

THIẾT KẾ VÀ ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ BUỒNG THIẾU OXY (BUỒNG HYPOXIA) ỨNG DỤNG TRONG MÔ HÌNH BỆNH THIẾU MÁU CỤC BỘ - TÁI TƯỚI MÁU CƠ TIM *IN VITRO*

Ngô Thị Hải Yến^{1*}, Đoàn Thị Dậu¹, Phạm Thị Bích¹, Vũ Thị Thu^{1,**}

TÓM TẮT

Mục tiêu: Thiết kế và đánh giá hiệu quả buồng thiếu oxy (buồng hypoxia) trong mô hình bệnh thiếu máu cục bộ - tái tưới máu cơ tim *in vitro*. **Phương pháp:** Hiệu quả hoạt động của buồng hypoxia được đánh giá thông qua kiểm tra tỷ lệ tế bào sống và thành phần cardiolipin màng trong ty thể của tế bào H9C2 trong mô hình thiếu oxy/tái cung cấp oxy có so sánh với điều kiện bệnh lý gây ra do Cobalt chlorit (CoCl_2). **Kết quả:** Tương tự kết quả CoCl_2 , nhóm tế bào H9C2 được gây mô hình bệnh sử dụng buồng hypoxia có tỷ lệ sống và thành phần cardiolipin màng trong ty thể giảm đáng kể so với nhóm tế bào được nuôi trong điều kiện thường ($p < 0,05$). **Kết luận:** Buồng hypoxia thiết kế có hiệu quả hoạt động khá tốt, có tiềm năng ứng dụng cao trong nghiên cứu mô hình bệnh thiếu máu cục bộ - tái tưới máu cơ tim *in vitro*.

Từ khóa: Hypoxia, H9C2, CoCl_2 , ty thể

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thiếu máu cục bộ cơ tim (myocardial ischemia) xảy ra khi lượng máu đến mô cơ tim bị giảm dẫn đến sự suy giảm oxy và chất dinh dưỡng cung cấp cho tim, làm cơ tim bị tổn thương. Việc thông dòng, tái tưới máu (reperfusion) giúp tái cung cấp oxy và chất dinh dưỡng cho mô cơ tim, tuy nhiên, quá trình này cũng có thể làm trầm trọng thêm những tổn thương trước đó và gây chết tế bào. Những tổn thương này được gọi là tổn thương thiếu máu cục bộ - tái tưới máu cơ tim (HR) [3]. Các nhà khoa học vẫn đang tiếp tục tập trung tìm kiếm chất và bào chế thuốc mới nhằm ngăn ngừa hoặc giảm thiểu tổn thương HR và các di chứng của nó [12]. Do vậy, các mô hình nghiên cứu thực nghiệm HR là cần thiết để nghiên cứu, bào chế và đánh giá hiệu quả của chất hay thuốc trong bệnh lý này.

Thực nghiệm nghiên cứu cơ chế sinh bệnh lý thiếu máu cục bộ - tái tưới máu cơ tim *in vitro* thường dựa trên việc thay đổi các điều kiện nồng độ oxy (bình thường, ít oxy) kết hợp nồng độ glucose thấp (hoặc không có). Nhiều phương pháp và thiết bị buồng nuôi khác nhau đã được phát triển để tạo và duy trì điều kiện thiếu oxy trong quá trình nuôi cấy *in vitro* như buồng thiếu oxy, tủ nuôi cấy thiếu oxy và hệ thống buồng phụ thiếu oxy [2], [13]. Khí hỗn hợp với nồng độ oxy thấp nhằm tạo ra điều kiện thiếu oxy cho tế bào cũng được sử dụng [13]. Tuy nhiên, chi phí cho các thiết bị này khá đắt đỏ đối với phòng thí nghiệm ở nhiều cơ sở nghiên cứu ở nhiều nơi trên thế giới cũng như tại Việt Nam. Vì vậy, việc thiết kế và tối ưu buồng hypoxia (sử dụng khí hỗn hợp với nồng độ oxy thấp) với tiêu chí là giảm thiểu chi phí, dễ thực hiện mà vẫn thu được các kết quả tương tự với các buồng hypoxia hiện đại là rất cần thiết trong các nghiên cứu sàng lọc thuốc bảo vệ cơ tim trong mô hình HR *in vitro*.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi cung cấp một phương pháp đơn giản nhằm thiết kế buồng hypoxia ứng dụng trong nghiên cứu bệnh thiếu máu cục bộ - tái tưới máu cơ tim *in vitro*. Đồng thời, hiệu quả hoạt động của buồng hypoxia cũng được đánh giá trong mô hình HR sử dụng tế bào cơ tim chuột H9C2.

