

А.Ф. Повещенко, О.В. Повещенко, В.И. Коненков

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Новосибирск, Российская Федерация

Современные достижения в создании методов изучения миграции стволовых клеток

Обзор посвящен сравнительному анализу методов исследования миграции стволовых клеток в условиях эксперимента и клинической практики, оценке их преимуществ и недостатков. Невозможно выделить какой-то один преимущественный метод исследования миграции стволовых клеток, идеальный во всех аспектах. Каждый из методов имеет свой набор достоинств и недостатков. Рентгенологические методы «страдают» неспецифическим связыванием контрастной метки с последующей быстрой деградацией и выделением из организма. Если необходимо изучить миграцию трансплантированных стволовых клеток в течение длительного временного интервала, то визуализация гена-репортера является наилучшим из имеющихся методов, поскольку может обеспечить неинвазивный мониторинг в реальном времени расположения в тканях организма единичных стволовых клеток и помочь оценить их жизнеспособность и пролиферацию. Наиболее привлекательны из агентов для отслеживания — эндогенные, т.е. природные составляющие стволовых клеток, например генетические маркеры. Критерии для применения методов изучения миграции в условиях клиники и эксперимента имеют существенные различия. Главными критериями для методов исследования миграции клеток в клинических условиях, очевидно, должны быть биосовместимость, безопасность, нетоксичность, неинвазивность. Соответственно, основными критериями для экспериментальных методов изучения миграции будут точность, возможность длительной количественной оценки миграции клеток и стабильность «метки».

Ключевые слова: *стволовые клетки, миграция.*

(Вестник РАМН. 2013; 9: 46–51)

46

Введение

Клеточная биология и биология стволовых клеток (СК) стремительно двигаются в сторону клинического применения своих достижений в регенеративной медицине. СК способны выполнять восстановительные функции у пациентов с различными нарушениями, и, следовательно, лечение СК может стать альтернативой трансплантации органов. В последние годы наметился прогресс в понимании свойств мульти- и плюрипотентных СК и оценке возможностей их применения в клинических условиях. В течение последних десятилетий активно разрабатывают методы клеточной терапии, в частности трансплантации СК, в т.ч. СК костного мозга, с целью замещения в организме поврежденных клеток и тканевых структур и восстановления функций

органов. Возросший интерес к трансплантации клеток костного мозга во многом связан с пластичностью СК костного мозга и появлением новых технических возможностей в исследовании их свойств и применении как наиболее перспективного материала в регенеративной медицине. Изучение свойств и функций СК остается важнейшим фундаментальным направлением современной биологии и медицины. Область применения клеточных технологий в лечении многих патологий неуклонно расширяется. Успешность клеточной терапии зависит не только от их способности восстанавливать поврежденные ткани, но и главным образом от способности мигрировать в ткани и органы. Иными словами, актуальность исследования миграции трансплантируемых СК обусловлена тем, что эффективность регенерации тканей и органов во многом зависит от направления

A.F. Poveshchenko, O.V. Poveshchenko, V.I. Konenkov

Scientific Institution of Clinical and Experimental Lymphology of the Siberian Branch, RAMS, Novosibirsk, Russian Federation

Recent Advances in the Study of the Stem Cells Migration Methods

Review is devoted to a comparative analysis of stem cells migration methods for studying in experimental conditions and clinics, assessing their strengths and weaknesses. It is impossible to single out any one preferred method for studying the migration of stem cells. Each method has its own set of advantages and disadvantages. X-ray methods «suffer» from non-specific binding of contrast marks, followed by rapid degradation and the release of the body. If it is necessary to study the migration of the transplanted stem cells for a long time interval, the visualization of the reporter gene is the best available techniques, since it can provide a non-invasive real time monitoring of the location in the tissue and stem cells isolated help assess their viability and proliferation. The most attractive of the agents for monitoring — endogenous, i.e. natural constituents stem cells, for example, genetic markers. Criteria for the application of methods to study migration in clinical and experimental results have significant differences. The main criteria for the methods of the study of cell migration in clinical settings, it must be biocompatible, safe, non-toxic, non-invasive. Accordingly, the main criteria for the experimental methods for studying the migration will be accuracy, the ability to quantify the long-term migration of cells and stability of the «label».

