

Б. Экспериментальные исследования

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616-006

Вопросы онкологии, 2018. Том 64, № 6

Е.А. Поттер^{1,}, Г.С. Риттер^{1,2,*}, Е.В. Долгова¹, А.С. Проскурина¹, П.Э. Кисаретова², Я.Р. Ефремов^{1,2}, В.П. Николин¹, Н.А. Попова^{1,2}, О.С. Таранов³, А.А. Останин⁴, Е.Р. Черных⁴, С.В. Сидоров^{2,5}, Н.А. Колчанов¹, С.С. Богачев¹*

Оценка эффективности эрадикации стволовых инициирующих раковых клеток на примере асцитной формы гепатокарциномы мыши Г-29

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,

⁵Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Новосибирской области «Городская клиническая больница №1», Новосибирск

На опухоли Кребс-2 для солидной и асцитной форм был найден режим синхронизации, эрадикации и вылечивания рака («3+1»). С использованием аналогичной стратегии лечения были проведены исследования на мышинной модели Г-29 (гепатокарцинома), растущей как в асцитной, так и в солидной формах. В результате проведенной работы удалось полностью избавиться от первичного асцита экспериментальных мышей. Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что стратегия введения препаратов в режиме «3+1» с финальным терапевтическим воздействием цитостатика циклофосфана и сложнокомпозиционного препарата двуцепочечной ДНК на шестые и одиннадцатые сутки обладает наибольшим терапевтическим воздействием. Средняя продолжительность жизни в экспериментальных группах составила около 36 дней, в контрольной группе – 27 дней. Установлено, что регламентированные стратегией инъекции одного циклофосфана обладают ярко выраженным терапевтическим действием на растущий асцит. Экспериментально показано, что в случае асцитной формы опухоли Г-29 при синергичном действии цитостатика и препарата двуцепочечной ДНК вторичный асцит возникает после появления перитонеального канцероматозного солидного образования и, по-видимому, является его производным.

Ключевые слова: гепатокарцинома Г-29, циклофосфан, двуцепочечная ДНК, вторичный асцит

Введение

В наших работах последних лет открыты и охарактеризованы два новых общебиологических явления: 1) способность низкодифференцированных клеток различного генеза интернализировать фрагменты экстраклеточной двуцепочечной ДНК естественным механизмом интернализации и 2) способность фрагментов двуцепочечной ДНК, доставленных во внутренние компартменты стволовых инициирующих раковых клеток (СИРК), интерферировать процесс репарации межцепочечных сшивок, индуцированных действием кросслинквирующего цитостатика. В результате такой интерференции СИРК или погибают, или необратимо утрачивают свои туморогенные свойства [1-20].

В работе [18] был определен режим метронормальных терапевтических воздействий, позволяющий эффективно элиминировать не только дифференцированные опухолевые клетки, но и СИРК, и тем самым лишить опухоль туморогенного начала. В результате циторедуктивного действия цитостатика, а также гибели СИРК, опухоль необратимо теряет способность к самоподдержанию и элиминируется защитными системами организма. Совокупность процедурных этапов, определяющих этот режим, составляет новую стратегию терапии злокачественных новообразований. В основе предложенной стратегии лежат два принципиальных момента. Во-первых, это определенная последовательность обработки опухоли кросслинквирующим цитостатиком, которая позволяет индуцировать гибель дифференцированных раковых клеток через механизм апоптоза, а также синхронизировать СИРК в фазе клеточного цикла, наиболее

* авторы внесли равноценный вклад в работу

чувствительной для последующего (финального) терапевтического воздействия. Во-вторых, введение сложнокомпозиционного препарата на основе двуцепочечной ДНК в точку демаркации двух фаз процесса репарации межцепочечных шивков, а именно NER (nucleotide excision repair) и гомологичной рекомбинации.

Экспериментально было установлено, что компоненты, входящие в состав разработанного препарата двуцепочечной ДНК, позволяют одновременно элиминировать из асцитного графта СИРК, находящихся на конечных стадиях фазы репарации NER, а также клетки, вступившие в фазу гомологичной рекомбинации (в режиме метрономной терапии 1-12 и 18-30 часов после первой инъекции цитостатика, соответственно). При этом был определен режим однократного введения такого препарата.

В результате в значительной части стволовых иницирующих раковых клеток нарушаются репаративные процессы, что приводит к их гибели и/или необратимой потере туморогенных свойств. Тем не менее, оценка клеточного цикла и количества СИРК в течение нескольких (до 12) суток после начала терапии свидетельствовали, что не все СИРК (идентифицированные по способности захватывать TAMRA меченый ДНК зонд) элиминируются на первом этапе терапии. Было обнаружено, что «выжившая» популяция СИРК оказалась синхронизированной в G1/S фазе клеточного цикла. Поскольку клетки, находящиеся в этой фазе, наиболее чувствительны к терапии, было предложено использовать финальную обработку цитостатиком и препаратом двуцепочечной ДНК по аналогичной временной схеме. Временной интервал финального терапевтического «удара» определялся индивидуально для опухолей различного типа и варьировал в пределах 8-12 суток от первой инъекции цитостатика (для Кребс-2). Таким образом, была определена базовая схема новой стратегии эрадикации СИРК, обозначенная нами как «3+1». Результатом такой терапии оказалось полное излечение как асцитной, так и солидной формы экспериментального рака мышей Кребс-2 [18, 20]. С учетом данных, полученных нами на асцитной форме Кребс-2, было сделано предположение, что предложенная стратегия эрадикации СИРК в режиме «3+1» может быть использована и при других формах асцитного рака.

В настоящем исследовании разработанная стратегия была валидирована на модели асцитной формы мышинной гепатокарциномы Г-29.

Материалы и методы

В экспериментах использовали мышей линии СВА/Лас. Животных содержали в пластиковых клетках не более 10 особей в каждой, со свободным доступом к пище и воде.

Все работы были проведены в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных.

В качестве опухолевой модели в настоящем исследовании была использована гепатокарцинома мыши Г-29, взятая из коллекции ИЦиГ СО РАН. Для получения трансплантата клетки опухоли выделяли от мышей с 10-дневным асцитом, разводили физиологическим раствором и перевивали экспериментальным животным в количестве 2 млн/мышь (для формирования асцитной формы опухоли) или 1 млн/мышь (для формирования солидного трансплантата).

Подробная информация об инъекциях цитостатика циклофосфана (ЦФ) и препарата ДНК представлена в разделе «Материалы и методы» в статье [6]; о ремиссии опухоли и патологоморфологическом анализе опухолевого образца – в статье [7]; об анализе клеточного цикла и фракционировании клеток асцита на фиколл-урографинном градиенте – в статье [9]; об анализе интернализации TAMRA-меченой ДНК и анализе количества двуцепочечных разрывов методом «кометных хвостов» – в статье [14].

В работах использовались услуги ЦКП проточной цитометрии и ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

Результаты

Интернализация TAMRA-меченого ДНК-зонда в клетки гепатокарциномы мыши Г-29, выделенные из перитонеальной жидкости асцитной формы рака

Для того чтобы оценить возможность применения стратегии «3+1» на модели гепатокарциномы мыши Г-29, необходимо было убедиться, что в популяции раковых клеток присутствует субпопуляция, способная интернализировать TAMRA-меченый ДНК-зонд. Именно эти клетки, как предполагалось по аналогии с результатами экспериментов, выполненных на асците Кребс-2 [6-9, 18], являются отвечающими клетками при обработке ЦФ и препаратом ДНК.

На рис. 1 приведен анализ количества TAMRA+ клеток в интактном асците Г-29 методом проточной цитометрии (рис. 1B) и при подсчете на цитологических препаратах (рис. 1A). Установлено, что в популяции асцитных клеток гепатокарциномы мыши Г-29 содержание TAMRA+ клеток составило 1,1% согласно цитологической оценке и 1,2% согласно оценке методом проточной цитометрии.

