

Метод оптической визуализации In Vivo

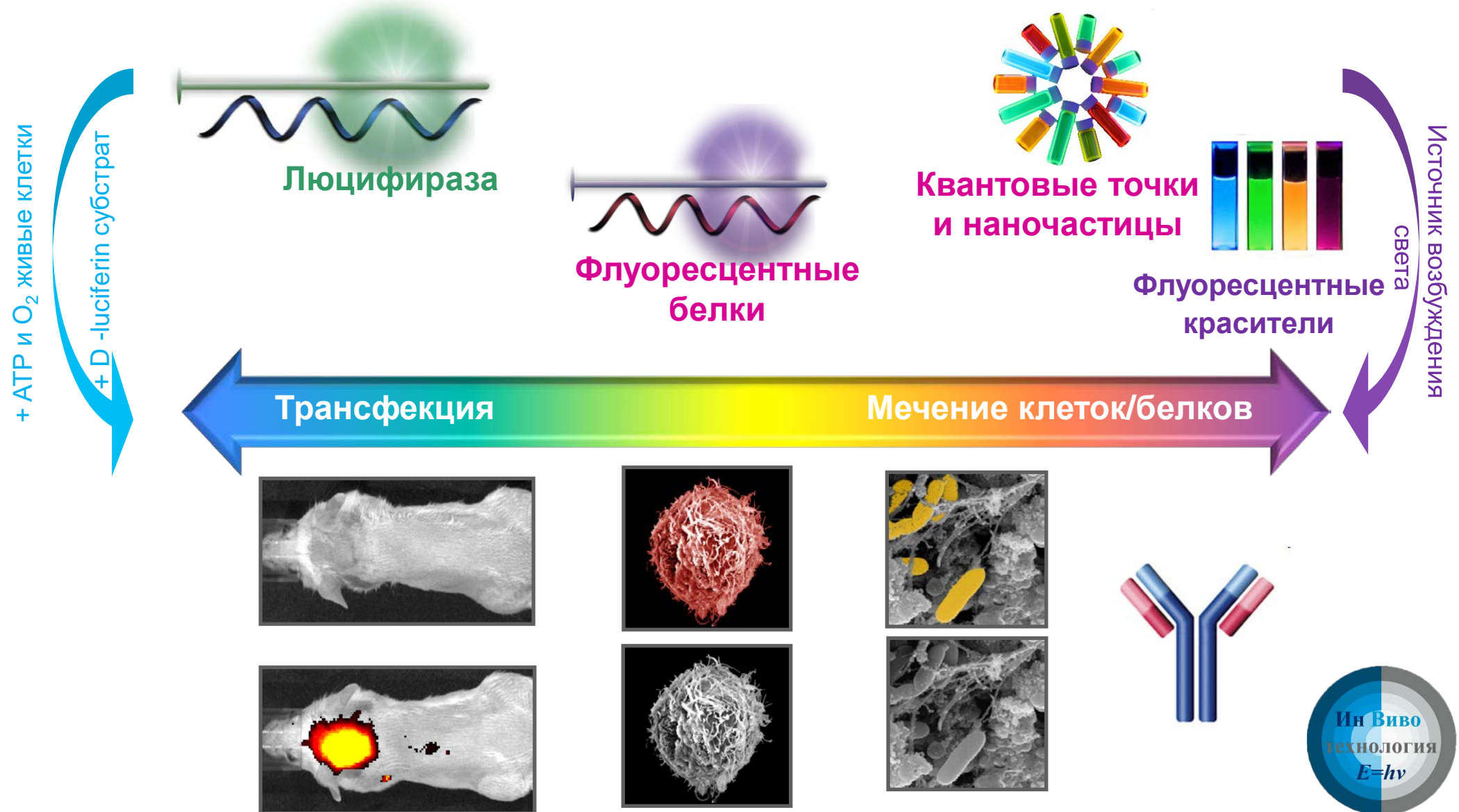
Системы оптической визуализации in vivo

Чалов Сергей Евгеньевич, кхн
“Ин ВивоТехнология”, Москва

chalov@invivotech.ru, <http://www.invivotech.ru>, +7 (495) 922-25-64

VIEWWORKS

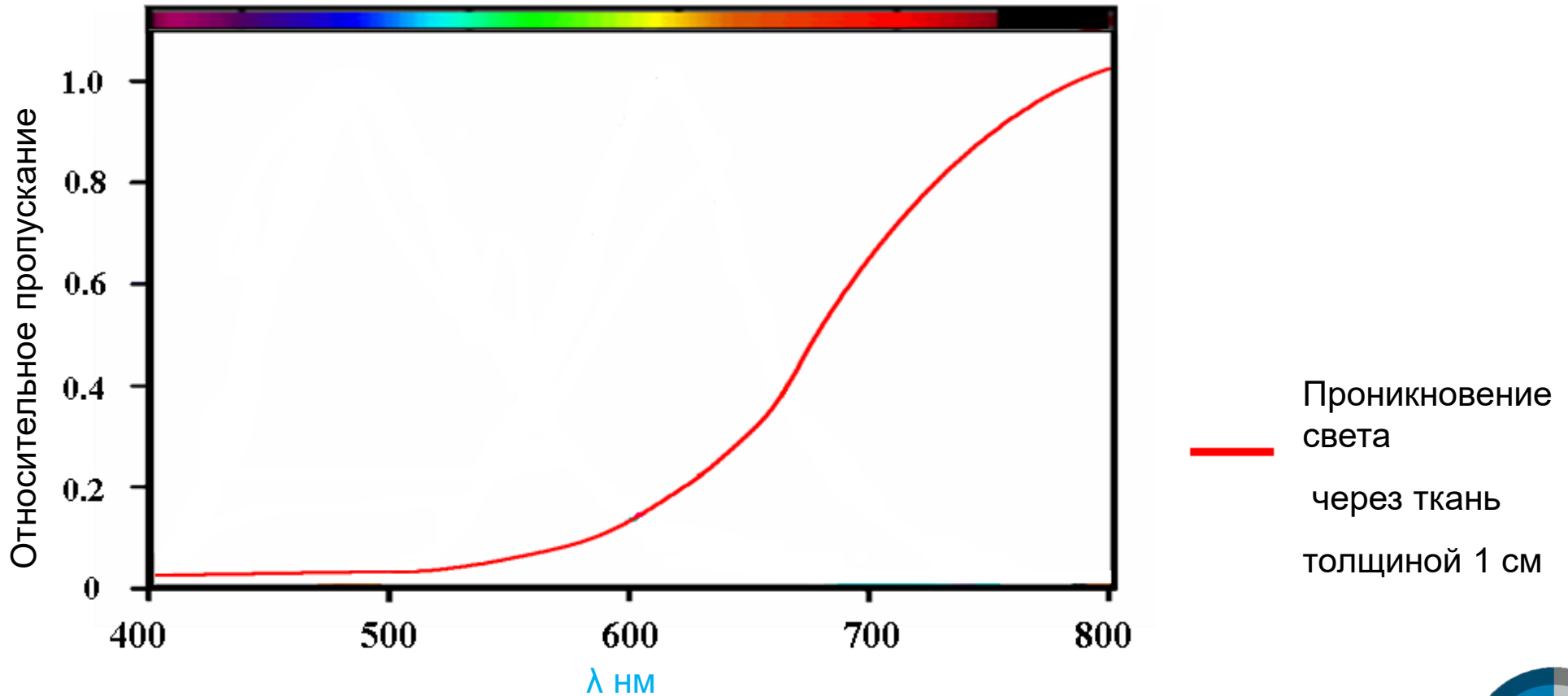
Реагенты для метода оптической визуализации in vivo