¹ Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

* Tác giả thực hiện chính:

Ngô Thị Hải Yến

**Tác giả chịu trách nhiệm

Vũ Thị Thu

Email: vtthu2015@gmail.com

Ngày tiếp nhận: 18/8/2019

Ngày phản biện: 20/8/2019

Ngày chấp nhận đăng: 22/9/2019

2. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

Tế bào H9C2 (ATCC® CRL-1446™, Mỹ).

2.2. Vật liệu

- Hộp nhựa Lock & Lock (Việt Nam).
- Dây dẫn khí gas 8mm (Hàn Quốc).
- Bình chứa khí hỗn hợp gồm 5%CO₂ và 95%N₂ (Việt Nam).
- Màng lọc vi khuẩn 0,2μm (Sartorius, Đức).

2.3. Hóa chất, thiết bị

Môi trường Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Mỹ) Phosphate buffered saline (PBS, Gibco, Mỹ); Fetal bovine serum (FBS, Gibco, Mỹ); Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo, Nhật Bản); Chất nhuộm chỉ thị cardiolipin màng ty thể 10-N-nonyl acridine orange (NAO, Invitrogen, Mỹ); Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Sigma, Mỹ); Đĩa nuôi cấy 60x15mm, 90x20mm, đĩa 96 giếng trong (SPL-Life Sciences, Hàn Quốc); Đĩa 96 giếng đen (Corning, Mỹ); Kính hiển vi soi ngược Axiovert (Carl Zeiss, Đức); Máy đọc đĩa 96 giếng và các thiết bị vật tư tiêu hao khác phục vụ thí nghiệm.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Thiết kế buồng thiếu oxi (buồng hypoxia)

Buồng hypoxia được thiết kế dựa theo một số nghiên cứu về việc tạo ra và duy trì môi trường nuôi cấy tế bào thiếu oxi [2]. Chúng tôi sử dụng hộp nhựa kín (Lock & Lock, Việt Nam) để đảm bảo không có sự trao đổi khí với bên ngoài. Hộp nhựa được lựa chọn phải có thể tích phù hợp với kích thước của tủ nuôi cấy. Điều kiện thiếu oxi trong buồng hypoxia được tạo ra bằng cách bơm khí hỗn hợp gồm 5%CO₂ và 95%N₂ (Việt Nam) vào hộp nhựa rồi đậy kín. Độ ẩm của buồng hypoxia được duy trì nhờ đặt đĩa chứa nước cất đã khử trùng. Buồng hypoxia được đặt trong tủ nuôi cấy để duy trì nhiệt độ ổn định ở 37°C.

2.4.2. Nuôi cấy tế bào cơ tim chuột H9C2

Tế bào cơ tim chuột H9C2 được nuôi cấy trong môi trường Dulbecco's Modified Eagle Medium hoàn chỉnh (DMEM với 4,5g/l glucose

có bổ sung 10% huyết thanh phôi bò (FBS) và 1% Penicillin-Streptomycin) ở điều kiện 37°C và 5%CO₂ [1]. Môi trường nuôi được thay sau 1-2 ngày cấy chuyển và tế bào được cấy chuyển khi mật độ che phủ đĩa nuôi đạt 80%.

2.4.3. Thử nghiệm mô hình thiếu oxi – tái cung cấp oxi (HR)

Thử nghiệm mô hình HR sử dụng buồng hypoxia

Tế bào H9C2 được nuôi ổn định trên đĩa 96 giếng trong ở mật độ 5.10³ tế bào/giếng. Sau 24h nuôi cấy, tế bào được chia thành 2 nhóm: nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm mô hình HR. Nhóm đối chứng: Tế bào được nuôi trong điều kiện thường (DMEM có bổ sung 10% FBS và 1% kháng sinh, ở 37°C và 5%CO₂). Nhóm thử nghiệm HR được chia thành 2 nhóm. Nhóm HR1 là nhóm các tế bào được nuôi ở điều kiện thiếu oxi 6h và tái cung cấp oxi (điều kiện thường) trong 24h. Nhóm HR2 là nhóm tế bào được nuôi ở điều kiện thiếu oxi 10h và tái cung cấp oxi 24h.

