ХАРАКТЕРИСТИКА МОДЕЛИ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА, ПРЕДНАЗНАЧЕННОЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ АПОПТОЗА *INVIVO*

Казачкина Н.И., Жердева В.В., Меерович И.Г., Савицкий А.П.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии им. А.Н. Баха» Российской академии наук, Москва, Россия (119071, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2), е-mail:nkazachkina@inbi.ras.ru

Апоптоз – один из видов программируемой клеточной гибели – играет важную роль в возникновении и прогрессировании онкологических заболеваний, а также реализации эффектов противоопухолевых воздействий. Ключевым ферментом апоптоза является каспаза-3. Целью настоящей работы является характеристика роста и флуоресцентных свойств опухоли, полученной путем имплантации иммунодефицитным мышам клеток, экспрессирующих FRET-сенсор каспазы-3 - TR23K. Опухоли получали путем инокуляции под кожу спины мышей пи/пи клеток линии А549 (аденокарцинома легкого человека), трансфецированных конструкцией TRK-23-К.Флуоресцентные исследования проводили методом планарной томографии. Срок наблюдения за животными составил 45 дней. Показано, что после прививки клеток А549-ТR23К опухолевые узлы развивались у 100% животных. Латентный период варьировал от 6 до 14 дней, у большинства мышей он составлял 6-8 дней. Устойчивый рост опухоли наблюдался в течение всего срока наблюдения. Случаев спонтанной регрессии не отмечено. По мере роста опухоли интенсивность ее флуоресценции увеличивалась. Природа усиления люминесценции опухоли А-549 в процессе роста требует детального изучения. Информация об условиях эффективного действия сенсора, частности потенциального влияния него апоптозатрансдуцированных опухолевых клеток, необходима при последующем тестировании новых противоопухолевых средств, изучении апоптотического статуса экспериментальных опухолей и его влияния на эффективность противоопухолевых воздействий.

Ключевые слова: апоптоз, каспаза-3, опухоль, А-549.

CHARACTERISTICS OF TUMOR GROWTH MODEL FOR IN VIVOESTIMATING OF APOPTOSIS

Kazachkina N.I., Zherdeva V.V., Meerovich I.G., Savitsky A.P.

A.N. Bach Institute of biochemistry of RAS, Moscow, Russia (119071, Moscow, Leninsky prospekt, 33 build. 2), e-mail:ASGoryash@yandex.ru

Apoptosis -atype of the programmed cell death- plays an important role in the malignancy onset and progression of as well as the response to antitumor treatments. The key enzyme of apoptosis is caspase-3. The aim of this work is characteristic of the fluorescent properties of growth and tumor obtained by implanting cells expressing caspase-3 FRET-sensor - TR-23-K into immunodeficient mice. Tumors induced by inoculation under the dorsal skin of mice nu / nu A-549 cell line (human lung adenocarcinoma) transfected with TRK23K. Fluorescence studies were conducted by the planar imaging. The observation period was 45 days. It was shown that tumor nodules developed in 100% of animals after inoculation of A-549-TR23K cells. The latent period ranged from 6 to 14 daysandit was 6-8 days for most of the mice. The steady growth of the tumor occurred during the whole period of observation. The cases of spontaneous regression were not observed. Fluorescence intensity increased in a parallel with tumor growth. The reason of this fact is unknown. Information about effective action of the sensor, in particular, about the potential impact of spontaneous apoptosis of transduced tumor cells is necessary for subsequent testing of new anticancer drugs, the experimental study of the apoptotic status of the tumor and its influence on the efficacy of antitumor effects.

Keywords: apoptosis, caspase-3,tumor, A-549.

Введение

Апоптоз – один из видов программируемой клеточной гибели - играет двоякую роль в образовании, росте опухолей и их ответе на противоопухолевое лечение. С одной стороны, известно, что эффект противоопухолевых терапевтических воздействий реализуется путем

запуска ПКГ, и в частности апоптоза [6].Сдругойстороны, существуют данные, свидетельствующие отом,

чторазвитиеиростопухолейтакжесопровождаются увеличением уровня апоптоза [2; 3;5;8-10]. Вработе [4] показано, что апоптоз, индуцированный лучевой терапией, может стимулировать восстановление популяции опухолевых клеток как *invitro*, так и *invivo* за счет усиления синтеза простагландина Е, который, в свою очередь, стимулирует рост опухолевых клеток.