Key words: *stem cells, migration.*

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2013; 9: 46–51)

и интенсивности их миграции. Изучение миграции клеток (как важнейшей функции) имеет фундаментальное и прикладное значение.

Таким образом, создание, изучение и применение новых надежных методов визуализации миграции СК в эксперименте и в клинической практике является важнейшей научной задачей.

Активное изучение миграции СК в экспериментальных условиях индуцировали работы Тилла и Маккалоха (1961), в которых было показано, что внутривенная трансплантация клеток костного мозга сингенным, летально облученным реципиентам сопровождается образованием в селезенке видимых на глаз колоний дифференцированных клеток [1].

В 1970 годах XX в. Р.В. Петровым и Р.М. Хаитовым была предложена модель для изучения веществ, влияющих на миграцию СК у линейных мышей [2]. Модель представляет собой систему для оценки препаратов, усиливающих или тормозящих миграцию стволовых клеток. До летального облучения животного экранировали участок костного мозга (часть задней конечности, обычно до уровня $1/2$ голени мыши). Спустя 8 сут после облучения в селезенке определяли число колоний, образовавшихся в результате миграции СК из защищенного участка костного мозга. Введение сразу после облучения препарата, активного в отношении процесса миграции СК, соответствующим образом отражается на числе колоний в селезенке [2]. Первоначально были созданы методы изучения миграции СК только в условиях эксперимента. Впоследствии были разработаны методы изучения миграции *in vivo* в условиях клинической практики. Намечился набор критериев и характеристик, которым должны соответствовать методы исследования миграции СК:

- биосовместимость, безопасность, отсутствие токсичности;
- отсутствие генетической модификации СК;
- возможность определения единичной клетки в любой анатомической локализации;
- возможность количественной оценки миграции клеток;
- минимальное снижение визуализации при клеточном делении;
- отсутствие контрастного вещества в клетках, отличных от стволовых;
- неинвазивность метода (отсутствие повреждений клетки в течение длительного времени);
- отсутствие изменений контраста (метки) с течением времени (с изменением возраста клетки) [3].

В настоящее время перечень методов и подходов визуализации для отслеживания СК *in vivo* неуклонно расширяется. Среди методов изучения СК в клинических условиях радиоактивные метки с использованием радиофармпрепаратов и магнитно-резонансной томографии (МРТ) являются наиболее широко используемыми. Интенсивно развиваются рентгенография и компьютерная томография (КТ), однофотонная эмиссионная компьютерная томография, (ОФЭКТ; Single Photon Emission Computed Tomography — SPECT), позитронно-эмиссионная томография (Positron Emission Tomography — PET), метод квантовых точек (Quantum dots), микрокомпьютерная томография (MicroCT). Совершенствуются методы изучения миграции клеток, основанные на метках гена-репортера, биолюминесценции и флуоресценции — методы оптической визуализации, а также ультразвуковые и скинтиграфические способы исследования миграции клеток.

Цель обзора: провести сравнительный анализ методов исследования миграции СК в условиях эксперимента и клиники, оценить их преимущества и недостатки.

Изучение миграции клеток с применением рентгенографических методов и компьютерной томографии

Методы рентгеноконтрастного исследования и КТ — наиболее доступные способы исследования миграции СК в эксперименте и при этом относительно дешевые. Для получения изображения требуются контрастные материалы высокой концентрации, плотности и атомной массы. Для этой цели применяют радиофармпрепараты йода, гадолиния или металлов [3]. К радиоизотопным методам изучения миграции клеток относят ОФЭКТ, ПЭТ, MicroCT. Радионуклидные методы позволяют визуализировать клетки, меченные этими маркерами, и изучать их взаимодействие с биохимическими процессами в живых организмах. Указанные методы обладают наномолярной ($<10^{-9}$ М) чувствительностью и высоким пространственным разрешением (<2 мм), что делает возможным их применение в условиях *in vivo*.

