БИОТЕХНОЛОГИЯ, 2024, том 40, № 4, с. 73–83

МЕДИЦИНСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

(УДК) 57

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МЕЧЕНИЯ КЛЕТОК И МИКРОВЕЗИКУЛ БЕЛКОМ KATUSHKA2S ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ *in vivo* и *ex vivo*

© 2024 г. В. А. Кирьянова[1], А. М. Аймалетдинов[1, 2], С. К. Клетухина[1], М. О. Гомзикова[1, *]

[1]Институт фундаментальной медицины и биологии, ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Лаборатория "Межклеточная коммуникация", Казань, 420021 Россия

[2]Институт фундаментальной медицины и биологии, ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Лаборатория "Регенеративная ветеринария", Казань, 420012 Россия

**e-mail: marina.gomzikova.gmo@gmail.com*

Поступила в редакцию 26.03.2024 г.
После доработки 22.07.2024 г.
Принята к публикации 07.08.2024 г.

Проведен *in vivo* сравнительный анализ эффективности биораспределения меченых с помощью флуоресцентных белков клеток и микровезикул. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) генетически модифицированы с помощью рекомбинантного лентивируса, несущего ген флуоресцентного белка Katushka2S с целью мечения самих клеток и получаемых от них микровезикул (МВ). Селекцию генетически модифицированных МСК проводили путем сортировки клеток с помощью проточного цитометра-сортера FACS Aria III. Биораспределение клеток оценивали путем детекции флуоресцентного сигнала с использованием прибора IVIS Spectrum. Внутривенное введение мышам 5×10^5 МСК-Katushka2S недостаточно для детекции биораспределения клеток *in vivo*. При анализе *ex vivo* обнаружено, что сразу после внутривенного введения МСК аккумулируются в легких и печени. Интенсивности флуоресценции белка Katushka2S и чувствительности прибора IVIS Spectrum достаточно для визуализации скопления клеток МСК-Katushka2S *ex vivo*. В то же время количества МВ-Katushka2S, выделенных из 1.5×10^6 МСК-Katushka2S, оказалось недостаточно для детекции биораспределения МВ *in vivo* и *ex vivo*. Следовательно, применение данного метода для оценки биораспределения единичных клеток и микровезикул *in vivo* является неэффективным.

Ключевые слова: биораспределение, внеклеточные везикулы, индуцированные микровезикулы, мембранные везикулы, мезенхимальные стволовые клетки, мультипотентные стромальные клетки, флуоресцентный белок

DOI: 10.56304/S0234275824040057

Одним из наиболее перспективных инструментов регенеративной медицины является клеточная терапия с использованием мезенхимальных стволовых клеток (МСК), поскольку они обладают потенциалом к мультипотентной дифференцировке и иммунорегуляторной активностью [1]. Однако недостатки клеточной терапии с использованием МСК (низкая выживаемость клеток, дифференцировка в нежелательном направлении, бесконтрольное деление [2, 3]) ограничивают ее использование, поэтому продолжается поиск и разработка новых инструментов регенеративной медицины.

Новым подходом является бесклеточная терапия на основе микровезикул (МВ), которые представляют собой наноразмерные липидные двухслойные структуры, высвобождаемые различными типами клеток [4]. МВ обладают способностью переносить биологически активные молекулы, включая РНК, ДНК, белки, углеводы и липиды непосредственно к клеткам мишеням [5]. Кроме того, МВ имеют важное значение в передаче сигналов внутри клетки и поддержании гомеостаза [6] и обладают такими преимуществами, как небольшой размер, который обеспечивает лучшее биораспределение, низкую иммуногенность, отсутствие способности к делению [7]. Большое количество экспериментальных данных об эффективности применения нативных и модифицированных МВ МСК было получено в ходе доклинических исследований [8–10].

В рамках программы доклинических исследований обязательным разделом является получение данных о биораспределении и фармакокинетике потенциальных терапевтических средств. Одним из самых широко используемых методов для оценки биораспределения клеток и микровезикул *in vivo* является их мечение с помощью флуоресцентных

Таблица 1. Состав реакционной смеси для трансфекции
Table 1. Composition of the reaction mixture for transfection

Реагент	Количество в расчете на 1 культуральную 10 см чашку, мкл
Векторная плазмида pKatushka2S	8.27
Упаковочная плазмида psPAX2	5.28
Оболочечная плазмида VSV-G	2.8
Стерильная MilliQ H_2O	151
2.5 M CaC_{l2}	50
0.1× TE (10 мМ Трис + 1 мМ ЭДТА pH 8.0) (“Евроген”, Россия)	293
2× HBS (0.280 M NaCl (“ПанЭко”, Россия), 0.1 M Hepes (Servicebio, Китай), 0.0015M Na_2HPO_4 (Servicebio), pH 7.12)	506

белков с последующей неинвазивной детекцией интенсивности флуоресцентного сигнала. Для мечения клеток и микровезикул, ген флуоресцентного белка вводят в клетки с помощью плазмидных или вирусных векторов. Далее клетки и микровезикулы, обладающие флуоресценцией, детектируют в органах и тканях организма животного [11].

С помощью данного метода было обнаружено, что МСК после внутривенной инъекции задерживаются в легких, которые являются первым капиллярным фильтром, позже происходит перераспределение клеток, в основном в печень, селезенку и почки, с небольшим перераспределением МСК в другие органы [12]. МВ после внутривенной инъекции обнаруживаются в печени, селезенке, легких и желудочно-кишечном тракте [13]. Однако до настоящего времени не было проведено сравнительного анализа разрешающей способности метода мечения с помощью флуоресцентных белков с последующей неинвазивной детекцией интенсивности флуоресцентного сигнала в организме животного для оценки биораспределения клеток и микровезикул. Поэтому целью нашего исследования была оценка биораспределения мезенхимальных стволовых клеток и микровезикул после внутривенного введения мышам и проведение сравнительного анализа разрешающей способности метода.

Для визуализации *in vivo* преимущественно используются красители, обладающие флуоресценцией в красной и дальней красной области спектра, так как большинство тканей не автофлуоресцируют в этом диапазоне и эти длины волн обладают меньшей фототоксичностью [14, 15]. Учитывая это, в качестве флуоресцентной метки мы использовали белок Katushka2S для оценки биораспределения мезенхимальных стволовых клеток и микровезикул после их внутривенного введения мышам. Katushka2S – дальне-красный флуоресцентный белок с максимумами возбуждения и эмиссии флуоресценции при 588 и 633 нм, соответственно [16]. Он имеет самую высокую яркость, быстрое созревание и наилучшее отношение сигнал/шум по сравнению со многими другими флуоресцентными белками дальнего красного цвета [16].

