

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ ИМИДЖИНГ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК *IN VIVO* С ПРИМЕНЕНИЕМ ОПТИМИЗИРОВАННОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКА *LUC2*

УДК 61–006:575

Поступила 16.05.2013 г.



Н.В. Клементьева, аспирант, младший научный сотрудник проблемной научной группы биофотоники НИИ ПФМ¹;
М.В. Ширманова, к.б.н., старший научный сотрудник проблемной научной группы биофотоники НИИ ПФМ¹;
Е.О. Серебровская, к.б.н., научный сотрудник лаборатории биофотоники²;
А.Ф. Фрадков, к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярных технологий²;
А.В. Мелешина, аспирант, инженер лаборатории биоинженерии тканей кафедры биомедицины³;
Л.Б. Снопва, д.б.н., зав. отделом морфологии ЦНИЛ НИИ ПФМ¹;
Н.Н. Проданец, к.б.н., старший научный сотрудник отдела морфологии ЦНИЛ НИИ ПФМ¹;
С.А. Лукьянов, д.б.н., академик РАН, зав. лабораторией молекулярных технологий²; зав. лабораторией флюоресцентного биоимиджинга¹;
Е.В. Загайнова, д.м.н., директор НИИ биомедицинских технологий¹; зав. кафедрой биомедицины³

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²Институт биоорганической химии РАН им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, 179971, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

³Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского — Национальный исследовательский университет, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23

Цель исследования — создание опухолевой клеточной линии, стабильно экспрессирующей люциферазу *luc2*, и разработка методики наблюдения первичных узлов опухоли и метастазов с помощью биолюминесцентного имиджинга *in vivo*.

Материалы и методы. Использованы плазмиды *pLuc2-N* и лентивирусный вектор *pLVT-1* («Лаборатория молекулярных технологий», ИБХ РАН, Россия), клеточная линия *Colo 26* (МНИОИ им. П.А. Герцена, Россия). Работа выполнена на мышах линии *BALB/c*. Биолюминесцентное наблюдение *in vitro* и *in vivo* проводили на установке *IVIS-Spectrum* (Caliper Life Sciences, США). Модель первичной опухоли создавали путем подкожной инъекции 500 000 клеток, модель метастазов — путем внутривенной инъекции 75 000 опухолевых клеток мышам. Для верификации опухоли и метастазов выполняли патоморфологический анализ с окраской парафиновых срезов гематоксилин-эозином.

Результаты. Методами молекулярного клонирования получен лентивирусный вектор, несущий ген оптимизированной люциферазы светляка *luc2*. С помощью данной генетической конструкции создана стабильная линия опухолевых клеток *Colo 26-luc2*. Определена чувствительность метода биолюминесцентного имиджинга на основе *Colo 26-luc2*: *in vitro* интенсивность свечения в среднем составила около 5000 фотон/с на клетку, *in vivo* — 250 фотон/с на клетку. Созданы модели первичного опухолевого узла и метастазов на основе *Colo 26-luc2*. Результаты биолюминесцентного имиджинга полученных моделей соотнесены с данными гистологического исследования.

Заключение. Выполненная работа демонстрирует возможности биолюминесцентного имиджинга на основе оптимизированной люциферазы *luc2* для прижизненной неинвазивной визуализации опухолевых процессов на уровне целого организма.

Ключевые слова: биолюминесцентный имиджинг; оптимизированная люцифераза светляка *luc2*; первичная опухоль; модель метастазирования.

Для контактов: Клементьева Наталья Владимировна, тел. раб. 8(831)465-41-13, тел. моб. +7 903-059-84-86;
 e-mail: nvklementieva@gmail.com

English

In Vivo Bioluminescence Imaging of Tumor Cells Using Optimized Firefly Luciferase luc2

N.V. Klementyeva, Postgraduate, Junior Research Worker, Problem Scientific Group of Biophotonics, Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine¹;

M.V. Shirmanova, PhD, Senior Research Worker, Problem Scientific Group of Biophotonics, Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine¹;

E.O. Serebrovskaya, PhD, Research Worker, the Biophotonics Laboratory²;

A.F. Fradkov, PhD, Senior Research Worker, the Laboratory of Molecular Technologies²;

A.V. Meleshina, Postgraduate, Engineer, the Laboratory of Biological Engineering of Tissues, the Department of Biomedicine³;

L.B. Snopova, D.Bio.Sc., Head of the Morphology Department, Central Scientific Research Laboratory of Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine¹;

N.N. Prodanets, PhD, Senior Research Worker, the Morphology Department, Central Scientific Research Laboratory of Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine¹;

S.A. Lukyanov, D.Bio.Sc., Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Molecular Technologies²; Head of the Laboratory of Fluorescent Bioimaging¹;

E.V. Zagaynova, D.Med.Sc., Director of Scientific Research Institute of Biomedical Technologies¹; Head of the Department of Biomedicine³

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603005;

²Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya St., 16/10, Moscow, Russian Federation, 179971;

³Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky — National Research University, Gagarin Avenue, 23, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950

The present study was aimed to establish a tumor cell line stably expressing luciferase luc2, and to develop the technique to observe primary tumor nodes and metastases using *in vivo* bioluminescence imaging.

Materials and Methods. In this research we used pLuc2-N plasmid, lentiviral vector pLVT-1, Colo 26 cell line and BALB/c mice to generate new bioluminescent tumor model. Bioluminescence imaging *in vitro* и *in vivo* was carried out on IVIS-Spectrum system (Caliper Life Sciences, USA). Primary tumor model was created by subcutaneous injection of 500 000 Colo 26-luc2 cells. Model of metastases was generated by i.v. injection of 75 000 Colo 26-luc2 cells. Histological analysis was performed to verify the results of the imaging.

Results. We created the lentiviral vector containing luc2 gene using molecular cloning. Then Colo 26-luc2 tumor cell line was generated. We assessed the sensitivity of luc2-based bioluminescence imaging. The intensity of bioluminescent signal *in vitro* averaged about 5000 photon/s per cell, *in vivo* — 250 photon/sec per cell. *In vivo* monitoring of Colo 26-luc2 primary tumor and metastases was demonstrated. The results of bioluminescence imaging correlated with histological analysis data.

Conclusion. The present work shows the possibility of bioluminescent system based on optimized luciferase luc2 for *in vivo* noninvasive high-sensitive whole-body imaging of tumors.