Анализ репаративного цикла клеток гепатокарциномы Г-29 методом «кометных хвостов» после однократного введения ЦФ

Анализ репаративного цикла асцитной формы гепатокарциномы Г-29 был проведен на 10-ти суточном асците, когда объем развитого асцита позволял отбирать биопсийный материал. Степень повреждения ДНК клеток асцита оценивалась методом «кометных хвостов».

В процессе репарации межцепочечных шивков выделяют две фазы, NER и гомологичная рекомбинация. Первая характеризуется появле-

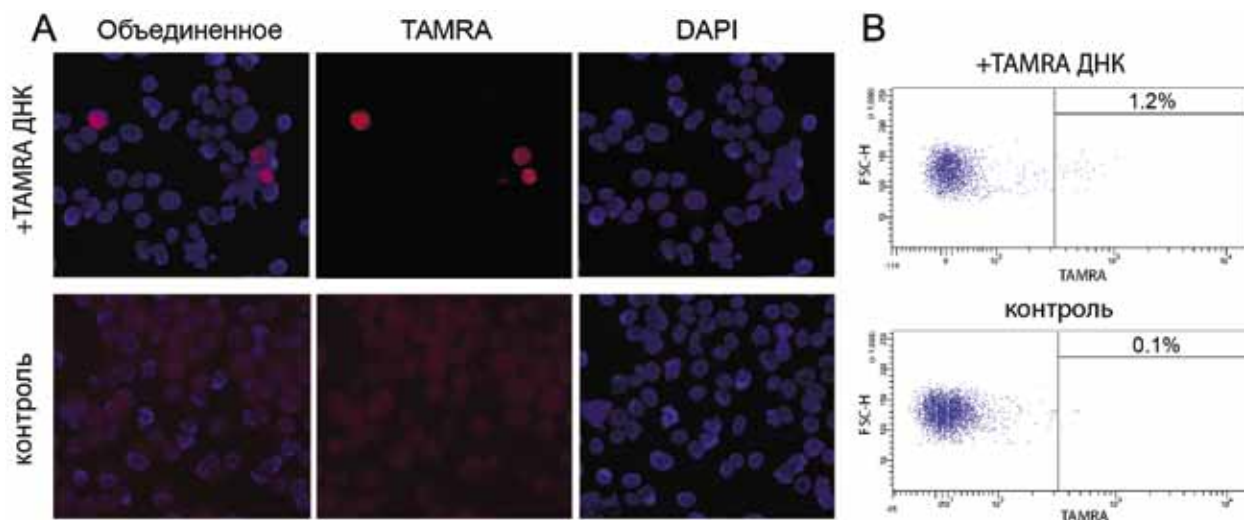


Рис. 1. Интернализация TAMRA-меченого ДНК-зонда в клетки гепатокарциномы Г-29 мыши, растущей в асцитной форме, по сравнению с контролем. А. Анализ количества клеток, захватывающих TAMRA-меченую ДНК, методом флуоресцентной микроскопии. В. Анализ количества клеток, захватывающих TAMRA-меченую ДНК, методом проточной цитометрии

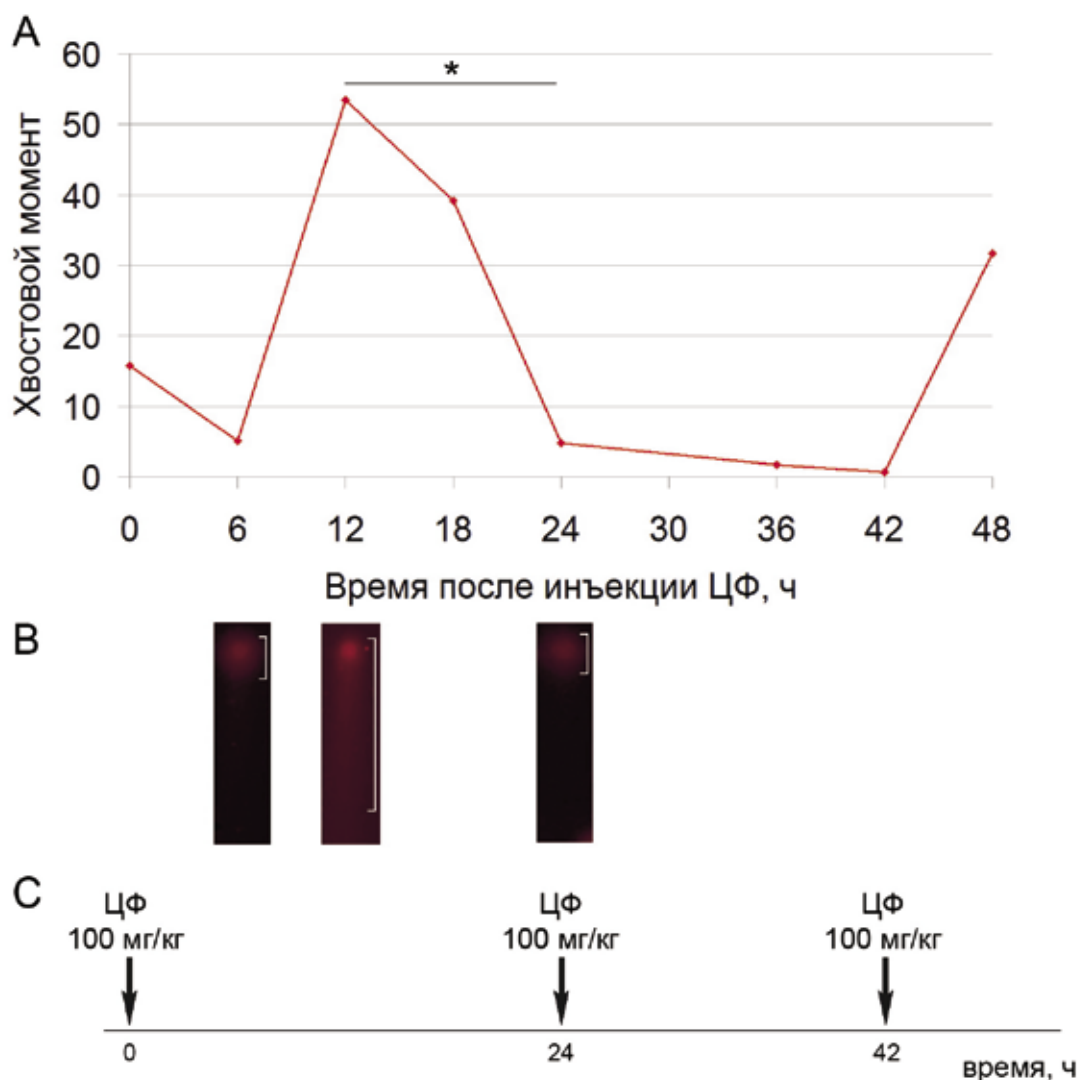


Рис. 2. Анализ репаративного цикла гепатокарциномы Г-29 (появление и исчезновение ДЦР) методом «кометных хвостов». А. Обобщенная схема появления и «залечивания» ДЦР. В. Демонстрационные микрофотографии, характеризующие длину «кометных хвостов», на основании которых определялись фазы репаративного цикла. Набор ДЦР соответствует фазе NER, снижение количества ДЦР соответствует фазе гомологичной рекомбинации. С. Базовая схема терапевтического введения цитостатика ЦФ в режиме «3», предполагающая накладывающиеся друг на друга три последовательных ареста клеточного цикла, позволяющие синхронизовать в G1/S TAMRA+ СИРК

