

# Характеристика режимов терапевтического воздействия циклофосфана и препаратов двуцепочечной ДНК на опухоль Кребс-2, растущую в асцитной форме, приводящих к эрадикации первичного асцита

Е.А. Поттер<sup>1</sup>, Е.В. Долгова<sup>1</sup>, А.М. Минкевич<sup>1</sup>, В.П. Николин<sup>1</sup>, Н.А. Попова<sup>1,2</sup>, Я.Р. Ефремов<sup>1,2</sup>, С.И. Байбородин<sup>1,2</sup>, В.А. Рогачев<sup>1</sup>, А.С. Проскурина<sup>1</sup>, А.В. Козел<sup>1,2</sup>, О.С. Таранов<sup>3</sup>, В.В. Омигов<sup>3</sup>, Е.И. Верещагин<sup>4</sup>, Д.Б. Петров<sup>5</sup>, А.А. Останин<sup>6</sup>, Е.Р. Черных<sup>6</sup>, Н.А. Колчанов<sup>1</sup>, С.С. Богачев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

<sup>4</sup> Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия

<sup>5</sup> Общество с ограниченной ответственностью торговый дом «Терморобот», Новосибирск, Россия

<sup>6</sup> Институт клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

В настоящей статье цикла были протестированы многочисленные режимы воздействия циклофосфана (ЦФ) и препаратов двуцепочечной ДНК (дцДНК) на асцитную форму опухоли Кребс-2 *in situ* на мышах линий C57Bl и CBA. Показано, что синергическое действие цитостатика ЦФ и препаратов кросс-линкованной дцДНК человека и лосося имеет выраженный токсический эффект на животных с развитым асцитом, о чем свидетельствует гистологический анализ органов и тканей экспериментальных животных. В то же время использование смеси нативного и кросс-линкованного препаратов дцДНК человека и лосося приводит к достоверному увеличению средней продолжительности жизни животных. Установлено, что повторные инъекции ЦФ, дополненные обработкой препаратами дцДНК, имеют наиболее выраженный противораковый эффект. Повторное введение препаратов воздействует на клетки, находившиеся во время предыдущих обработок в нечувствительной фазе клеточного цикла G2-M. Трех- или четырехкратное повторение терапевтических процедур приводит к максимальной элиминации стволовых иницирующих раковых клеток (СИРК) из опухолевой массы. Разработана схема инъекций препаратов, приводящая к одновременной полной резорбции первичного асцита у всей экспериментальной группы животных, достигающей семи-девяти-суточной фазы ремиссии. Однако такой режим не позволяет избежать развития вторичной опухоли в асцитной или солидной форме, что, по-видимому, связано с миграцией клеток асцита в близлежащие ткани или сохранением жизнеспособности СИРК. Дополнительно проведенные масштабные патоморфологические исследования свидетельствовали о том, что, помимо вторичных опухолей, гибель животных определяет развивающаяся системная воспалительная реакция (СВР) и ее терминальная стадия – полиорганная недостаточность (ПОН). Сформулированы базовые положения концепции терапии асцитного рака Кребс-2, позволяющие полностью элиминировать первичный асцит.

Ключевые слова: двуцепочечная ДНК; циклофосфан; асцит Кребс-2; стволовые иницирующие раковые клетки; ремиссия; NER; гомологичная рекомбинация; системная воспалительная реакция; полиорганная недостаточность.

## Analysis of different therapeutic schemes combining cyclophosphamide and double-stranded DNA preparations for eradication of Krebs-2 primary ascites in mice

E.A. Potter<sup>1</sup>, E.V. Dolgova<sup>1</sup>, A.M. Minkevich<sup>1</sup>, V.P. Nikolin<sup>1</sup>, N.A. Popova<sup>1,2</sup>, Ya.R. Efremov<sup>1,2</sup>, S.I. Baiborodin<sup>1,2</sup>, V.A. Rogachev<sup>1</sup>, A.S. Proskurina<sup>1</sup>, A.V. Kozel<sup>1,2</sup>, O.S. Taranov<sup>3</sup>, V.V. Omigov<sup>3</sup>, E.I. Vereschagin<sup>4</sup>, D.B. Petrov<sup>5</sup>, A.A. Ostanin<sup>6</sup>, E.R. Chernykh<sup>6</sup>, N.A. Kolchanov<sup>1</sup>, S.S. Bogachev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> The State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

<sup>4</sup> Novosibirsk State Medical Academy, Novosibirsk, Russia

<sup>5</sup> LLC «Termorobot» Novosibirsk, Russia

<sup>6</sup> Institute of Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

In the present paper, we report a series of experiments where multiple regimens of CP and dsDNA injections were tested for targeting the ascites form of murine Krebs-2 cancer *in situ*. We show that combining CP with cross-linked human and salmon dsDNA results in a synergistic toxicity for ascites-bearing mice, an observation supported by a histopathological analysis of organs and tissues of experimental animals. By contrast, using a composite mixture of native and cross-linked human and salmon DNA after CP injections leads to a significant increase in the average lifespan of the treated mice. Furthermore, we demonstrate that repeated rounds of CP + dsDNA injections result in a dramatic anticancer effect. The timing of injections is chosen so that they target the cells that are insensitive to the previous treatments as they were in the G2/M phase. 3-4 rounds of injections are needed to eliminate the subpopulation of tumor-

initiating cancer stem cells. Our experiments identified the regimen when complete resorption of the primary Krebs-2 ascites occurs in all of the treated animals, followed by a remarkable remission period lasting 7–9 days. Yet, this regimen does not prevent secondary site metastases (either solid or ascites form), which is likely caused by the migration of ascites cells into adjacent tissues or by incomplete eradication of cancer stem cells. To address these and other questions, we expanded the study and performed a histopathological analysis, which indicated that secondary metastases are not the only cause of death. In fact, many animals displayed unfolding systemic inflammatory reaction which was culminated by multiple organ failure. Thus, we have developed a concept for treating the ascites form of Krebs-2 cancer, which allows the primary ascites to be eliminated.

**Key words:** double-stranded DNA; cyclophosphamide (CP); Krebs-2 ascites; tumor-initiating stem cells; remission; NER; homologous recombination; systemic inflammatory reaction; multiple organ failure.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Поттер Е.А., Долгова Е.В., Минкевич А.М., Николин В.П., Попова Н.А., Ефремов Я.Р., Байбородин С.И., Рогачев В.А., Проскурина А.С., Козел А.В., Таранов О.С., Омигов В.В., Верещагин Е.И., Петров Д.Б., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Богачев С.С. Характеристика режимов терапевтического воздействия циклофосфана и препаратов двуцепочечной ДНК на опухоль Кребс-2, растущую в асцитной форме, приводящих к эрадикации первичного асцита. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):108-124. DOI 10.18699/VJ15.117

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Potter E.A., Dolgova E.V., Minkevich A.M., Nikolin V.P., Popova N.A., Efremov Ya.R., Baiborodin S.I., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Kozel A.V., Taranov O.S., Omigov V.V., Vereschagin E.I., Petrov D.B., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Analysis of different therapeutic schemes combining cyclophosphamide and double-stranded DNA preparations for eradication of Krebs-2 primary ascites in mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):108-124. DOI 10.18699/VJ15.117

**В**ведение в проблематику лечения малигнизированного асцитного рака было сделано в первой статье настоящего цикла исследований (Поттер и др., 2016). Основное его положение состоит в том, что, несмотря на широко применяемые методы циторедукции и гормональной терапии (Блохин, Переводчикова, 1984; Лайт, 1986; Brenner, 1986; Стенина, 2006; Беспалов и др., 2013), в современной медицинской практике отсутствует метод полного излечения больных от асцитной формы рака. В цикле представленных работ главной целью исследований является поиск режима излечения асцитного рака на модели опухоли Кребс-2 у мышей.

Проведенные эксперименты предыдущего раздела цикла дали основание считать, что синергичное действие циклофосфана (ЦФ) и двуцепочечной ДНК (дцДНК) оказывает разрушительное действие на стволовые иницирующие раковые клетки (СИРК), что приводит к неперевиваемости клеток обработанного асцита в виде солидных трансплантатов. Можно было полагать, что режимы введения ЦФ+ДНК (1–12, 18–30 ч после инъекции ЦФ) и новая композиция двух препаратов, состоящая из смеси нативной и кросс-линкированной дцДНК (ICL-DNA), позволят полностью эрадикаровать привитый и развитый асцитный трансплантат и составят основу новой терапевтической стратегии лечения рака. Длительная ремиссия в развитии привитого асцитного графта, обнаруженная в работе (Alyamkina et al., 2015), подразумевала возможность излечения мышей от асцитной формы рака Кребс-2.

В настоящей части цикла асцит обрабатывали непосредственно в организме мыши. Протестировали различные схемы совместного введения одной или нескольких инъекций цитостатика ЦФ и разных сочетаний препаратов дцДНК. Некоторые схемы дополнили введением антибиотика гентамицина для купирования бактериального заражения животных, а также активацией адаптивного иммунитета (АИ) и трансплантацией клеток костного мозга (ККМ). В экспериментах оценивали состояние животных, продолжительность их жизни, степень развития асцита. Погибших животных подвергали патоморфологическому анализу с целью выяснения причин гибели.

#### Материалы и методы

Подробная информация о методах исследования, экспериментальных животных, опухолевой модели, получении препарата ДНК человека и лосося, подготовке кросс-линкированного нитроген-мустардом препарата ДНК, а также анализ перевивочного потенциала обработанных *ex vivo* препаратом ДНК клеток асцита Кребс-2, находящихся под воздействием ЦФ, и статистическая обработка данных представлены в разделе «Материалы и методы» в предыдущей статье настоящего цикла исследований (Поттер и др., 2016).

#### Введение препаратов циклофосфана, экзогенной ДНК и антибиотика гентамицина

Для того чтобы избежать гибели мышей от токсического действия разрушающихся раковых клеток, здесь и везде

далее использовали четырех- или пятидневный асцитный графт, полученный в результате прививки 2 млн раковых клеток (ко времени обработки препаратами количество асцитных клеток достигало 250–300 млн и объем асцитной жидкости составлял в среднем 1,25 мл).

Цитостатик ЦФ вводили мышам внутривентриально (в/б) в дозе 50 или 100 мг/кг веса животного (суммарная доза для всех мышей составляла 300, в некоторых случаях 400 мг/кг) одно-, дву-, трех- или четырехкратно, что отмечено в каждом конкретном эксперименте.

Препараты дцДНК: ssDNA (нативная ДНК лосося), hDNA (нативная ДНК человека), ICL-ssDNA (кросс-линкированная ДНК лосося), ICL-hDNA (кросс-линкированная ДНК человека), ssDNAmix (смесь: нативная ДНК лосося/кросс-линкированная ДНК лосося 3/1 или 5/3), hDNAmix (смесь: нативная ДНК человека/кросс-линкированная ДНК человека 3/1 или 5/3) вводили в/б в дозе 0,5–1 мг на инъекцию каждые 1, 2 или 3 ч (суммарно по 6 мг ДНК на мышь за 12 ч). Временные интервалы введения препаратов либо описаны непосредственно в тексте, либо изображены схематически на соответствующих рисунках. Режимы введения ДНК: 1–12, 18–30, 1–20, 20–36 ч после инъекции ЦФ. Выбор промежутков времени инъекций препарата дцДНК после введения ЦФ был связан с экспериментально обнаруженным временем появления и репарации двуцепочечных разрывов, являющихся интермедиатами репарации межцепочечных сшивков, индуцированных ЦФ, и был привязан к нему (Dolgova et al., 2014).

