

*Е.В. Долгова¹, Е.А. Поттер¹, А.С. Проскурина¹, В.П. Николин¹, Н.А. Попова^{1,2},
М.В. Романенко², С.В. Нетесов², О.С. Таранов³, Я.Р. Ефремов¹, Е.Л. Завьялов¹,
А.А. Останин⁴, Е.Р. Черных⁴, С.С. Богачев¹*

Оценка эффективности эрадикации стволовых иницирующих раковых клеток на примере линии клеток глиобластомы человека U87

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

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

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

⁴Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск

В работе оценена эффективность нового терапевтического подхода, направленного на разрушение ракового клеточного сообщества на примере иммортализованной клеточной линии глиобластомы человека U87. Первоначально были охарактеризованы реперные элементы новой стратегии эрадикации стволовых иницирующих раковых клеток. Было оценено присутствие TAMRA+ (стволовых иницирующих раковых клеток) в популяции клеток анализируемой культуры. Далее были определены реперные временные точки цикла репарации межцепочечных сшивок, индуцированных кросслинkerующим цитостатиком митомидином С. После этого был определен день, после начала терапии, на который TAMRA+ клетки накапливаются и синхронно присутствуют в G1/S фазе клеточного цикла, чувствительной для обработок. На основании полученных данных был разработан терапевтический режим, направленный на эрадикацию TAMRA+ клеток (стволовых иницирующих раковых клеток). Обработка культуры проводилась кросслинkerующим цитостатиком митомидином С и сложнокпозиционным препаратом ДНК. Показано, что после проведенных обработок клетки перестают делиться, и культура деградирует. Наиболее сильное разрушительное воздействие на TAMRA+ стволовые иницирующие раковые клетки глиобластомы U87 оказывает комбинация препаратов митомидин С и сложнокпозиционного препарата ДНК. Эксперименты по трансплантации показали, что митомидин С при высоких экспериментальных дозах (20 мкг/мл) самостоятельно способен полностью разрушить перевивочный потенциал U87. Снижение концентрации цитостатика до терапевтиче-

ских доз (5 мкг/мл) четко проявляет редуцирующее воздействие сложнокпозиционного препарата двуцепочечной ДНК на опухолевый потенциал клеток глиобластомы. В результате наблюдается полное разрушение перевивочного потенциала U87, что подтверждает основную концепцию новой разрабатываемой технологии лечения рака, основанной на принципе эрадикации стволовых иницирующих раковых клеток.

Ключевые слова: глиобластома, клеточная линия U87, митомидин С, стволовые иницирующие раковые клетки, TAMRA

Введение

Несмотря на то, что частота встречаемости злокачественных новообразований центральной нервной системы является относительно низкой, эти заболевания характеризуются высоким риском летальных исходов. Так, медиана выживаемости больных после постановки диагноза в среднем составляет 10-15 мес. [38, 57]. Опухоли центральной нервной системы не редко диагностируются у детей и подростков, при этом заболеваемость детей до 15 лет с каждым годом возрастает на 1,8% [43, 54]. По данным Cancer Research UK пятилетняя выживаемость пациентов с диагнозом анапластическая астроцитома составляет 25%, тогда как больных глиобластомой — только 6%. В этой связи разработка новых подходов в диагностике и лечении опухолей мозга является актуальной задачей современной онкологии.

Общепринятым стандартом лечения глиом является хирургическое удаление опухолевой массы с последующей радио- и/или химиотерапией. В качестве химиотерапевтического агента рекомендуется использование темозоломида. Темозоломид является алкилирующим цитоста-

тиком, который при физиологическом pH претерпевает спонтанный гидролиз, в результате чего образуется активный ион метилдиазония, переносящий метильную группу на остаток гуанина в ДНК. В результате этого процесса формируется O⁶- и N⁷-метилгуанин, в процессе репарации которого формируются одно- и двуцепочечные разрывы в ДНК [56]. Темозоломид способен преодолевать гематоэнцефалический барьер [26, 48]. Применение темозоломида продлевает медиану выживаемости пациентов до 14,6 мес. после постановки диагноза [57]. Такие не высокие показатели эффективности терапии связаны с тем, что существует ряд факторов, обеспечивающих устойчивость глиом к лечению. Во-первых, в силу своей структуры (инфильтрующий рост, отсутствие капсулы) такие опухоли не удаляются полностью хирургическим путем, и оставшиеся клетки могут являться причиной возникновения рецидивов. Во-вторых, глиомы характеризуются наличием участков гипоксии. Пониженное содержание кислорода в опухолевой массе существенно снижает эффективность радио- или химиотерапии [48]. В-третьих, необходимость преодолевать гематоэнцефалический барьер также снижает эффективность алкилирующих агентов. Кроме того, существует ряд мутаций, снижающих действие цитостатиков [24]. Главной причиной устойчивости глиобластом к существующим способам лечения является существование стволовых глиобластомальных раковых клеток с их невероятным потенциалом выживаемости [14, 40].

До середины 20-го века считалось, что нейтральных стволовых клеток в развившемся головном мозге не существует, однако в настоящее время известно, что такие клетки есть, и они ответственны за нормальное развитие и функционирование мозга. Открытие нейтральных стволовых клеток послужило основанием для поиска стволовых иницирующих раковых клеток (СИРК) глиом.

Такие клетки были идентифицированы. Было показано, что СИРК глиом обладают признаками, схожими с нейральными стволовыми клетками: самовозобновление в ряду поколений, формирование нейросфер, экспрессия определенных поверхностных маркеров (CD133, CD15, A2B5, CD44), способность к дифференцировке, высокая подвижность и наличие определенного микроокружения [15, 28]. Считается, что именно СИРК глиом устойчивы к действию цитостатиков и гамма-облучения. Они характеризуются высокой экспрессией эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF). Показано, что в СИРК глиом активны такие сигнальные пути как Notch,

Hedgehog-Gli, Wnt/ β -катенин, TGF- β /SMAD, PI3K/Akt/mTOR, благодаря чему клетки обладают высокой пролиферативной активностью и лекарственной резистентностью [5, 13, 47, 51, 58]. Также этот тип клеток отличается иммунорезистентностью [11, 36].

К сожалению, до настоящего времени не найден универсальный специфический маркер СИРК глиом, что является причиной отсутствия таргетных способов лечения рака головного мозга [1, 15, 16, 28, 36, 44, 60].

Выявление в массе опухолевых клеток главной мишени — СИРК, является приоритетной задачей, за которой с неизбежностью встает вопрос о том, как убить эту клетку в ее естественных условиях существования. Основными описанными свойствами СИРК являются следующие: пролиферативная самодостаточность, инвазивность, множественная лекарственная устойчивость, независимость от контролирующего влияния стволовых ниш, способность после апоптотической дефрагментации формировать структуру, названную авторами «blebbishields», которая в последствии восстанавливается в жизнеспособную клетку [30, 33, 34, 49]. Кроме того, СИРК обладают эпигенетической пластичностью — при блокировании одного регуляторного каскада активируются другие регуляторные системы клетки, в результате чего СИРК выживают, а их клеточные потомки приобретают более агрессивные свойства. Наконец, опухолевые клетки способны к реверсивной трансформации стволового фенотипа при генерализованном клеточном стрессе [12, 19, 27, 29, 32, 39, 50]. В силу всех вышеперечисленных свойств СИРК чрезвычайно устойчивы к внешним воздействиям [17, 28, 48].

В настоящее время изучается возможность воздействия на отдельные молекулярные мишени СИРК глиобластом. Наиболее перспективными в этом плане являются Notch [18, 25] и Hedgehog сигнальные каскады [41, 58]. Разрабатываются препараты, блокирующие активность металлопротеиназ ADAM10 и ADAM17 [53]. Рассматриваются подходы с использованием электрических полей низкой интенсивности и промежуточной частоты (tumor-treating fields, TTF) [37] и феномена направленной миграции нормальных нейральных стволовых клеток к стволовым глиальным раковым клеткам [2, 3].

Несмотря на огромные усилия, в настоящее время еще не найдено эффективного терапевтического режима, позволяющего вылечить больных злокачественными глиомами (особенно, больных глиобластомами) или существенно увеличить их безрецидивную выживаемость. В этой связи поиск новых маркеров и раз-

работка принципиально новых подходов элиминации СИРК глиом остается актуальной задачей экспериментальной и клинической медицины.

В нашей работе [22] было обнаружено свойство низкодифференцированных клеток различного генеза, в том числе СИРК, интернализировать без каких-либо факторов трансфекции фрагменты двуцепочечной экстраклеточной ДНК. Используя новый маркер, были идентифицированы СИРК в глиобластомах человека [23]. Также нами было описано другое свойство, а именно, способность захваченных экстраклеточных фрагментов интерферировать репаративный процесс, идущий в СИРК. Помимо двух упомянутых свойств в реализации нового стратегического подхода лечения рака принципиальное место занимает обнаруженный механизм синхронизации СИРК в чувствительной для обработок фазе клеточного цикла. На основании найденных новых общебиологических свойств СИРК была разработана универсальная стратегия их эрадикации и, как следствие, новая технология лечения рака [4, 6, 7, 10, 20, 21, 45].

В настоящем исследовании на примере линии U87 удалось показать, что разработанная стратегия эрадикации СИРК с использованием терапевтических доз цитостатика митомицина С в режиме «накладывающихся арестов» клеточного цикла в комбинации со сложнокпозиционным препаратом на основе ДНК позволяет полностью разрушить перевивочный потенциал клеток глиобластомы. В перспективе разработанная стратегия может дать новый терапевтический вектор в лечении злокачественных опухолей головного мозга человека.

Материалы и методы

Получение меченного dUTP-5'-TAMRA ДНК зонда

Мечение *Alu*-повтора человека флуорофором TAMRA проводили при помощи ПЦР в точности как описано в работе [22].

Сложнокпозиционный препарат двуцепочечной ДНК

Подробная информация о составе и способе приготовления композиционного препарата ДНК представлена в разделе «Материалы и методы» в работе [10].

Анализ TAMRA+ клеток

Клетки рассаживали в чашки Петри (диаметр 3,5 см). Прикрепленные клетки промывали PBS, в чашки Петри добавляли среду без сыворотки, *Alu*-TAMRA ДНК в количестве 0,5 мкг/мл, инкубировали 20 мин. Затем добавляли ядерный краситель Hoechst (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали еще 15 мин. Клетки анализировали при помощи инвентированного флуоресцентного микроскопа AxioObserver Z1 (Zeiss) и программы ZEN. В каждой точке присутствовали реплики и было проанализировано 2000–4000 клеток.