Điều kiện thiếu oxi được thiết lập bằng cách môi trường nuôi DMEM có glucose nồng độ thấp, không bổ sung FBS, đã được sục khí hỗn hợp 5%CO₂ và 95%N₂ [2] trong buồng trong 5 phút. Sau đó, buồng hypoxia được đậy kín và để trong tủ nuôi ở điều kiện 37°C nhằm mô phỏng điều kiện thiếu oxi với các khoảng thời gian 6h và 10h.

Tại thời điểm tái cung cấp oxi, môi trường hypoxia được thay thế bằng môi trường DMEM hoàn chỉnh và tiếp tục nuôi tế bào ở 37°C, 5%CO₂ trong 24h. Cuối thời điểm mô hình, tỷ lệ sống của tế bào được xác định bằng CCK-8; thông số lipid màng ty thể được đánh giá thông qua chỉ thị huỳnh quang 10-N-nonyl acridine orange (NAO). Mỗi thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần.

Thử nghiệm mô hình HR sử dụng CoCl₂

Tế bào H9C2 được nuôi ổn định trên đĩa 96 giếng trong với mật độ 5.10³ tế bào/giếng. Sau 24h nuôi cấy, tế bào được chia thành nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm mô hình HR sử dụng CoCl₂. Ở nhóm đối chứng, tế bào được nuôi ở điều kiện thường. Đối với nhóm xử lý với CoCl₂, môi trường cũ được thay thế bằng môi trường mới có chứa 200μM

CoCl₂. Sau 24h, môi trường chứa CoCl₂ được thay thế bằng môi trường DMEM đầy đủ mới. Các tế bào này tiếp tục được nuôi ở điều kiện thường trong 24h tiếp theo để mô phỏng tái cung cấp oxy. Cuối thời điểm mô hình, tỷ lệ sống của tế bào được xác định bằng CCK-8; thông số lipid màng ty thể được đánh giá thông qua chỉ thị huỳnh quang NAO. Mỗi thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần.

2.4.4. Xác định khả năng sống của tế bào bằng CCK-8

Tỷ lệ sống của tế bào được xác định gián tiếp thông qua CCK-8 với nguyên lý là WST-8 (highly water-soluble tetrazolium salt) trong CCK-8 bị khử bởi hoạt động của dehydrogenase trong các tế bào sống tạo ra formazan màu cam. Lượng formazan tạo ra tỷ lệ thuận với số lượng tế bào sống. Tại cuối thời điểm thí nghiệm, CCK-8 được cho vào mỗi giếng với tỷ lệ thể tích 10%. Tế bào được ủ với CCK-8 ở 37°C, 5%CO₂ trong thời gian từ 1-4h. Tiếp đó, mẫu phân tích được đo bằng máy đọc đĩa 96 giếng ở bước sóng hấp thụ 450nm. Phân tích kết quả tỷ lệ sống của tế bào ở các nhóm để đánh giá hiệu quả của mô hình thiết lập được.

2.4.5. Xác định sự biến đổi thành phần cardiolipin màng ty thể

Thành phần cardiolipin màng trong ty thể được đo gián tiếp bằng kit huỳnh quang 10-N-nonyl acridine orange (NAO). Tế bào H9C2

được nuôi cấy ổn định trên đĩa 96 giếng thành đen với mật độ 5.10^3 tế bào/giếng ở điều kiện 37°C, 5%CO₂. Sau 24h, tế bào được thử nghiệm mô hình HR sử dụng buồng hypoxia và CoCl₂ như mô tả ở mục 2.3.3. Tại cuối thời điểm thí nghiệm, tế bào H9C2 được nhuộm NAO (0,1μM, ex/em: 495/519nm) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp theo, mẫu thí nghiệm được rửa 2-3 lần bằng PBS [1]. Mật độ huỳnh quang của NAO được xác định bằng máy đọc đĩa 96 giếng. Mỗi thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần.