Антибиотик гентамицин вводили животным в/б по 0,2 мг/мышь через каждые 1–2 сут в течение месяца относительно начала эксперимента.

#### **Активация адаптивного иммунитета**

Для активации у экспериментальных животных АИ вводили препарат нативной ДНК человека («Панаген») через 1, 2 и 3 сут после последней инъекции ЦФ по 500 мкг/мышь (Alyamkina et al., 2010c).

#### **Пересадка клеток костного мозга**

Для получения ККМ использовали здоровых мышей-доноров использованных линии. Клетки костного мозга вымывали раствором PBS из больших берцовых костей, промывали средой RPMI-1640, подсчитывали в камере Горяева и вводили в хвостовую вену экспериментальным животным в количестве 200 тыс. клеток/мышь.

#### **Патоморфологический анализ тканей и органов мышей**

Кусочки органов фиксировали в 4 %-м параформальдегиде, обезживляли в спиртах возрастающей концентрации, просветляли ксилолом, заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной до 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (Волкова, Елецкий, 1971). Просмотр препаратов и микрофотосъемку проводили на световом микроскопе AxioImager Z1 (Zeiss, Германия).

#### **Оценка ремиссии асцитной опухоли Кребс-2**

О ремиссии заболевания судили визуально: «уходом» асцита считали состояние мышши, когда внешний вид

живота соответствовал виду интактного животного и появлялись характерные рубцы, свидетельствующие о резком уменьшении объема жидкости, находящейся в брюшной полости.

#### **Результаты**

В начальных экспериментах на линиях C57Bl и CBA было показано, что инъекции ЦФ в монорежиме незначительно влияют на развитие асцитной опухоли Кребс-2 (Поттер и др., 2016). Результаты настоящего исследования организованы в виде нескольких серий экспериментов, отражающих определенную логическую линию. В сравнениях, приведенных на рисунках, представлены либо наиболее эффективные, либо демонстрирующие определенную закономерность режимы с использованием того или иного препарата. Идеология использования конкретного режима обсуждается по ходу описания экспериментальной части работы.

Контрольными значениями в экспериментах были выбраны: средняя продолжительность жизни (СПЖ), продолжительность жизни последнего животного в группе, ремиссия в развитии асцита и ее продолжительность в группе. Эти показатели использовались для характеристики эффективности режимов.

#### **Характеристика токсического синергичного действия циклофосфана и препаратов кросс-линкированной ДНК лосося и человека на развитый асцит Кребс-2.**

##### **Первая серия экспериментов**

Ранее было показано, что кросс-линкированная дцДНК лосося (ICL-ssDNA) в сочетании с ЦФ, так же как и дцДНК человека (hDNA), используемая в сочетании с цитостатиком, разрушает опухолевый потенциал обработанных асцитных клеток Кребс-2, перевиваемых в форме солидного трансплантата (Dolgova et al., 2014; Поттер и др., 2016). При этом время введения такой ДНК после инъекции ЦФ для проявления терапевтического эффекта отличалось от времени введения препарата hDNA.

Было сделано предположение, что препараты чистых ICL-ssDNA и (или) ICL-hDNA в синергизме с ЦФ могут обладать выраженным прямым терапевтическим действием на развитый асцит. Проведенные эксперименты свидетельствовали, что использование чистых ICL-ssDNA и ICL-hDNA в сочетании с ЦФ крайне токсично для экспериментальных мышшей. Применение такой терапии приводит к гибели мышшей, как предполагается, от развивающейся системной воспалительной реакции (СВР), переходящей в сепсис (Alyamkina et al., 2015). Было выполнено несколько серий экспериментов с почасовыми инъекциями препарата ICL-hDNA в синергизме с ЦФ. Мыши погибали в результате развития характерного симптомокомплекса. Был проведен патоморфологический анализ органов и тканей мышшей из различных групп, взятых в агонистической фазе развития болезни и обработанных при различных режимах и различными препаратами дцДНК (рис. 1). Полученные результаты свидетельствовали о выраженном воспалительном процессе в организме экспериментальных мышшей. Показателями

воздействия на организм животных являются, прежде всего, поражения печени и селезенки, а также воспалительные изменения в легких отдельных мышей. Наиболее выраженные изменения в печени в виде участков некробиоза отмечены в группах ЦФ+ICL-hDNA (1–12) и ЦФ+ICL-hDNA (18–30). Для всех животных, включая контрольную группу, характерны очаговые воспалительные изменения в легких. Эти проявления наиболее выражены в группах ЦФ+hDNA (1–12) и ЦФ+ICL-hDNA (1–12), в которых воспалительный процесс приобретает крупноочаговый характер и распространяется на плевру. Крайняя редукция лимфатических фолликулов селезенки, характерная для всех животных в эксперименте, вероятно, отражает функциональную незрелость данного органа. К такому выводу подталкивает отсутствие какой-либо морфологической вариабельности в течение эксперимента. Отсутствуют фолликулы с типичной структурой, нет тенденции к компенсаторной гиперплазии фолликулов. Кроме общих для всех животных патологических изменений селезенки, отмечен некроз пульпы в группе ЦФ+ICL-hDNA (1–12). По выраженности патологических проявлений в печени и селезенке выделяется группа ЦФ+ICL-hDNA (1–12), в которой эти проявления достигали степени некроза. В демонстрационном эксперименте видно, что экспериментальные мыши, обработанные ЦФ и ICL-ssDNA (18–30), погибли существенно раньше, чем мыши, обработанные одним ЦФ (рис. 2, а, кривая L2).

На этом и последующих рисунках на иллюстрациях инъекций (рис. 2, а3, б3, в3; рис. 3, а3, б3, в3, г3; рис. 4, а3, б3; рис. 6, 3) схематично изображена динамика накопления, репарации и исчезновения двуцепочечных разрывов, вызванных действием цитостатика ЦФ. Сплошными линиями изображены ранее полученные экспериментальные данные, пунктиром – предположительный путь развития репаративных событий на основании уже имеющихся данных (Поттер и др., 2016; Dolgova et al., 2014).

Патологические изменения характеризуется крайне негативным прогнозом для выживаемости экспериментальных мышей. В этой связи в последующих экспериментах использовалась смесь кросс-линкированной и нативной дцДНК, которая оказалась менее токсичной и в то же время демонстрировала высокий терапевтический эффект (см. следующий раздел).

#### **Характеристика синергического действия циклофосфана и препаратов hDNAmix и ssDNAmix, приводящего к замедлению развития асцита Krebs-2. Вторая серия экспериментов**

Эксперименты с использованием одной инъекции ЦФ с дальнейшей обработкой различными препаратами дцДНК, проведенные на обеих линиях мышей, свидетельствовали, что препараты hDNAmix и ssDNAmix в режиме введения 1–12 ч после инъекции ЦФ демонстрируют наиболее эффективные для этой серии экспериментов результаты (рис. 2, б, кривая L2; в, кривая L2). Обработки увеличивают продолжительность жизни последнего животного в группе на 4–8 сут, или на ~24–57 %. Медианы СПЖ достоверно на ~25–30 % отличаются от контролей.

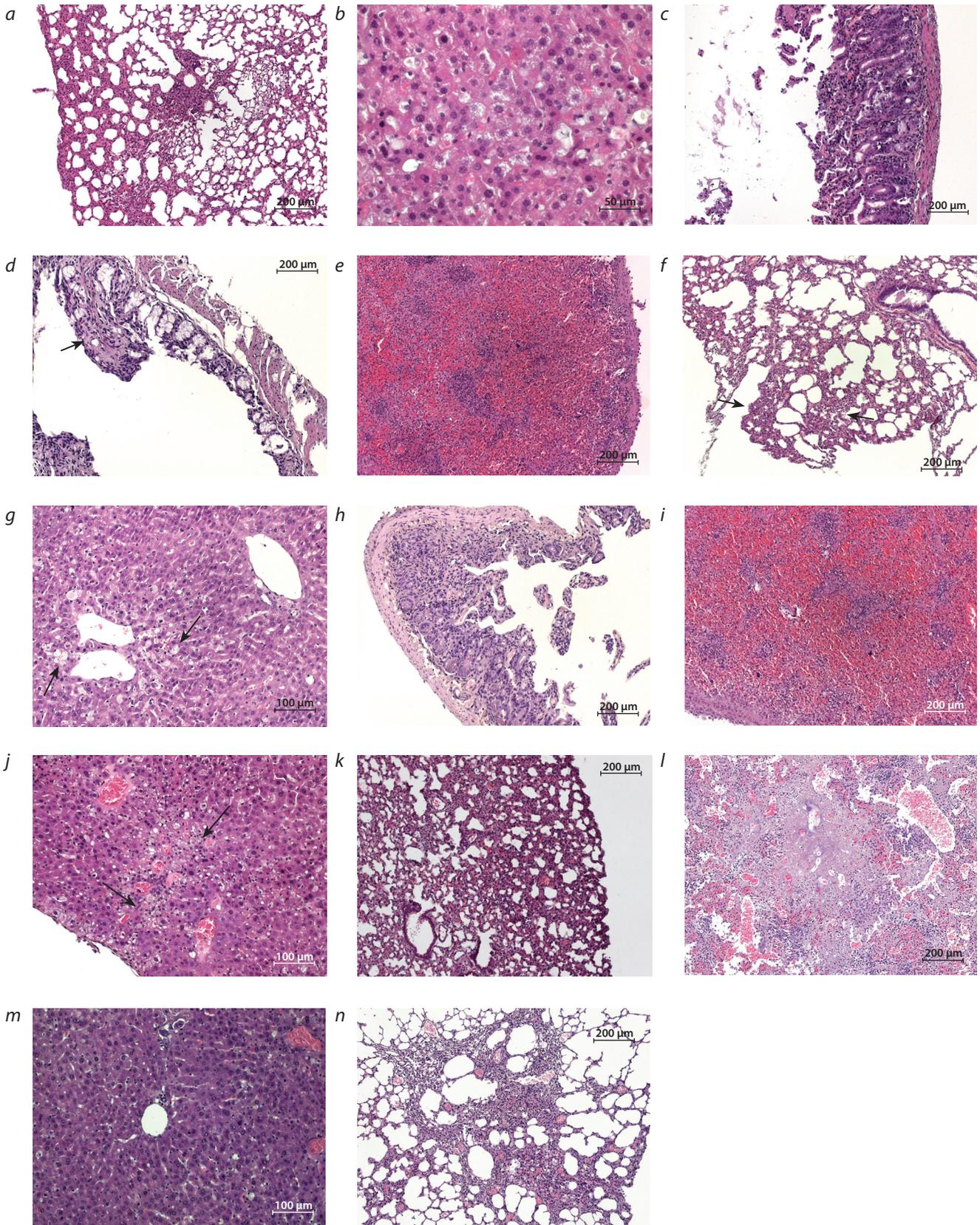
#### **Анализ воздействия нескольких инъекций цитостатика циклофосфана в сочетании с препаратами ДНК человека и лосося на развитый асцитный трансплантат Krebs-2. Третья серия экспериментов**

Как следует из обсуждения действия ЦФ в форме монопрепарата и результатов синергичного действия ЦФ и ДНК, описанных в первой статье цикла (Поттер и др., 2016), сочетание введения нескольких инъекций ЦФ и ДНК является наиболее эффективным в лечении асцитной формы рака Krebs-2. В настоящем исследовании было показано, что при двукратной инъекции ЦФ с интервалом в 36 ч и дополнительной обработке препаратами hDNAmix (1–12) или ssDNAmix (18–30) после каждой инъекции ЦФ продолжительность жизни последнего животного в группе не увеличивается относительно двух инъекций ЦФ (рис. 3, а, кривая L2; б, кривая L2, данные для двух инъекций ЦФ см. в статье Поттер и др., 2016). Тем не менее медиана СПЖ в группах, получавших ДНК, достоверно выше, чем в группе животных, получавших только две инъекции ЦФ, и составляет для ЦФ 22 дня, для ЦФ+ДНК – 24–26 сут (10–18 %) (рис. 3, а1, кривая L2, а2, столбец L2; б1, кривая L2, б2, столбец L2). Для такой агрессивной опухоли, как асцитная форма Krebs-2, это существенный показатель. Полученный результат свидетельствовал о том, что указанные препараты дцДНК оказывают достоверное тормозящее действие на рост графта.