Все это указывает на важность изучения роли апоптоза в биологии опухолевого роста иреализации эффектов противоопухолевых воздействий.

Ключевым ферментом апоптоза является каспаза-3.В ИНБИ им.А.Н.Баха РАН разрабатываются генетически кодируемые сенсоры для прижизненной визуализации активности каспазы-3. Ранее был разработансенсор каспазной активности, представляющий собой FRET-пару цветных белков TagRFPиKFP, связанных между собой линкером. В результате разрезания линкера каспазой-3 нарушаются условия FRET,и флуоресценция донора увеличивается [1]. Клетки опухолей человека, трансфицированные данной генно-инженерной конструкцией, демонстрировали увеличение интенсивности и времени жизни флуоресценции трансфицированных клеток [7]. Следующим шагом в работе являлось получение моделей на основе трансфицированных клеток для исследований *invivo*.

Цель исследования

Целью настоящей работы является характеристика роста и флуоресцентных свойств опухоли A-549, полученной путем имплантации иммунодефицитныммышам опухолевых клеток, трансфецированных конструкцией TR23K.

Материалы и методы

В работе использованы мыши nu/nu, самки, массой 19-21 г, разведения питомника «Пущино».Все исследования на животных проводились в соответствии с национальными требованиями к гуманному обращению с экспериментальными животными.

Животные содержались в специальных модулях при температуре 26°C в клетках, оснащенных НЕРА-фильтрами, поддерживающими стерильность внутри клеток.

На протяжении всего эксперимента мыши получали сертифицированный полнорационный корм «Чара» (ЗАО «Ассортимент Агро», Россия) и воду без ограничений.

Опухоли получали путем инокуляции под кожу спины мышей клеток линии A-549 (аденокарцинома легкого человека), трансфицированных конструкцией TRK23K.

Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста путем пассированиякультуры через 2-3 дня в соотношении 1:3 или 1:4.

Для получения прививочного материала клетки, выращенные в вентилируемых культуральных флаконах (CorningCostar, США), обрабатывали смесью трипсин-ЭДТА,

отмывали в растворе DPBS(«ПанЭко», Россия), центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин, ресуспендировали в растворе DPBS до состояния клеточной суспензии, состоящей из одиночных клеток. Количество жизнеспособных клеток в суспензии определяли по окрашиванию трипановым синим с последующим подсчетом в камере Горяева. Создавали «концентрацию» клеток 20 млн/мл и прививали мышам в объеме 0,05 мл. Прививочная доза составляла таким образом – 1 млн клеток.

День прививки считали нулевым днем роста опухоли.

Опухолиизмеряли2-3 раза в неделюштангенциркулем и затем рассчитывали размер по формуле: $V_{\text{опухоли}} = \pi/6*a*b*c$, где a,b,c-длина, ширина и высота опухоли, соответственно. Вклад кожи при этом не учитывался.

Срок наблюдения за животными составил 45дней.

Флуоресцентные исследования проводили методом планарной томографии.

Измерения флуоресценции проводили *invivo*2-3 раза в неделю. Для этого мышей обездвиживали на растяжках с помощью «дышащего» пластыря Omnifilm или наркотизировали с смесью золетил : рометар в соотношении 1 : 1 в объеме 0,04 мл/мышь. Наркозу животных подвергали не чаще, чем 2 раза в неделю.

Флуоресцентные изображения получали на автоматизированной системе iBox (UVP, США) для анализа изображений лабораторных животных *invivo*. Базовым элементом установки является тёмный бокс с моторизованным лифтом и фильтрами для вырезания диапазона длин волн, требуемого для возбуждения и регистрации флуоресценции. Установка оснащена автоматизированным источником Biolite для эпилюминесценции и охлаждаемой ССD-камерой.