Key words: bioluminescence imaging; optimized firefly luciferase luc2; primary tumor; metastases model

Оптические методы визуализации, или имиджинга, на уровне целого организма стали незаменимым инструментом экспериментальной онкологии в последние годы. Они основаны на использовании излучения длинноволновой части видимого диапазона спектра и ближнего инфракрасного диапазона, которое является неинвазивным вследствие малой величины энергии кванта света и незначительной мощности. Оптический имиджинг — это быстрый, точный и относительно недорогой метод визуализации [1].

В зависимости от природы свечения, которое лежит в основе метода, различают флуоресцентный и биолуминесцентный имиджинг. В случае флуоресцентного

имиджинга в качестве контрастирующих агентов используются флюорофоры, которые вводятся в организм животного экзогенно (например, индоцианин зеленый) либо продуцируются самими опухолевыми клетками (например, GFP-подобные белки) за счет того, что в них встроен соответствующий ген. Ограничения флуоресцентного имиджинга обусловлены прежде всего наличием собственной флуоресценции биотканей, которая создает высокий фоновый сигнал, снижающий чувствительность метода [2].

Биолуминесцентный имиджинг основан на реакции окисления ферментом люциферазой соответствующего субстрата, которая сопровождается испусканием

кванта света. При этом ДНК, кодирующую люциферазу, встраивают в геном целевых клеток, а субстрат вводится системно. Поскольку собственная биолюминесценция тканей крайне мала, данный подход позволяет осуществлять высокочувствительное детектирование сигнала.

Люциферазы встречаются у различных живых организмов — бактерий, динофлагеллят, радиолярий, многоклеточных, в целом примерно у 700 видов. Наиболее широко изучена и применяется система на основе люциферазы светляка *Photinus pyralis* [3]. Данный фермент принадлежит к семейству оксигеназ, в присутствии аденозинтрифосфата, ионов магния и кислорода он окисляет субстрат D-люциферин с образованием оксилуциферина, что сопровождается испусканием света в широком диапазоне длин волн: от желто-зеленого до красного. Этот белок состоит из 550 аминокислотных остатков, молекулярная масса равна 62 кДа [4]. Активный центр фермента включает два домена: большой N-терминальный — 433 а.о. (а.о. — аминокислотные остатки) и малый C-терминальный (115 а.о.), которые соединены гибким шарнирным участком. Для сохранения энзиматической активности и биолюминесценции оба фрагмента должны находиться в непосредственной близости друг от друга и формировать единую структуру [5].

В 2005 г. компания Promega Corporation выпустила новый продукт — оптимизированную люциферазу светляка (luc2) с улучшенными свойствами. Данная модификация белка среди люцифераз, излучающих в желтом диапазоне спектра, характеризуется наибольшей яркостью и с высокой эффективностью экспрессируется в цитоплазме клеток млекопитающих. Это существенно повышает чувствительность метода биолюминесцентной визуализации и позволяет проводить наблюдение в глубоких слоях тканей [6].

На сегодняшний день биолюминесцентный имиджинг с использованием маркера luc2 представляет собой быстрый, крайне чувствительный и неинвазивный метод исследования, в том числе и онкологических процессов. Задачи, которые он позволяет решать *in vitro* и *in vivo*, очень разнообразны. Продемонстрирована возможность изучения картины генной экспрессии, активности клеточных рецепторов, путей сигнальной передачи, процессинга РНК и белок-белковых взаимодействий [7, 8]. Перспективными направлениями считаются исследования жизнедеятельности стволовых клеток [9] и процесса апоптоза [10]. Показаны возможности применения люциферазы как для наблюдения роста первичных опухолевых узлов, так и для детектирования метастазов [11, 12].

Следует отметить, что оценка метастатической активности опухоли стала неотъемлемым условием при разработке новых методов противоопухолевого лечения, поскольку для обнаружения метастазов до сих пор используются рутинные трудоемкие гистологические методы, так как метастатические новообразования зачастую слишком малы, чтобы быть обнаруженными макроскопически. Кроме того, метастазы могут распространяться в различных органах и тканях животного,

что создает трудности для их выявления с помощью световой микроскопии. Таким образом, макро- и микроскопический анализ не могут обеспечить полноценную картину распространения неопластических процессов в организме животного [13]. Возможности обнаружения у животных метастатических узлов на ранних этапах их формирования в режиме реального времени открывает метод биолюминесцентного имиджинга, что обуславливает актуальность создания моделей метастазирования и разработки подходов к их наблюдению с помощью биолюминесценции.

Цель исследования — создание опухолевой клеточной линии, стабильно экспрессирующей люциферазу luc2, и разработка методик наблюдения первичных узлов опухоли и метастазов с помощью биолюминесцентного имиджинга *in vivo*.

Материалы и методы

Получение лентивирусного вектора. Использованы плазмиды рLuc2-N и лентивирусный вектор рLVT-1, любезно предоставленные Лабораторией молекулярных технологий (ИБХ РАН, Россия). Амплифицированный с матрицы плазмиды рLuc2-N фрагмент, соответствующий открытой рамке считывания luc2, был обработан эндонуклеазой рестрикции Not I с последующей достройкой «липких» концов ДНК-полимеразой I *E. coli* (Klenow fragment). Далее фрагмент luc2 обрабатывали эндонуклеазой рестрикции Nhe I. Лентивирусная конструкция рLVT-1 также была первоначально обработана эндонуклеазой рестрикции Sal I с достройкой «липких» концов ДНК-полимеразой I *E. coli* (Klenow fragment), а затем рестриктазой Nhe I. Продуктом лигирования вектора рLVT-1/Nhe I–Sal I* и фрагмента luc2/Nhe I–Not I* трансформировали клетки *E. coli* XL1-Blue по стандартной методике; рекомбинантные клоны скринировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с бактериальных колоний с использованием ген-специфических ПЦР-праймеров на ген luc2. Соответствие структуры ДНК-вставки рекомбинантных клонов последовательности гена luc2 подтверждали секвенированием.

Культивирование клеток. Использована клеточная линия мышины карциномы толстой кишки Colo 26. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 ЕД/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 4 мМ L-глутамин. Культивирование проводили во флаконах (25 см²) при 37°C и 5% CO₂. На каждом этапе пассирования клетки обрабатывали 0,25% раствором трипсина-ЭДТА. Субкультивирование выполняли через 2–3 сут по достижении культурой 80% конфлюентности. Подсчет клеток производили в камере Горяева.