Микрокомпьютерная томография — новый метод изучения миграции клеток *in vivo*

MicroCT — новейшая разновидность рентгенконтрастного компьютерного исследования — дает возможность обнаружить с высоким разрешением (1–10 мкм и даже до 0,3 мкм) СК человека после трансплантации, а также позволяет длительно отслеживать их судьбу в условиях *in vivo*. Кроме того, MicroCT позволяет обнаружить с высокой четкостью и разрешением СК человека в условиях клинической практики. Объединение мечения клеток наночастицами и рентгеновского microCT может дать более подробную информацию о миграции СК в 3D-формате, которая недостижима традиционными методами, основанными на 2D-технологии, такими как гистологические исследования с использованием сканирующей электронной и флуоресцентной микроскопии. microCT-изображения могут быть применены в исследованиях хоминга различных субтипов СК или СК, измененных генно-инженерными методами (например, iPs СК) в разных аспектах клеточной терапии. MicroCT-методы исследования миграции СК, меченных наночастицами оксида железа, дают возможность количественно оценить число клеток, способных мигрировать из крови в мышечную ткань; также возможна 3D-визуализация их распространения и обнаружения в моделях на животных в условиях *in vivo*. В качестве примера можно привести результаты исследований, в которых меченные наночастицами оксида железа CD133+ клетки человека были введены интраартериально в организм мышей, страдающих дистрофией. В дальнейшем эти СК были успешно визуализированы в организме живых мышей в различные моменты времени после трансплантации, обеспечивая биологическое понимание процессов хоминга СК в мышечной системе [4].

Однофотонная эмиссионная компьютерная томография

Для прижизненного исследования СК *in vivo* используют прямое мечение радиоактивной меткой, которая является источником высокоэнергетического γ -излучения. Для прямого мечения применяют известные метки радиофармпрепаратов, например ^{99m}Tc -НМРАО. Технеций (^{99m}Tc) является часто используемым радио-

фармацевтическим препаратом для мечения лейкоцитов и исследования локальных инфекций, воспалительных кишечных заболеваний. Из-за короткого периода полураспада (около 6 ч) он хорошо адаптирован к обычным γ -камерам. Обеспечивая высокое качество изображения, ^{99m}Tc -НМРАО хорошо подходит для короткого времени отслеживания стволовых клеток *in vivo* (даже лучше, чем ^{111}In) [5].

^{111}In -оксин: индий с молекулярной массой 111 является электронным эмиттером, который поглощается нормальными клетками и клетками злокачественных опухолей. ^{111}In одобрен для клинических исследований и используется уже более 20 лет, в т.ч. для мечения и визуализации миграции клеток, поскольку стабилен в течение длительного времени в условиях *in vivo*. Возможно отслеживание миграции клеток, меченных ^{111}In , в течение 10 сут с помощью СПЕКТ. Описанный метод имеет и достоинства, и недостатки. СК в клинической практике и в научных исследованиях могут быть визуализированы *in vivo* в естественных условиях до 10 сут после первого вливания, и это дает возможность оценивать их миграцию количественно с помощью радиоактивных изотопов ^{111}In [6]. После внутривенной инфузии было обнаружено, что радиофармпрепарат первоначально накапливается в легких, а затем постепенно, в течение последующих часов и до нескольких дней, накопление более выражено в печени и селезенке. Нельзя исключить возможность того, что обнаружение радионуклидных сигналов исходит от клеток ретикуло-эндотелиальной системы, которые фагоцитируют нежизнеспособные поврежденные меченые СК. Так происходит, к примеру, в результате цитотоксического эффекта ^{111}In -оксина, после инфузии которого часть СК теряет жизнеспособность [6].

Таким образом, нельзя однозначно полагать, что радиоактивность, наблюдаемая в естественных условиях, отражает наличие жизнеспособных СК в органах. Кроме того, период наблюдения за миграцией клеток, как правило, достаточно непродолжителен.

Позитронно-эмиссионная томография как метод изучения миграции клеток

ПЭТ-сканирование (позитронная томография, эмиссионная томография) — новейший диагностический метод, при котором изображения получают за счет излучения позитронов. Контрастное вещество (радиофармпрепарат) — ^{18}F -ФДГ (2-дезоксидезокси-2-(^{18}F) фтор-D-глюкоза). Период полувыведения радиоактивного препарата составляет 110 мин. Ввиду высокого пространственного разрешения и высокой чувствительности ПЭТ может считаться высококачественным методом для изучения миграции СК в клинической практике [7].

ПЭТ обладает преимуществом — более высокой чувствительностью, чем СПЕКТ, что позволяет более точно оценить число СК [3], однако период наблюдения за миграцией клеток также остается достаточно коротким.