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Сборка рекомбинантного лентивируса

Рассев клеток линии HEK293FT (ATCC CRL-11268, клетки эмбриональной почки человека 293) производили на культуральную 10 см чашку Петри (NEST, США) в количестве 2–2.5 × 10^6 в 10 мл среды DMEM (Sigma, США) содержащую 10% FBS (Sigma). Клетки культивировали до получения клеточного монослоя плотностью 70% в термостате при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2.

Через 24 ч производили смену среды и добавляли 10 мл свежей среды DMEM и инкубировали клетки в тех же условиях еще в течение 2 ч.

Для трансфекции смешивали в 15 мл стерильной пробирке следующие компоненты, в соответствии с табл. 1.

Реагент HBS добавляли, держа 15 мл пробирку со смесью на встряхивателе Vortex (ELMI, Латвия). Смесь перемешивали на этом встряхивателе и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Далее смесь добавляли на 10 см чашку с клетками HEK293T, инкубировали чашку в течение 6–8 ч при комнатной температуре, затем заменяли среду на свежую DMEM и продолжали инкубировать.

Через 24 ч после трансфекции собирали супернатант (10 мл), содержащий рекомбинантный лентивирус, в стерильную 15 мл пробирку. А к клеткам добавляли 10 мл свежей среды DMEM. Сбор супернатанта осуществляли через каждые 12 ч. Весь собранный супернатант хранили при 4°C. После последнего сбора объединенный супернатант цен-

трифугировали при 300 *g* на Rotina 460R (Hettich, Германия) в течение 5 мин и фильтровали через фильтр 0.22 мкм.

Для концентрирования лентивируса переносили по 30 мл полученного раствора в ультрацентрифужные пробирки 50Ultra-Clear™ Tubes 1 × 31/2 in. (25 × 89 мм) (Beckman Coulter, Inc., США) и центрифугировали в ультрацентрифуге Optima™ L-90K (Beckman Coulter, Inc.) при 122000 *g* в течение 2 ч при температуре 4°C. Супернатант удаляли и ресуспендировали осадок в среде DMEM. Аликвоты по 2 мл хранили в криопробирках при –80°C.

Выделение мезенхимальных стволовых клеток из подкожной жировой ткани человека

Жировую ткань получали от здоровых доноров в результате выполнения операций по медицинским показаниям в Научно-клинического центра прецизионной и регенеративной медицины Казанского Федерального Университета. Забор материала осуществляется строго в соответствии с этическими принципами, утвержденными локальным этическим комитетом Казанского Федерального университета и при информированном согласии донора (Протокол № 3 от 23.03.2017). Выделение стволовых клеток из жировой ткани человека осуществляли методом ферментативной обработки 0.2%-ным раствором коллагеназы II (“Диа-М”, Россия). Инкубацию ткани проводили при 37°C на шейкере при 120 об/мин в течение 1 ч. Клетки трижды промывали фосфатно-буферным раствором (PBS). Полученный клеточный осадок ресуспензировали в среде α-MEM (“ПанЭко”), с добавлением FBS (Sigma), 2 мМ L-глутамина (“ПанЭко”). Полученные клетки окрашивали антителами: CD29 (2115040, Sony, США), CD73 (344014, BioLegend, США), CD90 (51-9007657, BD Biosciences, США), CD45 (sc-25590, Santa Cruze, США), CD105 (323218, BioLegend) и HLA-DR (IM0463U, Beckman coulter) и подтверждали, что клетки обладают характерным для МСК иммунофенотипом: CD29-позитивные, CD73-позитивные, CD90-позитивные, CD105-позитивные, D45-негативные, HLA-DR-негативные [17]. МСК поддерживали на среде DMEM (Sigma), к которой добавляли 10% FBS (Sigma), 2 мМ L-глутамина и смесь антибиотиков пенициллина (5000 Ед./мл) и стрептомицина (5000 мкг/мл) (“ПанЭко”). Культуры клеток культивировали в инкубаторе inCusaFeMCO-15AC (Panasonic, Япония) при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2.

Трансдукция мезенхимальных стволовых клеток лентивирусом

Для генетической модификации рекомбинантным лентивирусом, рассеивали клетки в 6-луночный планшет до плотности монослоя 70%. Подготавливали смесь для трансдукции, с учетом MOI (Multiplicity of infection – множественность инфекции) 10. Затем наносили на клетки приготовленную смесь для трансдукции с применением 50 мкг/л раствора протамина сульфата (Sigma). Через 6 ч сменяли среду на свежую. На 4 сутки после вирусной трансдукции производили отбор и сортировку генетически модифицированных МСК, регистрируя дальне-красную флуоресценцию белка на проточном цитометре с функцией сортировки FACS Aria III (BD Biosciences).

Для анализа экспрессии дальне-красного флуоресцентного белка Katushka2S использовали метод конфокальной микроскопии LSM 710 (Carl Zeiss, Германия) [18].

Получение микровезикул из МСК

Получение микровезикул из культуры клеток МСК человека осуществляли согласно Pick et al. с модификациями [19]. При достижении культурой клеток плотности монослоя 90%, отбирали питательную среду, дважды промывали культуру с помощью PBS. Клетки открепляли от культурального пластика при помощи 0.25% раствора трипсина-ЭДТА (Life Technologies, США), затем их отмывали PBS. Инкубировали клетки в DMEM без сыворотки, содержащей 10 мкг/мл цитохалазина B (Sigma-Aldrich) в течение 30 мин при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2. Далее клеточную суспензию активно встряхивали 30 с и осаждали 100 g 10 мин (центрифуга LMC-3000 (BioSan, Латвия)). После чего осуществляли отбор супернатанта и два последовательных этапа центрифугирования: 300 *g* 20 мин и 2000 *g* 25 мин (центрифуга CM-50 (ELMI)). Осадок, содержащий МВ, отмывали большим количеством PBS, центрифугировали при 2000 *g* 25 мин. Отделяли супернатант и полученный осадок МВ использовали далее в работе.

Лабораторные животные

В работе использовали мышей *Mus musculus* ICR, полученных из питомника лабораторных животных “Стезар” (Москва, Россия), содержание которых соответствовало правилам, принятым в КФУ и рекомендациям местного этического комитета (протокол № 30, от 28.06.2021.

Биораспределение

Биораспределение клеток и везикул исследовали при внутривенном введении мышам. Исследования проводили при помощи IVIS Spectrum (PerkinElmer, США). Для этого животным внутривенно вводили 5×10^5 МСК-Katushka2S или иМВ-Katushka2S, выделенные из 1.5×10^6 МСК.

