

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

ДОЛГОВА ЕВГЕНИЯ ВЛАДИМИРОВНА

**ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ ДВУЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК НИЗКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМИ
КЛЕТКАМИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭТОГО СВОЙСТВА
ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ**

1.5.22. Клеточная биология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант
д.б.н. Богачев Сергей Станиславович

Новосибирск – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	9
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	27
1.1. Происхождение и организация опухоли: клеточный и молекулярный аспекты	27
1.1.1. Основные характеристики и свойства опухолевой клетки и опухоли как ткани.....	30
1.1.1.1. Поддержание пролиферативного потенциала.....	30
1.1.1.2. Избегание супрессии клеточного деления	31
1.1.1.3. Репликативное бессмертие.....	32
1.1.1.4. Устойчивость к апоптозу	33
1.1.1.5. Инвазия и метастазирование.....	34
1.1.1.6. Ангиогенез.....	35
1.1.2. Иерархическая система организации опухоли.....	36
1.2. Опухолевые стволовые клетки	39
1.2.1. Опухолевые стволовые клетки как организующие единицы на вершине иерархической структуры опухоли.....	39
1.2.2. Молекулярные маркеры опухолевых стволовых клеток	39
1.2.3. Основные характеристики опухолевых стволовых клеток и определяющие их молекулярные сигнальные пути	43
1.2.3.1. Поддержание низкодифференцированного состояния	43
1.2.3.2. Асимметричное/симметричное деление.....	46
1.2.3.3. Эпителиально-мезенхимальный переход, аноикс, метастазирование.....	50
1.2.3.4. Эффлюкс и детоксикация лекарственных средств, химио-/радиоустойчивость.....	60
1.2.3.5. Эффект Варбурга	61
1.2.4. Свойства опухолевых стволовых клеток – заключение.....	63
1.3. Экстраклеточная двуцепочечная ДНК.....	65
1.3.1. Источники свободной экстраклеточной ДНК в организме	65
1.3.2. Механизмы интернализации нуклеиновых кислот.....	66
1.3.3. Функциональная значимость экстраклеточной ДНК в организме.....	73

1.4.	Современные подходы лечения онкологических заболеваний	75
1.4.1.	ДК-вакцины	76
1.4.2.	CAR T-клетки	76
1.4.3.	NK-клетки	77
1.4.4.	Онколитические вирусы	78
1.4.5.	Метронормальная малодозовая химиотерапия циклофосфамидом	78
1.5.	Опухолевая стволовая клетка как мишень в противоопухолевой терапии	80
1.5.1.	Известные техники таргетного воздействия на опухолевые стволовые клетки	80
1.6.	Заключение	83
1.7.	Краткая историческая ремарка к настоящему исследованию	84
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ		88
2.1.	Материалы и оборудование	88
2.2.	Экспериментальные животные	90
2.3.	Опухолевые модели	91
2.3.1.	Карцинома мышцы Кребс-2	91
2.3.2.	Устойчивая к действию циклофосфамида лимфосаркома мышцей	91
2.3.3.	Карцинома мышцы Льюис	91
2.3.4.	Гепатокарцинома мышцей Г-29	92
2.3.5.	Глиобластома человека U87	92
2.3.6.	В-лимфома человека, индуцированная вирусом Эпштейна-Барр	92
2.3.6.1.	Пациент	92
2.3.6.2.	Получение культуры клеток	93
2.3.6.3.	Характеристика культуры клеток	93
2.4.	Эксперименты на модели клеток линии U87	94
2.4.1.	Хирургическое удаление ортотопического ксенотрансплантата	94
2.5.	Получение суммарной нативной ДНК человека	96
2.6.	Синтез TAMRA-ДНК зонда	96

2.7.	Введение TAMRA-5'-dUTP предшественника в образцы суммарной ДНК человека при помощи фрагмента Кленова.....	97
2.8.	Сложнокомпозиционный препарат двуцепочечной ДНК.....	97
2.9.	Выделение ДНК из клеток после обработки экстраклеточной двуцепочечной ДНК ...	97
2.10.	Выделение ДНК из ядер клеток костного мозга экспериментальных мышей.....	98
2.11.	Детекция и сортировка TAMRA+ клеток	98
2.12.	Анализ доставки радиоактивно-меченой экстраклеточной ДНК в клетки Кребс-2.....	99
2.13.	Определение заряда клеток.....	100
2.13.1.	Электрофорез в свободном объеме	100
2.13.2.	Обработка клеток катионным красителем Basic Blue 41	100
2.13.3.	Микрогелевый электрофорез	101
2.14.	Обработка клеток протеолитическими ферментами	101
2.15.	Обработка клеток ингибиторами эндоцитоза	101
2.16.	Анализ продолжительности репаративного цикла методом «комет»	101
2.17.	Определение цитокинового профиля TAMRA+ и TAMRA– клеток ВЭБ-индуцированной В-лимфомы.....	102
2.18.	RNAseq-анализ	102
2.19.	Поиск специфических сайтов связывания полианионов/гепарина/дцДНК в факторах клеточной мембраны TAMRA+ клеток.....	104
2.20.	Валидирующий qPCR.....	104
2.21.	Подсчет копий молекул экстраклеточной ДНК в клетках Кребс-2 методом qPCR	104
2.22.	Определение содержания ДНК В-клона в образцах ДНК сфер культуры В-лимфомы и ДНК ксенографта методом qPCR	105
2.23.	Выделение клеток асцита Кребс-2 на фиколл-верографиновом градиенте	106
2.24.	Гистологический анализ тканей и органов мышей	106
2.25.	Статистические методы.....	106
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....		107
3.1.	Гемопозитические стволовые клетки мышей интернализуют экстраклеточную ДНК	107
3.2.	Формирование основной идеи исследования.....	112

3.3. Опухолевые клетки, способные интернализировать экстраклеточные фрагменты ДНК, являются опухолевыми стволовыми клетками	113
3.3.1. Модель карциномы мышцы Кребс-2	113
3.3.1.1. Интернализация фрагментов экстраклеточной ДНК в клетки Кребс-2 как биологическое явление	113
3.3.1.2. Доказательство стволовой природы TAMRA+ клеток карциномы Кребс-2.....	120
3.3.1.3. Два пика интернализации экстраклеточной ДНК связаны с ограничениями, возникающими при делении клеток.....	123
3.3.1.4. Поиск генов-кандидатов, доказывающих стволовую природу TAMRA+ клеток Кребс-2, методом RNAseq	126
3.3.1.5. Верификация экспрессии генов-кандидатов методом qPCR.....	132
3.3.2. Модель индуцированной вирусом Эпштейна-Барр В-лимфомы человека	134
3.3.2.1. Характеристика полученной культуры.....	134
3.3.2.2. Интернализация фрагментов экстраклеточной дцДНК в клетки ВЭБ-индуцированной В-лимфомы как биологическое явление	139
3.3.2.3. Доказательство стволовой природы TAMRA+ клеток ВЭБ-индуцированной В-лимфомы	140
3.3.2.4. Поиск генов-кандидатов, доказывающих стволовую природу TAMRA+ клеток ВЭБ-индуцированной В-лимфомы, методом RNAseq. Верификация их экспрессии методом qPCR	155
3.3.3. Заключение по первым двум частям исследования.....	160
3.4. Механизм интернализации фрагментов экстраклеточной ДНК на моделях опухолевых клеток Кребс-2 и ВЭБ-индуцированной В-лимфомы.....	161
3.4.1. Первичное взаимодействие TAMRA-ДНК зонда с поверхностью клеток Кребс-2 и ВЭБ-индуцированной В-лимфомы.....	161
3.4.1.1. Определение заряда клеток карциномы Кребс-2 и В-лимфомы, с которыми взаимодействует TAMRA-ДНК зонд	162
3.4.1.2. Характеристика первичного взаимодействия фрагментов экстраклеточной ДНК с поверхностью клеток Кребс-2 и В-лимфомы	166