Трансфекция и получение стабильной клеточной линии. Для получения стабильной линии меченых опухолевых клеток Colo 26–luc2 использовали технологию лентивирусной трансфекции. Для наработки лентивирусных частиц клетки линии НЕК 293Т с помощью кальций-фосфатного метода котрансфицировали смесью лентивирусных плазмид, включая вектор, несущий ген luc2. Полученными частицами инфицировали целевые клетки Colo 26.

Животные и опухолевые модели. Объектом исследования служили мыши линии BALB/c, самки массой 18–20 г. Животных содержали в условиях вивария с 12-часовым световым ритмом. Для оценки чувствительности биолюминесцентного имиджинга делали подкожные инъекции опухолевых клеток Colo 26-luc2 в количестве 25, 50, 100 и 200 клеток в 50 мкл фосфатно-солевого буфера на дорсальной стороне тела животного. Для получения модели первичной опухоли животным подкожно в область бедра вводили суспензию опухолевых клеток Colo 26-luc2 в концентрации 500 000 клеток в 100 мкл фосфатно-солевого буфера. Измерение размеров опухолевого узла проводили на 4-й и 7-й дни после инокуляции с помощью штангенциркуля. Для создания модели метастазирования меченые опухолевые клетки Colo 26-luc2 были инъецированы животным через хвостовую вену в количестве 75 000 клеток в 100 мкл фосфатно-солевого буфера. Умерщвление животных дислокацией шейных позвонков производили на 7-й день после подкожного введения опухолевых клеток и на 9-й день после внутривенной инъекции.

При проведении исследования неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.).

Биолюминесцентная визуализация. Биолюминесцентные изображения *in vivo* и *in vitro* получали на установке IVIS-Spectrum (Caliper Life Sciences, США). Для измерения биолюминесцентного сигнала *in vitro* клетки вносили в 96-луночный планшет в количестве 25 000 клеток на лунку с серией разведений 1:2, в трех повторностях. D-люциферин, растворенный в деионизированной воде, добавляли в концентрации 150 мкг/мл. Измерения проводили в динамике до тех пор, пока сигнал не выходил на плато. Для *in vivo* имиджинга животных предварительно наркотизировали 2% изофлураном. D-люциферин, растворенный в фосфатно-солевом буфере, вводили внутрибрюшинно в дозе 150 мг/кг. Изображения получали спустя 3 мин после введения субстрата серийно, каждые 2 мин, в течение 20 мин. У животных с моделью первичной опухоли *in vivo* имиджинг проводили на 4-й и 7-й дни после введения опухолевых клеток, у животных с моделью метастазирования — на 9-й день соответственно. У последних сразу после умерщвления выполняли анализ биолюминесценции во всех органах *ex vivo* с целью обнаружения метастазов. Сигнал биолюминесценции количественно обрабатывали в программе Living Image 4.2. Динамику изменения интенсивности биолюминесцентного сигнала первичной опухоли Colo 26-luc2 оценивали в процентном соотношении; для обработки данных использовали программу Microsoft Office Excel 2010.

Гистологическое исследование. Для получения гистологических препаратов подкожные опухоли и легкие с метастазами фиксировали в 10% нейтральном формалине, в дальнейшем готовили парафиновые срезы по стандартной методике с окраской гематоксилином и эозином. Патоморфологическую оценку опухолевой

ткани проводили при 100- и 400-кратном увеличении на световом микроскопе Leica DFC290 (Германия).

Результаты

Получение лентивирусной конструкции и создание стабильной клеточной линии Colo 26-luc2

В ходе молекулярного клонирования получен лентивирусный вектор, несущий ген оптимизированной люциферазы светляка luc2. В результате лентивирусной трансфекции создана линия опухолевых клеток Colo 26-luc2, стабильно экспрессирующая данный биолюминесцентный маркер. Клетки культивировали в несколько последовательных пассажей (более 20). При добавлении к клеткам субстрата D-люциферина отмечено, что культура сохраняет биолюминесцентные свойства в течение длительного периода времени. Также установлено, что клетки не теряют люциферазной активности после процедур замораживания/размораживания.

Определение чувствительности метода биолюминесцентного имиджинга на основе Colo 26-luc2

Для *in vitro* оценки зависимости между интенсивностью биолюминесцентного сигнала и количеством жизнеспособных клеток линии Colo 26-luc2 была приготовлена серия разведений клеточной суспензии в 96-луночном культуральном планшете. Установлено, что после добавления к клеткам субстрата D-люциферина на изображениях регистрируется биолюминесценция. Количественная оценка сигнала показала, что при увеличении числа клеток Colo 26-luc2 в лунке планшета сигнал линейно нарастает. Интенсивность свечения составила в среднем около 5000 фотон/с на клетку (рис. 1).

На следующем этапе выполнена *in vivo* оценка чувствительности системы на основе Colo 26-luc2. Клеточные суспензии в количестве 25, 50, 100 и 200 клеток в 50 мкл буфера были введены подкожно мышам линии BALB/c. Сразу после этого внутрибрюшинно вводили субстрат D-люциферин. Биолюминесцентный имиджинг *in vivo* показал, что минимальное количество клеток, которое можно визуализировать при подкожной локализации, составляет примерно 50 (рис. 2). Суммарная интенсивность биолюминесценции (TotalFlux) 50 клеток равнялась в среднем около 9600 фотон/с, 100 клеток — 15 100 фотон/с, 200 клеток — 80 000 фотон/с, что в среднем составляло 250 фотон/с на клетку. В случае подкожного введения 25 клеток Colo 26-luc2 биолюминесценция не регистрировалась. Таким образом, несмотря на ослабление сигнала кожей примерно в 20 раз, чувствительность биолюминесцентного имиджинга опухолевых клеток на основе оптимизированной люциферазы luc2 оказалась достаточно высока.

Биолюминесцентный имиджинг подкожной опухоли Colo 26-luc2

Наблюдение за опухолями Colo 26-luc2, привитыми подкожно мышам линии BALB/c, показало, что по скорости формирования они не отличались от немодифицированных опухолей Colo 26.

