

Терапевтические эффекты воздействия циклофосфана, препаратов двуцепочечной ДНК и их сочетания на раковые клетки асцита Кребс-2 и различные формы трансплантатов

Е.А. Поттер¹, Е.В. Долгова¹, А.М. Минкевич¹, Я.Р. Ефремов^{1,2}, О.С. Таранов³, В.В. Омигов³, В.П. Николин¹, Н.А. Попова^{1,2}, А.С. Проскурина¹, Е.И. Верещагин⁴, А.В. Козел^{1,2}, В.А. Рогачев¹, Д.Б. Петров⁵, А.А. Останин⁶, Е.Р. Черных⁶, Н.А. Колчанов¹, С.С. Богачев¹

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

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

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

⁴ Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия

⁵ Общество с ограниченной ответственностью торговый дом «Терморобот», Новосибирск, Россия

⁶ Институт клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

В настоящее время считается доказанным существование в массе опухолевых клеток стволовых раковых клеток, обуславливающих прогрессию опухоли и ее устойчивость ко многим химиотерапевтическим цитостатикам. Предлагаемая работа является первой в цикле статей, характеризующих разработку стратегии противораковой терапии, основанной на элиминации стволовых раковых клеток. В исследовании охарактеризовано циторедукующее действие инъекций циклофосфана (ЦФ), двуцепочечной ДНК (дцДНК) и их сочетания на популяцию туморогенных клеток асцитной опухоли Кребс-2 (стволовые иницирующие раковые клетки, СИРК) мыши. Оценен перевивочный потенциал раковых клеток Кребс-2, обрабатываемых *in vivo* в мышцах-асцитоносах линии СВА, с последующей перевивкой обработанных клеток в форме солидного графта реципиентным мышам той же линии. Данные по перевивке обработанного ЦФ и ДНК асцита Кребс-2 позволяют предположить, что СИРК можно полностью элиминировать из развитого асцита. Показано, что клетки, интернализирующие дцДНК и одновременно позитивные по CD34, более чувствительны к синергичному воздействию ЦФ и препаратов дцДНК. Обработка асцита Кребс-2 ДНК человека в интервал времени 1–12 ч после инъекции ЦФ элиминирует клетки, захватывающие TAMRA-меченую ДНК (СИРК), или меняет их функциональное состояние, что сопровождается исчезновением поверхностного маркера CD34. Установлено, что 18 ч после введения ЦФ является переломной точкой репаративного процесса, разделяющей его на два временных отрезка: NER (nucleotide excision repair, эксцизионная репарация нуклеотидов) + процессинг двуцепочечных концов и гомологическую рекомбинацию (ГР). Оба временных интервала могут быть эффективно использованы для разрушения туморогенного потенциала трансплантата. ЦФ в виде монопрепарата оказывает наиболее эффективное редуцирующее действие на развитие асцитного трансплантата в режиме нескольких инъекций. Для достижения максимальной эффективности время повторного введения цитостатика должно накладываться на время достижения раковыми клетками фазы G1-S, находящимися при первой инъекции ЦФ в фазе G2-M, и (или) на время активной фазы ГР.

Ключевые слова: двуцепочечная ДНК; циклофосфан; асцит Кребс-2; стволовые иницирующие раковые клетки; NER; гомологическая рекомбинация; перевивочный потенциал.

Therapeutic effects of cyclophosphamide, dsDNA preparations and their combinations against Krebs-2 ascites cancer cells and various cancer transplants

E.A. Potter¹, E.V. Dolgova¹, A.M. Minkevich¹, Ya.R. Efremov^{1,2}, O.S. Taranov³, V.V. Omigov³, V.P. Nikolin¹, N.A. Popova^{1,2}, A.S. Proskurina¹, E.I. Vereschagin⁴, A.V. Kozel^{1,2}, V.A. Rogachev¹, D.B. Petrov⁵, A.A. Ostanin⁶, E.R. Chernykh⁶, N.A. Kolchanov¹, S.S. Bogachev¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

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

⁴ Novosibirsk State Medical Academy, Novosibirsk, Russia

⁵ LLC «Termorobot» Novosibirsk, Russia

⁶ Institute of Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

The existence of a small subset of cancer cells referred to as tumor initiating stem cells (TISCs) largely responsible for tumor progression and resistance to chemotherapeutic cytostatic drugs represents a recent important paradigm shift. The present work is the first report in a series of papers from our group where we describe the development of anticancer therapy based on the selective targeting of TISCs. Here we characterize a cytoreductive activity of cyclophosphamide (CP), double-stranded DNA (dsDNA) and their combinations against the TISC population present in mouse Krebs-2 ascites. We evaluated the engraftment potential of Krebs-2 cancer cells treated in ascites-bearing mice *in vivo*, followed by re-engraftment to congenic recipient mice in the form of a solid graft. These data indicate that, with our approach, TISCs can be completely eliminated even from a well-established ascites. We demonstrate that dsDNA-internalizing and CD34-positive cells are more sensitive to the synergistic

effects of CP and dsDNA. Treatment of Krebs-2 ascites with human DNA at hours 1–12 post CP injection results in either elimination of cells that internalize TAMRA-labeled DNA (TISCs) or alterations in their phenotype, which is accompanied by the loss of surface expression of CD34. Next, we show that the timepoint 18 hrs post CP treatment is critical to the ongoing repair process in that it divides the repair into two phases: nucleotide excision repair + dsDNA break repair and homologous recombination. Importantly, both of these phases can be conveniently used for targeting the tumorigenic potential of the graft. In the context of monotherapy, CP is most effective against ascites grafts when administered as serial injections. To achieve maximum efficacy, the timing of consecutive injections must match the time when cancer cells found at G2-M during the first injection enter G1-S and/or the time of active repair via homologous recombination.

Key words: double-stranded DNA; cyclophosphamide; Krebs-2 ascites; tumor-initiating cancer stem cells; NER; homologous recombination; engraftment potential.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Поттер Е.А., Долгова Е.В., Минкевич А.М., Ефремов Я.Р., Таранов О.С., Омигов В.В., Николин В.П., Попова Н.А., Проскурина А.С., Верещагин Е.И., Козел А.В., Рогачев В.А., Петров Д.Б., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Богачев С.С. Терапевтические эффекты воздействия циклофосфана, препаратов двуцепочечной ДНК и их сочетания на раковые клетки асцита Кребс-2 и различные формы трансплантатов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):96-107. DOI 10.18699/VJ15.116

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

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 Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):96-107. DOI 10.18699/VJ15.116

В наших предыдущих работах было показано, что как предварительные обработки животных цитостатиком циклофосфаном (ЦФ) и препаратом двуцепочечной ДНК (дцДНК), так и инъекции этих препаратов животным с уже привитыми солидными опухолями приводят к достоверному торможению роста экспериментальных злокачественных опухолей Кребс-2, LS, RLS (Алямкина и др., 2009, Alyamkina et al., 2009, 2010). Целью настоящего цикла исследований являлась разработка режима синергичного противоракового действия цитостатика ЦФ и препарата дцДНК в терапии асцитного рака мышей Кребс-2. Доставка терапевтических агентов, в частности препаратов дцДНК, в солидные опухоли затруднена ввиду слабой васкуляризации тканей. В связи с этим в настоящем цикле работ в качестве модельной опухоли использовали асцитную форму карциномы Кребс-2 мыши. Эта злокачественная опухоль слабо иммуногенна, не дает метастазов и является линейнонеспецифичной, что позволяет перевивать ее разным линиям мышей. Цитостатик ЦФ выбрали как базовый, широко применяемый в программной полихимиотерапии алкилирующий агент, индуцирующий межцепочечные сшивки (МЦС) ДНК в активно делящихся клетках опухоли.

Злокачественный (малигнизированный) асцит – это патологическое накопление жидкости в брюшной или плевральной полости, развивающееся вследствие опухолевого поражения брюшины или легких. Малигнизированный асцит наиболее часто развивается при раке молочной железы, яичников, желудка, поджелудочной железы, толстой кишки. Асцитная форма рака относится к неизлечимым заболеваниям и характеризует терминальную стадию раз-

вития болезни. В терапии асцитных форм рака используются несколько поддерживающих общепринятых способов, позволяющих улучшить «качество» жизни паллиативных пациентов (Блохин, Переводчикова, 1984; Лайт, 1986; Brenner, 1986; Стенина, 2006; Беспалов и др., 2013).

