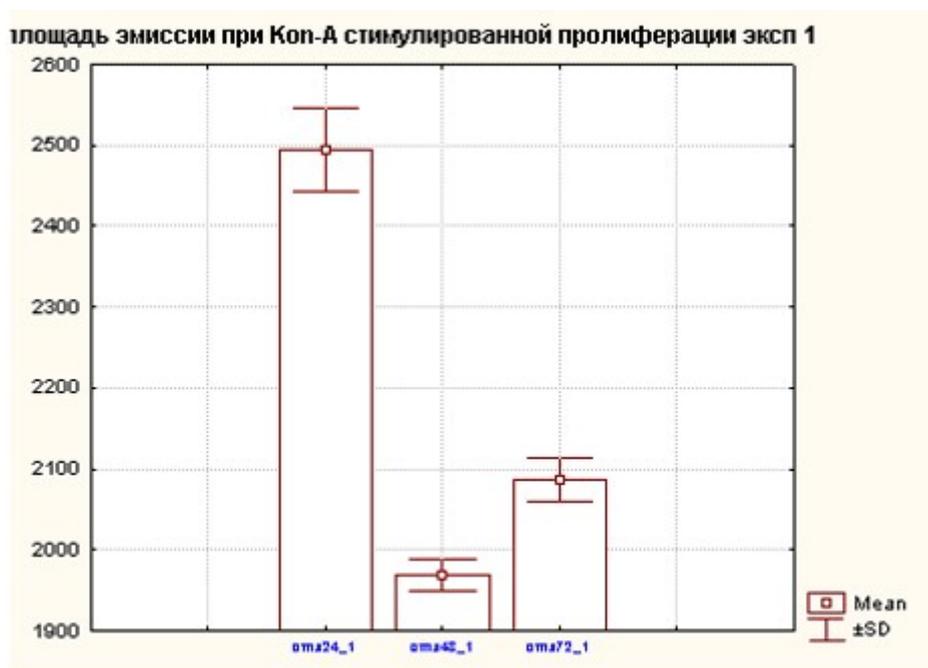


Рис. 5. Динамика изменения площади опико-электронной эмиссии при КонА стимулированной пролиферации спленоцитов

В то же время, наблюдается последовательное достоверное снижение интенсивности оптико-электронной эмиссии суспензии спленоцитов при увеличении времени экспозиции в условиях стимуляции митогеном, что свидетельствует об обратной связи степени активности клеток и интенсивности свечения суспензии клеток (рис. 6).

Сопоставляя данные при спонтанной и стимулированной пролиферации, можно обнаружить, что при 48-часовой экспозиции наблюдается более значительное снижение площади эмиссии, в сравнении с 24- и 72-часовой экспозициями. Кроме того, обращает на себя внимание тот факт, что с увеличением времени экспозиции – степень пролиферативно/метаболической активности возрастает, а интенсивность оптико-электронной эмиссии суспензии клеток последовательно снижается.