3.4.2. Молекулярная характеристика элементов клеточной мембраны TAMRA+ клеток Кребс-2 и В-лимфомы, определяющих взаимодействие с TAMRA-ДНК зондом.....	169
3.4.2.1. Влияние гепарина и протеаз на процесс связывания TAMRA-ДНК зонда с элементами мембраны клеток Кребс-2 и В-лимфомы.....	169
3.4.2.2. Динамика истинной интернализации TAMRA-ДНК зонда во внутриклеточные компартменты клеток Кребс-2 в случае пред- или постобработки протеиназой К	173
3.4.3. Определение механизма интернализации дцДНК зонда в клетки.....	176
3.4.3.1. Влияние блокирования некоторых путей эндоцитоза на процент TAMRA+ клеток Кребс-2 и В-лимфомы.....	178
3.4.3.2. Влияние блокирования некоторых путей эндоцитоза на интернализацию TAMRA-ДНК зонда во внутриклеточные компартменты клеток Кребс-2 и В-лимфомы.....	180
3.4.4. Анализ факторов, характеризующих молекулярный портрет ОСК, определенных на основании имеющихся литературных данных.....	184
3.4.4.1. Принцип организации мембранных факторов ОСК, опосредующих интернализацию экстраклеточных фрагментов ДНК	184
3.4.4.2. Определение групп-специфических генов, сверхэкспрессирующихся в TAMRA+ клетках Кребс-2 и В-лимфомы	187
3.4.4.3. Сравнение уровня экспрессии некоторых групп-специфических факторов в клетках Кребс-2 и В-лимфомы методом qPCR	189
3.5. Основные этапы создания и принципы терапевтического режима «Каранахан»	191
3.6. Этапы анализа опухолевых клеток для разработки схемы терапии согласно режиму «Каранахан».....	197
3.7. Применение нового терапевтического режима «Каранахан» на модельных опухолевых системах	200
3.7.1. Модель карциномы мыши Кребс-2	200
3.7.1.1. Модель карциномы мыши Кребс-2 в асцитной форме	200
3.7.1.2. Модель карциномы мыши Кребс-2 в солидной форме	207
3.7.2. Модель асцитной гепатокарциномы мыши Г-29	210
3.7.2.1. Интернализация TAMRA-ДНК зонда в клетки Г-29	210
3.7.2.2. Анализ репаративного цикла клеток Г-29	210

3.7.2.3. Анализ времени синхронизации клеток Г-29.....	212
3.7.2.4. Характеристика терапевтических режимов лечения гепатокарциномы мыши Г-29 ..	216
3.7.3. Модель асцитной лимфосаркомы RLS, устойчивой к действию циклофосфана	222
3.7.3.1. Интернализация TAMRA-ДНК зонда клетками RLS.....	222
3.7.3.2. Анализ продолжительности репаративного цикла клеток RLS	224
3.7.3.3. Анализ времени синхронизации клеток RLS после обработки цитостатиком в терапевтическом режиме.....	224
3.7.3.4. Характеристика эффективности лечения лимфосаркомы RLS согласно терапевтическому режиму «Каранахан».....	225
3.7.4. Модель карциномы мыши Льюис	231
3.7.4.1. Интернализация TAMRA-ДНК зонда клетками карциномы Льюис	231
3.7.4.2. Анализ репаративного цикла клеток карциномы Льюис	231
3.7.4.3. Определение времени синхронизации клеток карциномы Льюис.....	233
3.7.4.4. Оценка эффективности терапевтического режима «Каранахан» на модели карциномы Льюис	234
3.7.4.5. Влияние сезонных и годовых ритмов на эффективность терапевтического режима «Каранахан» на модели карциномы Льюис.....	239
3.7.5. Оценка эффективности терапевтического режима «Каранахан» на модели глиобластомы человека U87.....	242
3.7.5.1. Оценка туморогенности клеток глиобластомы U87 после терапевтического воздействия согласно режиму «Каранахан» in vitro	247
3.7.5.2. Оценка эффективности терапевтического режима «Каранахан» на модели подкожного ксенотрансплантата глиобластомы человека U87	248
3.7.5.3. Оценка эффективности терапевтического режима «Каранахан» на модели ортотопического ксенотрансплантата глиобластомы U87 в комбинации с хирургическим удалением.....	249
3.7.6. Заключение	253
3.8. Общее заключение к разделу результатов.....	254
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	256

4.1. Новое общебиологическое свойство ОСК – способность интернализировать фрагменты экстраклеточной дцДНК естественным природным механизмом	256
4.1.1. Опухолевая клетка, способная интернализировать TAMRA-ДНК зонд, является опухолевой стволовой клеткой.....	256
4.1.2. Три элемента, определяющие интернализацию TAMRA-ДНК зонда в клетку.....	258
4.1.3. Гликокаликс и его участие в процессе интернализации фрагментов дцДНК в ОСК .	260
4.1.4. Формирование общего положительного заряда клеточной мембраны ОСК.....	263
4.1.5. Предполагаемый механизм эндоцитоза дцДНК зонда.....	266
4.1.6. Принцип организации элементов гликокаликса на цитоплазматической мембране ОСК	267
4.1.7. Возможность неспецифического попадания экстраклеточной ДНК в клетку в результате нарушения структуры билипидного слоя цитоплазматической мембраны	269
4.2. Воздействие экстраклеточных фрагментов дцДНК на ОСК	272
4.2.1. Возможные механизмы интерференции процесса репарации МЦС экстраклеточными фрагментами дцДНК, интернализированными во внутриклеточное пространство ОСК	273
4.3. Терапевтический режим «Каранахан» как новый принцип лечения злокачественных новообразований	277
4.4. Отличия принципов таргетного воздействия на ОСК при использовании режима «Каранахан» от известных подходов	278
4.5. Терапевтический режим «Каранахан»: дополнительные характеристики и место среди подходов лечения злокачественных новообразований	279
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	282
ВЫВОДЫ.....	285
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	287
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	290
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	322
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	323
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	365
ПРИЛОЖЕНИЕ 4.....	368

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Онкологические заболевания занимают второе место по общей смертности после сердечно-сосудистых патологий. Статистические данные свидетельствуют о том, что частота возникновения различного рода злокачественных неоплазий ежегодно растет. Этому факту способствуют: увеличение продолжительности жизни населения, вредные привычки, плохое питание, неактивный образ жизни, повышение среднего возраста женщин, рожаящих первого ребенка.

В Российской Федерации на данный момент онкологические заболевания также стоят на втором месте среди причин смертности, на которые приходится 12 % всех случаев смертей. По статистике Международного агентства по изучению рака (специализированная структура ВОЗ – всемирной организации здравоохранения), в России в 2022 году выявлено 635 560 новых случаев онкологических заболеваний (интернет-ресурс <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/643-russian-federation-fact-sheet.pdf>). Неутешительна и мировая статистика – на 2022 год зарегистрировано 19 976 499 новых случаев заболевания раком и 9 743 832 онкологических пациентов скончались от этой болезни. По прогнозам ВОЗ рост числа онкологических заболеваний к 2030 году увеличится на 18–20 %.