Подкожная и интрацеребральная перевивка культуры U87 мышам

В эксперименте использовали мышей линии SCID (Charles river) SPF статуса в возрасте 6–7 недель. Животных содержали в ЦКП «SPF-виварии» (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010) Института цитологии и генетики СО РАН однополыми семейными группами по 2–5 особей в индивидуально вентилируемых клетках (IVC) системы OptiMice (Animal Care Systems) в контролируемых условиях, при температуре 22–26°C, относительной влажности 30–60% и световом режиме свет/темнота 14/10 ч. Корм Ssniff (Германия) и воду, обогащенную минеральной смесью Северянка (Санкт-Петербург), животным предоставляли *ad libitum*.

За 2–3 недели до начала эксперимента на животных культуру клеток глиобластомы человека U87 (коллекция ИЦиГ СО РАН), размораживали и культивировали в течение 5–7 пассажей на среде DMEM (Gibco) с 10% фетальной сыворотки (FBS) фирмы Invitrogen. Перед инъекцией клетки снимали с подложки раствором трипсин/версен и после центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5 мин осадок тщательно ресуспендировали в среде DMEM без сыворотки, доводя до необходимой концентрации.

Для получения солидной опухоли глиомы U87 мышам подкожно в межлопаточную область вводили по 6,3 млн клеток в объеме 100 мкл среды DMEM без сыворотки. Рост опухоли отслеживали 1 раз в 2–3 дня и измеряли с использованием штангенциркуля в продольном и поперечном направлении при появлении под кожей характерных уплотнений.

Интрацеребральную перевивку клеток проводили с использованием модели ортотопической ксенотрансплантации клеток глиобластомы человека иммунодефицитным мышам. Животным в левое полушарие головного мозга вводили 5 мкл суспензии клеток (400 тыс. клеток/мышь). После инъекции появление новообразований в мозге животных отслеживали через 25–33 дня на высокопольном (11,7 Тл) ЯМР томографе «BioSpec 117/16USR» (Bruker, Германия) с использованием T2-взвешенного изображения (weighted techniques).

Все эксперименты с животными были одобрены локальным этическим комитетом Института Цитологии и Генетики СО РАН и проведены в строгом соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях.

Анализ репарации двуцепочечных разрывов методом «кометных хвостов»

Культуру клеток глиобластомы человека в виде суспензии (300 тыс. клеток) инкубировали в 1 мл с митомицином С (MMC) (SIGMA-Aldrich) (20 мкг/мл) при 37°C. После инкубирования с цитостатиком клетки осаждали, один раз промывали средой с сывороткой, ресуспендировали в этой же среде и разносили по лункам в 24-х луночном планшете. Каждые 6 часов клетки отбирали и заливали в блоки с легкоплавкой агарозой. Блоки застывали при 4°C, затем их переносили в 0,5 М ЭДТА. Перед нанесением на электрофорез блоки отмывали в ТЕ-буфере, переносили в лизирующий буфер (1% лаурилсаркозил, 50 мМ ЭДТА, протеиназа К 1 мг/мл), лизировали блоки при 50 °C в течение 15 мин. Электрофорез блоков проводили в течение 30 мин, 0,75 В/см в трис-ацетатном буфере с добавлением бромистого этидия. Затем блоки высушивали и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа AxioImager (Zeiss) и программы ISIS. Анализ содержания двуцепочечных разрывов (ДЦР) производили с использованием параметра Tail Moment (ТМ, хвостовой момент) (ТМ = длина хвоста кометы × процент ДНК в кометном хвосте) в программе CASP.

Анализ распределения клеток по клеточному циклу

Культуру клеток глиобластомы обрабатывали цитостатиком ММС (20 мкг/мл) трехкратно через каждые 36 часов. До обработки цитостатиком, через 18, 54, 90 часов, а также на 6-9-е сут с момента первой обработки клетки отбирали на анализ распределения по клеточному циклу. Отобранные для анализа клетки фиксировали в 50% метаноле и хранили при 4°C. Анализ распределения по клеточному циклу всех экспериментальных точек проводился одновременно. Клетки ждали центрифугированием 400 g в течение 5 мин, промывали раствором PBS и производили подсчет в камере Горяева. Равное количество клеток в каждой экспериментальной точке было использовано для последующего анализа. Анализ проводили при помощи обработки клеток пропидий йодидом (SIGMA-Aldrich) и проточного цитофотометра BD FACSAria (Becton Dickinson, USA) по протоколу, описанному в работе [20].

Обработка культуры клеток глиобластомы цитостатиком и препаратом ДНК, подсчет абсолютного количества TAMRA+ клеток

Клетки в прикрепленном виде обрабатывали ММС и препаратом ДНК. При этом клетки промывали PBS, помещали в среду без сыворотки с добавлением либо цитостатика в количестве 20 или 10 мкг/мл, либо препарата ДНК в количестве 0.5 мкг/мл. Обработку цитостатиком проводили в течение часа или 30 мин соответственно, препаратом ДНК — в течение 40 мин. Затем клетки промывали PBS и помещали в среду DMEM с добавлением 10% FBS. В контрольных точках в каждой группе считали процент TAMRA+ клеток, как это описано выше, в указанном анализе присутствовали биологические реплики. Затем забирали по чашке Петри, снимали клетки трипсином/ЭДТА и считали их количество (N) при помощи камеры Горяева. Абсолютное количество TAMRA+ клеток (X) считали по формуле:

$$X = \frac{N \times k}{100}$$

где k — процент TAMRA+ клеток.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили при помощи программы Statistica 10. На графиках приведены стандартные отклонения, а также доверительные интервалы (p<0.01). Достоверность полученных результатов оценивали при помощи критерия Манна-Уитни.

Результаты

Оценка числа TAMRA позитивных клеток в культуре клеток глиобластомы человека U87

Культура клеток U87 является стандартной моделью для изучения глиобластом. Клет-

ки хорошо растут в стандартных условиях (DMEM+10% сыворотки с добавлением смеси антибиотиков пенициллин/стрептомицин) в прикрепленном состоянии. При определенных условиях (в отсутствии эмбриональной сыворотки) культура может формировать свободно плавающие сферы (неопубликованные данные). Был оценен процент TAMRA+ клеток в культуре клеток глиобластомы человека U87, который составил 0.47±0.26% (рис. 1).

Анализ возможности интрацеребрального и интракратенального графтинга культуры клеток человеческой глиобластомы U87

Для того чтобы оценить эффективность разрабатываемой стратегии и режима эрадикации TAMRA+ СИРК необходимо, помимо оценки клеточных параметров выживаемости, в обязательном порядке оценить эффективность перевивки обработанной культуры. Именно такой биологический тест даст окончательный ответ на вопрос об эрадикации опухолевого начала в трансплантате. Для оценки в биологических тестах эффективности проводимых обработок цитостатиком и препаратом ДНК культуры клеток, необходимо в начале исследований определить возможность получения уверенного трансплантата при графтинге клеток необработанной (исходной) культуры. Рабочей моделью для биологических экспериментов была выбрана стандартная культура клеток человеческой глиобластомы U87.

Для оценки *in vivo* опухолевого потенциала данной культуры нами были проведены эксперименты по перевивке U87 клеток интрацеребрально и подкожно SCID мышам (рис. 2). При интрацеребральной перевивке трем иммунодефицитным мышам перевивали по 400 тыс. клеток. На 33 день с момента перевивки провели МРТ головного мозга. Развитый графт хорошо детектировался у всех животных (рис. 2А). При подкожной перевивке такого же количества клеток также были получены уверенно развивающиеся трансплантаты (рис. 2б).

Присутствие в культуре U87 TAMRA позитивных клеток и полученные результаты по

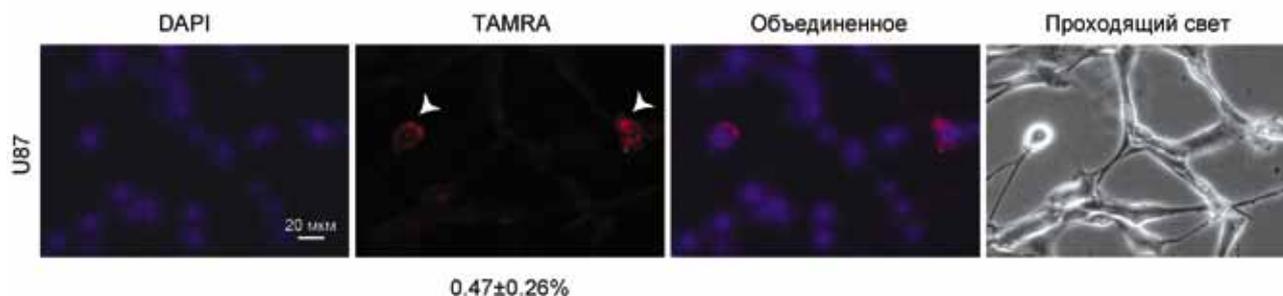


Рис. 1. Анализ присутствия TAMRA+ клеток в культуре клеток человеческой глиобластомы U87. DAPI — окраска на хроматин, TAMRA — сигнал экзогенной ДНК, стрелками указаны клетки, имеющие сигнал TAMRA

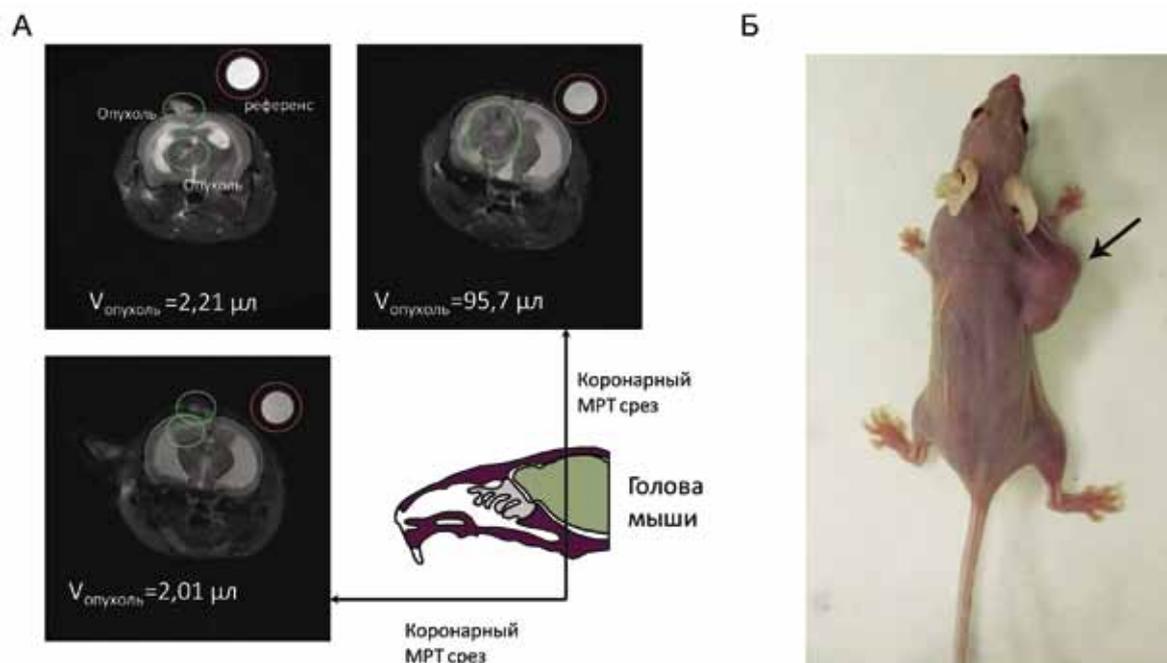


Рис. 2. Оценка культуры клеток человеческой глиобластомы U87 давать графт при перевивке SCID мышам. А — МРТ анализ головного мозга SCID мышей через 33 дня после интрацеребральной перевивки клеток U87. Графт детектируется у всех животных. Б — Подкожная трансплантация U87 той же линии мышей. Графт указан стрелкой

ксенотрансплантации клеток U87 SCID мышам делают культуру человеческой глиобластомы удобной репрезентативной модельной системой для определения режима эрадикации TAMRA+ СИРК и оценки эффективности разрабатываемой стратегии.