Разработка терапевтического режима, при котором происходит эрадикация асцитного рака, приводящего к полному излечению экспериментальных животных, могло бы значить, что произошел качественный скачок в терапии рака.

В работах (Dolgova et al., 2013, 2014) описано два явления, имеющих, по всей видимости, общебиологическое значение. Установлено, что низкодифференцированные клетки различного генеза, включая стволовые иницирующие раковые клетки (СИРК), способны естественным путем интернализировать фрагменты экстраклеточной дцДНК. Эти фрагменты, находясь в клетке во время процесса репарации межцепочечных сшивок, индуцированных действием ЦФ, интерферируют репаративный процесс таким образом, что перевиваемый графт экспериментальной опухоли Кребс-2 мыши теряет туморогенные свойства. Механизм интернализации фрагментов дцДНК в клетки к настоящему моменту не выяснен и представляет интерес для дальнейших исследований.

Первоначальной задачей настоящей работы была оценка циторедукрующего воздействия ЦФ и препаратов ДНК на СИРК, характеризующиеся захватом TAMRA-меченой ДНК, с использованием дополнительного маркера этих клеток CD34 (Dolgova et al., 2014).

Для характеристики режимов противоракового действия ЦФ и препаратов дцДНК мы оценивали тумороген-

ный перевивочный потенциал раковых клеток Кребс-2, обработанных *in vivo* в мышах-асцитозах, путем перевивки таких клеток в виде солидных аллогенных трансплантатов реципиентным мышам той же линии. В работе протестировали различные режимы перевивки и количества перевиваемых клеток. Дополнительно охарактеризовали терапевтическое действие различных режимов введения ЦФ в виде монопрепарата мышам-асцитозам.

Материалы и методы

Подробная информация о методах исследования, экспериментальных животных, опухолевой модели, получении препарата ДНК человека и лосося (препарат ДНК лосося получали аналогичным образом из молок лосося), подготовке кросс-линкированного нитроген-мустардом препарата ДНК представлена в статье Alyamkina et al., 2015.

Введение препаратов циклофосфана и экзогенной ДНК

Цитостатик циклофосфан вводили мышам внутривентрально (в/б) в дозе 100–200 мг/кг массы тела в зависимости от эксперимента. Препараты фрагментированной ДНК (hDNA и ssDNA) и ДНК, обработанной нитроген-мустардом (ICL-hDNA и ICL-ssDNA), вводили в/б в дозе 0,5–1 мг на инъекцию ежедневно или каждые два часа (суммарно по 6 мг ДНК на мышь). Временные интервалы введения препаратов либо описали непосредственно в тексте, либо изобразили схематически на соответствующих рисунках (например, рис. 5).

Определение количества CD34+ клеток в асцитной форме опухоли Кребс-2 при помощи проточной цитометрии и микроскопического анализа

Клетки асцита Кребс-2 отбирали у животных после соответствующих обработок, промывали раствором PBS и осаждали при 400 g в течение 5 мин при 4 °С. После осаждения центрифугированием клетки ресуспендировали в PBS с 0,1 % NaN₃, 1 % FBS (Fetal Bovine Serum, HyClone, США) и подсчитывали в камере Горяева. К 1 млн клеток добавляли 4 мкг антител (FITC Rat anti-Mouse CD34, BD Pharmingen, США), 4 мкг изотип-контроля (FITC Rat IgG2a, Isotype Control, BD Pharmingen, США) и инкубировали в течение 40 мин при 4 °С в 200 мкл среды. Далее долю CD34+ клеток (%) определяли двумя способами. Первый: при помощи проточного цитофлуориметра BD FACSAria относительно результатов изотип-контроля в каждом образце. Второй: обработанные указанным выше способом клетки асцита Кребс-2 промывали PBS, наносили цитоспином на предметное стекло (1 000 об/мин в течение 1 мин), на полученный препарат наносили ~10 мкл Antifade DABCO, накрывали покровным стеклом и анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа Axioskop 2 Plus (Zeiss) с использованием программы AxioVision.

Мечение ДНК флуорохромом TAMRA

Метод мечения ДНК флуорохромом TAMRA в реакции ПЦР подробно описан в статье (Dolgova et al., 2014).

Анализ перевивочного потенциала клеток асцита Кребс-2, обработанных *in vivo*

Мыши с развитым асцитом Кребс-2 (4–7 сут после прививки) получали инъекции цитостатика ЦФ (100–200 мг/кг) и препаратов ДНК (суммарно по 6 мг по схеме, приведенным в каждом конкретном эксперименте). В определенный интервал времени после проведенных обработок у животных отбирали асцитную жидкость, из нее при 400 g осаждали клетки в течение 5 мин при 4 °С, подсчитывали их в камере Горяева и перевивали в 100 мкл среды RPMI-1640 или PBS в заднюю правую лапу интактных животных. Количество перевиваемых клеток в экспериментах варьировали. Животным контрольных групп перевивали аналогичное количество клеток асцита Кребс-2, не подвергнутого обработкам.

Анализ перевивочного потенциала клеток асцита Кребс-2, обработанных *ex vivo* препаратом ДНК и находящимся под воздействием циклофосфана

Отличие настоящего подхода от предыдущего заключается в том, что экспериментальным животным одновременно прививали клетки асцита Кребс-2 в количестве, соответствующем количеству клеток, содержащихся в четырехсуточном асците, развившемся в мышь после прививки 2 млн клеток (~200 млн клеток).

Мышь с заранее привитым развитым асцитом получала инъекцию ЦФ в дозе 100 мг/кг. Через 18 ч у нее отбирали асцитную жидкость, клетки осаждали при 400 g в течение 5 мин и подсчитывали в камере Горяева. Далее эти клетки соединяли со смесью препаратов ICL-ssDNA/ssDNA (3/5) из расчета 0,5 мг/мышь и прививали по 200 млн клеток экспериментальным животным, получившим также предварительную инъекцию ЦФ (100 мг/кг) за 18 ч до прививки асцита. После этого мышь получили инъекции аналогичной дозы смеси препаратов ДНК еще 11 раз (режим 18–30 ч). В тексте группа обозначена как «ЦФ+асцит (через 18 ч после ЦФ)+ssDNAmix (18–30)».

Анализ доставки TAMRA-меченой ДНК в клетки асцита Кребс-2

Клетки асцита Кребс-2 отбирали у мышь и осаждали центрифугированием при 400 g в течение 5 мин при 4 °С и промывали средой RPMI-1640 один раз. Затем клетки подсчитывали в камере Горяева. Инкубировали 1 млн клеток в 200 мкл этой же среды с 10 или 1 000 нг TAMRA-меченой ДНК в течение часа при комнатной температуре. Затем клетки осаждали центрифугированием, промывали небольшим количеством среды и осадок ресуспендировали в конечном объеме среды. Далее количество клеток, захвативших TAMRA-меченую ДНК, анализировали при помощи проточного цитофлуориметра BD FACSAria (Becton Dickinson, США). При этом процент TAMRA+ клеток, т.е. клеток, инкубируемых в среде без добавления TAMRA-меченой ДНК, оценивали относительно контроля.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили при помощи программы Microsoft Excel, на рисунках отображено стандартное отклонение. Сравнение групп животных по