В Российской Федерации ежегодно 150 тыс. онкологических больных становятся инвалидами. Из них около 30 % получают 1 группу инвалидности (полностью нетрудоспособные) и около 70 % получают 2 группу инвалидности (частично нетрудоспособные). При этом риск смерти от рака в России составляет порядка 60 %, в то время как в США и Великобритании – 33 % и 40 % соответственно (Масленникова, Стрекалова, 2016; Мерабишвили, 2013).

Помимо общего роста заболеваемости населения имеется тенденция к «омоложению рака». В настоящее время показатели онкологических заболеваний у детей повышаются на 1 % с каждым годом. Ожидаемое число новых случаев онкопатологии у детей и подростков (0–19 лет) составляет порядка 429 тыс. (Lam et al., 2019). В России ежегодно регистрируется 3.1 тыс. детей (в возрасте до 17 лет) со злокачественными новообразованиями, при чем 46.6 % из них составляют опухоли в лимфатических тканях и системе кроветворения, а 17.3 % – опухоли центральной нервной системы (Масленникова, Стрекалова, 2016).

Основными составляющими, необходимыми для снижения смертности от онкологических заболеваний, являются как ранний диагноз и начало лечения, так и разработка новых терапевтических подходов.

Общепринятой терапией вне зависимости от происхождения злокачественного новообразования является использование различных схем циторедукующего воздействия. В случае солидных опухолей применяют хирургическое удаление опухолевого очага с последующим продолжением химиотерапии. Широко используются облучение и терапия гормонами в случае гормонозависимых опухолей.

В последние годы в связи с углублением представлений о механизмах противоопухолевого иммунного ответа организма активное развитие получили разработки противораковых вакцин различного происхождения. К клеточным методам иммунотерапии, или адоптивной терапии, относятся: дендритноклеточные вакцины, вакцины на основе натуральных киллеров (natural killer, NK) и трансгенных опухоль-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов, содержащих химерный антигенный рецептор (Chimeric Antigen Receptor, CAR) (Fang, Xiao, Tian, 2017; Pettitt et al., 2018; Saxena, Bhardwaj, 2018; Волков, 2016).

Еще одним перспективным методом лечения опухолей являются онколитические вирусы, специфически реплицирующиеся в раковых клетках. Показано, что онколитические вирусы способствуют иммуногенной гибели опухолевых клеток, что в свою очередь ведет к развитию противоопухолевого иммунного ответа (Tsun et al., 2016). Широкое применение для лечения онкологических заболеваний получила иммунотерапия с использованием антител, включая Ab2-вакцины и так называемые конъюгаты антитело-лекарство (Antibody-Drug Conjugate, ADC) (Moek et al., 2017; Scheinberg et al., 2005; Моисеенко, 2003). Близкими по своему функциональному действию к антителам являются аптамеры. Аптамеры представляют собой искусственные одноцепочечные короткие последовательности ДНК или РНК (иногда пептиды), которые благодаря своей вторичной и третичной структуре способны с высокой специфичностью связываться с мишенями (антигенами) на опухолевых клетках, повторяя воздействие антител (Ireson, Kelland, 2006). Также следует упомянуть об адьювантах – соединениях, обладающих способностью стимулировать иммунный ответ (Семакова, Микшис, 2016). К адьювантам, проходящим клинические исследования, относятся такие как CpG-олигонуклеотиды, MPL (монофосфорилированный липид), TMX-101 (имиквимод), Панаген (Bode et al., 2011; Proskurina et al., 2016; Temizoz, Kuroda, Ishii, 2016).

Перечисленные методы лечения могут применяться как независимо, так и в сочетании друг с другом. Если их применение имеет положительные результаты, заболевание переходит

в стадию ремиссии, тем не менее, угроза рецидива всегда существует. Как следует из огромной клинической практики, несмотря на постоянно совершенствующиеся методы лечения, угроза рецидивов в ближайшие 5 лет при различных типах терапии достигает 30–50 %.

В последнее время все более актуальной становится теория гетерогенного строения опухоли, заключающаяся в наличии опухолевых стволовых клеток (ОСК) в опухолевом «сообществе» (Clarke et al., 2006). Считается, что именно ОСК несут ответственность за устойчивость неоплазии к химиотерапии, метастазирование и возникновение рецидивов (Rysaj, Tang, 2014). Это предполагает, что высокий процент рецидивов, возникающих после лечения онкологических заболеваний, связан с невозможностью удалить всю совокупность ОСК, которые благодаря наличию набора особенных свойств легко ускользают как от различных видов терапии, так и от разрушающего действия иммунной системы организма (Gilbert, Ross, 2011a).

Еще одной проблемой является отсутствие универсального маркера ОСК. Показано, что ОСК опухолей различных нозологий обладают как различными поверхностными маркерами, так и отличающейся системой активированных сигнальных путей. Это создает трудности в создании универсальных терапевтических подходов. Таргетная терапия предполагает подбор условий для индивидуального типа опухоли с учетом имеющихся у ОСК этого типа отличительных признаков. Именно поэтому изучение свойств ОСК, разработка новых методов их детекции, а также создание новых терапевтических подходов, в основе которых лежит таргетное воздействие на ОСК, являются приоритетными задачами для прорыва в лечении онкологических заболеваний.

В лечении онкологических заболеваний появилось новое направление – молекулярная терапия опухолей с использованием нуклеиновых кислот, основной идеей которой является регуляция экспрессии генов. В ней широко используются антисмысловые олигонуклеотиды, малые интерферирующие РНК (Watts, Corey, 2012). Неожиданно эффективным оказался применение коротких синтетических двуцепочечных олигонуклеотидов (малые интерферирующие ДНК), которые своими двуцепочечными концами конкурируют за связывание с ферментами репарации, тем самым нарушая ход репарации двуцепочечных разрывов (ДЦР) хроматина клетки (Berthault et al., 2022). Во всех перечисленных подходах применяются способы искусственной доставки экстраклеточного материала нуклеиновых кислот в клетку (с помощью трансфецирующих агентов, вирусных конструкций или модификаций молекулы ДНК).

Тем не менее возможность интернализации экстраклеточной ДНК в клетки разного типа (лимфоциты, моноциты, нейтрофилы и др.) естественным путем была показана в

предшествующих исследованиях (Bennett, 1993; Hefeneider et al., 1990; Schubbert et al., 1997). В данном случае под термином **интернализация** подразумевается попадание во внутриклеточные компартменты без обозначения механизма процесса. При всей очевидной фундаментальной и прикладной значимости исследований в этой области ни раньше, ни сейчас не было сформировано представления ни о количестве клеток в анализируемых популяциях, обладающих свойством интернализации экстраклеточной ДНК естественным путем, ни об особенностях их строения. Кроме того, многолетние исследования не выявили специфических поверхностных белков, которые бы однозначно участвовали в акте интернализации нуклеиновых кислот (Yakubov et al., 1989; Челобанов, Лактионов, Власов, 2006). Поскольку не было сформировано целостного представления о механизме интернализации экстраклеточных нуклеиновых кислот в клетки, в настоящее время активность исследований в данном направлении существенно снизилась.

Ранее в лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН было показано, что экстраклеточная двуцепочечная ДНК (дцДНК) способна попадать во внутриклеточное пространство определенной популяции клеток костного мозга (ККМ) мышей как при *in vivo* введении препарата дцДНК в организм экспериментальных животных, так и при *ex vivo* культивировании ККМ с фрагментами экстраклеточной ДНК. Также было показано, что фрагменты дцДНК, интернализирующиеся в ККМ мышей на фоне процесса репарации ДЦР, вызванных действием кросслинквирующих цитостатиков, интерферировали указанный процесс (Dolgova et al., 2012a, b).