Как было сказано выше, использование нескольких инъекций ЦФ в сочетании с введением препаратов дцДНК может оказаться эффективной мерой эрадикации развитого асцита Krebs-2. В проведенных экспериментах установлено, что введение дополнительных инъекций ЦФ, последовательно каждый раз захватывающих G1-S-фазу оставшихся клеток, находящихся в момент предыдущих инъекций ЦФ в предыдущей G2-M-фазе, в значительной степени усиливает эффект торможения роста асцита у экспериментальных животных. Для данной серии экспериментов наиболее эффективными оказались режимы 4ЦФ+ssDNA (1–12) и 4ЦФ+hDNAmix (1–12), при которых ЦФ вводили в 0, 20, 36 и 56 ч, а препараты ДНК – в течение 12 ч ежедневно после первой и третьей инъекций ЦФ. Проведенная обработка увеличивает продолжительность жизни последнего животного в группе на ~165 % по сравнению с контролем и составляет 43–45 сут после начала эксперимента. Медиана СПЖ на ~40 % больше, чем в контрольной группе (рис. 3, в1, кривая L2, в2, столбец L2; г1, кривая L2, г2, столбец L2).

Общее заключение по трем сериям экспериментов раздела предполагает, что для дальнейшего поиска эффективного режима эрадикации первичного асцита Krebs-2 следует использовать три–четыре инъекции ЦФ в комбинации с нативной или со смесью нативной и кросс-линкированной ДНК человека в режиме ЦФ+hDNA (1–12) и (или) со смесью нативной и кросс-линкированной ДНК лосося в режиме ЦФ+ssDNAmix (18–30).

Проведенные эксперименты свидетельствовали о следующем. Наиболее эффективная терапия увеличивает продолжительность жизни экспериментальных животных более чем в два раза, но к полному излечению от первичного асцита не приводит. Все мыши погибают.



**Fig. 1.** Histopathology of mouse organs and tissues (first experimental series).  
Microscopically examined mouse organs: lungs, liver, small and large intestine, kidney, adrenal gland, and spleen.

Начало гибели мышей в наиболее эффективных группах перекрывается с таковым последних животных в контрольной группе и растянуто во времени. В большинстве случаев формируется вторичный асцит. В единичных случаях мыши погибают с развивающейся солидной опухолью, локализация которой совпадает с направлением введения иглы при инъекциях. Слабая степень развития вторичных и асцита, и солидной опухоли у погибающих мышей предполагает, что гибель животных опосредована другими причинами. Посев асцитной жидкости и крови погибающих животных в определенном числе случаев для следующей серии экспериментов (см. ниже) свидетельствовал о бактериальном заражении жидкостей (данные не приводятся). Гибель мышей и постоянно детектируемое развитие вторичного асцита при прямом воздействии на мыш-асцитноса подразумевали необходимость дополнительных мер. Предполагалось, что гибель мышей опосредована одним или несколькими патологическими процессами, связанными с взаимодействием асцита и препарата дцДНК на фоне инъекций ЦФ. Такими процессами, вероятно, могут быть СВР, сепсис и ПОН, вызванные масштабным апоптозом асцитных раковых клеток. Также губительной для организма могла быть эрозия эпителия кишечника, сопровождаемая как изменением проницаемости гастроэнтерического барьера, так и функциональными нарушениями в доставке питательных веществ в организм (Alyamkina et al., 2015). В этой связи были разработаны и экспериментально опробованы режимы, учитывающие основные особенности воздей-

ствия ЦФ, препарата дцДНК и их сочетания, описанные в наших ранних работах и предыдущем разделе. К таким особенностям можно отнести: способность препарата дцДНК в синергизме с действием ЦФ эрадикаровать СИРК, в монорежиме индуцировать масштабный апоптоз раковых клеток, а также активировать развитие пролиферативного адаптивного иммунного ответа (Alyamkina et al., 2009, 2010a–c, 2012). Одновременно был использован подход с применением трех–четырёх последовательных инъекций ЦФ и препарата дцДНК.

В предыдущей статье цикла (Поттер и др., 2016) было найдено, что регламентированные по времени последовательные инъекции ЦФ воздействуют на раковые клетки по двум независимым векторам. По ходу течения одной из стадий репарации межпочечных шивок (NER, HR) повторная инъекция ЦФ индуцирует несанкционированную (несвоевременную) стадию репаративного процесса. По-видимому, возникает конфликт репаративных молекулярных машин, приводящий к гибели раковой клетки. Также дополнительно инъекции ЦФ проводили в промежуток времени, когда пул клеток, находящихся в первую инъекцию ЦФ в G2-M-фазе клеточного цикла, переходил в G1-S-фазу. Такая обработка затрагивала все клетки в наиболее чувствительную фазу клеточного цикла – S-фазу. И таким образом, терапевтическая схема состояла из чередования инъекций ЦФ и ДНК. Одновременно в дизайн экспериментов для изучаемых животных были введены терапия антибиотиком гентамицином и регламентированная трансплантация ККМ.

**Group CP + hDNA (1–12):** (a) Lungs. Several animals have subpleural edema, suffusion, decreased airiness, inflammatory cell infiltration involving neighboring parts of parenchyma and accompanied with tissue destruction foci. Taken together, these morphological features are consistent with pleuropneumonia. (b) Liver. All animals of the group show diffuse granular degeneration of hepatocytes, sometimes progressing into ballooning degeneration. Inflammatory cell reaction is not detectable. (c) Small intestine. In one animal, villi of the intestinal mucosa appear smoothed, epithelial cells are almost entirely degraded; the stroma displays edema and lymphocytic infiltration. This pattern is morphologically consistent with acute enteritis. (d) Large intestine. In one animal, mucosal lining shows focal sclerosis. Crypts are malformed, some of them are expanded and appear cyst-like. The mucosa surface looks smoothed (arrow). The changes observed can be classified as manifestation of chronic colitis. Kidney and adrenal gland: no overt pathological changes. (e) Spleen. In all animals, white pulp follicles are small and display indistinct zonation.

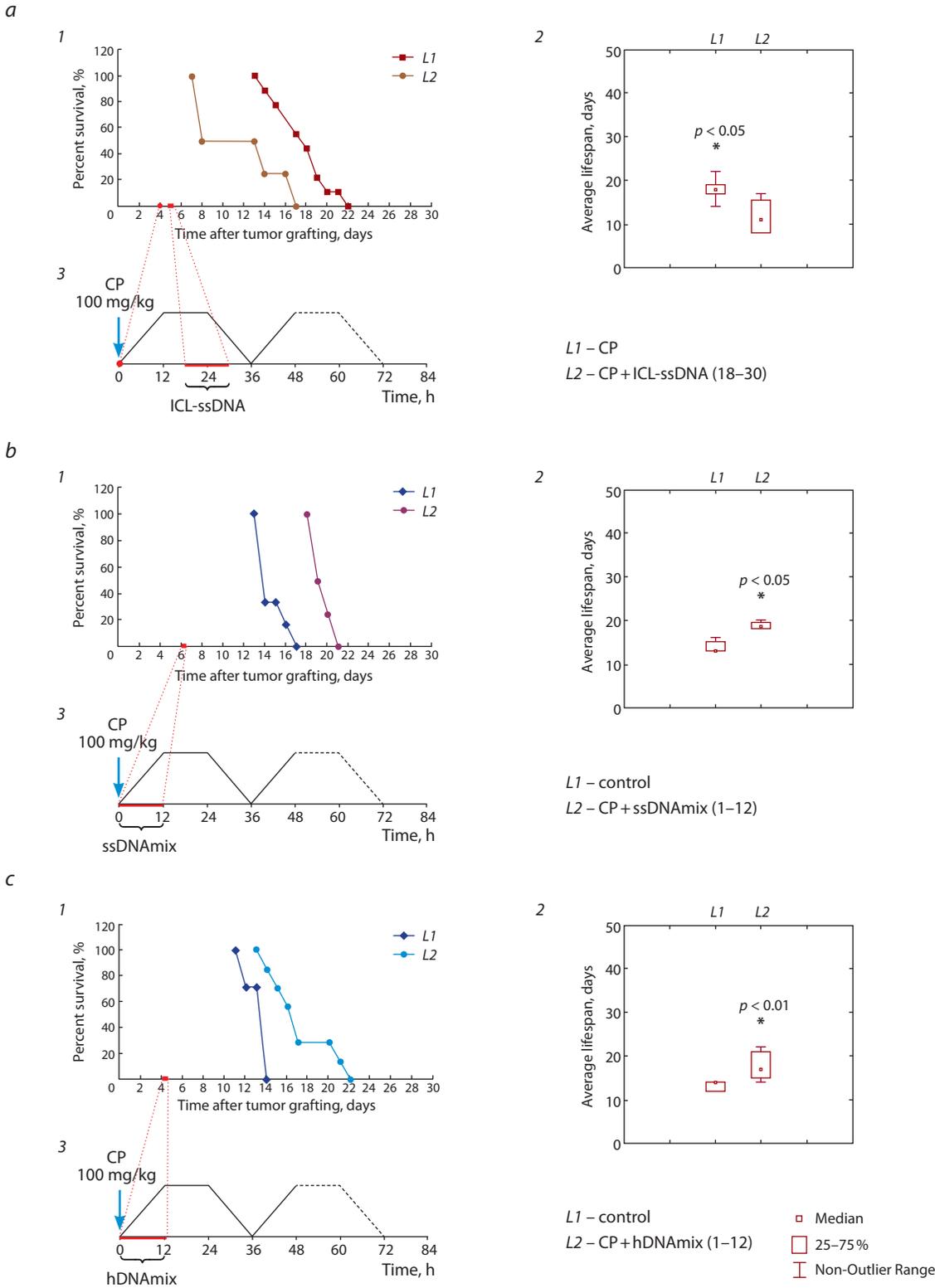
**Group CP + hDNA (18–30):** (f) Lungs. Inflammation foci are small, looking like local swelling in several samples; lymphocyte and neutrophil infiltration, moderate decrease in airiness (dysaerectasis-type, arrow). (g) Liver. All animals consistently display vacuolar degeneration (arrows). (h) Small intestine. One sample displays signs of profound mucosal layer swelling, residual villi, and pronounced inflammatory cell infiltration combined with progressive fibrosis. This set of morphological changes is consistent with chronic enteritis. Large intestine, kidney and adrenal gland: no pathological changes. (i) Spleen. All spleen samples display hypoplasia of white pulp follicles (functional exhaustion).