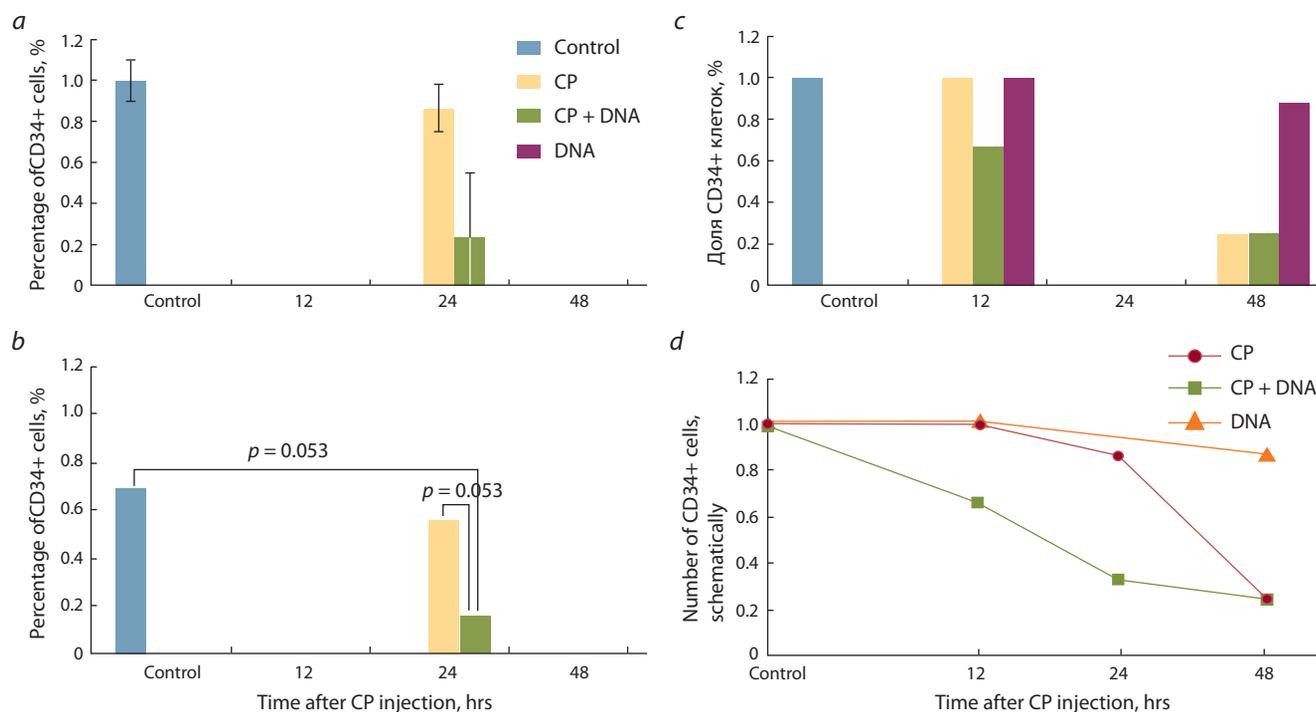


Fig. 1. Quantification of CD34+ cell dynamics in Krebs-2 mouse ascites treated with CP and/or dsDNA.

Groups: CP, single CP injection (200 mg/kg); CP+DNA, CP injection (200 mg/kg) followed by 12 human DNA injections (hourly, 0.5 mg/injection); DNA, 12 human DNA injections (hourly, 0.5 mg/injection); Control, intact ascites. 0: starting timepoint (CP or first dsDNA injection). (a) FACS analysis of Krebs-2 ascites engrafted into mice. The percentage of CD34+ cells was measured before (control) and 24 hours after the treatment with CP or CP+dsDNA; (b) Quantification of CD34+ cell percentage in Krebs-2 ascites from mice (control and 24 hrs after CP, CP+DNA, and DNA injections) as assayed by fluorescence microscopy; (c) FACS analysis of CD34+ cells in Krebs-2 engrafted mice treated with CP or CP+DNA (12 and 48 h timepoints) and in untreated ascites-bearing mice (control); (d) Schematic plot of CD34+ cell dynamics measured over two days after CP, CP+dsDNA or dsDNA injections. Three independent experiments shown in (a-c) are summarized.

продолжительности жизни проводили методом непараметрической статистики с использованием U-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни в программе Statistica (Стэнфорд, США).

Результаты и обсуждение

Эффект воздействия обработки циклофосфаном и циклофосфаном + ДНК на асцитные CD34+ клетки

Одним из первостепенных вопросов, касающихся воздействия ЦФ и дцДНК на СИРК, был вопрос эффективности элиминации СИРК, захватывающих дцДНК и находящихся под воздействием ЦФ, в режиме монопрепаратов и в их синергичном действии.

Были проведены эксперименты по оценке воздействия двух препаратов на клетки асцита Кребс-2, способные интернализировать фрагменты дцДНК, с использованием CD34, дополнительного маркера этих клеток. Как было показано в работе (Dolgova et al., 2014), популяция клеток, способных интернализировать TAMRA-меченую ДНК, на 40 % перекрывается с популяцией клеток, несущих маркер CD34 (причем от 40 до 90 % CD34+ клеток являющихся TAMRA-позитивными). Если при проведенных обработках будет обнаружено снижение числа CD34+ клеток, то этот факт может с определенной долей вероятности означать, что произошла элиминация или TAMRA+СИРК, или

поверхностного CD34 маркера. Однако нельзя исключить возможность воздействия указанных обработок на CD34+ клетки, не способные захватывать TAMRA-меченую ДНК, что подразумевает относительность указанной оценки. Мы провели несколько экспериментов по оценке изменения числа CD34+ клеток в обработанном асците. Результаты одного из экспериментов с использованием человеческой дцДНК в режиме 1–12 ч после введения животным с привитым асцитом ЦФ представлены на рис. 1.

При анализе полученных результатов можно сделать следующие выводы. К 48 ч обработка *in vivo* асцита как ЦФ, так и его сочетанием с препаратом дцДНК человека приводит к снижению количества CD34+ клеток до значения 0,2 % (рис. 1, в, ЦФ, ЦФ+ДНК, ДНК). Полного исчезновения этого типа клеток не происходит. На отрезке времени 0–48 ч обнаружена разница в динамике изменения количества CD34+ клеток при обработке одним ЦФ и ЦФ+дцДНК человека (рис. 1, а, б, в, ЦФ, ЦФ+ДНК). Можно отметить более выраженное снижение количества CD34+ клеток в случае обработки ЦФ+ДНК по сравнению с действием одного ЦФ (рис. 1, г, ЦФ, ЦФ+ДНК). Такая картина могла означать, что более сильное воздействие на этот тип клеток оказывает совместная обработка ЦФ и дцДНК и что клетки, интернализирующие дцДНК и одновременно позитивные по CD34, более чувстви-