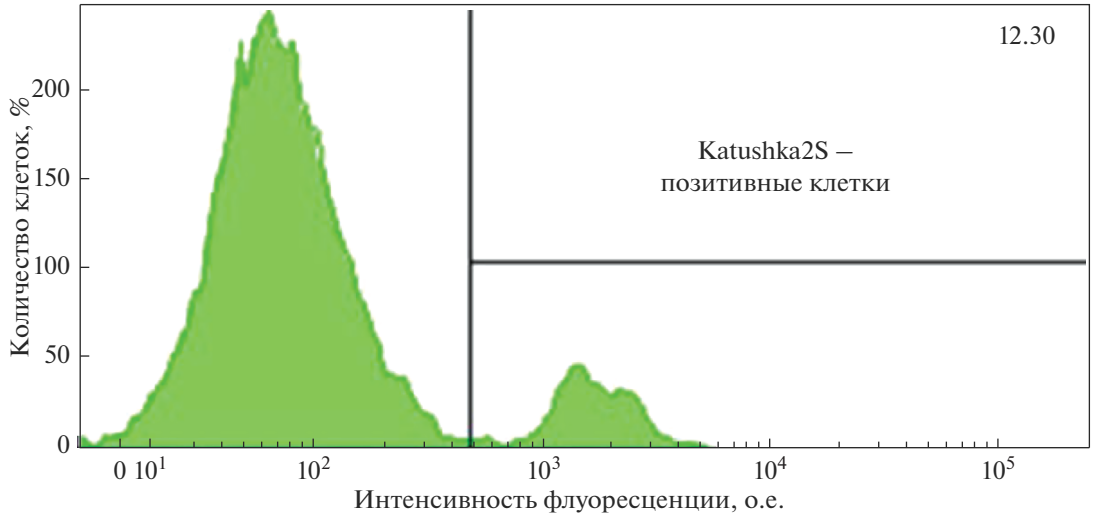

Рис. 1. Анализ флуоресценции клеток HEK293FT через 24 ч после кальций-фосфатной трансфекции. Пик– трансфицированные клетки.
Fig. 1. Fluorescence analysis of HEK293FT cells 24 h after calcium phosphate transfection. The peak represents the transfected cells.

Далее животных наркотизировали внутримышечно при помощи золетила 100 (Virbac, Франция) в дозе 0.7 мл/кг и медитина (“Апиценна”, Россия) в дозе 0.1 мл/кг и оценивали распределение флуоресцентного сигнала в организме животного с использованием системы визуализации IVIS Spectrum (Perkinelmer).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сборка рекомбинантного репликационно-дефектного лентивируса, несущего ген красного флуоресцентного белка Katushka2S

С целью получения флуоресцентно меченных клеток и микровезикул, мы провели сборку рекомбинантного репликационно-дефектного лентивируса, несущего ген красного флуоресцентного белка Katushka2S (LV-Katushka2S). Для этого нами была проведена ко-трансфекция пакующей линии клеток HEK293FT тремя плазмидами: лентивирусной векторной, содержащей целевой ген (pLX303-Katushka2S, #25897), оболочечной (pCMV-VSV-G, AddGene #8454) и упаковочной (psPAX2, AddGene #12260), методом кальций-фосфатной трансфекции. Мы определили эффективность кальций-фосфатной трансфекции поскольку от нее зависит количество трансфицированных клеток и, следовательно, эффективность сборки лентивируса. Количество трансфицированных, то есть обладающих флуоресценцией в красной области спектра клеток оценили методом проточной цитофлуориметрии (рис. 1).

Эффективность трансфекции клеток HEK293FT, которые были успешно трансфицированы и экспрессировали красный флуоресцентный белок Katushka2S составила 12.3%. Наши результаты согласуются с данными других авторов [20].

Проведение генетической модификации мезенхимальных стволовых клеток рекомбинантным лентивирусом LV- Katushka2S

Генетическая модификация (вирусная трансдукция) МСК для получения культуры клеток со сверхэкспрессией Katushka2S нами была проведена по освоенной ранее методике с использованием рекомбинантного лентивируса LV-Katushka2S [21]. Одной из важных характеристик вирусной трансдукции является множественность инфекции (MOI) – количество вирусных частиц на клетку-мишень, которое должно быть достаточным для эффективной трансдукции. Слишком высокий MOI может привести к цитотоксичности или другим нежелательным эффектам, поэтому выбор его значения зависит от конкретных целей эксперимента и желаемого результата. Мы использовали MOI 10, учитывая исследование Andrews S. et al. [22] этого значения достаточно для высокого процента заражения и в то же время MOI 10 не приводит к цитотоксичности. МСК культивировали в 6-луночном культуральном планшете до плотности клеточного монослоя 70%. Клетки инфицировали полученным рекомбинантным LV-Katushka2S с MOI 10. После добавления рекомбинантного лентивируса, клетки инкубировали в течение 3 сут при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2. Анализ флуоресценции в красной области спектра в культуре МСК осуществляли при помощи флуоресцентного микроскопа Axio Observer.Z1 (CarlZeiss) (рис. 2).