**Group CP + ICL-hDNA (1–12):** (j) Liver: in contrast to the above-mentioned groups, pathological changes in the liver tissue of these animals are much more pronounced and some are classifiable as necrobiosis (arrows). The necrobiotic zones display loss of cell borders between hepatocytes and complete disintegration of their cytoplasmic structure. These zones are readily identifiable on the slides as displaying homogeneous eosinophilic staining. Additionally, profound inflammatory changes are seen in lung and spleen tissues of some animals. (k) Lungs: focal pneumonia is present, and the affected volume is rather large in two of the three samples. (l) Spleen. Necrosis of the spleen pulp is found in two cases. Additionally, tumor cells are found scattered around the capsule edge, but these cells do not appear to spread into deeper cell layers. No morphological changes are observed in other organs or tissues studied.

**Group CP + ICL-hDNA (18–30):** (m) Liver. Two animals from this group display pronounced liver pathology appearing as necrobiotic foci. (n) Lungs. In one animal, necrobiotic foci are accompanied by local inflammation sites. Other organs display pathological changes basically similar to those described above.

**Group CP.** Much as in the animals from the treated groups, the following problems in the organs are noted: pronounced degeneration of hepatocytes, presence (in one of two cases) of small inflammatory foci in the lungs, notable hypoplasia of lymph follicles in the white pulp of the spleen, and signs of chronic colitis.

**Conclusion:** Histopathological changes are found in all experimental mouse groups. Effects of the treatments are most evident from lesions in the liver and spleen, as well as from inflammatory changes in the lungs of several mice. The strongest change is observed in the liver. It appears as necrobiosis in groups CP + ICL-hDNA (1–12) and CP + ICL-hDNA (18–30). Characteristic inflammatory changes in lungs occur in all animals, including the control group. These changes are the most pronounced in the groups CP + hDNA (1–12) and CP + ICL-hDNA (1–12), where the inflammatory foci are the largest, involving pleural tissue. The extreme reduction in the size of lymph follicles of the spleen is observed in all experimental animals, and it is likely attributable to the functional immaturity of this organ. We speculate that just for this cause no dynamics in the morphology was observed throughout the experiment. Follicles with the typical structure are absent, and the compensatory hyperplasia of the follicles is undetectable. In addition to the pathological changes in the spleen that are common to all the mice, pulp necrosis is seen in group CP + ICL-hDNA (1–12). Pathological changes in the liver and spleen are particularly deep in group CP + ICL-hDNA (1–12), where they progressed to the stage of necrosis.



**Fig. 2.** Analysis of the synergistic activity of the CP cytostatic (100 mg/kg) and various combinations of hDNA, ICL-hDNA, ssDNA, and ICL-ssDNA against the ascites form of Krebs-2 tumor: 1, survival of ascites-engrafted mice; 2, average lifespan of animals having received the treatments (Mann-Whitney U-test); 3, the drug delivery protocol.

(a) CBA mice with established 4-day old Krebs-2 ascites received injections of CP alone (curve L1) or CP followed by the cross-linked ssDNA (ICL-ssDNA) preparation 18–30 hrs later (curve L2); (b) CBA mice with six-day Krebs-2 ascites grafts were treated with CP alone (curve L1, control) or CP followed with a 3 : 1 mixture of native and crosslinked ssDNA (ssDNA/ICL-ssDNA 3/1) 1–12 hrs later (curve L2). (c) C57Bl mice with 4-day Krebs-2 ascites were treated with CP and a mixture of native and cross-linked hDNAs (hDNA/ICL-hDNA 3/1) 1–12 hrs after the CP injection (curve L2) in comparison with the control (curve L1).

### **Характеристика режимов синергичного воздействия нескольких инъекций циклофосфана и различных сочетаний нативной и кросс-линкированной ДНК человека и лосося, приводящих к полной регрессии первичного асцита Krebs-2.**

#### **Четвертая серия экспериментов**

Проведенные в настоящей серии эксперименты показали, что введение антибиотика гентамицина в режимы терапии приводит к увеличению СПЖ животных в группах. Обработка экспериментальных животных с использованием трех или четырех инъекций ЦФ и hDNAmix в нескольких режимах полностью разрушает перевитый первичный асцит. Развитие вторичного асцита в группах происходило последовательно с задержкой от 2 до 5 сут для каждого последующего заболевшего животного. Причем для нескольких режимов первичный асцит элиминировался у всех животных группы, а фаза полной ремиссии для последнего животного в группе составляла около 30 сут (рис. 4, *a2*, кривая *L3*). Контрольные мыши при этом погибли синхронно от развитого асцита на 18-е сутки эксперимента (рис. 4, *a1*, кривая *L1*). Вторичный асцит в наиболее демонстративном варианте появился на 36-е сутки эксперимента. В нескольких случаях вторичная опухоль в принципе не появилась до гибели животных (35, 41, 43-е сутки для обсуждаемой серии экспериментов). Несколько животных в различных группах демонстрировали отсутствие асцита и одновременно развитие солидного трансплантата с локализацией или в перитонеуме, или в некоторых внутренних органах. Этот факт, а также последовательное появление вторичного асцита во всех группах животных означали, что проведенные *in vivo* обработки количественно изменяют опухолевый потенциал асцитного графта и что существует фактическая возможность добиться полного излечения мышей от асцита. Главная трудность в решении такой задачи заключается в том, что, как предполагается, часть СИРК сохраняется в тканях или заносится в результате инъекций в ткани, где их внутритканная локализация предохраняет эти клетки от воздействия терапевтических обработок. Сохраненные таким образом клетки и являются источником вторичной солидной опухоли и рецидива асцита.

### **Комбинирование воздействия циклофосфана и препаратов дцДНК с терапией антибиотиком, активацией адаптивного иммунитета и пересадкой клеток костного мозга на развитый асцит Krebs-2.**

#### **Пятая серия экспериментов**

В этой серии экспериментов была предпринята попытка объединить в одной группе описанные эффективные режимы и препараты. Одновременно были сформированы группы, в терапию которых была введена обработка мышей препаратом «Панаген» в режиме, активирующем развитие противоракового АИ (Alyamkina et al., 2009, 2010a–c, 2012). Также животным проводили регламентированную пересадку ККМ (рис. 4, *b3*). Регламент инъекций наиболее эффективного режима был следующий: четыре инъекции ЦФ (0, 20, 36, 56 ч по 100, 50, 100 и 50 мг/кг соответственно), введение hDNA и ssDNAmix в режимах 1–18 (36–56) и 20–36 (58–72) каждые три часа, соответственно, относительно первого введения ЦФ. Был

воспроизведен эффект полного ухода асцита и развития фазы ремиссии у всей группы животных (рис. 4, *b2*, кривая *L4*, кривая *L5*). Однако, как и в предыдущих экспериментах, мыши гибли. Размер и состояние вторичного асцита снова позволили предположить, что гибель мышей не связана с асцитом как таковым. Это наблюдение могло означать, что даже при терапии антибиотиком гентамицином и пересадке ККМ в организме индуцируются патологические процессы, приводящие к гибели животных.

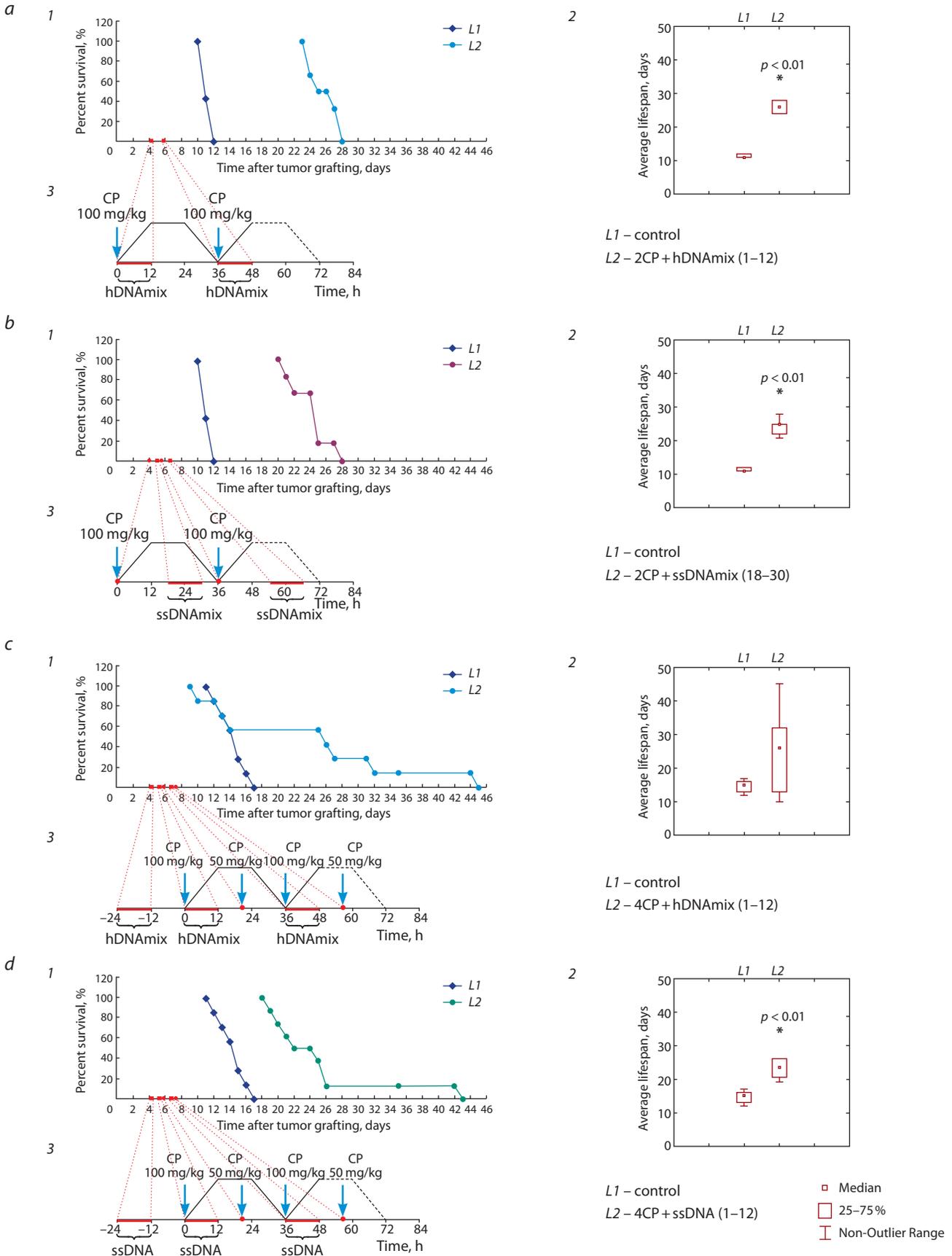
Оказалось, что при использовании комбинированных форм препарата дцДНК уровень разрушительного действия на органы экспериментальных животных в значительной степени ниже, чем при использовании только модифицированной (кросс-линкированной) ДНК. Подтверждением этого явился патоморфологический анализ тканей и органов нескольких животных из экспериментальных групп (рис. 5). Именно этот режим в дальнейшем был взят за основу терапевтической процедуры лечения асцитного рака Krebs-2. Главными в этом режиме были два обстоятельства: 1) три обязательные инъекции ЦФ, дополнительно воздействующие в G1-S-фазе клеточного цикла на клетки, находящиеся в момент предыдущей инъекции ЦФ в G2-M-фазе клеточного цикла; 2) введение композиции двух типов ДНК, одна из которых, как было доказано в первых разделах цикла, действует разрушительно на опухолевый потенциал перевиваемого графта (СИРК) в фазе NER репарации межпочечных шивок (МЦС), а вторая с тем же эффектом воздействует на опухолевый потенциал трансплантата (СИРК) в фазе HR.