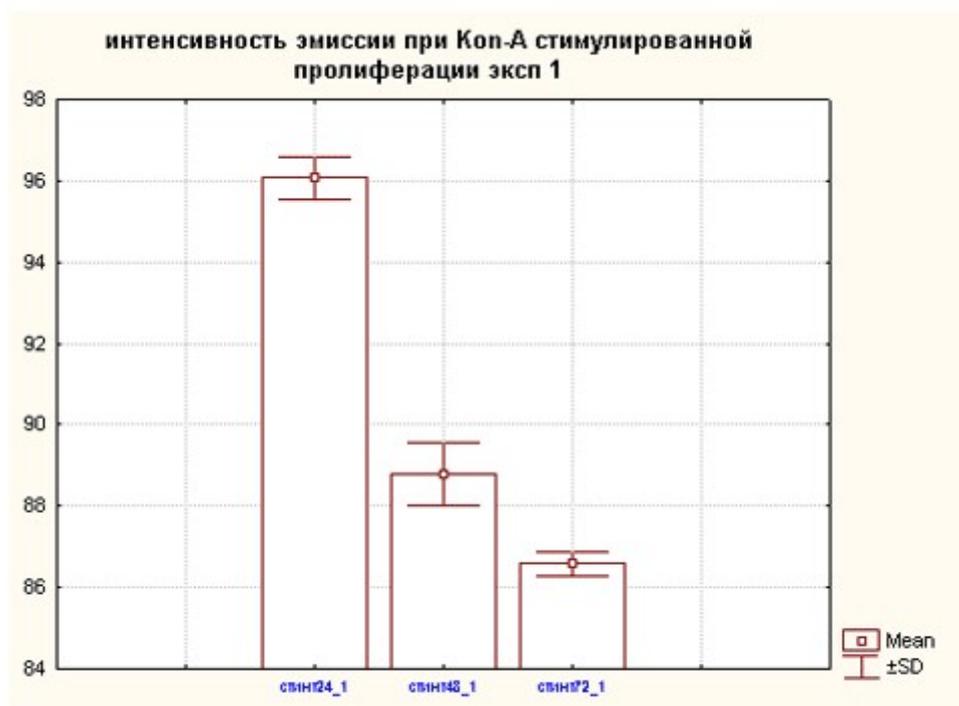


Рис. 6. Динамика изменения интенсивности оптико-электронной эмиссии при КолА стимулированной пролиферации спленоцитов

Причём указанная закономерность наблюдается как в контроле (спонтанная пролиферация), так и в опытном образце (при стимуляции митогеном).

Однако, абсолютные значения площади и интенсивности эмиссии при стимулированной пролиферации в течение 3-дневной экспозиции изменяются не линейно.

Так, при сравнении интенсивности эмиссии контрольного и опытного образца после 24-часовой экспозиции наблюдаются достоверные различия, причём наблюдается достоверное повышение интенсивности свечения в суспензии спленоцитов стимулированных митогеном (рис. 7).

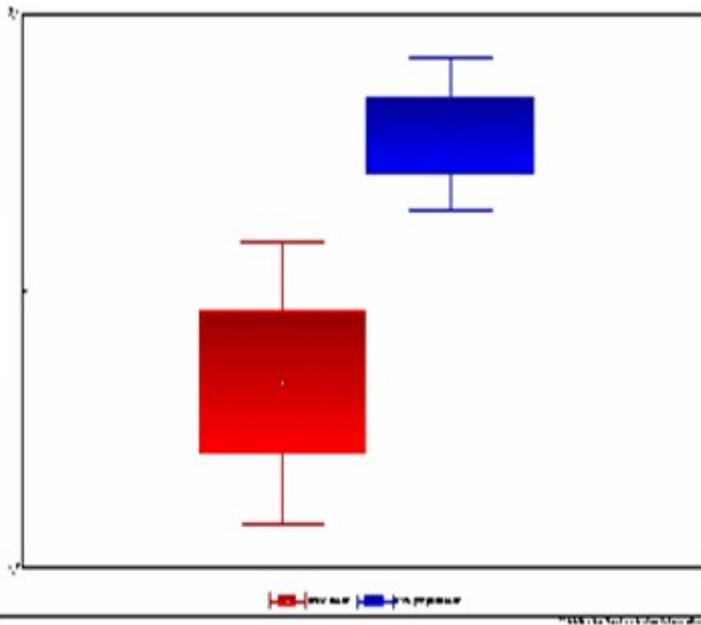


Рис. 7. Различия в интенсивности оптико-электронной эмиссии суспензии спленоцитов при спонтанной и KopA-стимулированной пролиферации в условиях 24-часовой экспозиции

Кроме того, наблюдается достоверное увеличение площади эмиссии в образце, стимулированном митогеном в сравнении с контролем при 24-часовой экспозиции (рис. 8).