Флуоресценцию возбуждали в диапазонедлин волн 502-547 нм, регистрацию осуществляли в диапазоне 570-640 нм. Анализ изображений проводили с помощью программы ImageJ. При математической обработке флуоресцентных изображений выделяли области опухоли и кожи, определяли среднюю интенсивность флуоресценции и нормировали среднюю интенсивность флуоресценции опухоли на среднюю интенсивность участка кожи.

Результаты

После прививки клеток A-549-TR23Копухолевые узлы развивались у всех животных(n=10). Латентный период варьировал от 6 до 14дней. У 90%мышей он составлял 6-8 дней.

В течение месяца наблюдался устойчивый рост опухолей (рис.1). Случаев спонтанной регрессии не отмечено.

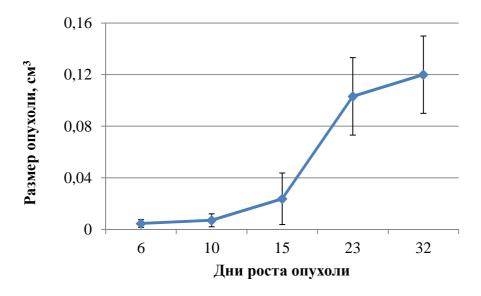


Рис.1. Изменение размеров опухоли A549-TR-23-К в течение срока наблюдения.

Результаты изучения флуоресцентных свойств опухоли A549-TR-23-K представлены на рис.2-4.

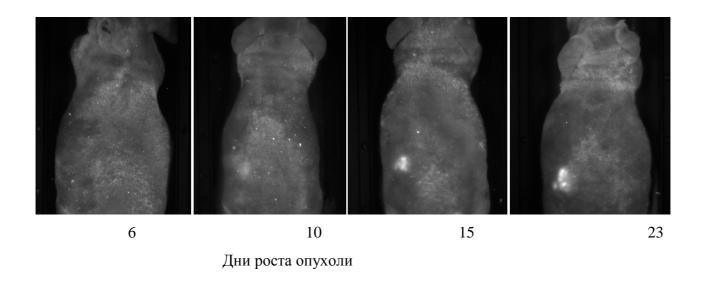


Рис.2. Флуоресцентные изображения мыши с опухолью A-549-TR23Квразличные сроки после имплантации опухолевых клеток.

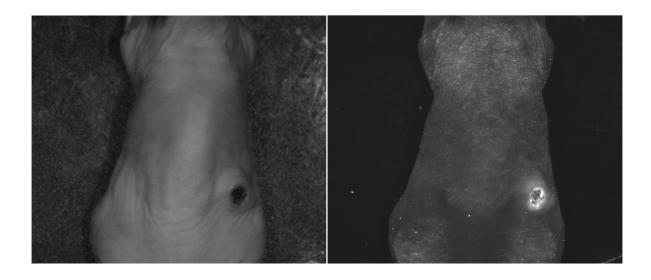


Рис.3. Изображения мыши с опухолью A-549-TR23Кна 38-й день роста опухоли, полученные в белом свете (а) и при возбуждении флуоресценции (б).

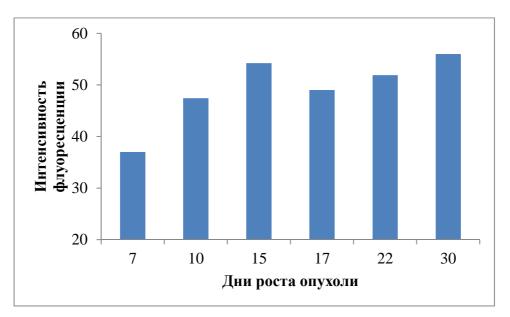


Рис.4. Изменение интенсивности флуоресценции опухоли A-549-TR23Кв процессе ее роста. Представлены данныепо средней интенсивности флуоресценцииопухоли

Как видно из рисунков, распределение флуоресценции по опухоли неравномерно (например, рис.2 в, д). У некоторых мышей в зоне прирастания опухоли к коже образовывался некроз с формированием струпа, который был аранжирован участками более яркой флуоресценции, чем остальная опухоль (рис.3). При этом интенсивность флуоресценции как отдельных участков, так и в среднем по опухоли возрастала по мере ее роста (рис.4).