Вторая группа животных этой серии экспериментов не продемонстрировала исчезновения асцита в 100 % случаев (рис. 4, *b2*, кривая *L2*), регрессия наблюдалась только у двух мышей. Интересным оказалось то обстоятельство, что одно животное в этой группе прожило без признаков опухоли до 230-х суток эксперимента. Тем не менее асцит все же проявился и мышь погибла. Однако перевитый асцит, взятый от этой мыши (клетки были живыми и нормальными при цитологическом анализе), не дал ни солидного, ни асцитного повторного трансплантата. Перевиваемая доза составляла 10 млн клеток, что с неизбежностью должно было дать графт. Этот факт свидетельствовал о том, что развившийся асцит был нераковой природы. Полученный результат являлся первым примером полного вылечения экспериментального животного от асцита Krebs-2 с использованием разрабатываемого подхода.

### **Апробация метода терапевтической обработки циклофосфаном и препаратами ДНК человека и лосося асцита Krebs-2 *ex vivo*.**

#### **Шестая серия экспериментов**

Разрушение первичного асцита и длительная задержка появления вторичного асцита у всей группы экспериментальных мышей позволили предположить, что проведенные обработки оказывают воздействие на СИРК. Растворное во времени появление вторичных опухолей свидетельствовало, что произошло количественное изменение числа опухолевых клеток асцита или признака опухоленности. Как уже было сказано, постоянно повторяющееся появление вторичных опухолей могло



**Fig. 3.** Test of different schedules of CP and DNA co-administration to treat established Krebs-2 ascites in mice. The treatments result in partial regression of ascites, remission, and a longer lifespan of ascites-engrafted animals. 1, survival plot for ascites-engrafted mice; 2, average lifespan of animals receiving the treatments (Mann-Whitney U-test); 3, drug delivery protocol.

быть связано с несколькими причинами. Инъекции ДНК проводятся мышам с развившимся в организме животного асцитным раком. Предполагается, что СИРК Кребс-2 обладают способностью индивидуализироваться от опухолевой массы и проникать в другие ткани организма, где они становятся недоступными для атаки фрагментами экстраклеточной интродуцированной ДНК. Также была возможна контаминация тканей брюшной полости СИРК в результате многократных терапевтических прокалываний брюшной стенки. И таким образом, последовательное растянутое во времени появление вторичного асцита может быть обусловлено числом клеток, находящихся в глубине тканей организма и оказавшихся недоступными для прямого контакта с фрагментами дцДНК.

Для проверки этих предположений разработали методику, предполагающую полное и своевременное воздействие на асцитные раковые клетки фрагментами дцДНК в результате одноразового контакта в системе *ex vivo*. В качестве препаратов ДНК выбрали дцДНК человека и лосося в смеси с модифицированной кросс-линкированной формой. Для обработки взяли 200 млн клеток, что соответствовало количеству, содержащемуся в четырехдневном асците (~1,25 мл). Для одних групп первую из 12 обработок препаратом ДНК делали вне организма животного, после чего обработанный *ex vivo* асцит реинтродуцировали в перитонеальную полость мышей той же линии, и мыши получали остальные инъекции препаратов. Другим группам животных клетки опухоли прививали одновременно с первой инъекцией препаратов hDNA или ssDNA. Режимы дальнейших инъекций препаратов дцДНК выбирали в соответствии с ранее полученными результатами (рис. 6, 3).

Оказалось, при использовании большинства режимов в организме животных развиваются катастрофические деструктивные процессы, приводящие к их скоротечной гибели. Во всех группах мыши погибли в течение 3–7 сут после инъекции обработанного асцита (данные не приводятся). В группе мышей «ЦФ + ssDNAmix (1–12) *in vivo*» гибель животных была растянута во времени до 19 сут от момента прививки асцита, у одного животного в течение трех дней даже наблюдали ремиссию опухоли (рис. 6, 1, кривая L2; 2, кривая L2). Для режима «ЦФ + асцит (через 18 ч после ЦФ) + ssDNAmix (18–30)» токсический эффект не проявился. Асцит развивался медленно, мыши гибли последовательно от развитого асцита с 13-х по 42-е сутки (рис. 6, 1, кривая L3, данные также были упомянуты в работе Поттер и др., 2016, рис. 2, в5 для описания режимов воздействия разных препаратов ДНК). Одна мышь была умерщвлена в агонистической фазе симптомокомплекса, у нее полностью отсутствовали признаки асцита или

солидного образования в брюшной полости. У двух мышей вторичный асцит не начал развиваться до 27-го дня от введения обработанного графта (рис. 6, 2, кривая L3). У одного из этих животных при терапевтических инъекциях препарата дцДНК к 24-му дню от начала эксперимента в месте введения иглы сформировался вторичный солидный трансплантат с несколькими узлами вдоль следа введения иглы (рис. 6, 5). Максимальная продолжительность жизни одной мыши составила 42 дня. СПЖ в этой группе в четыре раза превосходила таковую в контроле.

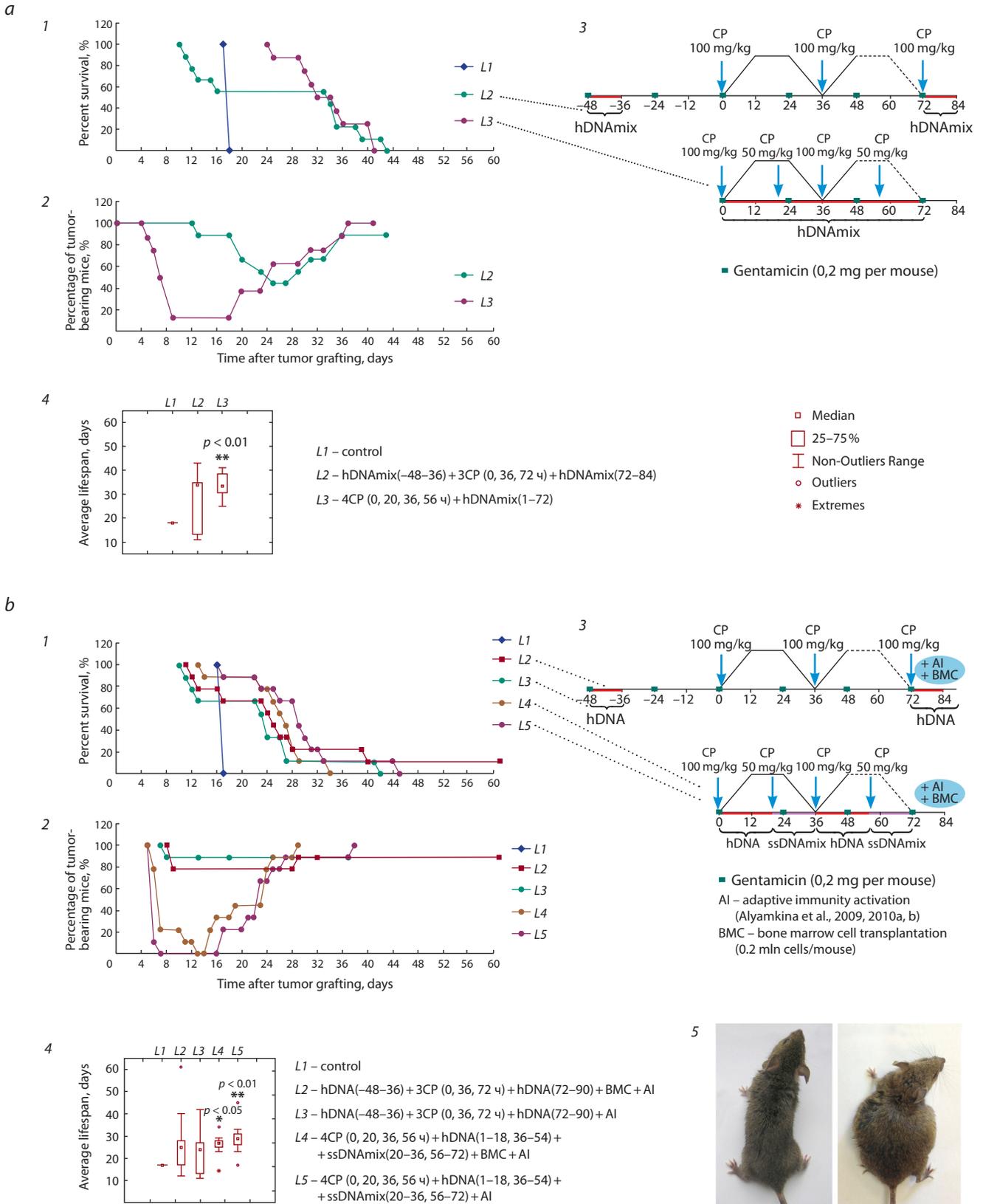
## Обсуждение

Данные, полученные в опытах по лечению мышей с экспериментальным асцитным раком Кребс-2, согласуются с результатами ранее проведенных нами исследований, представленных в публикациях (Dolgova et al., 2014; Alyamkina et al., 2015; Поттер и др., 2016), и могут быть суммированы в следующих выводах.

Вывод 1. В настоящей работе удалось подобрать эффективные режимы, позволяющие полностью вылечить первичный асцит. Время ремиссии опухоли для последней мыши в различных экспериментах составляло до 30 сут. При этом все контрольные мыши погибали в промежутке 5–18 сут после прививки опухоли в зависимости от эксперимента. Наиболее демонстративными являются эксперименты по перевивке 200 млн клеток и терапии с использованием режима «ЦФ + асцит (через 18 ч после ЦФ) + ssDNAmix (18–30)». В данном случае нам удалось увеличить СПЖ мышей в четыре раза по сравнению с контролем и другими режимами и показать, что у животных ремиссия асцита может продолжаться более 30 сут после гибели всех животных от асцита в контрольной группе. Тем не менее, как показывают эксперименты, наиболее значимым терапевтическим эффектом обладают режимы введения нескольких инъекций ЦФ и комбинации двух препаратов дцДНК, направленных на интерференцию двух различных репаративных систем, NER и HR, или воздействующих на СИРК, находящихся в настоящей S-фазе и избежавших действия предыдущего цикла терапии в нечувствительной M-фазе. Подобранные условия позволили добиться полной ремиссии у всех животных группы, которая продержалась 9 сут (рис. 4, б2, кривая L5).

Вывод 2. Несмотря на существенное увеличение продолжительности жизни мышей, только в единственном случае нам удалось задержать развитие вторичного рака на 230 сут (пятая серия экспериментов), после чего асцит, имеющий нераковую природу, все же проявился и мышь погибла.

