


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

Е.А. Поттер¹, Е.В. Долгова¹, А.С. Проскурина¹, Я.Р. Ефремов^{1,2}, О.С. Таранов³, В.П. Николин¹, Н.А. Попова^{1,2}, Т.Д. Дубатолова⁴, Д.Д. Петрова⁵, Е.И. Верещагин⁶, А.М. Минкевич¹, О.М. Андрушкевич^{1,2}, С.И. Байбородин^{1,2}, В.А. Рогачев¹, А.А. Останин⁷, Е.Р. Черных⁷, Н.А. Колчанов¹, С.С. Богачев¹ 

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

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

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

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия


⁵ Специализированный учебно-научный центр Новосибирского государственного университета, Новосибирск, Россия

⁶ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирск, Россия

⁷ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

Совокупность всех данных, полученных в работах настоящего цикла исследований, определила основную логику создания нового сложноконпозиционного препарата на основе двуцепочечной ДНК, применение которого в рамках нового терапевтического режима привело к полному вылечиванию мышей от асцита Кребс-2. Рассматривается предполагаемый механизм разрушения опухолевого начала опухоли Кребс-2, который заключается в элиминации из опухоли TAMRA+ стволовых иницирующих раковых клеток (СИРК). Проведен анализ изменения количества СИРК Кребс-2 в нативном асците и асците после обработки цитостатиком циклофосфатом (ЦФ). В нативном асците количество СИРК осциллирует на определенном уровне. После обработки циклофосфатом их количество относительно оставшихся после масштабного апоптоза коммитированных раковых клеток увеличивается по сравнению с исходным, что предполагает пониженную чувствительность СИРК к действию циклофосфана. Тем не менее произошедшая в результате проведенных обработок синхронизация СИРК в чувствительной фазе клеточного цикла делает их доступными для действия терапевтических агентов. Охарактеризован режим синергичного воздействия циклофосфана и препарата ДНК на развивающуюся асцитную опухоль Кребс-2, приводящего к полному вылечиванию 50 % экспериментальных животных. Этот режим включает трехкратные инъекции цитостатика циклофосфана в конечные точки каждого из трех последовательных репаративных циклов, дополненные инъекциями препарата двуцепочечной ДНК через 18 ч после каждой инъекции циклофосфана, и финальную обработку цитостатиком и препаратом ДНК в момент синхронизации клеток асцита в чувствительной фазе клеточного цикла после первичных обработок. Первые три инъекции «ЦФ + ДНК» необходимы для ареста всех асцитных клеток Кребс-2 в поздней S-G2-M-фазе и их синхронного выхода в G1-S-фазе следующего клеточного цикла. Момент такого синхронного выхода определен как принципиальная временная

Development of the therapeutic regimen based on the synergistic activity of cyclophosphamide and double-stranded DNA preparation which results in complete cure of mice engrafted with Krebs-2 ascites

Е.А. Potter¹, E.V. Dolgova¹, A.S. Proskurina¹, Ya.R. Efremov^{1,2}, O.S. Taranov³, V.P. Nikolin¹, N.A. Popova^{1,2}, T.D. Dubatolova⁴, D.D. Petrova⁵, E.I. Vereschagin⁶, A.M. Minkevich¹, O.M. Andrushkevich^{1,2}, S.I. Baiborodin^{1,2}, V.A. Rogachev¹, A.A. Ostanin⁷, E.R. Chernykh⁷, N.A. Kolchanov¹, S.S. Bogachev¹ 

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

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

⁴ Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Russia

⁵ The Specialized Educational Scientific Center at Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁶ Novosibirsk State Medical Academy, Novosibirsk, Russia

⁷ Institute of Clinical Immunology, SB RAMS, Novosibirsk, Russia

Cumulative evidence obtained in this series of studies has guided the logic behind the development of a novel composite dsDNA-based preparation whose therapeutic application according to the specific regimen completely cures the mice engrafted with otherwise lethal Krebs-2 ascites. The likely mechanism involves elimination of TAMRA+ tumor-inducing stem cells (TISCs) from Krebs-2 tumors. We performed quantitative analysis of TISC dynamics in Krebs-2

точка финальной обработки препаратами, приводящей к эрадикации опухолевого начала рака Кребс-2. Дополнительно оцениваются некоторые биохимические, клеточные и патоморфологические параметры состояния экспериментальных животных в различных фазах лечения.

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

ascites following treatment with the cytostatic drug cyclophosphamide (CP) and untreated control cells. In intact ascites, TISC percentage oscillates around a certain value. Following CP treatment and massive apoptosis of committed cancer cell subpopulation, we observed relative increase in TISC percentage, which is consistent with reduced susceptibility of TISCs to CP. Nonetheless, this treatment apparently synchronizes TISCs in a cell cycle phase when they become sensitive to further drug treatments. We describe the regimen of synergistic DNA + CP activity against Krebs-2 ascites. This protocol results in a complete cure of 50 % of Krebs-2 engrafted mice and involves three metronomic injections of CP exactly at the timepoints when repair cycles are about to finish combined with dsDNA injections 18 hours following each CP injection. The "final shot" uses CP + DNA treatment, which targets the surviving yet highly synchronized and therefore treatment-sensitive cells. The first three CP/DNA injections appear to arrest Krebs-2 cells in late S-G2-M phase and result in their simultaneous progression into G1-S phase. The timing of the "final shot" is crucial for the successful treatment, which eradicates tumorigenic cell subpopulation from Krebs-2 ascites. Additionally, we quantified the changes in several biochemical, cellular and morphopathological parameters in mice throughout different treatment stages.

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

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Поттер Е.А., Долгова Е.В., Проскурина А.С., Ефремов Я.Р., Таранов О.С., Николин В.П., Попова Н.А., Дубатолова Т.Д., Петрова Д.Д., Верещагин Е.И., Минкевич А.М., Андрушкевич О.М., Байбородин С.И., Рогачев В.А., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Богачев С.С. 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;20(5):723-735. DOI 10.18699/VJ16.162

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Efremov Ya.R., Taranov O.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Dubatolova T.D., Petrova D.D., Vereschagin E.I., Minkevich A.M., Andrushkevich O.M., Baiborodin S.I., Rogachev V.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Development of the therapeutic regimen based on the synergistic activity of cyclophosphamide and double-stranded DNA preparation which results in complete cure of mice engrafted with Krebs-2 ascites. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):723-735. DOI 10.18699/VJ16.162

Настоящая работа завершает цикл из четырех статей, посвященных поиску стратегии лечения асцитной формы рака на модели мышинной опухоли Кребс-2.

Проблема терапии малигнизированного асцита рассматривалась в первых двух статьях (Поттер и др., 2016а, б).

В предыдущих исследованиях нами установлены следующие важные моменты.

- Действие нативной ДНК человека при ее введении мышам с 7–9-дневным асцитом в отрезок времени 1–12 ч после инъекции ЦФ приводит к разрушению опухолевого потенциала перевиваемых опухолевых клеток (Поттер и др., 2016а).
- Действие нативной ДНК человека при ее введении мышам с 7–9-дневным асцитом в отрезок времени 18–30 ч после инъекции ЦФ защищает опухолевые клетки от действия цитостатика (Поттер и др., 2016а).
- Действие кросс-линкированной ДНК в форме монопрепарата на фоне инъекции ЦФ смертельно токсично для экспериментальных животных (Поттер и др., 2016б).
- Единичная инъекция препарата нативной ДНК человека (0,5 мг) мышам с 7–9-дневным асцитом через 18 ч

после введения ЦФ разрушает опухолевые свойства графта аналогично ежечасным инъекциям препарата ДНК в режиме 1–12 ч после введения ЦФ (Поттер и др., 2016а).

- Известно, что популяция TAMRA+ раковых клеток асцита Кребс-2, обладающих свойствами стволовых иницирующих раковых клеток (СИРК), на 40 % пересекается с популяцией CD34+ клеток (Dolgova et al., 2014). При этом популяция CD34+ клеток на 90 % состоит из TAMRA+ клеток. Показано, что синергичное действие ЦФ и препарата двуцепочечной ДНК (дцДНК) человека приводит к снижению количества CD34+ клеток в популяции клеток Кребс-2 (Поттер и др., 2016а). Полученный факт мог означать, что предлагаемая обработка воздействует на СИРК Кребс-2, а их элиминация, в свою очередь, приводит к потере опухолевого потенциала раковыми клетками.
- Проведенные исследования режимов воздействия на развитый 5-суточный асцит *in vivo* продемонстрировали следующий терапевтический эффект. Терапия цитостатиком ЦФ (0, 20, 36 и 56 ч), метрономное введение на-

тивной дцДНК человека (hDNA) в режиме 1–20 ч после инъекции ЦФ и продолжающие их ежедневные инъекции смеси нативной и кросс-линкированной дцДНК спермы лосося (ssDNAmix) в режиме 20–36 ч после инъекции ЦФ приводят к акцидентальной регрессии асцита у всей группы экспериментальных животных с последующей продолжительной (в течение 9 суток у 100 % животных в группе) ремиссией и с обязательным развитием вторичного рака (Поттер и др., 2016б).