Биолюминесцентный имиджинг животных *in vivo* продемонстрировал возможность визуализации опухолевого узла на ранних сроках. Так, уже на 4-й день после подкожной инъекции клеток Colo 26-luc2 в об-

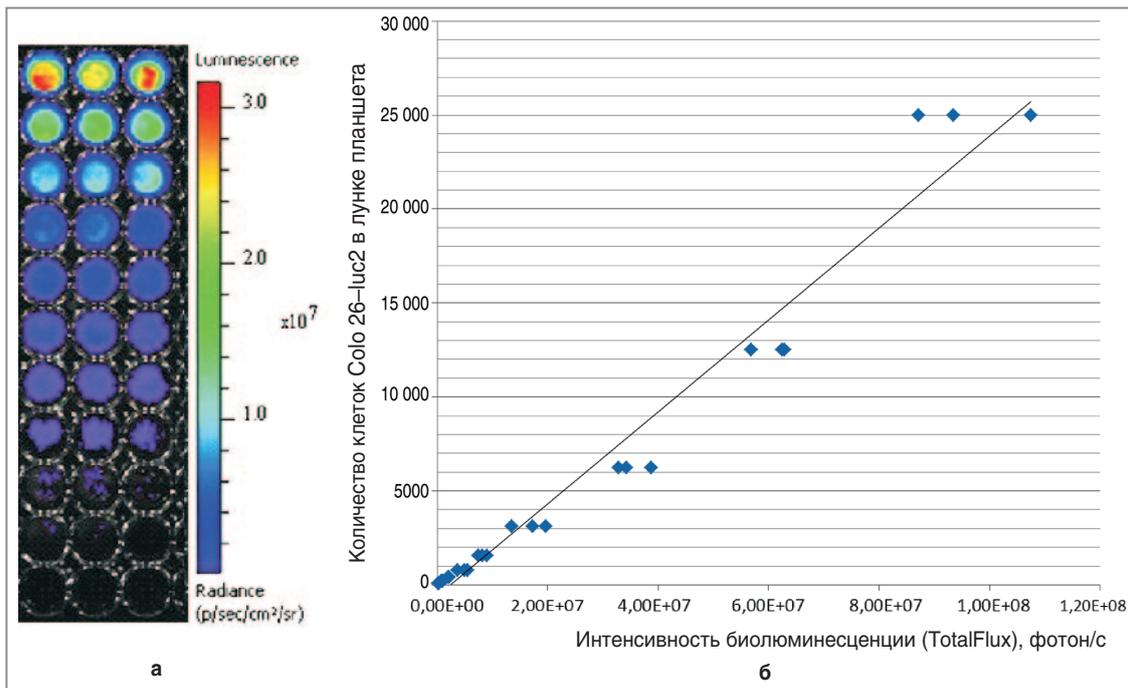


Рис. 1. Определение чувствительности метода билюминесцентного имиджинга на основе Colo 26-luc2 *in vitro*: а — билюминесцентное изображение планшета с опухолевыми клетками; б — зависимость интенсивности билюминесценции от количества меченых клеток. D-люциферин, 150 мкг/мл

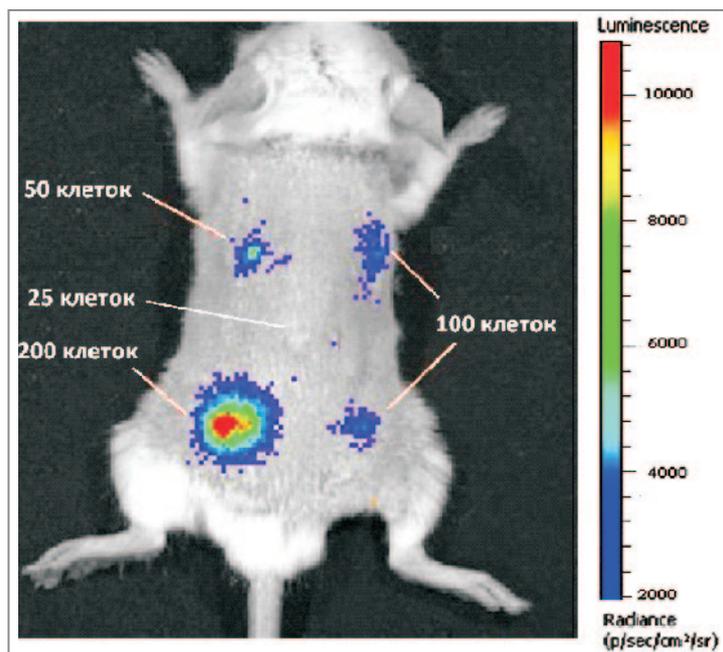
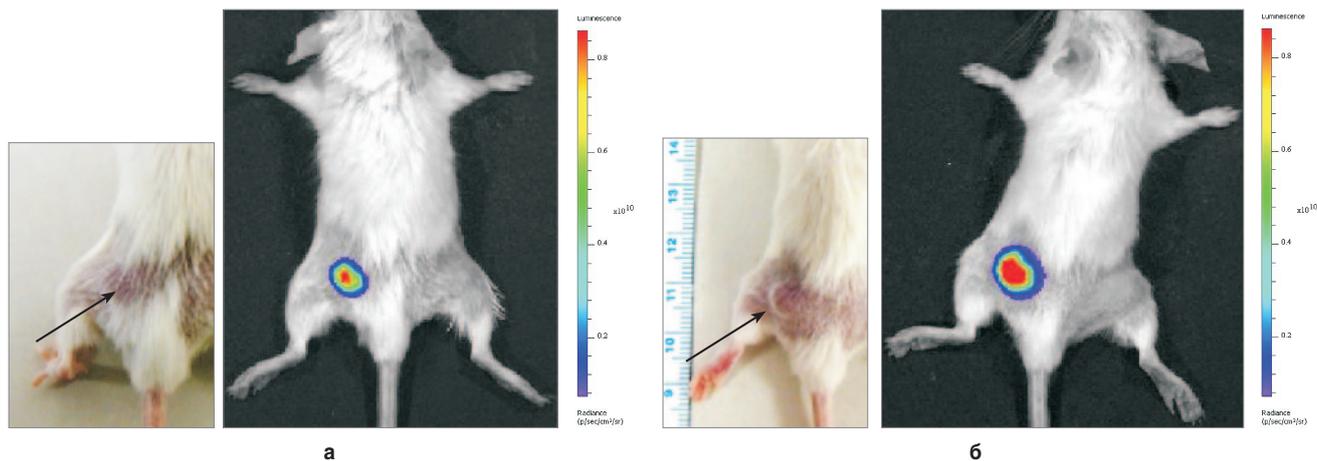


Рис. 2. Определение чувствительности метода билюминесцентного имиджинга на основе Colo 26-luc2 *in vivo*. Подкожные инъекции клеток Colo 26-luc2 в количестве 25, 50, 100 и 200. D-люциферин, 150 мг/кг, внутривенно

ласти бедра регистрировался интенсивный билюминесцентный сигнал, свидетельствующий о наличии живых опухолевых клеток, в то время как опухоль еще не пальпировалась. На 7-й день после инокуляции у животных образовался пальпируемый узел размером 9–10 мм³, а сигнал билюминесценции значительно вырос. Динамика изменения интенсивности билюминесцентного сигнала первичной опухоли Colo 26-luc2 показана на рис. 3.

