

О.Е. Холупко, М.С. Гриб
СПОСОБЫ МЕЧЕНИЯ КЛЕТОК ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ IN VIVO
Научный руководитель: канд. биол. наук, доц. Н.И. Мезен
Кафедра биологии
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

A.E. Khalupka, M.S. Hryb
METHODS OF MARKING CELLS FOR IN VIVO IMAGING
Tutor: PhD, associate professor N.I. Mezen
Department of Biology
Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. Используя литературные данные, был изучен ряд методов визуализации трансплантированных клеток *in vivo*, оценены их характеристики и, в соответствии с этим, определены области эффективного применения.

Ключевые слова: трансплантация, клетки, визуализация, маркеры.

Resume. Using the literature data a number of imaging methods of transplanted cells *in vivo* were studied, their characteristics were evaluated and in accordance with this fields of effective application were determined.

Keywords: transplantation, cells, visualization, markers.

Актуальность. На сегодняшний день существует множество заболеваний сердечно-сосудистой, эндокринной, нервной систем, опорно-двигательного аппарата и т.д., эффективным методом лечения которых является трансплантация клеток. Для улучшения качества терапии необходимо получение точной информации о выживаемости, миграции и конкретной локализации внесенных в организм реципиента клеток с помощью различных методов визуализации.

Цель: Изучить научные данные о наиболее часто применяемых способах маркирования трансплантированных клеток для визуализации в теле реципиента, их характеристиках, а также области их эффективного применения.

Задачи:

1. Проанализировать литературные данные о результатах использования различных методов мечения клеток.
2. Выделить достоинства и недостатки этих методов.
3. Обозначить области эффективного применения и перспективы данных методов.

Материал и методы. Анализ данных научных статей.

Результаты и их обсуждение. В последнее время трансплантация клеток успешно применяется для лечения заболеваний кроветворной системы, онкологий, проблем с иммунной системой и даже переломов. Для оценки качества использования клеточных технологий необходимо обладать такими данными, как в каком количестве представлены выжившие после трансплантации клетки, пространственное распределение, точная локализация клеток и успешность ассимиляции, что возможно при помощи различных маркеров.

Вследствие этого Джоном В. Франджиони и Роджером Дж. Хаджаром в 2004 году была предложена идеальная модель маркера, которая включает в себя характеристики, относительно которых мы можем оценивать качество и эффективность того или иного способа маркирования:

- биосовместимость
- безопасность экзогенных контрастных агентов;
- отсутствие необходимости генетической модификации клетки;
- определение единичной клетки в любой локализации;
- возможность оценки количества клеток;
- минимальное снижение количества контрастного агента при делении клетки;
- минимальный перенос контрастных агентов окружающим клеткам;
- длительная визуализация трансплантированных клеток (месяцы, годы).

Выделяют следующие классы маркеров: эндогенные и экзогенные. Эндогенные маркеры представляют собой внутренние, конститутивно присутствующие элементы клетки, а экзогенные – элементы, внесенные извне.

Наиболее распространенным эндогенным маркером является Y-хромосома, в частности SRY-ген, при сингенной трансплантации от самца-донора к самке-реципиенту [7]. Данный маркер в последующем детектируется при помощи ПЦР и флуоресцентной гибридизации *in situ*. Например, Y-хромосома поспособствовала выявлению такого свойства гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), как пластичность. На мышинных моделях было продемонстрировано, что при трансплантации ГСК в нервную ткань, скелетные мышцы, ткани почки, печени эти клетки, сохраняя генотип донора, приобретали фенотип клеток реципиента, тем самым восстанавливая утраченные функции поврежденных органов [1]. К достоинствам данного метода можно отнести высокую стабильность, присутствие во всех потомках донорских клеток, простоту визуализации путем окрашивания (FISH-метод). Однако недостатком этого способа маркирования является невозможность применения для прижизненной визуализации трансплантированных клеток в организме хозяина, ложноотрицательные результаты в слишком тонких срезах и в слишком толстых срезах ($>10\mu\text{м}$).

Кроме того, в качестве эндогенных маркеров могут использоваться группы биомолекул, способных к флуоресценции: аминокислоты (триптофан, тирозин, фенилаланин), некоторые белки (коллаген, эластин), коферменты в окисленной и восстановленной формах, витамины групп А, D, К. Воздействие излучения определенной длины волны на эти мишени вызывает их флуоресценцию [5].

Экзогенные маркеры делятся на прямые неспецифические (флуоресцентные красители, наночастицы, радиоактивные метки) и непрямые специфические (репортерные гены).

Красители в зависимости от механизма окрашивания делят на мембранные, цитоплазматические и ядерные [7].

