

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-200

МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ БИОДОСТУПНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ С ВИЗУАЛИЗАЦИЕЙ*

METHOD FOR STUDYING DRUG BIOAVAILABILITY USING IMAGING FLOW CYTOMETRY

К. А. Елфимов, Л. Г. Готфрид, М. П. Гашникова, А. В. Тотменин, Н. М. Гашникова

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

K. A. Elfimov, L. G. Gotfrid, M. P. Gashnikova, A. V. Totmenin, N. M. Gashnikova

State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo

✉ elfimovkiril@yandex.ru

Аннотация

Разработан подход для оценки биодоступности химических соединений с помощью проточной цитометрии с визуализацией. Протокол включает анализ проникновения, локализации и распределения соединений в клетках с расчетом биологически значимых параметров и статистической обработкой результатов. Предлагаемый подход заполняет существующие ограничения микроскопии и проточной цитометрии.

Abstract

An approach to assess the bioavailability of chemical compounds using imaging flow cytometry has been developed. The protocol includes analysis of internalization, localization and distribution of compounds in cells with calculation of biologically relevant parameters and statistical processing of results. The proposed approach fills the existing limitations of microscopy and flow cytometry.

Введение

Современные методы машинного обучения помогают достаточно точно предсказать эффективные соединения во время разработки лекарств [1], однако не меньшее внимание уделяется способам доставки препаратов [2]. Как правило, способность к проникновению оценивается качественным или полуколичественным образом с помощью методов микроскопии и проточной цитометрии. Однако проточная цитометрия не предоставляет информации о локализации меченого соединения, в то время как данные микроскопии обладают низкой статистической мощностью из-за малого количества рассматриваемых объектов.

В этой работе мы представляем подход исследования клеточной биодоступности лекарственных соединений с помощью проточной цитометрии с визуализацией, которая способна заполнить эти пробелы.

Материалы и методы

Для демонстрации использовался набор экспериментальных антисмысловых олигонуклеотидов (AOS) с антиретровирусной активностью [3], которые инкубировались с клетками иммортализованной культуры МТ-4 в питательной среде RPMI-1640 с 10 % FBS.

Проточная цитометрия с визуализацией проводилась на платформе Amnis FlowSight. Клетки окрашивали AOS-FAM, PI и антителами к CD4, коньюгированными с AF700. Для экстинкции использовался лазер с длиной волны 488 нм и мощностью 60 МВт. Детекция эмиссия проводилась в канале FAM (фильтр 532/55 нм) и PI (фильтр 577/35 нм). Изображения были получены при общем увеличении в 20 раз (NA = 0,6) и размере пикселя 1 × 1 мкм.

Анализ результатов проточной цитометрии проводился в ПО IDEAS 6.2. Статистический анализ проводился с помощью языка программирования R (v. 4.3.0). Для визуализации результатов использовалось ПО GraphPad Prism (v. 10.0.0).

Результаты

Созданный пайплайн включает в себя запись клеток, анализ токсичности, абсорбции и проникновения и внутриклеточного распределения соединения.

Первый этап содержит окрашивание клеток витальным красителем (PI, 2 мкг/мл, 2 мкл/образец) и запись событий (клеток) на проточном цитометре. Для анализа использовались только живые единичные клетки (рис. 1).

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (№ 1/23).

© К. А. Елфимов, Л. Г. Готфрид, М. П. Гашникова, А. В. Тотменин, Н. М. Гашникова, 2025