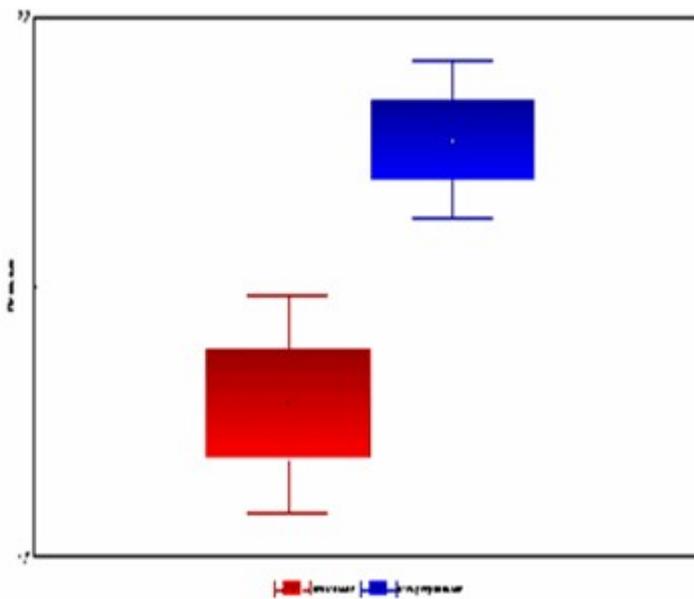


Рис. 8. Различия в площади оптико-электронной эмиссии суспензии спленоцитов при спонтанной и KopA-стимулированной пролиферации в условиях 24-часовой экспозиции

В то же время, при 48-часовой экспозиции было обнаружено снижение площади эмиссии в образце, стимулированном митогеном (рис. 9).

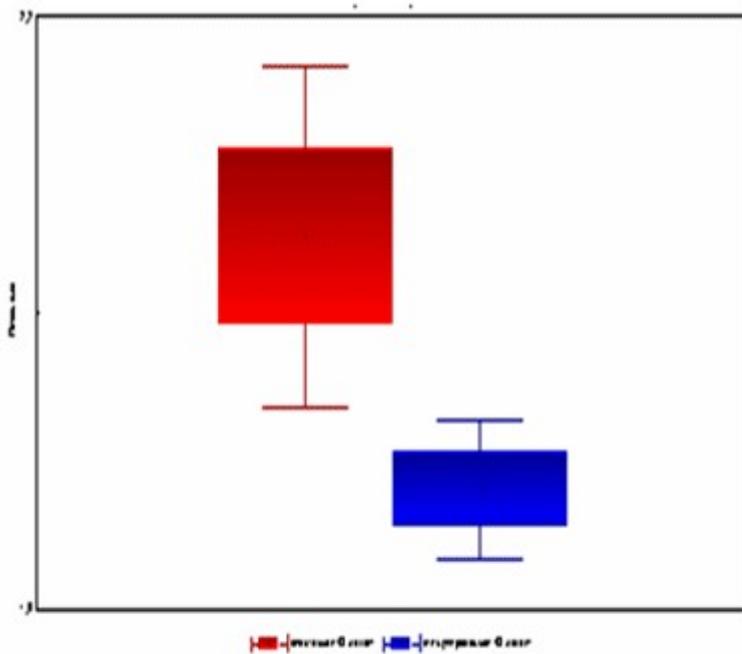


Рис. 9. Различия в площади опико-электронной эмиссии суспензии спленоцитов при спонтанной и KopA-стимулированной пролиферации в условиях 48-часовой экспозиции

При 72-часовой экспозиции также наблюдается снижение площади интенсивности свечения в образце, стимулированном митогеном (рис. 10). Было обнаружено, что при увеличении степени KopA-индуцированной пролиферативной (метаболической) активности в условиях 24-часовой экспозиции интенсивность свечения суспензии спленоцитов снижается (рис. 11).