В настоящей работе термин **«кросслинквирующие цитостатики»** используется для обозначения противоопухолевых препаратов, которые создают прочные химические связи («мостики»), называемые межцепочечными сшивками (МЦС), между нитями ДНК или внутри одной нити. ДЦР ДНК являются основными интермедиатами, возникающими в процессе репарации МЦС, и являются наиболее губительными повреждениями для клетки, которые в обязательном порядке должны быть устранены. Под термином **интерференция** понимается вовлечение в репаративный процесс и отклонение от его канонического (стандартного) течения.

В ККМ мышей интерференция проявлялась таким образом, что клетки не могли корректно завершить процесс репарации, в результате чего погибали путем апоптоза. Это приводило к исчезновению белого ростка кроветворения из костного мозга, инволюции иммунных органов, активации оппортунистической инфекции организма, развития системного воспаления и дальнейшей гибели экспериментальных животных (Dolgova et al., 2012a). С большой долей вероятности это могло означать, что ККМ, которые интернализуют

экстраклеточную ДНК и в которых наблюдается интерференция репаративного процесса, представлены популяцией гемопоэтических стволовых клеток (ГСК).

Известно, что ОСК по многим характеристикам и клеточным функциям схожи с нормальными стволовыми клетками, в том числе ГСК (Gilbert, Ross, 2009). Возможность таргетного воздействия кросслинкующего цитостатика и фрагментов экстраклеточной дцДНК, интернализованных в клетку на стадии репарации, подразумевала, что если ОСК, подобно ККМ, обладают способностью интернализировать фрагменты экстраклеточной дцДНК, то можно будет подобрать режим обработки двумя препаратами, таргетно воздействующий на ОСК.

Цель исследования: характеристика явления естественной интернализации фрагментов экстраклеточной двуцепочечной ДНК низкодифференцированными клетками, в первую очередь опухолевыми стволовыми клетками, и поиск режима воздействия на экспериментальные опухоли, в основе которого лежит указанное свойство.

Задачи исследования

В ходе исследования были поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать способность низкодифференцированных гемопоэтических клеток мышей, опухолевых клеток карциномы мыши Кребс-2 и индуцированной вирусом Эпштейна-Барр В-лимфомы человека интернализировать экстраклеточные фрагменты двуцепочечной ДНК естественным природным механизмом. Дать качественную и количественную характеристики указанному процессу.
2. На моделях карциномы Кребс-2 и индуцированной вирусом Эпштейна-Барр В-лимфомы оценить клоногенные и туморогенные свойства клеток, способных интернализировать фрагменты двуцепочечной ДНК (TAMRA-ДНК зонд) естественным природным механизмом.
3. В клетках, интернализирующих двуцепочечный TAMRA-ДНК зонд, провести анализ экспрессии генов сигнальных путей, отвечающих за основные характеристики опухолевых стволовых клеток. На первом этапе провести отбор генов-кандидатов методом RNAseq, на втором – валидировать достоверность дифференциальной экспрессии выбранных генов-кандидатов методом qPCR.
4. Для карциномы Кребс-2 и индуцированной вирусом Эпштейна-Барр В-лимфомы определить механизм интернализации экстраклеточных фрагментов двуцепочечной ДНК клеткой, происходящей естественным путем. Оценить, существуют ли особенности строения клеточной мембраны (гликокаликса) опухолевых клеток, способных захватывать экстраклеточную ДНК, благодаря которым они обладают указанным свойством.

5. Оценить эффекты одиночного и комбинированного воздействия кросслинkerующих цитостатиков и препарата на основе двуцепочечной ДНК на опухолевые клетки Кребс-2. Провести анализ, характеризующий связь эффективности воздействия с удалением из опухолевого очага клеток, способных интернализировать экстраклеточные фрагменты ДНК. Определить наиболее эффективный режим воздействия на модельную опухоль.

6. Оценить эффективность выбранного режима в отношении развития опухоли в экспериментах *in vivo* на моделях карциномы Кребс-2 (солидной и асцитной), гепатомы Г-29, карциномы Льюис, лимфосаркомы RLS, а также на модели ортотопического ксенотрансплантата клеток линии глиобластомы человека U87.

Научная новизна работы

В работе впервые продемонстрировано новое уникальное свойство ОСК, как прототипа низкодифференцированных клеток млекопитающих, интернализировать фрагменты экстраклеточной дцДНК естественным природным механизмом без использования трансфецирующих факторов. Определено, что клетки, обладающие указанным свойством, имеют особенности строения клеточной мембраны (гликокаликса), позволяющие им на первом этапе электростатически, на втором – путем формирования прочных ковалентных/химических контактов связываться с фрагментами экстраклеточной дцДНК и далее интернализировать эти фрагменты внутрь клетки механизмами клатрин- и/или кавеолин-зависимого эндоцитоза и макропиноцитоза. Впервые показано, что ОСК имеют общий положительный заряд клеточной мембраны, что отличает их от коммитированных опухолевых клеток. Для определения заряда клеточной поверхности ОСК впервые применен метод электрофоретического разделения в свободном объеме, который был экспериментально доработан и адаптирован к используемой в работе системе.

Определена одна из важнейших особенностей строения гликокаликса ОСК – обязательное присутствие в его составе факторов клеточной мембраны, принадлежащих к трем функциональным группам: протеогликанам/гликопротеинам, скавенджер-рецепторам и гликозилфосфатидилинозитол-заякоренным белкам, которые несут в своем составе положительно заряженные сайты связывания гепарина/полианионов/молекул дцДНК. Сформировано новое представление о том, что на клеточной поверхности разных типов ОСК присутствуют различные представители указанных трех групп факторов, тем не менее обеспечивающих одинаковое свойство – интернализацию экстраклеточных фрагментов дцДНК. Это означает, что свойство интернализации экстраклеточных фрагментов, может

представлять собой универсальную диагностическую характеристику ОСК. В этой связи использованный в работе флуоресцентно-меченый дцДНК фрагмент (TAMRA-ДНК зонд) может являться универсальным индикатором ОСК различных нозологий, благодаря чему стало возможным детектировать ОСК в общей массе опухолевых клеток.

На основе указанного свойства интернализации экстраклеточной дцДНК опухолевыми стволовыми клетками впервые был разработан режим воздействия на злокачественные новообразования, получивший название «Каранахан» («убивающий причину», санскрит). Режим воздействия «Каранахан» включает в себя трехкратные малодозовые хронометрические обработки клеток опухоли кросслинквирующим цитостатиком (циклофосфамид, митомицин С), зависящие от продолжительности цикла репарации ДЦР клеток конкретной опухоли, и введение сложнокомпозиционного препарата дцДНК в точку демаркации двух этапов репарации: эксцизионной репарации нуклеотидов (NER, nucleotide excision repair) и гомологичной рекомбинации (HR, homologous recombination). Препарат ДНК-микс состоит из трех составных частей: нативной ДНК человека, нативной и модифицированной ДНК спермы лосося в соотношении 7:5:2 (или 50 %, 36 % и 14 %). При этом первая часть препарата ДНК-микс интерферирует процесс NER, а оставшиеся – HR. Также частью режима является четвертая (финальная) обработка указанными препаратами в день синхронизации ОСК в чувствительной для воздействия фрагментов дцДНК фазе клеточного цикла (G1), приводящая к удалению ОСК из опухолевого очага и, как следствие, излечению экспериментальных животных от перевитых опухолей.