2.5. Xử lý số liệu

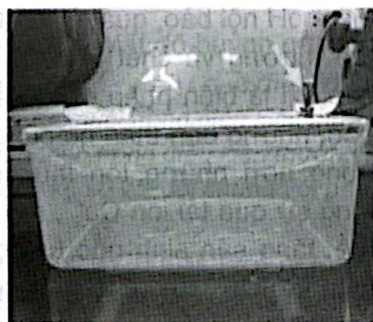
Kết quả nghiên cứu được phân tích sử dụng phần mềm Excel 2016. Sự khác biệt giữa các nhóm được phân tích bằng Anova và t-test. $p < 0,05$ phản ánh sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

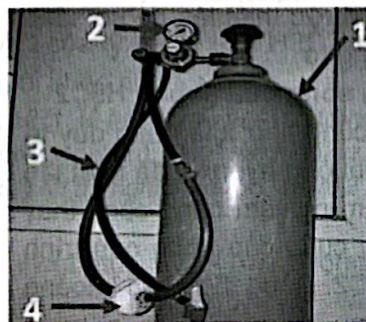
3.1. Buồng hypoxia và cách sử dụng trong mô hình HR

Buồng hypoxia

Buồng hypoxia và bình khí sau khi lắp ráp được mô tả như hình 3.1. Các bước lắp ráp được mô tả tuần tự như sau: 1) Lắp van điều chỉnh khí phía trên và lệch về một phía của nắp hộp nhựa (hình 3.1A); 2) Bình khí hỗn hợp, đồng hồ đo lưu lượng khí thoát ra, màng lọc vi khuẩn, dây dẫn khí được được kết nối như hình 3.1B.



A



B

Hình 3.1. Buồng hypoxia và bình chứa khí hỗn hợp sau khi lắp ráp

A) Buồng hypoxia (mũi tên vàng: van xả khí vào buồng); B) Bình chứa khí hỗn hợp với các chi tiết: 1- Bình khí; 2-Đồng hồ đo áp lực khí; 3-Dây dẫn khí; 4-Màng lọc vi khuẩn.

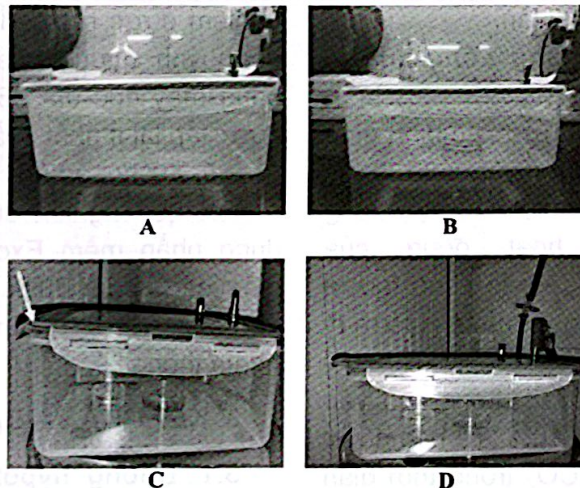
Cách sử dụng buồng hypoxia trong mô hình HR

Buồng hypoxia và bình khí hỗn hợp sau khi lắp ráp sẽ được dùng để mô phỏng điều

kiện thiếu oxy trong nuôi cấy tế bào. Các bước chuẩn bị và ứng dụng buồng hypoxia trong mô hình HR được mô tả ở hình 3.2.

Đĩa tế bào theo thiết kế thí nghiệm và một đĩa 35x15mm chứa nước cất khử trùng được đặt vào buồng hypoxia (hình 3.2A, 3.2B). Sau đó, nắp hộp/buồng ở phía gần van xả khí được đóng chặt và nắp hộp ở phía đối diện được để hở (mũi tên vàng, hình 3.2C). Van được kết nối với bình khí hỗn hợp và khí

được xả với tốc độ 5lit/phút trong thời gian 5-10 phút nhằm đảm bảo khí giàu oxy trong buồng được đẩy ra ngoài (hình 3.2D). Tại thời điểm kết thúc quá trình xả khí, nắp hộp và van xả được chặt, buồng hypoxia được vệ sinh và đưa vào tủ nuôi bình thường. Thời gian hypoxia tùy thuộc vào từng thí nghiệm.



