

# ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОТОКСИЧНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМОГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА KillerRed НА ОПУХОЛЯХ ЖИВОТНЫХ

УДК 616.001.6–006.6–092:575  
Поступила 24.10.2012 г.



**М.В. Ширманова**, к.б.н., старший научный сотрудник проблемной научной группы биофотоники НИИ ПФМ<sup>1</sup>;  
**Л.Б. Снопва**, д.б.н., зав. отделом морфологии ЦНИЛ НИИ ПФМ<sup>1</sup>;  
**Н.Н. Проданец**, к.б.н., старший научный сотрудник отдела морфологии ЦНИЛ НИИ ПФМ<sup>1</sup>;  
**Е.О. Серебровская**, к.б.н., научный сотрудник<sup>2</sup>;  
**Н.И. Игнатова**, к.б.н., ассистент кафедры микробиологии и иммунологии<sup>1</sup>;  
**Е.А. Сергеева**, к.ф.-м.н., старший научный сотрудник<sup>2</sup>;  
**В.А. Каменский**, д.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник<sup>2</sup>;  
**Н.В. Клементьева**, аспирант, младший научный сотрудник проблемной научной группы биофотоники НИИ ПФМ<sup>1</sup>;  
**К.А. Лукьянов**, д.б.н., член-корреспондент РАН, зав. лабораторией биофотоники<sup>2</sup>;  
**С.А. Лукьянов**, д.б.н., академик РАН, зав. лабораторией молекулярных технологий<sup>2</sup>; зав. лабораторией флуоресцентного биоимиджинга<sup>1</sup>;  
**Е.В. Загайнова**, д.м.н., зам. директора по науке НИИ ПФМ<sup>1</sup>; зав. кафедрой биомедицины<sup>4</sup>

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

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

<sup>3</sup>Институт прикладной физики РАН, Н. Новгород, 603155, ул. Ульянова, 46;

<sup>4</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского — Национальный исследовательский университет, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23

Изучение фототоксических эффектов KillerRed в экспериментальных опухолях позволяет понять механизмы действия генетически-кодированных фотосенсибилизаторов и выбрать направления развития метода фотодинамической терапии (ФДТ).

**Цель исследования** — изучение патоморфологических особенностей действия белка KillerRed на опухоли животных при режимах лазерного воздействия, близких к используемым при фотодинамической терапии с химически синтезированными фотосенсибилизаторами.

**Материалы и методы.** Работа выполнена на иммунодефицитных мышах *nude* с привитой подкожно опухолью HeLa (рак шейки матки человека). Опухолевые клетки стабильно экспрессировали генетически-кодированный фотосенсибилизатор KillerRed в хроматине (KillerRed-H2B). Контролем служили опухоли HeLa без KillerRed. Наблюдение за ростом опухолей и изменением интенсивности флуоресценции в процессе облучения проводили *in vivo* методом поверхностного флуоресцентного имиджинга на установке IVIS-Spectrum (Caliper Life Sciences, США). Лазерное облучение опухолей выполняли на длине волны 593 нм при плотности энергии 180 Дж/см<sup>2</sup> троекратно через день. Через 24 ч опухоли исследовались с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии и подвергались гистологическому анализу.

**Результаты.** Методами флуоресцентного имиджинга *in vivo* и *ex vivo* после лазерного облучения опухолей обнаружено выгорание белка KillerRed, что являлось критерием правильно выбранного режима воздействия и свидетельствовало о протекании фотодинамической реакции. В остром периоде после облучения в опухолях, экспрессирующих KillerRed, выявлены признаки деструкции ткани. Наряду с умеренными, обратимыми дистрофическими изменениями, такими как увеличение или уменьшение размеров клеток и вакуолизация цитоплазмы, в большинстве клеток обнаружены необратимые признаки повреждения — нарушение целостности клеточных и ядерных оболочек.

Для контактов: Ширманова Марина Вадимовна, тел. раб. 8(831)465-41-13, тел. моб. +7 904-044-05-65; e-mail: Shirmanovam@mail.ru

Выполненное исследование впервые показывает принципиальную возможность фотоповреждения опухоли с помощью фототоксичного белка KillerRed при лазерном воздействии в режиме фотодинамической терапии.

**Ключевые слова:** генетически-кодируемый фотосенсибилизатор; KillerRed; фотодинамическая терапия; ФДТ; опухолевая модель; патоморфология.

## English

## Pathomorphological Study of Phototoxicity of Genetically-Encoded Photosensitizer KillerRed on Animal Tumors

**M.V. Shirmanova**, PhD, Senior Research Worker, Problem Scientific Group of Biophotonics, Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine<sup>1</sup>;

**L.B. Snopova**, D.Bio.Sc., Head of the Morphology Department, Central Scientific Research Laboratory of Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine<sup>1</sup>;

**N.N. Prodanets**, PhD, Senior Research Worker, the Morphology Department, Central Scientific Research Laboratory of Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine<sup>1</sup>;

**E.O. Serebrovskaya**, PhD, Research Worker<sup>2</sup>;

**N.I. Ignatova**, PhD, Tutor, the Department of Microbiology and Immunology<sup>1</sup>;

**E.A. Sergeeva**, PhD, Senior Research Worker<sup>3</sup>;

**V.A. Kamensky**, D.Ph.-Mat.Sc., Leading Research Worker<sup>3</sup>;

**N.V. Klementyeva**, Postgraduate, Junior Research Worker of Problem Scientific Group of Biophotonics, Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine<sup>1</sup>;

**K.A. Lukyanov**, D.Bio.Sc., corresponding member of Russian Academy of Sciences, Head of the Biophotonics Laboratory<sup>2</sup>;

**S.A. Lukyanov**, D.Bio.Sc., Academician of Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Molecular Technologies<sup>2</sup>; Head of the Laboratory of Fluorescent Bioimaging<sup>1</sup>;

**E.V. Zagaynova**, D.Med.Sc., Deputy Director of Science, Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine<sup>1</sup>; Head of the Department of Biomedicine<sup>4</sup>

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

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

<sup>3</sup>Institute of Applied Physics of Russian Academy of Sciences, Ul'yanova St., 46, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603155;

<sup>4</sup>Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky — National Research University, Gagarin Avenue, 23, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950

The study of phototoxic effects of KillerRed in experimental tumors enables to understand the mechanisms of action of genetically-encoded photosensitizers and choose the directions for photodynamic therapy (PDT) development.