Анализ репарации ДЦР ДНК в культуре клеток U87 после воздействия кросслинкующего цитостатика ММС

Одним из базовых параметров разрабатываемой технологии является нахождение контрольных точек процесса репарации межцепочечных сшивок. В качестве контрольных точек было выбрано время появления и репарации ДЦР ДНК, как основных маркеров происходящих событий. Процесс репарации межцепочечных сшивок характеризуется следующим особенностями. Кросслинкующий цитостатик или его кросслинкующий метаболит проникает в клетку простой диффузией и интеркалирует в ДНК хроматина. Алкилирующие группы взаимодействуют с основаниями обеих цепей и формируют межцепочечную сшивку [35]. Такая структура крайне токсична для клетки, и при ее появлении активируются два репаративных механизма: эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER) и гомологичная рекомбинация (homology repair, HR). Таким образом репаративный процесс состоит из следующих этапов. Кросслинк определяется в процессе синтеза новой цепи ДНК в S фазе, когда репликативная вилка «наталкивается» на

межцепочечную сшивку. Специфический нуклеазный комплекс Mus81-Eme1 гидролизует одноцепочечный участок одной из вновь синтезированных цепей хроматина [31, 61]. В результате активности Mus81-Eme1 образуется свободный двуцепочечный конец, который детектируется или антителами к гистону $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ (специфический маркер свободных двуцепочечных концов), или методом «кометных хвостов» [59]. Этот момент времени считается началом репаративного цикла. Далее аналогичные события происходят со всем межцепочечными сшивками, индуцированными цитостатиком, что детектируется как их максимальное накопление. Одновременно активируется молекулярная машина NER, и стартует процесс вырезания аддукта. По завершению NER свободный двуцепочечный конец процессируется, отжигается с гомологичным участком сестринской хроматиды, и остановленная репликативная вилка восстанавливается (HR), что определяет конец репаративного процесса. Эта индикаторная точка так же легко определяется указанными выше способами. Таким образом, определив динамику появления и репарации ДЦР, мы можем определить время репаративного цикла, необходимое для полного восстановления хроматина после воздействия цитостатика или его метаболитов.

Временная конфигурация репаративного цикла раковых клеток является базой для определения режима метрономных (накладывающихся) обработок кросслинкующим цитостатиком (когда каждая последующая обработка цито-

статиком проводится в конечную фазу предыдущего репаративного цикла) и времени введения в терапию препарата ДНК. В свою очередь определенный таким способом режим накладываемых обработок цитостатиком позволяет определить день полной синхронизации СИРК в чувствительной для терапии фазе клеточного цикла и назначить день финальной эрадицирующей обработки. В результате применения накладываемых обработок цитостатиком происходит последовательный арест всех раковых клеток, независимо от первоначального распределения по клеточному циклу, в S фазе. Затем происходит синхронный выход всех выживших раковых клеток, включая СИРК, в G2/M и далее в G1. Такая синхронизация позволяет эрадицировать все СИРК, что приводит к вылечиванию от рака [6-9, 45, 46].

Анализ образования и репарации ДЦР ДНК культуры клеток человеческой глиобластомы U87 был произведен методом «кометных хвостов» (рис. 3).

Как видно из графика на рис. 3, максимум образования ДЦР в культуре клеток U87 приходится на 18 часов с момента обработки цитостатиком ($p < 0.001$). Эта картина отличается от данных, полученных на первичных клеточных линиях (данные не приведены). Поэтому для клеток линии U87 был разработан независимый регламент терапевтического режима эрадикации TAMRA+ (СИРК) в соответствии с результатами анализа цикла репарации межцепочечных сшивок, индуцированных ММС.

Определение дня финальной терапевтической обработки, направленной на эрадикацию TAMRA+ СИРК U87

Для определения дня синхронизации раковых клеток в чувствительной для обработок G2/M (и далее G1) фазе после трех последовательных обработок цитостатиком, были проведены два анализа. Было проанализировано распределение клеток U87 по клеточному циклу в течение и после обработок митомицином С (ММС). Дополнительно было оценено изменение поведения культуры U87, а также изменение количества TAMRA позитивных клеток, обнаруживаемых в процессе обработок цитостатиком.

График обработки цитостатиком соответствовал режиму «накладываемых арестов» клеточного цикла, когда каждая последующая обработка ММС проводилась в конечную фазу предыдущего репаративного цикла, временные параметры которого были определены в предыдущем разделе.

Анализ распределения клеток по клеточному циклу оценивался по количеству хроматина с использованием интеркалирующего красителя пропидия йодида. В норме четко определяются фазы клеточного цикла G1 и G2/M, соответствующие 2N и 4N набору хромосом, и промежуточные количества хроматина, соответствующие фазе синтеза (S). При применении терапевтических обработок с использованием останавливающего клеточный цикл цитостатика, в анализ одновременно попадают как клетки, находящиеся в различных фазах клеточного цикла

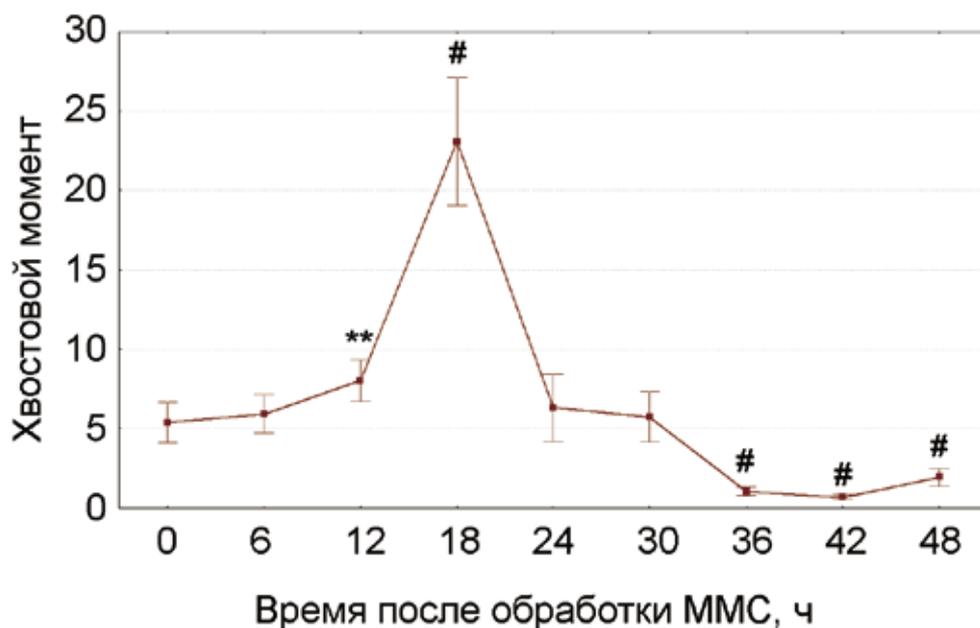


Рис. 3. График цикла репарации ДЦР, вызванных действием цитостатика ММС, культуры клеток глиобластомы человека U87 методом «кометных хвостов». Количество ДЦР в клетках оценивали с использованием показателя «хвостовой момент» кометных хвостов. На графике приведены доверительные интервалы ($p < 0.01$). ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$, достоверность результатов в каждой точке оценивалась относительно нулевой точки при помощи критерия Манна-Уитни в программе Statistica 10