Изучение миграции клеток методом квантовых дотов

Для мечения объектов используется новый класс соединений — квантовые доты — полупроводниковые нанокристаллы 2–5 нм в диаметре, способные светиться в ультрафиолетовом свете (флуоресцентные зонды). Так, кремний-германиевые наноструктуры применяют для изучения миграции СК в условиях клиники [8].

Интерес к изучению миграции с использованием указанных молекул связан с размером и составом этих зондов. Они могут быть применены для излучения различных длин волн света, начиная от ультрафиолетового и почти до инфракрасного. В настоящее время опыт их применения для исследования миграции стволовых клеток *in vivo* в клинических условиях незначителен, но такие свойства полупроводниковых квантовых дотов, как нетоксичность для СК, весьма благоприятные флуоресцентные свойства (широкая полоса спектра поглощения, узкая полоса излучения, а также высокая фотостабильность), делают их привлекательными инструментами для изучения миграции СК *in vivo* в условиях клинической практики [9–11].

В эксперименте показано, что кремний-германиевые наноструктуры (квантовые доты, или квантовые точки), покрытые D-маннозой, D-галактозой и D-галактозамином, накапливаются в ткани печени, специфически связываясь с рецепторами клеток печени. Таким образом, конъюгированные с сахарами кремний-германиевые наноструктуры успешно находили путь к ткани печени и накапливались в ней, не осаждались в других органах. Доказана высокая селективность распределения наночастиц в различных тканях организма. Метод основывается на использовании определенных молекулярных меток, способных накапливаться и специфически связываться в определенных органах и тканях, успешно применяется в условиях *in vivo* на мышах, при этом квантовые доты проявляют стабильность и хорошо определяются с помощью ультрафиолета.

Таким образом, разработки в области использования нанотехнологий внесли свой вклад в продвижение методов исследования миграции клеток с высокой разрешающей способностью, включая ПЭТ, СПЕКТ, микроСТ. Очевидно, что изучение меченых СК и клеток-предшественников будет способствовать нашему пониманию не только миграционных процессов, но и дифференцировки указанных клеток, а также послужит для оценки их терапевтического эффекта в контексте клеточной терапии болезней нервной системы, онкологических заболеваний, инфаркта миокарда и мн. др. [12, 13].

Возможность неинвазивного исследования миграции СК в условиях *in vivo* в течение длительного времени — насущная потребность, обуславливающая необходимость разработки новых стратегий клеточной терапии. В связи с этим в последние годы интенсивно развиваются методы, основанные на мониторинге распределения и миграции *in vivo* меченых СК. Примером использования указанного метода служит работа, в которой продемонстрировано, что меченые эмбриональные СК, введенные в неишемизированную сторону мозга крысам с частичной ишемией головного мозга, обнаруживаются во время их миграции вдоль мозолистого тела и в ишемизированной области контралатерального полушария [14].

Наночастицы для прижизненной магнитно-резонансной визуализации трансплантированных стволовых клеток

Метод МРТ нашел широкое применение в изучении миграции СК как в научных, так и в клинических исследованиях [15]. Изучение миграции СК с помощью МРТ основано на предварительном мечении СК магнитными наночастицами *ex vivo*, которые, попав в клетку, генерируют сильный МРТ-контраст [16]. МРТ часто применяется для исследования миграции стволовых клеток *in vivo* в доклинических исследованиях. Высокое трехмерное

анатомическое разрешение и хороший профиль безопасности являются основными преимуществами метода. Для мечения СК с целью изучения их миграции методом МРТ используют ряд способов:

- неспецифическое прямое мечение клеток;
- специфическое не прямое (т.е. рецепторопосредованное) мечение клеток, которое достигается путем образования комплекса меченого контрастным веществом лиганда (МР-видимым), который связывается специфическим рецептором СК;
- мечение зонда к гену-репортеру либо трансфекция в СК гена-репортера, экспрессия которого (либо его фермента или рецептора) выявляется с помощью МРТ или других методов визуализации [17].