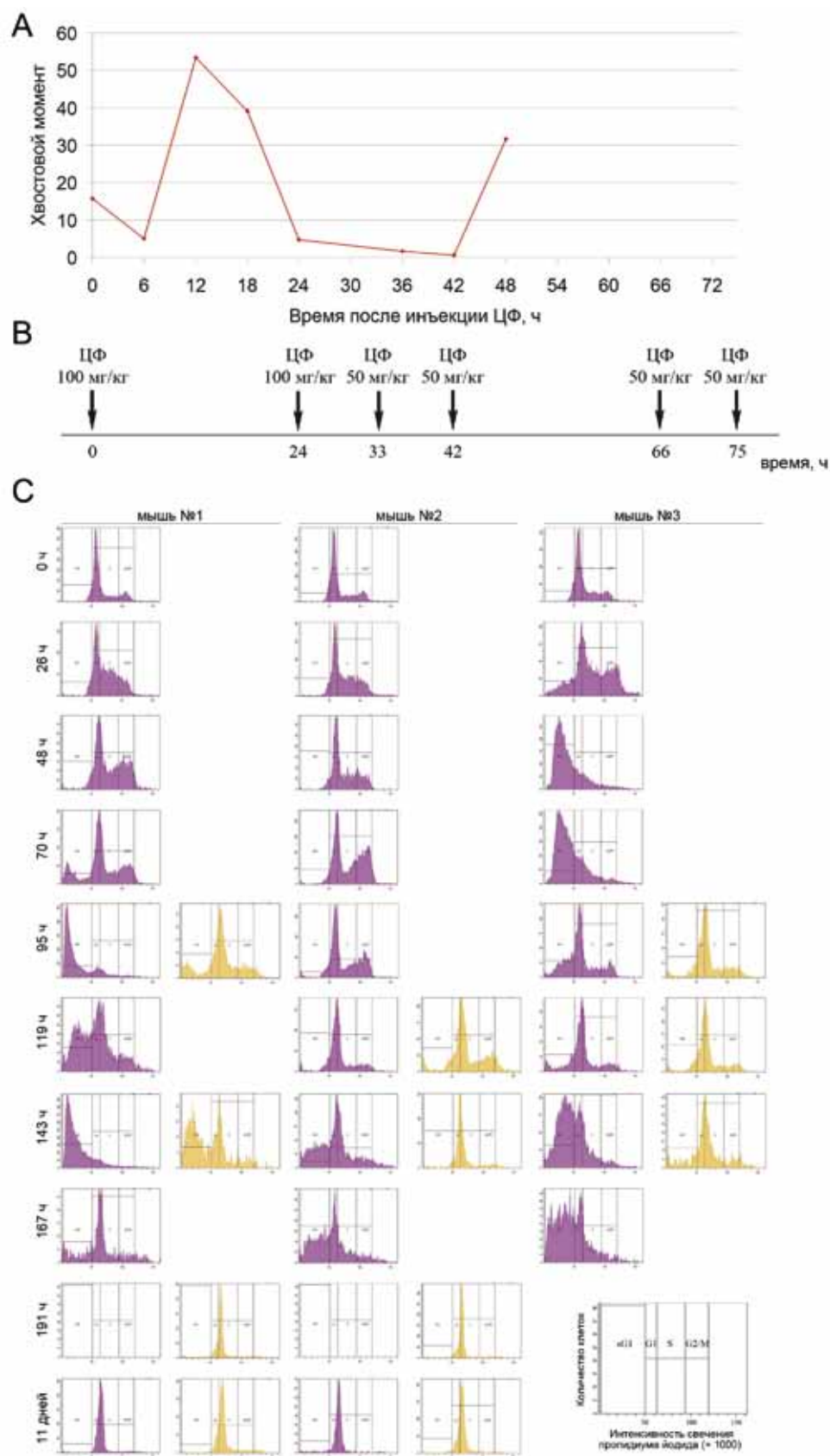


Рис. 3. Пилотная схема терапевтического режима инъекций ЦФ мышам с развитым асцитом Г-29. А. Схема репаративного цикла клеток асцита Г-29. В. Схема инъекций цитостатика. С. Плоты, демонстрирующие распределение общей популяции клеток асцита гепатокарциномы Г-29 по клеточному циклу после проведения терапевтических инъекций цитостатика ЦФ по схеме, приведенной в пункте В (фиолетовые диаграммы). Те же биопатные образцы после фиколюрографического градиента (оранжевые диаграммы). Представлены результаты анализа, проведенного на протяжении 11 суток от начала эксперимента. Справа внизу приведен увеличенный шаблон определения «ворот» распределения клеток по клеточному циклу. Шкала по оси ординат между диаграммами различается. Плоты приведены в одном масштабе, что необходимо для удобства их сравнения

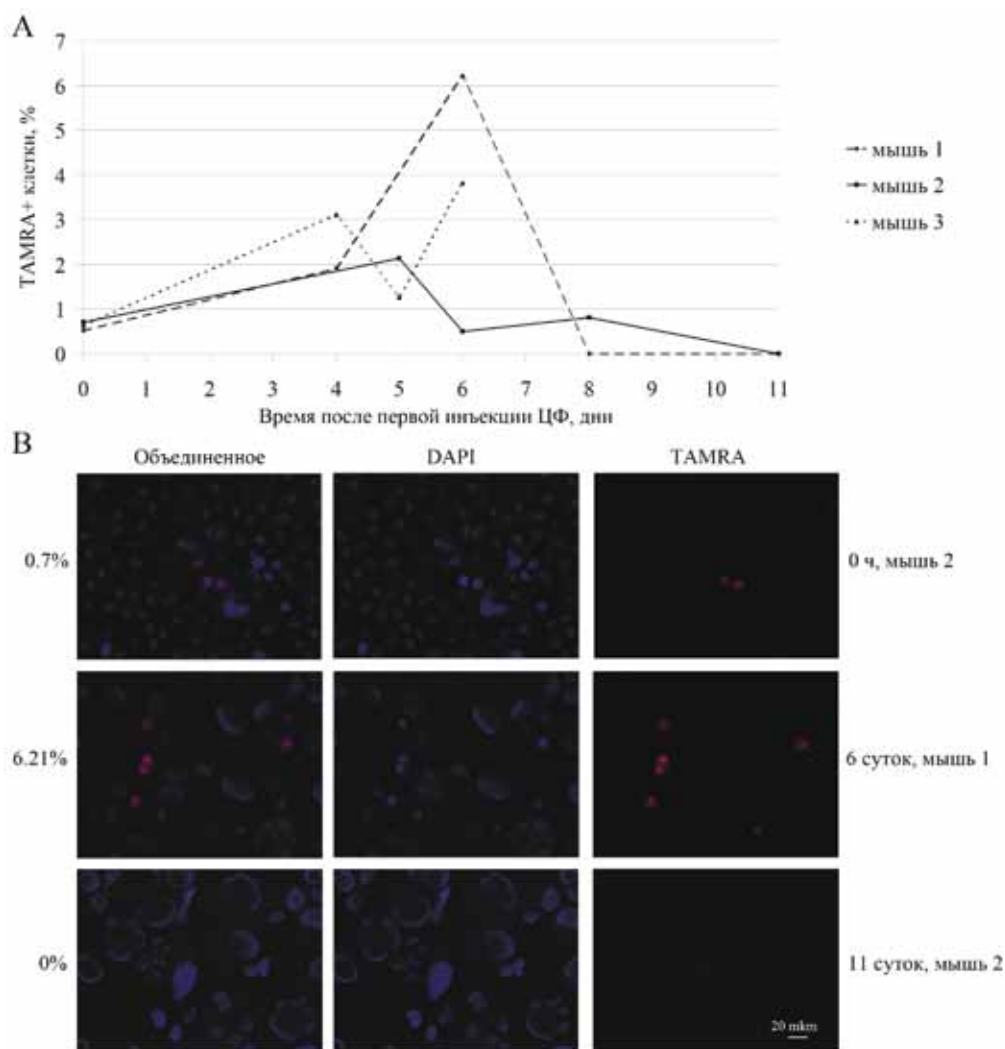


Рис. 4. Ежедневный анализ количества TAMRA+ стволовых клеток в асците Г-29 после обработки асцита по схеме, приведенной на рис. 3В. А. Процент TAMRA+клеток, оцененный индивидуально для трех животных. В. Демонстрация количества и размеров клеток асцита Г-29 после проведенных обработок. Масштаб для всех снимков один