Новым, ранее неизвестным является способ синхронизации ОСК в чувствительной для терапии фазе клеточного цикла.

Уникальной особенностью режима «Каранахан» является сочетание разрушения проопухолевой активности опухолевого микроокружения и опухоль-реактивной активации клеток врожденного и адаптивного иммунитета.

Таргетная эрадикация ОСК, разрушение супрессивного действия клеток опухоль-ассоциированной стромы и активация противопухолевого иммунитета организма создают условия для необратимой резорбции развитой опухоли и полной ремиссии у экспериментальных животных.

Таким образом, в настоящем исследовании открыто новое, ранее неизвестное свойство ОСК интернализировать экстраклеточную дцДНК, описан механизм указанного явления. На основе этого свойства разработан новый режим воздействия на злокачественные новообразования, основанный на комплексном влиянии на ОСК, клетки опухолевой стромы и

иммунную систему организма, что в сумме позволяет вылечить экспериментальных животных от злокачественных неоплазий как в асцитном, так и в солидном вариантах.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в описании нового биологического свойства ОСК – способности интернализировать естественным природным механизмом фрагменты экстраклеточной дцДНК. ОСК располагаются на вершине иерархической организации опухоли, и именно эти клетки ответственны за рост, агрессивное развитие, химио-/радиорезистентность, инвазию и метастазирование, а также возникновение рецидивов заболевания (Clarke et al., 2006; Gilbert, Ross, 2011b; O'Brien, Kreso, Jamieson, 2010). Понимание биологии и особенностей строения ОСК, отличающих указанный тип клеток от общей массы коммитированных клеток опухоли и придающих им особые свойства, делающие клетку практически «неубиваемой», является приоритетной задачей современной клеточной биологии и медицинской практики.

Обнаруженное в настоящей работе свойство интернализации ОСК экстраклеточных фрагментов дцДНК и использование в этой связи TAMRA-ДНК зонда, маркирующего низкодифференцированные опухолевые клетки, имеет многогранную практическую значимость. Указанный ДНК зонд (или любой аналогичный по принципу зонд дцДНК) может являться универсальным индикатором для детекции ОСК различных типов опухолей. Анализ содержания TAMRA-позитивных ОСК в биопсийных образцах позволяет определить стадию прогрессии опухоли (как это было сделано в работе (Dolgova et al., 2018) на примере опухолей головного мозга). Анализ изменения количества ОСК в процессе лечения в опухоли и окружающих ее тканях дает возможность в моменте определить эффективность используемой терапии для конкретного пациента.

Безусловной практической значимостью настоящей работы является разработка нового режима воздействия на злокачественные новообразования «Каранахан». Режим основан на таргетной эрадикации ОСК и протестирован на нескольких различных моделях опухолей мышей и модели глиобластомы человека U87.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Низкодифференцированные клетки млекопитающих, включая гемопоэтические стволовые клетки мыши, опухолевые стволовые клетки карциномы мыши Кребс-2 и индуцированной вирусом Эпштейна-Барр В-лимфомы человека, обладают природной

способностью интернализировать экстраклеточные фрагменты двуцепочечной ДНК без привлечения факторов трансфекции.

2. Возможность интернализации экстраклеточной ДНК опухолевыми стволовыми клетками обусловлена особенностями организации белков их клеточной мембраны, содержащих в своей структуре положительно заряженные сайты связывания гепарина и полианионов, через которые обеспечивается первичное связывание фрагментов ДНК и последующее поглощение механизмами кавеолин- и/или клатрин-зависимого эндоцитоза и макропиноцитоза.

3. Сформулирован принцип организации белков клеточной поверхности опухолевых стволовых клеток. Установлено, что для опухолевых стволовых клеток Кребс-2 и индуцированной вирусом Эпштейна-Барр В-лимфомы белки, участвующие в интернализации ДНК, представлены тремя функциональными группами: гликопротеинами/протеогликанами, скавенджер-рецепторами и гликозилфосфатидилинозитол-заякоренными белками. Конкретный белковый состав внутри этих групп различается у опухолевых стволовых клеток разных опухолей, формируя их уникальный поверхностный портрет.

4. Интернализация двуцепочечной ДНК является избирательным процессом, характерным для опухолевых стволовых клеток, что позволяет использовать данное свойство для эрадикации указанных клеток из очага опухолевого роста при сочетании с воздействием кросслинкующего цитостатика. На основании этого свойства разработан новый противоопухолевый режим воздействия «Каранахан».

Апробация работы

Материалы диссертации докладывались автором на симпозиуме «Новейшие методы клеточных технологий в медицине» 2–6 сентября 2014 года, Новосибирск; на XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А.Ю. Барышникова 17–18 марта 2016 года, Москва; на Международном конгрессе «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» 18–22 июня 2019 года, Санкт-Петербург; на 13-й Международной Мультиконференции BGSR/SB 4–8 июля 2022 года, Новосибирск.

Также по тематике диссертации опубликовано шесть патентов на изобретение:

1. Патент № 2530170 от 12.08.2014 (заявка № 2013113328/10 от 27.03.2013). Способ детекции стволовых раковых клеток. **Долгова Е.В.**, Алямкина Е.А., Рогачев В.А., Николин

В.П., Попова Н.А., Проскурина А.С., Минкевич А.М., Байбородин С.И., Андрушкевич О.М., Ефремов Я.Р., Черных Е.Р., Останин А.А., Сидоров С.В., Богачев С.С., Шурдов М.А.

2. Патент № 2542410 от 21.01.2015 (заявка № 2013143563 от 27.09.2013). Способ эрадикации стволовых инициирующих раковых клеток. **Долгова Е.В.**, Алямкина Е.А., Рогачев В.А., Николин В.П., Попова Н.А., Проскурина А.С., Минкевич А.М., Байбородин С.И., Андрушкевич О.М., Козел А.В., Ефремов Я.Р., Таранов О.С., Омигов В.В., Черных Е.Р., Останин А.А., Сидоров С.В., Богачев С.С.

3. Патент № 2595864 от 04.08.2016 (заявка № 2015134532 от 18.08.2015). Способ лечения асцитной формы рака. **Долгова Е.В.**, Алямкина Е.А., Рогачев В.А., Николин В.П., Попова Н.А., Проскурина А.С., Минкевич А.М., Байбородин С.И., Андрушкевич М.М., Козел А.В., Ефремов Я.Р., Таранов О.С., Омигов В.В., Черных Е.Р., Останин А.А., Сидоров С.В., Богачев С.С.

4. Патент № 2662354 от 25.07.2018 (заявка № 2017132869 от 20.09.2017). Способ лечения онкологических заболеваний. Богачев С.С., **Долгова Е.В.**, Поттер Е.А., Проскурина А.С., Риттер Г.С., Николин В.П., Попова Н.А., Ефремов Я.Р., Байбородин С.И., Таранов О.С., Останин А.А., Черных Е.Р.

5. Патент № 2675233 от 18.12.2018 (заявка № 2018104722 от 07.02.2018). Способ лечения онкологических заболеваний. Богачев С.С., Проскурина А.С., **Долгова Е.В.**, Поттер Е.А., Николин В.П., Попова Н.А., Ефремов Я.Р., Байбородин С.И., Таранов О.С., Останин А.А., Черных Е.Р.