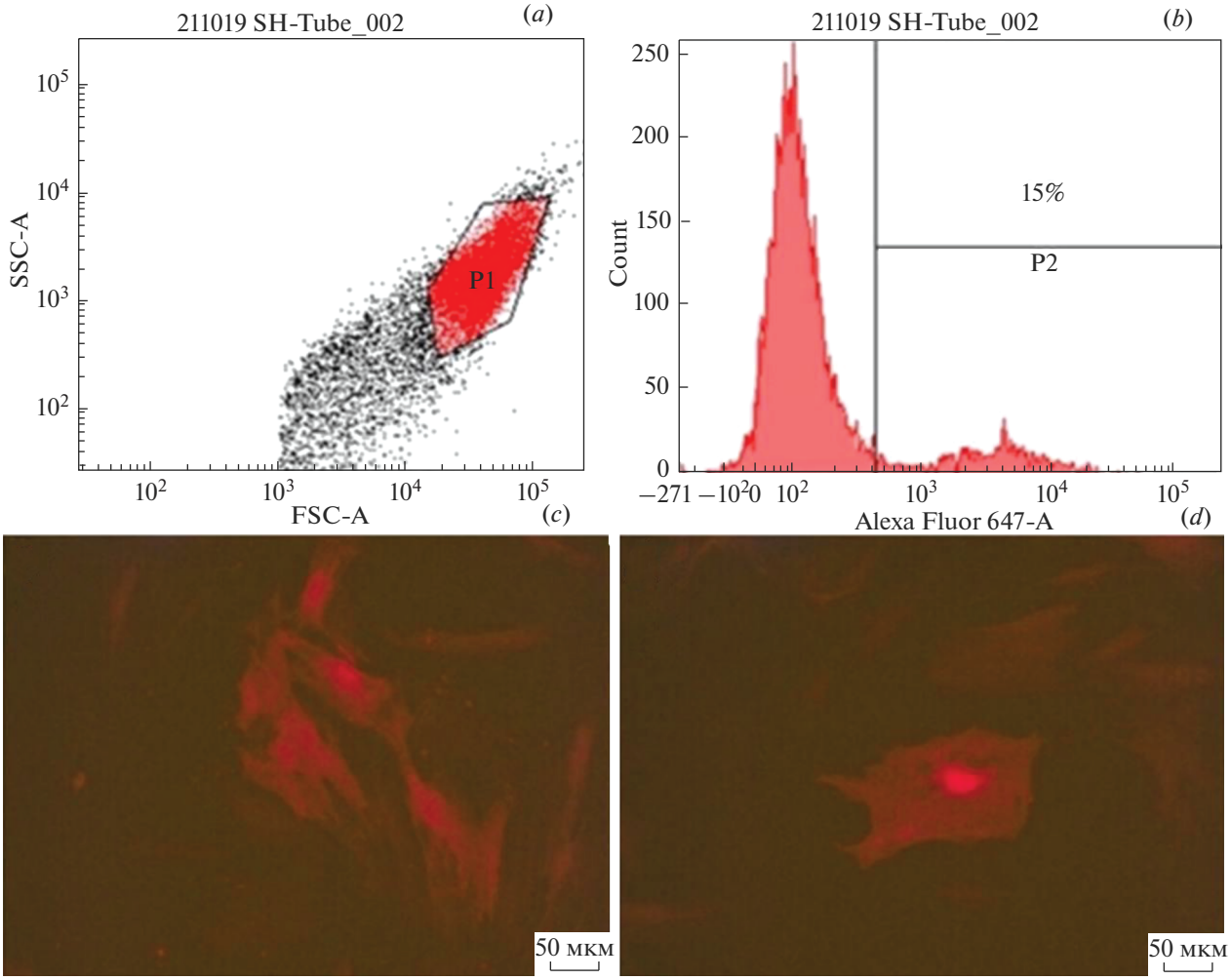

Рис. 2. Анализ флуоресценции МСК после трансдукции: *a*, *b* – проточная цитометрия, *c*, *d* – конфокальная микроскопия. *a* – Выделение популяции МСК с помощью гейта; *b* – анализ интенсивности флуоресценции клеток в красной области спектра; *c*, *d* – флуоресцентная микрофотография МСК после трансдукции. Масштабный отрезок 50 мкм.
Fig. 2. Fluorescence analysis of MSCs after transduction: *a*, *b* – flow cytometry, *c*, *d* – confocal microscopy. *a* – Gating to select the MSC population; *b* – analysis of cell fluorescence intensity in the red region of the spectrum; *c*, *d* – fluorescent micrograph of MSCs after transduction. Scale bar 50 μm.

Согласно полученным результатам, в культуре МСК 15% клеток обладали флуоресценцией в красной области спектра. Это свидетельствует о том, что в результате генетической модификации рекомбинантным лентивирусом клетки экспрессируют красный флуоресцентный белок Katushka2S. Однако, по-видимому, такого количества вирусных частиц (MOI 10) было недостаточно для заражения всех клеток-мишеней, поскольку некоторые клетки остались незараженными или инфицированными лишь частично.

Сортировка генетически модифицированных мезенхимальных стволовых клеток

С целью увеличения процента/обогащения генетически модифицированных МСК в культуре, мы провели сортировку клеток на основании интенсивности флуоресценции в красной области спектра с помощью проточного цитофлуориметра с функцией сортировки FACS Aria III (BD Biosciences). Режим сортировки был подобран с целью максимального выхода клеток. Полученные результаты представлены на рис. 3.

В результате сортировки согласно данным проточной цитометрии процент клеток, обладающих флуоресценцией в диапазоне 588–633 нм, составил 82% (рис. 3*b*).

Данные проточной цитофлуориметрии были подтверждены при помощи конфокальной микроскопии. Для этого клетки выращивали в 6-луночном планшете до плотности монослоя 70%. Микрофотографии культуры отсортированных