нием и накоплением до максимального числа двуцепочечных разрывов (ДЦР), в ходе второй фазы эти разрывы репарируются. И, таким образом, появление и исчезновение ДЦР определяют начало и конец репарации межцепочечных сшивков, то есть продолжительность репаративного цикла. Анализ результатов свидетельствует, что продолжительность репаративного цикла клеток гепатокарциномы Г-29 составляет 24 часа (рис. 2А, В).

Анализ времени синхронизации клеток асцитной формы гепатокарциномы Г-29 после обработки цитостатиком ЦФ в терапевтическом режиме

Следующим необходимым элементом при разработке новой терапевтической стратегии являлся этап определения времени синхронизации опухолевых клеток, включая СИРК (TAMRA+

клетки), в определенной стадии клеточного цикла. В разных экспериментах на различных типах раков было показано, что синхронизация может детектироваться как в G2/M так и в G1/S фазах клеточного цикла, в зависимости от времени взятия образца опухоли [6-9, 13, 16, 18].

Для гепатокарциномы Г-29 параллельно с анализом клеточного цикла в одних и тех же биопсийных образцах было определено содержание TAMRA+ клеток. Синхронизация этого типа клеток предполагает их значимый количественный прирост в определенный день от начала терапии, который будет коррелировать с днем синхронизации в определенной фазе клеточного цикла общей популяции асцитных клеток. Дополнительно к базовой схеме были выбраны более сложные терапевтические режимы (рис. 3А, В), что было связано с неоднозначной трактовкой результатов оценки времени репаративного цикла.

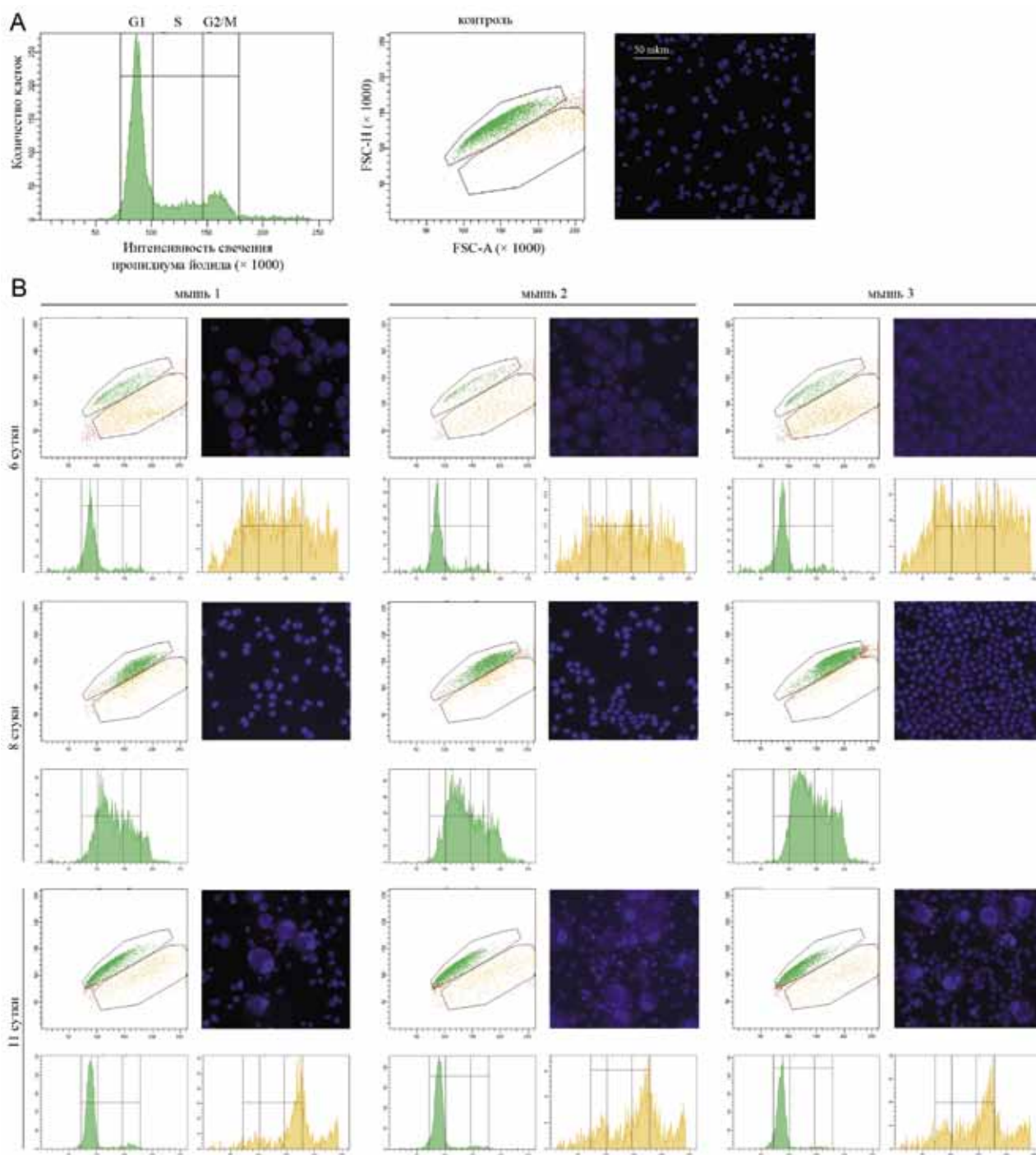


Рис. 5. Анализ состояния клеток асцита Г-29 после обработки ЦФ по схеме, указанной на рисунке 3, для трёх индивидуальных мышей на 6, 8 и 11 сутки после первой инъекции ЦФ. А. Распределение по клеточному циклу в исходной популяции асцитных клеток (слева). Плоты (зеленое и оранжевое облака) показывают распределение клеток по размеру и гранулированности (в центре). Диаграммы (зеленая и оранжевая) показывают распределение клеток асцита по клеточному циклу. Визуальное состояние клеток (справа). В. Аналогичный анализ клеток асцита Г-29 после обработки ЦФ по разработанной схеме на 6, 8 и 11 сутки. Микроскопические имиджи приведены в одном масштабе и демонстрируют внешний вид клеток. Окраска DAPI

Асцитные клетки от трех мышей в течение 11 суток отбирали каждые 24 часа и фиксировали 50% метанолом для анализа клеточного цикла на проточном цитометре. Начиная с пятых суток от начала эксперимента, дополнительно клетки асцита фракционировали на фиколл-урографинном градиенте и также анализировали методом проточной цитометрии (рис. 3С). Па-

раллельно с оценкой клеточного цикла на пятые сутки клетки инкубировали с TAMRA-меченым ДНК-зондом, и количество TAMRA-позитивных клеток определяли микроскопически (рис. 4). Показано, что со 2 по 11 сутки клеточный цикл популяции асцитных клеток гепатокарциномы Г-29 претерпевает существенные изменения. Наблюдается отчетливый сдвиг в G2 и после-