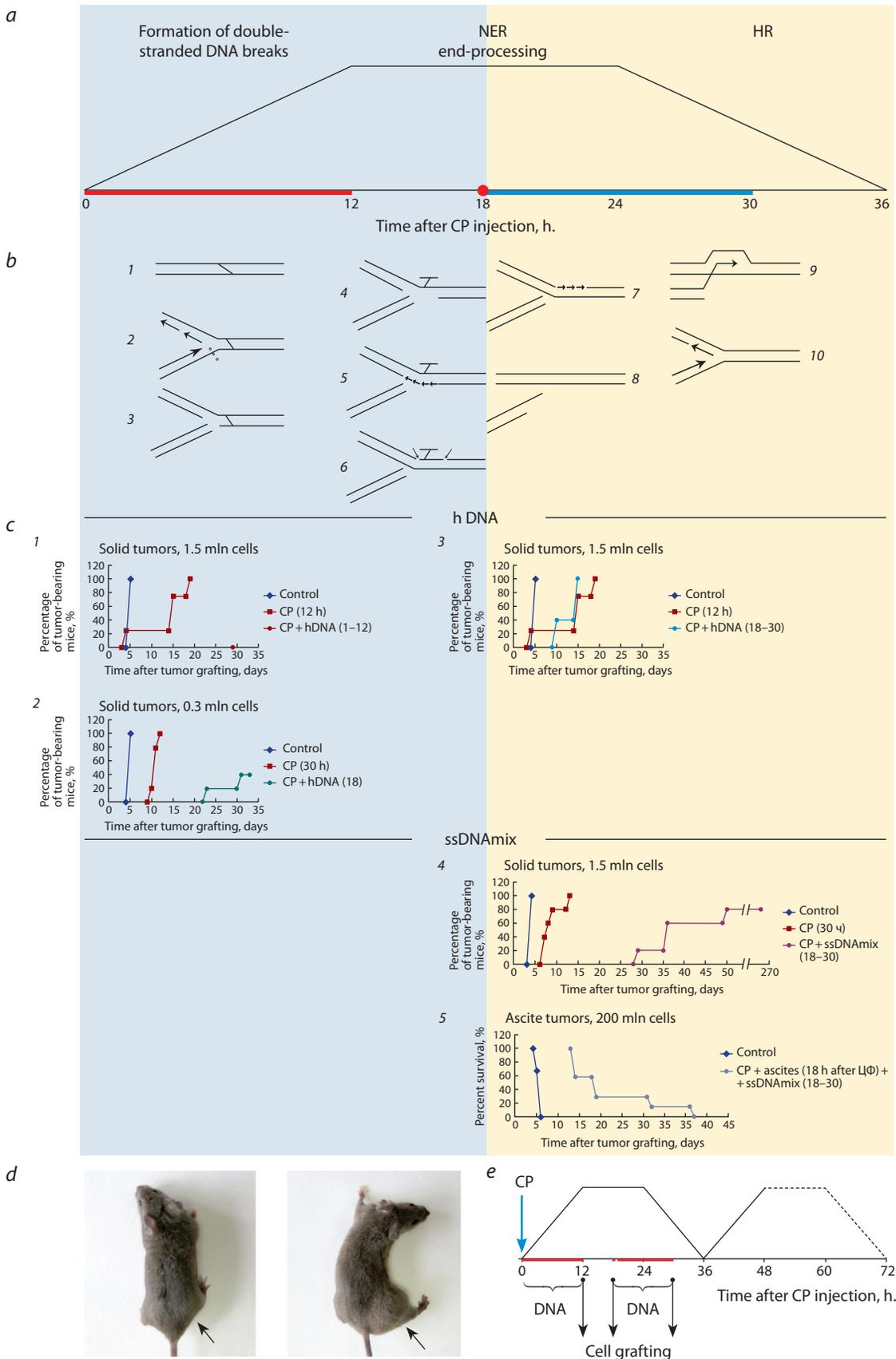


Fig. 2. Anticancer effect of combined CP + dsDNA treatments correlated with the stage of the repair of inter-strand crosslinks induced by CP in the ascites form of the Krebs-2 tumor.

тельны к такому воздействию. Общий вывод следующий. Обработка асцита Krebs-2 препаратом ДНК человека в режиме 1–12 ч на фоне воздействия ЦФ или элиминирует TAMRA+ клетки, или меняет их функциональное состояние, что в обоих случаях сопровождается исчезновением клеток, несущих поверхностный маркер CD34.

Влияние синергичного действия циклофосфана и препаратов дцДНК человека и лосося в режиме 1–12, 18, 18–30 (часов после введения циклофосфана) на перевивочный потенциал асцитных клеток Krebs-2

Для оценки биологического эффекта синергичного воздействия ЦФ и ЦФ+ДНК, которое подразумевало элиминацию TAMRA+ клеток (СИРК, характеризующихся захватом TAMRA-меченой ДНК) или изменение их функционального состояния, нами были проведены эксперименты по перевивке в форме солидного трансплантата мышам той же линии обработанных непосредственно в асците раковых клеток. Такая тактика была связана с тем, что в начале исследования (Alyamkina et al., 2015) в экспериментах использовали асцит в возрасте старше 7 сут от перевивки и после обкола ЦФ и препаратом дцДНК наблюдали тотальную гибель мышей. Причины токсического воздействия обработок были неизвестны. Как показали дальнейшие эксперименты, одновременное апоптотическое разрушение массы асцитных клеток, составляющей для асцита такого возраста несколько миллиардов, и связанные с этим патологические последствия (вторичный некроз, разрушение кишечного эпителия, системная воспалительная реакция, сепсис, коллапс иммунной системы), вызванные проведенными обработками, явились причиной смертельного токсического эффекта (Alyamkina et al., 2015). Скоротечная гибель мышей и возможность длительного нахождения (до 14 сут) молекул ДНК в реципиентной клетке (Dolgova et al., 2012) не позволяли оценить состояние TAMRA+ клеток у мышей-асцитиносов, которым вводили препарат дцДНК.

Ниже приводятся результаты применения нескольких режимов, при которых обрабатывали зрелый (> 7 сут) асцит. Использованные режимы введения препаратов проиллюстрированы для каждого конкретного эксперимента. Асцит *in vivo* обрабатывали препаратами нативной человеческой дцДНК в режиме ЦФ+ДНК (1–12), ЦФ+ДНК (18–30) или ЦФ+ДНК (18) и ДНК лосося в смеси кросс-линкированной дцДНК/дцДНК (2–3/5)

в режиме ЦФ+ДНК (18–30), после чего выделенные асцитные клетки перевивали в виде солидного трансплантата мышам той же линии. Для понимания общей картины происходящих событий сравнивали как уже опубликованные результаты (Dolgova et al., 2014), так и новые экспериментальные данные.

В проведенных исследованиях удалось полностью лишить клетки асцита туморогенного начала и добиться длительного по сравнению с контролем промежутка времени приживаемости или полной неприживаемости трансплантата, сформированного такими клетками.

Полученные результаты свидетельствуют:

1. В синергизме с ЦФ в фазе репарации NER (1–12 ч после введения ЦФ) при интерференции процесса репарации МЦС фрагментами дцДНК человека, попавшими в СИРК, последние теряют жизнеспособность или изменяют свой функциональный статус. Перевивка 40–50-кратного избытка клеток не приводит к развитию солидного трансплантата (рис. 2, в1). Также установлен факт, что единственная инъекция дцДНК человека через 18 ч после введения ЦФ разрушает туморогенный потенциал перевиваемого графта в количестве 300 тыс. клеток у трех из пяти опытных животных (рис. 2, в2). Опухоль не появилась после 60 дней наблюдения.
2. В рассматриваемой серии экспериментов было отмечено следующее противоречие. В синергизме с ЦФ в фазе репарации гомологичной рекомбинации (ГР) (в 18–30 ч после введения ЦФ) при интерференции процесса репарации межцепочечных шивок фрагментами дцДНК человека, попавшими в СИРК, корректность репаративного процесса сохраняется и СИРК выживают более эффективно, чем при действии одного ЦФ (рис. 2, в3). Происходит стимуляция развития солидного трансплантата, который приживается в 100 % перевивочных экспериментов (Dolgova et al., 2014; Alyamkina et al., 2015).
3. В синергизме с ЦФ в фазе репарации ГР (18–30 ч после введения ЦФ) при использовании смеси кросс-линкированной дцДНК/ДНК лосося (2/5) происходят события, интерферирующие процесс репарации таким образом, что разрушается туморогенный потенциал прививаемого солидного трансплантата. В проведенном эксперименте у одной из пяти мышей солидный трансплантат не сформировался к 270-му дню наблюдения (рис. 2, в4). У остальных мышей трансплантат формировался последовательно, в зависимости от

Data on the plots are compared with the control and treatment with CP alone. (a) Schematic presentation of the stages of the repair process in Krebs-2 ascites cells (black curve) overlaid with the dsDNA injection regimen (red bars for human DNA and blue, for the 3:5 mix of native: crosslinked salmon sperm DNA); (b) Inter-strand crosslink repair intermediates arranged according to the time when the double-stranded DNA breaks were formed and repaired: 1, the nascence of an inter-strand crosslink; 2, the replication fork halts at the lesion; 3, 4, the NER machinery is recruited to the lesion, and a double-stranded break is formed; 5, DNA adduct translocation and repair synthesis of the leading DNA strand (TLS polymerase-mediated or on the homologous template); 6, the second step of NER, DNA adduct excision; 7, repair synthesis of the lagging DNA strand; 8, 3'-end processing of the double-strand break; 9, 10, invasion of the processed 3'-end of the double-stranded break into the homologous region of DNA, The replication fork is re-established; (c) 1, 2, 3, 4, the time course of tumor emergence after intramuscular injection of tumor cells treated *in vivo* with CP and dsDNA. Numbers of injected cells are indicated above the plot; 5, the time course of death of experimental animals engrafted with the ascites form of the Krebs-2 tumor after the treatments. The number of cells used for injections is indicated above the plot. 1–3, injection of human DNA; 4, 5, injection of salmon sperm DNA mix (ssDNAmix); c1, c3 reproduce the data, published in (Dolgova et al., 2014, Fig. 5A); c5 is described in more detail in (Potter et al., 2015b). (d) Left: mouse from the CP + ssDNAmix(18–30) group (Fig. 2, c4, line CP + ssDNAmix(18–30)) that never developed a tumor 270 days post engraftment; right: mouse from a control group on day 20 following engraftment. Arrows point to the graft injection site. (e) Experimental design outline showing the timepoints when mice received CP or CP + dsDNA and when treated tumor cells were re-engrafted to healthy animals as solid grafts.

степени сохранившегося туморогенного потенциала, на протяжении длительного промежутка времени. В этом случае наблюдается ярко выраженное количественное изменение признака (разрушение способности индуцировать развитие новой опухоли).