**The aim of the investigation** was to study pathomorphological characteristics of the protein KillerRed effect on animal tumors in laser exposure modes close to those used in photodynamic therapy with chemically synthesized photosensitizers.

**Materials and Methods.** The study was carried out on immunodeficient *nude* mice with subcutaneously implanted tumor HeLa (human cervical cancer). Tumor cells stably expressed genetically-encoded photosensitizer KillerRed in chromatin (KillerRed-H2B). Control tumors were HeLa tumors without KillerRed. Tumor growth and fluorescence intensity change were observed in the process of radiation *in vivo* using fluorescence imaging on IVIS-Spectrum Sistem (Caliper Life Sciences, USA). Tumors were exposed to laser radiation at wavelength of 593 nm, with fluence of 180 J/cm<sup>2</sup> three times every other day. 24 h after treatment the tumors were studied using confocal fluorescence microscopy and were analyzed histologically.

**Results.** Fluorescence imaging techniques *in vivo* and *ex vivo* after laser treatment of the tumors revealed the bleaching of KillerRed that was the criterion for selection of treatment regimen, and indicated photodynamic reaction. In acute post-irradiation period the tumors expressing KillerRed were found to have signs of tissue destruction. Along with moderate, reversible dystrophic changes such as enlargement and reduction in cell size and cytoplasm vacuolization, irreversible damage signs were revealed in most cells — damage of cell and nuclear membrane integrity.

The performed study showed for the first time the possibility in principle of tumor photodamage using phototoxic protein KillerRed in laser exposure in photodynamic therapy regimen.

**Key words:** genetically-encoded photosensitizer; KillerRed; photodynamic therapy; PDT; tumor xenograft; pathomorphology.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) — метод лечения опухолей, основанный на способности фоточувствительных веществ — фотосенсибилизаторов — при локальном воздействии лазерного облучения генери-

ровать активные формы кислорода, которые вызывают гибель опухолевых клеток. Эффективность метода ФДТ убедительно доказана в лечении небольших поверхностных опухолей различной локализации, в част-

ности рака кожи, мочевого пузыря, бронхов, вульвы, ранних стадий рака легких, шейки матки, пищевода Баррета, желчных протоков [1–3]. Показано, что ФДТ может использоваться интерстициально при раке простаты, опухлях головного мозга, карциноматозе брюшины [4, 5].

Традиционно фотосенсибилизаторами служат порфириновые соединения, которые экзогенно вводятся в организм и избирательно накапливаются в опухоли в силу ее структурно-функциональных особенностей [6, 7]. Однако избирательность накопления порфириновых фотосенсибилизаторов в опухолях достаточно низкая [8, 9]. Неспецифическое поступление фотосенсибилизатора в нормальные ткани приводит к серьезным побочным эффектам в виде фототоксичности в коже и слизистых оболочках, а неравномерное распределение и перераспределение фоточувствительного вещества в опухоли создает сложности в дозиметрии.

Противоопухолевый эффект ФДТ с химическими фотосенсибилизаторами основан на трех механизмах: 1) прямое фототоксическое поражение опухолевых клеток; 2) повреждение сосудов; 3) активация неспецифического иммунного ответа [10]. Относительный вклад каждого из них зависит от многих факторов: химической природы фотосенсибилизатора, его локализации в опухоли, степени васкуляризации и содержания макрофагов в опухоли, времени от введения фотосенсибилизатора до облучения. Преобладания клеточного механизма следует ожидать при высоком содержании фотосенсибилизатора в опухолевых клетках. Субклеточная локализация его во многом определяет путь клеточной гибели (апоптоз или некроз) и зависит главным образом от его физико-химических свойств [11, 12]. Показано, что фотосенсибилизаторы, локализованные в митохондриях, индуцируют апоптотическую гибель клетки в отличие от сенсбилизаторов, находящихся в лизосомах или плазматических мембранах [13]. Однако на практике основную роль в противоопухолевом действии химически синтезированных фотосенсибилизаторов играют сосудистые повреждения (сосудистый стаз и тромбоз, кровоизлияния), приводящие к нарушению питания опухоли и ее некрозу [14]. Часть клеток опухоли при этом может оставаться жизнеспособной, что иногда вызывает рецидив злокачественного новообразования.

Все сказанное обуславливает актуальность поиска новых фотосенсибилизаторов с принципиально иными механизмами действия и разработки новых подходов к ФДТ опухолей.

Перспективным решением в данной области могут стать генетически-кодируемые фотосенсибилизаторы. Появление идеи использования этих фотосенсибилизаторов вызвано интенсивным развитием генной инженерии в последние годы и недавним открытием фототоксичного белка KillerRed. Идея заключается в том, что опухолевая клетка несет ген, отвечающий за синтез фотоактивного соединения, и в результате сама вырабатывает фотосенсибилизатор в заданном компартменте.

Первый генетически-кодируемый фотосенсибилизатор KillerRed создан в 2006 г. в лаборатории С.А. Лукьянова (ИБХ РАН, Россия). Он представляет собой красный флуоресцентный GFP-подобный белок с димерной структурой [15]. Длина полипептидной цепи составляет 239 аминокислот, молекулярная масса — 27 кДа. Максимум возбуждения находится при длине волны 585 нм, максимум эмиссии — при 610 нм. Коэффициент молярной экстинкции —  $45\,000 \text{ моль}^{-1}\text{см}^{-1}$ . Квантовый выход флуоресценции — 0,25. Характерными особенностями структуры данного белка, ответственными за фототоксичность, являются заполненный молекулами воды канал, который идет от торцевого конца  $\beta$ -бочонка и достигает области хромофора, пóra в боковой стенке  $\beta$ -бочонка и наличие аминокислотных остатков Glu<sup>68</sup> и Ser<sup>119</sup> рядом с хромофором [16]. Предположительно фототоксическое действие белка реализуется через реакции фотосенсибилизации I типа [17].