Мембранные красители являются липофильными производными карбоцианинов, которые проникают в клетки путем латеральной диффузии, оставляя на поверхности полярную флуоресцирующую головную группу. Преимущественно применяются красители семейства РКН, в частности РКН67, что обусловлено длительным со-

хранением метки (до месяца), способствуя проведению продолжительного мониторинга миграции клетки, а также пролиферативной активности, адгезии и хоуминга (способности стволовых клеток после трансплантации вне зависимости от места введения находить точку повреждения в организме для последующей регенерации) [2, 6]. Еще одним достоинством данных красителей является отсутствие воздействия на функциональность клетки. Также в экспериментах на животных часто используется флуорофор Dil из-за своей низкой стоимости [6].

В структуре цитоплазматических красителей присутствуют функциональные группы – липофильные ацетатные остатки, – способствующие прохождению через цитоплазматическую мембрану. Особенностью данных красителей является взаимодействие их функциональных групп с внутриклеточными эстеразами. Отщепление ацетатных групп ферментами препятствует выходу красителей из клетки, поэтому скорость элиминации красителя из клетки зависит как от количества заряженных групп в структуре вещества, так и от скорости его взаимодействия с эстеразами. Примером наиболее устойчивого представителя данной группы является CFSE (до месяца), который применяется для долговременного мониторинга миграции клеток, также они используются для изучения пролиферативной активности.

Ядерные красители связываются с АТ-богатыми участками малой бороздки ДНК клеток. Основными представителями являются DAPI и Hoechst 33342. Данная методика является достаточно экономичной и легкодоступной, не вызывает генетических изменений и с определенными ограничениями не влияет на жизнеспособность клеток. Так на примере Hoechst 33342 было установлено, что при окрашивании стволовых клеток (СК) жировой ткани мышей в концентрации 0,5 мкг/мл не возникало серьезных проблем с пролиферативной активностью, хотя при этом был снижен временной интервал флуоресценции. В то же время среди клеток, окрашенных красителем в концентрации 5 мкг/мл на некоторое время снизился индекс жизнеспособности и на продолжительный срок уменьшилась скорость пролиферации, хотя временной интервал флуоресценции через 56 остался на уровне 99,48%. Также негативным фактором при высокой концентрации оказалось явление самопроизвольного выхода красителя из клетки и загрязнения окружающих СК [7, 8].

Наночастицы являются комплексами, размеры которых не превышают 100 нм, и представляют из себя широкий спектр элементов с различными характеристиками: форма, размеры, структура, физические свойства (электронные, оптические, термические). По способу обнаружения частиц выделяют: флуоресцентные наночастицы для флуоресцентной визуализации, магнитные наночастицы для магнитно-резонансной томографии (МРТ), радиоизотопы, заключенные в наночастицы, для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ).

Говоря про флуоресцентные наночастицы следует сказать, что основным методом оптической визуализации является использование квантовых точек (КТ). Квантовые точки представляют из себя флуоресцентные полупроводниковые наночастицы. Их уникальные свойства заключаются в том, что они обладают высоким коэффициентом молярной экстинкции (характеристика того, насколько сильно вещество поглощает свет на заданной длине волны) и высоким квантовым выходом, что

обеспечивает исключительную яркость этих флуорофоров. Кроме того, для КТ характерен широкий спектр поглощения и узкий и симметричный спектр флуоресценции. При этом длину волны флуоресценции можно регулировать, изменяя размеры ядра, что позволяет создавать из одних и тех же материалов широкий набор различных точек, флуоресцирующих в области спектра 400–2000 нм. Это в свою очередь открывает возможность многоцветного маркирования и одновременного анализа различных биологических объектов, используя лишь одну длину волны для индуцирования флуоресценции. Помимо этого, КТ обладают высокой фотостабильностью и устойчивостью к фото- и химической деградации. Одним из направлений использования квантовых точек является визуализация опухолевых клеток. Однако обратной стороной данного метода является токсичность, зависящая от типа синтеза и физико-химических свойств, что ограничивает его применение [3].

Магнитно-резонансная томография – способ диагностики, не предполагающий нарушения целостности организма, основанный на детекции электромагнитного отклика ядер H_2 . Конструкция магнитных наночастиц включает в себя магнитное ядро и оболочку, имеющую на своей наружной стороне функциональные группы. Ввиду неинвазивности и удобства данного метода стало возможным проведение несколько клинических исследований, включая определение миграции дендритных клеток у пациентов с меланомой, нервных стволовых клеток у пациентов с повреждением головного мозга.