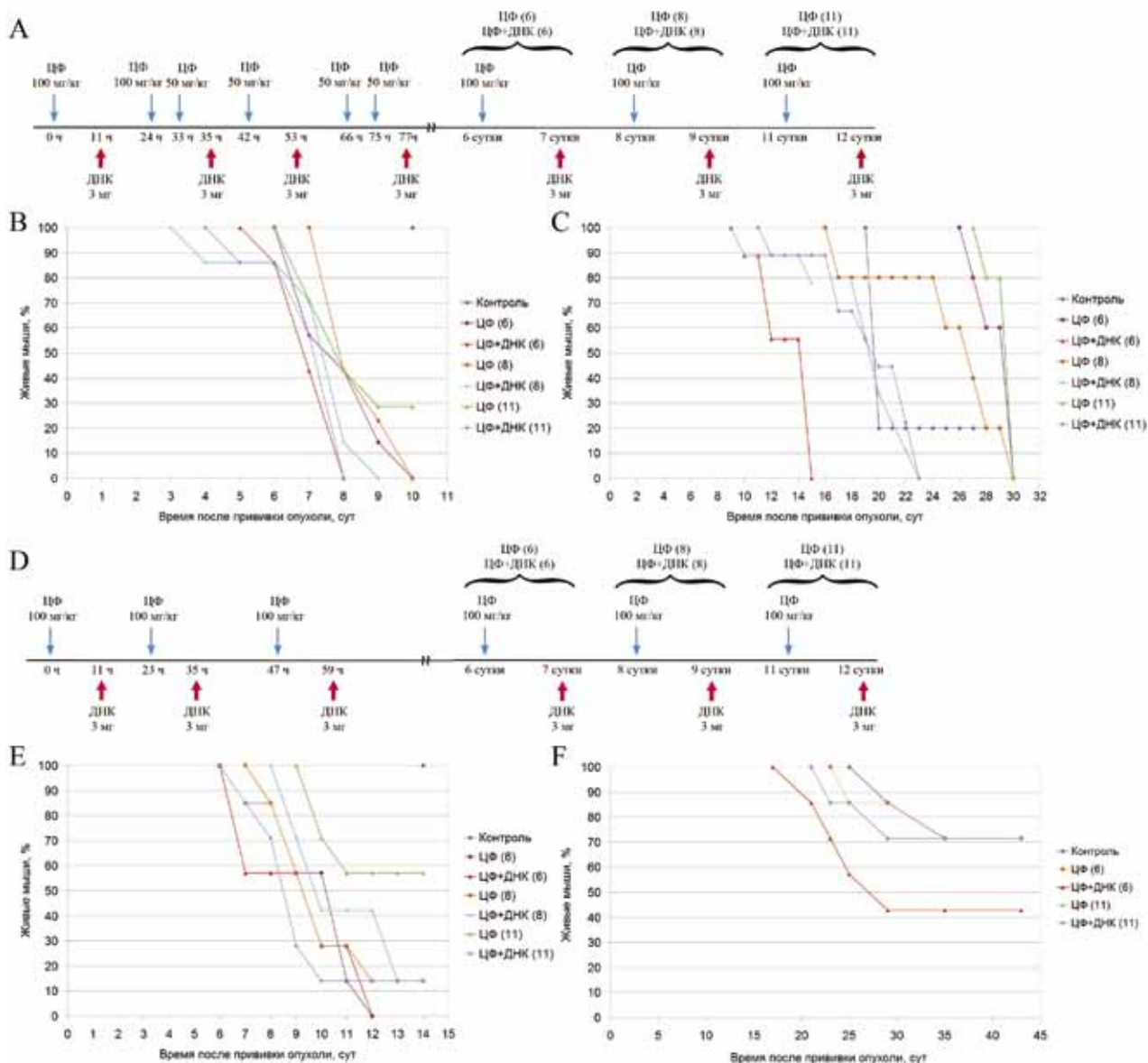


Рис. 6. Анализ синергичного действия цитостатика ЦФ и препарата двуцепочечной ДНК на асцитную форму опухоли Г-29 в режиме «6+1» и «3+1». А. Схема введения цитостатика ЦФ и препарата ДНК в режиме «6+1». В. Динамика гибели при обработке экспериментальных животных с привитым асцитным трансплантатом Г-29, 4 млн клеток в/б, в режиме «6+1». С. Динамика гибели при обработке экспериментальных животных с привитым асцитным трансплантатом Г-29, 2 млн клеток в/б, в режиме «6+1». Д. Схема введения цитостатика ЦФ и препарата ДНК в режиме «3+1». Е. Динамика гибели при обработке экспериментальных животных с привитым асцитным трансплантатом Г-29, 13 млн клеток в/б, в режиме «3+1». Ф. Динамика гибели при обработке экспериментальных животных с привитыми солидным трансплантатом Г-29, 2 млн клеток, в/м, в режиме «3+1»

дующая стабилизация клеток в G1/S, которая на 8 и 11 сутки становится доминирующей. Также отмечается катастрофическое снижение общей клеточной массы. Для получения статистически значимой информации эксперимент был повторен несколько раз. Однако, вследствие наблюдаемого сильнейшего токсического эффекта режима, приводящего к гибели экспериментальных мышей в группах к последним дням наблюдения, не удалось получить данные в объеме, необходимом для корректной статистической обработки для всех временных интервалов.

На рис. 4 представлены результаты анализа количества TAMRA-положительных клеток в био-

птатах асцита, взятых у мышей по ходу проведения эксперимента. На графике приведены значения процентного содержания TAMRA+ клеток посуточно до 11 дня от начала терапии для двух мышей и до 6 суток для одной мыши группы (пала). Показано, что предложенный режим приводит к накоплению TAMRA+ клеток на ~5-6 сутки от первой инъекции цитостатика. Дальнейший анализ свидетельствует, что такие клетки полностью исчезают из анализируемых образцов к 8-11 суткам эксперимента. На рис. 4В продемонстрированы цитологические имиджи препаратов асцитных клеток до эксперимента и на 6 и 11 сутки от первой инъекции ЦФ.