- Компиляция полученных фактов позволила сделать предположение, что в проводимом *in vivo* лечении асцита вместо многочасового метрономного введения можно использовать режим одной инъекции нового композиционного препарата DNAmix (hDNA + ssDNAmix) через 18 ч после введения ЦФ (суммарная доза дцДНК 6 мг), который будет сочетать все свойства, необходимые для проявления терапевтического эффекта. Эксперименты показали, что трехкратное повторение такого режима (инъекции ЦФ в 0, 36 и 72 ч и инъекции DNAmix через 18 ч после каждого введения ЦФ) приводит к полной эрадикации первичного асцита у 100 % животных. Фаза ремиссии продолжается 8 суток (Поттер и др., 2016в). Однако впоследствии у всех экспериментальных животных развивается вторичный асцит.

Таким образом, нами была сформулирована концепция использования сложнокомпозиционного препарата на основе нативной дцДНК человека и смеси нативной и кросс-линкированной дцДНК лосося. Если инъекция композиции препаратов дцДНК проводится в точку демаркации NER (nucleotide excision repair) и HR (homologous recombination) (18 ч после введения ЦФ), т. е. составляющие препарата одновременно воздействуют на конечные этапы NER и на начальные этапы HR, то перекрывается любая возможность для СИРК корректно завершить репарацию межцепочечных швов (МЦС) (Поттер и др., 2016в). Трехкратное повторение такой процедуры с интервалом между инъекциями ЦФ в 36 ч позволяет полностью элиминировать первичный асцит. СИРК разрушаются или теряется их туморогенный потенциал и тем самым элиминируется туморогенное начало опухоли. Однако впоследствии всегда развивается вторичный рак. Существуют две главные причины рецидива: контаминация СИРК при терапевтических проколах брюшной стенки животных и нечувствительность части СИРК к терапии или их способность переживать терапию.

Первый фактор был преодолен введением в терапевтическую процедуру единственной в рамках одного терапевтического цикла инъекции сложнокомпозиционного препарата на основе дцДНК (Поттер и др., 2016в).

Второй фактор мог быть связан с ускользанием СИРК, находящихся в момент обработки ЦФ в G2-M-фазе клеточного цикла, от терапевтического воздействия экстраклеточных фрагментов дцДНК. Как предполагается в первом варианте объяснения, у СИРК в G2-M-фазе отсутствует свойство интернализации экстраклеточных дцДНК (Dolgova et al., 2016), и они не обладают свойством репарировать МЦС в G2-M. Тогда при их переходе в G1-S МЦС будут обнаружены и репарированы. При этом СИРК сохраняют жизнеспособность, что приведет к рецидиву. Возможно и другое объяснение. СИРК в G2-M захваты-

вают фрагменты дцДНК и одновременно способны обнаруживать и репарировать МЦС без репликации (Долгова и др., 2010). Тогда при переходе в G1-S эти клетки будут также нечувствительны к фрагментам экстраклеточной дцДНК внутриклеточной локализации, что тоже вызовет рецидив. Для того чтобы избежать неконтролируемого ускользания СИРК от проводимой терапии, был введен режим нескольких инъекций ЦФ в точку «0» и далее в фазы окончания каждого репаративного цикла и выхода, по-видимому, нечувствительных к обработке ЦФ и ДНК G2-M СИРК в следующую по очереди G1-S-фазу клеточного цикла – 36 и 72 ч (Поттер и др., 2016в).

Исходя из этих рассуждений, мы предположили, что необходима финальная обработка терапевтическими препаратами, которая приведет к полной элиминации оставшихся СИРК, избежавших предыдущих обработок. В связи с этим было охарактеризовано состояние раковых клеток асцита в момент регрессии опухоли и во время появления вторичного асцита. Проведен цитологический анализ состояния клеток асцита Кребс-2 и их распределение по клеточному циклу на протяжении развития опухоли без и после воздействия ЦФ. Также оценено процентное содержание TAMRA-позитивных клеток в различные дни развития асцита – в норме и после проведенных обработок. И наконец, проанализированы основные показатели состояния клеток крови и костного мозга животных в момент регрессии и ремиссии опухоли и патоморфологические характеристики животных, погибающих после проведенных обработок.

Материалы и методы

Подробная информация о методах исследования, экспериментальных животных, опухолевой модели, получении препарата ДНК человека и лосося, подготовке кросс-линкированного нитроген-мустардом препарата ДНК приведена в статье (Alyamkina et al., 2015).

Метод статистической обработки данных описан в работе (Поттер и др., 2016б). Методики введения препаратов циклофосфана, экзогенной ДНК и антибиотика гентамицина, активации адаптивного иммунитета, пересадки клеток костного мозга, оценки ремиссии асцитной опухоли Кребс-2 рассмотрены в статье (Поттер и др., 2016б).

Метод анализа захвата клетками TAMRA-меченого ДНК-зонда подробно описан в статье (Dolgova et al., 2014).

Анализ клеточного цикла в клетках асцита Кребс-2 после трех инъекций ЦФ с интервалом в 36 ч

Мышам был привит асцит Кребс-2 в количестве 2 млн/мышь. На 5-е сутки была сделана первая инъекция ЦФ (100 мг/кг), через 36 и 72 ч – две аналогичные инъекции. Одновременно с этим у мышей отбирали асцит для проведения анализа распределения клеток асцита по клеточному циклу (0, 18, 54, 90 ч после первой инъекции ЦФ). Для этого небольшое количество асцита (около 50 мкл) отбирали шприцем, промывали PBS один раз, считали в камере Горяева и фиксировали 600 тыс. клеток в 50 % метаноле (в объеме ~300 мкл, при этом метанол по каплям приливали в суспензию клеток). Когда все образцы были собраны, клетки осаждали, промывали один раз PBS,

ресуспендировали в 200 мкл PBS, обрабатывали РНКазой (200 мкг/мл, 30 мин при 37 °С). Затем еще раз осаждали, ресуспендировали в 400 мкл PBS и добавляли краситель PI до концентрации 10 мкг/мл. Затем делали анализ клеточного цикла на проточном цитофотометре BD FACS Atria. Распределение по клеточному циклу оценивали методом One Way ANOVA.

Анализ фрагментации клеток асцита Кребс-2 после трех инъекций ЦФ

В определенные промежутки времени у мышей с асцитом, обработанных цитостатиком ЦФ по схеме (0, 36, 72 ч), отбирали асцит, считали клетки в камере Горяева. На препарат брали по 150 тыс. клеток в 50 мкл среды RPMI-1640, сажали на стекло цитоспином, покрывали глицерином и покровным стеклом. Фотографировали в проходящем свете с помощью микроскопа AxioScope 2 Plus (Zeiss) и анализировали при помощи программы AxioVision.

Перевивка вторичного асцита

У мышей с развивающимся вторичным асцитом отбирали по 300 мкл асцита, осаждали центрифугированием (400 g, 5 мин) супернатант отбирали, клетки ресуспендировали в 300 мкл среды RPMI-1640. Полученную суспензию асцитных клеток из каждой индивидуальной мыши прививали трем интактным животным в заднюю правую лапу по 100 мкл.

Выделение клеток асцита Кребс-2 на фиколл-верографинном градиенте

У мыши после терапевтических процедур отбирали 0,1 мл асцита, ресуспендировали в 3 мл PBS и наносили на 3 мл фиколл-верографина (плотность 1,077 г/см³), ц/ф 30 мин, 1500 об/мин. Верхнее интерфазное кольцо отбирали, проклевывая пипеткой слой жидкости над ним, промывали один раз PBS.

Анализ площади клеток асцита Кребс-2

Измерение площадей асцитных клеток Кребс-2 выполняли с помощью программы Image J (площадь клетки выражена в пикселях, значения представлены в $\times 10^3$ пиксель).

Анализ уровня ЛДГ в асцитной жидкости экспериментальных мышей

На 8-е сутки после первой инъекции ЦФ во время регрессии асцита и во время появления вторичного асцита (разные дни для всех животных) отбирали по 100 мкл асцита, осаждали клетки, по 50 мкл асцитной жидкости замораживали для анализа уровня ЛДГ, который проводили в лаборатории «Сиблабсервис».

Анализ клеток крови и костного мозга мышей

Из хвостовой вены мышей отбирали каплю крови, делали мазок на предметном стекле. Животных в предсмертном состоянии с характерным симптомокомплексом забивали и делали на стекле отпечатки срезов грудины. Мазки и отпечатки на стеклах фиксировали в метаноле 7–10 мин, окрашивали красителем Гимза (Merck) в течение 30 мин. Препараты смотрели под иммерсионным объективом $\times 100$, микроскоп Leica DM4000 B.

Результаты и обсуждение

Характеристика некоторых свойств раковых клеток асцита Кребс-2 интактных и после инъекций ЦФ

Как показано ранее, TAMRA+ клетки – это туморогенные раковые клетки асцита Кребс-2 (стволовые иницирующие раковые клетки) (Dolgorova et al., 2014). При анализе состояния клеток по ходу развития интактного асцита были обнаружены следующие явления.