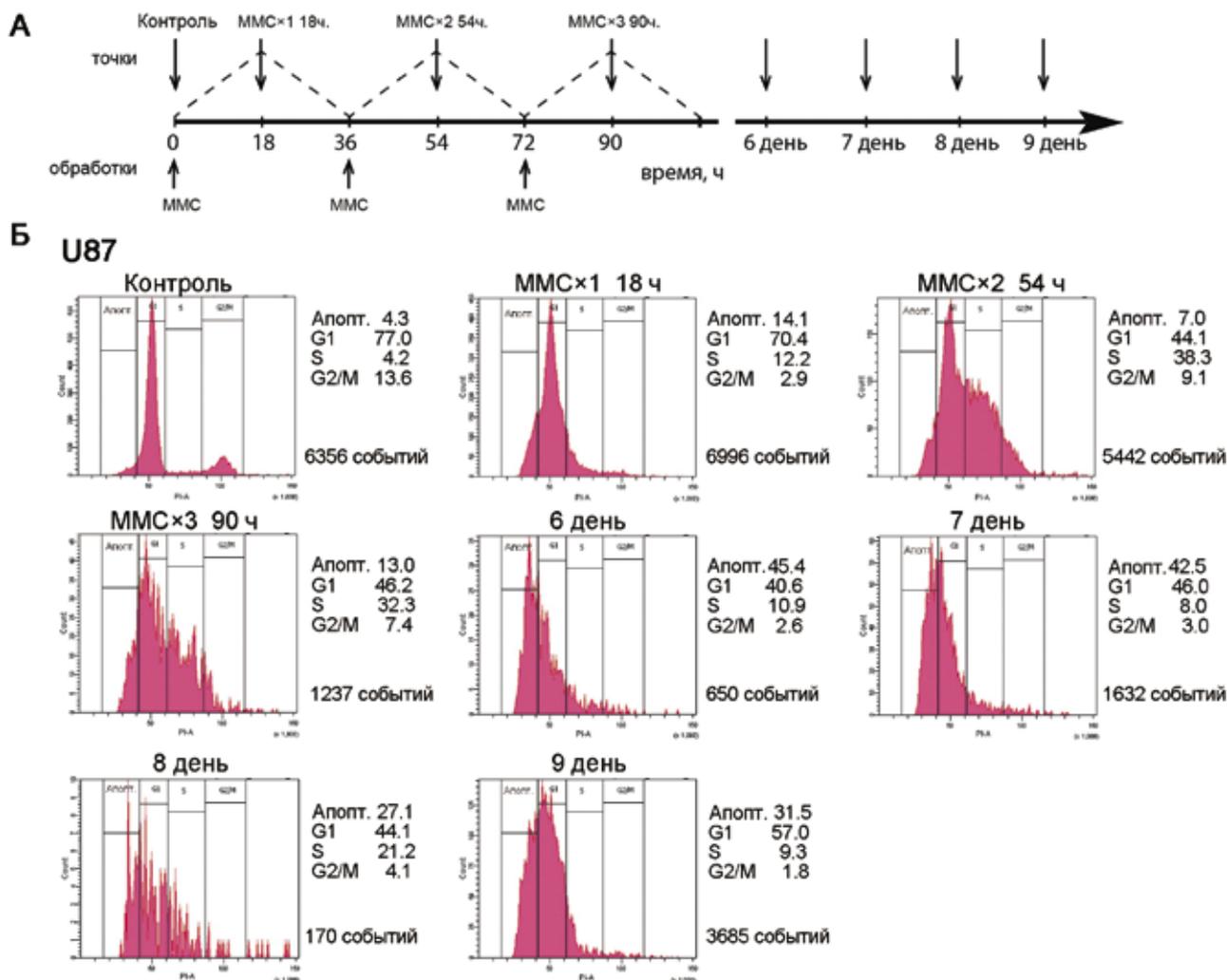


Рис. 4. Анализ распределения по клеточному циклу культуры клеток глиобластомы U87 в течение терапии цитостатиком MMC. А — схема обработки клеток MMC (три обработки через 36 ч), а также точек, в которых производили анализ клеточного цикла (до начала обработки цитостатиком, через 18, 54, 90 ч, а также на 6-9 сутки после первой обработки MMC). Б — плоты с проточного цитофотометра (BD FACSAria); G1, S, G2/M — фазы клеточного цикла; апопт. — апоптотизирующие клетки

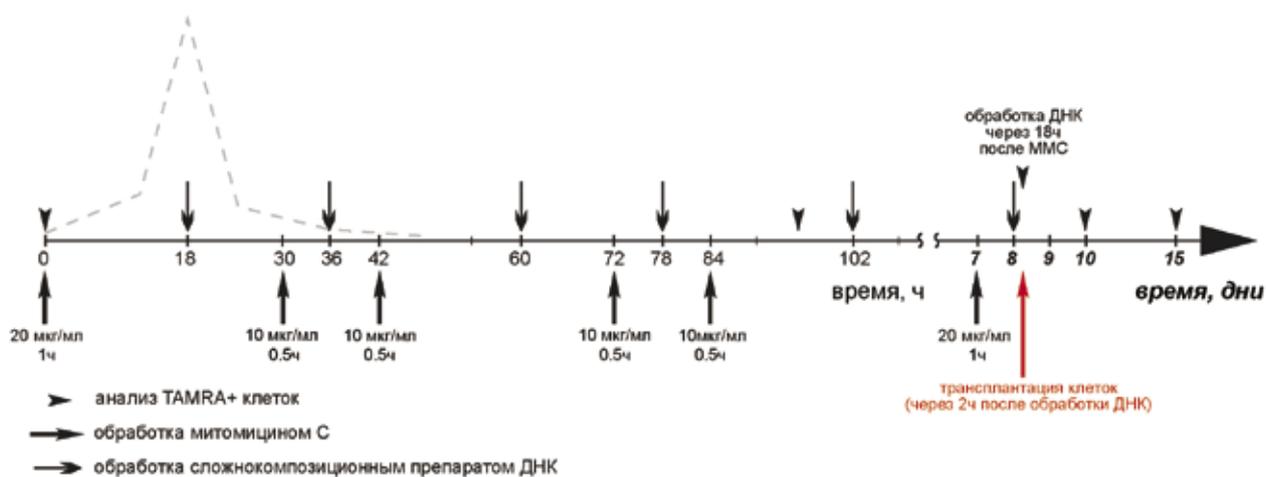


Рис. 5. Схема обработки культуры клеток глиобластомы U87 цитостатиком MMC и композиционным препаратом ДНК. Пунктирной линией схематично обозначен график образования и репарации ДЦР ДНК после обработки культуры U87 цитостатиком

и имеющие промежуточную (2N-4N) интенсивность флуоресценции по пропидий йодиду, так и «апоптотические деграданты», также имеющие различную интенсивность флуоресценции (4N-2N). То есть в области выставленных ворот клеточного цикла в S фазе встречаются два неконтролируемых по свечению процесса. Этот факт подразумевает, что оценка клеточного цикла всегда будет относительно условной, поскольку «апоптотические деграданты» будут смешиваться с целыми клетками, находящимися в процессе синтеза, искажая картину распределения по клеточному циклу. В этой связи при анализе клеточного цикла находящихся в режиме терапии клеток, рассматривались только устойчивые точки, которые могли трактоваться однозначно. К таким точкам мы отнесли отсутствие клеток в G2/M, их накопление в G1 и динамический выход в синтез.

Поскольку, как было сказано выше, анализ распределения клеток по клеточному циклу всегда имеет некоторые ограничения, мы в наших исследованиях всегда параллельно оцениваем количество TAMRA позитивных клеток как маркера эффективности воздействия на СИРК. Сопоставление этих двух параметров позволяет наиболее точно определить день финальной терапевтической обработки.

Анализ распределения культуры клеток U87 по клеточному циклу

Используя трехкратную обработку ММС, был определен день синхронизации раковых клеток в чувствительной для терапии фазе клеточного цикла (G1). Схема обработок цитостатиком представлялась как трехкратное выдерживание культуры клеток в течение часа в присутствии ММС (20 мкг/мл) с последующей отмывкой. Обработка цитостатиком производилась на временных отрезках, обрамляющих время найденного репаративного цикла (рис. 4А). В наших предыдущих исследованиях мы обнаружили, что трехкратные обработки цитостатиком арестуют практически всю популяцию раковых клеток в S фазе. Большая часть коммитированных потомков уходит в апоптоз, что хорошо визуализируется микроскопически. Оставшиеся клетки, включая TAMRA позитивные СИРК, будут синхронизированы и войдут в клеточный цикл в определенный день после проведенных обработок [6-9, 45, 46]. Распределение культуры U87 по клеточному циклу выглядело следующим образом (рис. 4Б).

U87 клетки арестуются при обработке цитостатиком в S фазе, и их количество возрастает с 4,2% в необработанной культуре до 38,3% к 54 часам после первой обработки ММС. Количество апоптозирующих клеток достигает 45% и держится на высоком уровне на протяжении

5-и суток наблюдения. На 8 сутки эксперимента количество клеток падает до минимального, при этом основная масса оставшихся клеток находится в G1 после минимального показателя в S фазе на 6-7 сутки эксперимента. Минимальный показатель клеток в S фазе, минимальный показатель клеток в G2/M определяемые на 6-7 сутки и идентичность плотов на протяжении этих двух суток свидетельствует о том, что подавляющее большинство клеток находится в положении «ожидания» в G1 фазе клеточного цикла, где клетки сконцентрировались после синхронизации. Именно 7-й день был выбран в качестве времени финальной обработки, уничтожающей TAMRA+ СИРК. На 8 день четко определяется восстановление движения по клеточному циклу, которое характеризуется выходом клеток в фазу синтеза (21% в отличие от 8%).

Обработка культуры клеток человеческой глиобластомы U87 цитостатиком ММС и препаратом ДНК в режиме, направленном на эрадикацию СИРК (TAMRA+ клеток)

Для валидации определенного FACS анализом дня финального терапевтического «удара» была проведена оценка состояния культуры U87, находящейся в режиме терапевтического воздействия ММС, цитологическими методами. Дополнительно было оценено изменение количества TAMRA+ клеток при введении в терапию препарата ДНК.

Клетки линии U87, находящиеся в культуре в адгезивном состоянии, обрабатывали препаратами ММС и ММС совместно с комбинированным препаратом экзогенной двуцепочечной ДНК [6-9] по схеме, представленной на рис. 5.

Обработку цитостатиком проводили в 0 часов и на 7-е сутки с момента начала терапии (20 мкг/мл в течение 1 ч) и в 30, 42, 72, 84 (10 мкг/мл в течение 30 мин). Препаратом двуцепочечной ДНК в количестве 0,5 мкг обрабатывали в течение 40 мин в 18, 36, 60, 78, 102 часа с момента первой обработки цитостатиком и на 7-е сутки через 10 часов после обработки ММС. Выбранный режим введения цитостатика полностью перекрывал репаративный цикл. Повторение схемы введения, перекрывающей репаративный цикл, как предполагалось, должно было привести к аресту всей популяции СИРК культуры U87. Режим обработки цитостатиком в точке 36 часов был частично изменен с целью охвата всех клеток популяции СИРК которые, как нам казалось, могли ускользнуть от обработки ММС, проведенным только в точку 36 часов. Базовую выбранную точку 36 часов разбили на две обрамляющие ее точки и обработку ММС провели в 30 и 42 часа, снизив дозу цитостатика вдвое.

В процессе обработок был проанализирован процент TAMRA+ клеток, а также были проведены оценочные эксперименты, характеризующие количество прикрепленных (жизнеспособных) клеток и абсолютное количество TAMRA+ клеток (на 3, 7, 10 и 15 сутки с начала обработки ММС) (рис. 6).

Уже к 3 суткам количество клеток в контрольных культурах возрастает с исходных 300 до 570 тыс. (в 1,9 раза). В группах ММС и ММС+ДНК количество клеток постепенно снижается. Так, к 10 суткам остается 92,4 тыс. (ММС) и 16,8 тыс. (ММС+ДНК) клеток. То есть от исходных клеток их количество падает в 3,2 и 17,9 раз соответственно. К 15-м суткам количество клеток составляет 62 тыс. (ММС) и 72 тыс. (ММС+ДНК) (рис. 6А).

Как видно из рис. 6Б после начала обработок (на 7 сутки) процент TAMRA+ клеток снижается до $0.00 \pm 0\%$ в обеих группах. Затем процент TAMRA+ клеток начинает возрастать. На 15-е сутки процент TAMRA+ составляет $0.33 \pm 0.06\%$ (ММС) и $0.05 \pm 0.10\%$ (ММС+ДНК, $p < 0.05$ по сравнению с контролем).

Также была произведена оценка динамики абсолютного количества TAMRA позитивных клеток (рис. 7). По ходу эксперимента абсолютное количество СИРК (TAMRA+) падает. К 7-м суткам наблюдается их минимальное количество, к 15-м суткам количество TAMRA+ клеток составляет 210 клеток в ММС и 72 клетки в группе ММС+ДНК. Полученные данные свидетельствуют, что предложенная стратегия значительно снижает абсолютное количество TAMRA+ клеток как при обработке одним ММС, так и при синергичном действии ММС и препарата ДНК.