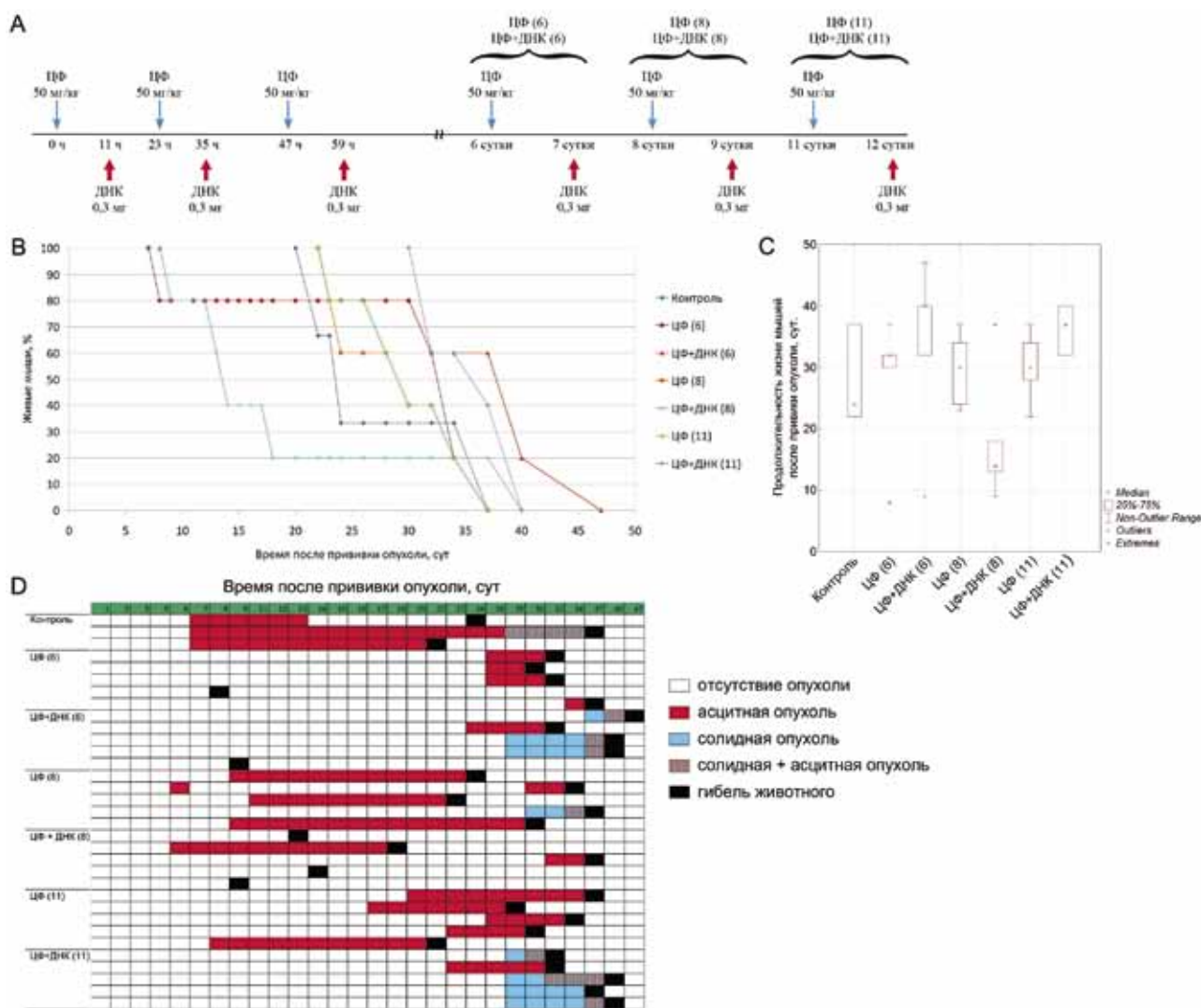


Рис. 7. Анализ синергичного действия цитостатика ЦФ и препарата двуцепочечной ДНК на асцитную форму опухоли Г-29 в режиме «3+1». А) Схема обработки асцита Г-29. В) Динамика гибели экспериментальных животных, обработанных по схеме. С) Продолжительность жизни экспериментальных животных в группах. Приведены медианы, квартильные диапазоны (25-75% значений) и экстремумы. D) Анализ характера развития вторичного асцита у мышей, обработанных ЦФ и препаратом ДНК.

Четко определяются TAMRA+ клетки в нулевой точке и на 6 сутки эксперимента. На 11 сутки от начала терапии раковые клетки претерпевают значительные морфологические изменения. Они набухают и дефрагментируются. В образцах, взятых в этот день, TAMRA+ клетки не обнаруживаются (рис. 4B).

В этом эксперименте также был проведен анализ клеточного цикла в трех наиболее отличающихся по количеству TAMRA+ клеток временных точках. На 6 сутки клетки отчетливо разделялись на две субпопуляции. Одна популяция имела размер клеток интактного асцита (выделено зеленым цветом). Другая была представлена крупными клетками, которые также были хорошо различимы под микроскопом (выделено оранжевым цветом). В этой связи клеточный цикл оценивался отдельно для этих двух популяций (рис. 5).

На плотах, обозначенных зеленым цветом, на 6 сутки распределение клеток по клеточному циклу не отличается от распределения клеток в необработанном асците. На 8 сутки четко видно смещение пика в G2/M с последующим возвращением в G1 на 11 сутки с практическим отсутствием клеток в S/G2/M (рис. 5B).

На плотах, обозначенных оранжевым цветом, на 6 сутки видно смещение клеток по содержанию хроматина в G2/M и выравнивание количества клеток по всем выставленным воротам, включая область апоптоза. На 8 сутки популяция крупных клеток исчезает. На 11 сутки популяция крупных клеток появляется снова. При этом содержание хроматина в этих клетках или соответствует G2/M, или выпадает за границы ворот в сторону увеличения содержания ДНК (рис. 5B).