6. Патент № 2717218 от 18.03.2020 (заявка № 2019125001 от 07.08.2019). Способ торможения роста подкожного трансплантата экспериментальной глиобластомы человека U-87, перевитого иммунодефицитным мышам Nu/J. Богачев С.С., Кирикович С.С., Левитес Е.В., **Долгова Е.В.**, Проскурина А.С., Поттер Е.А., Риттер Г.С., Кисаретова П.Э., Байбородин С.И., Ефремов Я.Р., Таранов О.С., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р.

С использованием режима воздействия «Каранахан» было проведено пилотное клиническое исследование персонифицированной химиотерапии рака молочной железы малыми дозами циклофосфана с учетом репаративного цикла опухолевых клеток (Протокол № 7 заседания Ученого совета ФГБНУ «Научно-исследовательского института фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ) от 15 октября 2019 года, протокол № 120 заседания локального этического комитета при НИИФКИ от 7 ноября 2019 года).

По результатам настоящей работы в 2020 году автору с коллегами (Проскурина А.С., Поттер Е.А.) была присуждена премия Президента Российской Федерации в области науки и

инноваций за формирование новой идеологии в лечении пациентов со злокачественными опухолями, основанной на скоординированном по времени действию инновационных препаратов нуклеиновых кислот и кросслинкующих цитостатиков.

Публикации

Всего автором по теме диссертации опубликовано 42 статьи, из которых 41 входит в базы данных Web of Science и/или Scopus:

1. **Dolgova EV**, Efremov YR, Orishchenko KE, Andrushkevich OM, Alyamkina EA, Proskurina AS, Bayborodin SI, Nikolin VP, Popova NA, Chernykh ER, Ostanin AA, Taranov OS, Omigov VV, Minkevich AM, Rogachev VA, Bogachev SS, Shurdov MA. Delivery and processing of exogenous double-stranded DNA in mouse CD34+ hematopoietic progenitor cells and their cell cycle changes upon combined treatment with cyclophosphamide and double-stranded DNA. *Gene*. 2013; 528(2): 74-83.

2. **Долгова Е.В.**, Николин В.П., Попова Н.А., Проскурина А.С., Орищенко К.Е., Алямкина Е.А., Ефремов Я.Р., Байборodin С.И., Черных Е.Р., Останин А.А., Богачев С.С., Гвоздева Т.С., Малкова Е.М., Таранов О.С., Рогачев В.А., Панов А.В., Загребельный С.Н., Шурдов М.А. Патологические изменения, возникающие в организме мышей, обработанных сочетанием циклофосфана и экзогенной ДНК. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013; Т. 17(1): 129-146.

3. **Долгова Е.В.**, Прокопенко А.В., Николин В.П., Попова Н.А., Проскурина А.С., Орищенко К.Е., Алямкина Е.А., Ефремов Я.Р., Черных Е.Р., Останин А.А., Богачев С.С., Гвоздева Т.С., Малкова Е.М., Таранов О.С., Рогачев В.А., Панов А.В., Загребельный С.Н., Шурдов М.А. 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; 17(2): 246-264.

4. **Dolgova EV**, Alyamkina EA, Efremov YR, Nikolin VP, Popova NA, Tyrinova TV, Kozel AV, Minkevich AM, Andrushkevich OM, Zavyalov EL, Romaschenko AV, Bayborodin SI, Taranov OS, Omigov VV, Shevela EY, Stupak VV, Mishinov SV, Rogachev VA, Proskurina AS, Mayorov VI, Shurdov MA, Ostanin AA, Chernykh ER, Bogachev SS. Identification of cancer stem cells and a strategy for their elimination. *Cancer Biol Ther*. 2014; 15(10): 1378-94.

5. Alyamkina EA, Nikolin VP, Popova NA, Minkevich AM, Kozel AV, **Dolgova EV**, Efremov YR, Bayborodin SI, Andrushkevich OM, Taranov OS, Omigov VV, Rogachev VA, Proskurina AS, Vereschagin EI, Kiseleva EV, Zhukova MV, Ostanin AA, Chernykh ER, Bogachev

SS, Shurdov MA. Combination of cyclophosphamide and double-stranded DNA demonstrates synergistic toxicity against established xenografts. *Cancer Cell Int.* 2015; 15: 32.

6. Proskurina AS, Gvozdeva TS, Alyamkina EA, **Dolgova EV**, Orishchenko KE, Nikolin VP, Popova NA, Sidorov SV, Chernykh ER, Ostanin AA, Leplina OY, Dvornichenko VV, Ponomarenko DM, Soldatova GS, Varaksin NA, Ryabicheva TG, Uchakin PN, Zagrebelniy SN, Rogachev VA, Bogachev SS, Shurdov MA. Results of multicenter double-blind placebo-controlled phase II clinical trial of Panagen preparation to evaluate its leukostimulatory activity and formation of the adaptive immune response in patients with stage II-IV breast cancer. *BMC Cancer.* 2015; 15(1): 122.

7. **Dolgova EV**, Efremov YR, Taranov OS, Potter EA, Nikolin VP, Popova NA, Omigov VV, Chernykh ER, Proskurina AS, Bogachev SS. 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; 211(10): 754-8.

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

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

10. **Dolgova EV**, Potter EA, Proskurina AS, Minkevich AM, Chernych ER, Ostanin AA, Efremov YR, Bayborodin SI, Nikolin VP, Popova NA, Kolchanov NA, Bogachev SS. 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.

11. Proskurina AS, Gvozdeva TS, Potter EA, **Dolgova EV**, Orishchenko KE, Nikolin VP, Popova NA, Sidorov SV, Chernykh ER, Ostanin AA, Leplina OY, Dvornichenko VV, Ponomarenko DM, Soldatova GS, Varaksin NA, Ryabicheva TG, Uchakin PN, Rogachev VA, Shurdov MA, Bogachev SS. Five-year disease-free survival among stage II-IV breast cancer patients receiving FAC and AC chemotherapy in phase II clinical trials of Panagen. *BMC Cancer.* 2016; 16: 651.

12. **Dolgova EV**, Shevela EY, Tyrinova TV, Minkevich AM, Proskurina AS, Potter EA, Orishchenko KE, Zavjalov EL, Bayborodin SI, Nikolin VP, Popova NA, Pronkina NV, Ostanin AA, Chernykh ER, Bogachev SS. 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; 16(10): 563-576.

13. Поттер Е.А., **Долгова Е.В.**, Минкевич А.М., Николин В.П., Попова Н.А., Ефремов Я.Р., Байбородин С.И., Рогачев В.А., Проскурина А.С., Таранов О.С., Верещагин Е.И., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Богачев С.С. Режим однократной инъекции препарата двуцепочечной ДНК после каждой инъекции циклофосфана, приводящий к эрадикации первичного асцита Кребс-2. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016; 20(5): 716-722.

14. 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.

15. Potter EA, **Dolgova EV**, Proskurina AS, Minkevich AM, Efremov YR, Taranov OS, Omigov VV, Nikolin VP, Popova NA, Bayborodin SI, Ostanin AA, Chernykh ER, Kolchanov NA, Shurdov MA, Bogachev SS. A strategy to eradicate well-developed Krebs-2 ascites in mice. Oncotarget. 2016; 7(10): 11580-94.

16. Potter EA*, **Dolgova EV***, Proskurina AS, Efremov YR, Minkevich AM, Rozanov AS, Peltek SE, Nikolin VP, Popova NA, Seledtsov IA, Molodtsov VV, Zavyalov EL, Taranov OS, Baiborodin SI, Ostanin AA, Chernykh ER, Kolchanov NA, Bogachev SS. Gene expression profiling of tumor-initiating stem cells from mouse Krebs-2 carcinoma using a novel marker of poorly differentiated cells. Oncotarget. 2017; 8(6): 9425-9441. *These authors contributed equally to this work.