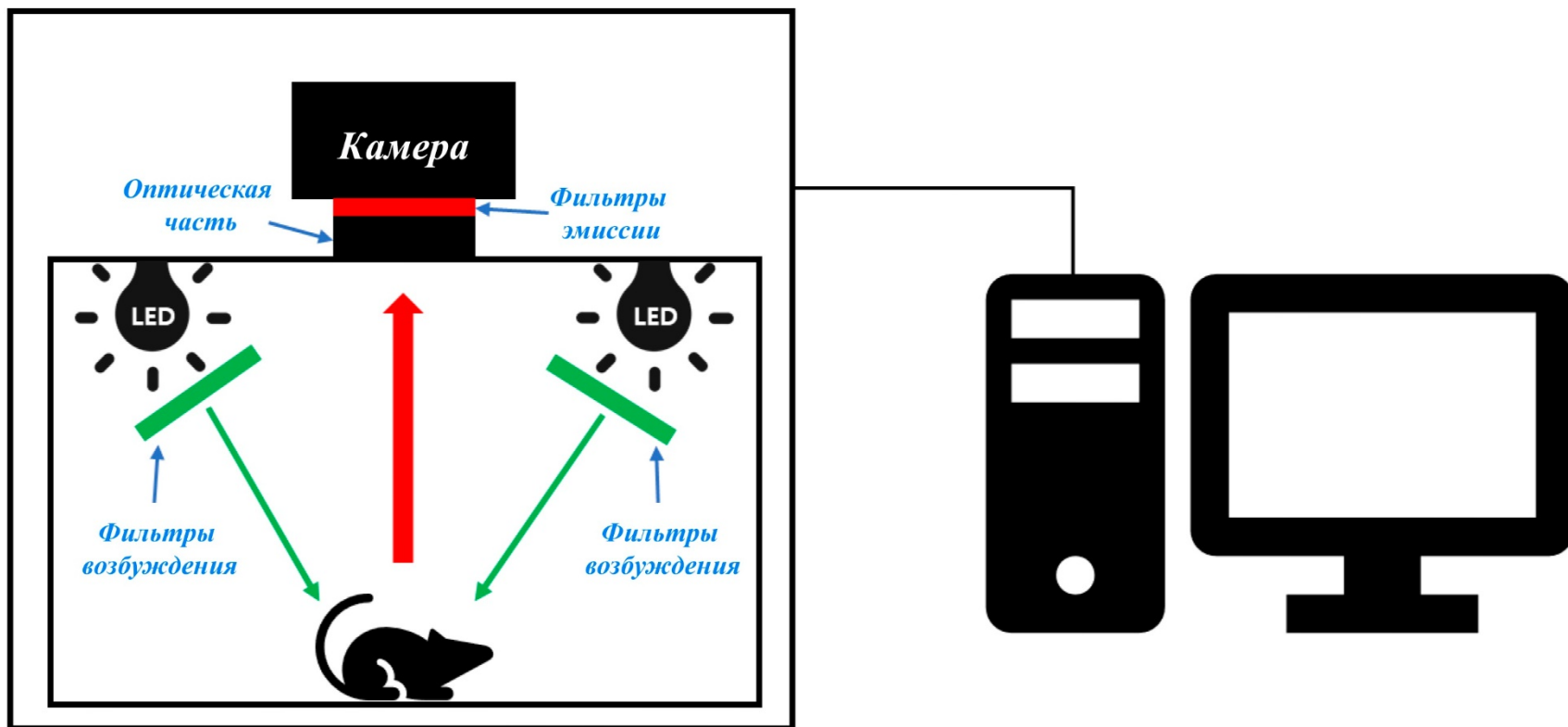
VIEWWORKS Генетические маркеры Меченные клетки Меченные бактерии Меченные белки

Живая ткань не является прозрачной для пропускания света – Поглощение света зависит от длины волны

Излучения оптического диапазона



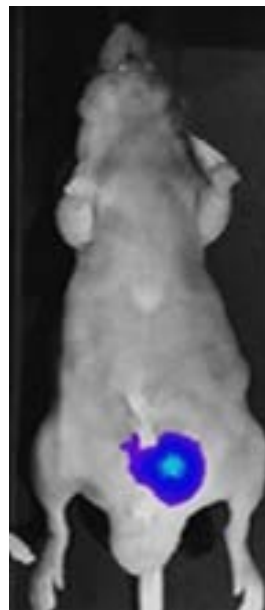
Принципиальная схема систем оптической визуализации in vivo



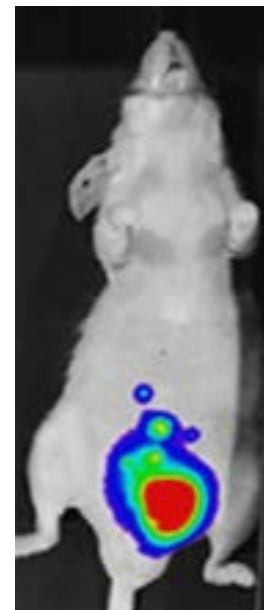
Почему метод оптической визуализации удобен для исследований in vivo?

- Введения метки для исследования любого биологического процесса – в отдельных клетках или глубоко в тканях всего организма лабораторных животных.
 - **Количество света пропорционально количеству клеток, продуцирующих свет**
 - Небольшая глубина тканей
- Неинвазивный метод
 - Возможность исследования животных в режиме реального времени
 - Отсутствие радиации
- Наличие большого количества публикаций и стандартных протоколов исследований

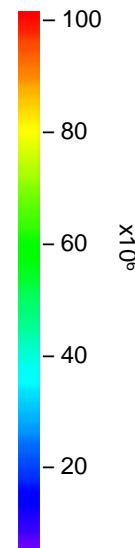
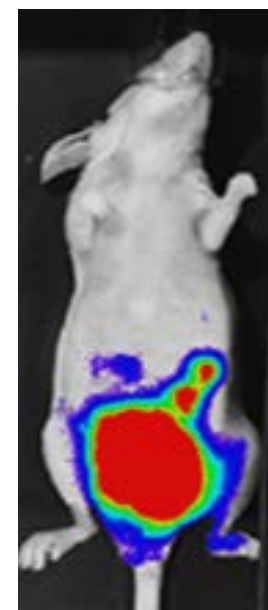
Неделя 1



Неделя 3



Неделя 5



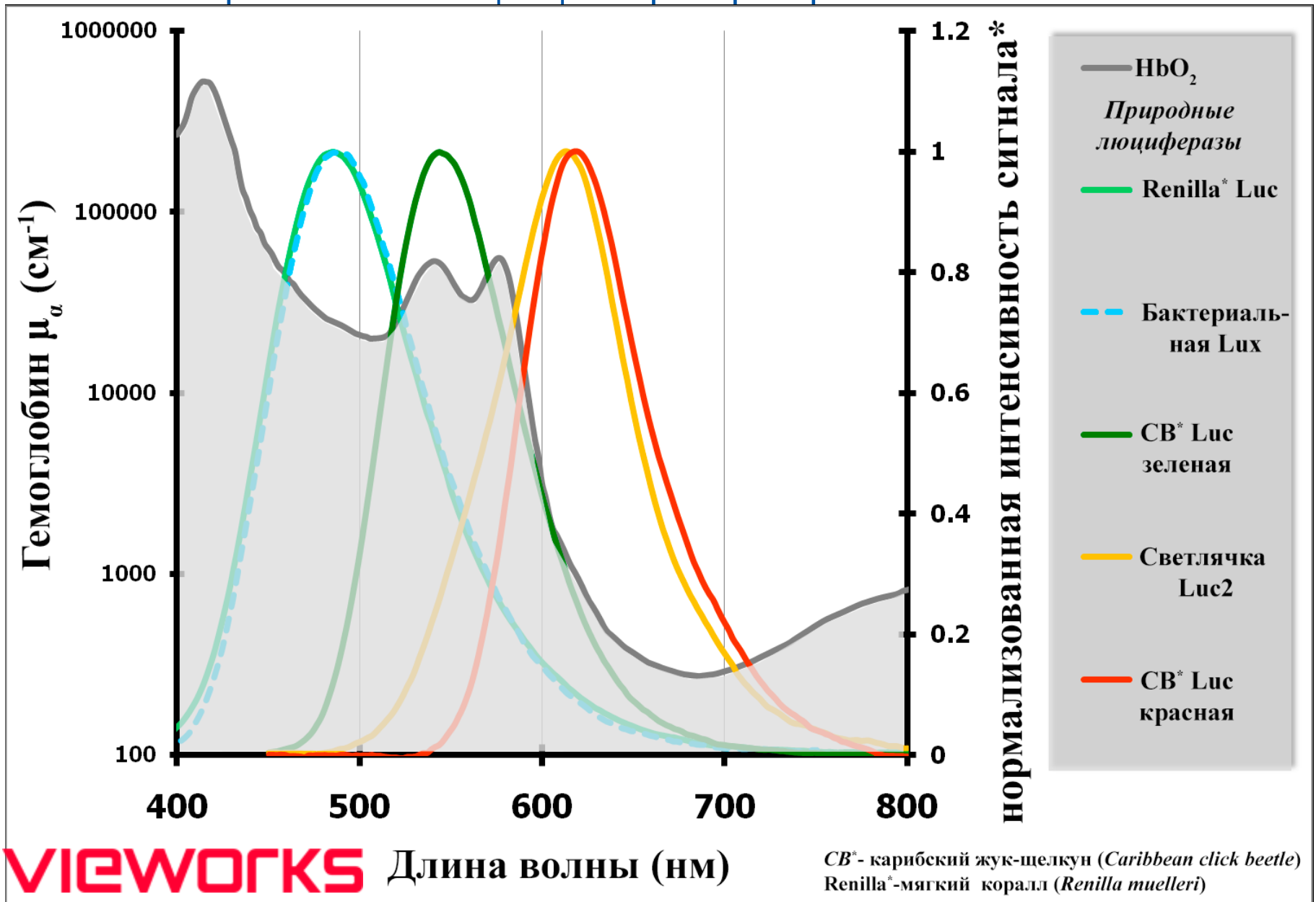
- Стандартизованная шкала измерений данных
 - Флуоресцентный сигнал - $\frac{\text{p/sec/cm}^2/\text{sr}}{\mu\text{W/cm}^2}$
 - Биолюминесцентный сигнал - $\text{p/sec/cm}^2/\text{sr}$