4. В синергизме с ЦФ в фазе репарации ГР (18–30 ч после введения ЦФ) при использовании смеси кросс-линкированная дцДНК/ДНК лосося (3/5) при первичной *ex vivo* обработке асцитных клеток происходят события, interfering процесс репарации так, что при этом в значительной степени редуцируется туморогенный потенциал прививаемого асцитного трансплантата (рис. 2, в5). В анализируемом эксперименте количество привитых клеток составляло 200 млн, что соответствовало четырехсуточному асциту. Средняя продолжительность жизни (СПЖ) животных в четыре раза превысила этот показатель в контрольной группе, в которой мыши погибли на 4–6-е сутки после прививки асцита. В экспериментальной группе у 70 % животных асцит развивался последовательно и медленно, и эти мыши погибли к 19-м суткам эксперимента. Одна мышь погибла без каких-либо признаков асцита. У двух мышей вторичный асцит не развивался до 27-го дня от введения обработанного графта. У одного из этих животных к 24-му дню от начала эксперимента в месте введения иглы сформировался солидный трансплантат в форме нескольких подкожных узлов, повторяющих путь движения иглы. Максимальная продолжительность жизни одной мыши составила 42 дня.

Полученные данные позволили предположить, что обработки разными препаратами дцДНК и при разных режимах введения могут приводить к одному и тому же результату – полной эрадикации в обработанном асците или полному изменению функционального ракового статуса всех СИРК, что сопровождается потерей или значительным снижением туморогенного потенциала прививаемого графта. Одновременно существовала схема обработок, стимулирующая развитие опухоли. На рис. 2 представлены выборочные сравнительные результаты экспериментов, демонстрирующие режимы терапии ЦФ и препаратами дцДНК, позволяющие полностью или частично разрушить туморогенный потенциал прививаемого асцита или сохранить жизнеспособность СИРК и тем самым оказать стимулирующее действие на развитие перевитого графта.

Важно отметить, что обработка асцита только TAMRA-меченой ДНК не приводила к какому-либо значимому эффекту. При этом СИРК асцита Кребс-2 также интернализировали TAMRA-меченую ДНК. Этот факт мог означать, что разрушение СИРК или их функций: а) никак не связано с активацией иерархических киназ и арестом клеточного цикла, как это описано для случаев появления внутри клетки двуцепочечных концов экстраклеточных фрагментов (см. Лихачева и др., 2008); б) может быть связано с немедленной активацией клеточных лигаз и удалением из внутреннего пространства клетки фрагментов ДНК со свободными двуцепочечными концами путем замыкания в кольцо (см. Лихачева и др., 2008). Эффективность синергичного действия ЦФ и ДНК в этом плане может объясняться тем, что ЦФ полностью меня-

ет молекулярную «физиологию» клетки и фрагменты дцДНК, интернализированные в СИРК, не подпадают под действие механизмов репарации двуцепочечных концов. Такие фрагменты в данных условиях или индуцируют программируемую гибель СИРК, или непосредственно в ядре interfering репаративный процесс в фазах NER и ГР.

Как было сказано выше, выбранные временные режимы инъекции ДНК привязаны к фазам репаративного процесса NER и ГР (Dolgorova et al., 2014) (рис. 2, а, б). Если считать, что фрагменты дцДНК достигают внутриядерного пространства (как это показано в работе Dolgorova et al., 2014, Fig. 1, b), то действие препаратов дцДНК может быть объяснено следующими соображениями. В литературе подробно, шаг за шагом, описано формирование и разрешение интермедиатов репарации МЦС (Räschle et al., 2008; Долгова и др., 2010; Muniandy et al., 2010; Deans, West, 2011). Первоначально идет формирование двуцепочечных разрывов, затем фаза NER. Далее происходит процессинг оставшегося двуцепочечного конца, и на последнем этапе осуществляется акт ГР (рис. 2, а, б). Для асцитных раковых клеток Кребс-2 эти фазы репарации разбиты на временные отрезки следующим образом (Dolgorova et al., 2014). До 12 ч идет накопление двуцепочечных разрывов. Репарация двуцепочечных разрывов (фаза ГР) начинается через 24 ч и заканчивается через 30 ч после инъекции ЦФ. Между 12 и 24 ч происходят два события, а именно: осуществляется NER и формируется одноцепочечный участок двуцепочечного конца. Было обнаружено, что если вводится нативный препарат дцДНК человека последовательно в промежуток времени 1–12 (рис. 2, в1, «ЦФ+hDNA(1–12)») или единично в 18 ч (рис. 2, в2, «ЦФ+hDNA(18)»), то наблюдается значительная редукция туморогенного потенциала прививаемого трансплантата, что выражается в непрививаемости опухоли. Этот факт означает, что нативные фрагменты дцДНК человека interfering первые из перечисленных этапов репаративного процесса (до 18 ч), что негативно сказывается на выживании клеток. Если вводить нативную дцДНК в промежуток времени 18–30 ч после инъекции ЦФ, то фрагменты дцДНК попадают на завершающие фазы репаративного процесса. Возникшее взаимодействие способствует восстановлению целостности хроматина, что проявляется в предохранении СИРК от действия ЦФ и быстром развитии солидного трансплантата (Dolgorova et al., 2014) (рис. 2, в3, «ЦФ+hDNA(18–30)»). Было обнаружено аналогичное действие на стволовые клетки крови (Likhacheva et al., 2007). И, таким образом, в зависимости от фазы репаративного процесса, нативные фрагменты дцДНК, интернализированные в СИРК, могут как элиминировать эти клетки или изменять их раковый статус и тем самым разрушать прививочный потенциал привитого графта, так и сохранять жизнеспособность СИРК и стимулировать развитие привитого трансплантата.

Если рассматривать максимально чувствительную, искореняющую кросс-линкированную дцДНК лосося, то процесс interfering выглядит иначе. Препарат такой ДНК практически не работает на стадии формирования двуцепочечных разрывов (NER) (1–18 ч) и в значительной степени interfering процесс репарации в фазе

процессинга двуцепочечных концов – ГР (рис. 2, в4, «ЦФ+ssDNAmix(18–30)»; рис. 2, з, левая мышь). При инъекциях смеси кросс-линкированной дцДНК лосося с нативной ДНК лосося (3/5) в промежутки времени 18–30 ч после инъекции ЦФ наблюдаются факты разрушения опухолевых свойств перевитого трансплантата даже в случае прививки 200 млн клеток (рис. 2, в5, «ЦФ+асцит (18 ч после ЦФ)+ssDNAmix (18–30)», полное описание эксперимента см. в статье Поттер и др., 2016).

Таким образом, показано, что проведенные обработки в определенном числе случаев приводят к полной потере трансплантатом опухолевого начала, что, как следует из результатов, представленных на рис. 1, по-видимому, связано с эрадикацией СИРК или изменением их ракового статуса. Это означает, что проводимое воздействие оказывается именно на СИРК, и именно отсутствие этих клеток или изменение их опухолевых свойств делает несостоятельным прививку экспериментального графта.

Из полученных результатов также следует, что 18 ч после введения ЦФ является переломной точкой репаративного процесса, разделяющей его на два отрезка. На первом отрезке репаративного процесса (NER, процессинг двуцепочечных концов) обработка препаратом нативной дцДНК убивает причинную раковую клетку или меняет ее раковый статус. На втором отрезке репаративного процесса (ГР) этот же препарат сохраняет жизнеспособность СИРК и стимулирует рост опухоли. При этом использование чужеродной модифицированной дцДНК на втором отрезке репаративного процесса приводит к частичной или полной элиминации СИРК или изменению ими злокачественного статуса и потере графтом опухоленности. Фаза формирования двуцепочечных разрывов составляет 12 ч (рис. 2, а). Сразу после формирования двуцепочечных разрывов следует NER. Фаза восстановления целостности хроматина начинается в 24 ч. Следовательно, 18 ч – это промежуточная точка фазы NER. Вероятно, воздействие на СИРК в случае нативной ДНК человека происходит при интерференции процесса формирования одноцепочечного участка в фазе NER. В фазе ГР фрагменты экстраклеточной дцДНК могут выступать в качестве внешней матрицы, позволяющей корректно завершить восстановление репликативной вилки.

Полученные данные предполагают, что СИРК можно полностью элиминировать из асцитной формы опухоли Krebs-2.