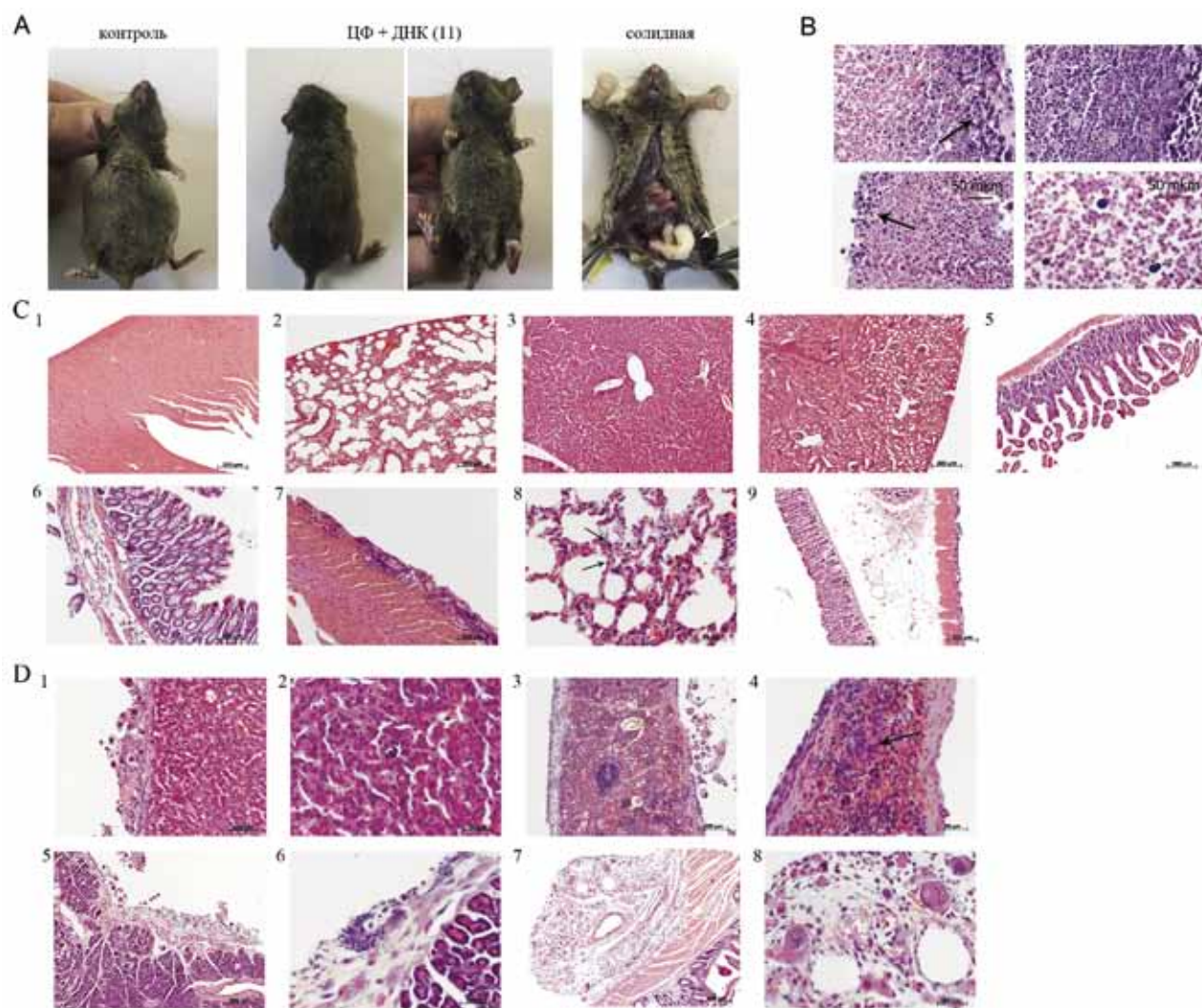


Рис. 8. Оценка патоморфологических параметров у животных с развитой асцитной опухолью Г-29 после проведения терапии с применением ЦФ и препарата двуэпочечной ДНК А) Визуальное состояние экспериментальных животных. Стрелкой указано новообразование, обнаруживаемое в брюшной полости экспериментальных животных. В) Патоморфологический анализ новообразования (указанного стрелкой в пункте А), обнаруживаемого в брюшной полости экспериментальных животных (окраска гематоксилином/эозином). Ядро в клетках, как правило, расположено центрально и в большинстве случаев четко определяется ядрышко темно-синего цвета. Определяются фигуры митоза. Фиброзной капсулы у узлов нет, но в краевой зоне преобладают клетки, по своей морфологии и тинкториальным свойствам более близкие к гепатоцитам (указано черными стрелками). С) 1 – Миокард. Структура соответствует норме. 2 – Легкое. Локальная гиперемия с умеренным снижением воздушности паренхимы. Опухолевые очаги отсутствуют. 3 – Печень. Дольково-балочная структура сохранена. Опухолевые очаги отсутствуют. 4 – Почка. Патологические изменения отсутствуют. 5 – Тонкая кишка. Структура в целом сохранена. Фрагментация отдельных микроворсинок – артефакт. 6 – Толстая кишка. Умеренный отек подслизистой оболочки, дилатация сосудов. Слизистая оболочка без изменений. 7 – Миокард. Локальное утолщение эпикарда вследствие инфильтрации клетками гепатомы. 8 – Легкое. Отдельные опухолевые клетки в капиллярах межальвеолярных перегородок (стрелки). 9 – Желудок. В адвентициальном слое стенки (правая часть микроснимка) видны многочисленные клетки опухоли, расположенные рыхлыми слоями. Д) 1 – Скопление опухолевых клеток на поверхности капсулы печени (на микроснимке слева). 2 – Печень. Группа клеток гепатомы в гепатокapилляре (центральная часть микроснимка). 3 – Опухолевые клетки на поверхности капсулы селезенки. 4 – Скопления клеток опухоли в красной пульпе селезенки (стрелка). 5 – Опухолевые клетки на поверхности капсулы поджелудочной железы (на микроснимке сверху). 6 – Клетки гепатомы в капсуле поджелудочной железы (на микроснимке слева). 7 – Фрагмент стенки толстой кишки с брыжейкой (место соединения). В строме брыжейки (на микроснимке слева) видны крупные, полиморфные клетки гепатомы. 8 – Детализация предыдущего микроснимка. Выраженный полиморфизм опухолевых клеток

Морфология общей популяции асцитных клеток характеризуется следующими изменениями; на 6 сутки часть суммарной популяции асцитных клеток увеличивается в размерах, формируя независимую популяцию; на 8 сутки популяция клеток крупного размера исчезает, при этом популяция «нормальных клеток» смещается в G2/M; на 11 сутки популяция клеток «нормального» размера по содержанию ДНК попадает в ворота, определенные для G1 фазы клеточного

цикла. При этом обсуждаемая популяция микроскопически выглядит как остатки деградированных клеток. Клетки появившейся вновь популяции крупных клеток имеют неправильную овальную форму, крупные, часто содержащие фрагментированные ядра. Общая цитологическая картина свидетельствует о масштабной катастрофической деградации клеток асцита (рис. 4В, рис. 5В). Полученные результаты предполагают, что существенные изменения с клетками

асцита произошли на 6 и 11 сутки от начала терапии, где обнаруживается накопление TAMRA+ СИРК и смещение (синхронизация) в G2/M для одной, и смещение (синхронизация) в G2/M для второй дифференцированной популяции асцитных клеток.

Характеристика терапевтических режимов лечения гепатокарциномы мыши Г-29

Проведенная подготовительная работа определила реперные индикаторы стратегии, необходимые для лечения экспериментальных мышей. В первой части работы по проверке эффективности разработанного режима в биологическом тесте были использованы как схема, предполагающая частые инъекции ЦФ, охватывающие все предположительные фазы репаративного процесса для всех асцитных клеток, изначально находящихся в различных фазах клеточного цикла («6+1») (рис. 6А), так и стандартная схема «3+1» (рис. 6D). Также в предварительных экспериментах тестировалось количество вводимого препарата ДНК.

Как показали 4 серии проведенных экспериментов (рис. 6В, С, Е, F), первоначально предложенные экспериментальные схемы и дозы препарата ДНК являлись абсолютно токсичными для всех групп мышей как при асцитной форме рака, так и для солидного его варианта. В этой связи были проведены эксперименты с использованием стандартного режима «3+1» и введением в терапевтический режим инъекции препарата ДНК в переносимой дозе 0,3 мг на мышшь. Результаты экспериментов приведены на рис. 7. В эксперименте были сформированы три группы мышей. Режим обработок был аналогичен для всех групп в первой его части. Финальное терапевтическое воздействие было проведено для трех групп в различные дни после начала терапии, на 6, 8 и 11 сутки. (рис. 7А). Главным индикатором исследуемого терапевтического режима, на который было обращено внимание, являлась динамика развития асцита: его исчезновение, продолжительность ремиссии и время появления рецидива (рис. 7D).

Установлено, что при использовании режима «ЦФ (6)» и «ЦФ (11)» первичный асцит уходит полностью. Рецидив детектируется на 26 сутки при использовании режима «ЦФ (6)» и на 17 сутки при использовании режима «ЦФ (11)». При этом одна мышшь оказалась нечувствительной к обработке ЦФ. Наибольший терапевтический эффект был обнаружен при использовании режимов «ЦФ+ДНК (6)» и «ЦФ+ДНК (11)». Необходимо отметить следующую закономерность. В этих группах рецидивирующий асцит разви-

вался как вторичная опухоль преимущественно после развития и визуального проявления солидного тяжа. Для группы «ЦФ+ДНК (11)» вторичный асцит у всех мышей появился только после развития солидного внутрибрюшинного образования. В группе «ЦФ (6)» только у одной мыши рецидив асцита не коррелировал с появлением солидного очага. Во всех остальных группах всегда рецидив асцита обнаруживался первым.

Обсуждение

В настоящем исследовании была предпринята попытка вылечивания асцитной формы гепатокарциномы Г-29 мыши. Была использована предложенная стратегия лечения рака, состоящая из следующих этапов. Определение в популяции асцитных клеток TAMRA+ клеток, которые, согласно нашим исследованиям, являются СИРК опухоли Г-29. Определение времени прохождения репаративного цикла клетками гепатокарциномы на основании анализа появления и ухода ДЦР. Определение времени синхронизации асцитных, и в том числе СИРК, в определенной фазе клеточного цикла. Определение времени выхода клеток асцита из синхронного состояния. На основании вышеуказанного, определение метромного режима введения цитостатика ЦФ и препарата ДНК.

В асците Г-29 присутствует около 1% TAMRA-позитивных клеток. Репаративный цикл основной массы асцитных раковых клеток составляет 24 часа. При анализе клеточного цикла после режимного введения ЦФ были обнаружены две популяции клеток: клетки, размером не отличающиеся от исходных («нормальные»), и вторые – крупные.