Биолюминесцентный метод визуализации in vivo

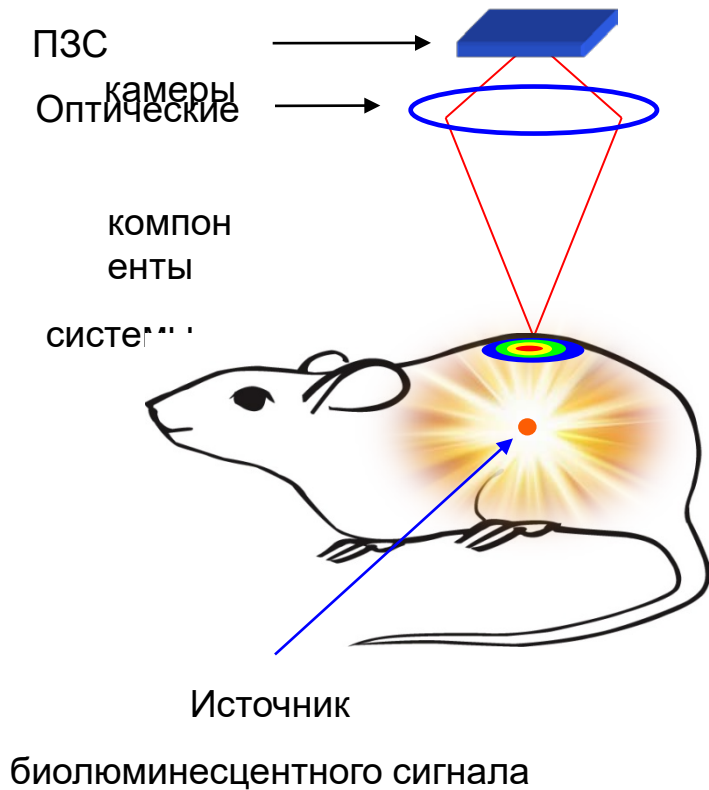
- ▶ **Высокая чувствительность**
- ▶ **Не токсичность**
- ▶ Возможность исследования динамики in vivo
- ▶ Отсутствие фона
- ▶ **Исследований с использованием оптимизированной люциферазой светляка (Luc2)**
- ▶ Картина генной экспрессии
- ▶ Активность клеточных рецепторов
- ▶ Процессинга РНК и белок-белковых взаимодействий
- ▶ Исследования стволовых клеток
- ▶ Процесс апоптоза
- ▶ Наблюдения первичных опухолевых узлов для детектирования метастазов



Спектр биolumинесценции и распространение света в живой ткани



Ограничения при детекции сигнала билюминесценции in vivo



- ▶ Свет, проходящий через ткани, многократно рассеивается, создавая "нечеткую" картину рассеяния на поверхности животного
- ▶ Камера системы визуализации детектирует на поверхности объекта свет проходящий сквозь ткани
- ▶ Свет не может проникать через ткани животного на 100% и детектироваться камерой – происходит поглощение света при выходе на поверхность из тканей животного



Поток фотонов при прохождении через живую ткань рассеивается, поэтому на поверхности животного образуется световое пятно

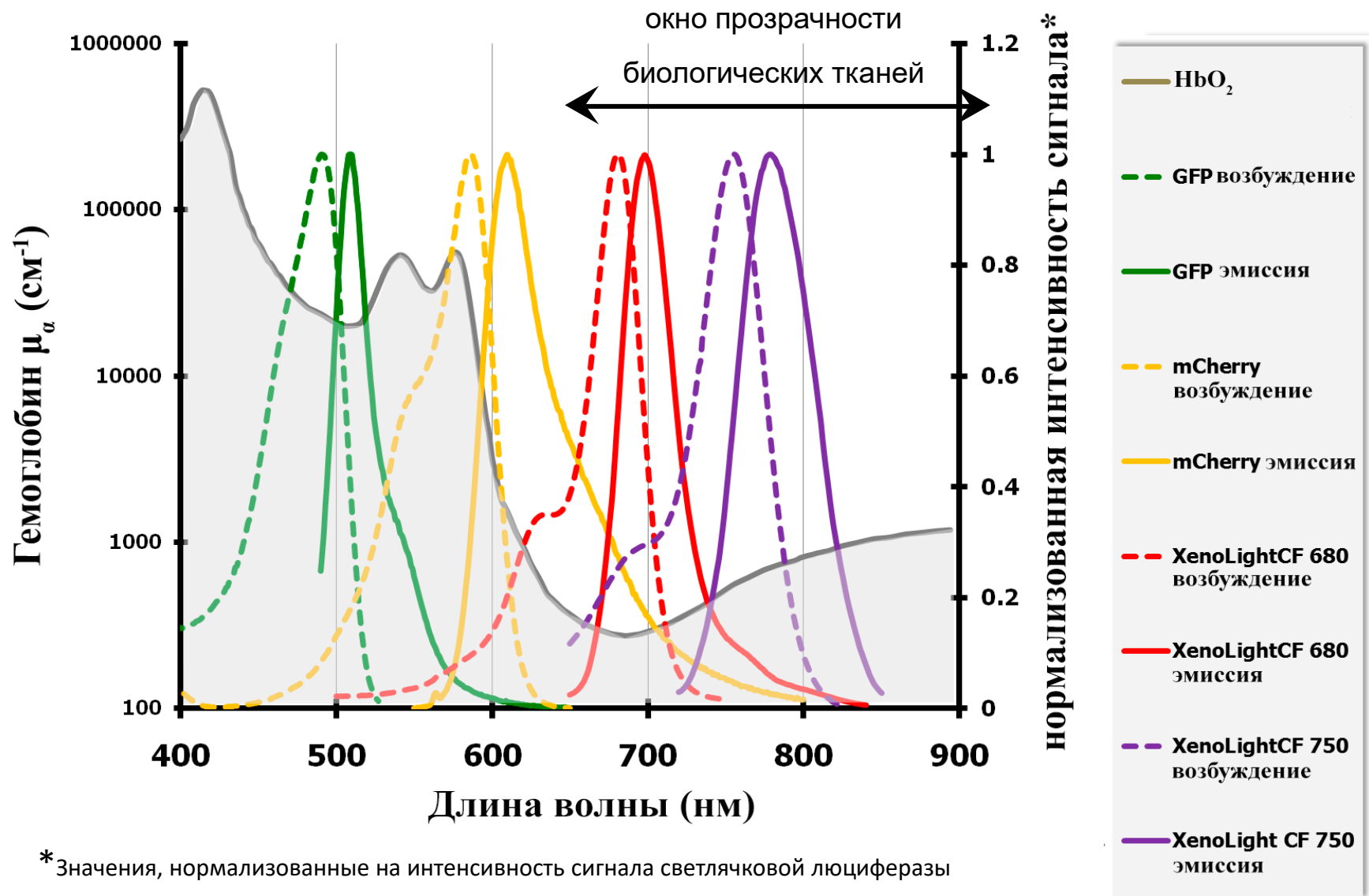
Флуоресцентный метод визуализации in vivo