(а, б) C57Bl mice with 4-day ascites received two injections of CP at 0 hrs and 36 hrs timepoints (100 mg/kg) followed by either native/crosslinked hDNA mix (hDNA/ICL-hDNA 3/1) or native/crosslinked ssDNA mix (ssDNA/ICL-ssDNA 3/1) 1–12 hrs after CP (curve L2). Control mice received no DNA injections (curve L1); (в, г) CBA mice bearing 4-day Krebs-2 ascites received a series of CP injections (at timepoints 0, 20, 36, and 56 hrs and doses 100, 50, 100, 50 mg/kg, respectively) (curve L1, control). Experimental CBA mice with the tumor received a combination of CP injections with either native/cross-linked hDNA mix (hDNA/ICL-hDNA 3/1) or native/cross-linked ssDNA mix (ssDNA/ICL-ssDNA 5/3), respectively. Injections of DNA preparations were done at 1–12 h after the CP injection at time 0 and 24 h prior to the first CP injection (curve L2) in comparison to the control CBA mice (curve L1).



Принципиально можно было предположить несколько возможностей индукции развития ракового (но не связанного с СВР или иным) асцита после обработки препаратом дцДНК, когда на СИРК не оказывается терапевтического элиминирующего воздействия:

- 1) признак интернализации дцДНК, являющийся причиной разрушения туморогенного начала предполагаемых СИРК в синергизме с ЦФ, характерен не для СИРК, а для их коммитированных потомков, а значит, причинная клетка остается интактной;
- 2) не вся популяция СИРК в силу биологических особенностей в один и тот же момент времени способна интернализировать фрагменты дцДНК и, следовательно, избежать синергической элиминации;
- 3) возможно, что, как показано в работе (Dolgova et al., 2013) на стволовых клетках крови, СИРК также могут на время терять туморогенность, а затем восстанавливать ее;
- 4) развитие вторичного асцита также может быть связано с тем, что в определенных случаях не все СИРК «асцитного бульона» разрушаются или меняют свой раковый статус. Это возможно в том случае, когда проведенные обработки не перекрыли в полной мере промежуток времени разрешения интермедиатов, в течение которого происходит интерференция репаративного процесса с последующим разрушением или клетки, или ее свойств, например отрезок времени между 12 и 18 ч;
- 5) известно, что раковые клетки способны к реверсивному перерождению, что означает, что коммитированная раковая клетка в силу определенных причин способна вернуться к фенотипу СИРК (Gupta et al., 2011);
- 6) возможна ситуация генетической трансформации (генометаствазии) стволовых клеток организма мыши генетическим материалом огромного числа погибших раковых клеток асцита Кребс-2 (Garcia-Olmo et al., 2000).

В этих случаях предлагаемым способом принципиально невозможно убить такую клетку и требуются дополнительные варианты воздействия на нее. Тем не менее результаты, приведенные в статьях настоящего цикла, свидетельствуют, что если раковые клетки доступны для действия ЦФ + дцДНК, то благодаря проведенной обработке можно полностью эрадикаровать туморогенный потенциал таких клеток. Это означает, что можно полностью элиминировать или изменить раковый статус СИРК, что приведет к эрадикации первичного асцита и невозможности развития вторичного.

Существуют также две другие возможности сохранения СИРК в тканях организма мыши. Асцитные раковые стволовые клетки в период прорастания перевитого асцитного трансплантата проникают в ткани, где они

становятся недоступными для действия препарата дцДНК (Parsons et al., 1982). Также существует вероятность, что при многократных проколах перитонеальной стенки у мышей в период терапевтических процедур часть СИРК вместе с перемещением иглы доставляется в прокляываемые ткани, где клетки фиксируют свое местоположение и становятся недоступными для дальнейшего воздействия.

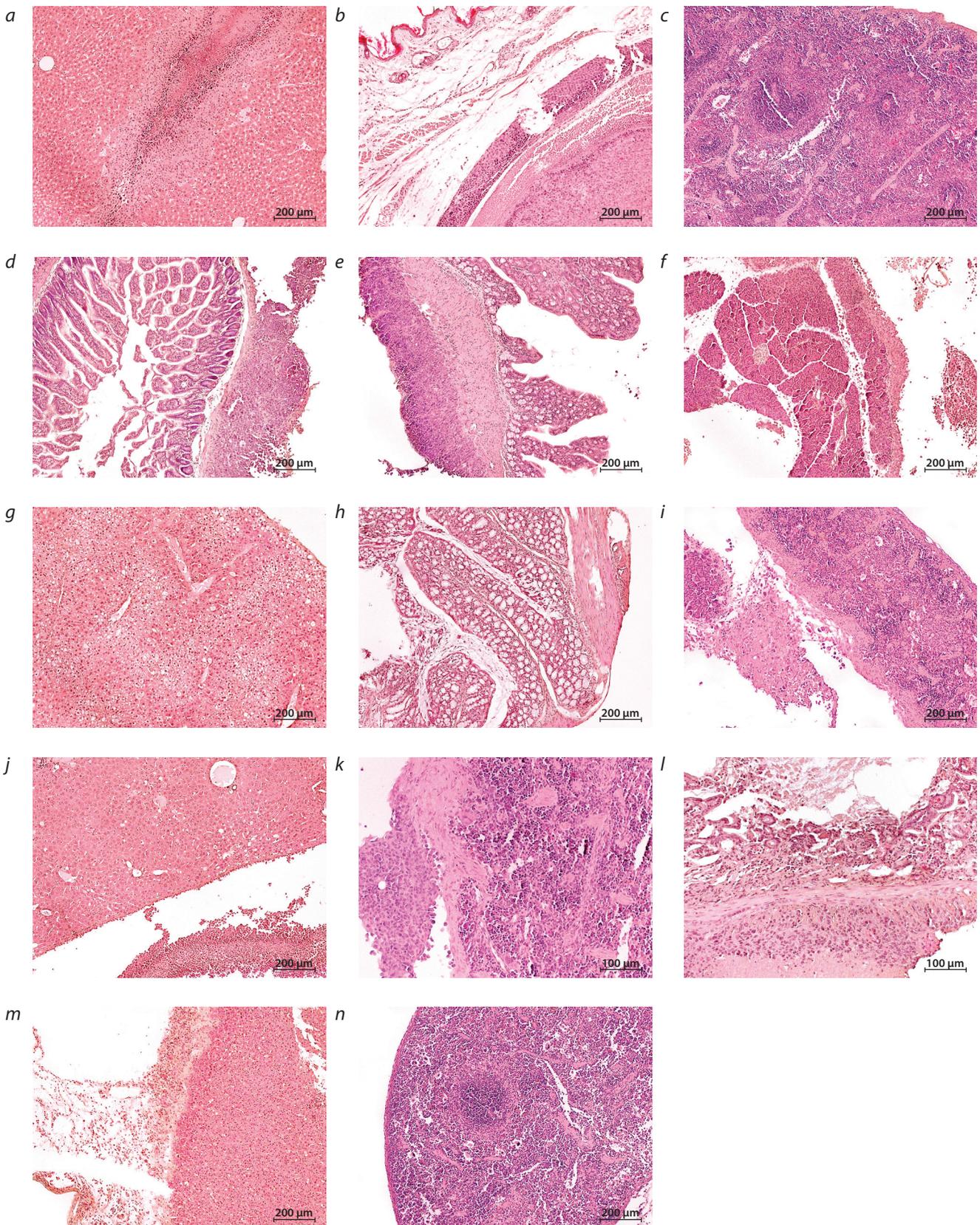
Результаты проведенного исследования в большей мере предполагают, что появление вторичных опухолей связано как с механическим загрязнением перитонеальных тканей СИРК, которые в этом случае становятся недоступными для синергичной терапии, так и с выживанием СИРК. Во многих экспериментах часто наблюдалось появление солидных опухолей в месте ввода иглы при проводимых обработках, которое практически всегда сопровождалось появлением вторичного асцита. Вероятно, что при многократных проколах иглой СИРК захватываются и перераспределяются во внутренних органах мыши, где они недоступны действию препарата дцДНК. Такие клетки и являются возможной причиной развития вторичного ракового асцита. Наглядно такое заражение было продемонстрировано в эксперименте по перевивке 200 млн раковых клеток (рис. 6, 5), в котором четко прослеживаются несколько узлов развития солидной опухоли вдоль пути ввода иглы и появление вторичного асцита.

Вывод 3. Гибель мышей происходит не от вторичных опухолей, а от нескольких одновременно развивающихся патологических процессов. При анализе развития вторичного асцита и соотношении его величины с гибелью животных можно сделать заключение, что гибель мышей не связана с асцитом как таковым. При суммировании результатов всех патоморфологических анализов органов и тканей мышей, погибающих после фазы частичной ремиссии (разные группы из независимых экспериментов текущего раздела цикла исследований), выявлены различные нарушения в структуре тканей и органов (рис. 1).

Патологоанатомический анализ, выполненный для животных, переживших фазу полной ремиссии в развитии асцита (рис. 5), свидетельствует, что примененная терапия является существенно более щадящей для животных, что характеризуется как полной ремиссией основного заболевания, так и увеличением СПЖ.

Характер патологических изменений указывал на развитие в организме экспериментальных животных СВР. Наличие воспалительных процессов определяется на основании гистологического исследования образцов тканей экспериментальных животных. Признаками воспаления со стороны легких являются отек межальвеолярных перегородок, геморрагия, массивная воспалительноклеточная инфильтрация перибронхиальных и периваскулярных

(a) Analysis of the synergistic targeting activity of CP and hDNAmix against 4-day Krebs-2 grafts. Daily injections of gentamicin were added to the treatment schedule. (b) Analysis of the synergistic activity of CP and the hDNAmix/ssDNAmix preparation to eliminate 4-day Krebs-2 grafts from mice. The protocol was supplemented with bone marrow cell transplantation (BM), activation of adaptive immunity (AI), and gentamicin injections to prevent the systemic inflammatory response. 5, Left: A mouse from the hDNA (-48-36) + 3CP (0, 36, 72 h) + hDNA (72-90) + BM + AI group shows no evidence of detectable ascites on day 60 after engraftment. Right: A mouse from the same treatment group on day 39 (one day before death) with a well-developed ascites.



**Fig. 5.** Histopathology of mouse organs and tissues (fi th experimental series). BM, bone marrow cells; AI, adaptive immunity.

**Control group.** (a) Liver. Tumor metastasis divides the sample section in two parts. The border between the tumor and liver parenchyma is indistinct.

No inflamm tory reaction is detectable. (b) Abdominal wall. A large tumorous body found in the skin lacking a distinct border that would separate it from

the adjacent tissue. Tumor cells themselves are considered the border. Tumor cells invade the surrounding muscles. (c) Spleen. Tumor cells are scattered over

пространств; со стороны печени – деструкция гепатоцитов, мелкие очаги лимфоидноклеточной инфильтрации внутри долек и по ходу портальных трактов. Обнаруженные нами патоморфологические изменения в других органах, как следует из аналогий с патоморфологическими данными, полученными на человеческом материале, также являются следствием масштабного воспалительного процесса. В некоторых случаях посев асцитной жидкости и крови свидетельствовал о мощном инфекционном заражении животных.