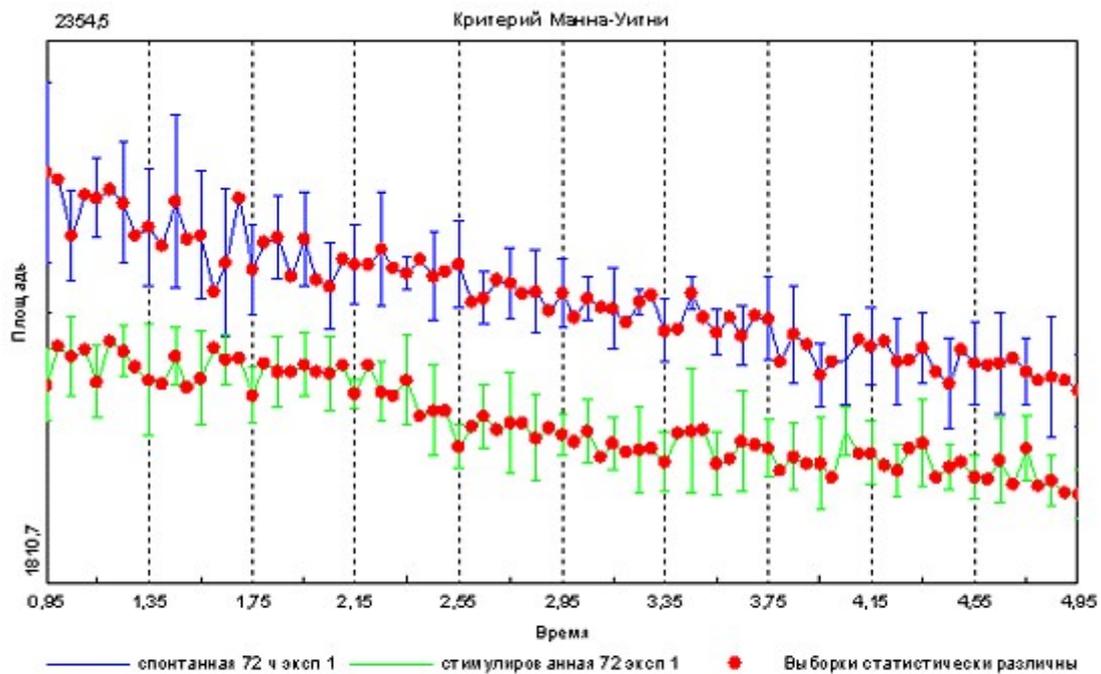


Рис. 10. Динамика изменения площади опико-электронной эмиссии суспензии спленоцитов при спонтанной и KopA-стимулированной пролиферации в условиях 72-часовой экспозиции

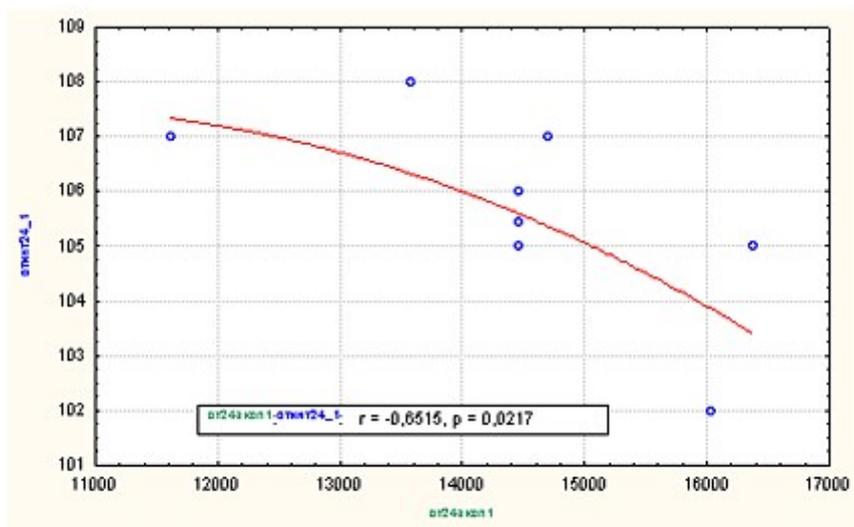


Рис. 11. Характер зависимости интенсивности свечения от степени КоnА стимулированной пролиферации в условиях 24-часовой экспозиции в 1 эксперименте

В то же время, зависимость интенсивности свечения от степени спонтанной пролиферативной активности в условиях 72-часовой экспозиции носит нелинейный характер, при этом в диапазоне счёта от 180 до 200 у. е. наблюдается усиление интенсивности свечения, а в диапазоне более 200 снижение интенсивности свечения (рис. 12).