- ▶ **Высокая чувствительность**
- ▶ Возможность исследования динамики in vivo
- ▶ **Исследований с использованием оптимизированных мутантных форм белков (флуорофоров)**

- ▶ Картина генной экспрессии репортёрной молекулы
- ▶ Активность клеточных рецепторов
- ▶ **Исследования клеточных взаимодействий**
- ▶ Процесс апоптоза
- ▶ Наблюдения первичных опухолевых узлов для детектирования метастазов

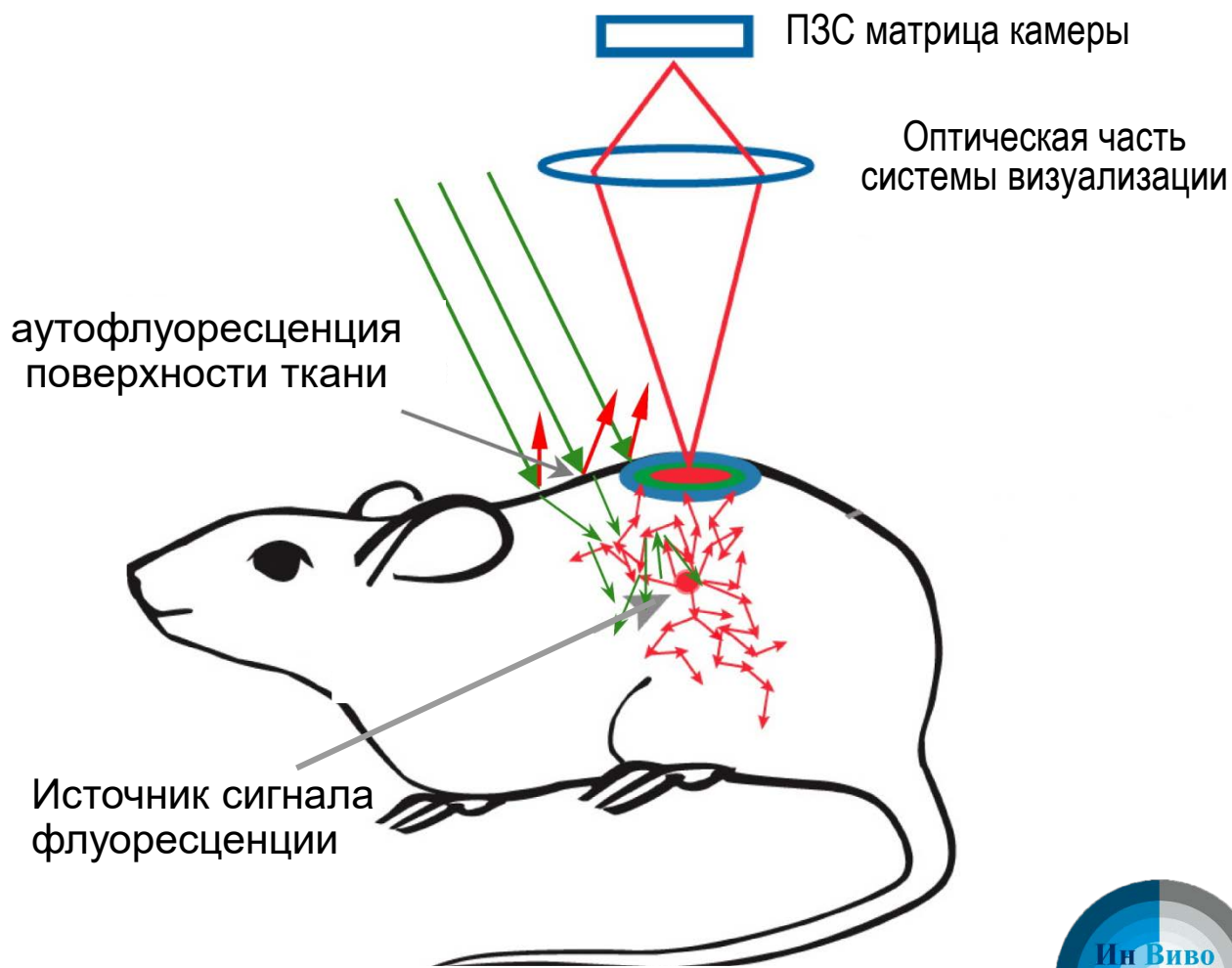


Спектр флуоресценции и распространение света в живой ткани



Ограничения при детекции сигнала флуоресценции in vivo

- ▶ Оптический сигнал на поверхности зависит от глубины расположения в тканях
- ▶ Живая ткань одновременно имеет аутофлуоресценцию
- ▶ Свет не может проникать через ткани животного на 100% и детектироваться камерой – происходит поглощение света при выходе на поверхность из тканей животного
- ▶ Для источника флуоресцентного сигнала необходимо иметь источник возбуждения
- ▶ “Диффузное пятно” светового излучения на поверхности животного от флуоресцентного источника налагается на аутофлуоресцентный сигнал от кожи животного



Специализированные корма для уменьшения аутофлуоресцентного сигнала

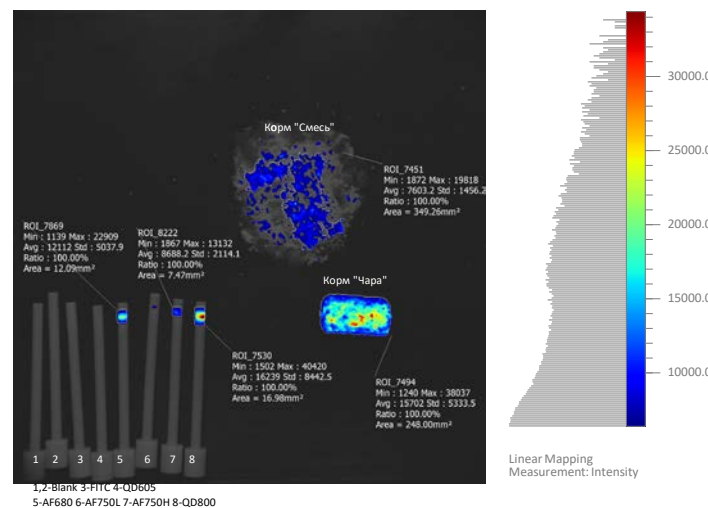
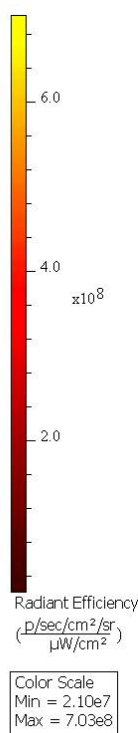
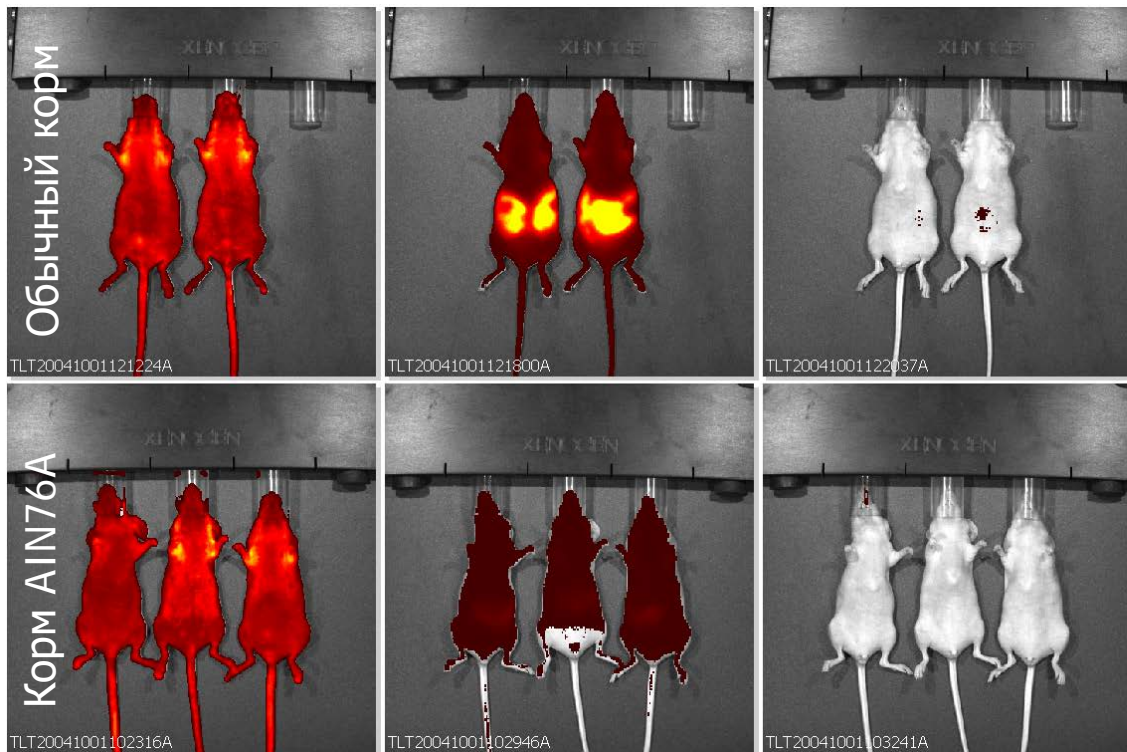
- Корм с хлорофиллсодержащими ингредиентами на основе люцерны