На протяжении всего времени развития асцита содержание TAMRA+ клеток колеблется от 0,5 до 3 %. Для одной группы животных этот показатель достоверно осциллировал (рис. 1, а). Период осцилляции составлял примерно 4 суток. Для второй группы мышей четкой осцилляции не обнаруживалось, а количество TAMRA+ клеток достигало пиковых значений на 12-е сутки (см. рис. 1, б). Для третьей группы мышей наблюдался провал в количестве и процентном отношении TAMRA+ клеток на 10-е сутки развития асцита (см. рис. 1, в). Абсолютное количество TAMRA+ клеток в группе с максимальным падением на 10-е сутки менялось от ~ 6 млн на 6-е сутки до ~ 1 млн на 10-е сутки и до ~ 11 млн на 14-е сутки.

Сохранение на определенном уровне доли TAMRA+ клеток может означать, что после некоторого числа делений эти клетки теряют свою способность интернализировать TAMRA-меченый ДНК-зонд. При этом для поддержания статус-кво сообщества раковых клеток Кребс-2 требуется около 0,5–3 % TAMRA+ СИРК, и на определенную массу раковых клеток должно присутствовать определенное количество «клеток-операторов». Возможно, TAMRA+ клетки и являются такими операторами, поддерживающими гомеостаз асцитного сообщества клеток.

Известно, что СИРК может делиться как симметрично, давая такую же плюрипотентную клетку, так и несимметрично, давая коммитированный потомок. Последний, обладая конечным, но значительным пролиферативным потенциалом, продуцирует множество дифференцированных раковых клеток (Deleyrolle et al., 2011; Lathia et al., 2011; Gómez-López et al., 2014; Pine, Liu, 2014).

Как следует из оценки динамики процентного соотношения TAMRA+ клеток, не все TAMRA-позитивные клетки являются предшественниками, стоящими на вершине иерархической лестницы раковых клеток Кребс-2. По-видимому, к СИРК относятся те TAMRA+ клетки и то их минимальное количество (составляющее менее 1 % и 1 млн в численном выражении для различных животных), до которого падает их число в определенных точках наблюдения. Оставшиеся TAMRA+ клетки представляют собой коммитированных потомков первого эшелона с высокой пролиферативной активностью. После определенного числа делений они в очередной раз делятся, теряя свойство захватывать ДНК-зонд, и переходят в статус дифференцированных клеток. Именно этот переход детектируется как резкое падение процентного содержания и абсолютного числа TAMRA+ клеток до минимального, а также как наблюдаемые падения при осцилляции. Далее идет фаза несимметричного деления СИРК (менее 1 %), дающих прослойку TAMRA+ потомков первого эшелона коммитирования, которая увеличивает долю TAMRA-позитивных клеток в асците до характерных 0,5–3 %.

Такое соотношение поддерживается на протяжении всего периода развития асцита. Можно полагать, что TAMRA+ СИРК в процессе становления и первых дней развития асцита претерпевают серию симметричных делений, образуя необходимое базовое количество «клеток-операторов». Мы не исключаем варианта существования еще более низкодифференцированных плюрипотентных клеток, не обладающих свойством интернализировать экстраклеточные фрагменты дцДНК. Тем не менее TAMRA+ клетки обладают основными свойствами СИРК и относятся именно к этой популяции раковых клеток асцита Кребс-2 (Dolgova et al., 2014; Поттер и др., 2016а–в).

Поскольку установлено, что проведенная терапия приводит у всей группы животных к полной регрессии асцита, восьмисуточной ремиссии и последующему развитию вторичного рака (Поттер и др., 2016а), мы предположили, что при всех процедурах всегда остается опухолевое начало опухоли, представляющее собой, по-видимому, для асцита Кребс-2 TAMRA+ СИРК (Dolgova et al., 2014). В этой связи была проведена серия экспериментов, анализирующих состояние TAMRA+ СИРК асцита Кребс-2 после обработок.

При анализе состояния клеток после обработки ЦФ установлено, что последовательные инъекции ЦФ в четко определенные временные точки приводят к аресту раковых клеток в S-фазе на 18 ч и сдвигу ареста в позднюю S-G2-M-фазу на 54 ч эксперимента (рис. 2). На 90 ч эксперимента четкое деление клеток по количеству хроматина исчезает, а клеточный материал уходит в зону апоптотического «мусора» (см. рис. 2).

К 7-м суткам от первой инъекции ЦФ происходит полное апоптотическое разрушение всей массы асцитных раковых клеток, что подтверждается микроскопическим и электрофоретическим анализом (рис. 3, а, в). На электрофореграмме видна характерная апоптотическая лестница, свидетельствующая о том, что часть ДНК клеток асцита подверглась нуклеосомной фрагментации (см. рис. 3, в, средний блок). К 8–12-м суткам апоптотический дебрис переходит в состояние вторичного некроза (в, правый блок). Цитофлуоресцентный анализ оставшихся неразрушенными в момент апоптотической фрагментации основной массы раковых клеток (9-е сутки от введения цитостатика), выделенных на фиколл-верографинном градиенте, свидетельствовал о присутствии в образце 12,9 % TAMRA-позитивных клеток, что в 4–25 раз превышает их количество в исходном асците (см. рис. 3, б). Оценка фазы клеточного цикла этих клеток показала, что все они находятся в G1-фазе (см. рис. 3, б3).

Состояние полного разрушения асцита как патоморфологического образования продолжается примерно 5–7 суток и сопровождается визуально детектируемым и экспериментально подтвержденным уходом асцитной жидкости (фаза ремиссии) (Alyamkina et al., 2015; Поттер и др., 2016в; настоящее исследование). К 15–19-м суткам асцит появляется снова, и доля TAMRA+ клеток возвращается к норме, составляющей ~0,5–3 % (данные не приводятся).

Важнейшим в логике разрабатываемой стратегии эрадикации асцита Кребс-2 является соединение результатов, полученных в первой статье цикла (Поттер и др., 2016а), где анализировалось состояние TAMRA+/CD34+ клеток,

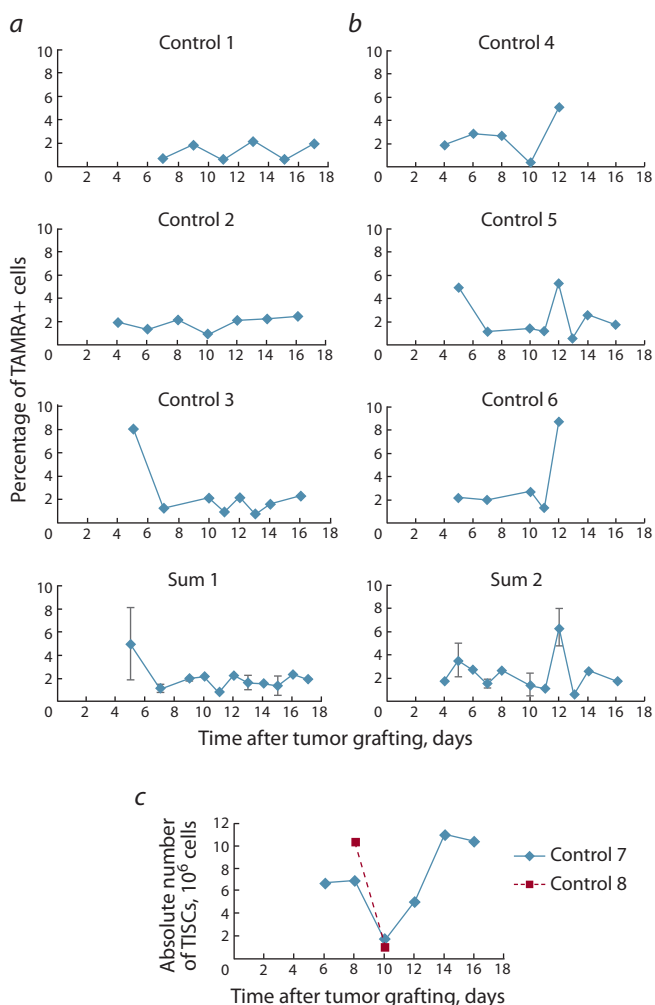


Fig. 1. Changes in the percentage and absolute numbers of TAMRA+ TISCs in intact Krebs-2 ascites.

(a) group 1, showing oscillation in TAMRA+ cell counts with a period of ~4 days; (b) group 2, showing a pronounced peak in TAMRA+ cells on day 12 following ascites engraftment; (c) abortive ascites remission followed by relapse to the initial levels of TAMRA+ cells in two animals; control 1-8, values measured for six individual animals; sum 1 and sum 2 are average values for groups; standard deviation ($n = 3$) is shown on the summarizing plots.

обработанных ЦФ в синергизме с препаратом дцДНК, и результатов настоящего исследования. В ранних экспериментах установлено, что добавление в терапию ЦФ метрономного введения препарата дцДНК приводит к элиминации TAMRA+/CD34+ клеток, что коррелирует с разрушением опухоленности перевиваемого, обработанного таким образом Кребс-2 трансплантата. Эти эксперименты означали, что экстраклеточная дцДНК воздействует на TAMRA+ клетки, лишая их опухолевого потенциала.