Чтобы изучать миграцию в организме человека и в органах-мишенях у животных, СК должны быть помечены контрастным веществом, а сигнал должен быть достаточным, чтобы отличить их от фона (нестволовых клеток). Важным аспектом является изучение миграции разных субтипов СК, обладающих разными свойствами и особенностями применения в медицинской практике. Так, способность мезенхимальных СК мигрировать и инфильтрировать опухоли дает возможность использовать их как переносчик противоопухолевых средств, что является важным направлением исследований. Интеграция мезенхимальных СК в опухоли доказана на моделях животных с использованием гистологических методов. Для доказательства передвижения и внедрения этих клеток в опухоль у человека требуется визуализирующая техника *in vivo*. С этой целью использовали меченые наночастицами оксида железа мезенхимальные СК, способные к движению *in vivo*, которое можно зафиксировать при помощи МРТ. Клетки донора поместили *in vitro* наночастицами оксида железа, что не оказало эффекта на их дифференцировку, пролиферацию, выживание или миграцию. В первоначальных экспериментах показано, что всего 1 тыс. меченых мезенхимальных СК визуализируется в опухоли молочной железы, формирующей подкожные узлы на МРТ через месяц после их введения. Позже установили, что меченые мезенхимальные СК могут передвигаться *in vivo* в множественные легочные метастазы, что можно визуализировать при помощи МРТ; это было подтверждено гистологическими исследованиями. В клинических исследованиях на людях неинвазивные методы оценки миграции выживаемости клеток, их приживления необходимы для оценки терапевтической эффективности. Преимущество визуализации МРТ-метода состоит в том, что он обладает высоким пространственным разрешением, а это имеет решающее значение для описания миграционных процессов СК. Однако уровень чувствительности, достигаемый с помощью этой техники, зависит от разбавления контрастирующего агента из-за деления клеток или перехода некоторых из них в нестволовые. В этом случае сигнал уменьшается, и не представляется возможным соотнести его с вводимым числом клеток. В целом возможность метить СК контрастными магнитными наночастицами обеспечивает возможность неинвазивно отслеживать их миграцию. Для получения МРТ-контраста могут быть сконструированы различные наночастицы. Например, пептидконъюгированный подход может быть реализован для маркировки клеток с мультidetектируемыми наночастицами (магнитные, люминесцентные, изотопные) [18]. К ним относится применение суперпарамагнитных оксидов железа, которые, как правило, покрыты декстраном или другими полимерами для поддержания растворимости и уменьшения агрегации частиц. Наночастицы представляют со-

бой наиболее широко используемые контрастные агенты для обнаружения имплантированных клеток в условиях клинических исследований.

Методы изучения миграции клеток, основанные на мечении гена-репортера

Визуализация т.н. репортерных генов представляет собой инструмент для локализации конкретных молекул внутри биологических объектов [19, 20]. Репортерным геном является ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein — GFP), или SRY-ген хромосомы Y, или ген люциферазы. Репортерный ген люциферазы можно визуализировать, соединив его с промотором, чувствительным к наличию человеческого гормона роста. Когда гормон оказывает влияние на клетку, наблюдается флуоресценция. Генетические метки с использованием гена-репортера применяют для определения миграции мезенхимальных СК в поврежденных тканях [20]. Мезенхимальные СК костного мозга самцов крыс линии Sprague-Dawley были трансплантированы самкам крыс с созданной в эксперименте ишемией миокарда (путем лигирования левой передней нисходящей коронарной артерии). Трансплантацию мезенхимальных СК выполняли через хвостовую вену через 3 ч после наступления ишемии. Характеристики миграции мезенхимальных СК к сердцу были исследованы по экспрессии гена SRY на хромосоме Y при помощи флуоресцентной гибридизации (FISH). В течение 8 нед после трансплантации, SRY-позитивные клетки обнаруживали в сердечной ткани крыс с ишемией миокарда и в контрольной группе (ложнооперированных животных), причем число SRY-положительных клеток было достоверно выше в группе с ишемией [15]. Эти результаты демонстрируют, что миграция мезенхимальных СК в поврежденный миокард достоверно выше, чем в неповрежденный, т.е. повреждение тканей миокарда стимулирует миграцию в них мезенхимальных СК.

49

Биолюминесценция и флуоресценция — оптические методы визуализации миграции стволовых клеток

Биолюминесценция использует свет, генерируемый ферментом люциферазой, для обнаружения клеток *in vivo*, эффективность метода подтверждена в модели на животных [21, 22]. К сожалению, гены люциферазы и другие субстраты, применяемые для изучения миграции СК в клинике и при проведении научных исследований, генерируют только видимый свет (спектр с длиной волны от 400 до 700 нм), который имеет очень высокое поглощение и рассеивание в живой ткани, что исключает их применение у животных, больших по размерам, чем крысы. Существуют и другие ограничения применения этого метода в клинической практике, в связи с чем маловероятно, что биолюминесцентные методы изучения миграции достигнут широкого клинического применения [23].