- Оптические характеристики российских кормов для оптических исследований in vivo

Green – 550nm

Red – 740nm

Far Red – 840nm



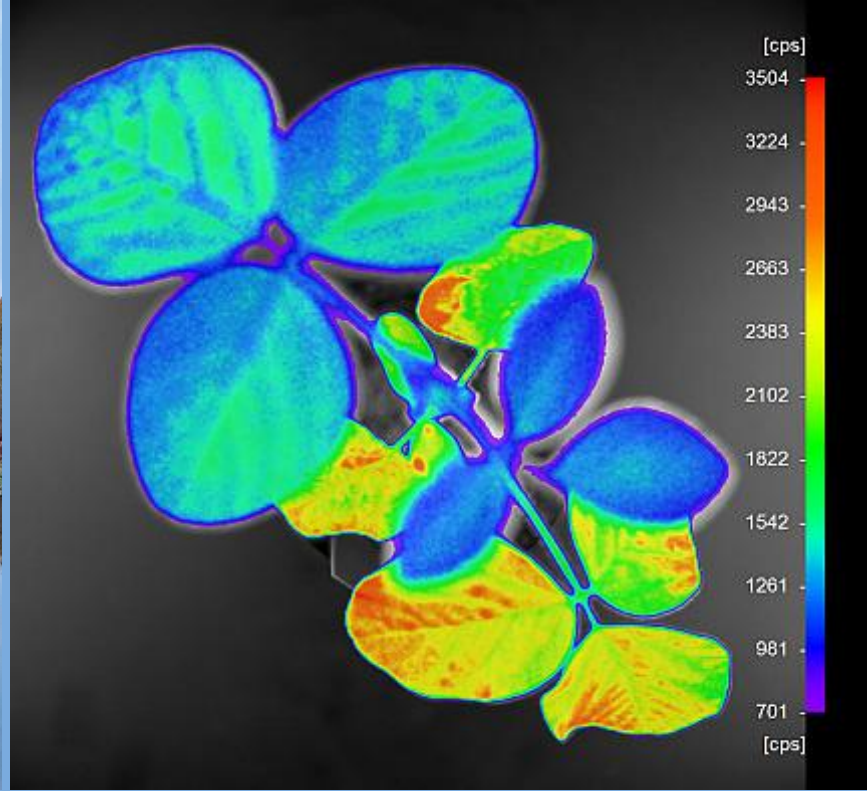
Zoom	1x	Filter	Cy5.5
Lens	Focus 120 step	Light	HyperRed Exc: 630 – 680 nm Em: 690 – 740 nm
	Iris F2.8	Intensity	Middle
Camera Temperature	-20.36 c	Stage Temp.	26.80 c
Door Status	Closed	Model	VISQUE InVivo Smart-LF

- Корм "Чара" и специализированный корм без хлорофиллсодержащих ингредиентов "Ин Виво Технология" (Россия)

- Корм AIN76A на основе оптически неактивных ингредиентов Research Diets Inc. (США)

VIEWWORKS





Спасибо за внимание

“Ин Виво Технология”, системы оптической визуализации in vivo
Vieworks Co., Ltd (Южная Корея)

chalov@invivotech.ru, <http://www.invivotech.ru>, +7 (495) 922-25-64

VIEWORKS

in vitro  in vivo



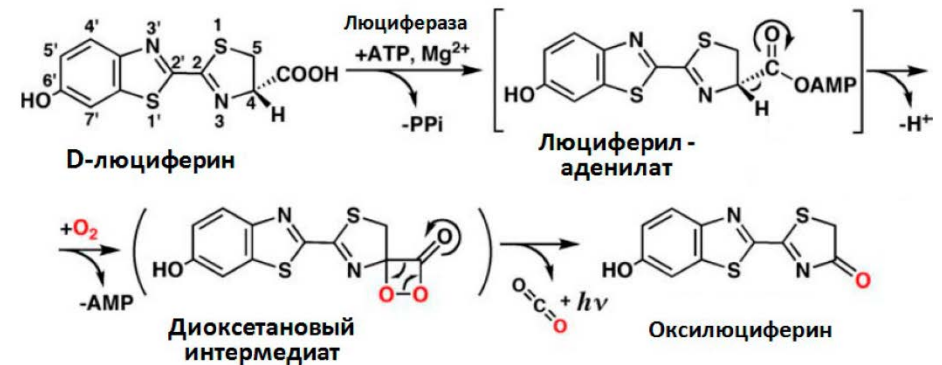
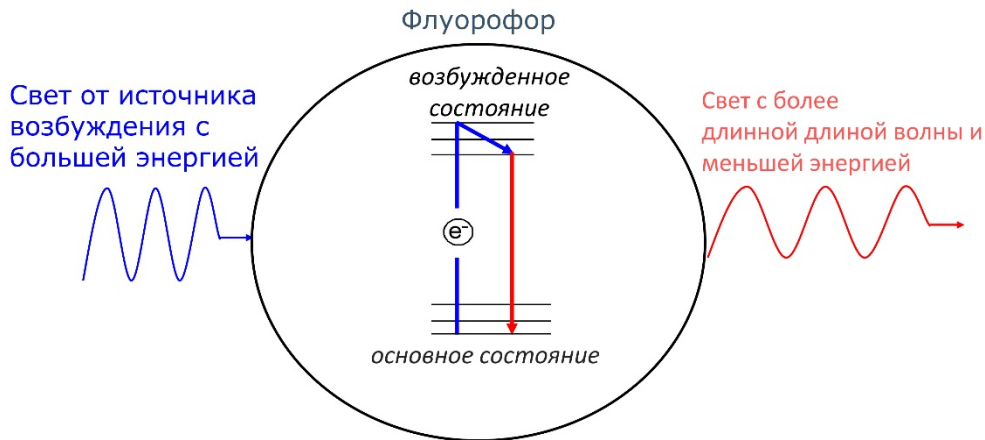
Оптическая визуализация in vivo (детекция оптического сигнала в тканях животного)