К настоящему времени цитотоксичность белка KillerRed показана в основном на культурах опухолевых и бактериальных клеток [15, 18]. Клетки, трансфицированные геном этого белка и экспрессирующие его в том или ином компартменте, при облучении светом погибали. При этом путь клеточной гибели определялся локализацией белка. Так, при митохондриальной локализации облучение клеток приводило к апоптозу, а при мембранной — преимущественно к некрозу [15, 18]. Химерный белок, включающий в себя гистон H2B и KillerRed, вызывал остановку клеточных делений после облучения [19]. Фототоксичность KillerRed, локализованного в цитоплазме, была слабой.

**Цель исследования** — изучение патоморфологических особенностей действия белка KillerRed на опухоли животных при режимах лазерного воздействия, близких к используемым при фотодинамической терапии с химически синтезированными фотосенсибилизаторами.

**Материалы и методы.** Работа выполнялась в лаборатории флуоресцентного биоимиджинга НИИ ПФМ НижГМА. Использован белок KillerRed, локализованный в хроматине (KillerRed-H2B), поскольку ядро клетки считается наиболее уязвимой клеточной мишенью.

**Клеточные линии.** Эксперименты проводили с использованием клеточной линии рака шейки матки человека HeLa Kyoto, стабильно экспрессирующей гистон H2B, слитый с двумя копиями белка KillerRed (KillerRed-H2B) [19], и немодифицированной линии HeLa Kyoto. Для культивирования клеток применяли среду DMEM, содержащую глутамин (1%), 10% телячьей сыворотки, пенициллин-стрептомицин (50 мкг/мл). Культивирование проводили во флаконах (25 см<sup>2</sup>) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37°C и влажности 85%. Снятие клеток осуществляли при помощи раствора трипсин-ЭДТА (25%) в течение 10 мин. Субкультивирование проводили дважды в неделю по достижении монослоем конfluence 70%.

**Животные и опухолевая модель.** Объектом исследования служили самки иммунодефицитных мышей

*nude* массой 18–20 г. Животных содержали в условиях SPF-вивария с 12-часовым световым ритмом.

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.).

Для получения опухолевой модели мышам подкожно вкалывали по 2 млн клеток HeLa в 200 мкл натрий-фосфатного буфера. С целью предварительного изучения динамики роста KillerRed-экспрессирующей опухоли и ее флюоресценции трем животным было привито по одной опухоли на левое бедро. Для исследования фототоксичности белка KillerRed опухоли прививались на оба бедра. Группы с белком и без белка включали по 4 животных. Размер опухолей измеряли 3 раза в неделю с помощью штангенциркуля по двум взаимно перпендикулярным направлениям. Объем опухолей рассчитывали по формуле:  $V=a \cdot b \cdot b/2$ , где  $a$  — длина;  $b$  — ширина опухолевого узла.

**Флюоресцентный биоимиджинг.** Наблюдение за ростом опухолей, экспрессирующих белок KillerRed, и изменении интенсивности флюоресценции в процессе облучения проводили *in vivo* методом поверхностного флюоресцентного имиджинга на установке IVIS-Spectrum (Caliper Life Sciences, США). Флюоресценцию возбуждали на длине волны 570 нм, принимали в диапазоне 610–630 нм при экспозиции 5 с. На время процедуры получения изображений животных наркотизировали 2% изофлураном. При количественном анализе сигнала флюоресценции в программе LivingImage определяли суммарную интенсивность флюоресценции опухоли и усредненную по ее площади. Изображения получали непосредственно после прививки опухолевых клеток и далее раз в 2–3 дня до 27-го дня роста.

**Фотодинамическая терапия.** Лазерное воздействие на опухоли начинали с 13-го дня после прививки, когда размер опухолевого узла составлял порядка 3–4 мм. Облучение проводили лазером MGL-III-593 (CNI, Китай) с длиной волны 593 нм при плотности энергии 180 Дж/см<sup>2</sup> (150 мВт/см<sup>2</sup>, 20 мин) троекратно через день. Лазерное излучение направляли перпендикулярно к поверхности опухоли. Мощность лазера контролировали перед каждым облучением с помощью измерителя PM100A (Thorlabs, Германия). Диаметр светового пятна составлял 7–8 мм. На время процедуры животное фиксировали на подложке. До и после облучения измеряли поверхностную температуру опухолей с помощью компактного ИК-термографа «СЕМ-Термодиагностикс» («СЕМ-Технологии», Россия). У каждого животного облучали одну из опухолей, вторая служила контролем, поскольку животные были иммунодефицитные. Через 24 ч после окончания ФДТ образцы опухолей исследовались с помощью конфокальной флюоресцентной микроскопии и подвергались гистологическому анализу.

**Гистологическое исследование.** Для получения гистологических препаратов опухоли фиксировали в

10% нейтральном формалине, по общепринятой методике изготавливали парафиновые срезы толщиной 5–7 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином. Морфометрическую оценку структурных изменений клеток проводили при 400-кратном увеличении микроскопа. В каждом образце опухоли выполняли подсчет типичных опухолевых клеток и клеток с признаками дистрофических изменений и апоптоза в 8–18 полях зрения с площадью одного поля 0,01 мм<sup>2</sup>.

**Конфокальная флюоресцентная микроскопия.** Образцы опухолей *ex vivo* с белком KillerRed сразу после извлечения исследовались на установке для лазерной сканирующей микроскопии LSM 510 META 23 на основе моторизованного инвертированного микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия). Конфокальные изображения были получены с помощью масляно-иммерсионного объектива с увеличением 63. Регистрация флюоресценции осуществлялась в диапазоне 597–661 нм при однофотонном возбуждении аргоновым лазером на длине волны 543 нм.