Метод флуоресценции — широко используемая техника оптических изображений, в которой применяют флуоресцентный белок для изучения миграции *in vivo* (например, зеленый флуоресцентный белок или малые молекулы полиметинов) или органические/неорганические гибриды (в частности, метод квантовых точек). Метод инфракрасной флуоресценции имеет поглощение и рассеяние фотонов при длине волны от 700 до 1000 нм, что дает преимущество этой техники над биолюминес-

ценцией. Тем не менее применение инфракрасной флуоресценции ограничивается поверхностными тканями на глубину 4–10 см, даже при использовании томографических методов визуализации. Таким образом, клиническое применение флуоресценции, вероятно, будет ограничено приповерхностными изображениями при проведении интраоперационных процедур [24, 25]. В нескольких исследованиях подтвердили эффективность и целесообразность использования маркировки генов-репортеров для биолюминесценции и флуоресценции с целью визуализации и отслеживания распределения и приживления СК в экспериментах на животных с использованием оптического изображения. Хотя сигналы, генерируемые этими методами, более чувствительны, чем у других методов визуализации, у небольших животных они могут быть легко рассеяны в глубоких тканях: то есть основное ограничение метода состоит в его неспособности точно определить глубину клеток.

Заключение

На данный момент невозможно выделить какой-то один преимущественный метод исследования, идеальный во всех аспектах. Каждый из них имеет свой набор достоинств и недостатков. Рентгенологические методы (обычное рентгенологическое исследование и КТ) «страдают» неспецифическим связыванием контрастной метки с последующей быстрой деградацией и выделением из организма, а также достаточно высокой стоимостью, что является барьером для крупномасштабных исследований для отслеживания миграции стволовых клеток *in vivo* в клинических условиях. Использование метода квантовых точек может вызвать изменения профиля дифференцировки стволовых клеток и нарушения эмбрионального развития, что также может оказаться неприемлемо для клинических условий. МРТ имеет преимущества по безопасности и возможность получения трехмерного изображения, но при этом низкую чувствительность и противопоказания у пациентов с имплантированными устройствами (например, кардиостимуляторами). Недостатком метода является постепенная потеря МР-сигнала за счет деления клеток. Кроме того, трудно соотносить МР-сигналы с числом обнаруженных клеток. На нынешнем этапе исследования стволовых клеток метод микрокомпьютерной томографии (microCT) как неинвазивный

может быть применен для отслеживания судьбы трансплантированных стволовых клеток и служить важным инструментом для мониторинга их миграции и определения эффективности терапии. Если исследуется только краткосрочное биораспределение трансплантированных клеток, то скинтиграфические методы являются более предпочтительными. Если необходимо изучить миграцию трансплантированных стволовых клеток в течение длительного временного интервала, то визуализация гена-репортера является наилучшим из имеющихся методов (например, биолюминесценция с использованием люциферазы), поскольку она может обеспечить неинвазивный мониторинг в реальном времени анатомического расположения в тканях организма единичных стволовых клеток и помочь оценить их жизнеспособность и пролиферацию. Главным недостатком скинтиграфических методов, как и МРТ-техник изучения миграции стволовых клеток с использованием флуоресценции, является разведение агента с каждым делением клетки и вероятность включения метки в нестволовые и мертвые клетки [23].

Наиболее привлекательны из агентов для отслеживания — эндогенные, т.е. природные составляющие стволовых клеток, например генетические маркеры, как, в частности, ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (*GFP*), или *SRY*-ген хромосомы Y [4]. Конфокальная и многофотонная микроскопия, покадровая технология визуализации, трансфекция репортерных генов и другие неинвазивные методы визуализации в клинических условиях предоставляют возможность наблюдать поведение клеток в живом организме [3]. Использование комплексного подхода, т.е. комбинации из двух или более методов визуализации, может минимизировать потенциальные недостатки использования каждого метода и обеспечить идеальный информационный профиль для клинического применения.

