

ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ТКАНЯХ РЕЦИПИЕНТА

Скуратов А. Г.¹, Лызиков А. Н.¹, Кондрачук А. Н.¹,
Призенцов А. А.¹, Петренев Д. Р.^{1,2}

¹Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»,

²Государственное научное учреждение

«Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси»

г. Гомель, Республика Беларусь

Введение

Последние годы расширяется область применения клеточных технологий, в частности использование стволовых клеток (СК) в лечении ряда дегенеративных патологических состояниях, таких как болезнь Паркинсона и Альцгеймера, рассеянный склероз, сахарный диабет, атрофия зрительного нерва, аутоиммунные заболевания, болезни легких, цирроз печени и др. Предполагается, что после имплантации клетки-потомки СК под действием микроокружения могут дифференцироваться в специализированные клеточные элементы соответствующей ткани.

Эффективность регенерации тканей и органов во многом зависит от направления и интенсивности миграции (трекинга) трансплантируемых СК. Поэтому изучение миграции клеток имеет крайне важное фундаментальное и прикладное значение [1].

Цель

Охарактеризовать разработанные методы трекинга СК после трансплантации и внедрить методику оптической визуализации СК в тканях реципиента.

К настоящему времени, для изучения миграционных свойств СК *in vivo* в условиях возможного клинического применения определен ряд критериев и требований:

- биосовместимость, безопасность, отсутствие токсичности;
- цитогенетическая стабильность, отсутствие генетической модификации СК;
- возможность определения единичной клетки в любой анатомической локализации;
- возможность количественной оценки миграции клеток;
- минимальное снижение возможности аппаратной визуализации при клеточном делении;
- присутствие контрастного вещества только в исследуемых СК;
- неинвазивность метода (отсутствие повреждений клетки в течение длительного времени);
- отсутствие изменений контраста (метки) с течением времени (с изменением возраста клетки) [2].

Однако, на сегодняшний день такого «идеального» метода или маркера, соответствующего всем перечисленным параметрам, не существует. Каждый метод мечения клеток имеет свои достоинства и недостатки, поэтому выбор оптимального маркера будет зависеть от поставленных исследователем задач.

В настоящее время доступны ряд методов и подходов для отслеживания судьбы СК *in vivo*, основанные на различных физических принципах действия. Условно их можно разделить на оптические, неоптические методы и гибридные технологии. Основные группы методов представлены в таблице 1.

Оптические методы исследования

К методам оптической визуализации относятся флюоресцентные и биолюминесцентные методы. Для улучшения видимости исследуемых структур применяются две группы контрастирующих агентов (маркеров): эндогенные, в норме присутствующие в клетках, и экзогенные, внесенные извне. Экзогенные маркеры подразделяются на прямые неспецифические (флюоресцентные красители, наночастицы, радиоизотопные метки) и непрямые специфические (репортерные гены). [3].

Таблица 1 — Методы визуализации миграционной активности стволовых клеток

Метод визуализации	Пространственное разрешение	Использование в экспериментах на животных/ в клинике	Применение	Достоинства	Недостатки
Оптические методы визуализации					
Флюоресцентная визуализация	2–3 мм	Да/нет	Структурный (молекулярный, клеточный, органный)	Высокая чувствительность	Не может применяться в клинике.
Биоломинесцентная визуализация	3–5 мм	Да/нет	Структурный (молекулярный, клеточный, органный)	Высокая чувствительность	Не может применяться в клинике
Неоптические методы визуализации					
Магнитная резонансная томография (МРТ)	10–300 мкм	Да/да	Структурный (молекулярный, клеточный, органный). Функциональный	Высокое пространственное разрешение. Нет воздействия радиации	Низкая чувствительность. Сигнал может не отражать жизнеспособные клетки
Однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОЭКТ)	1–2 мм	Да/да	Структурный (молекулярный). Функциональный	Высокая трансляционная способность	Чувствительность в 10–100 раз ниже, чем у ПЭТ. Воздействие радиации
Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ)	1–2 мм	Да/да	Структурный (молекулярный, органный). Функциональный	Высокая чувствительность. Высокая биологическая специфичность	Воздействие радиации.
Фотоакустическая визуализация	20–300 мкм	Да/да	Структурный (молекулярный, клеточный, органный)	Высокая разрешающая способность. Неинвазивность	Контактный режим детектирования в фотоакустической томографии

Эндогенные маркеры. Наиболее достоверными маркерами для трекинга (отслеживания) клеток являются их «внутренние, собственные» — нормальные компоненты клеток. К таким маркерам можно отнести гены Y-хромосомы при сингенной трансплантации клеток самцов-доноров самкам-реципиентам. Данная метка детектируется методом ПЦР и флуоресцентной гибридизацией *in situ*, а маркер характеризуется высокой стабильностью, отсутствием влияния на функциональную активность клетки и возможностью использования в долгосрочных экспериментах. К эндогенным маркерам также относят группы биомолекул, способных к флюоресценции: аминокислоты (триптофан, тирозин, фенилаланин), структурные белки (коллаген, эластин) и др. Однако основным ее недостатком является невозможность применения для прижизненной визуализации трансплантированных клеток в организме реципиента.