Режим полного вылечивания

50 % экспериментальных мышей от асцита Кребс-2

Таким образом, обнаружено, что после ориентированного на фазы репаративного цикла трехкратного введения ЦФ происходит масштабное одновременное апоптотическое

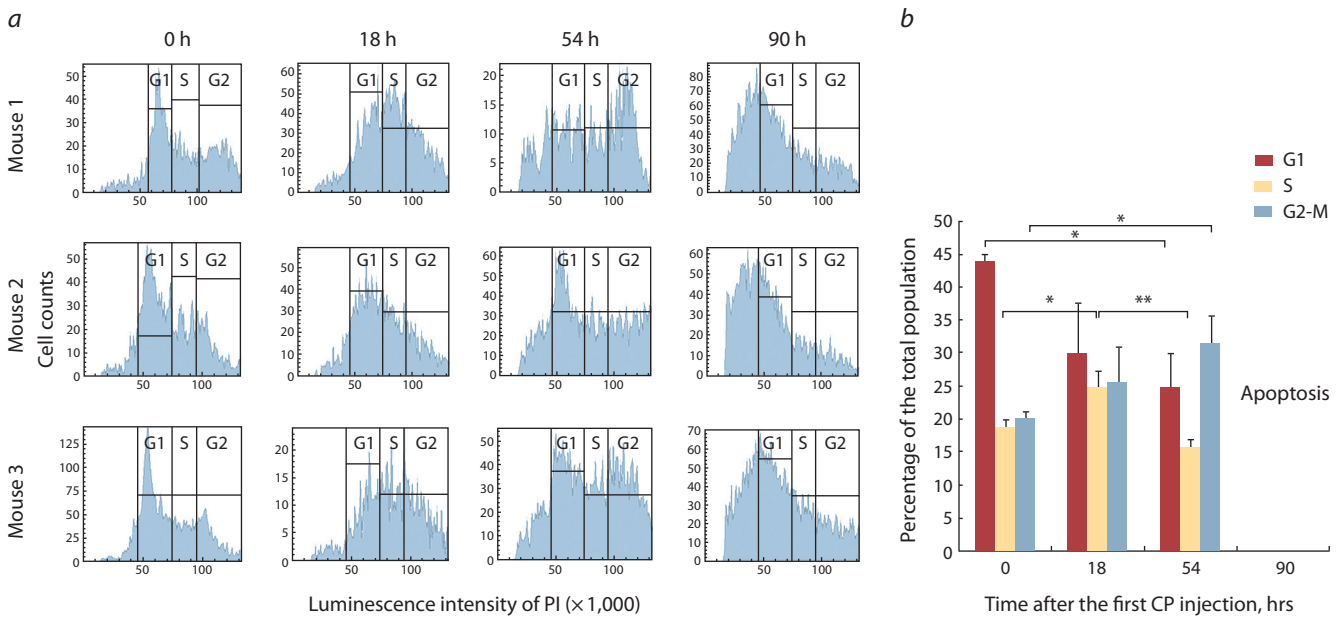


Fig. 2. Cell cycle profiling of Krebs-2 ascites cells with three CP treatments.

(a) cell cycle analysis of Krebs-2 ascites from mice that received three injections of CP (100 mg/kg body weight at 0, 36, 72 hrs). Measurements were taken at the initial (pre-treatment) point and 18, 54, and 90 hrs after the first CP injection ($n = 3$); (b) cell cycle distribution of Krebs-2 cells after CP treatment. Standard deviation ($n = 3$) is shown. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ($n = 3$).

разрушение раковых клеток. При этом все сохранившие морфологическую целостность асцитные раковые клетки (выделенные на фиколл-верографинном градиенте) находятся в G1-S-фазе клеточного цикла, а количество TAMRA+ клеток в этой фракции достигает ~13 %, что подразумевает концентрацию выживших после терапии СИРК. Компиляция этих фактов позволила сформулировать следующую гипотезу.

В клеточном сообществе асцитных раковых клеток существуют две дискриминируемые по признаку интернализации TAMRA-меченой ДНК популяции клеток: захватывающие ДНК-зонд (TAMRA+ клетки) и не захватывающие его (TAMRA- клетки). Известно, что TAMRA+ клетки обладают свойствами СИРК (Dolgova et al., 2014). Сделано предположение, что эти две популяции клеток по-разному завершают арест в поздней S-G2-M-фазе клеточного цикла. Коммитированные раковые клетки разрушаются апоптозом с последующим вторичным некрозом (Alyamkina et al., 2015; настоящее исследование, рис. 3). Часть генетически экстремально пластичных TAMRA+ СИРК выдерживают терапию и после завершения ареста в поздней S-G2-M-фазе выходят из репаративного процесса и стремятся завершить деление. Происходит полная синхронизация всех выживших после проведенной терапии СИРК, и они одновременно входят в первую после ареста G1-S-фазу (как это следует из анализа состояния клеточного цикла и процента TAMRA+ клеток на 9-й день обработки).

Было сделано важнейшее заключение, что именно эта точка может позволить нанести завершающий удар по всем оставшимся причинным СИРК Кребс-2. Без финального удара через несколько суток произойдет естественное расхождение раковых клеток, в том числе СИРК, по

фазам клеточного цикла, и СИРК станут недостигаемыми для дополнительной однократной обработки по схеме разрабатываемого терапевтического режима.

Нами проведено два полномасштабных эксперимента для проверки предложенной гипотезы терминальной обработки сохранившихся асцитных клеток Кребс-2 в фазу синхронного выхода в G1-S (частично результаты экспериментов представлены в работе (Potter et al., 2016)). Последняя обработка для первого эксперимента была осуществлена на 8-е, для второго – на 12-е сутки от введения ЦФ. Результаты экспериментов представлены на рис. 4.

Особое внимание в экспериментах было сконцентрировано на двух группах. Группа, где проводилась обработка композиционным препаратом дцДНК (ЦФ + ДНК), и группа, где проводилась обработка тем же препаратом, но в ассоциации с белком протамином (ЦФ + ДНК + протамин). Введение этого дополнительного компонента позволяет в 10 раз снизить терапевтическую дозу препарата ДНК, сохраняя высокий терапевтический эффект (Поттер и др., 2016а).

Оказалось, что предложенное решение приводит к полному вылечиванию 50 % мышей от асцитной формы рака Кребс-2. И ЦФ, и комбинированное действие ЦФ и препарата дцДНК/дцДНК + протамин демонстрировали ярко выраженный терапевтический эффект на развитие асцита.

В первом эксперименте в группе «ЦФ» к 80 дню эксперимента последнее животное было с раковым асцитом и погибло в течение недели (см. рис. 4, a). В экспериментальных группах «ЦФ + ДНК» и «ЦФ + ДНК + протамин» к 80-м суткам эксперимента у 50 % животных обеих групп вторичный асцит не проявился. К 100-му дню эксперимента у одной мыши в группе «ЦФ + ДНК + протамин» по-

