

Изучение методом проточной цитометрии физиологических параметров клеток в суспензиях диссоциированной ткани почки

Научный руководитель – Плотников Егор Юрьевич

Угольков Ярослав Александрович

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: ugoikov911@mail.ru

Нарушение функционирования почки является одним из важных патологических последствий ишемии данного органа. Окислительный стресс, возникающий в почке после ишемии, затрагивает не только клетки нефрона, но и клетки сосудистой стенки, в первую очередь, эндотелий, приводя к его повреждению [1]. Самым важным остается механизм повреждения, в котором ключевую роль играют митохондрии, учитывая, что они являются основными продуцентами активных форм кислорода [2].

Проточная цитометрия — метод исследования дисперсных сред в режиме поштучного анализа элементов дисперсной фазы по сигналам светорассеяния и флуоресценции. Данный метод отлично подходит для изучения и оценки физиологических показателей клеток, однако обычно используется для анализа клеточных культур. В данной работе оценена возможность использовать проточную цитометрию для анализа клеток, полученных непосредственно из органа.

В работе был использован протокол для получения отдельных клеток почечных канальцев из целой почки крысы путем диссоциации тканей, при помощи коллагеназы и механической диссоциации. Полученные суспензии клеток окрашивались различными флуоресцентными зондами и были изучены с помощью портативного клеточного анализатора “MUSE”, работающего по принципу цитометра. Для индукции почечной недостаточности у новорожденных крысят был использован препарат цисплатин, который вводили внутривентриально из расчета 10 мкг/гр веса крысы. Для анализа возникновения почечной недостаточности после инъекции цисплатина проводили биохимический анализ крови на наличие повышенной концентрации азотистых соединений, таких как мочевины и креатинин. По результатам анализа данных биохимического исследования было выявлено, что концентрация мочевины в крови больше в 2,8 раз, а креатинина в 1,5 раза.

Результаты, полученные при помощи “MUSE”, показали, что цисплатин вызывает нарушения в митохондриях, что приводит в повышенной концентрации активных форм кислорода. Количество клеток, окрашенных TMRE (накапливается в нормально функционирующих митохондриях), после инъекции цисплатина уменьшилось на 3%, а клеток с DCF (флуоресцирует при контакте с активными формами кислорода) стало на 2% больше, что свидетельствует о развитии окислительного стресса. Полученные результаты свидетельствуют о том, что метод диссоциации ткани и анализа на проточном цитофлуориметре можно использовать для анализа функций митохондрий, продукции АФК и для многих других физиологических показателей клеток, полученных из интактной ткани. Эта методика может упростить изучение и выявление отрицательных эффектов различных препаратов на организм.

Исследование поддержано грантом Президента РФ МД-2065.2018.4

Источники и литература

1) Янкаускас С.С., Андрианова Н.В., Алиева И.Б., Прусов А.Н., Мациевский Д.Д., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Савченко Е.С., Пирогов Ю.А., Силачев Д.Н., Плотников Е.Ю.,

Зоров Д.Б. Дисфункция эндотелия почки при ишемии/реперфузии и ее предотвращение с помощью митохондриально-направленных антиоксидантов// <https://istina.msu.ru/journals/93637/>, 2017, 82 (1), 51-63

2) Plotnikov EY, Kazachenko AV, Vyssokikh MY, Vasileva AK, Tsvirkun DV, Isaev NK, Kirpatovsky VI, Zorov DB. The role of mitochondria in oxidative and nitrosative stress during ischemia/reperfusion in the rat kidney// *Kidney Int.*, 2007, 72(12), 1493-1502.