Детекция флуоресцентного сигнала

Детекция биолюминесцентного сигнала

Схема возникновения флуоресценции

Схема возникновения биолюминесценции

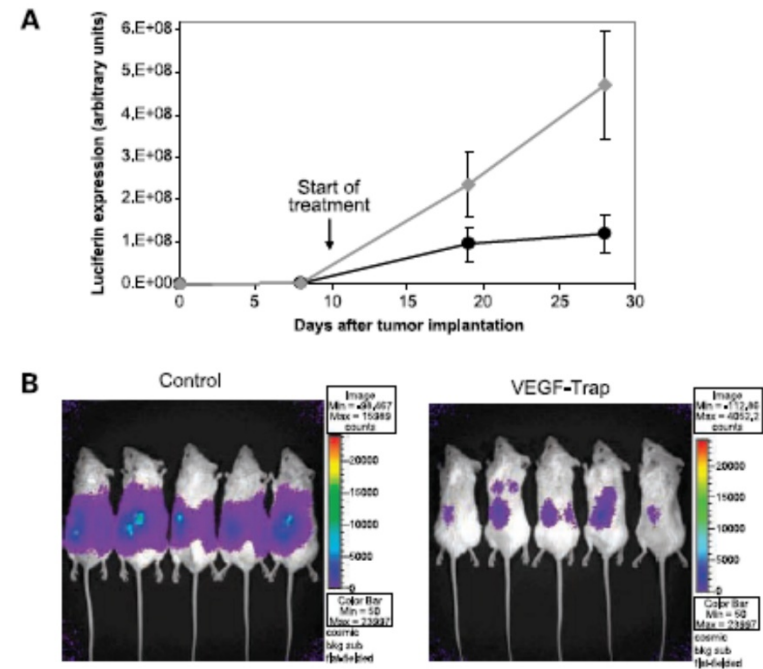


Механизм реакции окисления люциферина, катализируемой люциферазой светлячка



Применение метода оптической визуализации *in vivo* в доклинических исследованиях

- ▶ Sutent (Pfizer): подкожный опухолевый ксенотрансплантат
- ▶ Tasiqna (Novartis): модель лейкоза/метастазов
- ▶ Cubicin (Cubist Pharmaceuticals): модель бактериального перитонита
- ▶ CG0070 (Cell Genesys): ортотопический рак мочевого пузыря
- ▶ Panzem (EntreMed Pharmaceuticals): ортотопическая глиосаркома
- ▶ AEE788 (Novartis): модель внутрибрюшинной опухоли
- ▶ IT-101 (Insert Therapeutics): ксенотрансплантат саркомы Юингса
- ▶ PS-341 (Millennium Pharmaceuticals): внутрибрюшинный ксенотрансплантат
- ▶ **Aflibercept (Sanofi-Aventis): ортотопический рак почки**
- ▶ CHIR-258 (Novartis): ортотопическая модель множественной миеломы
- ▶ NPI-0052 (Nereus Pharmaceuticals): модель подкожной опухоли