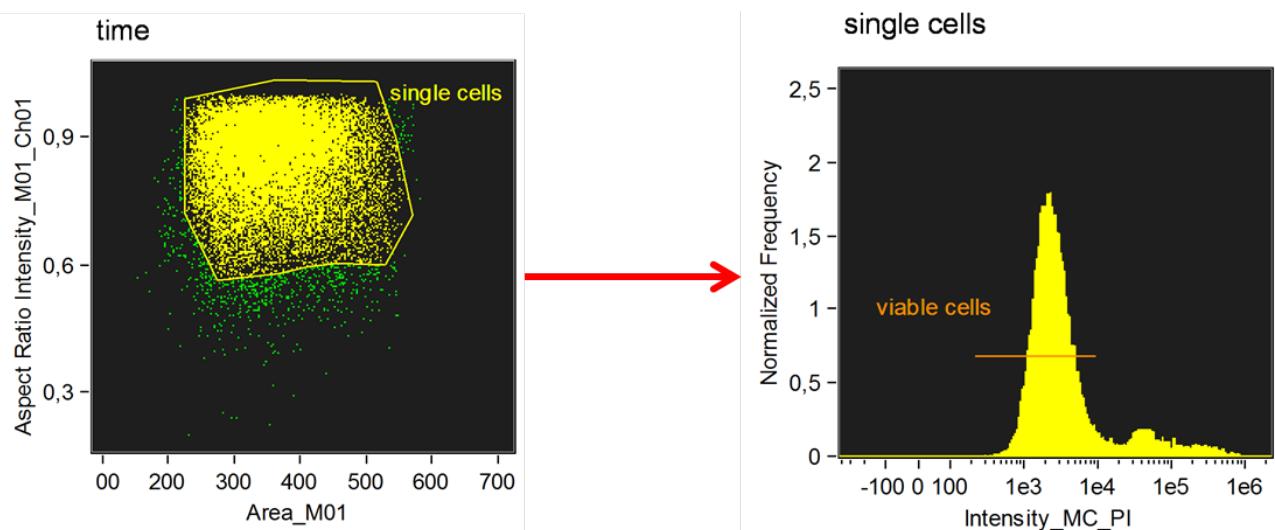


Рис. 1. Гейтингование единичных живых клеток на первом этапе анализа результатов

Второй этап состоит из дополнительного гейтингования клеток, попавших в фокус камеры цитометра. Дополнительно рекомендуется выделить популяцию *time*, которая состоит из событий, прошедших через точку интерrogации через 10–15 с после стабилизации ламинарного потока, поскольку на старте записи возможен заброс клеток из предыдущего образца (рис. 2).

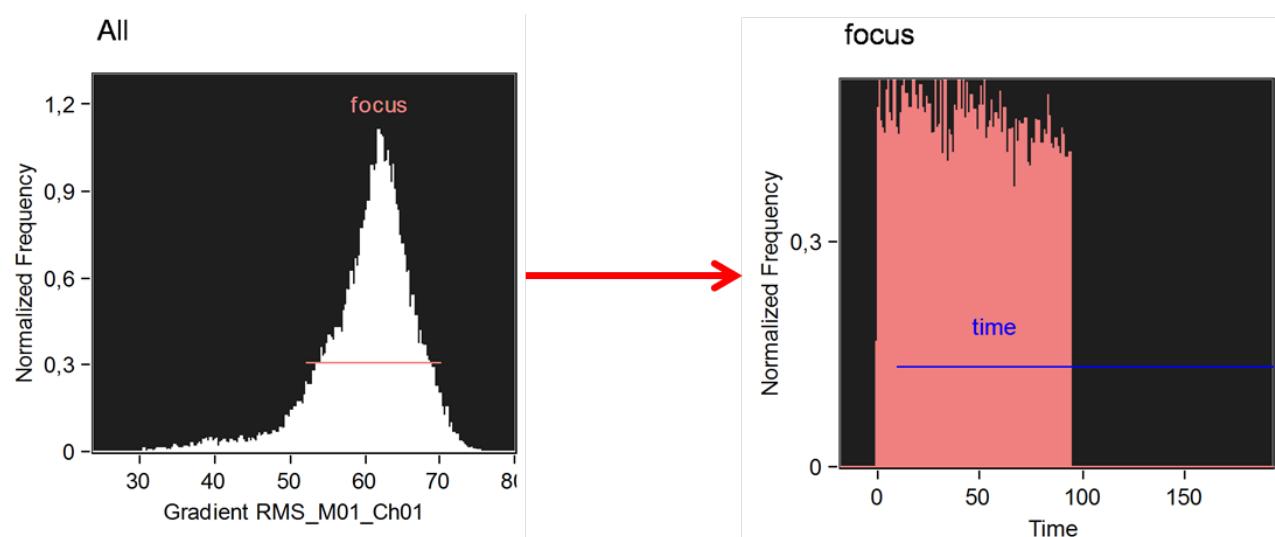


Рис. 2. Гейтингование клеток в фокусе камеры и клеток, прошедших через камеру проточного цитометра после 10–15 с от начала записи событий

Третий этап включает в себя создание масок, которые бы выделяли нужную нам область клетки из общей маски изображения. В этой работе используется маски, выделяющие область цитоплазмы (Cytoplasm) и цитоплазматической мембраны (Membrane), но если целевой компартмент соединения — ядро, то возможно создание маски и этой области (Nucleus). Если исследуемое соединение должно связываться с определенным ферментом или органоидом, то IDEAS 6.2 содержит помощник Colocalization, который поможет отобразить долю флуоресценции метки, которая находится в одном компартменте с мишенью.