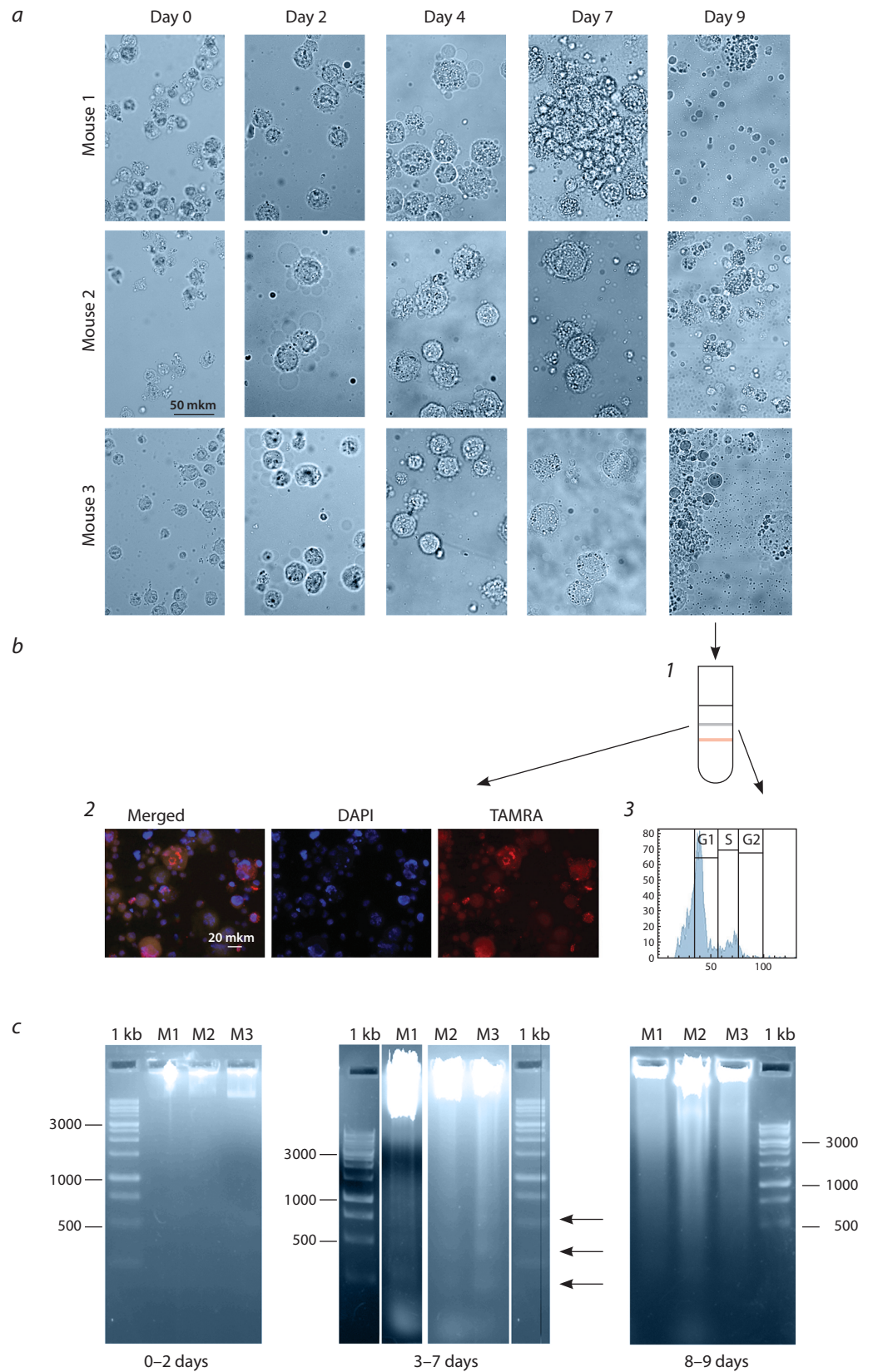


Fig. 3. Analysis of Krebs-2 cell status following CP treatment *in vivo*.

(a) Morphology of Krebs-2 ascites cells on day 9 after CP treatment ($n = 3$). (b) Krebs-2 fractionation in a ficoll-verografin density gradient: 1. On day 9 after the CP treatment: Krebs-2 cells in the top fraction, and apoptotic cell debris is present in the bottom fraction. 2. Cytofluorescence analysis of the top fraction showing the percentage of TAMRA+ Krebs-2 cells. 3. Cell cycle profiling of Krebs-2 cells present in the top fraction. (c) Electrophoresis of DNA isolated from Krebs-2 ascites cells in 1% agarose (shown in Fig. 3a).

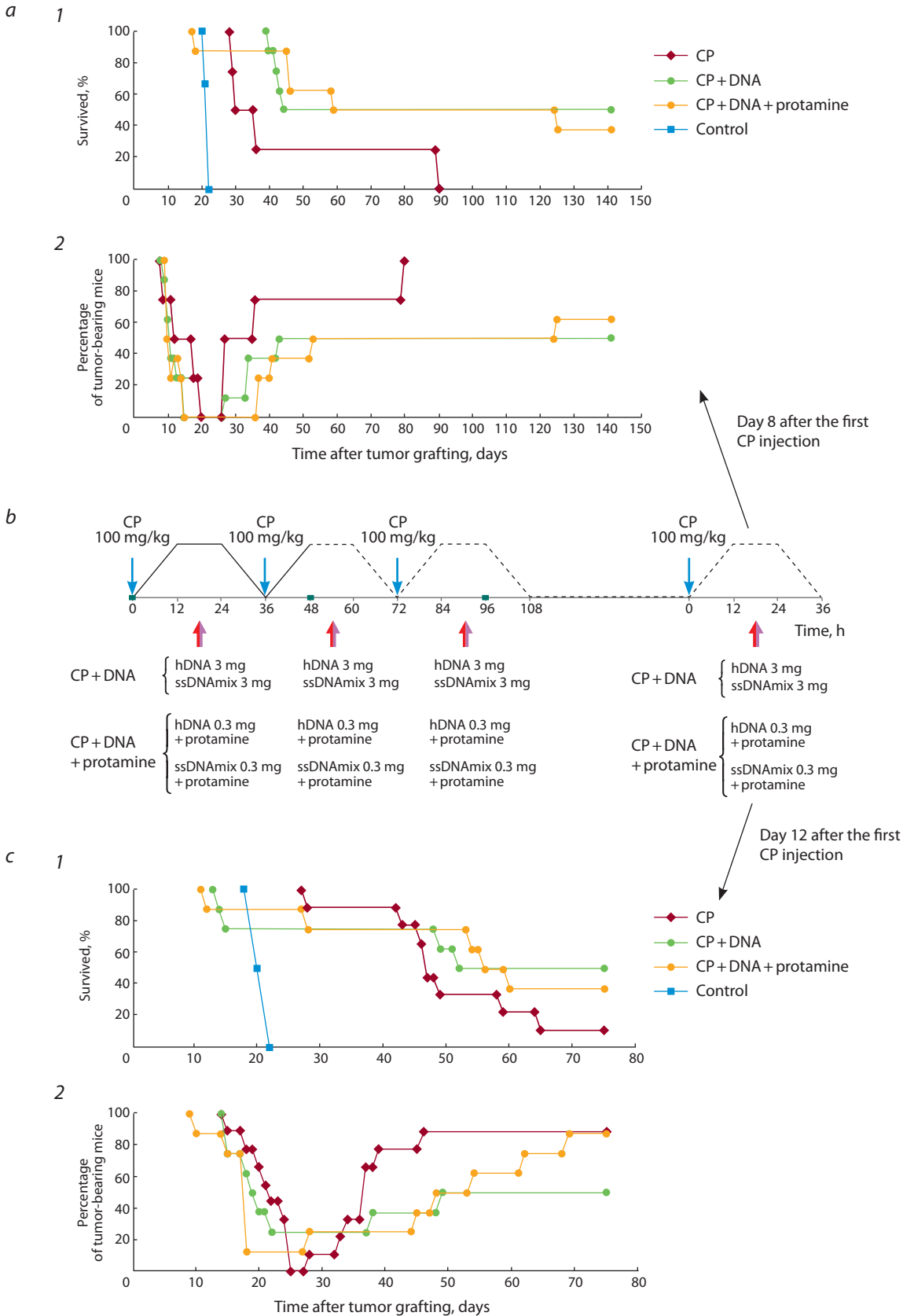


Fig. 4. Analysis of the synergic anti-ascites activity of CP plus human and salmon sperm DNA in the presence or absence of protamine. (a) Synergic activity of CP and dsDNA preparation administered following the "3+1 CP+dsDNA" schedule, with the last injection cycle given on day 8 after the first CP injection ($n = 8$); (b) scheme of the treatment in experiments a and c; (c) synergic activity of CP and dsDNA preparation administered following the "3+1 CP+dsDNA" schedule, with the last injection cycle given on day 12 after the first CP injection ($n = 8$). 1, Survival plot; 2, ascites remission in the experimental groups.

явилась солидная опухоль в районе шеи, и к 130-му дню животное погибло. Оставшиеся 7 животных этого эксперимента прожили 8–12 месяцев без признаков опухоли.

Во втором эксперименте дополнительная терапия была проведена на 12-е сутки после первой инъекции ЦФ, т. е. на четверо суток позже, чем в первом (см. рис. 4, б, в). Такой подход позволил частично оценить продолжительность терминального терапевтического отрезка времени. Так же как и в предыдущем эксперименте, обе группы животных демонстрировали высокую эффективность предлагаемой терапии.

В обоих экспериментах была достигнута 50 % выживаемость мышей для группы «ЦФ+ДНК». Причинами гибели животных в экспериментальных группах были развитие вторичной опухоли и развитие неуправляемой полиорганной недостаточности (ПОН) (Поттер и др., 2016б). В первом эксперименте из 50 % погибших животных (см. рис. 4, а) в каждой группе по одной мышке погибло от ПОН без признаков асцита, по три мышки – от развившегося вторичного асцита. Во втором эксперименте в группе «ЦФ+ДНК» одна мышка погибла от ПОН без признаков асцита, три животных – с асцитом. В группе «ЦФ+ДНК+протамин» две мышки погибли без асцита, пять – с асцитом.