Verheul *et al.*, Clin Cancer Res 2007;13(14) July 15, 2007, p. 4201–4208

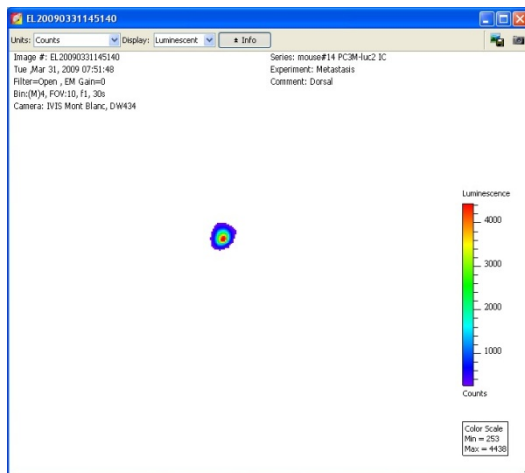


Схема получения результатов планарной оптической визуализации in vivo

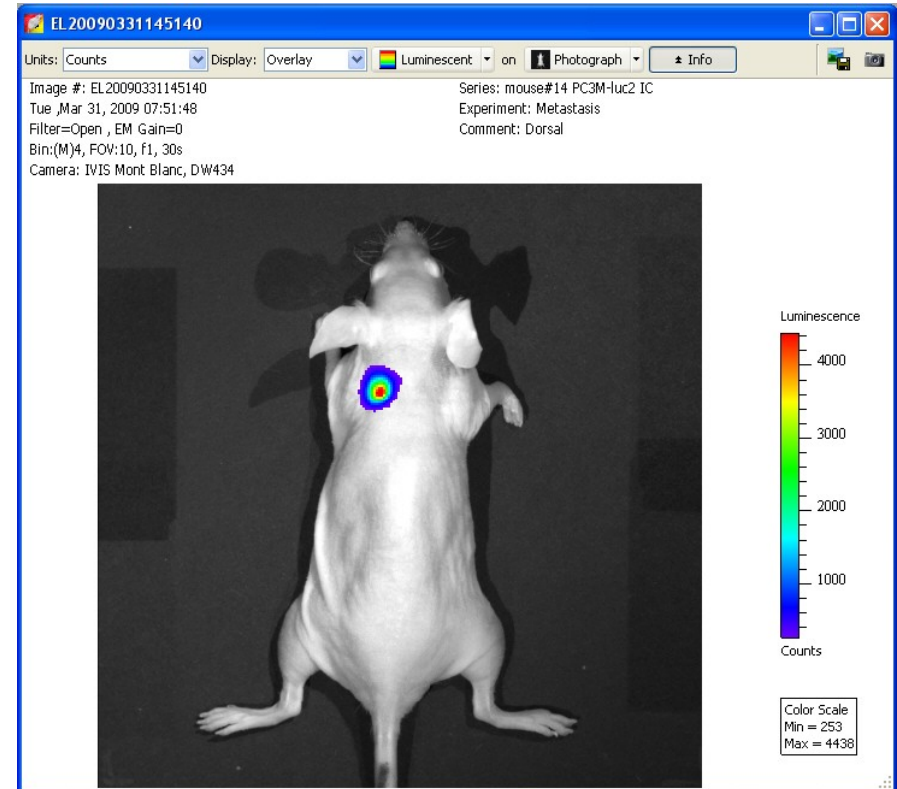
Фотография животного



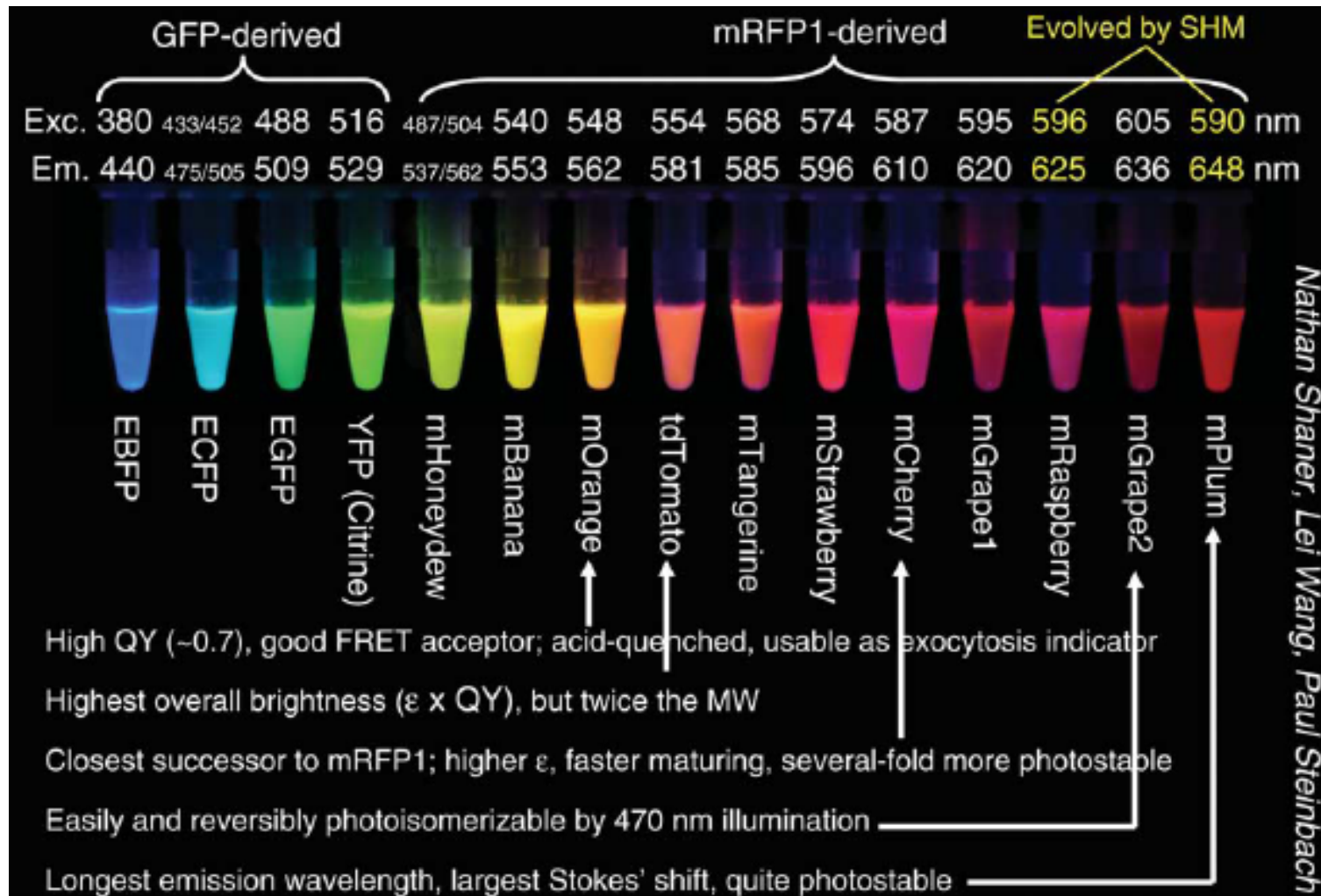
Расчетное значение оптического сигнала на поверхности животного



Результат – совмещение двух изображений



Флуоресцентный метод визуализации in vivo



Спектральные характеристики белков для оптической визуализации флуоресцентного сигнала in vivo



Флуоресцентный метод визуализации in vivo

Флуоресцентные белки: Визуализация клеток внутри целых организмов

Таблица основных свойств флуоресцентных белков для визуализации клеток внутри целых организмов

БЕЛОК	Katushka2S	TurboFP650	NirFP
Цвет флуоресценции	дальне-красный	ближне-инфракрасный	ближне-инфракрасный
Максимум возбуждения (нм)	588	592	605
Максимум эмиссии (нм)	633	650	670
Квантовый выход	0.44	0.24	0.06
К экст. ($M^{-1}cm^{-1}$)	67 000	65 000	70 000
Яркость*	29.5	15.6	4.2
Яркость, % от EGFP	89	47	13
pKa	5.4	5.7	4.5
Структура	димер	димер	димер
Токсичность для клеток	нет	нет	нет
Агрегация	нет	нет	нет
Скорость созревания при 37°C	очень быстрая	очень быстрая	быстрая**
Молекулярный вес (kDa)	26	26	26

* Яркость - произведение коэффициента молярной экстинкции и квантового выхода флуоресценции, деленное на 1000.

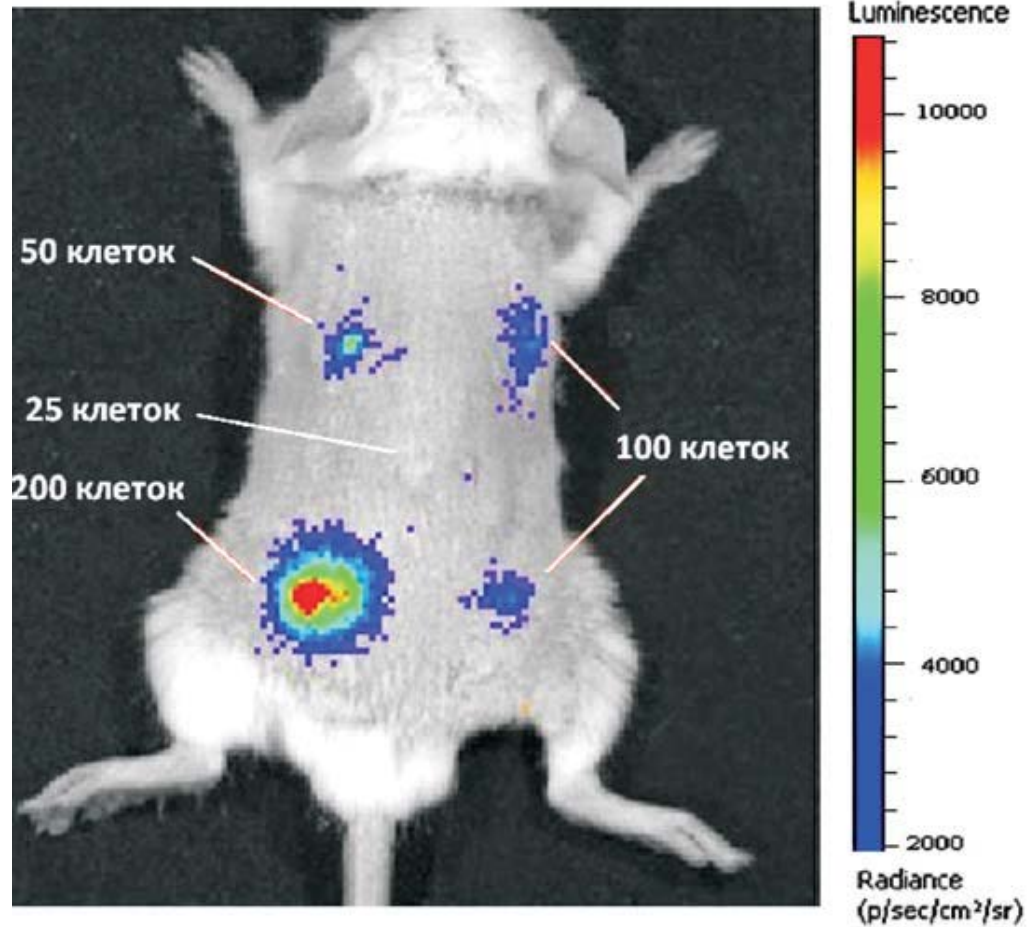
К экст. - коэффициент молярной экстинкции

** Несмотря на то, что NirFP характеризуется быстрым созреванием в *E. coli*, из-за низкой яркости, требуется до 48 часов для его детекции после трансфекции вектора в клетки млекопитающих.

Спектральные характеристики белков для оптической визуализации флуоресцентного сигнала in vivo (<https://evrogen.ru>)



Чувствительность при детекции сигнала биolumинесценции in vivo



- ▶ Определение чувствительности метода биolumинесцентного сигнала на основе Colo 26-luc2 in vivo. Подкожные инъекции клеток основе Colo 26-luc2 в количестве 25, 50, 100 и 200.