Проведенная оценка свидетельствовала, что основные параметры терапевтического вмешательства, а именно режим введения цитостатика, препарата ДНК и день финальной обработки (7 сутки от начала терапии) выбраны корректно. При применении такого подхода происходит эффективная элиминация TAMRA+ клеток как в случае обработки одним ММС, так и при введении в схему обработок препарата двуцепочечной ДНК.

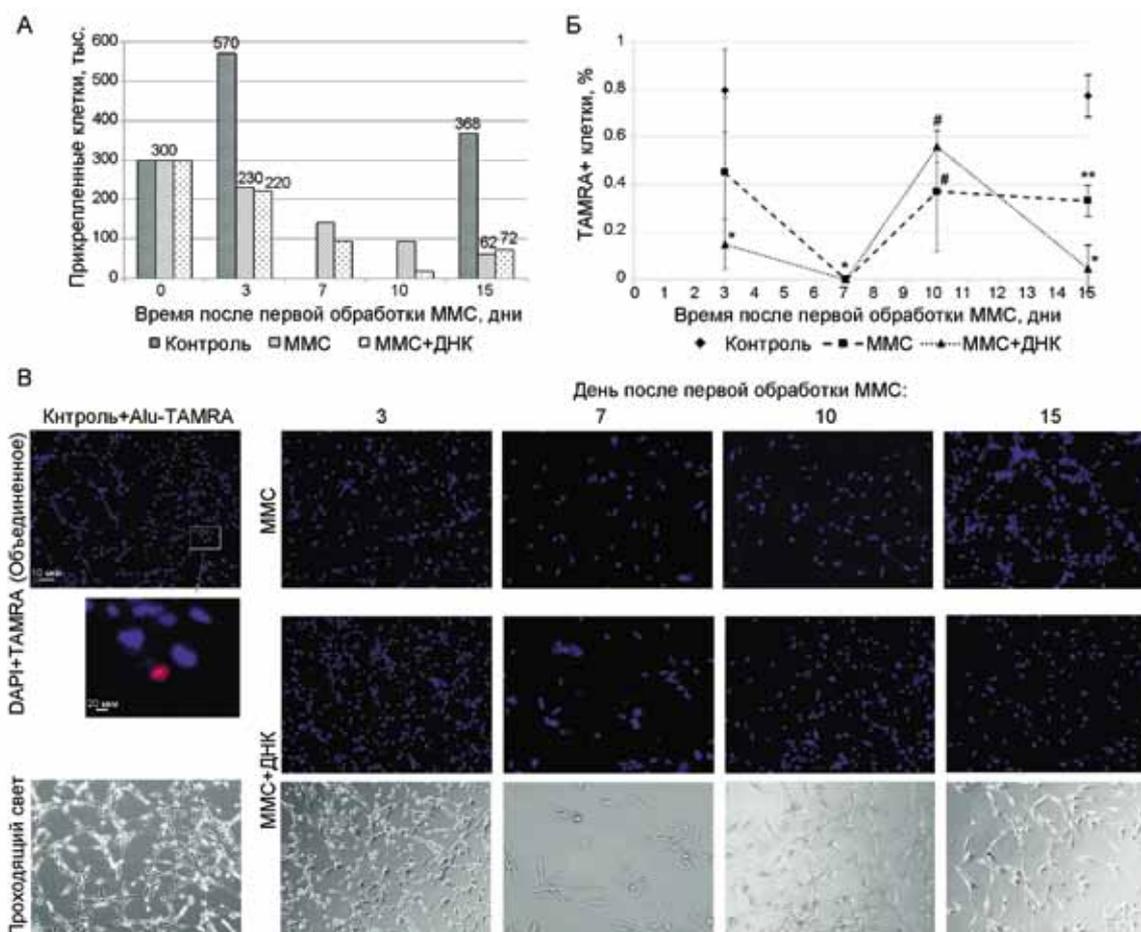


Рис. 6. Анализ количества прикрепленных клеток, а также TAMRA+ клеток культуры U87 после обработки цитостатиком ММС и композиционным препаратом ДНК. А — график количества прикрепленных клеток на 3, 7, 10 и 15 сутки с момента первой обработки ММС. Б — график процента TAMRA+ клеток. Приведены стандартные отклонения, достоверность результатов оценена относительно контрольных значений при помощи критерия Манна-Уитни, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$. В — цитологические препараты клеток до обработки ММС (Контроль), на 3, 7, 10 и 15 сутки с начала обработок. На рисунке приведено объединенное изображение в каналах DAPI (хроматин) и TAMRA (сигнал экзогенной ДНК). ММС — группа, которую обрабатывали только цитостатиком; ММС+ДНК — группа, которую обрабатывали цитостатиком и препаратом ДНК. Для групп «Контроль» и «ММС+ДНК» приведено изображение клеток в проходящем свете

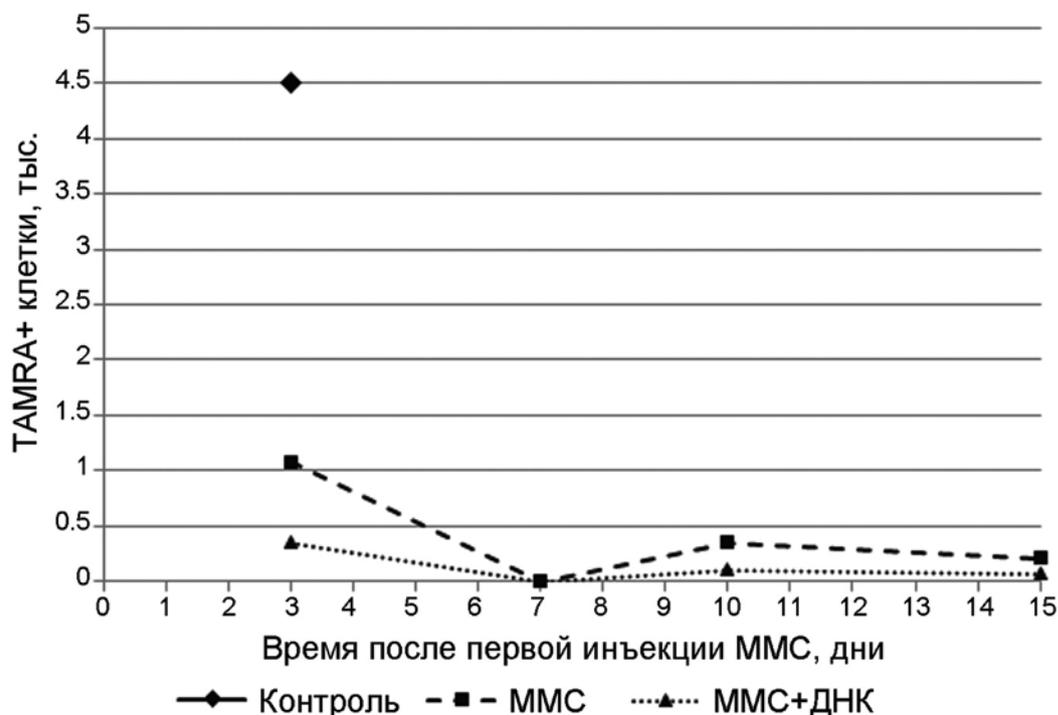


Рис. 7. Абсолютное количество TAMRA+ клеток в культуре линии U87 на фоне терапии цитостатиком ММС и ММС в комбинации со сложноккомпозиционным препаратом ДНК

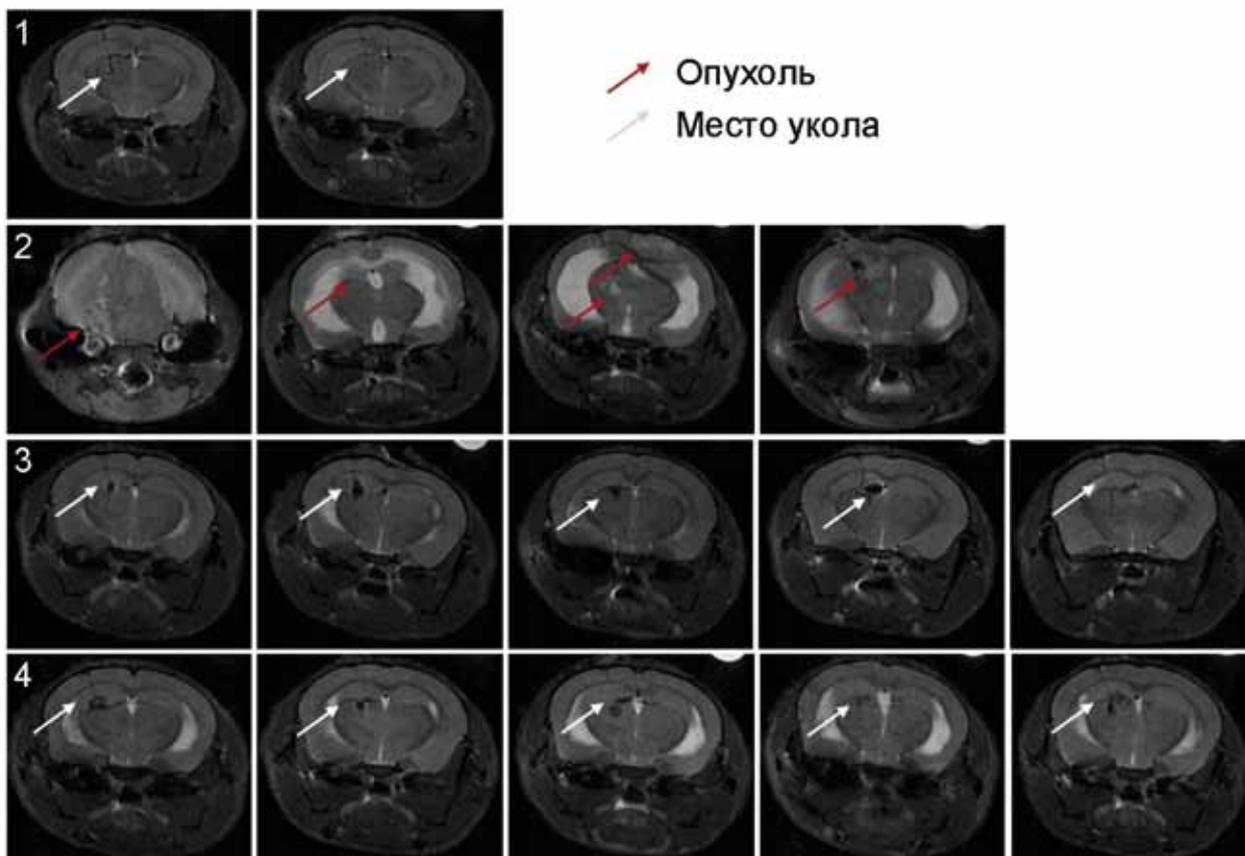


Рис. 8. МРТ анализ головного мозга SCID мышей через 15 суток после интрацеребральной перививки клеток человеческой глиобластомы U87. **1** — отрицательный контроль, перививка физиологического раствора в том же объеме что и клетки; **2** — положительный контроль, перививка необработанных U87 клеток; **3** — ММС, перививка клеток, обработанных только цитостатиком ММС; **4** — ММС+ДНК, перививка клеток, обработанных ММС и препаратом ДНК. Графт детектируется только у животных из группы 2