График типичной кинетики изменения билюминесцентного сигнала в опухоли в течение 20 мин после внутривенного введения D-люциферина (рис. 4) показывает, что максимум билюминесценции опухоли достигался через 13 мин после введения субстрата и затем выходил на плато, что согласуется с доступными в литературе данными экспериментальных протоколов [14].

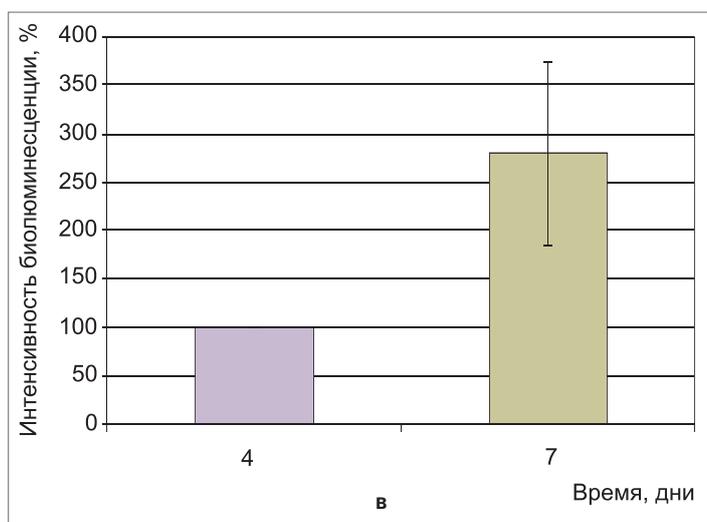
Гистологический анализ выявил, что опухоль Colo



а

б

Рис. 3. Биолуминесцентный имиджинг первичного опухолевого узла Colo 26–luc2: а — 4-й день после инокуляции; б — 7-й день после инокуляции (место формирования опухолевого узла на фотографиях мыши показано стрелками); в — рост биолуминесцентного сигнала с течением времени. D-люциферин, 150 мг/кг, внутривенно



в

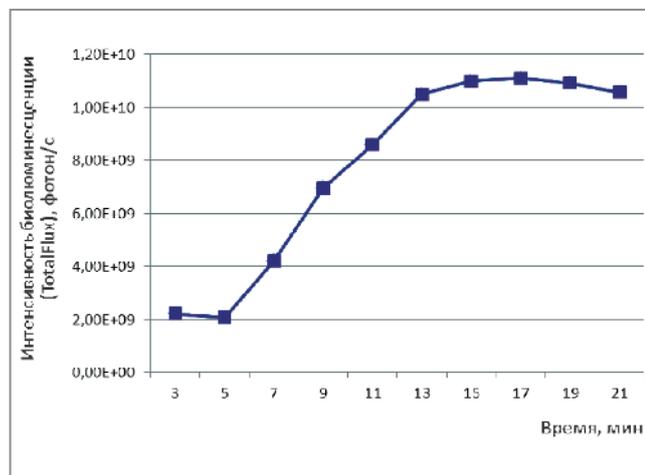


Рис. 4. Кинетика биолуминесцентной реакции *in vivo*. D-люциферин, 150 мг/кг, внутривенно

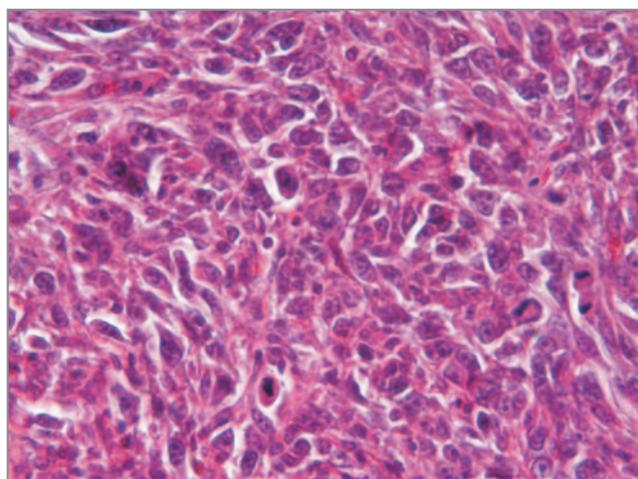


Рис. 5. Гистологический срез подкожной опухоли Colo 26–luc2. Окраска гематоксилином и эозином; х400

26–luc2 имеет типичную структуру (рис. 5). Она представлена плотной тканью с полиморфными клетками разной величины, содержащими крупные округлые или овальные ядра преимущественно с диффузным распределением хроматина и 1–2 ядрышками. Цитоплазма

клеток опухоли расположена в виде тонкого ободка вокруг ядер и имеет слабобазофильную реакцию. Опухолевые клетки образуют сплошные разрастания в виде комплексов и тяжей. Опухоль имеет хорошо развитую сосудистую сеть и бедна соединительной тка-

нию. Встречается много митозов. По мере роста узла образуются участки кровоизлияний и спонтанных некрозов.

Биолюминесцентный имиджинг метастазов опухоли Colo 26-luc2

Модель метастазирования была создана путем внутривенной инъекции опухолевых клеток Colo 26-luc2 мышам BALB/c. На 9-й день после инъекции опухолевых клеток осуществлен биолюминесцентный имиджинг животных *in vivo*. Съемку проводили в 4 позициях (дорсальная сторона, вентральная сторона, левый и правый бок). На всех изображениях регистрировался интенсивный биолюминесцентный сигнал в области грудной клетки (рис. 6). В этот же день проводили

оценку биолюминесценции изолированных органов *ex vivo*. Люминесцентный сигнал, указывающий на наличие метастазов, был обнаружен только в легких. При этом ввиду небольшого размера метастатических очагов при макроскопическом осмотре они не выявлялись (рис. 7).