Действие дцДНК как монопрепарата на асцитные клетки Krebs-2

В работе (Alyamkina et al., 2015) продемонстрировано, что препарат дцДНК как независимый терапевтический агент индуцирует масштабный апоптоз асцитных клеток. При этом мода такой индукции отличается от воздействия одного ЦФ (Alyamkina et al., 2015, Fig. 1, C, Fig. 3, A). Многократно показано, что инъекции препарата дцДНК в монорежиме никак не влияют на перевивочный потенциал асцитных клеток (Dolgova et al., 2014).

Мы установили, что при добавлении к асцитным клеткам TAMRA-меченого ДНК-зонда все клетки, способные к захвату дцДНК, одновременно начинают интернализировать меченый зонд независимо от его количества в окру-

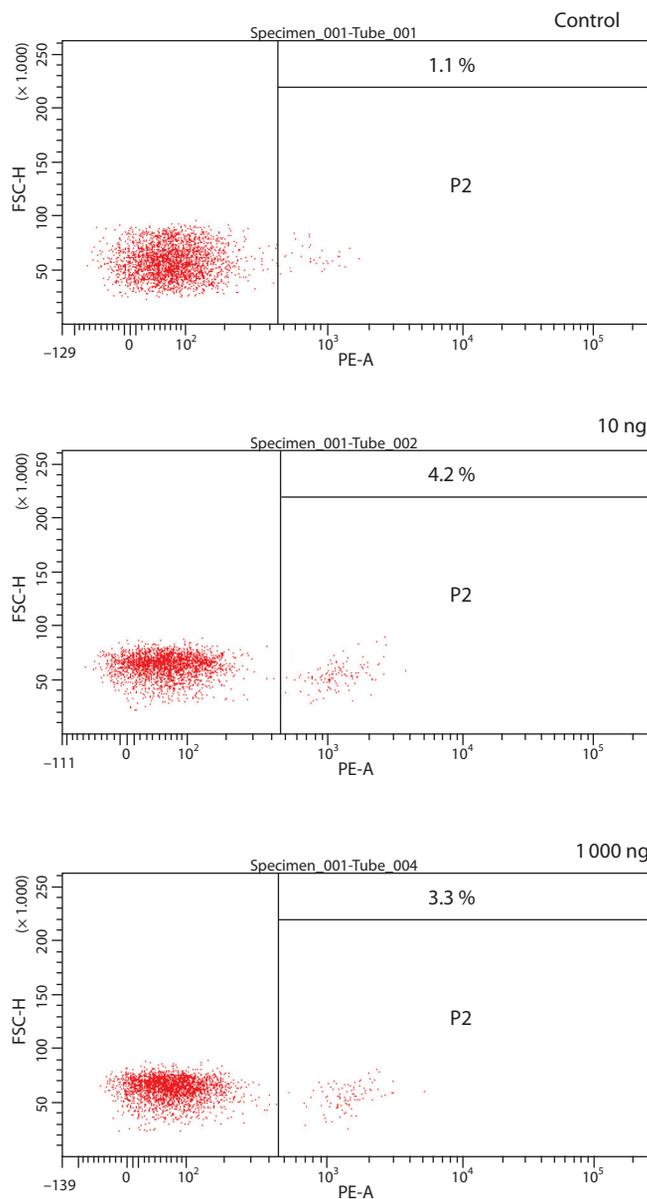


Fig. 3. Flow cytometry analysis of Krebs-2 ascites cells incubated with different amounts of TAMRA-labeled DNA for 1 hour.

Control: no TAMRA-DNA added; 10 ng and 1000 ng, Krebs-2 ascites cells incubated with 10 and 1000 ng TAMRA-labeled DNA, respectively; P2 is the population of TAMRA-positive cells. Percentages of corresponding cells are indicated for each sample.

жающей среде (рис. 3). Так, доля клеток асцита Krebs-2, включивших маркерную ДНК, при добавлении 10 нг меченого материала составила 4,2 % (рис. 3, «10 нг»), а при добавлении 1 000 нг – 3,3 % (рис. 3, «1 000 нг»), что свидетельствует о постоянной доле клеток, способных к захвату ДНК, независимо от количества. Также были проведены эксперименты в режиме реального времени по определению эффективности интернализации TAMRA-меченой ДНК на глиомах человека (Dolgova et al., 2014), при этом было показано, что интенсивность насыщения

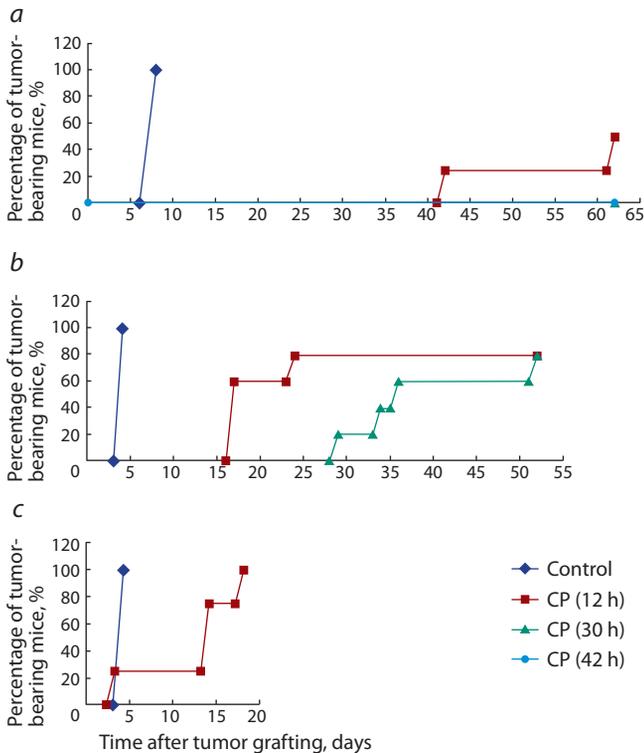


Fig. 4. Analysis of the ability of CP (administered as a monotherapy) to compromise the engraftment potential of Krebs-2 ascites.

(a) Formation of solid grafts upon engraftment of Krebs-2 ascites cells from an ascites-bearing mouse 12, 30 and 42 hrs after CP injection (100 mg/kg); (b) Detection of solid grafts upon engraftment of Krebs-2 ascites cells collected from an ascites-bearing mouse 12 and 30 hrs after CP-injection (100 mg/kg); (c) Percentage of mice with solid grafts upon engraftment of 1.500.000 Krebs-2 ascites cells taken from an ascites-bearing mouse 12 hrs after CP injection (100 mg/kg). The plot is reproduced from Fig. 1, c1 for reference.

индивидуальных клеток нейросфер увеличивается в течение времени инкубации (0–60 мин) без увеличения первоначального числа клеток.

Таким образом, от количества ДНК-зонда зависит только общая масса ДНК, попавшей в клетку: если в среде мало ДНК, в клетках ее будет мало, но одинаково мало во всех. Также если ДНК в среде будет, например, в количестве, достигающем порога насыщения, то все СИРК будут одинаково заполнены экстраклеточной дцДНК.

Действие циклофосфана как монопрепарата на перевивочный потенциал асцитных клеток Krebs-2 и на развитие асцитной формы опухоли

По ходу тестирования многочисленных режимов действия препаратов было выявлено, что цитостатик ЦФ обладает значимым циторедуцирующим эффектом при обработке перевитого трансплантата Krebs-2 (рис. 4). Прослеживалась следующая закономерность. При изъятии и перевивке асцитных клеток в количестве 300 тыс. через 12 ч после введения ЦФ графт частично прививался (рис. 4, а, «ЦФ (12 ч)»). При изъятии и перевивке такого же количества асцитных клеток, взятых через 30 или 42 ч после введения ЦФ, рост трансплантата не наблюдался (рис. 4, а,

«ЦФ (30 ч)», «ЦФ (42 ч)» соответственно). При изъятии и перевивке асцитных клеток в количестве 500 тыс. через 12 и 30 ч после введения ЦФ графт частично прививался, причем наблюдалась явная разница в количестве привившихся клеток (рис. 4, б, «ЦФ (12 ч)», «ЦФ (30 ч)» соответственно). У образца «ЦФ (12 ч)» в 80 % случаев наблюдалась прививка опухоли, тогда как в образце «ЦФ (30 ч)» трансплантат прививался у 60 % животных. При изъятии и перевивке асцитных клеток в количестве 1,5 млн через 12 ч после введения ЦФ графт приживался на 100 % (рис. 4, в, «ЦФ (12 ч)»). Полученные данные свидетельствовали, что после обработки в организме донора и перевивки реципиенту в асцитных клетках происходят процессы, не позволяющие им развиваться в полноценный графт. При этом для развития трансплантата имеет значение количество перевиваемых клеток. Увеличение их числа примерно в два раза при одном и том же времени терапевтической экспозиции приводит к прививке трансплантата, не прививающегося при перевивке меньшего количества клеток (рис. 4, в, «ЦФ (30 ч)»). Такой результат предполагает, что эффективность прививки графта зависит от количества жизнеспособных СИРК, сохранившихся в образце перевиваемых клеток асцита Krebs-2.