Что же произошло при использовании режима «3+1 ЦФ+ДНК»? Первые три инъекции ЦФ одна за другой уменьшают количество клеток, остающихся не подверженными воздействию ЦФ. Каждый раз при введении ЦФ через 36 ч после предыдущей инъекции новая обработка приходится на время, когда часть популяции TAMRA-ДНК интернализирующих клеток, находившаяся в G2-M-фазе клеточного цикла и не чувствительная к ЦФ, переходит в G1-S-фазу и становится чувствительной к обработке цитостатиком. Одновременно каждая следующая инъекция ЦФ повторно запирает в G2-фазе готовящиеся выйти из нее клетки первой очереди воздействия, т. е. очередная обработка ЦФ индуцирует новые кросс-линки в клетках, уже залечивших сшивки от предыдущей обработки, и не дает им перейти в митоз. Происходит полномасштабная синхронизация раковых клеток, включая СИРК Кребс-2, в поздней S-G2-M-фазе. При добавлении препарата ДНК в точку разделения двух репаративных фаз идет интерференция репаративного процесса по двум векторам – NER и HR. На 8-е сутки после обработок детектируется тотальное масштабное разрушение асцитных раковых клеток. Коммитированные клетки уходят в апоптоз. Часть генетически пластичных СИРК, выживших при проведенной терапии, синхронно завершают деление и входят в первую после ареста G1-S-фазу клеточного цикла. Экспериментально было подтверждено предположение, что если в это время еще раз провести обработку ЦФ и ДНК в указанном режиме, то наблюдается полная эрадикация СИРК и разрушение опухоленоса начала опухоли. Без дополнительного вмешательства (иммунокоррекция, антисепсисная терапия) выживает 50 % животных. При этом патоморфологический анализ свидетельствует об отсутствии у обработанных в указанном режиме мышей значимых патологий тканей и органов, что подразумевает возможность переноса данной терапии на человека (Potter et al., 2016).

Тот факт, что полностью вылечивается и выживает только половина экспериментальных животных, объясняется следующими причинами. У каждого индивидуального животного фаза тотальной апоптотической фрагментации раковых клеток сдвинута на 1–5 суток в зависимости от индивидуальных особенностей животного и прививаемого асцита (см. рис. 3, а). Это означает, что при программной терминальной обработке, проведенной в усредненный день тотального разрушения раковых клеток (например, 8-й или 12-й в наших экспериментах), у части животных чувствительная фаза к терминальной обработке или еще не наступила, или уже прошла. Именно у этих животных и развивается вторичный рак. ПОН, которая также вносит свой вклад в выживаемость, наблюдается практически во всех экспериментах и требует дополнительной антисепсисной терапии.

Все выжившие мышки-самки были ссажены с самцами. Через два месяца у двух самок из созданных семей появились здоровые мышата – семь и пять соответственно. Одна мышка съела потомство на 3-и сутки, по всей вероятности, из-за отсутствия молока. У второй мышки потомство погибло на 2-е сутки, по всей видимости, также от голода вследствие отсутствия молока у матери. Вторая мышка принесла помет повторно, мышата выжили и развиваются нормально. Таким образом, проверка репродуктивной функции самок после проведенного лечения свидетельствует об отсутствии прямого действия терапии на герминативные пути. Тем не менее гибель потомства у экспериментальных мышек в течение трех дней после рождения от (как предполагается) отсутствия молока указывает на наличие физиологических нарушений, причины которых требуют дополнительных исследований.

В рассматриваемых экспериментах у мышек были оценены некоторые биохимические, клеточные, физиологические и патоморфологические параметры во время регрессии асцита и на отрезке времени развития вторичного асцита или возникновения и развития симптомокомплекса ПОН. Также был проведен патоморфологический анализ органов и тканей мышек в агонистической фазе развития вторичного асцита или ПОН (патоморфологический атлас представлен в работе (Potter et al., 2016)).

Оценка некоторых показателей, характеризующих события, происходящие в организме экспериментальных мышек после проведенных обработок в фазе резорбции первичного асцита и в фазе развития вторичного асцита

В настоящем разделе приводятся некоторые характеристики состояния асцитной жидкости и клеток асцита Кребс-2 после проведенных обработок (рис. 5, а, в–д), а также представлены фотографии, демонстрирующие мышку с развившимся асцитом на 8–10-е сутки и после полной регрессии асцита через 130 суток после прививки опухоли (см. рис. 5, б).

Во время резорбции асцита у экспериментальных животных были проанализированы следующие параметры: процентное содержание TAMRA+ клеток, уровень лактацдегидрогеназы (ЛДГ) (см. рис. 5, а1), клеточность и состояние клеток. В фазе рецидива развития асцита анализировали процентное содержание TAMRA+ клеток,

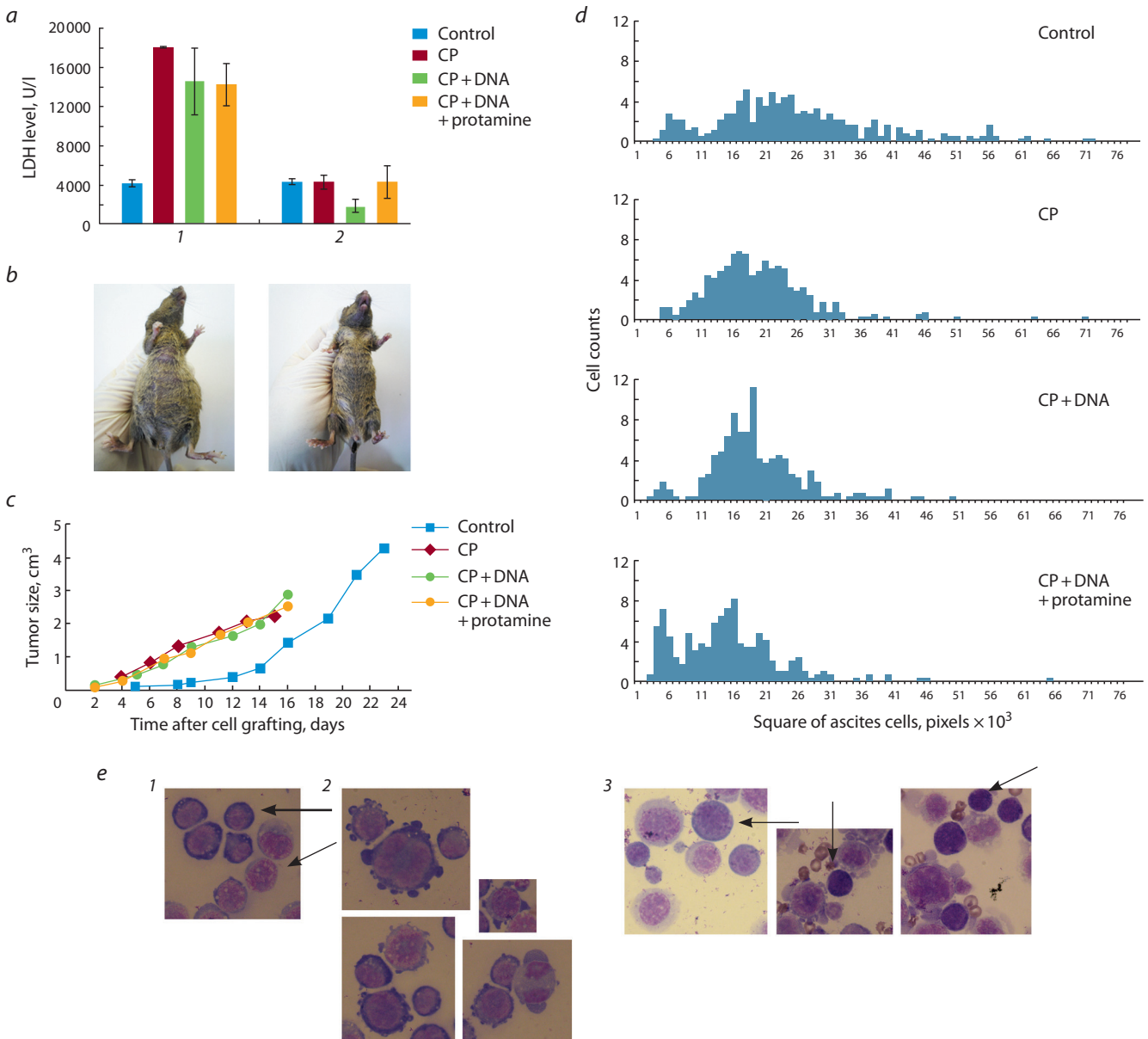


Fig. 5. Summary of several parameters measured in the course of the therapy of ascites-engrafted mice under the "3 + 1 CP + DNA" schedule.

(a) LDH levels in the ascitic fluid of mice: (1) during the ascites remission period and (2) upon ascites re-growth ($n = 3-5$). (b) View of ascites in arbitrarily chosen experimental animals. Left: mouse with an established ascites; right: the same mouse in the remission period (day 130). (c) Growth of solid Krebs-2 transplants taken from experimental animals with secondary ascites ($n = 3$). (d) Ascites cell size distribution in animals from different groups; (e) Examples of morphologically distinct types of ascites cells: 1, cells having basophilic granules (thick arrow) and cells with nongranular cytoplasm (thin arrow), 2, cytoplasm budding, 3, strongly basophilic cells (arrows).

ЛДГ (см. рис. 5, a2), клеточность и состояние клеток, состояние форменных элементов крови и костного мозга у погибающих животных (рис. 6). Для анализа туморогенности вторичного асцита проводилась его перевивка в форме солидного графта (см. рис. 5, в). Дополнительно был проведен частичный патоморфологический анализ погибших животных (Potter et al., 2016). Полученные данные свидетельствовали о следующем.

Процентное содержание TAMRA+ клеток при перевивке находилось в пределах нормы и составляло ~1–3%.