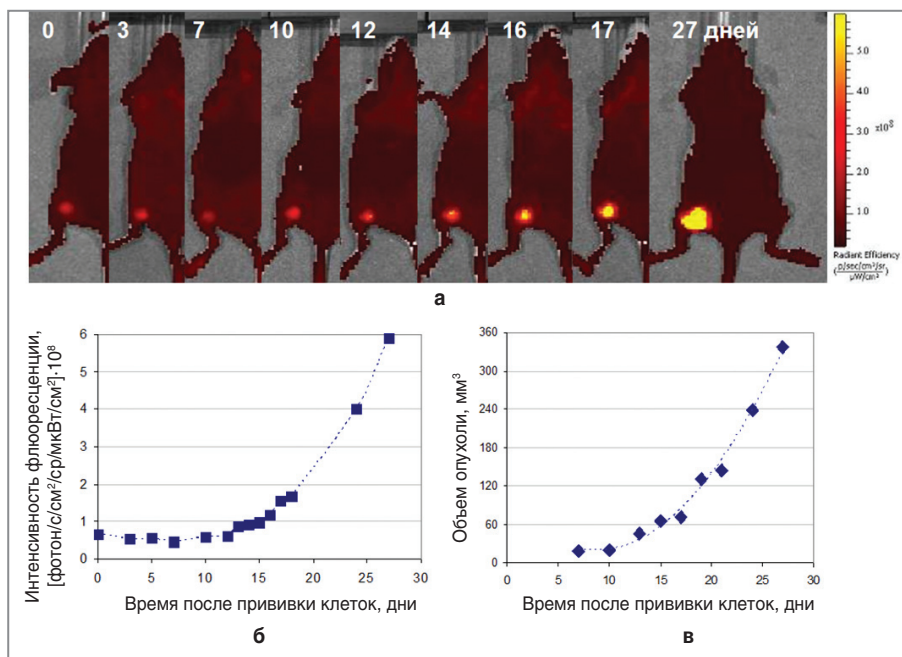
**Статистическая обработка.** Обработка результатов проводилась с помощью программ Microsoft Excel 2007 и Statistica 6.0 с вычислением средних значений ( $M$ ), стандартных отклонений ( $\sigma$ ), статистической значимости различий значений ( $t$ -тест Стьюдента) и коэффициента корреляции Пирсона.

#### Результаты.

**Флюоресцентное наблюдение за опухолями с белком KillerRed в процессе роста и лазерного облучения.** Предварительно до начала облучения выполнено *in vivo* наблюдение за ростом опухолей, экспрессирующих белок KillerRed, методом поверхностного флюоресцентного имиджинга. На рис. 1 представлена типичная динамика роста флюоресцирующей опухоли HeLa, не подвергавшейся облучению. На месте инъекции опухолевых клеток видна зона флюоресценции, интенсивность сигнала которой в течение первой недели незначительно снижается. На 10-й день формируется опухолевый узел, и с данного момента интенсивность флюоресценции в этой области нарастает. На месте инъекции в это время пальпируется неоднородность размером порядка 2,0–2,5 мм, однако точное определение ее объема затруднительно. С течением времени флюоресценция и объем опухоли увеличиваются. Выявлена высокая корреляция между объемом опухоли и суммарной интенсивностью ее флюоресценции ( $r=0,99$ ). Таким образом, установлено, что опухолевые клетки экспрессируют флюоресцентный белок стабильно, на протяжении всего периода роста опухолевого узла.

Известно, что выгорание фотосенсибилизатора сопровождается фотодинамической реакцией, поэтому наблюдение этого феномена служит важным показателем при оценке адекватности режима ФДТ [20].

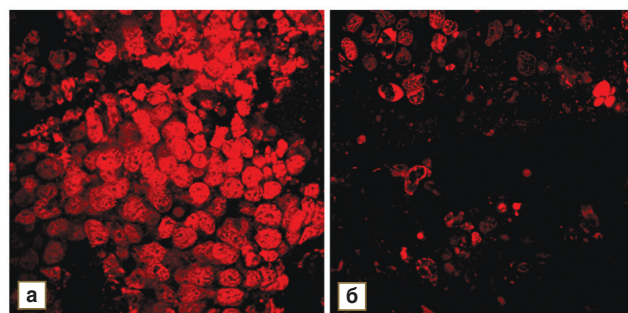
Когда размер опухоли достигал 3–4 мм (на 13-й день роста), начинали лазерное облучение в режиме 3 раза через день. До и после каждого облучения получали флюоресцентные изображения *in vivo*. Параметры лазерного воздействия были подобраны таким образом, что облучение опухолей приводило к выгоранию белка



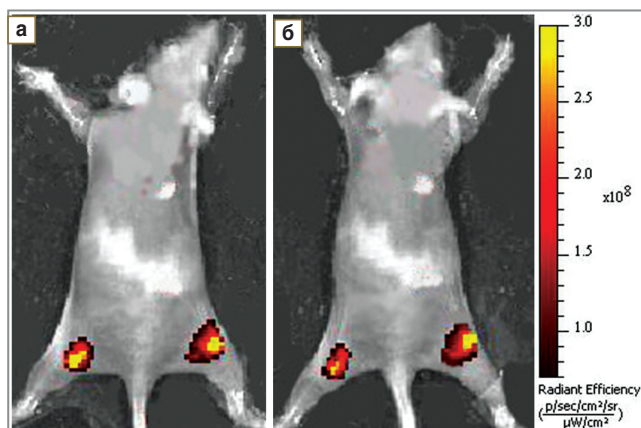
**Рис. 1.** Рост опухоли HeLa, экспрессирующей KillerRed-H2B: *а* — флуоресцентный имиджинг *in vivo*; *б* — изменение суммарной интенсивности флуоресценции опухоли, измеренной по представленным изображениям; *в* — изменение объема опухоли

KillerRed (это проявлялось в виде снижения флуоресценции опухоли на изображении) и не вызывало нагрева ткани (рис. 2). В результате анализа флуоресценции опухолей *in vivo* обнаружено, что сразу после лазерного воздействия интенсивность сигнала уменьшалась на  $25,6 \pm 4,9\%$  по сравнению со значением до облучения. Пониженный уровень сигнала флуоресценции в опухолях сохранялся на протяжении последующих 2–4 ч. Затем интенсивность сигнала постепенно возрастала, в некоторых случаях достигая исходного значения (до облучения) к 24 ч, что, вероятно, связано с наработкой новых молекул белка в опухолевых клетках.