Анализ продолжительности репаративного цикла раковых клеток Krebs-2 был выполнен в работе (Dolgova et al., 2014). Установлено, что к 36 ч от момента введения ЦФ репаративный цикл полностью завершается. Снижение перевивочного потенциала асцитных клеток по мере удаления от времени введения ЦФ (в пределах 42 ч) может быть связано с гетерогенностью стволовых раковых клеток в распределении по клеточному циклу. Возможно, что на ранних временных отрезках не все СИРК получают летальное повреждение, а изъятие таких «недобитых» клеток из организма предотвращает действие фактора киллинга и позволяет этим клеткам восстановить свой туморогенный потенциал. Ближе к концу репаративного цикла подавляющее большинство СИРК такое повреждение получает. Возможно, что в элиминации СИРК участвует не только метаболит ЦФ фосфорамид мустард, индуцирующий МЦС, но и другие метаболиты ЦФ, также обладающие выраженной цитотоксичностью.

Проведенные исследования предполагали существование значимого терапевтического действия ЦФ на развитие асцита Krebs-2. В этой связи были выполнены эксперименты по оценке действия инъекций ЦФ в форме монопрепарата на развитый асцитный трансплантат (рис. 5). ЦФ вводился одно-, дву-, трех- или четырехкратно, что указано в конкретных экспериментах. Одноразовая доза ЦФ составляла 50 или 100 мг/кг веса животного (суммарная доза для всех мышей составляла 300 мг/кг), что также отмечено в каждом конкретном эксперименте. Выбор промежутков времени инъекции ЦФ был связан с экспериментально обнаруженным временем появления и репарации двуцепочечных разрывов, являющихся интермедиатами репарации МЦС, индуцированных ЦФ, и был привязан к нему (Dolgova et al., 2014).

В приведенных на рисунках сравнениях взяты либо наиболее эффективные, либо демонстрирующие определенную закономерность режимы с использованием ЦФ. Идеология использования того или иного режима

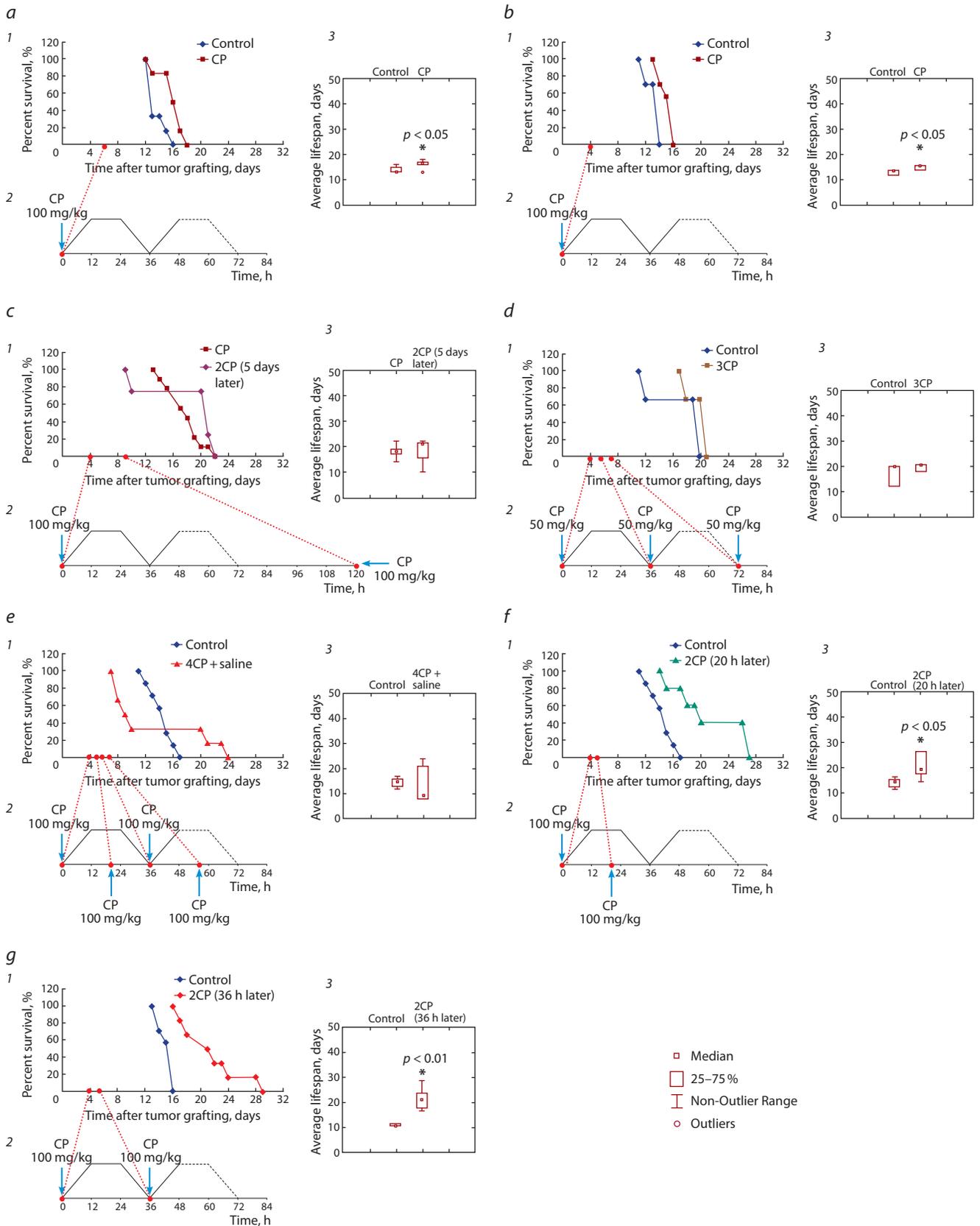


Fig. 5. Analysis of the therapeutic action of the cytostatic drug cyclophosphamide on the well-developed ascites form of the mouse Krebs-2 tumor. Different injection regimens were tested.

1, Kaplan-Meier survival curve of ascites-engrafted mice; 2, drug administration schedule; 3, average survival time after the treatments (Mann-Whitney U test). a, CBA mice with 6d-old ascites tumors; b, C57B1 mice with 4d-old ascites tumors; c, d, e, f, g, different CP treatment schedules targeting 4-day old Krebs-2 ascites tumors.

обсуждается по ходу описания экспериментальной части работы.

В начальных экспериментах на линиях C57Bl и CBA (рис. 5, а1, «ЦФ», б2, «ЦФ») было показано, что инъекции ЦФ в монорежиме увеличивают продолжительность жизни последнего животного в группе (max) на двое суток, или на ~13 %. Медианы продолжительности жизни различаются незначительно и не отличаются от контролей. Эти два показателя использовались в дальнейшем для характеристики эффективности режимов.

Как следует из результатов, полученных в работе (Dolgorova et al., 2014), молекулы кросс-линкированной ДНК не принимают компенсирующего участия в репаративном процессе в фазе ГР. Можно было полагать, что торможение роста опухоли при инъекциях модифицированной ДНК лососа или ДНК человека в режиме 18–30 ч связано с интерференцией молекулярной машины одной репаративной системы молекулярной машиной другой. Это означает, что процесс ГР как фазы репарации МЦС интерферирует или процесс NHEJ (Non-Homologous End Joining), индуцированный концами кросс-линкированных фрагментов экстраклеточной дцДНК, не способных к денатурации, или процесс NER, индуцированный новыми кросс-линк сайтами тех же фрагментов, доставленных в ядро СИРК. Это наблюдение подразумевало возможность аналогичного действия двух независимых инъекций ЦФ, проведенных в различные фазы репарации межцепочечных сшивков. Предполагалось, что при второй инъекции ЦФ в фазу ГР будут индуцироваться новые кросс-линки, которые активируют механизм формирования двуцепочечных концов и NER. Молекулярные машины обеих систем вступают в конфликт, и полученный результат будет подобен действию кросс-линкированной ДНК.