При тщательном гистологическом анализе срезов легочной ткани в локализациях, соответствующих зонам биолюминесценции, были найдены единичные метастазы. Они представляли собой небольшие скопления клеток с признаками опухолевой ткани. Опухолевые клетки отличались атипичностью, имели базофильную окраску за счет гиперхромии ядер. Малый размер и неярко выраженная структурирован-

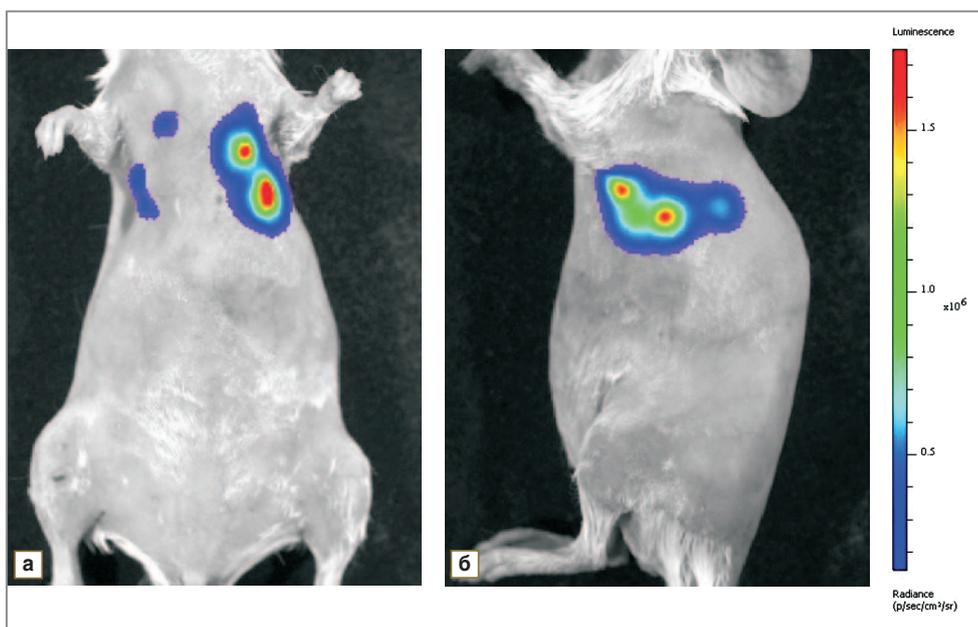


Рис. 6. Биолюминесцентный имиджинг метастазов Colo 26-luc2 в легких на 9-й день после внутривенного введения опухолевых клеток: а — вентральная сторона животного; б — вид сбоку. D-люциферин, 150 мг/кг, внутривенно

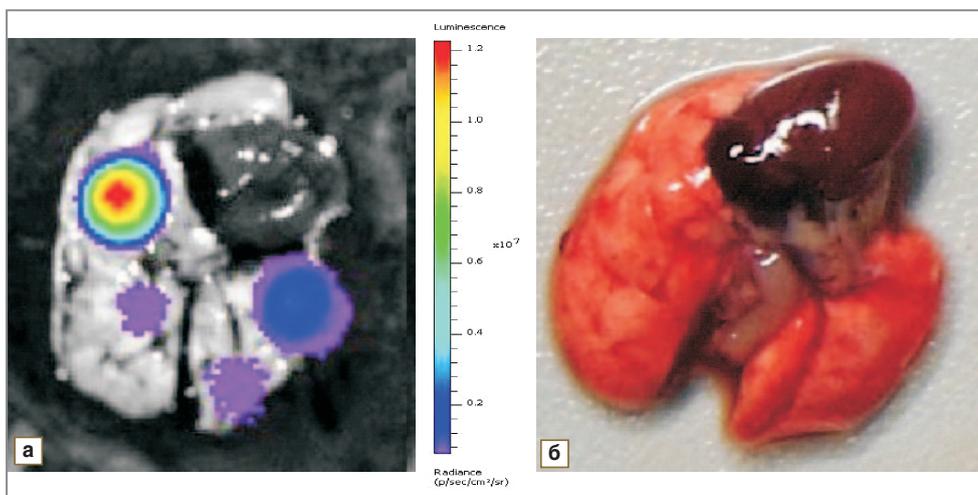


Рис. 7. Изолированные легкие мыши линии BALB/c на 9-й день после внутривенного введения клеток Colo 26-luc2: а — биолюминесцентный имиджинг *ex vivo*; б — фотография

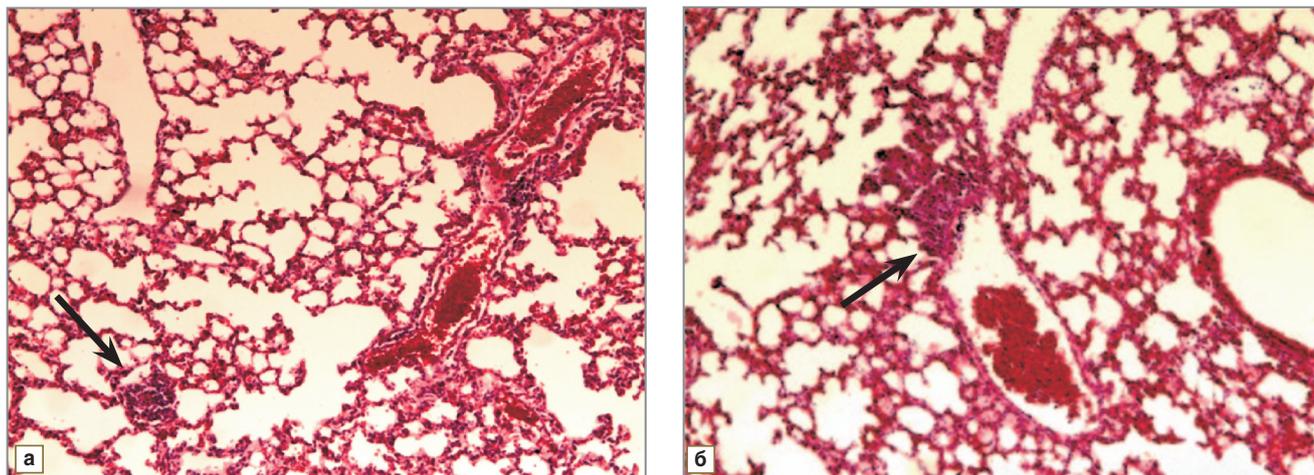


Рис. 8. Гистологические срезы легочной ткани с метастазами Colo 26–luc2: а — метастаз в правом легком; б — метастаз в левом легком (показаны стрелками). Окраска гематоксилином и эозином; $\times 100$

ность обнаруженных клеточных комплексов характеризуют крайне раннюю стадию формирования опухолевого узла (рис. 8).