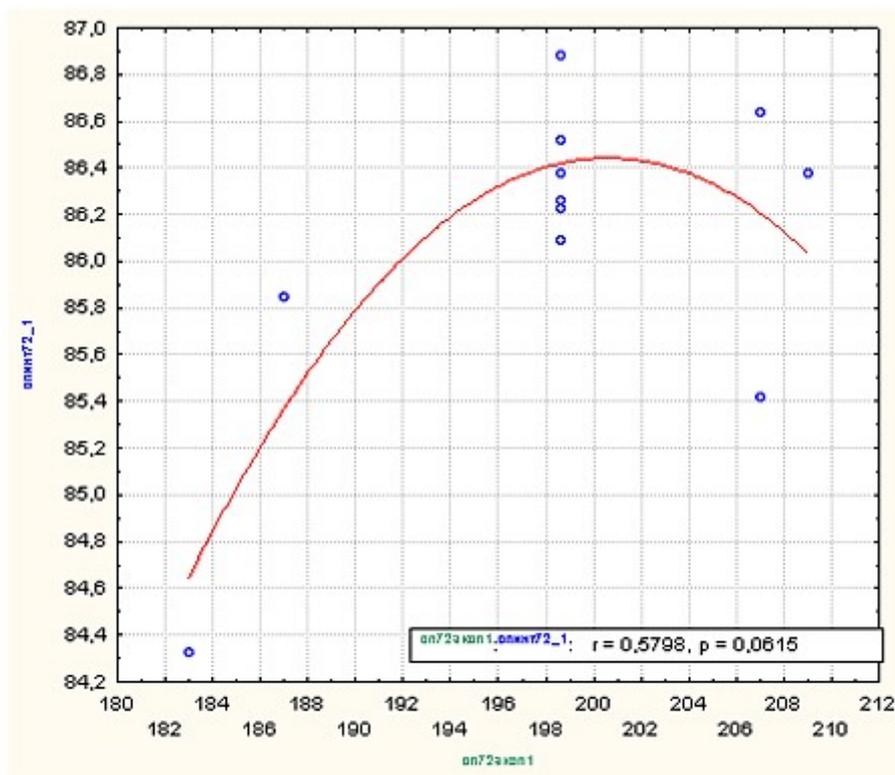


Рис. 12. Характер зависимости интенсивности свечения от степени спонтанной пролиферации в условиях 72-часовой экспозиции в 1 эксперименте

При 72-часовой экспозиции наблюдается линейная зависимость между площадью свечения суспензии клеток и степенью пролиферативной активности после стимуляции митогеном (рис. 13).

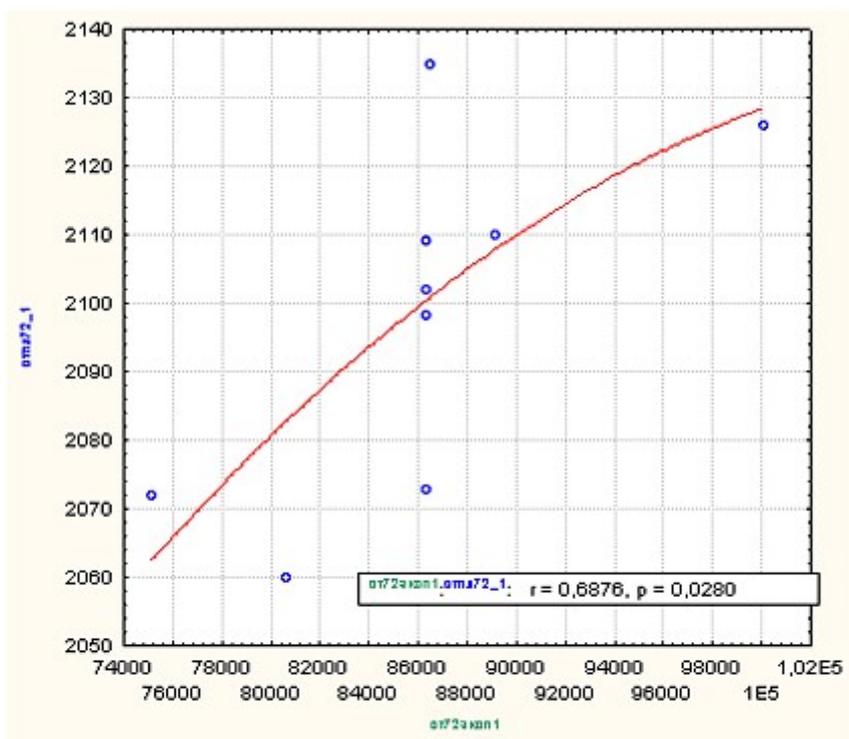


Рис. 13. Характер зависимости площади свечения от степени стимулированной пролиферации в условиях 72-часовой экспозиции в 1 эксперименте