Hình 3.2. Các bước tạo mô hình thử nghiệm HR sử dụng buồng hypoxia

A) Buồng hypoxia; B) Bình hypoxia chứa đĩa tế bào và đĩa nước cất; C) Kết nối van xả khí ở 1 đầu và 1 đầu còn lại của buồng được để hở (mũi tên); D) Kết nối van với bình khí hỗn hợp và xả khí vào buồng hypoxia.

3.2. Kết quả thử nghiệm buồng hypoxia

Hiệu quả của buồng hypoxia được đánh giá thông qua tỷ lệ sống của tế bào và thành phần cardiolipin màng ty thể khi thử nghiệm mô hình HR trên tế bào cơ tim chuột H9C2. Bên cạnh đó, mô hình HR sử dụng hóa chất CoCl_2 200 μM cũng được thiết lập để so sánh với các chỉ tiêu tương tự.

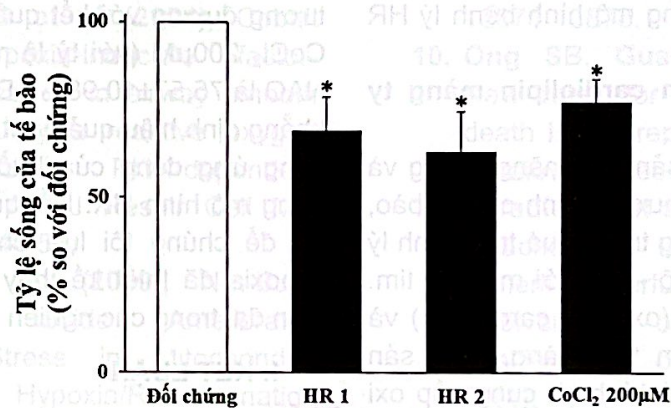
3.2.1. Khả năng sống của tế bào H9C2

Chất lượng khí cũng như khả năng duy trì điều kiện khí trong buồng hypoxia đã thiết lập được tiến hành kiểm nghiệm bằng cách thay đổi nồng độ khí oxy cung cấp trong quá trình nuôi cấy tế bào H9C2. Đồng thời, các khoảng thời gian khác nhau để nuôi tế bào trong buồng hypoxia cũng được thử nghiệm. Kết quả tỷ lệ sống của tế bào H9C2 được mô tả như hình 3.3.

Kết quả ở hình 3.3 cho thấy, tỷ lệ sống của tế bào H9C2 khi nuôi ở điều kiện HR giảm đáng kể so với khi được nuôi trong điều kiện thường. Tỷ lệ này ở các nhóm HR1 và HR2 lần lượt là $69,25 \pm 9,54\%$ và $63,13 \pm 11,38\%$.

Sự khác biệt tỷ lệ tế bào sống của các nhóm thử nghiệm mô hình HR so với nhóm đối chứng đều có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Điều này có thể giải thích, do trong giai đoạn hypoxia, sự thiếu oxy đã ức chế quá trình phosphoryl hóa oxy hóa, ức chế tổng hợp ATP, giảm pH nội bào, quá tải ion Ca^{2+} nội bào, làm tổn thương và chết tế bào. Mặc dù tái cung cấp oxy là biện pháp cấp thiết nhất để cứu tế bào, nhưng bản thân nó cũng có thể làm trầm trọng hơn những tổn thương trước đó như tăng sự quá tải ion Ca^{2+} , mở lỗ màng trong ty thể, tăng sản sinh gốc tự do oxy hóa (ROS), kích thích sự chết theo chương trình (apoptosis) [8] và cuối cùng là gây chết tế bào. Ngoài ra, khi kéo dài thời gian hypoxia từ 6h lên 10h, tỷ lệ sống của tế bào giảm dần. Tuy nhiên, sự khác biệt này không đáng kể ($p > 0,05$).