Обсуждение. Благодаря развитию высокочувствительных систем визуализации и созданию ярких люциферин-люциферазных систем, биолюминесцентный имиджинг с недавнего времени используется для наблюдения опухолей и метастазов у мелких лабораторных животных [11, 12]. На сегодняшний день коммерчески доступны линии опухолевых клеток человека и животных, стабильно экспрессирующие биолюминесцентный маркер luc2, такие как карцинома простаты человека (метастазирующая) PC-3M-luc2, карцинома молочной железы мыши 4T1-luc2 и др. Тем не менее расширение арсенала маркированных опухолевых линий представляется чрезвычайно важным для экспериментальной онкологии [15, 16].

Результатом данной работы явилось создание линии карциномы толстой кишки мышей Colo 26–luc2. Выбор клеточной линии Colo 26 обусловлен ее широким использованием в предклинических испытаниях противоопухолевых препаратов, в разработке новых диагностических и терапевтических методов [17, 18]. Colo 26 обладает высоким метастатическим потенциалом и после внутривенного введения в хвостовую вену формирует метастазы, преимущественно в легких [19].

Культура клеток Colo 26–luc2 была получена путем лентивирусной трансфекции с использованием сконструированного нами лентивирусного вектора, несущего ДНК люциферазы luc2. Технология лентивирусной трансфекции служит эффективным приемом для получения стабильных клеточных линий. Использование лентивирусов позволяет встраивать интересующие гены в геном целевых клеток благодаря их способности управлять эффективной доставкой, интеграцией и экспрессией генов как *in vitro*, так и *in vivo* [20]. Все это обеспечивает стабильную экспрессию и наработку соответствующих белков в течение сколь угодно долгого времени.

Оценка люциферазной активности полученной культуры в условиях *in vitro* показала, что клетки адекватно реагируют на добавление субстрата и дают достаточно интенсивный стабильный сигнал. На животных *in vivo* установлено, что биолюминесцентный имиджинг с использованием оптимизированной люциферазы luc2 является высокочувствительным инструментом и позволяет детектировать малое число (порядка 50) подкожно введенных клеток. Для сравнения: минимальное количество клеток, меченных красным флуоресцентным белком TurboFP635 и регистрируемых с помощью поверхностного флуоресцентного имиджинга, равняется 90 000 [21].

На модели подкожно привитой опухоли Colo 26–luc2 показана возможность визуализации опухолевого узла уже на ранних стадиях. Методом гистологического анализа подтверждено, что введенные подкожно клетки Colo 26–luc2 формируют узел с опухолевой структурой, соответствующей по морфологии немодифицированной опухоли Colo 26 [22].

На сегодняшний день мониторинг роста опухоли по оптическим (флуоресцентным или биолюминесцентным) изображениям считается более объективным по сравнению с традиционным измерением с помощью штангенциркуля. В биолюминесцентном имиджинге размер опухоли оценивается по суммарному биолюминесцентному сигналу, выраженному в фотон/с, который пропорционален числу живых клеток, экспрессирующих люциферазу [23]. Возможность наблюдения живых клеток дает этому методу неоспоримые преимущества как перед флуоресцентной визуализацией, где погибшие клетки, содержащие флуоресцентный белок, сохраняют способность к свечению, так и перед оценкой объема опухоли по ее линейным размерам, вклад в который вносят некротизированная ткань и строма.

Успешное применение биолюминесцентного имиджинга *in vivo* для оценки опухолевого роста и ответа опухоли на лечение продемонстрировано в целом ряде работ [24–26]. В нашей работе зафиксировано увели-

чение интенсивности биолюминесцентного сигнала с ростом опухолевого узла.

Созданная нами опухолевая клеточная линия Colo 26-luc2 была апробирована для раннего наблюдения метастазов у экспериментальных животных. По данным литературы, при работе с моделью легочных метастазов Colo 26 их подсчет производится в среднем на 21-й день после инокуляции [27]. С помощью биолюминесценции единичные, малые по размеру метастатические очаги в легких удалось обнаружить уже на 9-й день после внутривенной инъекции опухолевых клеток. Исследования, проведенные нами ранее на линии Colo 26, меченной красным флуоресцентным белком KillerRed, показали, что обнаружение легочных метастазов по их флуоресценции затруднительно даже на поздних сроках роста (неопубликованные данные).

Заключение. Выполненная работа демонстрирует возможности биолюминесцентного имиджинга на основе оптимизированной люциферазы luc2 для прижизненной неинвазивной визуализации опухолевых процессов на уровне целого организма. Биолюминесцентный имиджинг с использованием клеточной линии Colo 26-luc2 обеспечивает не только качественную, но и высокочувствительную количественную *in vivo* оценку опухолевых клеток и позволяет выявлять метастазы на ранних стадиях их формирования. Полученная клеточная линия колоректального рака мышей Colo 26-luc2 и разработанные методики биолюминесцентной визуализации первичной опухоли и метастазов у мышей BALB/c представляют интерес для дальнейших экспериментальных исследований в онкологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (договор №11. G34.31.0017, соглашения 8269, 8303).

Авторы выражают благодарность профессору, д.б.н. Р.И. Якубовской (МНИОИ им. П.А. Герцена) за любезно предоставленную культуру клеток Colo 26, а также к.б.н. Т.В. Городничевой (ЗАО «Евроген») и к.б.н. Д.С. Щербо (ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН) за помощь в организации и проведении исследования.

Литература/References

1. Luker G.D., Luker K.E. Optical imaging: current applications and future directions. *J Nucl Med* 2008; 49(1): 1–4.
2. Close D.M., Patterson S.S., Ripp S., Baek S.J., Sanseverino J., Saylor G.S. Autonomous bioluminescent expression of the bacterial luciferase gene cassette (*lux*) in a mammalian cell line. *PLoS One* 2010; 5(8): 12441.
3. Greer L.F. 3rd, Szalay A.A. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence* 2002; 17(1): 43–74.
4. De Wet J.R., Wood K.V., DeLuca M., Helinski D.R., Subramani S. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 725–737.
5. Conti E., Franks N.P., Brick P. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* 1996; 4(2): 287–298.
6. Paguio A., Almond B., Fan F., Stecha P., Garvin D., Wood M., et al. pGL4 vectors: a new generation of luciferase reporter vectors. *Promega Notes* 2005; 89: 4.