17. **Dolgova EV**, Mishinov SV, Proskurina AS, Potter EA, Efremov YR, Bayborodin SI, Tyrinova TV, Stupak VV, Ostatin AA, Chernykh ER, Bogachev SS. Novel Cancer Stem Marker and Its Applicability for Grading Primary Human Gliomas. Technol Cancer Res Treat. 2018; 17: 1533034617753812.

18. **Долгова Е.В.**, Проскурина А.С., Поттер Е.А., Тыринова Т.В., Таранов О.С., Ефремов Я.Р., Орищенко К.Е., Мишинов С.В., Ступак В.В., Останин А.А., Черных Е.Р.,

Богачев С.С. Оценка эффективности эрадикации стволовых инициирующих раковых клеток на примере первичных культур глиобластомы человека. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018; 22(7): 825-836.

19. Efremov YR, Proskurina AS, Potter EA, **Dolgova EV**, Efremova OV, Taranov OS, Ostanin AA, Chernykh ER, Kolchanov NA, Bogachev SS. Cancer Stem Cells: Emergent Nature of Tumor Emergency. *Front. Genet.* 2018; 9: 544.

20. Potter EA, Proskurina AS, Ritter GS, **Dolgova EV**, Nikolin VP, Popova NA, Taranov OS, Efremov YR, Bayborodin SI, Ostanin AA, Chernykh ER, Bogachev SS. 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; 9(47):28486-28499.

21. Поттер Е.А., Риттер Г.С., **Долгова Е.В.**, Проскурина А.С., Кисаретова П.Э., Ефремов Я.Р., Николин В.П., Попова Н.А., Таранов О.С., Осанин А.А., Черных Е.Р., Сидоров С.В., Колчанов Н.А., Богачев С.С. Оценка эффективности эрадикации стволовых инициирующих раковых клеток на примере асцитной формы гепатокарциномы мыши Г-29. *Вопросы Онкологии.* 2018; 64(6): 818-829.

22. Kirikovich SS, Taranov OS, Omigov VV, Potter EA; **Dolgova EV**, Proskurina AS, Efremov YR, Bogachev SS. Ultrastructural analysis of the Krebs-2 ascites cancer cells treated with extracellular double-stranded DNA preparation. *Ultrastructural pathology.* 2019; 43(1): 56-65.

23. **Dolgova EV**, Petrova DD, Proskurina AS, Ritter GS, Kisaretova PE, Potter EA, Efremov YR, Bayborodin SI, Karamysheva TV, Romanenko MV, Netesov SV, Taranov OS, Ostanin AA, Chernykh ER, Bogachev SS. Identification of the xenograft and its ascendant sphere-forming cell line as belonging to EBV-induced lymphoma, and characterization of the status of sphere-forming cells. *Cancer Cell Int.* 2019; 19: 120.

24. **Dolgova EV**, Evdokimov AN, Proskurina AS, Efremov YR, Bayborodin SI, Potter EA, Popov AA, Petruseva IO, Lavrik OI, Bogachev SS. Double-Stranded DNA Fragments Bearing Unrepairable Lesions and Their Internalization into Mouse Krebs-2 Carcinoma Cells. *Nucleic Acid Ther.* 2019; 29(5): 278-290.

25. Romanenko MV*, **Dolgova EV***, Osipov ID, Ritter GS, Sizova MS, Proskurina AS, Efremov YR, Bayborodin SI, Potter EA, Taranov OS, Omigov VV, Kochneva GV, Grazhdantseva AA, Zavyalov EL, Razumov IA, Netesov SV, Bogachev SS. Oncolytic Effect of Adenoviruses Serotypes 5 and 6 Against U87 Glioblastoma Cancer Stem Cells. *Anticancer Res.* 2019; 39(11): 6073-6086. * These authors contributed equally to this work.

26. Ефремов Я.Р., Проскурина А.С., Поттер Е.А., **Долгова Е.В.**, Ефремова О.В., Колчанов Н.А., Богачев С.С. Инь и янь плюрипотентности: результаты анализа генов,

демонстрирующих повышенную экспрессию в иницирующих опухолевых клетках асцитной карциномы Кребс-2. Математическая биология и биоинформатика. 2019. Т. 14. № 1. С. 160–187.

27. Ефремов Я.Р., Проскурина А.С., Поттер Е.А., **Долгова Е.В.**, Ефремова О.В., Ощепков Д.Ю., Колчанов Н.А., Богачев С.С. Стволовые раковые клетки: «служба спасения» для опухолей в условиях генерализованного клеточного стресса. Математическая биология и биоинформатика. 2019. Т. 14. № 1. С. 306–326.

28. **Долгова Е.В.**, Поттер Е.А., Проскурина А.С., Николин В.П., Попова Н.А., Романенко М.В., Нетесов С.В., Таранов О.С., Ефремов Я.Р., Завьялов Е.Л., Останин А.А., Черных Е.Р., Богачев С.С. Оценка эффективности эрадикации стволовых иницирующих раковых клеток на примере линии клеток глиобластомы человека U87. Вопросы онкологии. 2019. Т. 65, № 6. С. 904-919.

29. Kisaretova PE, Kirikovich SS, Ritter GS, Efremov YR, Taranov OS, Dubatolova TD, Proskurina AS, Potter EA, **Dolgova EV**, Sidorov SV, Ostanin AA, Chernych ER, Bogachev SS. Approbation of the cancer treatment approach based on the eradication of TAMRA+ cancer stem cells in a model of murine cyclophosphamide resistant lymphosarcoma. Anticancer Res. 2020; 40(2): 795-805.

30. **Dolgova EV**, Andrushkevich OM, Kisaretova PE, Proskurina AS, Ritter GS, Dubatolova TD, Romanenko MV, Taranov OS, Efremov YR, Zavyalov EL, Romaschenko AV, Mishinov SV, Kirikovich SS, Levites EV, Potter EA, Ostanin AA, Chernykh ER, Roshchin SY, Bervitskiy AV, Moysak GI, Rzaev JA, Bogachev SS. Efficacy of the new therapeutic approach in curing malignant neoplasms on the model of human glioblastoma. Cancer Biol Med. 2021; 18(3): 910-930.

31. Ruzanova VS, Proskurina AS, Ritter GS, Efremov YR, Nikolin VP, Popova NA, Naprimerov VA, **Dolgova EV**, Potter EA, Kirikovich SS, Levites EV, Mustafin ZS, Lashin SA, Burakova EA, Stetsenko DA, Ostanin AA, Chernykh ER, Bogachev SS. Experimental Comparison of the In Vivo Efficacy of Two Novel Anticancer Therapies. Anticancer Res. 2021; 41(7): 3371-3387.

32. Proskurina AS, Kupina VV, Efremov YR, **Dolgova EV**, Ruzanova VS, Ritter GS, Potter EA, Kirikovich SS, Levites EV, Ostanin AA, Chernykh ER, Babaeva OG, Sidorov SV, Bogachev SS. Karanahan: a potential new treatment option for human breast cancer and its validation in a clinical setting. Breast Cancer - Basic and Clinical Research. 2022; 28: 1610180.

33. Ruzanova V, Proskurina A, Efremov Y, Kirikovich S, Ritter G, Levites E, **Dolgova E**, Potter E, Babaeva O, Sidorov S, Taranov O, Ostanin A, Chernykh E, Bogachev S. Chronometric Administration of Cyclophosphamide and a Double-Stranded DNA-Mix at Interstrand Crosslinks

Repair Timing, Called “Karanahan” Therapy, Is Highly Efficient in a Weakly Immunogenic Lewis Carcinoma Model. *Pathol. Oncol. Res.* 2022; 28: 1610180.