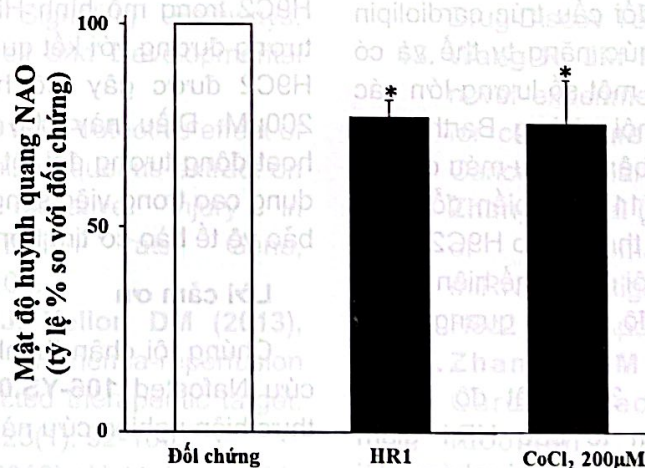
Bên cạnh đó, kết quả ở hình 3.3 cũng cho thấy, tỷ lệ tế bào sống ($69,25 \pm 9,54\%$) trong mô hình thử nghiệm HR sử dụng buồng hypoxia tương đương với kết quả thu được



Hình 3.3. Tỷ lệ sống của tế bào H9C2 trong các điều kiện nuôi khác nhau

Đối chứng: Tế bào được nuôi trong điều kiện thường; **HR1:** Tế bào được nuôi 6h trong điều kiện thiếu oxy và 24h tiếp theo trong điều kiện thường; **HR2:** Tế bào được nuôi 10h trong điều kiện thiếu oxy và 24h tiếp theo trong điều kiện thường. Dấu * thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng với $p < 0,05$.

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.



Hình 3.4. Mật độ huỳnh quang NAO của ty thể tế bào H9C2 trong các điều kiện nuôi khác nhau

Đối chứng: tế bào được nuôi trong điều kiện thường; **HR1:** tế bào được nuôi 6h trong điều kiện thiếu oxy (hypoxia) và 24h tiếp theo trong điều kiện thường (reoxygenation). Dấu* thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng với $p < 0,05$. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

khi gây bệnh bằng CoCl_2 200µM (với tỷ lệ tế bào sống là $77,16 \pm 6,56\%$). CoCl_2 là chất hóa học được chứng minh và sử dụng phổ biến để mô phỏng điều kiện thiếu oxy do có khả năng duy trì sự bền vững của HIF-1α, từ đó làm tăng biểu hiện của các gen giúp tế bào phản ứng với điều kiện thiếu oxy [4]. Đặc biệt hơn nữa, tỷ lệ tế bào sống trong mô hình HR sử dụng buồng hypoxia thiết kế khá tương đồng với các kết quả nghiên cứu đã công bố sử dụng buồng hypoxia hiện đại (hypoxia

incubator) [7] [14]. Trong nghiên cứu của Guang li (2018) [9] và của Andrey V. Kuznetsov (2015) tỷ lệ này lần lượt là $70 \pm 10\%$ và 60-70%. Ngoài ra, tỷ lệ tế bào sống của chúng tôi cũng cao hơn số liệu công bố khác [15]. Sự khác biệt này có thể là do môi trường hypoxia và thời gian hypoxia không giống nhau giữa các nghiên cứu.

Kết quả nghiên cứu chứng tỏ buồng hypoxia được thiết lập hoạt động khá tốt, có tiềm năng ứng dụng cao trong việc mô phỏng

mô hình HR. Mặt khác, khoảng thời gian hypoxia 6h là lựa chọn phù hợp để thực hiện các thí nghiệm sử dụng mô hình bệnh lý HR tiếp theo.