Конфокальная флуоресцентная микроскопия образцов опухолей *ex vivo* также показала выгорание флуоресцентного белка. В опухолях с белком KillerRed, не подвергавшихся облучению, идентифицировалась



**Рис. 3.** Результаты конфокальной флуоресцентной микроскопии опухолей *ex vivo*. Флуоресцентные изображения KillerRed-H2B-экспрессирующих опухолей: *а* — контроль без облучения; *б* — опухоль сразу после облучения (593 нм, 150 мВт/см², 20 мин). Возбуждение на длине волны 543 нм, регистрация сигнала в диапазоне 597–661 нм. Размер изображений — 200х200 мкм



**Рис. 2.** Флуоресцентные изображения *in vivo* мыши *nude* с опухолями, экспрессирующими KillerRed-H2B: *а* — до облучения; *б* — сразу после облучения (593 нм, 150 мВт/см², 20 мин). Облучению подвергалась опухоль слева. Средняя интенсивность флуоресценции опухоли до облучения составляла  $1 \cdot 10^8$  ед., после —  $8 \cdot 10^7$  ед.

интенсивная флуоресценция в ядрах опухолевых клеток, где экспрессируется KillerRed (рис. 3, *а*). После ФДТ флуоресценция опухолевой ткани значительно снижалась и свечение белка наблюдалось лишь в единичных клетках (рис. 3, *б*). Флуоресценция эндогенных флуорофоров в опухолевой ткани при используемых параметрах возбуждения и регистрации сигнала была слабой по сравнению с флуоресценцией KillerRed и на флуоресцентных изображениях не видна.

**Патоморфологические эффекты ФДТ с белком KillerRed.** При гистологическом исследовании ткани контрольных опухолей без белка и без облучения выявлено, что опухоль состоит из полиморфных клеток с округлыми или овальными крупными ядрами, преимущественно с диффузным мелкодисперсным распределением хроматина (рис. 4, *а*). В ядрах определяются 1–2 ядрышка. Цитоплазма клеток располагается вокруг ядра в виде тонкого ободка и имеет слабобазофильную реакцию. Клетки опухоли образуют комплексы, окру-

женные тонкими прослойками соединительной ткани, в которых проходят тонкостенные сосуды небольшого калибра. Васкуляризация опухоли слабо выражена. Среднее число клеток в поле зрения составляет 70,8, из них 82,8% — типичные опухолевые клетки (см. таблицу). В то же время клеточная популяция опухоли обладала гетерогенностью, что проявлялось в наличии клеток опухоли с признаками дистрофических изменений разной степени выраженности. В ткани опухоли наблюдались клетки с вакуолизацией цитоплазмы, отеком ядра или, напротив, с мелкими гиперхромными ядрами неправильной формы. Такие клетки в контрольной группе составляли 9,3%. Число клеток с конденсацией хроматина, фрагментацией ядер и цитоплазмы, ее выраженной эозинофилией (что является морфологическими признаками апоптоза) составляло 7,0%.

В контрольной группе опухолей без белка с облучением не выявлено значительных изменений структуры (рис. 4, б). Ткань опухолевого узла оставалась плотной, отмечено лишь небольшое увеличение доли дистрофически измененных клеток до 16,0% (см. таблицу). При этом дистрофические изменения были представлены в основном вакуолизированной цитоплазмой, что не критично для жизнедеятельности клетки. Характерно, что среднее число клеток в поле зрения уменьшилось до 51,1 за счет увеличения их размеров. Предположительно обнаруженные эффекты лазерного воздействия на опухоль без KillerRed обусловлены фотоактивацией эндогенных хромофоров, а не термическим действием лазера, поскольку нагрев ткани опухоли был незначителен и составлял порядка 1,2°C.

Структура опухолей, экспрессирующих белок KillerRed, но не подвергавшихся облучению, при микроскопическом обследовании отличалась от опухолей без белка более выраженными дистрофическими изменениями (рис. 4, в). Отмечено наличие большего по сравнению с интактным контролем числа клеток с вакуолизированной цитоплазмой и полиморфизмом ядра. Доля дистрофически измененных клеток составляла 15,5%. При этом в среднем в поле зрения насчитывалось 48,6 клеток. Наблюдаемые изменения могут быть обусловлены как собственной токсичностью белка, локализо-