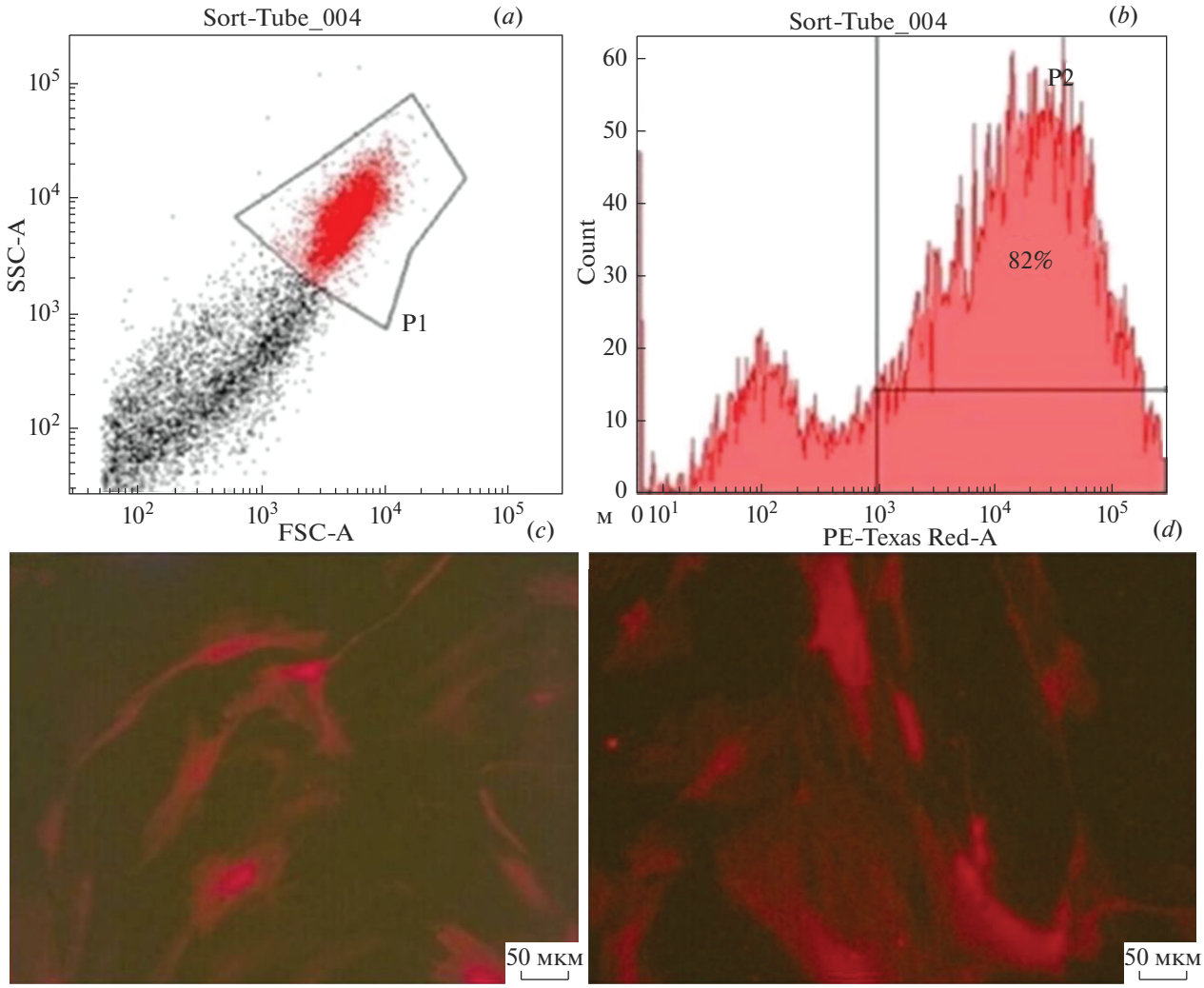

Рис. 3. Анализ отсортированных генетически модифицированных мезенхимальных стволовых клеток: *a, b* – проточная цитометрия, *c*, *d* – конфокальная микроскопия. *a* – Выделение популяции МСК с помощью гейта; *b* – анализ интенсивности флуоресценции клеток в красной области спектра и выделение наиболее ярких клеток; *c*, *d* – флуоресцентная микрофотография культуры отсортированных МСК. Масштабный отрезок 50 мкм.
Fig. 3. Analysis of sorted genetically modified mesenchymal stem cells: *a*, *b* – flow cytometry, *c*, *d* – confocal microscopy. *a* – Gating to select the MSC population; *b* – analysis of cell fluorescence intensity in the red region of the spectrum and selection of the brightest cells; *c*, *d* – fluorescent micrograph of the sorted MSC culture. Scale bar 50 μm.

МСК, представленные на рис. 3(*c*, *d*), подтверждают успешную сортировку обладающих флуоресценцией клеток.

Таким образом, мы увеличили количество Katushka2S экспрессирующих клеток в 5.47 раз. Наличие нетрансдуцированных клеток в итоговой/отсортированной популяции объясняется выбранным режимом сортировки. Мы использовали режим максимального выхода клеток, при котором происходит сортировка всех детектированных трансдуцированных клеток даже если есть риск "загрязнения" итоговой популяции нецелевыми/нетрансдуцированными клетками. Впоследствии после наращивания клеток возможно проведение повторной процедуры сортировки клеток, так как прибор обеспечивает стерильные условия процесса.

Оценка интенсивности флуоресценции генетически модифицированных мезенхимальных стволовых клеток с помощью прибора IVIS Spectrum

С целью определения минимального количества генетически модифицированных клеток, необходимого для детекции флуоресцентного сигнала с помощью прибора IVIS Spectrum (Perki-

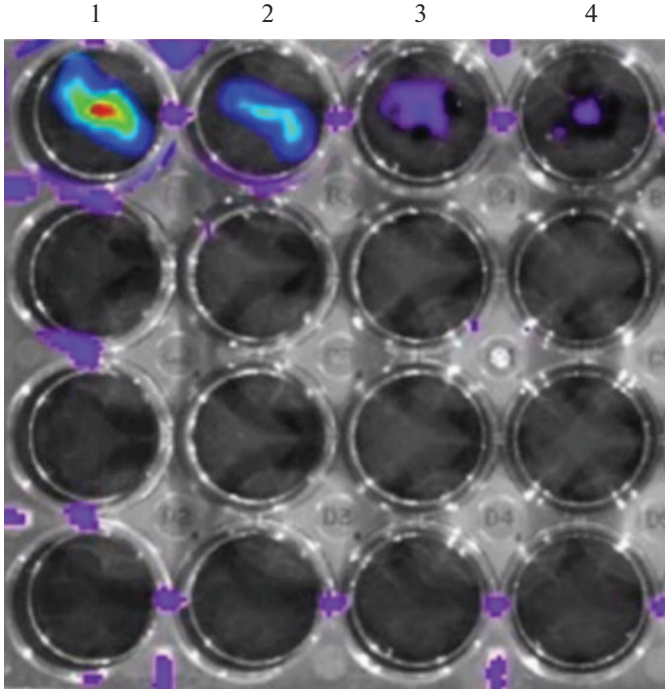

Рис. 4. Оценка интенсивности флуоресценции суспензии MCK-Katushka2S с помощью прибора IVIS Spectrum In Vivo Imaging System в планшете. 1 лунка – 5×10^5 клеток, 2 лунка – 2.5×10^5 клеток, 3 лунка – 1×10^5 клеток, 4 лунка – 5×10^4 клеток.
Fig. 4. Evaluation of the fluorescence intensity of the MSC-Katushka2S suspension using the IVIS Spectrum In Vivo Imaging System in a plate. Well 1 – 5×10^5 cells, well 2 – 2.5×10^5 cells, well 3 – 1×10^5 cells, well 4 – 5×10^4 cells.

nelmer), нами была оценена флуоресценция MCK-Katushka2S, нанесенных в разных разведениях в лунки 24-луночного планшета (рис. 4). Для этого были приготовлены суспензии со следующим количеством клеток MCK-Katushka2S: 1 лунка – 5×10^5 клеток, 2 лунка – 2.5×10^5 клеток, 3 лунка – 1×10^5 клеток, 4 лунка – 5×10^4 клеток.

Согласно полученным данным, минимальное количество клеток MCK-Katushka2S, необходимое для уверенной детекции сигнала с помощью прибора IVIS Spectrum составило 5×10^5 клеток (рис. 4, лунка № 1). Опираясь на эти данные, мы подобрали количество МСК и МВ для внутривенного введения животным на следующем этапе.

Характеристика биораспределения MCK-Katushka2S и MB-Katushka2S in vivo и ex vivo

На этом этапе нами были получены индуцированные микровезикулы (иМВ). Ранее нашим коллективом были оценены морфология и размер иМВ с помощью сканирующей электронной микроскопии. Согласно полученным данным, МВ, выделенные с помощью цитохалазина В из МСК, имеют сферическую структуру и размеры от 100 до 2600 нм, причем большинство (89.36%) имеют размеры от 100 до 1200 нм [23]. иМВ при “отшнуровывании” от цитоплазматической мембраны МСК имеют такое же содержимое и иммунофенотип, что и родительские МСК, поэтому иМВ также как и клетки МСК будут содержать флуоресцентный белок Katushka2S [23].

С целью оценки биораспределения мезенхимальных стволовых клеток и микровезикул, нами было проведено введение МСК и иМВ мышам и исследовано распределение флуоресцентного сигнала в организме животного с использованием системы визуализации IVIS Spectrum.