3.2.2. Thành phần cardiolipin màng ty thể tế bào H9C2

Ty thể - nhà máy sản sinh năng lượng và trung tâm chết theo chương trình của tế bào, đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh lý bệnh thiếu máu cục bộ - tái tưới máu cơ tim. Sự biến đổi cấu trúc (oxi hóa cardiolipin) và chức năng (giảm điện thế màng, tăng sản sinh ROS...) trong quá trình tái cung cấp oxi được xác định như dấu hiệu của bệnh thiếu máu cục bộ cơ tim [10]. Cardiolipin là phospholipid đặc trưng của màng trong ty thể và có vai trò thiết yếu đối với nhiều chức năng ty thể như: hoạt động của chuỗi hô hấp, sự chuyển hóa năng lượng [6]. Sự suy giảm số lượng cũng như thay đổi cấu trúc cardiolipin dẫn đến sự rối loạn chức năng ty thể và có liên quan mật thiết đến một số lượng lớn các bệnh tim mạch như hội chứng Barth, cao huyết áp và đặc biệt là bệnh thiếu máu cục bộ - tái tưới máu cơ tim [11]. Sự biến đổi hàm lượng cardiolipin của ty thể tế bào H9C2 trong nghiên cứu của chúng tôi được thể hiện thông qua sự biến đổi mật độ huỳnh quang NAO như mô tả ở hình 3.4.

Theo kết quả hình 3.4, mật độ huỳnh quang NAO của nhóm tế bào HR1 giảm xuống còn $77,17 \pm 4,17\%$ so với nhóm đối chứng. Điều này cho thấy, mô hình HR sử dụng buồng hypoxia thiết kế gây ra sự suy giảm đáng kể lượng cardiolipin tại màng trong ty thể dẫn đến giảm lượng NAO tích tụ trong ty thể. Sự suy giảm hàm lượng cardiolipin sẽ ảnh hưởng tới chuỗi vận chuyển điện tử I, III, IV, tăng sản sinh gốc tự do oxi hóa (ROS), làm rối loạn hoạt động chức năng ty thể [11], gây chết tế bào và dẫn đến việc giảm tỷ lệ tế bào sống như ở mục 3.2.1.

Kết quả về sự suy giảm hàm lượng cardiolipin trong nghiên cứu của chúng tôi tương tự kết quả của Chu. Q và cs (2019) khi thực hiện nuôi tế bào H9C2 ở điều kiện thiếu oxi trong buồng hypoxia hiện đại với $1\%O_2$, $5\%CO_2$, $94\%N_2$ [5]. Bên cạnh đó, tỷ lệ mật độ

huỳnh quang NAO thu được trong mô hình HR sử dụng buồng hypoxia thiết kế cũng tương đương với kết quả khi gây bệnh bằng $CoCl_2$ $200\mu M$ (với tỷ lệ mật độ huỳnh quang NAO là $75,57 \pm 10,98\%$). Điều này một lần nữa khẳng định hiệu quả hoạt động cũng như tiềm năng ứng dụng của buồng hypoxia thiết kế trong mô hình HR. Kết quả nghiên cứu là cơ sở để chúng tôi lựa chọn sử dụng buồng hypoxia đã thiết kế thay cho buồng hypoxia hiện đại trong các nghiên cứu tiếp theo.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết kế được buồng hypoxia với các ưu điểm là thao tác đơn giản, chi phí vận hành thấp. Hiệu quả hoạt động của buồng hypoxia được chứng minh qua việc làm giảm tỷ lệ sống và thành phần cardiolipin màng ty thể tế bào H9C2 trong mô hình HR. Kết quả này cũng tương đương với kết quả thu được khi tế bào H9C2 được gây mô hình HR bằng $CoCl_2$ $200\mu M$. Điều này cho thấy buồng hypoxia hoạt động tương đối tốt và có tiềm năng ứng dụng cao trong việc sàng lọc chất có tác dụng bảo vệ tế bào cơ tim trong tổn thương HR.

Lời cảm ơn

Chúng tôi chân thành cảm ơn quỹ nghiên cứu Nafosted 106-YS.06-2016.23 đã hỗ trợ thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ngô Thị Hải Yến và cs (2017), Ảnh hưởng của carbonyl-cyanide m-chlorophenylhydrazine lên chức năng ty thể của tế bào cơ tim chuột H9C2. Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Y Dược, Vol 33: 27-32.
2. Bakmiwewa SM et al (2015), An effective, low-cost method for achieving and maintaining hypoxia during cell culture studies. Biotechniques. 59(4):. 223-4, 226, 228-9.
3. Black SC (2000), In vivo models of myocardial ischemia and reperfusion injury: application to drug discovery

and evaluation. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 43(2): 153-67.

4. **Chachami G et al (2004)**, Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1 α expression in airway smooth muscle cells by a reactive oxygen species- and PI3K-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 31(5): 544-51.