* N.V. Klementyeva, M.V. Shirmanova, E.O. Serebrovskaya et al.: In vivo Bioluminescence imaging of Tumor cells using optimized firefly luciferase luc2, CTM 2013- том 5. №3



Билюминесцентная визуализация in vivo метастазов опухоли основе Colo 26-luc2

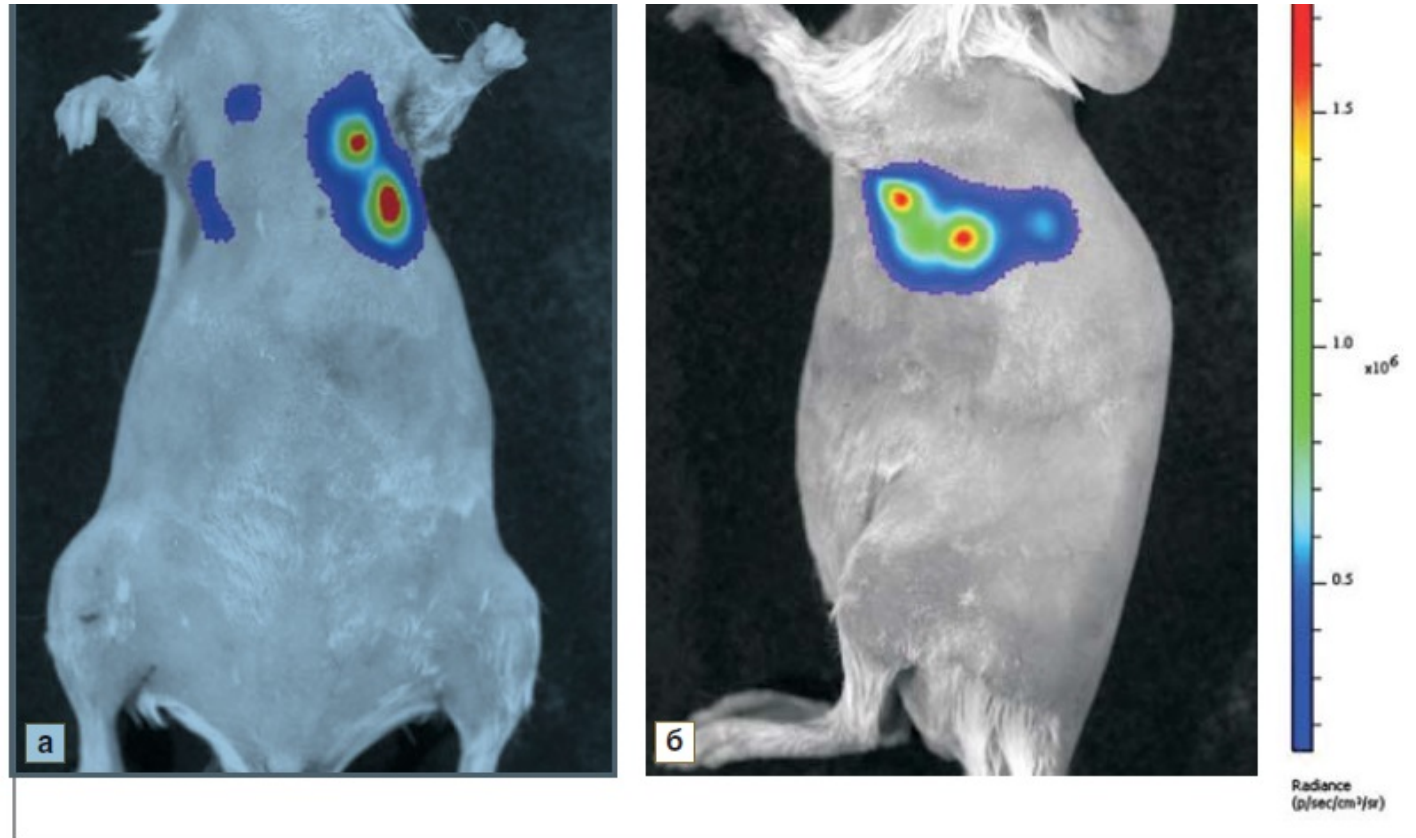


Рис. 6. Билюминесцентный имиджинг метастазов Colo 26–luc2 в легких на 9-й день после внутривенного введения опухолевых клеток: а — вентральная сторона животного; б — вид сбоку. D-люциферин, 150 мг/кг, внутривенно

*N.V. Klementyeva, M.V. Shirmanova, E.O. Serebrovskaya at all.: In vivo Bioluminescence imaging of Tumor cells using optimized firefly luciferase luc2, CTM 2013- том 5. №3



Билюминесцентная визуализация ex vivo метастазов опухоли основе Colo 26-luc2

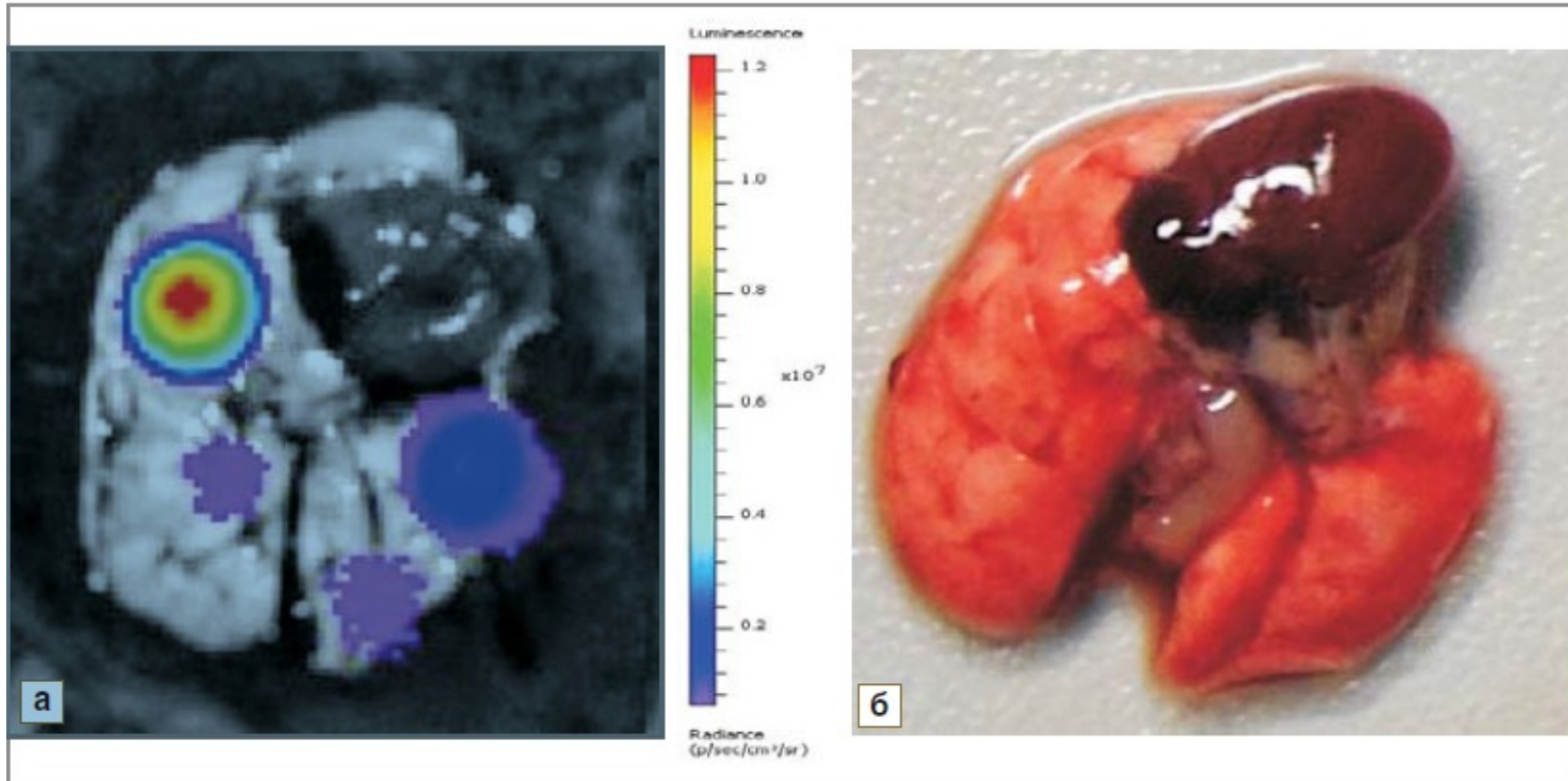


Рис. 7. Изолированные легкие мыши линии BALB/c на 9-й день после внутривенного введения клеток Colo 26-luc2: а — билюминесцентный имиджинг *ex vivo*; б — фотография

* N.V. Klementyeva, M.V. Shirmanova, E.O. Serebrovskaya at all.: In vivo Bioluminescence imaging of Tumor cells using optimized firefly luciferase luc2, СТМ 2013- том 5. №3