Четвертый этап содержит анализ результатов, включающих долю жизнеспособных клеток, долю клеток с меткой, долю клеток с меткой внутри цитоплазмы или какого-либо компартмента, индекс интернализации (отношение сигнала внутри клетки к сигналу снаружи) и энтропию Шеннона (демонстрирует равномерность распределения метки внутри маски) (рис. 3).

Последний этап содержит статистический анализ результатов. Значимость различий между группами определяется с помощью дисперсионного анализа (F-критерий) с последующими попарными сравнениями критерия Тьюки. Для оценки вклада биодоступности в исследуемую активность препарата рассчитывается величина эффекта с использованием омега-квадрата (ω^2). Открытый код статистической обработки в R, демонстрационные файлы (rif) и примеры обработки результатов в IDEAS 6.2 (daf, cif) находятся в облачном хранилище (<https://disk.yandex.ru/d/KrjTge7ouTSobg>).

Заключение

Разработанный пайплайн позволяет исследовать токсичность, проникновение, стабильность и транспорт исследуемых молекул внутри клеток при условии наличия у последних флуоресцентной метки. В рамках работы был создан полный цикл манипуляций: от проведения цитометрического исследования до статистической обработки ее результатов. Предлагаемый подход имеет высокую статистическую мощность и скорость исследования, является воспроизводимым и не требует глубокого обучения сотрудников для начала работы.

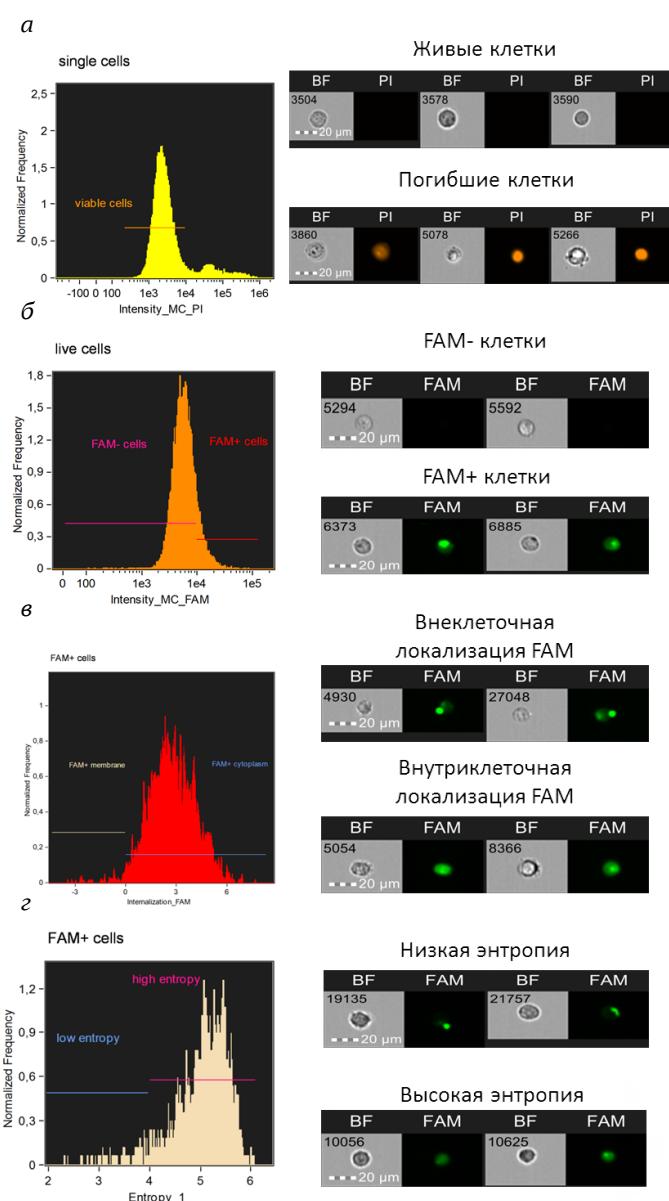


Рис. 3. Демонстрация биологически значимых параметров биодоступности соединений:
а — токсичность; б — абсорбция;
в — проникновение (интернализация);
г — энтропия

Литература

- Dara S., Dhamercherla S., Jadav S. S. et al. Machine learning in drug discovery: a review // Artif. Intelligence Rev. 2022. Vol. 55 (3). P. 1947–1999.
- Ramadon D., McCrudden M. T. C., Courtenay A. J. et al. Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications // Drug Delivery Translational Res. 2022. Vol. 12 (4). P. 758–791.
- Gotfrid L. G., El'fimov K. A., Gashnikova M. P. et al. Investigation of the Activity of LNA-Modified Phosphorothioate Oligonucleotides Against HIV-1 // Preprints.org. 2025. P. 18. (Препринт).