Очевидно, что критерии для применения методов изучения миграции в условиях клиники и эксперимента имеют существенные различия. Главными критериями для методов исследования миграции в клинических условиях, очевидно, должны быть биосовместимость, безопасность, нетоксичность, неинвазивность. Соответственно, основными критериями для экспериментальных методов изучения миграции будут точность, возможность количественной оценки и достаточно длительной оценки миграции клеток и стабильность «метки».

REFERENCES

1. Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radist. Res.* 1961; 14 (2): 213–222.
2. Petrov R.V., Khaitov R.M. *Radiobiologiya — Radiobiology.* 1972; 12(1): 69–76.
3. Frangioni J.V., Hajar R.J. *In vivo* tracking of stem cells for clinical trials in cardiovascular disease. *Circulation.* 2004; 110: 3378–3384.
4. Torrente Y., Gavina M., Belicchi M., Fiori F., Komlev V., Bresolin N., Rustichelli F. X-ray microtomography for three-dimensional visualization of human stem cell muscle homing. *FEBS Lett.* 2006; 580 (24): 5759–5764.
5. Detante O., Moisan A., Dimastromatteo J., Richard M.J., Riou L., Grillon E., Barbier E., Desrues M.D., DeFrapont F., Segebarth C., Jaillard A., Hommel M., Ghezzi C., Remy C. Intravenous administration of ^{99m}Tc-HMPAO-labeled human mesenchymal stem cells after stroke: *in vivo* imaging and biodistribution. *Cell Transplant.* 2009; 18 (12): 1369–1379.
6. Gholamrezaezhad A., Mirpour S., Bagheri M., Mohamadnejad M., Alimoghaddam K., Abdolazadeh L., Saghari M., Malekzadeh R. *In vivo* tracking of ¹¹¹In-oxine labeled mesenchymal stem cells following infusion in patients with advanced cirrhosis. *Nucl. Med. & Biol.* 2011; 38 (7): 961–967.
7. Kang W.J., Kang H.J., Kim H.S., Chung J.K., Lee M.C., Lee D.S. Tissue distribution of ¹⁸F-FDG-labeled peripheral hematopoietic stem cells after intracoronary administration in patients with myocardial infarction. *J. Nucl. Med.* 2006; 47 (8): 1295–1301.
8. Ramot Y., Steiner M., Morad V., Leibovitch S., Amouyal N., Cesta M.F., Nyska A. et al. Pulmonary thrombosis in the mouse following intravenous administration of quantum dot-labeled mesenchymal cells. *Nanotoxicology.* 2010; 4 (1): 98–105.
9. Michalet X., Pinaud F.F., Bentolila L.A., Tsay J.M., Doose S., Li J.J., Sundaresan G., Wu A.M., Gambhir S.S., Weiss S. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. *Science.* 2005; 307 (5709): 538–544.