Общая картина происходящих событий могла означать, что в ходе проведенных обработок в результате масштабного апоптоза и вторичного некроза асцитных клеток и лимфоцитов, вызванных действием экзогенной дцДНК, индуцируется СВР и разрушается эпителий кишечника. Генерализованное воспаление приводит к иммунному коллапсу, как это следует из патоморфологического анализа органов экспериментальных мышей. Одновременно на фоне эрозии эпителия стенки кишечника разрушается гастроэнтерический барьер и развивается сепсис, что вместе в конечном счете приводит к ПОН и гибели животных. Эрозия эпителия кишечника, по всей видимости, сопровождается существенными нарушениями в усвоении пищи, что приводит к катастрофическому снижению веса животных, что также вносит свой вклад в летальный исход. При этом прослеживается ярко выраженное редуцирующее воздействие на перевитый трансплантат.

В клинической реанимационной практике известно, что аналогичные изменения в органах и тканях человека являются следствием их тяжелейших функциональных нарушений, обусловленных или быстрым масштабным разложением тканей и возникновением СВР, или инфекционным сепсисом, также следующим за СВР. Для того чтобы наиболее полно определить местоположение возникающего вторичного асцита, в идеологии разрабатываемой стратегии необходимо дать краткую характеристику процесса СВР и сепсиса, возникающего

вследствие акцидентального масштабного разрушения тканей организма.

Известно, что масштабное скоротечное разрушение тканей организма и сопровождающий его развивающийся воспалительный процесс приводят к возникновению сепсиса (Bleiblo et al., 2012). В данном аспекте можно построить следующую логическую линию событий, происходящих в организме экспериментальных мышей, прошедших обработку разрабатываемым терапевтическим режимом. Синергичное действие ЦФ и препарата дцДНК приводит к апоптозу нескольких миллиардов раковых клеток, который завершается вторичным некрозом огромной массы апоптотировавших клеток. Перитонеальное пространство животного заполняется ДНК и ее комплексами с белками, и в частности нуклеосомами, что сопровождается развитием СВР и сепсисом.

Известно, что ДНК в любой форме является мощным воспалительным фактором. Показано, что нуклеосомы индуцируют масштабный некроз лимфоцитов (Decker et al., 2003). Также известно, что инъекции большого (1–8 мг/мышь) количества ДНК различного происхождения индуцируют масштабный апоптоз костномозговых предшественников, в некоторых случаях достигающий 98 % (Dolgova et al., 2012). Приводятся данные, что экстракционная ДНК вызывает синтез и секрецию фактора В комплемента и функционально ассоциирует с C1q комплемента (Kaczorowski et al., 2012). В плазме крови всегда функционирует система комплемента. Также в плазме крови, лимфе и интерстициальных жидкостях всегда присутствует определенное физиологическое количество дцДНК (Anker et al., 1999; Jahr et al., 2001; Laktionov et al., 2004). Вместе с этим В-лимфоциты памяти всегда секретуют базовый уровень антител против этих имманентно присутствующих нуклеиновых кислот (Туаева и др., 2006). Вероятно, что этап немедленной реакции на акцидентально появившиеся фрагменты дцДНК связан с двумя независимыми событиями. Установлено, что C1q комплемент

the spleen capsule, forming an interrupted fence-like cell layer. Lungs appear structurally normal. (d) Small intestine. Encased by a large tumor fragment. Other than that, no pathological or structural changes in the small intestine or its wall are seen. (e) Large intestine. The situation is identical to that observed in the small intestine sample. A tumor fragment encases the intestine. Spleen. Atrophy of follicles is notable. (f) Pancreas. Invasive growth of the tumor. Lungs. No visible histopathological changes.

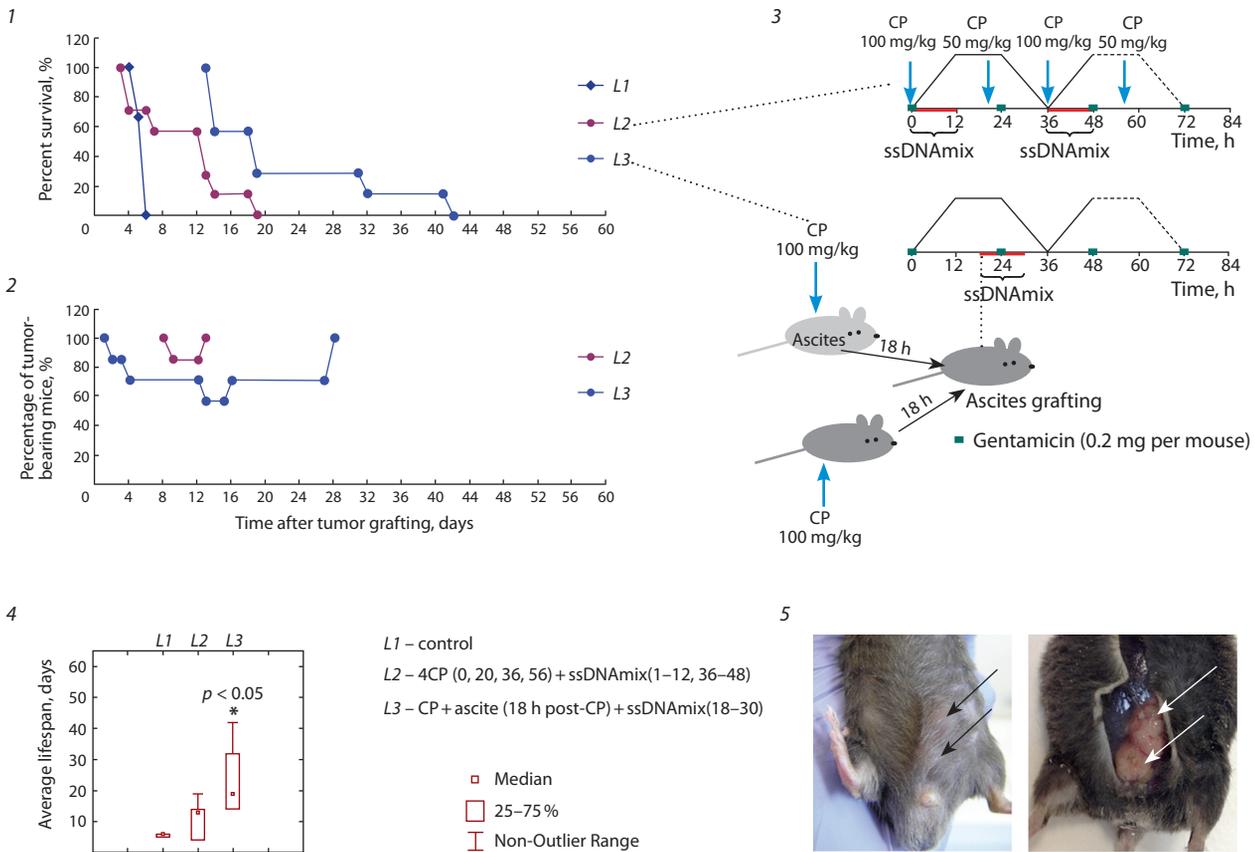
**Group hDNA (–48–36) + 3CP (0, 36, 72) + hDNA (72–90) + BM + AI.** Lungs: The structural organization of lung parenchyma appears normal. (g) Liver. Diffuse vacuolar degeneration of hepatocytes. Necrotic debris is visible on one of the external surfaces of the organ. (h) Large intestine: changes consistent with necrotizing colitis. The mucosa is completely degenerated.

**Group hDNA (–48–36) + 3ЦФ (0, 36, 72) + hDNA (72–90) + AI.** Lungs: no pathological changes observed. Cardiac muscle: no pathological changes. Spleen. Splenic lymph follicles are absent. Tumor metastases are scattered over the organ. Some of them appear necrotic. (i) Spleen. Atrophy of white pulp follicles. A metastatic tumor is attached from outside. Liver: no pathological changes. Small intestine: cancer metastasis showing necrotic foci is attached to the serous membrane of the intestine. The organ itself appears normal. Large intestine: structurally normal.

**Group 4CP (0, 20, 36, 56) + hDNA (1–18, 36–54) + ssDNA (20–36, 56–72) + BM + AI.** Lungs: no pathological changes. (j) Liver. The liver parenchyma is structurally normal. One of the regions of the liver capsule bears a loose attachment site of a cancer metastasis. (k) Spleen. No lymph follicles are detectable. Cancer cells are randomly scattered over the capsule surface. (l) Small intestine. A large metastatic tumor is attached to the serous membrane of the organ. The mucosa of the small intestine is damaged. It appears consistent with necrotizing enteritis. Large intestine: no pathological changes observed.

**Group 4CP (0, 20, 36, 56) + hDNA (1–18, 36–54) + ssDNA (20–36, 56–72) + AI.** (m) Liver. Necrotic debris, apparently unrelated to the organ itself, is present on the outer surface. No histopathological changes found. The liver is structurally normal. Lungs: parenchyma is structurally normal. (n) Spleen: a white pulp depletion pattern (The whole slide shows a single follicle).

**Conclusion.** Cancer spread is mostly confined to the abdominal cavity. Metastases in the liver that spread along the serous membranes were found only in the control mice. Cancer cells are invariably found on the serous membranes sheathing abdominal organs: spleen, liver, intestine, pancreas, kidneys. They never cross the connective tissue of the capsule to invade the organ.



**Fig. 6.** Analysis of various treatment schedules (CP+/-ssDNAmix) for C57Bl mice injected with  $0.2 \times 10^9$  Krebs-2 ascites cells with transplants failing to develop into ascites: 1, survival plot for animals from control (CP only) and experimental groups; 2, remission in experimental tumor-bearing animals; 3, treatment schedules; 4, average lifespan (Mann-Whitney U-test); 5, the last surviving mouse from the CP + ascites (18 h post-CP) + ssDNAmix (18–30) group. Left: day 36, solid tumor development. Right: day 42, post-mortem examination of the same mouse. The solid tumor is visible as separate nodules located along the drug injection trajectory, which was the most likely cause of the secondary ascites.

может напрямую связывать фрагменты дцДНК (Jiang et al., 1992; Tissot et al., 2003; Garlatti et al., 2010), и можно предположить, что такая реакция немедленно осуществляется при появлении в организме избытка дцДНК. Антитела против дцДНК также немедленно маркируют появившийся антиген в форме фрагментов дцДНК. Именно в этот момент происходит первая атака на антиген, в которой участвуют система комплемента и антитела к дцДНК. C1q напрямую или через связь с Fs антител, ассоциированных с фрагментами дцДНК, активирует систему комплемента. Не ассоциированный с патогеном дцДНК-C1 комплекс расщепляет цитоплазматический C3, который немедленно связывается с любым близкорасположенным субстратом (мембрана соматической клетки организма) своей реактивной тиоэфирной группой. Формируется мембран-атакующий комплекс (МАК). Происходит лизис собственных клеток, и образуются многочисленные очаги некроза, которые на патологоанатомических срезах выглядят как множественные лимфоидно-клеточные воспалительные инфильтраты (Dolgoва et al., 2012, настоящее исследование). Указанные выше события приводят к усилению

идущего воспалительного процесса и формированию акселеративной петли. Погибшие в результате некроза клетки выбрасывают в околоклеточную среду мощные медиаторы воспаления. Комплекс дцДНК-C1q комплемента запускает активность C3 конвертазы. Повышение уровня циркулирующего фактора В комплемента приводит к более эффективному связыванию любых собственных этому фактору лигандов, а также активации C3 конвертазы на мембранах собственных клеток, что ведет к формированию МАК, осмотическому разрыву клетки и опять к высвобождению медиаторов воспаления. Индуцируется СВР, сопровождаемая синдромом диссеминированного свертывания крови. По мере прогрессирования патологии развивается синдром ПОН, сопровождаемый гибелью животных (Гаврилов, 1981).