Увеличение интенсивности флуоресценции в опухоли по мере ее роста может быть вызвано различными причинами, напримерза счет увеличения количества флуоресцирующих

опухолевых клеток. Кроме того, как описано в работе [8], при прогрессировании злокачественных новообразований в опухолевых клетках может возрастать активность каспазы-3. Если увеличение активности этого фермента происходит и в опухоли А-549-TR23K, то это может приводить к расщеплению субстрата каспазы-3 TR23K и, следовательно, к увеличению интенсивности люминесценции опухолевого очага в целом. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о яркой флуоресценции в зоне распада опухоли (рис.3). По мере роста в клетках может увеличиваться синтез флуорофора или происходить «разбалансировка» экспрессии пары белков, цветных И, например, можетэкспрессироваться свободный TagRFP, который, как указано выше, люминесцирует ярче, находясь в свободном состоянии, чем при связывании с KFP. Можно выдвинуть еще ряд предположений, но все они, как и высказанные выше, нуждаются в экспериментальной проверке.

Таким образом, природа изменения флуоресценции требует детального изучения. Информация об условиях эффективного действия сенсора, в частности потенциального влияния на него спонтанного апоптозатрансдуцированных опухолевых клеток, необходима при последующем тестировании новых противоопухолевых средств, изучении апоптотического статуса экспериментальных опухолей и его влияния на эффективность противоопухолевых воздействий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки по государственному контракту № 14.512.11.0023.

Списоклитературы

- 1. Русанов А.Л. Спектрально-флуоресцентные свойства КFP и использование этого белка для создания сенсоров, основанных на индуктивно-резонансном переносе энергии:автореф.дис. ... канд.хим. наук. -М., 2010.-25 с.
- 2. Eerola A.-K. [идр.] Accelerated Apoptosisand LowBcl-2 Expression Associated with Neuroendocrine Differentiation Predict Shortened Survival in Operated Large Cell Carcinoma of the Lung // Pathologyoncology research.-1999.-Vol. 5. No 3.-P.181-186.
- 3. Hampson P. Neutrophil apoptosis and its induction as apotential treatment for chronic inflammatory disease / P. Hampson, J. Hazeldine, J.M.Lord //CurrOpinHematol. -2013. Vol.20. No 1. P.10-15.
- 4. Huang Q. [идр.] Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy //Nat Med. 2011.- Vol.17. № 7. P.860-866.

- 5. Jäckel M. [идр.] Spontaneous Apoptosis in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Is Independent of bcl-2 and bax Protein Expression // Cancer. 1999. Vol. 85. № 3. P. 591-599.
- 6. Jain M.V. [идр.] Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development//J Cell Mol Med. 2013. Vol.17. № 1.- P.12-29.
- 7. Savitsky A. P. FLIM-FRET Imaging of Caspase-3 Activity in Live Cells Using Pair of Red Fluorescent Proteins / Savitsky A.P., Rusanov A.L., Zherdeva V.V., Gorodnicheva T.V., Khrenova M.G., Nemukhin A.V. //Theranostics. 2012. Vol. 2. P. 215-226.
- 8. Soini Y. Apoptosis and expression of caspases 3,6 and 8 in malignant non-Hodgkin's lymphomas /Y.Soini, P.Pääkkö //APMIS. 1999. Vol. 107. P.1043-1050.
- 9. Vakkala M. [идр.] Apoptosis during Breast Carcinoma Progression //Clinical Cancer Research. 1999. Vol. 5. -P.319–324.
- 10. Young N.S. Aplastic Anemia/N.S. Young, P. Scheinberg, and R.T. Calado // CurrOpinHematol. 2008. –Vol.15. № 3.–P.162–168.

Рецензенты:

Королева О.В., д.б.н., зав. лабораторией молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, г.Москва.

Шишкин С.С., д.б.н., профессор, зав. лабораторией биомедицинских исследований Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, г.Москва.