10. Shah B.S., Clark P.A., Moiola E.K., Stroschio M.A., Mao J.J. Labeling of mesenchymal stem cells by bioconjugated quantum dots. *Nano Lett.* 2007; 7 (10): 3071–3079.
11. Slotkin J.R., Chakrabarti L., Dai H.N., Carney R.S., Hirata T., Bregman B.S., Gallicano G.I., Corbin J.G., Haydar T.F. *In vivo* quantum dot labeling of mammalian stem and progenitor cells. *Dev. Dyn.* 2007; 236 (12): 3393–3401.
12. Gera A., Steinberg G.K., Guzman R. *In vivo* neural stem cell imaging: current modalities and future directions. *Regenerative Medicine.* 2010; 5 (1): 73–86.
13. Villa C., Erratico S., Razini P., Fiori F., Rustichelli F., Torrente Y., Belicchi M. Stem cell tracking by nanotechnologies. *Int. J. Mol. Sci.* 2010; 11 (3): 1070–1081.
14. Kustermann E., Roell W., Breitbach M., Wecker S., Wiedermann D., Buehrle C., Wélz A., Hescheler J., Fleischmann B.K., Hoehn M. Stem cell implantation in ischemic mouse heart: a high-resolution magnetic resonance imaging investigation. *NMR Biomed.* 2005; 18 (6): 362–370.
15. Walczak P., Zhang J., Gilad A.A., Kedziorek D.A., Ruiz-Cabello J., Young R.G., Pittenger M.F., van Zijl P.C., Huang J., Bulte J.W. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. *Stroke.* 2008; 39 (5): 1569–1574.
16. Himmelreich U., Hoehn M. Stem cell labeling for magnetic resonance imaging. *Minim. Invasive Ther. Allied Technol.* 2008; 17: 132–142.
17. Kraitchman D.L., Bulte J.W. *In vivo* imaging of stem cells and Beta cells using direct cell labeling and reporter gene methods. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009; 29 (7): 1025–1030.
18. Modo M., Cash D., Mellodew K., Williams S.C., Fraser S.E., Meade T.J., Price J., Hodges H. Tracking transplanted stem cell migration using bifunctional, contrast agent-enhanced, magnetic resonance imaging. *Neuroimage.* 2002; 17 (2): 803–811.
19. Higuchi T., Anton M., Dumler K., Seidl S., Pelisek J., Saraste A., Welling A., Hofmann F., Oostendorp R.A., Gansbacher B., Nekolla S.G., Bengel F.M., Botnar R.M., Schwaiger M. Combined reporter gene *PET* and iron oxide MRI for monitoring survival and localization of transplanted cells in the rat heart. *J. Nucl. Med.* 2009; 50 (7): 1088–1094.
20. Kasinskaya N.V., Stepanova O.I., Karkishchenko N.N., Karkishchenko V.N., Semenov Kh.Kh., Beskova T.B., Kapanadze G.D., Revyakin A.O., Dengina S.E. *Biomeditsina – Biomedicine.* 2011; 2: 30–34.
21. Reumers V., Deroose C.M., Krylyshkina O., Nuyts J., Geraerts M., Mortelmans L., Gijssbers R., Van den Haute C., Debyser Z., Baekelandt V. Noninvasive and quantitative monitoring of adult neuronal stem cell migration in mouse brain using bioluminescence imaging. *Stem Cells.* 2008; 26 (9): 2382–2390.
22. Zhang H.L., Qiao H., Bakken A., Gao F., Huang B., Liu Y.Y., El-Deiry W., Ferrari V.A., Zhou R. Utility of dual-modality bioluminescence and MRI in monitoring stem cell survival and impact on post myocardial infarct. *Remodeling Acad. Radiol.* 2011; 18 (1): 3–12.
23. Zhang S.J., Wu J.C. Comparison of imaging techniques for tracking cardiac stem cell therapy. *J. Nucl. Med.* 2007; 48 (12): 1916–1919.
24. Polzer H., Haaster F.S., Prall W.C., Saller M.M., Volkmer E., Drosse I., Mutschler W., Schieker M. Quantification of fluorescence intensity of labeled human mesenchymal stem cells and cell counting of unlabeled cells in phase-contrast imaging: An open-source-based algorithm. *Tis. Engineering Part C Meth.* 2010; 16 (6): 1277–1285.
25. Sung C.K., Hong K.A., Lin S., Lee Y., Cha J., Lee J.K., Hong C.P., Han B.S., Jung S.I., Kim S.H., Yoon K.S. Dual-modal nanoprobe for imaging of mesenchymal stem cell transplant by MRI and fluorescence imaging. *Korean J. Radiol.* 2009; 10 (6): 613–622.

FOR CORRESPONDANCE

Poveshchenko Aleksandr Fedorovich, PhD, Head of the laboratory of protective system physiology of the Federal State Budgetary Institution «Scientific Research Institute of clinical and experimental lymphology» under the Siberian Branch of RAMS.

Address: 2, Timakova St., Novosibirsk, 630117; **tel.:** (383) 333-64-09, **e-mail:** poveshchenkoa200@mail.ru

Poveshchenko Olga Vladimirovna, MD, Head of the lymphotropic therapy and lymphodiagnostic laboratory of the Federal State Budgetary Institution «Scientific Research Institute of clinical and experimental lymphology» under the Siberian Branch of RAMS.

Address: 2, Timakova St., Novosibirsk, 630117; **tel.:** (383) 333-64-09, **e-mail:** poveshchenkoa200@mail.ru

Konenkov Vladimir Iosifovich, PhD, professor, member of the RAMS, director of the Federal State Budgetary Institution «Scientific Research Institute of clinical and experimental lymphology» under the Siberian Branch of RAMS.

Address: 2, Timakova St., Novosibirsk, 630117; **tel.:** (383) 333-64-09, **e-mail:** konenkov@sorsmn.ru, lymphology@soramn.ru