Обобщая представленные данные, можно отметить следующее. При 48-часовой экспозиции наблюдается более значительное снижение площади эмиссии, в сравнении с 24- и 72-часовой экспозициями. Это, по-видимому, связано с последовательным переходом клеток в разные фазы клеточного цикла, в условиях которых клетка по-разному структурирует воду. С увеличением времени экспозиции – степень пролиферативно/метаболической активности возрастает, а интенсивность оптико-электронной эмиссии суспензии клеток последовательно снижается. При этом, мы предполагаем, что снижение интенсивности связано с тем, что клетки выступают в роли акцептора свободных электронных состояний, уменьшая плотность первичной фотоэлектронной лавины. При этом, чем больше метаболическая активность клетки, тем больше требуется вакантных электронно-возбуждённых состояний.

Выводы:

1. Сопряжение между выраженностью пролиферативного ответа и параметрами газового разряда суспензии клеток имеет нелинейный характер, связанный как со временем экспозиции, так и с особенностями спонтанной и стимулированной пролиферации.
2. Характерна двухфазная динамика изменений ГРВ-параметров, в частности при 24-часовой экспозиции площадь и интенсивность фотоэлектронной эмиссии клеток, стимулированных митогеном увеличиваются; а после 72-часовой экспозиции снижаются в сравнении контролем.
3. Так как клетки были уравнены по цитозу и отмыты от культивируемой среды, полученные различия по ГРВ с определённой долей уверенности могут быть связаны именно с метаболической активностью клеток.

Список литературы

1. Коротков К. Г. Основы ГРВ биоэлектрографии / К. Г. Коротков. – СПб. : ИТМО, 2001. – 360 с.
2. Степанов А. В. Количественная регистрация специфического взаимодействия антиген – антитело в реакции агглютинации методом ГРВ / А. В. Степанов // Тезисы международного конгресса по биоэлектрографии. – СПб., 2006. – С. 37–39.
3. Сорокин О. В. Применение метода газоразрядной визуализации в изучении опико-электронных свойств моноклеаров мышей / О. В. Сорокин, В. В. Абрамов, К. Г. Коротков // Тезисы международного конгресса по биоэлектрографии. – СПб., 2006. – С. 37–39.
4. Ярилин А. А. Основы иммунологии / А. А. Ярилин. – М. : Медицина, 2004. – 608 с.

Учредитель электронного периодического издания - журнала "Медицина и образование в Сибири" - Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Новосибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию РФ"

Государственная лицензия ГОУ ВПО НГМУ Росздрава на образовательную деятельность:
серия АА № 001860 (регистрационный № 1851) от 25 мая 2009 года,
выдана Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки
на срок по 25 августа 2014 года

Свидетельство о государственной аккредитации ГОУ ВПО НГМУ Росздрава:
серия АА № 001905 (регистрационный № 1867) от 15 апреля 2009 года
выдано Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки
на срок по 15 апреля 2014 года

Адрес редакционной коллегии: 630091, г. Новосибирск, Красный проспект, д. 52
ГОУ ВПО НГМУ Росздрава, Учебно-методический центр Департамента ПДО,
тел./факс: (383) 229-10-82, Адрес электронной почты: mos@ngmu.ru

Свидетельство о регистрации СМИ: Эл № ФС77-28668 от 13.06.07
выдано Федеральной службой по надзору за соблюдением законодательства в сфере массовых
коммуникаций и охране культурного наследия
ISSN 1995-0020

© ГОУ ВПО НГМУ Росздрава, 2010

http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=365