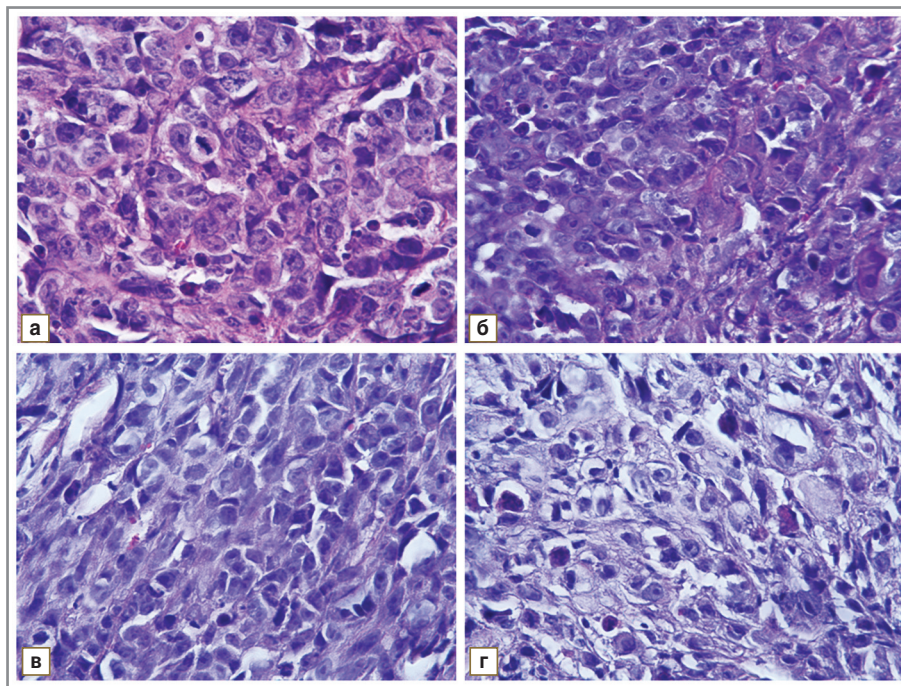


Рис. 4. Гистологические изображения опухолевой ткани: а — без KillerRed и без облучения; б — без KillerRed с облучением; в — с KillerRed без облучения; г — с KillerRed и облучением. Окраска — гематоксилином и эозином; х400. Размер изображений — 170х230 мкм

#### Морфометрический анализ клеточного состава опухолевой ткани (M±σ)

Клетки	Без KillerRed		С KillerRed	
	без облучения	с облучением	без облучения	с облучением
Типичные опухолевые, %	82,8±3,3	76,0±0,3 <sup>#</sup>	77,8±1,2	36,1±9,8*
Измененные опухолевые, %	16,3±2,9	22,6±0,3 <sup>#</sup>	21,7±1,0 <sup>#</sup>	63,7±9,8*
Дистрофически измененные, %	9,3±0,5	16,0±2,6 <sup>#</sup>	15,5±0,3 <sup>#</sup>	58,8±9,9*
С признаками апоптоза, %	7,0±2,9	6,7±2,3	6,2±0,7	4,8±2,4
Число клеток в одном поле зрения	70,8±10,0	51,1±11,2	48,6±8,0	35,0±9,9 <sup>#</sup>

\* — различия значений статистически значимы по отношению ко всем группам ( $p \leq 0,05$ );

<sup>#</sup> — по отношению к группе без KillerRed и без облучения ( $p \leq 0,05$ ).

ванного в хроматине, так и его фотоактивацией дневным светом.

Лазерное воздействие на опухоли, содержащие KillerRed, приводило к значительным качественным и количественным изменениям в их структуре. Подавляющее большинство клеток опухоли имели выраженную вакуолизацию цитоплазмы. Зачастую клетки были сильно увеличены в размерах, иногда вплоть до разрыва клеточной оболочки, так что общее число клеток в поле зрения было меньше (35,0). Ядра клеток были укрупнены вследствие отека. Наблюдались ядра с потерей целостности кариолеммы, признаками гомогенизации хроматина и хроматолиза. В части клеток ядра были, наоборот, уменьшены в размерах (рис. 4, г). Существенно, что содержание дистрофически измененных клеток увеличилось до 58,8% (см. таблицу).

**Обсуждение.** Концепция использования генетически-кодированного фотосенсибилизатора является принципиально новой в ФДТ злокачественных ново-

образований. В проведенном исследовании впервые продемонстрировано, что генетически-кодированный фотосенсибилизатор KillerRed может быть успешно использован для индукции клеточных повреждений в опухоли при режимах лазерного воздействия, близких к используемым в ФДТ. В остром периоде после лазерного облучения в опухолях, экспрессирующих KillerRed в хроматине, обнаружены признаки деструкции ткани. Наряду с умеренными, обратимыми дистрофическими изменениями, такими как увеличение или уменьшение размеров клеток и вакуолизация цитоплазмы, в клетках выявлены необратимые признаки повреждения — нарушение целостности клеточных и ядерных оболочек.

Фототоксическое действие белка KillerRed на опухоли в настоящее время мало изучено. Ранее в эксперименте на животных [21] нами была показана возможность повреждения опухолевой ткани с помощью генетически-кодированного фотосенсибилизатора KillerRed: многократное лазерное облучение опухолей, экспрессирующих KillerRed в митохондриях и ядрах клеток, приводило к выраженным патоморфологическим изменениям [21]. Однако лазерное воздействие на опухоли было весьма интенсивным как по плотности энергии (270 Дж/см<sup>2</sup>), так и по кратности облучения (7 сеансов), по сравнению со стандартной ФДТ, при которой облучение производится 1–2 раза при плотности энергии 75–100 Дж/см<sup>2</sup> [8, 9], реже — 200–300 Дж/см<sup>2</sup>. Оно осуществлялось на самой ранней стадии опухолевого роста, когда опухоль наиболее чувствительна к лечению. В проведенном исследовании мы оптимизировали режим воздействия, сократив число сеансов с семи до трех и снизив плотность энергии в 1,5 раза, и проводили облучение на более поздней стадии. Тем не менее наблюдаемые патоморфологические эффекты позволяют говорить о выраженном фототоксическом действии белка на опухоль.

На пути разработки метода ФДТ с генетически-кодированными фотосенсибилизаторами неизбежно встает вопрос о доставке генетического материала в опухоль. Многочисленные данные свидетельствуют, что технологии трансфекции солидных опухолей *in vivo* сейчас активно развиваются. В экспериментах на животных уже успешно реализована трансфекция опухолевых клеток при введении плазмид ДНК непосредственно в опухоль или в приносящий сосуд [22]. Для доставки генов созданы различные вирусные и невирусные системы, описана технология фотохимической интернализации [23, 24]. Предлагаются различные способы физического воздействия на опухоль для повышения проницаемости клеточных мембран: электропорация, ультразвук, акустическая энергия, генная «пушка» [23].

Следует отметить, что KillerRed как генетически-кодированный фотосенсибилизатор имеет ряд преимуществ перед традиционными химически синтезированными препаратами.

Во-первых, он экспрессируется непосредственно опухолевыми клетками, поэтому его противоопухолевый эффект будет основан на прямом цитотоксическом действии на клетки, а воздействие на опухоль будет более прицельным.