«Нормальные» клетки синхронизируются в G1 на 11 сутки от введения цитостатика. Крупные клетки синхронизируются на 6 сутки в G2/M. Для этой популяции клеток отмечается превышение содержания ДНК диплоидного количества, что может свидетельствовать о катастрофических нарушениях в структуре клеток. Накопление максимального количества TAMRA+ клеток происходит на 5-6 сутки от начала инъекций. Такое неоднозначное поведение клеток асцита Г-29 определило в биологических экспериментах формирование трех анализируемых групп животных, для которых время финальной терапевтической процедуры соответствовало 6, 8 и 11 суткам от первой инъекции ЦФ.

В результате проведенных экспериментов удалось полностью избавиться от первичного асцита в группах «ЦФ+ДНК (6)» и «ЦФ+ДНК (11)». Тем не менее, от вторичного асцита гепатокарциномы Г-29 вылечить экспериментальных мышей не удалось ни в одной из групп. В груп-

пе «ЦФ+ДНК (8)» асцит развился аналогично контролю. Касательно появления асцита в группах, где обработки проводились по примененной схеме режима, но только одним цитостатиком; в обеих группах («ЦФ (6)» и «ЦФ (11)») наблюдалась существенная задержка развития рецидива.

При вскрытии у всех экспериментальных мышей обнаруживался развитый канцероматозный солидный конгломерат опухоли (рис. 8). Патоморфологические изменения, свидетельствовали о внедрении раковых клеток во внутренние структуры тканей органов, что, по-видимому, и является причиной развития канцероматозных солидных образований. В наших исследованиях, направленных на терапию асцитных форм рака, экспериментальная процедура предполагает интраперитонеальную трансплантацию опухолевых клеток асцитной жидкости. Мы полагаем, что для гепатокарциномы Г-29 такой способ приводит к созданию искусственного первичного канцероматоза. СИРК при такой ситуации «прячутся» от терапевтического воздействия препарата ДНК в толще или серозных оболочек, или брюшной стенки, что и приводит к развитию солидной формы Г-29 перитонеальной локализации. Как оказалось, различные опухоли в асцитной форме обладают разными инвазивными характеристиками. Если для Кребс-2 солидные разрастания опухоли в брюшной полости наблюдаются крайне редко, то для Г-29 такая ситуация является нормой. И, по-видимому, именно солидное образование стимулирует развитие вторичного асцита.

Заключение

Применение новой стратегии «3+1», основанной на эрадикации стволовых инициирующих раковых клеток, демонстрирует эффективное редуцирующее воздействие на развивающийся асцитный трансплантат гепатокарциномы мышей Г-29.

Благодарности

Авторы выражают благодарность ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН, ЦКП проточной цитометрии ИЦиГ СО РАН, а также Рогачеву Владимиру Алексеевичу за наработку препарата кросслинзированной ДНК спермы лосося, входящей в состав сложнокомпозиционного препарата ДНК.

Работа выполнена в рамках государственного задания по бюджетному проекту № 0324-2018-0019.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алямкина Е.А., Долгова Е.В., Проскурина А.С. и др. Внутриклеточные системы обнаружения экзогенных нуклеиновых кислот и механизмы запуска иммунных реакций в ответ на интернализацию экзогенной ДНК // Медицинская иммунология. – 2013. – Т. 15. – № 5. – С. 413-430.
2. Долгова Е.В., Проскурина А.С., Николин В.П. и др. Характеристика временных параметров проявления эффекта токсического действия инъекций экзогенной ДНК на фоне предобработки цитостатиком циклофосфаном // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т. 15. – № 4. – С. 674-689.
3. Долгова Е.В., Николин В.П., Попова Н.А. и др. Интернализация экзогенной ДНК во внутренние компартменты клеток костного мозга мышей // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т. 16. – № 2. – С. 397-414.
4. Долгова Е.В., Николин В.П., Попова Н.А. и др. Патологические изменения, возникающие в организме мышей, обработанных сочетанием циклофосфана и экзогенной ДНК // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. – № 1. – С. 129-146.
5. Долгова Е.В., Прокопенко А.В., Николин В.П. и др. Характеристика изменения количества умеренных повторов в геноме клеток костного мозга экспериментальных мышей на фоне инъекции циклофосфана и экзогенной ДНК человека // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. – № 2. – С. 246-264.
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 асцита 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., Leplina O.Y., Ostanin A.A. et al. Effects of human exogenous DNA on production of perforin-containing CD8+ cytotoxic lymphocytes in laboratory setting and clinical practice // Cell Immunol. – 2012. – Vol. 276. – P. 59-66.
11. 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.
12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. Dolgova E.V., Efremov Y.R., Taranov O.S. et al. Comparative analysis of pathologic processes developing in mice housed in SPF vs non-SPF conditions and treated with cyclophosphamide and dsDNA preparation // *Pathol Res Pract.* – 2015. – Vol. 211. – № 10. – P. 754-758.
 16. Dolgova E.V., Potter E.A., Proskurina A.S. et al. Properties of internalization factors contributing to the uptake of extracellular DNA into tumor-initiating stem cells of mouse Krebs-2 cell line // *Stem Cell Res Ther.* – 2016. – Vol. 7. – № 1. – P. 76.
 17. Dolgova E.V., Shevela E.Y., Tyrinova T.V. et al. Non-adherent spheres with multiple myeloma surface markers contain cells that contribute to the sphere formation and are capable of internalizing extracellular double-stranded DNA // *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* – 2016. – Vol. 16. – № 10. – P. 563-576.
 18. 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.
 19. Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S. 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.
 20. Potter E.A., Proskurina A.S., Ritter G.S. et al. Efficacy of a new cancer treatment strategy based on eradication of tumor-initiating stem cells in a mouse model of Krebs-2 solid adenocarcinoma // *Oncotarget.* – 2018. – Vol. 9. – № 47. – P. 28486-28499.

E.A. Potter^{1,}, G.S. Ritter^{1,2,*}, E.V. Dolgova¹, A.S. Proskurina¹, P.E. Kisaretova², Y.R. Efremov^{1,2}, V.P. Nikolin¹, N.A. Popova^{1,2}, O.S. Taranov³, A.A. Ostanin⁴, E.R. Chernych⁴, S.V. Sidorov^{2,5}, N.A. Kolchanov¹, S.S. Bogachev¹*

Evaluating the efficiency of the tumor-initiating stem cells eradication strategy on the example of ascite form of mouse hepatocarcinoma G-29

¹Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk,

²Novosibirsk State University, Novosibirsk,

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

⁴Institute of Fundamental and Clinical immunology, Novosibirsk,

⁵Municipal Hospital No 1, Novosibirsk

Previously, we identified a treatment regimen ("3+1") to synchronize and eradicate solid and ascites forms of murine Krebs-2 tumor. Using a similar strategy, we attempted to narrow down the treatment conditions for mouse hepatocarcinoma G-29 that can be passaged in mice as either ascites or solid grafts. We successfully developed the protocol that allowed elimination of the primary ascites. Our results indicate that the "3+1" treatment protocol wherein the final doses of cyclophosphamide and double-stranded DNA preparation are given on days 6 or 11 had the greatest therapeutic effect. Mean survival time was 36 days in treated mice vs 27 days in untreated controls. We further demonstrate that tightly scheduled cyclophosphamide treatment was in itself highly inhibitory to the growing G-29 ascites. It has been shown that in the case of ascitic form of G-29 tumor after synergistic action of cytostatic and double-stranded DNA preparation, secondary ascites arises following the appearance of peritoneal carcinomatous solid formation and, apparently, is its derivative.

Key words: hepatocarcinoma G-29, cyclophosphamide, double-stranded DNA, secondary ascites

*The authors made an equal contribution to the work

Поступила в редакцию 26.02.2018 г.