В результате работы найден и охарактеризован такой режим воздействия на асцит Krebs-2, при котором происходит полная регрессия асцита, а время ремиссии для всей группы составляет 7–9 сут. Главным в этом режиме являются два обстоятельства: 1) несколько инъекций ЦФ, дополнительно воздействующего в G1-S-фазе клеточного

цикла на клетки, находящиеся в момент предыдущей инъекции ЦФ в G2-M-фазе клеточного цикла, и повторно запирающиеся в S-фазе готовящиеся выйти из нее клетки первой очереди воздействия; 2) введение двух композиций ДНК, одна из которых, как было доказано в первых разделах цикла, действует разрушительно на опухолевый потенциал перевиваемого графта (СИРК) в фазе NER репарации МЦС, а вторая с тем же эффектом воздействует на опухолевый потенциал трансплантата (СИРК) в фазе HR.

Продолжение исследования должно быть акцентировано на следующих направлениях.

1. Сокращение до минимума (одно) количества терапевтических прокалываний той части организма мышей, в которой располагается асцитная жидкость (поиск режима единичной инъекции, приводящей к разрушению первичного асцита, подкожные инъекции антибиотика, снижение дозы препаратов дцДНК и, тем самым, частоты их введения за счет ассоциации фрагментов с протаминам (Долгова и др, 2009)).

2. Разработка дополнительных процедур воздействия на вторичный рак и развивающуюся СВР, а именно: иммунотерапия обученными дендритными клетками, Т8+/перфорин+ лимфоцитами или макрофагами и разработка процедур, купирующих развитие СВР и ПОН, на базе реанимационной практики, используемой при лечении аналогичных состояний у человека.

Полученные в настоящей работе результаты предполагают возможность существования режима, технически простого и терапевтически эффективного, позволяющего конечно элиминировать асцит Krebs-2. Успешная доработка терапевтического режима эрадикации асцита Krebs-2 в дальнейшем позволит экстраполировать полученные данные на лечение различных видов злокачественного асцита у человека.

## Acknowledgments

This work was done as part of State Contract 0324-2015-0003.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Likhacheva A.S., Rogachev V.A., Sebeleva T.E., Nikolin V.P., Popova N.A., Kiseleva E.V., Orishchenko K.E., Sakhno L.V., Gel'fgat E.L., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Zagrebelny S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Exogenous allogenic fragmented double-stranded DNA is internalized into human dendritic cells and enhances their allostimulatory activity. *Cell Immunol.* 2010a; 262:120-126. DOI 10.1016/j.cellimm.2010.01.005

Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Likhacheva A.S., Rogachev V.A., Sebeleva T.E., Nikolin V.P., Popova N.A., Orishchenko K.E., Strunkin D.N., Chernykh E.R., Zagrebelny S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Combined therapy with cyclophosphamide and DNA preparation inhibits the tumor growth in mice. *Genet. Vaccines Ther.* 2009;7(1):12. DOI 10.1186/1479-0556-7-12

Alyamkina E.A., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Gvozdeva T.S., Dolgova E.V., Orishchenko K.E., Rogachev V.A., Sidorov S.V., Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Effects of human exogenous DNA on production of perforin-containing CD8+ cyto-

toxic lymphocytes in laboratory setting and clinical practice. *Cell Immunol.* 2012;276:59-66. DOI 10.1016/j.cellimm.2012.04.004.

Alyamkina E.A., Leplina O.Y., Sakhno L.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Efremov Y.R., Shilov A.G., Proskurina A.S., Orishchenko K.E., Dolgova E.V., Rogachev V.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Zagrebelny S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Effect of double-stranded DNA on maturation of dendritic cells in vitro. *Cell Immunol.* 2010b;266:46-51. DOI 10.1016/j.cellimm.2010.08.011

Alyamkina E.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Orishchenko K.E., Efremov Y.R., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Sidorov S.V., Ponomarenko D.M., Zagrebelny S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. A strategy of tumor treatment in mice with doxorubicin-cyclophosphamide combination based on dendritic cell activation by human double-stranded DNA preparation. *Genet. Vaccines Ther.* 2010c;8(1)(7). DOI 10.1186/1479-0556-8-7.

Alyamkina E.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Minkevich A.M., Kozel A.V., Dolgova E.V., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Andrushkevich O.M., Taranov O.S., Omigov V.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Vereschagin E.I., Kiseleva E.V., Zhukova M.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Combination of cyclophosphamide and double-stranded DNA demonstrates synergistic toxicity against established xenografts. *Cancer Cell Int.* 2015;15(32). DOI 10.1186/s12935-015-0180-6

Anker P., Mulcahy H., Chen X.Q., Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18(1):65-73.

Bespalov V.G., Zhabin A.A., Stukov A.N., Belyaeva O.A., Murazov Y.G., Semenov A.L., Konkov S.A., Krylova I.M. Synergistic antitumor effect of dioxodate and cisplatin on the model of ovarian ascites tumor. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology.* 2013;1:42-46.

Bleiblo F., Michael P., Brabant D., Ramana C.V., Tai T., Saleh M., Parrillo J.E., Kumar A. The role of immunostimulatory nucleic acids in septic shock. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2012;5. ISSN:1940-5901/IJCEM1112008.

Blohin N.N., Perevodchikova N.I. *Khimioterapiya opukholevykh zabollevaniy [Chemotherapy of neoplastic diseases]*. Moscow, Meditsina, 1984.

Brenner D.E. Intraperitoneal chemotherapy: a review. *J. Clin. Oncol.* 1986;4(7):1135-1147.

Decker P., Wolburg H., Rammensee H.G. Nucleosomes induce lymphocyte necrosis. *Eur. J. Immunol.* 2003;33(7):1978-1987. DOI 10.1002/eji.200323703

Dolgova E.V., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Tyrinova T.V., Kozel A.V., Minkevich A.M., Andrushkevich O.M., Zavyalov E.L., Romaschenko A.V., Bayborodin S.I., Taranov O.S., Omigov V.V., Shevela E.Y., Stupak V.V., Mishinov S.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Mayorov V.I., Shurdov M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Identification of cancer stem cells and a strategy for their elimination. *Cancer Biol. Ther.* 2014;15(10):1378-1394. DOI 10.4161/cbt.29854

Dolgova E.V., Efremov Y.R., Orishchenko K.E., Andrushkevich O.M., Alyamkina E.A., Proskurina A.S., Bayborodin S.I., Nikolin V.P., Popova N.A., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Taranov O.S., Omigov V.V., Minkevich A.M., Rogachev V.A., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Delivery and processing of exogenous double-stranded DNA in mouse CD34+ hematopoietic progenitor cells and their cell cycle changes upon combined treatment with cyclophosphamide and double-stranded DNA. *Gene.* 2013;528(2):74-83. DOI 10.1016/j.gene.2013.06.058

Dolgova E.V., Proskurina A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Alyamkina E.A., Orishchenko K.E., Rogachev V.A., Efremov Y.R., Dubatolova T.D., Prokopenko A.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Taranov O.S., Omigov V.V., Zagrebelny S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. "Delayed death" phenomenon: A synergistic action of cyclophosphamide and exogenous DNA. *Gene.* 2012;495(2):134-145. DOI 10.1016/j.gene.2011.12.032

- Dolgova E.V., Rogachev V.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Likhacheva A.S., Alyamkina E.A., Sebeleva T.E., Chernykh E.R., Gelfgat E.L., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Leukostimulatory effect of exogenous DNA fragments protected by protamine in mice in the case of myelosuppression caused by cyclophosphamide. *Voprosy onkologii=Problems in Oncology*. 2009;55(6):761-764.
- Garcia-Olmo D., Garcia-Olmo D.C., Ontanon J., Martinez E. Horizontal transfer of DNA and the "genometastasis hypothesis". *Blood*. 2000;95(2):724-725.
- Garlatti V., Chouquet A., Lunardi T., Vives R., Paidassi H., Lortat-Jacob H., Thielens N.M., Arlaud G.J., Gaboriaud C. Cutting edge: C1q binds deoxyribose and heparin sulfate through neighboring sites of its recognition domain. *J. Immunol*. 2010;185(2):808-812. DOI 10.4049/jimmunol.1000184.
- Gavrilov O.K. *Problemy i gipotezy v uchenii o svertyvanii krovi [Problems and Hypotheses in the Study of Blood Coagulation]*. Moscow, Meditsina, 1981.
- Gupta P.B., Fillmore C.M., Jiang G., Shapira S.D., Tao K., Kuperwasser C., Lander E.S. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell*. 2011;146(4):633-644. DOI 10.1016/j.cell.2011.07.026
- Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F.O., Hesch R.D., Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001;61(4):1659-1665.
- Jiang H., Cooper B., Robey F.A., Gewurz H. DNA binds and activates complement via residues 14-26 of the human C1q A chain. *J. Biol. Chem*. 1992;267(35):25597-25601.
- Kaczorowski D.J., Scott M.J., Pibris J.P., Afrazi A., Nakao A., Edmonds R.D., Kim S., Kwak J.H., Liu Y., Fan J., Billiar T.R. Mammalian DNA is an endogenous danger signal that stimulates local synthesis and release of complement factor B. *Mol. Med*. 2012;18(1):851-860. DOI 10.2119/molmed.2012.00011
- Laktionov P.P., Tamkovich S.N., Rykova E.Y., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Sumarokov S.V., Kolomiets S.A., Sevostianova N.V., Vlassov V.V. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids*. 2004;23(6-7):879-883.
- Light R.W. *Pleural Disease*. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins, 1980. (Russ. ed.: Layt R.U. *Bolezni plevry*. Moscow, Medicina, 1986:106-119).
- Parsons D.F., Marko M., Braun S.J., Wansor K.J. Ascites tumor invasion of mouse peritoneum studied by high-voltage electron microscope stereoscopy. *Cancer Res*. 1982;42(11):4574-4583.
- Potter E.A., Dolgova E.V., Minkevich A.M., Efremov Ya.R., Taranov O.S., Omigov V.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Vereschagin E.I., Kozel A.V., Rogachev V.A., Petrov D.B., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Therapeutic effects of cyclophosphamide, dsDNA preparations and their combinations against Krebs-2 ascites cancer cells and various cancer transplants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii=Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(1):96-107. DOI 10.18699/VJ15.116
- Stenina M.B. Controversial issues in the treatment of ovarian cancer. *Trudnyy patsient: spetsvypusk "Onkologiya"=An inveterate patient: Oncology*. 2006;4(11):9-14.
- Tissot B., Daniel R., Place C. Interaction of the C1 complex of the complement with sulfated polysaccharide and DNA probed by single molecule fluorescence microscopy. *Eur. J. Biochem*. 2003;270(23):4714-4720.
- Tuaeva N.O., Sofronov V.V., Amikeeva V.A., Abramova Z.I., Winter V.G., Mustafina D.M., Tutochkina K.V. Interconnection of extracellular DNA concentration in blood plasma and amount of antibodies to native DNA in newborns with pneumopathy. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal=Kazan Medical Journal*. 2006;87(4):254-257.
- Volkova O.V., Eleckii Yu.K. *Osnovy gistologii i gistologicheskoy tekhniki [The Fundamentals of Histology and Histological Technique]*. Moscow, Meditsina, 1971.