В хвостовую вену мышам внутривенно вводили 5×10^5 генномодифицированных мезенхимальных стволовых клеток (MCK-Katushka2S) и проводили детекцию флуоресцентного сигнала *in vivo* с помощью прибора IVIS Spectrum In Vivo Imaging. В качестве контроля использовали мышей, которым вводили физиологический раствор. Свечение наблюдалось только в области введения (рис. 5).

Полученные результаты, позволяют сделать вывод, что интенсивности флуоресценции используемого нами красного флуоресцентного белка и/или количества клеток недостаточно для неинвазивной визуализации *in vivo*, поэтому были проведены дополнительные исследования биораспределения на иссеченных органах с помощью макроскопической визуализации *ex vivo*.

На следующем этапе после внутривенного введения MCK-Katushka2S или индуцированных мем-

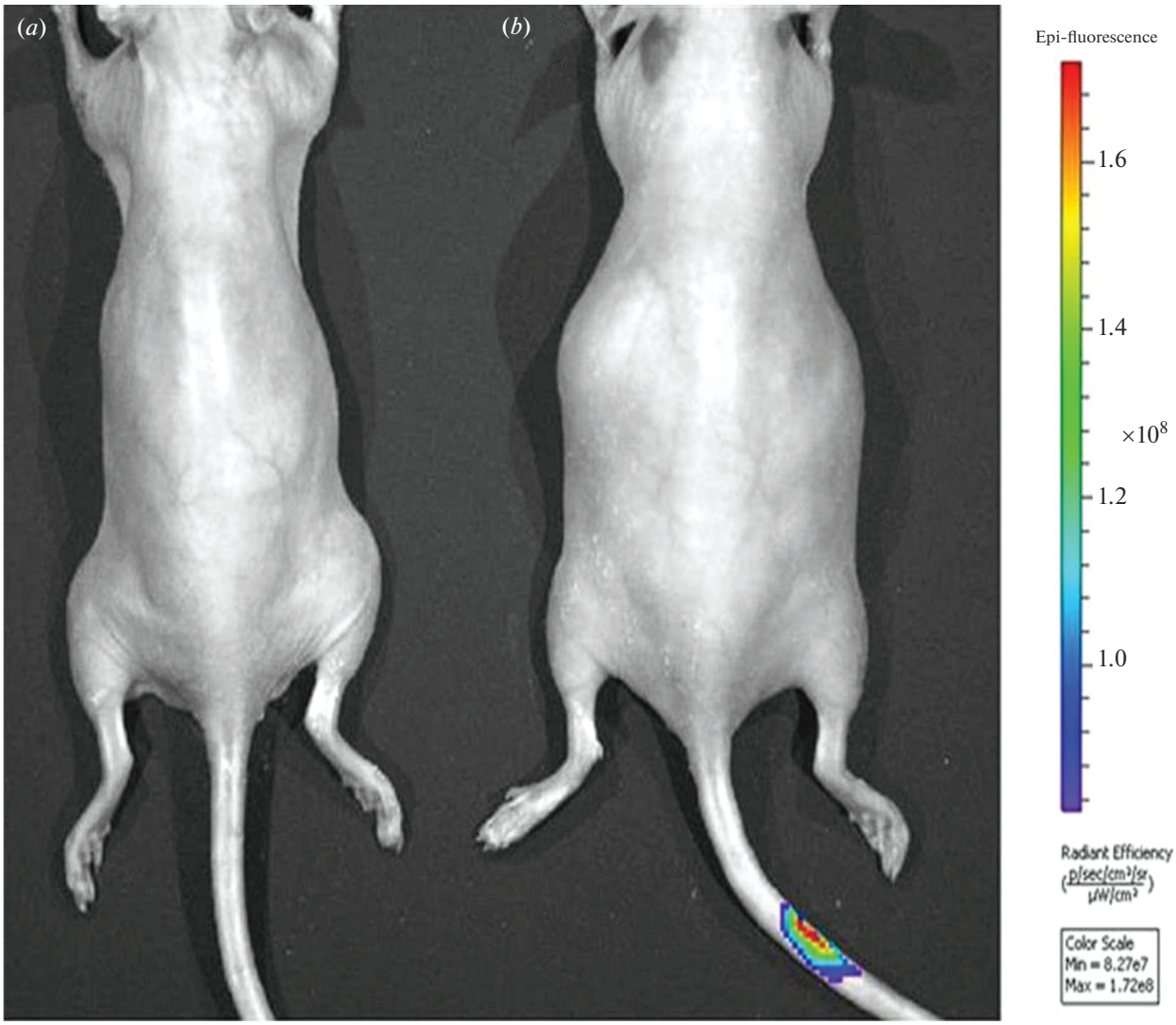

Рис. 5. Анализ биораспределения МСК-Katushka2S *in vivo*. *a* – Контрольное животное, *b* – опытное.
Fig. 5. Analysis of MSC-Katushka2S biodistribution *in vivo*. *a* – Control animal, *b* – experimental animal.

бранных везикул (иМВ-Katushka2S) флуоресценцию *ex vivo* анализировали в тканях при помощи прибора IVIS Spectrum In Vivo Imaging System. Результаты анализов представлены на рис. 6.

Как следует из представленных результатов, спустя 1 ч после введения 5×10^5 МСК-Katushka2S, клетки аккумулировались в легких и в печени (рис. 6*a*). Однако введенные индуцированные микровезикулы (иМВ-Katushka2S), выделенные из 1.5×10^6 МСК, визуализировать не удалось (рис. 6*b*).

Таким образом, мы установили, что чувствительности прибора IVIS Spectrum In Vivo Imaging System (Perkinelmer, США) достаточно для визуализации скопления клеток МСК-Katushka2S *ex vivo*, однако распространение микровезикул с помощью данного метода отследить невозможно. Это связано с тем, что везикулы, обладая меньшим (по сравнению с МСК) размером, демонстрируют лучшую проникающую способность и более быструю скорость распределения *in vivo*. Вероятно, чувствительности данного метода для детекции биораспределения микровезикул недостаточно вследствие быстрого рассеивания везикул после внутривенного введения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мечение с помощью флуоресцентных белков широко используется для исследования биораспределения. Однако, необходимо учитывать, что интенсивность флуоресценции зависит от множества факторов, в частности от эффективности трансдукции, количества копий гена на клетку, уровня экспрессии белка [23]. Успешная детекция флуоресцентного сигнала зависит от чувствительности прибора и мощности источника