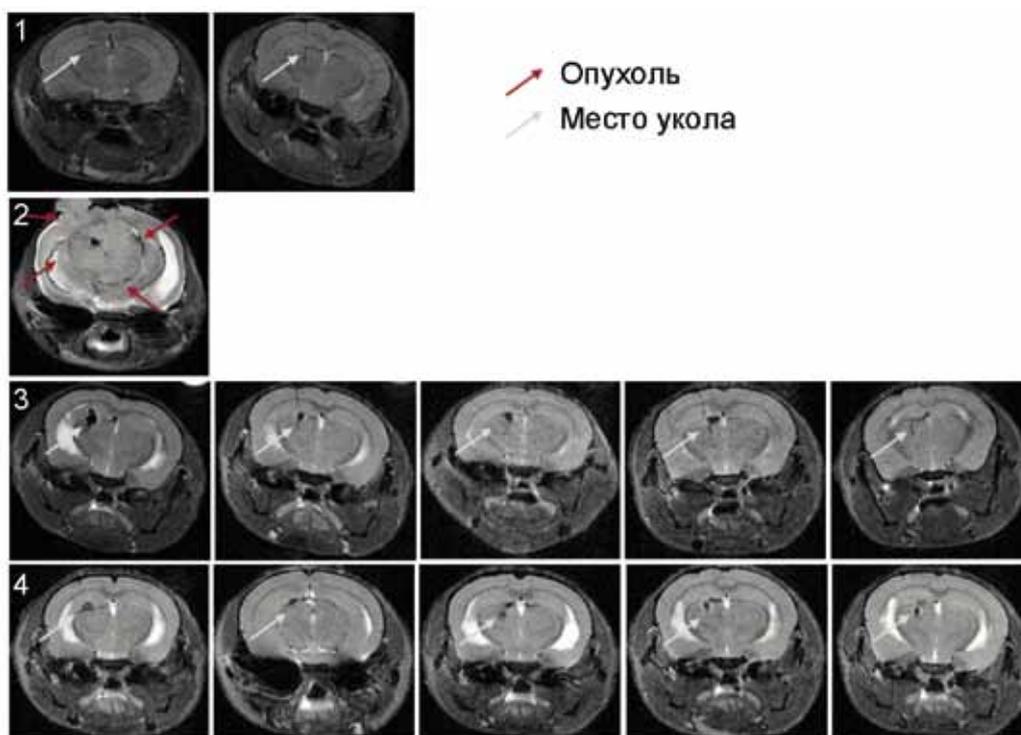


Рис. 9. МРТ анализ головного мозга SCID мышей через 37 суток после интрацеребральной перевивки клеток человеческой глиобластомы U87. **1** — отрицательный контроль, перевивка физиологического раствора в том же объеме что и клетки; **2** — положительный контроль, перевивка необработанных U87 клеток; **3** — ММС, перевивка клеток, обработанных только цитостатиком ММС; **4** — ММС+ДНК, перевивка клеток, обработанных ММС и препаратом ДНК. Гraft детектируется только у животного из группы 2, остальные три мыши из этой группы к 37-м суткам пали

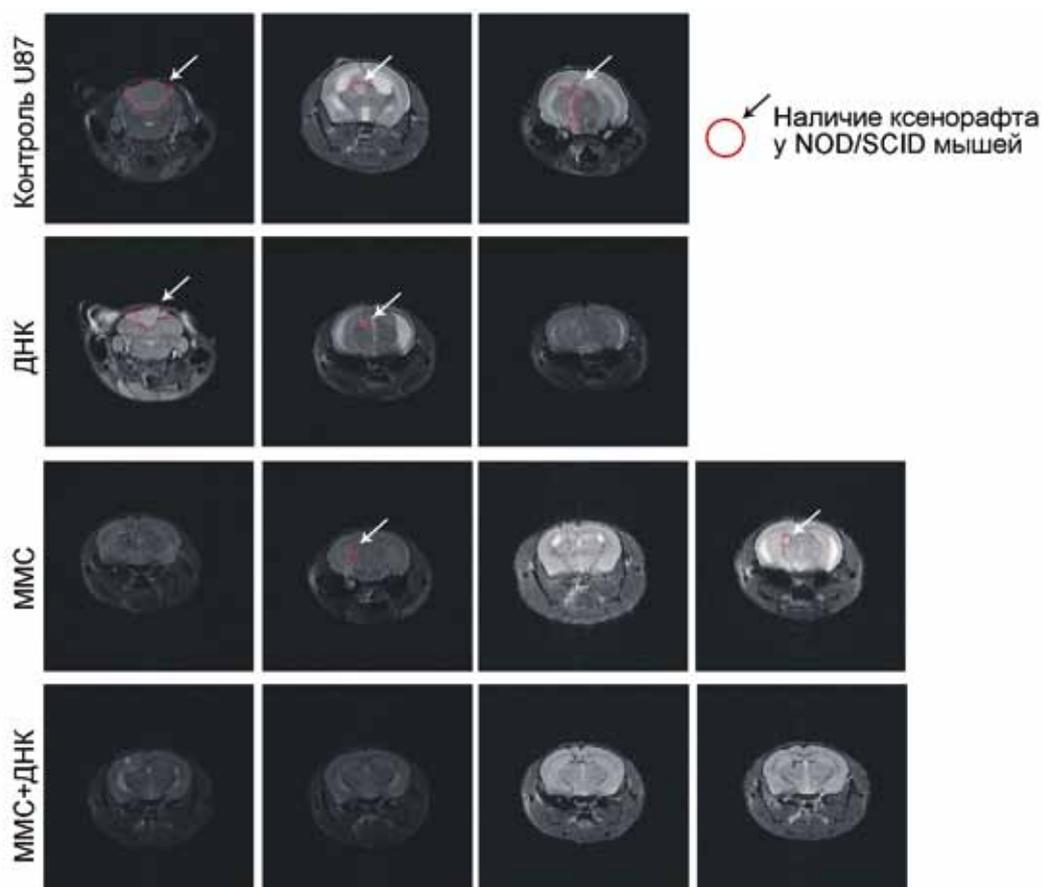


Рис. 10. МРТ анализ головного мозга SCID мышей через 24 суток после интрацеребральной перевивки клеток человеческой глиобластомы U87. Контроль **U87** — положительный контроль, перевивка необработанных U87 клеток; ДНК — перевивка клеток, обработанные препаратом ДНК в режиме монотерапии; ММС — перевивка клеток, обработанных только цитостатиком ММС; ММС+ДНК — перевивка клеток, обработанных ММС и препаратом ДНК. В группе ММС+ДНК graft отсутствует у всех животных

Перевивка культуры клеток человеческой глиобластомы U87 SCID мышам после обработки ММС и ММС+ДНК

Разработанная терапевтическая схема была использована для обработки клеток культуры клеток U87 с их последующей интрацеребральной трансплантацией. Обработку клеток для перевивки вели в большом культуральном флаконе. По окончании обработок клетки перевивали интрацеребрально SCID мышам.

Было сформировано 4 группы: 1) отрицательный контроль, 2) мыши, перевивка физиологического раствора в том же объеме что и клетки; 2) положительный контроль, 4 мыши, перевивка необработанных U87 клеток, 315 тыс. клеток/мышь; 3) ММС в дозе 20 мкг/мл, 5 мышей, перевивка 400 тыс. клеток/мышь, обработанных только цитостатиком ММС; 4) ММС+ДНК, 5 мышей, 400 тыс. клеток/мышь, обработанных ММС в дозе 20 мкг/мл, и препаратом ДНК. Клетки в требуемом количестве брались после всех проведенных обработок.

На 15-е сутки с момента перевивки клеток был сделан первый МРТ анализ. Сформированный графт обнаруживался только у группы положительного контроля (рис. 8).

Повторно МРТ анализ был проведен на 37-е сутки с момента перевивки клеток. Часть контрольных мышей к этому моменту уже пала (три из четырех мышей). В остальных группах графт по-прежнему не детектировался (рис. 9). Через 3 мес. наблюдения трансплантаты в экспериментальных группах так и появились.

В проведенном эксперименте не было обнаружено влияния препарата двуцепочечной ДНК на развитие графта, несмотря на его явное влияние в экспериментах на культуре клеток. Было сделано предположение, что ММС в используемых дозах сам по себе элиминирует стволовые клетки в обрабатываемой культуре, использованной для графтинга. В этой связи эксперимент по трансплантации клеток глиобластомы U87 был повторен с использованием терапевтической дозы цитостатика, равной 5 мкг/мл (такую дозировку цитостатика в дальнейшем возможно будет применять в экспериментах *in vivo*, то есть вводить животным без риска их гибели непосредственно от токсического воздействия цитостатика) [52, 55]. Результаты эксперимента представлены на рис. 10.

В рассматриваемом эксперименте по трансплантации были получены следующие результаты. У всех контрольных мышей сформировался интрацеребральный трансплантат. У животных, которым прививались обработанные ММС клетки, трансплантат был детектирован только у двух из четырех мышей (50% животных). У животных, которым прививался обработанный ММС

в синергизме с препаратом двуцепочечной ДНК трансплантат, роста графта не было обнаружено ни у одного животного. Полученный результат предполагает, что проведенная обработка клеток глиобластомы цитостатиком ММС и препаратом ДНК полностью эрадицирует туморогенное начало графта, представленного TAMRA позитивными клетками.

Обсуждение

Определенный репаративный цикл для культуры U87 не характеризовался симметричными кривыми накопления ДЦР и их репарацией. В этой связи обработку цитостатиком и препаратом ДНК проводили с небольшими изменениями из понимания максимального терапевтического охвата всех клеток обрабатываемой культуры.