Во-вторых, использование генетически-кодированного

фотосенсибилизатора позволит избежать негативного влияния на здоровые ткани, в которых он не экспрессируется, в частности фототоксичности в отношении кожи и слизистых оболочек, а также снизить общую токсическую нагрузку на организм.

В-третьих, генетически-кодированный фотосенсибилизатор можно направить в любой клеточный компартмент, в том числе наиболее чувствительный к фотоздействию, и обеспечить гибель опухоли по пути апоптоза.

Кроме того, стабильная экспрессия опухолью фототоксического белка открывает возможность для многократного облучения опухоли с целью достижения большего эффекта. Метастазы опухоли, трансфицированной геном фототоксического белка, тоже будут экспрессировать фототоксичный белок, что позволит осуществлять их раннюю диагностику и лечение.

**Заключение.** Выполненное впервые исследование фототоксических эффектов генетически-кодированного фотосенсибилизатора KillerRed в экспериментальных опухолях показывает принципиальную возможность фотоповреждения опухоли с его помощью. При режимах, близких к используемым при фотодинамической терапии с химически синтезированными фотосенсибилизаторами, лазерное воздействие на опухоли HeLa с белком KillerRed приводит к выгоранию флуоресцентного белка и существенным дистрофическим изменениям в опухолевой ткани.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (договор №11. G34.31.0017, соглашения 8269, 8303) и РФФИ (проекты № 11-04-01427а, 11-02-00916).*

*Авторы выражают благодарность члену-корреспонденту РАН А.М. Сергееву, д.м.н. Н.М. Шаховой, к.ф.-м.н. И.В. Турчину, аспирантам В.В. Елагину, А.И. Павликову, студентке ННГУ М.М. Кузнецовой за помощь в организации и проведении исследования.*

## Литература

1. Kessel D. Photodynamic therapy of neoplastic disease. Vol. 2. CRC Press; 1990; 280 p.
2. Hasan T., Ortel B., Moor A.C.E., Pogue B.W. Photodynamic therapy of cancer. In: Cancer medicine. Edited by Kufe D.W., et al. Hamilton (ON): B.C. Decker; 2003; p. 605–620.
3. Гельфонд М.Л. Фотодинамическая терапия в онкологии. Практическая онкология 2007; 8(4): 204–210.
4. Stepp H., Beck T., Pongratz T., et al. ALA and malignant glioma: fluorescence-guided resection and photodynamic treatment. J Environ Pathol Toxicol Oncol 2007; 26(2): 157–164.
5. Cengel K.A., Glatstein E., Hahn S.M. Intraperitoneal photodynamic therapy. In: Peritoneal carcinomatosis. Ceelen W.P. (editor). Springer (US); 2007; p. 493–514.
6. Berg K., Selbo P.K., Weyergang A., et al. Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. J Microsc 2005; 218(Pt 2): 133–147.
7. Josefsen L.B., Boyle R.W. Photodynamic Therapy and the development of metal-based photosensitizers. Met Based Drugs 2008; 2008: 276109.
8. Smirnova Z.S., Oborotova N.A., Makarova O.A., Orlova O.L., Polozkova A.P., Kubasova I.Yu., et al. Efficiency and pharmacokinetics of photosense: a new liposomal photosensitizer formulation based on aluminum sulfophthalocyanine. Pharm Chem J 2005; 39(7): 341–344.

9. Gomer C.J., Ferrario A. Tissue distribution and photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 in a mouse tumor model. *Canc Res* 1990; 50: 3985–3990.

10. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy. Part three. Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2005; 2(2): 91–106.

11. Mroz P., Yaroslavsky A., Kharkwal G.B., and Hamblin M.R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers* 2011; 3: 2516–2539.

12. Nowis D., Makowski M., Stokiosa T., et al. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol* 2005; 52(2): 339–352.

13. Oleinick N.L., Morris R.L., Nieminen A.L. Photodynamic therapy-induced apoptosis. In: *Apoptosis, senescence and cancer*. Gewirtz D.A., Holt S.E., Grant S. (editors). 2nd ed. 2007; 599 p.

14. Krammer B. Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer Res* 2001; 21(6B): 4271–4277.

15. Bulina M.E., Chudakov D.M., Britanova O.V., Yanushevich Y.G., Staroverov D.B., Chepurnykh T.V., Merzlyak E.M., Shkrob M.A., Lukyanov S., Lukyanov K.A. A genetically encoded photosensitizer. *Nat Biotechnol* 2006; 24(1): 95–99.

16. Pletnev S., Gurskaya N.G., Pletneva N.V., Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Martynov V.I., Popov V.O., Kovalchuk M.V., Wlodawer A., Dauter Z., Pletnev V. Structural basis for phototoxicity of the genetically encoded photosensitizer KillerRed. *J Biol Chem* 2009; 284(46): 32028–32039.

17. Vegh R.B., Solntsev K.M., Kuimova M.K., Cho S., Liang Y., Loo B.L., Tolbert L.M., Bommaris A.S. Reactive oxygen species in photochemistry of the red fluorescent protein “Killer Red”. *Chem Comm* 2011; 47(17): 4887–4889.

18. Bulina M.E., Lukyanov K.A., Britanova O.V., Onichtchouk D., Lukyanov S., Chudakov D.M. Chromophore-assisted light inactivation (CALI) using the phototoxic fluorescent protein KillerRed. *Nat Protoc* 2006; 1(2): 947–953.

19. Serebrovskaya E.O., Gorodnicheva T.V., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Sharonov G.V., Zagaynova E.V., Chudakov D.M., Lukyanov S., Zaraisky A.G., Lukyanov K.A. Light-induced blockage of cell division with a chromatin-targeted phototoxic fluorescent protein. *Biochem J* 2011; 435(1): 65–71.