Экзогенные маркеры. С использованием экзогенных маркеров выполняется прямое неспецифическое мечение клеток. Метод основан на поглощении красителей клетками из культуральной среды. По механизму окрашивания клеток красители делятся на мембранные (DiI, DiO, PKH26 и др.), цитоплазматические (CFSE, CFDA и др.) и ядерные (Hoechst, DAPI и др.). Достаточно длительное сохранение активности метки (до месяца) позволяет проводить продолжительный мониторинг миграции клеток [4]. Достоинствами способа маркировки клеток с использованием флуоресцентных красителей являются доступность, простота исполнения, отсутствие генетической модификации клеток и возможность применения для исследования пролиферации. К недостаткам данного способа относятся нестабильность метки (выведение красителя из клетки) и возможность переноса красителя в окружающие клетки.

К экзогенным маркерам относят также различные виды наночастиц. В оптической визуализации применяются флуоресцентные полимерные наночастицы, флуоресцентные наночастицы диоксида кремния и квантовые точки. Непрямое специфическое мечение СК мо-

жет осуществляться с использованием методов генетического маркирования. При этом выделенная группа клеток подвергается трансфекции или вирусной трансдукции репортерными конструкциями, кодирующими метку (белок) под контролем специфического промотора. В качестве меток применяется семейство гомологичных флюоресцентных белков, полученных из кишечнорастворимых, наиболее распространенным из которых является зеленый флюоресцентный протеин (GFP), полученный из медузы *Aequorea victoria*. Флюоресцентные белки, будучи экспрессированными под контролем регуляторных элементов белка-мишени в составе репортерной конструкции, делают возможным оптическое наблюдение за экспрессией белка-мишени *in vivo* и *in vitro*.

Наиболее простой реализацией прижизненной визуализации на уровне организма является поверхностный *имиджинг*, который дает возможность оперативно (1–2 с) оценить размеры флюоресцирующей области, находящейся вблизи поверхности исследуемого объекта. Использование высокочувствительных приемников позволяет обнаруживать также глубинную флюоресценцию, однако при этом изображение существенно размывается из-за сильного рассеяния света тканями. Данные системы визуализации реализуют режимы эпифлуоресценции, транслюминесценции и 3D-флюоресцентной диффузионной томографии [5]. Для неинвазивного *in vivo* мониторинга распределения трансплантированных СК применяется также биолуминесцентная визуализация, основанная на детекции видимого света, выделяемого в результате реакции фермента люциферазы с субстратом люциферин. Люцифераза может служить маркером экспрессии различных молекул в отдельных клетках или организме живых лабораторных животных. Для наблюдения за экспрессией молекулы-мишени, маркированной люциферазой, используют биолуминесцентные томографы.

Большое количество репортерных генов используются для радионуклидной визуализации. Как правило, такие гены делят на три различных класса: кодирующие либо рецепторы, либо ферменты, либо белки-переносчики. Использование репортерных генов позволяет оценить распределение введенных клеток в реальном времени в течение продолжительного периода. Преимуществом метода является дополнительная возможность изучения функциональной активности клеток. Параллельно с анализом *in vivo* можно исследовать фиксированные ткани, осуществлять другие виды флуоресцентного анализа (цитофлуориметрию и сортировку клеток). Также одним из преимуществ использования репортерных генов является то, что сигнал генерируется только живыми клетками. Однако флуоресцентные белки характеризуются низкой фотостабильностью, метод подходит только для исследования на небольших животных; необходимость модификации генетического материала клетки может привести к изменению ее функциональной активности, а также трудоемкость процесса получения культуры клеток, стабильно экспрессирующей репортерный ген на протяжении продолжительного периода времени.

Материал и методы исследования

Использовались линейные крысы Wistar с индуцированным тетрахлорметаном циррозом печени. Выделение и культивирование МСК из жировой ткани проводили по стандартной методике протокола. Проводили типирование МСК по характерной морфологии и экспрессии маркерных генов (CD 90, 29, 44, 45 и др.). Клетки прижизненно окрашивали с флуоресцентными красителями РКН 67, дающим желто-зеленое свечение, и CM-Dil, флуоресцирующим красным цветом. Для контраста дополнительно окрашивали ядра клеток Dapi. Меченные МСК ресуспендировали в растворе D-PBS и вводили в количестве $1-3 \times 10^6$ клеток/мл внутрипортально через канюлированную воротную вену. На 5-е сутки животных выводили из эксперимента. Из печени изготавливали криосрезы толщиной 8–10 мкм, проводили флуоресцентную микроскопию на аппарате NIKON Eclipse E200.