Однофотонная эмиссионная компьютерная томография – метод диагностики, основанный на получении изображений, используя комплексы с гамма-излучающими радиоизотопами. Позитронно-эмиссионная томография – метод исследования в ядерной медицине с использованием позитрон-излучающих радиоизотопов. В классическом виде пациенту вводят необходимый радиоизотоп с последующим анализом его локализации. Однако недостатком данного метода являются радиационное облучение пациента, низкое пространственное разрешение, короткий период жизни изотопа. С целью решения этих проблем возможно использование наночастиц, в которые заключаются нуклиды, тем самым снижая радиационную нагрузку и увеличивая время детекции. Однако в случае гибели трансплантированной клетки она вместе с изотопом поглощается макрофагом, что может привести к искажению результата.

Наночастицы широко используются для исследования миграции клеток, однако существуют определенные риски, связанные с коротким сроком детекции из-за уменьшения количества контрастного агента при делении клеток, с самопроизвольным переносом частиц на другие клетки, а также о самом влиянии частицы на клетку [4].

Использование репортерных генов в качестве маркера основано на синтезе зеленого флуоресцентного белка и его производных. Однако последующая детекция производится при помощи биопсии или эксплантации органа и последующим гистологическим анализом. Поэтому с целью неинвазивного мониторинга *in vivo* было разработано 4 основных подхода:

1. Внесение репортерного гена фермента люциферазы, в ходе реакции которого с субстратом люциферином испускается видимое световое излучение.

2. Синтез рецептора, кодируемого репортерным геном, который специфичен к определенной радиоактивной метке.

3. Использование репортерного гена для продукции специфического фермента, который модифицирует радиоактивную метку, препятствуя её выходу из клетки.

4. Синтез белков-переносчиков, специфичных для некоторых меток.

Данные методы позволяют анализировать функциональную активность только живых клеток долгий промежуток времени, что является преимуществом. Однако существует ряд недостатков:

1. Низкая фотостабильность флуоресцентных белков, ограничивающая их период использования.

2. Необходимость модификации генетического материала клетки, что создает определенные риски для функциональной активности.

3. Подходит только для изучения на небольших животных из-за ограниченной глубины проникновения волны эмиссии метки в ткани.

4. Сложный и длительный процесс получения культуры клеток, стабильно экспрессирующих репортерный ген продолжительный промежуток времени.

Выводы:

1. На сегодняшний день имеется большое количество контрастирующих агентов, методов визуализации и детекции, имеющих свои достоинства и недостатки.

2. Выбор каждого из них зависит от целей конкретной задачи.

3. Усовершенствование имеющихся и поиск новых универсальных методов маркирования играет огромную роль в развитии клеточной трансплантации и переходе на новый уровень в лечении серьезных и опасных заболеваний человека.

Литература

1. Владимирская, Е. Б. Стволовые клетки в клеточной терапии / Е. Б. Владимирская, А. Г. Румянцев // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2005. – Т. 4. – №. 1. – С. 7-13.

2. Ельский, В. Н. Хоуминг – эффект и возникновение химер при трансплантации клеток и клеточной кардиопластике / В. Н. Ельский // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2011. – Т. 12. – №. 1. – С. 112-114.

3. Здобнова, Т. А. Квантовые точки для молекулярной диагностики опухолей / Т. А. Здобнова, Е. Н. Лебеденко, С. М. Деев // Acta Naturae (русскаяязычная версия). – 2011. – Т. 3. – №. 1. – С. 30-50.

4. Исследование коллоидных квантовых точек AgInS₂/ZnS в качестве флуоресцентных меток для тераностики: физические свойства, биораспределение и биосовместимость / М. С. Истомина, Е. И. Почкаева, Д. Л. Сонин и др. // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2018. – №. 6. – С. 74-82.

5. Современные методы визуализации стволовых клеток in vivo (обзор) / А. В. Мелешина, Е. И. Черкасова, М. В. Ширманова и др. // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7. – №. 4. – С. 174-188.

6. Скуратов, А. Г. Методики трекинга трансплантированных мезенхимальных стволовых клеток в организме реципиента / А. Г. Скуратов, А. Н. Лызилов, Д. Р. Петренев // Проблемы здоровья и экологии. – 2014. – №. 4 (42). – С. 84-89.

7. Способы мечения клеток для визуализации in vivo / А. О. Соловьева, К. Э. Зубарев, А. Ф. Повещенко и др. // Гены и клетки. – 2013. – Т. 8. – №. 4. – С.33-38.

8. Labeling adipose-derived stem cells with Hoechst 33342: usability and effects on differentiation potential and DNA damage / P. Schendzielorz, K. Froelich, K. Rak, et al. // Stem Cells International. – 2016. – V. 2016. – P. 1-9.