При регрессии асцита подсчет TAMRA-позитивных клеток оказался невозможным, поскольку клеточный дебрис создавал множественные артефакты. В фазе рецидива количество TAMRA+ клеток восстанавливалось до исходного уровня (~1–3%) (данные не приводятся). В исходной точке и в фазе роста вторичного асцита общая клеточность асцитного бульона была на обычном уровне (~200 млн кл./мл). В фазе резорбции асцит плохо отбирался, клеточность была почти в 10 раз ниже исходной, сохранившийся материал имел выраженную апоптотиче-

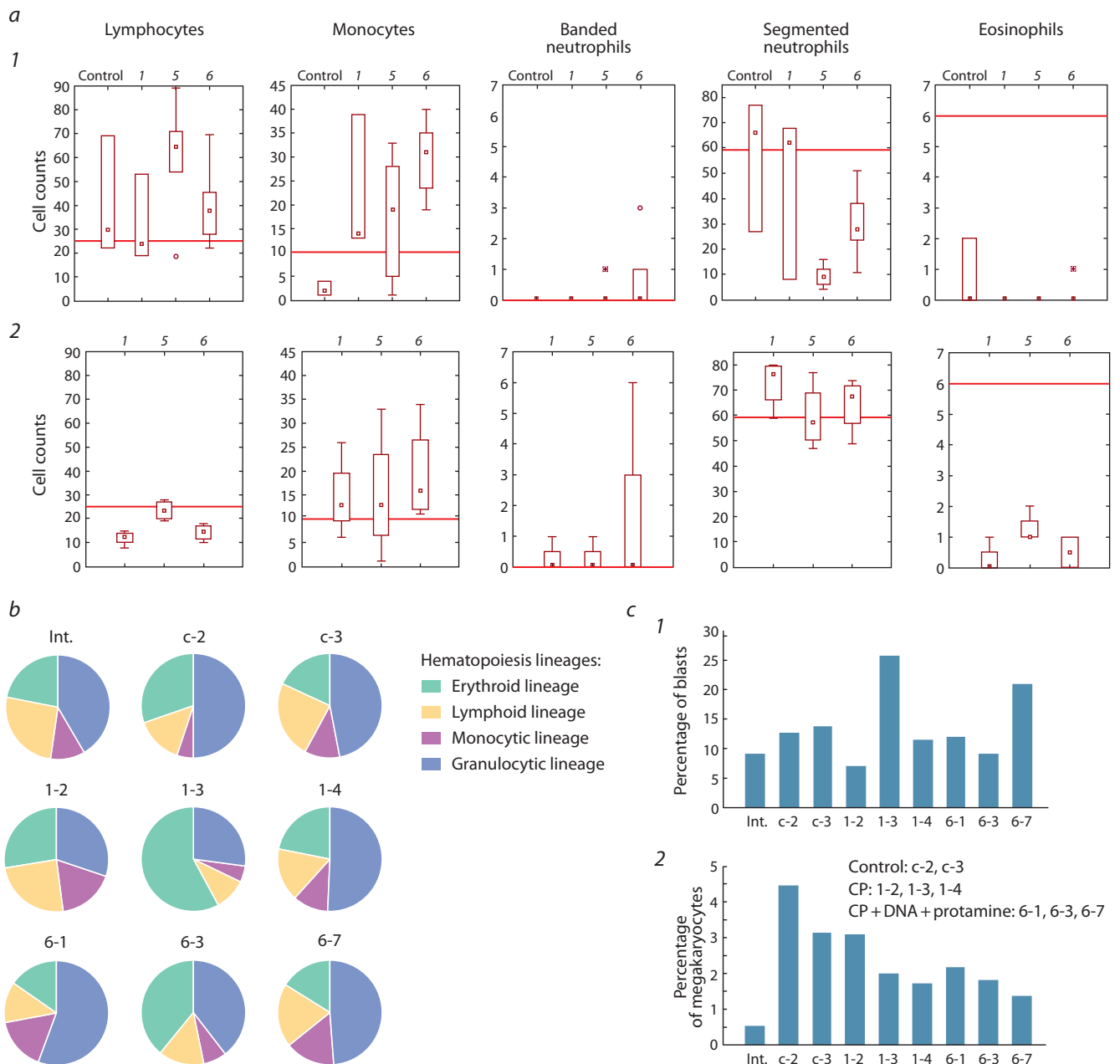


Fig. 6. Blood and bone marrow cell counts in control and treated mice.

(a) Blood cell composition in experimental animals (1) during ascites regression ($n = 4-8$) and (2) when the secondary ascites starts to grow ($n = 4$); red line denotes the value observed in intact animals. (b) Cell composition in the bone marrow from experimental animals, blood cell lineage ratio. (c) Fractions of (1) blast forms and (2) megakaryocytes in the bone marrow of individual mice from the experimental groups. Int, intact animal; c, control animal with a growing ascites ($n = 3$). Treatment: 1, "CP"; 5, "CP+DNA"; 6, "CP+DNA+protamine".

скую деградацию (Alyamkina et al., 2015; настоящее исследование, рис. 3, а, в). Раковые клетки вторичного асцита по размеру отличались от исходных в меньшую сторону (см. рис. 5, з) и обладали рядом морфологических особенностей. В группах «ЦФ», «ЦФ+ДНК», «ЦФ+ДНК+протамин» обнаруживались клетки с резко базофильной цитоплазмой (см. рис. 5, д1, жирная стрелка, д3), количество которых особенно велико в группах «ЦФ+ДНК» и «ЦФ+ДНК+протамин», и клетки с негранулированной цитоплазмой (см. рис. 5, д1, тонкая стрелка). Происхож-

дение этих клеток, вероятно, связано с отпочковыванием клеточного материала, содержащего цитоплазматические гранулы (см. рис. 5, д2).

Измерение площадей асцитных клеток приведено на рис. 5, з. В группе мышей, которым препараты не вводились, гистограмма, отображающая изменение площади клеток асцита, представляет собой равномерное распределение от величин $7 \cdot 10^3$ до $70 \cdot 10^3$ пикселей с небольшим подъемом в области значений от $15 \cdot 10^3$ до $33 \cdot 10^3$, пик приходится на размер площади $21 \cdot 10^3$ пикселей. Кривые

распределения площадей в группах «ЦФ», и особенно «ЦФ+ДНК» и «ЦФ+ДНК+протамин», имеют тенденцию к уменьшению ширины гистограммы и концентрированию значений в области $(15-19) \cdot 10^3$. При этом почти исчезают клетки большой площади (со значениями свыше $40 \cdot 10^3$ пикселей), а малые образуют дополнительный пик. Малые значения – это размеры, сравнимые с размерами форменных элементов крови – $(4-9) \cdot 10^3$ пикселей. Также у животных групп «ЦФ+ДНК» и «ЦФ+ДНК+протамин», а также группы «ЦФ» появляются в асцитной жидкости некоторые клеточные элементы, которых нет в контрольных группах, а именно – макрофаги и клетки с базофильной зернистостью, напоминающие тучные клетки (см. рис. 5, д).

При резорбции асцита уровень ЛДГ в асцитной жидкости был повышен в несколько раз по сравнению с контролем (см. рис. 5, а1). Анализ выполняли на 8-й день после первой инъекции ЦФ. При развитии вторичного асцита уровень ЛДГ не отличался от контрольного (см. рис. 5, а2).

Проведенная перевивка вторичного асцита в солидной форме свидетельствовала, что это полноценный опухолевый раковый трансплантат (см. рис. 5, в).

Анализ крови и анализ состояния клеток костного мозга был проведен у мышей с развитым вторичным асцитом или с развившимся патологическим симптомокомплексом ПОН (рис. 6). Показано, что в фазе регрессии асцита наблюдается ярко выраженная нейтропения в группе «ЦФ+ДНК» и нейтропения в группе «ЦФ+ДНК+протамин» (см. рис. 6, а1). Также для группы «ЦФ+ДНК» на стадии развития вторичного асцита характерен лимфоцитоз, что свидетельствует об идущем остром воспалительном процессе. Вторичный асцит у многих животных группы «ЦФ+ДНК» носил характер геморрагического экссудата, свойственного геморрагическому воспалению, когда вследствие генерализованного воспалительного процесса полностью нарушается механизм сосудистой проницаемости и эритроциты в массе выходят в интерстициальное пространство.

Характеристика клеточного состава костного мозга мышей в предсмертной фазе развития вторичной патологии приведена на рис. 6, б, в. Во всех экспериментальных группах (ЦФ, ЦФ+ДНК, ЦФ+ДНК+протамин) увеличено количество мегакариоцитов по сравнению с интактным контролем (см. рис. 6, в2). Для индивидуальных животных всех обследованных групп отмечается незначительное повышение бластных форм (см. рис. 6, в1).