7. Marques S.M., Esteves da Silva J.C. Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB Life* 2009; 61(1): 6–17.
8. Sato A., Klauenberg B., Tolwani R. In vivo bioluminescence imaging. *Comp Med* 2004; 54(6): 631–634.
9. Kim J.B., Urban K., Cochran E., Lee S., Ang A., Rice B., et al. Non-invasive detection of small number of bioluminescent cancer cells in vivo. *PLoS One* 2010; 5(2): 9364.
10. Hickson J., Ackler S., Klaubert D., Bouska J., Ellis P., Foster K., et al. Noninvasive molecular imaging of apoptosis in vivo using a modified firefly luciferase substrate, Z-DEVD-aminoluciferin. *Cell Death Differ* 2010; 17(6): 1003–1010.
11. Paroo Z., Bollinger R.A., Braasch D.A., Richer E., Corey D.R., Antich P.P., et al. Validating bioluminescence imaging as a high-throughput, quantitative modality for assessing tumor burden. *Mol Imaging* 2004; 3(2): 117–124.
12. Wetterwald A., van der Pluijm G., Que I., Sijmons B., Buijs J., Karperien M., et al. Optical imaging of cancer metastasis to bone marrow: a mouse model of minimal residual disease. *Am J Pathol* 2002; 160(3): 1143–1153.
13. Jenkins D.E., Oei Y., Hornig Y.S., Yu S.F., Dusich J., Purchio T., et al. Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20(8): 733–744.
14. Lim E., Modi K.D., Kim J. In vivo bioluminescent imaging of mammary tumors using IVIS spectrum. *J Vis Exp* 200; 26: 1210.
15. Wang K., Xie S., Ren Y., Xia H., Zhang X., He J. Establishment of a bioluminescent MDA-MB-231 cell line for human triple-negative breast cancer research. *Oncol Rep* 2012; 27(6): 1981–1989.
16. Kang M.R., Yang G., Charisse K., Epstein-Barash H., Manoharan M., Li L.C. An orthotopic bladder tumor model and the evaluation of intravesical saRNA treatment. *J Vis Exp* 2012; 28: 65.
17. Henderson B.W., Gollnick S.O., Snyder J.W., Busch T.M., Kousis P.C., Cheney R.T., et al. Choice of oxygen-conserving treatment regimen determines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. *Cancer Res* 2004; 64(6): 2120–2126.
18. Golab J., Wilczynski G., Zagozdzon R., Stokiosa T., Dabrowska A., Rybczycka J., et al. Potentiation of the anti-tumour effects of Photofrin-based photodynamic therapy by localized treatment with G-CSF. *Br J Cancer* 2000; 82(8): 1485–1491.
19. Tsuruo T., Yamori T., Naganuma K., Tsukagoshi S., Sakurai Y. Characterization of metastatic clones derived from a metastatic variant of mouse colon adenocarcinoma 26. *Cancer Res* 1983; 43(11): 5437–5442.
20. Klages N., Zufferey R., Trono D. A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors. *Mol Ther* 2000; 2: 170–176.
21. Мелешина А.В., Черкасова Е.И., Сергеева Е.А., Клешнин М.С., Турчин И.В., Киселева Е.В., Дашинимаев Э.В., Ширманова М.В., Лукьянов С.А., Загайнова Е.В. Исследование взаимодействия мезенхимных клеток и опухоли методами флуоресцентного биоимиджинга. *Соврем технол мед* 2012; 4: 7–16. Meleshina A.V., Cherkasova E.I., Sergeeva E.A., Kleshnin M.S., Turchin I.V., Kiseleva E.V., Dashinimaev E.V., Shirmanova M.V., Lukyanov S.A., Zagaynova E.V. Issledovanie vzaimodeystviya mezenkhimnykh kletok i opukholi metodami fluorestsentnogo bioimidzhinga [The study of the interaction of mesenchymal stem cells and the tumor using the methods of fluorescent bioimaging]. *Sovrem Tehnol Med — Modern Technologies in Medicine* 2012; 4: 7–16.
22. Ширманова М.В., Снопина Л.Б., Проданец Н.Н., Серебровская Е.О., Игнатова Н.И., Сергеева Е.А., Каменский В.А., Клементьева Н.В., Лукьянов К.А., Лукьянов С.А., Загайнова Е.В. Патоморфологическое исследование фототоксичности генетически-кодированного фотосенсибилизатора KillerRed на опухолях животных. *Соврем технол мед* 2013; 5(1): 6–13. Shirmanova M.V., Snopina L.B., Prodanets N.N., Serebrovskaya E.O., Ignatova N.I., Sergeeva E.A., Kamensky V.A., Klementyeva N.V., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A., Zagaynova E.V. Patomorfologicheskoe issledovanie fototoksichnosti

geneticheski-kodiruemogo fotosensibilizatora KillerRed na opukholyakh zivotnykh [Pathomorphological study of phototoxicity of genetically-encoded photosensitizer KillerRed on animal tumors]. *Sovrem Tehnol Med — Modern Technologies in Medicine* 2013; 5(1): 6–13.

23. Close D.M., Xu T., Sayler G.S., Ripp S. In vivo bioluminescent imaging (bli): noninvasive visualization and interrogation of biological processes in living animals. *Sensors (Basel)* 2011; 11(1): 180–206.

24. Riedel S.S., Mottok A., Brede C., Bäuerlein C.A., Jordán Garrote A.L., Ritz M., et al. Non-invasive imaging provides spatiotemporal information on disease progression and response to therapy in a murine model of multiple myeloma. *PLoS One* 2012; 7(12): 52398.

25. Burkhardt J.K., Hofstetter C.P., Santillan A., Shin B.J., Foley C.P., Ballon D.J., et al. Orthotopic glioblastoma stem-like cell xenograft model in mice to evaluate intra-arterial delivery of bevacizumab: from bedside to bench. *J Clin Neurosci* 2012; 19(11): 1568–1572.

26. Poeschinger T., Renner A., Weber T., Scheuer W. Bioluminescence imaging correlates with tumor serum marker, organ weights, histology, and human DNA levels during treatment of orthotopic tumor xenografts with antibodies. *Mol Imaging Biol* 2011; 13(1): 28–39.

27. Ramani P., Hart I.R., Balkwill F.R. The effect of interferon on experimental metastases in immunocompetent and immunodeficient mice. *Int J Cancer* 1986; 37(4): 563–568.