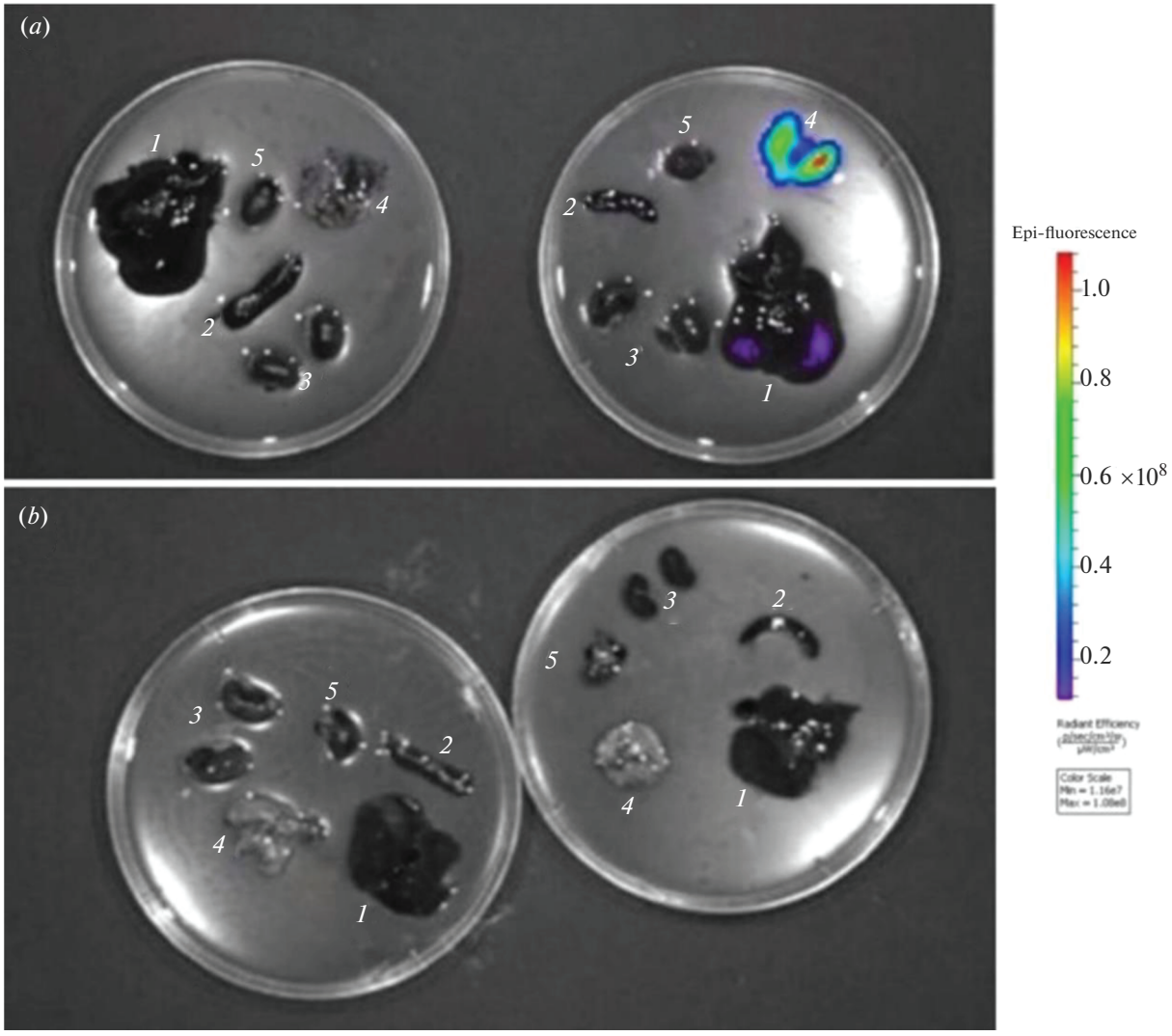

Рис. 6. Анализ биораспределения меченых МСК и иМВ в органах. Анализ через 1 ч после внутривенного введения: *a* – МСК-Katushka2S, *b* – иМВ-Katushka2S. Слева контрольные ткани, справа – ткани эксперимента: *1* – печень, *2* – селезенка, *3* – почки, *4* – легкие, *5* – сердце.

Fig. 6. Analysis of the biodistribution of labeled MSCs and iMVs in organs. Analysis 1 hour after intravenous administration: *a* – MSC-Katushka2S, *b* – iMV-Katushka2S. Control tissues are on the left, experimental tissues on the right: *1* – liver, *2* – spleen, *3* – kidneys, *4* – lungs, *5* – heart.

возбуждающего света. Кроме того, вероятно скорость распределения исследуемого препарата напрямую влияет на успешность детекции флуоресцентного сигнала, так как быстрое распределение препарата в организме животного исключает локальное скопление, снижает эффект складывания флуоресцентного света в области скопления, что приводит к снижению эффективности детекции.

Согласно полученным результатам, сразу после введения МСК аккумулируются в легких и печени, при этом интенсивности флуоресценции белка Katushka2S и чувствительности прибора IVIS Spectrum достаточно для визуализации скопления клеток МСК-Katushka2S *ex vivo*. Распространение единичных клеток и микровезикул, которые обладают лучшей проникающей способностью из-за небольшого размера и быстро рассеиваются в организме мыши с помощью данного метода отследить невозможно. Следовательно, для увеличения его чувствительности нужно модифицировать протокол, при этом увеличить количество получаемых микровезикул и оптимизировать условия их детекции. Таким образом, необходимо выбирать правильный метод визуализации, исходя из объекта исследования и его распределения в организме.

БЛАГОДАРНОСТИ.

Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

ФИНАНСИРОВАНИЕ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного Фонда и Академии наук Республики Татарстан по проекту № 23-25-10046.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Song N., Scholtemeijer M., Shah K.* Mesenchymal stem cell immunomodulation: mechanisms and therapeutic potential. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2020, 41(9), 653–664. https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.009
2. *Hoang D.M., Kim S.U., Lee H.J.* Stem cell-based therapy for human diseases. *Signal Transduct. Target.Ther.*, 2022, 7(1), 272. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7196-3_2
3. *Thanaskody K., Jusop A.S., Tye G.J., Wan Kamarul Zaman W.S., Dass S.A., Nordin M.* MSCs vs. iPSCs: Potential in therapeutic applications. *Front. Cell Develop. Biol.*, 2022, 10, 1005926. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1005926
4. *Aimaletdinov A.M., Gomzikova M.O.* Tracking of extracellular vesicles' biodistribution: New methods and approaches. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 23(19), 11312. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1005926
5. *Raposo G., Stoorvogel W.* Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.*, 2013, 200(4), 373–383, https://doi.org/10.1083/jcb.201211138
6. *Di Rocco G., Baldari S., Toietta G.* Towards therapeutic delivery of extracellular vesicles: strategies for in vivo tracking and biodistribution analysis. *Stem Cells Int.*, 2016, 2016. https://doi.org/10.1155/2016/5029619
7. *Konala V.B.R., Mamidi, M.K., Bhonde, R Bhonde R., Das A.K., Pochampally R., Pal R.* The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: a new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy*, 2016, 18(1), 13–24. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.10.008
8. *Zhou Y., Xu H., Xu W., Xu W., Wang B., Wu H., Tao Y., Zhang B., Wang M., Mao F., Yan Y., Gao S., Gu H., Zhu W., Qian H.* Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem Cell Res. Ther.*, 2013, 4(2), 1–13. https://doi.org/10.1186/scrt194
9. *Salomon C. Ryan J., Sobrevia L., Kobayashi M., Ashman K., Mitchell M., Rice G.E.* Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis. *PloS One*, 2013, 8(7), e68451. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068451
10. *Lee C., Mitsialis S.A., Aslam M., Vitali S.H., Vergadi E., Konstantinou G., Sdrimas K., Fernandez-Gonzalez A., Kourembanas S.* Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, 2012, 126(22), 2601–2611. https://doi.org/10.1161/circulationaha.112.114173
11. *Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A.* Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol. Rev.*, 2010, 90(3), 1103–1163. https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009
12. *Sanchez-Diaz M., Quiñones-Vico M. I., Sanabria de la Torre, R., Montero-Vílchez T., Sierra-Sánchez A., Molina-Leyva A., Arias-Santiago S.* Biodistribution of mesenchymal stromal cells after administration in animal models and humans: a systematic review. *J. Clin. Med.*, 2021, 10(13), 2925. https://doi.org/10.3390/jcm10132925
13. *De Sousa K.P., Rossi I., Abdullahi M., Ramirez M.I., Stratton D., Inal J.M.* Isolation and characterization of extracellular vesicles and future directions in diagnosis and therapy. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.,* 2023, 15(1), e1835. https://doi.org/10.1002/wnan.1835
14. *Brieher W.M., Gumbiner B.M.* Regulation of C-cadherin function during activin induced morphogenesis of Xenopus animal caps. *J. Cell Biol.*, 1994, 126(2), 519–527. https://doi.org/10.1083/jcb.126.2.519
15. *Grange C., Tapparo M., Bruno S., Chatterjee D., Quesenberry P.J., Tetta C., Camussi G.* Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute kidney injury monitored by optical imaging. *Int. J. Mol. Med.*, 2014, 33(5), 1055–1063. https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1663
16. *Shcherbo D., Murphy C.S., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Chepurnykh T.V., Shcheglov A.S., Verkhusha V.V., Pletnev V.Z., Hazelwood K.L., Roche P.M., Lukyanov S., Zaraisky A.G., Davidson M.W., Chudakov D.M.* Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochem. J.*, 2009, 418(3), 567–574. https://doi.org/10.1042/bj20081949
17. *Зубов Д.А.* Функционально-фенотипическая характеристика культивированных некоммитированных и коммитированных по остеогенному пути мезенхимальных стволовых клеток. *Травма*, 2008, 9(3). https://doi.org/10.7868/s0131164613050068
18. *ZEISS Microscopy. LSM 710 Confocal Microscope User Manual.* Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany, 2008.
19. *Pick H., Schmid E. L., Tairi A. P., Ilegems E., Hovius R., Vogel H.* Investigating cellular signaling reactions in single attoliter vesicles. *J. Amer. Chem. Soc.*, 2005, 127(9), 2908–2912. https://doi.org/10.1021/ja044605x
20. *Савченкова И.П., Васильева С.А., Гулюкин А.М.* Влияние диметилсульфоксидного шока на эффективность кальцийфосфатной трансфекции клеток. *Ветеринария и кормление*, 2018, (5), 8–9.
21. *Черенкова Е.Е., Федотова В.Ю., Борисов, М.А., Исламов Р.Р., Ризванов А.А.* Создание рекомбинантных аденовирусов и лентивирусов, экспрессирующих ангиогенные и нейропротекторные факторы, с помощью технологии клонирования Gateway. *Гены и клетки*, 2012, 7(3), 164–168.
22. *Andrews S., Cheng A., Stevens H., Logun M.T., Webb R., Jordan E., Xia B., Karumbaiah L., Guldberg R.E., Stice S.* Chondroitin sulfate glycosaminoglycan scaffolds for cell and recombinant protein-based bone regeneration. *Stem Cells Transl. Med.*, 2019, 8(6), 575–585. https://doi.org/10.1002/sctm.18-0141
23. *Gomzikova M.O., Zhuravleva M.N., Vorobev V.V., Salafutdinov I.I., Laikov A.V., Kletukhina S.K., Martynova E.V., Tazetdinova L.G., Ntekim A.I., Khaiboullina S.F., Rizvanov A.A.* Angiogenic activity of cytochalasin B-induced membrane vesicles of human mesenchymal stem cells. *Cells,* 2019, 9(1), 95. https://doi.org/10.3390/cells9010095
24. *Chuo S.T.Y., Chien J.C.Y., Lai C.P.K.* Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods. *J. Biomed. Sci.*, 2018; 25, 1–10. https://doi.org/10.1186/s12929-018-0494-5

Evaluation of the Effectiveness of Fluorescent Labeling of Cells and Microvesicles with the Katushka2S Protein to Assess their Biodistribution *in vivo* and *ex vivo*

V. A. Kiryanova[a], A. M. Aimaletdinov[a, b], S. K. Kletukhina[a], and M. O. Gomzikova[a, #]

[a] *Laboratory "Intercellular Communication", Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420021 Russia*

[b] *Laboratory "Regenerative Veterinary Medicine", Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420012 Russia*

[#] *e-mail: marina.gomzikova.gmo@gmail.com*

Abstract—A comparative *in vivo* analysis was conducted to evaluate the biodistribution efficiency of cells and microvesicles labeled with fluorescent proteins. Mesenchymal stem cells (MSCs) were genetically modified using a recombinant lentivirus carrying the gene for the fluorescent protein Katushka2S, with the goal of labeling both the cells and their derived microvesicles (MVs). The selection of genetically modified MSCs was performed through cell sorting using a FACS Aria III flow cytometer-sorter. The biodistribution of the cells was assessed by detecting the fluorescent signal using the IVIS Spectrum system. Intravenous administration of 5×10^5 MSC-Katushka2S in mice was insufficient for *in vivo* detection of cell biodistribution. *Ex vivo* analysis revealed that immediately after intravenous administration, the MSCs accumulated in the lungs and liver. The intensity of Katushka2S protein fluorescence and the sensitivity of the IVIS Spectrum system were sufficient for *ex vivo* visualization of MSC-Katushka2S cell clusters. However, the quantity of MVs-Katushka2S isolated from 1.5×10^6 MSC-Katushka2S was insufficient for the detection of MV biodistribution both *in vivo* and *ex vivo*. Therefore, the application of this method for evaluating the biodistribution of individual cells and microvesicles in vivo is ineffective.

Keywords: biodistribution, extracellular vesicles, induced microvesicles, membrane vesicles, mesenchymal stem cells, multipotent stromal cells, fluorescent protein