5. **Chu Q et al (2019)**, N-n-Butyl Haloperidol Iodide Ameliorates Oxidative Stress in Mitochondria Induced by Hypoxia/Reoxygenation through the Mitochondrial c-Jun N-Terminal Kinase/Sab/Src/Reactive Oxygen Species Pathway in H9c2 Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 14.

6. **Dudek J (2017)**, Role of Cardiolipin in Mitochondrial Signaling Pathways. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 5(90).

7. **Ge G et al (2014)**, Protective effect of *Salvia miltiorrhiza* aqueous extract on myocardium oxidative injury in ischemic-reperfusion rats. *Gene*, 546(1): p. 97-103.

8. **Hausenlon DJ, Yellon DM (2013)**, Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 123(1): 92-100.

9. **Li G et al (2018)**, Notoginsenoside R1 prevents H9c2 cardiomyocytes apoptosis against hypoxia/

reoxygenation via the ERs/PI3K/Akt pathway. *RSC Advances*, 8(25): p. 13871-13878.

10. **Ong SB, Gustafsson AB (2012)**, New roles for mitochondria in cell death in the reperfused myocardium. *Cardiovasc Res*. 94(2): 190-6.

11. **Paradies G et al (2004)**, Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circ Res*. 94(1): 53-9.

12. **Vidavalur R et al (2008)**, Ex vivo and in vivo approaches to study mechanisms of cardioprotection targeting ischemia/reperfusion (i/r) injury: useful techniques for cardiovascular drug discovery. *Curr Drug Discov Technol*. 5(4): 269-78.

13. **Wang R, Jin F, Zhong H (2014)**, A novel experimental hypoxia chamber for cell culture. *American Journal of Cancer Research*. 4(1): 53-60.

14. **Zhang J et al (2017)**, Overexpression of Exosomal Cardioprotective miRNAs Mitigates Hypoxia-Induced H9c2 Cells Apoptosis. Vol. 18.

15. **Zhang SM et al (2015)**, Cardioprotective effects of fucoidan against hypoxia-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells. *Pharm Biol*, 53(9): 1352-7.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và thiết bị nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu: Chuột nhắt trắng hương thơm dòng Swiss, không phân biệt giống, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, cân nặng mỗi con tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm là 18 - 22g. Động vật do Ban động vật thí nghiệm - Học viện Quân y cung cấp, nuôi dưỡng theo tiêu chuẩn động vật thí nghiệm.

2.1.2. Thiết bị, hóa chất

- Thiết bị: Kính vi phẫu (Leica); Cân phân tích 10⁻⁴; model CP224S (Sartorius - Đức);

¹ Học viện Quân y

^{*} Tác giả thực hiện chính

Phạm Anh Hòa

^{**} Tác giả chịu trách nhiệm khoa học

Nguyễn Hoàng Ngân

Email: nguyenhoangnganb@yahoo.com.vn

Ngày tiếp nhận: 15/5/2019

Ngày phản biện: 12/5/2019

Ngày chấp nhận đăng: 22/9/2019

SUMMARY

DESIGNING AND EVALUATING THE EFFECTIVENESS OF HYPOXIA CHAMBER APPLIED IN MYOCARDIAL HYPOXIA-REOXYGENATION MODEL IN VITRO

Ngo Thi Hai Yen, Doan Thi Dau, Pham Thi Bich, Vu Thi Thu

Faculty of Biology, VNU University of Science

Objective: To design and evaluate the effectiveness of hypoxia chamber in myocardial hypoxia-reoxygenation (HR) model in vitro. **Method:** The efficacy of hypoxia chamber was assessed through the examination of the cell viability and mitochondrial cardiolipin components of H9C2 cells in the hypoxia/reoxygenation model compared with the Cobalt chlorit (CoCl_2) HR model. **Results:** Equivalent to CoCl_2 induced HR model, the H9C2 cells subjected to designed hypoxia chamber has a significantly reduced survival rate and composition of mitochondrial cardiolipin content compared to those in control ($p < 0.05$). **Conclusion:** Designed hypoxia chamber works well and potentially used in ischemic hypoxia-reoxygenation related studies

Keywords: Hypoxia, H9C2 cells, CoCl_2 , mitochondria.