20. Bonnett R., Martinez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* 2001; 57(47): 9513–9547.

21. Shirmanova M.V., Serebrovskaya E.O., Lukyanov K.A., Snopova L.B., Sirotkina M.A., Prodanetz N.N., Bugrova M.L., Minakova E.A., Turchin I.V., Kamensky V.A., Lukyanov S.A., Zagaynova E.V. Phototoxic effects of fluorescent protein KillerRed on tumor cells in mice. *J Biophotonics* 2012 Jun 13. doi: 10.1002/jbio.201200056.

22. Cabrera G., Porvasnik S.L., DiCorleto P.E., et al. Intra-arterial adenoviral mediated tumor transfection in a novel model of cancer gene therapy. *Mol Canc* 2006; 5: 32.

23. Kamimura K., Suda T., Zhang G., Liu D. Advances in gene delivery systems. *Pharmaceut Med* 2011; 25(5): 293–306.

24. Berg K., Selbo P.K., Prasmickaite L., et al. Photochemical Internalization: a new tool for gene and oligonucleotide delivery. *Top Curr Chem* 2010; 296: 251–281.

5. Cengel K.A., Glatstein E., Hahn S.M. Intraperitoneal photodynamic therapy. In: *Peritoneal carcinomatosis*. Ceelen W.P. (editor). Springer (US); 2007; p. 493–514.

6. Berg K., Selbo P.K., Weyergang A., et al. Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. *J Microsc* 2005; 218 (Pt 2): 133–147.

7. Josefsen L.B., Boyle R.W. Photodynamic Therapy and the development of metal-based photosensitizers. *Met Based Drugs* 2008; 2008: 276109.

8. Smirnova Z.S., Oborotova N.A., Makarova O.A., Orlova O.L., Polozkova A.P., Kubasova I.Yu., et al. Efficiency and pharmacokinetics of photosense: a new liposomal photosensitizer formulation based on aluminum sulfophthalocyanine. *Pharm Chem J* 2005; 39(7): 341–344.

9. Gomer C.J., Ferrario A. Tissue distribution and photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 in a mouse tumor model. *Canc Res* 1990; 50: 3985–3990.

10. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy. Part three. Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2005; 2(2): 91–106.

11. Mroz P., Yaroslavsky A., Kharkwal G.B., and Hamblin M.R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers* 2011; 3: 2516–2539.

12. Nowis D., Makowski M., Stokiosa T., et al. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol* 2005; 52(2): 339–352.

13. Oleinick N.L., Morris R.L., Nieminen A.L. Photodynamic therapy-induced apoptosis. In: *Apoptosis, senescence and cancer*. Gewirtz D.A., Holt S.E., Grant S. (editors). Totowa: Humana Press Inc.; 2007; 599 p.

14. Krammer B. Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer Res* 2001; 21(6B): 4271–4277.

15. Bulina M.E., Chudakov D.M., Britanova O.V., Yanushevich Y.G., Staroverov D.B., Chepurnykh T.V., Merzlyak E.M., Shkrob M.A., Lukyanov S., Lukyanov K.A. A genetically encoded photosensitizer. *Nat Biotechnol* 2006; 24(1): 95–99.

16. Pletnev S., Gurskaya N.G., Pletneva N.V., Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Martynov V.I., Popov V.O., Kovalchuk M.V., Wlodawer A., Dauter Z., Pletnev V. Structural basis for phototoxicity of the genetically encoded photosensitizer KillerRed. *J Biol Chem* 2009; 284(46): 32028–32039.

17. Vegh R.B., Solntsev K.M., Kuimova M.K., Cho S., Liang Y., Loo B.L., Tolbert L.M., Bommaris A.S. Reactive oxygen species in photochemistry of the red fluorescent protein “Killer Red”. *Chem Comm* 2011; 47(17): 4887–4889.

18. Bulina M.E., Lukyanov K.A., Britanova O.V., Onichtchouk D., Lukyanov S., Chudakov D.M. Chromophore-assisted light inactivation (CALI) using the phototoxic fluorescent protein KillerRed. *Nat Protoc* 2006; 1(2): 947–953.

19. Serebrovskaya E.O., Gorodnicheva T.V., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Sharonov G.V., Zagaynova E.V., Chudakov D.M., Lukyanov S., Zaraisky A.G., Lukyanov K.A. Light-induced blockage of cell division with a chromatin-targeted phototoxic fluorescent protein. *Biochem J* 2011; 435(1): 65–71.

20. Bonnett R., Martinez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* 2001; 57(47): 9513–9547.

21. Shirmanova M.V., Serebrovskaya E.O., Lukyanov K.A., Snopova L.B., Sirotkina M.A., Prodanetz N.N., Bugrova M.L., Minakova E.A., Turchin I.V., Kamensky V.A., Lukyanov S.A., Zagaynova E.V. Phototoxic effects of fluorescent protein KillerRed on tumor cells in mice. *J Biophotonics* 2012 Jun 13. doi: 10.1002/jbio.201200056.

22. Cabrera G., Porvasnik S.L., DiCorleto P.E., et al. Intra-arterial adenoviral mediated tumor transfection in a novel model of cancer gene therapy. *Mol Canc* 2006; 5: 32.

23. Kamimura K., Suda T., Zhang G., Liu D. Advances in gene delivery systems. *Pharmaceut Med* 2011; 25(5): 293–306.

24. Berg K., Selbo P.K., Prasmickaite L., et al. Photochemical Internalization: a new tool for gene and oligonucleotide delivery. *Top Curr Chem* 2010; 296: 251–281.

## References

1. Kessel D. *Photodynamic therapy of neoplastic disease*. Vol. 2. CRC Press; 1990; 280 p.

2. Hasan T., Ortel B., Moor A.C.E., Pogue B.W. Photodynamic therapy of cancer. In: *Cancer medicine*. Edited by Kufe D.W., et al. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. p. 605–620.

3. Gelfond M.L. Fotodinamicheskaya terapiya v onkologii [Photodynamic therapy in oncology]. *Prakticheskaya onkologiya — Practical Oncology* 2007; 8(4): 204–210.

4. Stepp H., Beck T., Pongratz T., et al. ALA and malignant glioma: fluorescence-guided resection and photodynamic treatment. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2007; 26(2): 157–164.