Результаты исследования и их обсуждение

При флуоресцентной микроскопии криопрепаратов печени выявлены яркие очаги специфического свечения желто-зеленого, которые определялись перипортально, местами диффузно проникали в дольки. При окрашивании МСК красителем CM-Dil в клетках индуцировалось свечение в красном спектре. Ядра были мечены красителем Dapi синего цвета. Эти очаги специфической флуоресценции также были выявлены в перипортальных зонах (рисунок 1).

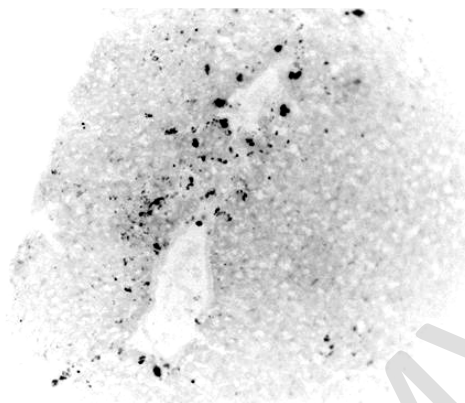
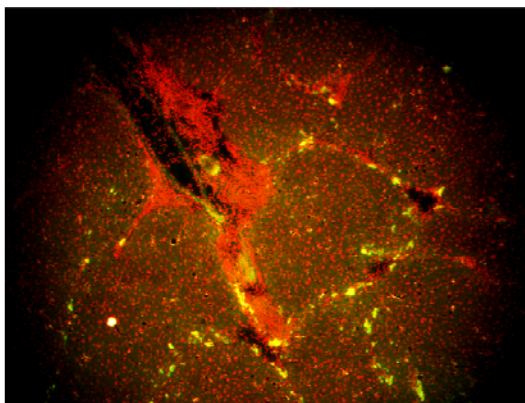


Рисунок 1 — Флуоресцентная микроскопия криопрепарата печени крысы с экспериментальным циррозом печени на 5-е сутки трансплантации (объектив $\times 10$): слева — МСК, меченные РКН 67; справа — CM-Dil (инвертированное ч/б изображение)

Выводы

Проведенные исследования показали, что оптические методики отслеживания донорских СК в тканях реципиента после трансплантации являются эффективными и наглядно демонстрируют приживление МСК, меченных флуоресцентными красителями (РКН67, CM-Dil), в печени реципиента при экспериментальном циррозе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhao, C. In vivo stem cell imaging / C. Zhao, M. Tian, H. Zhang // Open Nucl Med J. — 2010. — № 2. — P. 171–177.
2. Frangioni, J. V. In vivo tracking of stem cells for clinical trials in cardiovascular disease / J. V. Frangioni, R. J. Hajjar // Circulation. — 2004. — Vol. 110. — P. 3378–3384.
3. Способы мечения клеток для визуализации in vivo / А. О. Соловьева [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2013. — № VIII(4). — С. 33–38.
4. Intranasal mesenchymal stem cell treatment for neonatal brain damage: long-term cognitive and sensorimotor improvement / V. Donega [et al.] // PLoS One. — 2013. — Vol. 8(1). — P. 1–7.
5. Зиганшин, А. У. Наночастицы: фармакологические надежды и токсикологические проблемы / А. У. Зиганшин, Л. Е. Зиганшина. — Казанский медицинский журнал. — 2008. — № 89(1). — С. 1–7.

УДК 612.17: 612. 822.8] – 053.2- 074

ОЦЕНКА ПРИСПОСОБИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ СИСТЕМЫ КРОВООБРАЩЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПАССИВНОЙ ОРТОСТАТИЧЕСКОЙ ПРОБЫ У ДЕТЕЙ

Скуратова Н. А.^{1,2}

¹Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»,

²Учреждение здравоохранения

«Гомельская областная детская клиническая больница»

г. Гомель, Республика Беларусь

Введение

Среди множества методов исследования сегодня все больше внимания уделяется оценке автономной регуляции деятельности сердечно-сосудистой системы (ССС) в состоянии покоя и в ответ на стресс, поскольку эти показатели являются предикторами различных тяжелых, порой инвалидизирующих заболеваний.

Суть ортостатических расстройств кровообращения состоит в патологическом изменении общей и регионарной гемодинамики вследствие недостаточности приспособительных реакций системы кровообращения на гравитационное перераспределение крови в организме при смене положения тела от горизонтального к вертикальному (ортостатика) или при длительном стоянии (ортостаз) с возникновением головокружения, слабости, затемнения сознания, в тяжелых случаях и с возникновением обморока, коллапса. Приспособительные гемо-