Первоначально предполагалось, что проведенные обработки приведут к полной элиминации TAMRA+ (СИРК). Однако анализ количества TAMRA+ клеток, проведенный по ходу эксперимента, свидетельствовал, что динамика количества этой популяции клеток имеет более сложную закономерность. На 7 сутки этот тип клеток не обнаруживается в обработанных культурах. Далее идет увеличение числа TAMRA+ клеток, и на 10 сутки от начала обработок достигает максимального значения хотя и более низкого чем в начале. В культуре, обработанной ММС, этот показатель составляет $0.37 \pm 0.25\%$ а для группы ММС+ДНК $0.56 \pm 0.07\%$. К 15 суткам наблюдения в культуре, обработанной ММС, процент TAMRA+ клеток незначительно снижается до $0.33 \pm 0.06\%$, в группе ММС+ДНК показатель падает до $0.05 \pm 0.1\%$ ($p < 0.05$ по сравнению с контролем).

Абсолютное количество TAMRA позитивных клеток к 15-м суткам эксперимента составляет 210 клеток в образце, обработанном ММС и 72 клетки в группе ММС+ДНК (от количества в контроле 2 900 клеток). Результат анализа абсолютного числа и процентного соотношения TAMRA+ клеток может быть объяснен следующим образом. К 7 суткам клетки, находившиеся в исходной чувствительной фазе клеточного цикла G1/S [45] были элиминированы как обработкой ММС, так и синергичным действием двух препаратов (ММС+ДНК). В этот момент времени клетки, исходно находившиеся в G2/M нечувствительной фазе клеточного цикла, вышли в G1/S фазу. На 7 сутки была проведена финальная обработка, которая затронула все как оставшиеся, так и вновь «пришедшие» клетки TAMRA+ популяции. К 10 суткам наблюдается, как предполагается, естественное остаточное накопление TAMRA+ клеток, и затем начинается действие финальной отработки и происходит

разрушение TAMRA+ СИРК. К концу наблюдения становится очевидным, что предложенная стратегия значительно влияет на TAMRA+ клетки, снижая их количество как при обработке одним ММС, так и при синергичном действии ММС и препарата ДНК.

В первом эксперименте по трансплантации были перевиты 400 тыс. клеток, оставшихся после проведенных обработок в соответствии с разработанной стратегией (рис. 5). При экстраполяции результатов «клеточных экспериментов» в культуре, обработанной ММС, должно было остаться ~1 360 TAMRA+ клеток, а в культуре ММС+ДНК 400 таких клеток. Поскольку ни один из трансплантатов в обеих экспериментальных группах не прижился, можно предположить несколько вариантов объяснения эффекта: такого остаточного количества TAMRA+ СИРК недостаточно для формирования полноценного графта; эти клетки уже находились в процессе клеточной гибели и вскоре были полностью элиминированы; в результате таких обработок TAMRA+ СИРК необратимо теряли свои опухолевые свойства, например, критично снижается их способность к самоподдержанию и пролиферативный потенциал, нарушается способность к формированию опухолевого микроокружения и инвазивному росту; в результате таких обработок TAMRA+ СИРК теряют способность к ускользанию от иммунного надзора, связанную с изменением фенотипического ландшафта, например, в сторону повышенной экспрессии сигнальных молекул «eat me» в сочетании со снижением экспрессии «don't eat me» молекул.

Во втором эксперименте по трансплантации была снижена доза цитостатика ММС до терапевтической, равной 5 мкг/мл. Такое решение позволило достоверно проявить терапевтический эффект синергичного действия ММС+ДНК. Именно такое действие препаратов было открыто и охарактеризовано нами в работах [6-9, 45, 46].

Полученный результат продемонстрировал эффективность новой разрабатываемой технологии лечения рака на модельной культуре клеток глиобластомы человека U87, перевитой в качестве интрацеребрального трансплантата. В перспективе планируемые работы будут направлены на лечение новым стратегическим подходом перевитых трансплантатов глиобластомы. Будут использованы как интракратенальные, так и интрацеребральные трансплантаты. В качестве цитостатика предполагается использовать циклофосфан и темозоломид. Препарат ДНК в случае подкожного графтинга будет вводиться интрагуморально, в случае интрацеребрального графта внутривенно или парентерально в больших дозах. Предполагается, что частично

разрушенный гематоэнцефалический барьер, вследствие развития глиобластомы позволит интерферирующему репаративный цикл препарату ДНК достигнуть СИРК церебральной локализации. Также возможен вариант интраназального введения препаратов [42].

Заключение

В работе [22] было обнаружено свойство низкодифференцированных клеток различного генеза, в том числе СИРК, интернализировать естественным механизмом фрагменты двуцепочечной экстраклеточной ДНК. Используя меченый флуорохромом TAMRA ДНК зонд, СИРК были идентифицированы в образцах опухолей глиобластомы человека [23]. Было установлено, что интернализированные фрагменты экстраклеточной ДНК способны интерферировать идущий в СИРК процесс репарации МЦС, индуцированных кросслинкирующими цитостатиками. При этом введение кросслинкирующего цитостатика в метрономном режиме, привязанном к циклу репарации МЦС, приводит к синхронизации СИРК в чувствительной для обработок фазе клеточного цикла. На основании найденных свойств СИРК была разработана универсальная стратегия их эрадикации [6, 7, 20, 45].

В настоящем исследовании на примере линии клеток человеческой глиобластомы U87 удалось показать, что разработанная стратегия эрадикации СИРК с использованием терапевтических доз кросслинкирующего цитостатика митомидина С в комбинации со сложнопозиционным препаратом на основе ДНК позволяет полностью лишиться опухолевые клетки перевиваемого потенциала. В перспективе разработанная терапевтическая схема может стать основой для разработки принципиально нового подхода в лечении злокачественных опухолей головного мозга человека.

Благодарности

Авторы выражают благодарность ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН, ЦКП проточной цитометрии ИЦиГ СО РАН, ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН и сектору клеточных технологий ИЦиГ СО РАН, а также Рогачеву Владимиру Алексеевичу за наработку препарата кросслинкерованной ДНК спермы лосося, входящей в состав сложнопозиционного препарата ДНК.

Работа выполнена в рамках государственного задания по бюджетному проекту № 0324-2019-0042 и поддержана грантом РФФИ № 15-04-03386.

Конфликт интересов
 Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брюховецкий А.С., Шевченко В.Е., Чехонин В.П. и др. Сравнительное протеомное картирование опухолевых стволовых клеток, выделенных из глиобластомы линии u87, нейрональных стволовых и мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека: от каталогизации клеточных белков к инновационной парадигме протеом-основанной клеточной терапии опухолей // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2013. — Т. 8. — № 2. — С. 84-91.
2. Брюховецкий И.С. Клеточные и постгенные технологии в терапии мультиформной глиобластомы // Тихоокеанский медицинский журнал. — 2015. — Т. 2. — С. 12-17.
3. Брюховецкий И.С., Дюйзен И.В., Шевченко В.Е., Хотимченко Ю.С. Стволовые клетки глиобластомы индуцируют миграцию нормальных стволовых клеток // Тихоокеанский медицинский журнал. — 2016. — Т. 2. — С. 81-89.
4. Лихачева А.С., Рогачев В.А., Николин В.П., и др. Участие экзогенной ДНК в молекулярных процессах, протекающих в соматической клетке // Информационный вестник ВОГиС. — 2008. — Т. 12. — № 3. — С. 426-473.
5. Никифорова З.Н., Кудрявцев И.А., Арноцкая Н.Е., и др. Опухолевые стволовые клетки мультиформной глиобластомы // Успехи молекулярной онкологии. — 2016. — Т. 3. — С. 26-33.
6. Поттер Е.А., Долгова Е.В., Минкевич А.М., и др. Терапевтические эффекты воздействия циклофосфана, препаратов двуцепочечной ДНК и их сочетания на раковые клетки асциты Кребс-2 и различные формы трансплантатов // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2016. — Т. 20. — № 1. — С. 96-107.
7. Поттер Е.А., Долгова Е.В., Минкевич А.М., и др. 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. — Т. 20. — № 1. — С. 108-124.
8. Поттер Е.А., Долгова Е.В., Минкевич А.М., и др. Режим однократной инъекции препарата двуцепочечной ДНК после каждой инъекции циклофосфана, приводящий к эрадикации первичного асцита Кребс-2 // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2016. — Т. 20. — № 5. — С. 716-722.
9. Поттер Е.А., Долгова Е.В., Проскурина А.С., и др. Разработка регламента терапевтического режима, основанного на синергичном действии циклофосфана и препаратов двуцепочечной ДНК, приводящего к полному вылечиванию экспериментальных животных от асцитной формы опухоли мыши Кребс-2 // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2016. — Т. 20. — № 5. — С. 723-735.
10. Alyamkina E.A., Nikolin V.P., Popova N.A., et al. Combination of cyclophosphamide and double-stranded DNA demonstrates synergistic toxicity against established xenografts // Cancer Cell Int. — 2015. — Vol. 15. — P. 32.
11. Bao S., Wu Q., McLendon R.E., et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response // Nature. — 2006. — Vol. 444. — № 7120. — P. 756-760.
12. Bae K.-M., Dai Y., Vieweg J., Siemann D.W. Hypoxia regulates SOX2 expression to promote prostate cancer cell invasion and sphere formation // Am. J. Cancer Res. — 2016. — Vol. 6. — № 5. — P. 1078-1088.
13. Beier D., Hau P., Proescholdt M., et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles // Cancer Res. — 2007. — Vol. 67. — № 9. — P. 4010-4015.
14. Bonnet D., Dick J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell // Nat Med. — 1997. — Vol. 3. — P. 730-737.
15. Brescia P., Richichi C., Pelicci G. Current strategies for identification of glioma stem cells: adequate or unsatisfactory? // J Oncol. — 2012. — Vol. 2012. — P. 376894.
16. Brescia P., Ortensi B., Fornasari L., et al. CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance // Stem Cells. — 2013. — Vol. 31. — № 5. — P. 857-869.
17. Chang J.C. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance // Medicine (Baltimore). — 2016. — Vol. 95. — № 1 Suppl 1. — P. S20-S25.
18. Chen J., Kesari S., Rooney C., et al. Inhibition of notch signaling blocks growth of glioblastoma cell lines and tumor neurospheres // Genes Cancer. — 2010. — Vol. 1. — № 8. — P. 822-835.
19. Dayem A.A., Choi H.-Y., Kim J.-H., Cho SG. Role of oxidative stress in stem, cancer, and cancer stem cells // Cancers (Basel). — 2010. — Vol. 2. — № 2. — P. 859-884.
20. Dolgova E.V., Proskurina A.S., Nikolin V.P., et al. "Delayed death" phenomenon: A synergistic action of cyclophosphamide and exogenous DNA // Gene. — 2012. — Vol. 495. — P. 134-145.
21. Dolgova E.V., Efremov Y.R., Orishchenko K.E., et al. 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. — Vol. 528. — № 2. — P. 74-83.
22. Dolgova E.V., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., et al. Identification of cancer stem cells and a strategy for their elimination // Cancer Biol Ther. — 2014. — Vol. 15. — № 10. — P. 1378-1394.
23. Dolgova E.V., Mishinov S.V., Proskurina A.S., et al. Novel cancer stem marker and its applicability for grading primary human gliomas // Technol Cancer Res Treat. — 2018. — Vol. 17. — P. 1533034617753812.
24. Esteller M., Garcia-Foncillas J., Andion E., et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents // N Engl J Med. — 2000. — Vol. 343. — № 19. — P. 1350-1354.
25. Fan X., Khaki L., Zhu T.S., et al. NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts // Stem Cells. — 2010. — Vol. 28. — № 1. — P. 5-16.
26. Friedman H.S., Kerby T., Calvert H. Temozolomide and treatment of malignant glioma // Clin Cancer Res. — 2000. — Vol. 6. — № 7. — P. 2585-2597.
27. García-Casas A., García-Olmo D.C., García-Olmo D. Further the liquid biopsy: Gathering pieces of the puzzle