В предыдущих статьях (Поттер и др., 2016а–в) и в работе (Potter et al., 2016) нами был проведен масштабный патоморфологический анализ, позволивший выдвинуть предположение, что гибель мышей с вторичным раком или без него обусловлена развитием системной воспалительной реакции (СВР) и ПОН вследствие проведенных обработок, что связано с масштабной деструкцией асцитных клеток и индукцией вторичного некроза. Некротическое разрушение сопровождается повышением уровня ЛДГ и появлением патоморфологических структур, характерных для воспалительного процесса. Формула крови и данные по клеточному составу костного мозга мышей также предполагают наличие у экспериментальных животных

воспалительного процесса, характерного для злокачественных новообразований или вирусных инфекций, когда часто наблюдаются и нейтропения, и лимфоцитоз. Развивающийся геморрагический вторичный асцит нередко свидетельствует о присутствии в асцитной жидкости большого числа эритроцитов. Эритроциты попадают в асцит пассивно, выталкиваясь из сосудов гидростатическим давлением через расширенные межклеточные щели. Подобная картина характерна для СВР при тяжелейших нарушениях микроциркуляции при таких инфекциях, как чума и сибирская язва. Совокупность результатов проведенных анализов находится в соответствии с патоморфологическими данными и предполагает присутствие у мышей генерализованного воспаления.

Заключение:

Концепция терапевтического регламента

Охарактеризован режим полного вылечивания 50 % экспериментальных животных от асцитной формы рака Кребс-2. Описаны контрольные точки приложения терапевтических обработок, базирующиеся на общебиологических свойствах СИРК Кребс-2, рассмотренных в настоящем цикле статей и в работах (Dolgova et al., 2014; Alyamkina et al., 2015). К таким свойствам относятся способность СИРК Кребс-2 интернализировать фрагменты дцДНК естественным механизмом интернализации (Dolgova et al., 2014) и способность фрагментов дцДНК, доставленных во внутриклеточное пространство СИРК при репарации МЦС, интерферировать процесс репарации таким образом, что СИРК или погибает, или лишается своего опухолевого статуса (Dolgova et al., 2014; Поттер и др., 2016а).

Базовые факторы терапии, необходимые для полного вылечивания мышей от асцитной формы рака Кребс-2

1. Повторяемость инъекций ЦФ. Первые три инъекции ЦФ, одна за другой, уменьшают количество TAMRA+СИРК, остающихся не подверженными воздействию ЦФ. Каждый раз при введении ЦФ через 36 ч после предыдущей инъекции новая обработка попадает на время, когда часть популяции интернализирующих TAMRA-меченую ДНК клеток, находившихся в G2-M-фазе клеточного цикла и нечувствительных к ЦФ, переходит в G1-S-фазу и становится чувствительной к обработке цитостатиком. Одновременно повторная обработка запирает уже обработанные асцитные клетки в той же поздней S-G2-M-фазе (настоящее исследование).
2. Для полной эрадикации асцита необходимо проводить дополнительную обработку цитостатиком ЦФ и препаратом дцДНК через 18 ч, в момент апоптотического разрушения коммитированных потомков раковых клеток Кребс-2 и синхронного входа СИРК Кребс-2 в G1-S после ареста в поздней S-G2-M-фазе клеточного цикла (8–12-е сутки после первой инъекции ЦФ) (настоящее исследование).
3. При добавлении в терапевтическую процедуру сложнопозиционного препарата дцДНК в точку демаркации NER и HR (18 ч после любой инъекции ЦФ) происходит интерференция процесса репарации МЦС. Композиция препарата дцДНК составлена таким образом, что одна

составляющая препарата интерферирует NER, а вторая – HR. Оба эффекта приводят к разрушению СИРК. В ходе трех обработок подавляющая часть популяции СИРК погибает, опухоль в значительной степени теряет туморогенное начало (Поттер и др., 2016в).

Дополнительные факторы

1. В схемах применения эффективного режима в обязательном порядке должна присутствовать антибиотиковая терапия на протяжении всего времени лечения, а также особая диета, используемая при лечении сепсиса (Peshkova et al., 2015).
2. Для купирования последствий масштабного одновременного разрушения асцитных раковых клеток необходимо проводить терапевтические процедуры при развитии асците, характеризующемся объемом 1/10 от веса тела мыши (1–2 мл), в котором содержится 200–300 млн асцитных раковых клеток (Поттер и др., 2016а).
3. Одноразовая доза вводимого препарата ДНК должна составлять 6 мг/мышь (Поттер и др., 2016в).

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0003 and the Russian Foundation for Basic Research, project 16-34-00191.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Alyamkina E.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Minkevich A.M., Kozel A.V., Dolgova E.V., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Andrushkevich O.M., Taranov O.S., Omigov V.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Vereschagin E.I., Kiseleva E.V., Zhukova M.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Combination of cyclophosphamide and double-stranded DNA demonstrates synergistic toxicity against established xenografts. *Cancer Cell Int.* 2015;15(32). DOI 10.1186/s12935-015-0180-6.
- Deleyrolle L.P., Ericksson G., Morrison B.J., Lopez J.A., Burrage K., Burrage P., Vescovi A., Rietze R.L., Reynolds B.A. Determination of somatic and cancer stem cell self-renewing symmetric division rate using sphere assays. *PLoS One.* 2011;6(1):e15844. DOI 10.1371/journal.pone.0015844.
- Dolgova E.V., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Tyrinova T.V., Kozel A.V., Minkevich A.M., Andrushkevich O.M., Zavyalov E.L., Romaschenko A.V., Bayborodin S.I., Taranov O.S., Omigov V.V., Shevela E.Y., Stupak V.V., Mishinov S.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Mayorov V.I., Shurdov M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Identification of cancer stem cells and a strategy for their elimination. *Cancer Biol. Ther.* 2014;15(10):1378-1394. DOI 10.4161/cbt.29854.
- Dolgova E.V., Likhacheva A.S., Orischenko K.E., Alyamkina E.A., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Repair of interstrand crosslinks in a DNA molecule. *Informatsionny vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders.* 2010;14(2):332-356. (in Russian)
- Dolgova E.V., Potter E.A., Proskurina A.S., Minkevich A.M., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Efremov Y.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. 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;7(1):76. DOI 10.1186/s13287-016-0338-8.
- Gómez-López S., Lerner R.G., Petritsch C. Asymmetric cell division of stem and progenitor cells during homeostasis and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014;71:575-597. DOI 10.1007/s00018-013-1386-1.
- Lathia J.D., Hitomi M., Gallagher J., Gadani S.P., Adkins J., Vasanji A., Liu L., Eyler C.E., Heddleston J.M., Wu Q., Minhas S., Soeda A., Hoepfner D.J., Ravin R., McKay R.D., McLendon R.E., Corbeil D., Chenn A., Hjelmeland A.B., Park D.M., Rich J.N. Distribution of CD133 reveals glioma stem cells self-renew through symmetric and asymmetric cell divisions. *Cell Death Disease.* 2011;2(9). DOI 10.1038/cddis.2011.80.
- Peshkova I.V., Bogachev S.S., Drobyazgin E.A., Chikinev Y.V., Mitrofanov I.M., Piontkovskaya K.A., Vereschagin E.I. Effect of glutamine on the nucleic acids exchange during the perioperative period in reconstructive esophagus surgery. *J. Nutr. Health Food.* 2015;2(4). DOI 10.15406/jnhfe.2015.02.00058.
- Pine S.R., Liu W. Asymmetric cell division and template DNA cosegregation in cancer stem cells. *Front Oncol.* 2014;4(226). DOI 10.3389/fonc.2014.00226.
- Potter E.A., Dolgova E.V., Minkevich A.M., Efremov Y.R., Taranov O.S., Omigov V.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Vereschagin E.I., Kozel A.V., Rogachev V.A., Petrov D.B., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Therapeutic effects of cyclophosphamide, dsDNA preparations and their combinations against Krebs-2 ascites cancer cells and various cancer transplants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2016a;20(1):96-107. DOI 10.18699/VJ15.116. (in Russian)
- Potter E.A., Dolgova E.V., Minkevich A.M., Nikolin V.P., Popova N.A., Efremov Y.R., Baiborodin S.I., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Kozel A.V., Taranov O.S., Omigov V.V., Vereschagin E.I., Petrov D.B., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Analysis of different therapeutic schemes combining cyclophosphamide and double-stranded DNA preparations for eradication of Krebs-2 primary ascites in mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2016b;20(1):108-124. DOI 10.18699/VJ15.117. (in Russian)
- Potter E.A., Dolgova E.V., Minkevich A.M., Nikolin V.P., Popova N.A., Efremov Y.R., Baiborodin S.I., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Kozel A.V., Taranov O.S., Omigov V.V., Vereschagin E.I., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Eradication of Krebs-2 primary ascites via a single-injection regimen of double-stranded DNA after each cyclophosphamide injection. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2016c;20(5):716-722. DOI 10.18699/VJ16.161. (in Russian)
- Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Minkevich A.M., Efremov Y.R., Taranov O.S., Omigov V.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Bayborodin S.I., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Shurdov M.A., Bogachev S.S. A strategy to eradicate well-developed Krebs-2 ascites in mice. *Oncotarget.* 2016;7(10):11580-11594. DOI 10.18632/oncotarget.7311.