Для проверки этой гипотезы авторы провели серию экспериментов с использованием обеих линий животных и показали, что инъекции двух ЦФ (вторая – на 5-е сутки) действует так же, как и одна инъекция ЦФ (конечная доза одинаковая). Последние животные погибают одновременно как в группе ЦФ, так и в группе 2ЦФ (вторая – на 5-е сутки) (рис. 5, в). Повторная инъекция ЦФ, сделанная в 20 (фаза ГР) или 36 ч (обнаружение кросс-линки популяцией раковых клеток, находящихся в момент первой инъекции ЦФ в поздней G2- или M-фазе клеточного цикла), увеличивает продолжительность жизни последнего животного (max) на 10–17 д, или на 58–141 % по отношению к таковой последнего животного в контроле (рис. 5, е, «2ЦФ (через 20 ч)»; ж, «2ЦФ (через 36 ч)» соответственно).

На клетках костного мозга (Dolgorova et al., 2012, 2013) и асцитных раковых клетках Кребс-2 (Dolgorova et al., 2014) показано, что появление и исчезновение двуцепочечных разрывов для одной и той же популяции обрабатываемых клеток имеют два пика. Этот факт связывался с гетерогенностью исходной популяции, в которой первая волна двуцепочечных разрывов формируется в клетках, находящихся в момент обработки в G1- и S-фазах клеточного цикла. Вторая волна, составляющая 15–20 % от первой, образуется в клетках, находящихся в момент обработки в поздней G2- или M-фазе клеточного цикла. Этот факт свидетельствовал о том, что для эффекта «смертельной интерференции» репарации МЦС, охватывающей всю

популяцию СИРК, нужно проводить терапевтическую обработку препаратом ДНК как минимум дважды. При повторной терапии в промежутки времени 36–48 ч будет оказано воздействие на клетки, содержащие двуцепочечные разрывы второй волны. Следует помнить, что часть СИРК могут находиться в G0-фазе и что они в этом случае будут неуязвимы до выхода из покоящегося состояния и прохода по пролиферативному циклу.

Поскольку действие повторной инъекции ЦФ в 20 ч попадает на идущую репаративную систему ГР, а действие второго ЦФ в 36 ч – на вторую малочисленную популяцию СИРК, которая при первой инъекции ЦФ была в поздней G2- или M-фазе, то эффективно будет применить режимы введения ЦФ, охватывающие оба терапевтических воздействия. Одновременно с этим в терапию необходимо ввести препараты дцДНК.

Полученные данные предполагают, что в схемах лечения асцита Кребс-2 нужно использовать несколько последовательных инъекций ЦФ, перекрывающих чувствительные к обработке ЦФ и ЦФ в синергизме с ДНК фазы клеточного цикла. Следует провести экспериментальную оценку эффективности комбинаций инъекций ЦФ в сочетании с инъекциями ДНК во временные точки 0, 18, 36, 54, 72, 90 ч, перекрывающих в различных по времени сочетаниях для ЦФ фазу наложения двух репаративных систем, NER и ГР, и захватывающих вторую волну двуцепочечных разрывов (клеток в G2- или M-фазе) после предыдущего введения ЦФ в случае инъекций препарата ДНК.

Как показано в работе (Alyamkina et al., 2015), инъекции дцДНК в монорежиме и в синергизме с ЦФ смертельно токсичны для экспериментальных животных с опухолью более 3 см³. Также такие обработки приводят к скоротечной синхронной гибели мышей-асцитиносов с асцитом старше 7 сут (Alyamkina et al., 2015). Тем не менее длительная ремиссия в развитии привитого графта, обнаруженная в работе (Alyamkina et al., 2015), предполагала возможность излечения мышей от асцитной формы рака Кребс-2. Для поиска и отработки эффективного режима полной эрадикации асцита у мышей с перевитым асцитом Кребс-2 проведена серия последовательных экспериментов, описанная в следующих разделах цикла. Лейтмотивом всей совокупности экспериментальных подходов является найденный и охарактеризованный в работе (Dolgorova et al., 2014) феномен интернализации фрагментов дцДНК в СИРК Кребс-2 и интерференции этими фрагментами процесса репарации МЦС.

Результаты, полученные в настоящей работе цикла исследований, создают экспериментальную платформу для выбора режимов обработки мышей-асцитиносов и их применения в терапии асцитного рака Кребс-2. Можно назвать следующие отправные точки при подборе режимов.

1. Для предотвращения гибели экспериментальных животных от системной воспалительной реакции и следующей за ней полиорганной недостаточности необходимо во всех экспериментах использовать мышей с развитым асцитом в возрасте 4–5 сут от прививки 2×10^6 асцитных клеток.
2. Для успешного лечения необходимо использовать несколько инъекций ЦФ, осуществляя следующую по порядку инъекцию, когда одна активированная

репаративная молекулярная машина (NER) будет накладываться на другую (ГР), а в сочетании с препаратом ДНК будет перекрываться популяция раковых клеток, находящихся в момент первой инъекции ЦФ в G2- или M-фазе клеточного цикла.

3. В режим цитостатической обработки следует добавить инъекции ДНК в промежутки времени 1–12 и (или) 18–30 ч после инъекции ЦФ. Необходимо охарактеризовать режим одновременного воздействия препаратов дцДНК в фазу NER и фазу ГР. При этом в фазе NER должна быть использована нативная ДНК человека, а в фазу ГР – максимально исковерканная, генеалогически отдаленная ДНК лосося.

Указанные детали объединяют все наиболее эффективные обработки, значительно редуцирующие развитие опухоли мыши Krebs-2.

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., Orishchenko K.E., Strunkin D.N., Chernykh E.R., Zagrebelskiy 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., Likhacheva A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Dolgova E.V., Rogachev V.A., Sebeleva T.E., Strunkin D.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Protamine association with exogenous DNA's versus its ability to inhibit experimental tumors. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology.* 2009;55(6):765-768.
- 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., Zagrebelskiy 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.* 2010;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
- 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.
- Blohin N.N., Perevodchikova N.I. *Khimioterapiya opukholevykh zabolovaniy [Chemotherapy of neoplastic diseases].* Moscow, Meditsina, 1984.
- Brenner D.E. Intraperitoneal chemotherapy: a review. *J. Clin. Oncol.* 1986;4(7):1135-1147.
- Deans A.J., West S.C. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2011;11(7):467-480. DOI 10.1038/nrc3088
- 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.* 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., Likhacheva A.S., Orishchenko K.E., Alyamkina E.A., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Repair of interstrand crosslinks in a DNA molecule. *Informatsionnyy vestnik VOGIS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists.* 2010;14(2):332-356.
- 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., Zagrebelskiy 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
- Light R.W. *Pleural disease.* Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins, 1980. (Russ. ed.: Layt R.U. *Bolezni plevry.* Moscow, Meditsina, 1986:106-119).
- Likhacheva A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Rogachev V.A., Prokhorovich M.A., Sebeleva T.E., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Exogenous DNA can be captured by stem cells and be involved in their rescue from death after lethal-dose γ -radiation. *Gene Ther. Mol. Biol.* 2007; 11:305-314.
- Likhacheva A.S., Rogachev V.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Shilov A.G., Sebeleva T.E., Strunkin D.N., Chernykh E.R., Gelfgat E.L., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Involvement of exogenous DNA in the molecular processes in somatic cell. *Informatsionnyy vestnik VOGIS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists.* 2008;12(3):426-473.
- Muniandy P.A., Liu J., Majumdar A., Liu S.T., Seidman M.M. DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2010;45(1):23-49. DOI 10.3109/10409230903501819
- Potter E.A., Dolgova E.V., Minkevich A.M., Nikolin V.P., Popova N.A., Efremov Y.R., Bayborodin 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 Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2016;20(1):108-124. DOI 10.18699/VJ15.117
- Räschle M., Knipscheer P., Enouï M., Angelov T., Sun J., Griffith J.D., Ellenberger T.E., Schärer O.D., Walter J.C. Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair. *Cell.* 2008; 134(6): 969-980. DOI 10.1016/j.cell.2008.08.030
- Stenina M.B. Controversial issues in the treatment of ovarian cancer. *Trudnyy patsient: spetsvypusk "Onkologiya" = An inveterate patient: Oncology.* 2006;4(11):9-14.