- of genomestasis theory // *World J. Clin. Oncol.* — 2017. — Vol. 8. — № 5. — P. 378-388.
28. Gilbert C.A., Ross A.H. Glioma stem cells: cell culture, markers and targets for new combination therapies // *Cancer Stem Cells Theories and Practice.* — 2011. — Vol. 108. — № 5. — P. 1031-1038.
 29. Gopal K., Gupta N., Zhang H., et al. Oxidative stress induces the acquisition of cancer stem-like phenotype in breast cancer detectable by using a Sox2 regulatory region-2 (SRR2) reporter // *Oncotarget.* — 2016. — Vol. 7. — № 3. — P. 3111-3127.
 30. Gottesman M.M. Mechanisms of cancer drug resistance // *Annu. Rev. Med.* — 2002. — Vol. 53. — № 1. — P. 615-627.
 31. Hanada K., Budzowska M., Modesti M. et al. The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strand breaks // *EMBO J.* — 2006. — Vol. 25. — № 20. — P. 4921-4932.
 32. Iida H., Suzuki M., Goitsuka R., Ueno H. Hypoxia induces CD133 expression in human lung cancer cells by up-regulation of OCT3/4 and SOX2 // *Int. J. Oncol.* — 2012. — Vol. 40. — № 1. — P. 71-79.
 33. Jiang W.G., Sanders A.J., Katoh M., et al. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives // *Semin. Cancer Biol.* — 2015. — Vol. 35. — P. S244-S275.
 34. Jinesh G.G., Kamat A.M. Blebbistatin emergency program: an apoptotic route to cellular transformation // *Cell Death Differ.* — 2016. — Vol. 23. — № 5. — P. 757-758.
 35. Karle P., Renner M., Salmons B., Günzburg W.H. Necrotic, rather than apoptotic, cell death caused by cytochrome P450-activated ifosfamide // *Cancer Gene Ther.* — 2001. — Vol. 8. — № 3. — P. 220-230.
 36. Kase M., Minajeva A., Niinepuu K., et al. Impact of CD133 positive stem cell proportion on survival in patients with glioblastoma multiforme // *Radiol Oncol.* — 2013. — Vol. 47. — № 4. — P. 405-410.
 37. Kim E.H., Song H.S., Yoo S.H., Yoon M. Tumor treating fields inhibit glioblastoma cell migration, invasion and angiogenesis // *Oncotarget.* — 2016. — Vol. 7. — № 40. — P. 65125-65136.
 38. Konar S.K., Bir S.C., Maiti T.K., Nanda A. A systematic review of overall survival in pediatric primary glioblastoma multiforme of the spinal cord // *J Neurosurg Pediatr.* — 2016. — Vol. 19. — № 2. — P. 239-248.
 39. Lagasse E. Cancer stem cells with genetic instability: the best vehicle with the best engine for cancer // *Gene Ther.* — 2008. — Vol. 15. — № 2. — P. 136-142.
 40. Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice // *Nature.* — 1994. — Vol. 367. — P. 645-648.
 41. Liu Y., Liu X., Chen L., et al. Targeting glioma stem cells via the Hedgehog signaling pathway // *Neuroimmunol Neuroinflammation.* — 2014. — Vol. 1. — № 2. — P. 51-59.
 42. Lochhead JJ, Thorne RG. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system // *Adv Drug Deliv Rev.* — 2012. — Vol. 64. — № 7. — P. 614-628.
 43. McNeill K.A. Epidemiology of brain tumors // *Neurol Clin.* — 2016. — Vol. 34. — № 4. — P. 981-998.
 44. Pietras A., Katz A.M., Ekström E.J., et al. Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth // *Cell Stem Cell.* — 2014. — Vol. 14. — № 3. — P. 357-369.
 45. Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., et al. A strategy to eradicate well-developed Krebs-2 ascites in mice // *Oncotarget.* — 2016. — Vol. 7. — № 10. — P. 11580-11594.
 46. Potter EA, Dolgova EV, Proskurina AS, et al. Gene expression profiling of tumor-initiating stem cells from mouse Krebs-2 carcinoma using a novel marker of poorly differentiated cells // *Oncotarget.* — 2017. — Vol. 8. — № 6. — P. 9425-9441.
 47. Qiang L., Yang Y., Ma Y., et al. Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines // *Cancer Letters.* — 2009. — Vol. 279. — P. 13-21.
 48. Ramirez Y.P., Weatherbee J.L., Wheelhouse R.T., Ross A.H. Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance // *Pharmaceuticals (Basel).* — 2013. — Vol. 6. — № 12. — P. 1475-1506.
 49. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells // *Nature.* — 2001. — Vol. 414. — № 6859. — P. 105-111.
 50. Saijo H., Hirohashi Y., Torigoe T., et al. Plasticity of lung cancer stem-like cells is regulated by the transcription factor HOXA5 that is induced by oxidative stress // *Oncotarget.* — 2016. — Vol. 7. — № 31. — P. 50043-50056.
 51. Schreck K.C., Taylor P., Marchionni L., et al. The Notch target Hes1 directly modulates Gli1 expression and Hedgehog signaling: a potential mechanism of therapeutic resistance // *Clin Cancer Res.* — 2010. — Vol. 16. — № 24. — P. 6060-6070.
 52. Shindo H., Ogura T., Masuno T., et al. Induction of activated macrophages by intraperitoneal injection of mitomycin C in mice // *Cancer Immunol Immunother.* — 1985. — Vol. 20. — № 2. — P. 145-150.
 53. Siney E.J., Holden A., Casselden E., et al. Metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 mediate migration and differentiation in glioblastoma sphere-forming cells // *Mol Neurobiol.* — 2016. — Vol. 54. — № 5. — P. 3893-3905.
 54. Smith M.A., Freidlin B., Gloeckler Ries L.A., Simon R. Trends in reported incidence of primary malignant brain tumors in children in the United States // *Journal of the National Cancer Institute.* — 1998. — Vol. 90. — № 17. — P. 1269-1277.
 55. Song X., Dilly A.K., Kim S.Y., et al. Rapamycin-enhanced mitomycin C-induced apoptotic death is mediated through the S6K1-Bad-Bak pathway in peritoneal carcinomatosis // *Cell Death Dis.* — 2014. — Vol. 5. — P. e1281.
 56. Stamatakis G.S., Antipas V.P., Uzunoglu N.K. Simulating chemotherapeutic schemes in the individualized treatment context: the paradigm of glioblastoma multiforme treated by temozolomide in vivo // *Comput Biol Med.* — 2006. — Vol. 36. — № 11. — P. 1216-1234.
 57. Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma // *N Engl J Med.* — 2005. — Vol. 352. — № 10. — P. 987-996.
 58. Takezaki T., Hide T., Takanaga H., et al. Essential role of the Hedgehog signaling pathway in human glioma-initiating cells // *Cancer Sci.* — 2011. — Vol. 102. — № 7. — P. 1306-1312.
 59. Wang Y., Xu C., Du L.Q., et al. Evaluation of the Comet Assay for Assessing the Dose-Response Relationship of DNA Damage Induced by Ionizing Radiation // *Int J Mol Sci.* — 2013. — Vol. 14. — № 11. — P. 22449-22461.

60. Wei K.C., Huang C.Y., Chen P.Y., et al. Evaluation of the prognostic value of CD44 in glioblastoma multiforme // *Anticancer Res.* — 2010. — Vol. 30. — № 1. — P. 253-259.
61. Zhang N., Liu X., Li L., Legerski R. Double-strand breaks induce homologous recombinational repair of interstrand cross-links via cooperation of MSH2, ERCC1-XPF, REV3, and the Fanconi anemia pathway // *DNA Repair.* — 2007. — Vol. 6. — № 11. — P. 1670-1678.

Поступила в редакцию 25.06.2018 г.

*E.V. Dolgova¹, E.A. Potter¹, A.S. Proskurina¹,
V.P. Nikolin¹, N.A. Popova^{1,2}, M.V. Romanenko²,
S.V. Netyosov², O.S. Taranov³, Y.R. Efremov¹,
L.E. Zavyalov¹, A.A. Ostanin⁴, E.R. Chernykh⁴,
S.S. Bogachev¹*

Evaluating the effectiveness of the tumor-initiating stem cells eradication strategy on the example of human glioblastoma cell line U87

¹Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk,
²Novosibirsk State University, Novosibirsk,
³The State Research Center of Virology and
Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region,
⁴Research Institute of Fundamental and Clinical
Immunology, Novosibirsk

The effectiveness of the new therapeutic approach aimed at the destruction of the cancer cell community was evaluated on the immortalized human glioblastoma cell line U87. Initially, the reference elements of a new strategy for eradication of tumor-initiating stem cells were characterized. The main points of the strategy were as follows. 1) Evaluation of the TAMRA+ (tumor-initiating stem cells) presence in the population of U87 culture cells. 2) Determination of the reference time points of the DNA interstrand cross-links repair, induced by cross-linking cytostatics mitomycin C. 3) Determination of the day after initiation of therapy when TAMRA+ cells accumulate and are synchronously present in the G1/S sensitive for the treatment phase of the cell cycle. Based on the data obtained, a therapeutic regimen aimed at eradicating TAMRA+ cells (tumor-initiating stem cells) was identified. Treatment of the culture was carried out by cross-linking cytostatic mitomycin C and complex DNA preparation. Transplantation experiments showed that high experimental doses of mitomycin C (20 µg/ml) totally destroy transplantation potential of U87 cells. Diminution of mitomycin C to therapeutic doses (5 µg/ml) clearly demonstrated effect of complex double-stranded DNA preparation to reducing of U87 tumorigenic potential. These fully confirmed the concept of developed cancer treatment technology.

Key words: glioblastoma, U87 cell line, mytomycin C, tumor-initiating stem cells, TAMRA