34. Ritter GS*, **Dolgova EV***, Petrova DD, Efremov YR, Proskurina AS, Potter EA, Ruzanova VS, Kirikovich SS, Levites EV, Taranov OS, Ostanin AA, Chernykh ER, Kolchanov NA and Bogachev SS. The new general biological property of stem-like tumor cells Part I. Peculiarities of the process of the double-stranded DNA fragments internalization into stem-like tumor cells. *Front. Genet.* 2022; 13: 954395. *These authors contributed equally to this work.

35. Petrova DD*; **Dolgova EV***; Proskurina AS; Ritter GS; Ruzanova VS; Efremov YR; Potter EA; Kirikovich SS; Levites EV; Taranov OS; et al. The New General Biological Property of Stem-like Tumor Cells (Part II: Surface Molecules, Which Belongs to Distinctive Groups with Particular Functions, Form a Unique Pattern Characteristic of a Certain Type of Tumor Stem-like Cells). *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23: 15800. * These authors contributed equally to this work.

36. Ruzanova VS, Kirikovich SS, Levites EV, Proskurina AS, **Dolgova EV**, Ritter GS, Efremov YR, Dubatolova TD, Sysoev AV, Koleno DI, Ostanin AA, Chernykh ER, Bogachev SS. The Macrophage Activator GcMAF-RF Enhances the Antitumor Effect of Karanahan Technology through Induction of M2–M1 Macrophage Reprograming. *Journal of Immunology Research.* 2024; 7484490.

37. Potter EA*, **Dolgova EV***, Proskurina AS, Ruzanova VS, Efremov YR, Kirikovich SS, Mamaev AL, Taranov OS, Bryukhovetskiy AS, Grivtsova LU, Kolchanov NA, Ostanin AA, Chernykh ER, Bogachev SS. Stimulation of mouse hematopoietic stem cells by angiogenin and DNA preparations. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2024; 57: e13072. *These authors contributed equally to this work.

38. Рузанова В.С., Ошихмина С.Г., Проскурина А.С., Риттер Г.С., Кирикович С.С., Левитес Е.В., Ефремов Я.Р., Карамышева Т.В., Мещанинова М.И., Мамаев А.Л., Таранов О.С., Богачев А.С., Сидоров С.В., Никонов С.Д., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., **Долгова Е.В.**, Богачев С.С.. Концепция природной реконструкции генома. Часть 2. Влияние фрагментов экстраклеточной двуцепочечной ДНК на гемопоэтические стволовые клетки. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2024; 28(8): 993-1007.

39. **Dolgova EV**, Oshikhmina SG, Efremov YR, Ruzanova VS, Proskurina AS, Kirikovich SS, Levites EV, Ritter GS, Taranov OS, Leplina OY, Ostanin AA, Chernykh ER, Strunkin DN, Kolchanov NA, Bogachev SS. Internalization of extracellular double-stranded DNA as a potential marker of cancer stem cells in Epstein-Barr virus-induced B-cell lymphoma. *Cancer Biomark.* 2025; 42(5): 18758592251322040.

40. Ruzanova V, Proskurina A, Ritter G, **Dolgova E**, Oshikhmina S, Kirikovich S, Levites E, Efremov Y, Taranov O, Ostanin A, Chernych E, Kolchanov N, Bogachev S. The synergistic antitumor effect of Karanahan technology and in situ vaccination using anti-OX40 antibodies. *Oncol Res.* 2025; 33(5): 1229-1248.

41. Рузанова В.С., Ошихмина С.Г., Риттер Г.С., **Долгова Е.В.**, Кирикович С.С., Левитес Е.В., Ефремов Я.Р., Карамышева Т.В., Богомолов А.Г., Мещанинова М.И., Мамаев А.Л., Таранов О.С., Сидоров С.В., Никонов С.Д., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Проскурина А.С., Богачев С.С. Концепция природной реконструкции генома. Часть 3. Анализ изменения количества теломерной ДНК в клетках колоний как нового амплифицированного признака, возникшего при обработке гемопоэтических стволовых клеток костного мозга. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2025; 29(4): 479-495.

Статьи по теме диссертации, опубликованные в журналах, не входящих в перечень ВАК, базы данных Web of Science и Scopus (1):

42. Колчанов Н.А., Богачев С.С., **Долгова Е.В.**, Поттер Е.А., Проскурина А.С., Черных Е.Р., Останин А.А., Таранов О.С., Сидоров С.В. Технология лечения злокачественных новообразований «Каранахан». *Наука и Технологии Сибири.* 2022. 7, №4, С: 56-63.

Личный вклад автора

Основные результаты получены автором самостоятельно либо при личном участии. Анализ и обработка результатов, планирование экспериментов были выполнены автором лично. Опубликованные по теме диссертации работы подготовлены в соавторстве с коллективом сотрудников. FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)-анализ и сортировка клеток проводились при участии Я.Р. Ефремова (ЦКП «Проточной цитометрии» ИЦиГ СО РАН). Работа на конфокальном микроскопе была проведена совместно с С.И. Байбородиним (ЦКП «Микроскопического анализа биологических объектов» СО РАН). Патологоанатомический анализ тканей и органов экспериментальных животных был выполнен при участии О.С. Таранова. Интрацеребральная перевивка клеток U87 иммунодефицитным мышам и МРТ головного мозга мышей были выполнены с участием Е.Л. Завьялова и А.В. Ромащенко (ЦКП «SPF-виварий»). Оперативное удаление графта глиобластомы человека из головного мозга иммуннодефицитных мышей было выполнено совместно с О.М. Андрушкевичем, С.Ю. Роциным и А.В. Бервитским (Федеральный центр нейрохирургии, г. Новосибирск). Секвенирование образцов проводилось в ЦКП «Геномика» СО РАН. Анализ прочтений RNAseq был выполнен совместно с Я.Р. Ефремовым.

Эксперименты по лечению экспериментальных опухолей мышей были выполнены при участии В.П. Николина, Н.А. Поповой, В.И. Каледина, Е.А. Поттер и В.С. Рузановой.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы и четырех приложений. Список цитируемой литературы включает 465 источников. Работа изложена на 386 страницах машинописного текста, содержит 16 таблиц, 56 рисунков и четыре приложения. Приложение 1 содержит один рисунок. Приложение 2 содержит пять таблиц. Приложение 3 содержит один рисунок и его описание. Приложение 4 содержит восемь рисунков и их описание.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность всем сотрудникам лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН за помощь в исследованиях и осуществлении экспериментов в любое время дня и ночи, за теплую рабочую атмосферу. Автор благодарен к.б.н. Я.Р. Ефремову за интересные дискуссии и помощь в анализе некоторых данных. Автор выражает глубокую признательность д.м.н. А.А. Останину и члену-корреспонденту РАН Е.Р. Черных за обсуждения основных идей работы. Автор выражает глубокую благодарность академику РАН Н.А. Колчанову за проявленный интерес к исследованию и административную помощь на разных этапах работы. Особую благодарность автор выражает своему учителю и научному консультанту д.б.н. С.С. Богачеву за привитие интереса и должного отношения к науке, за постоянную поддержку, возможность консультаций при выборе направлений дальнейшей работы и за терпеливые, но настойчивые призывы к написанию диссертации.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Литературный обзор представлен четырьмя основными разделами. В первом разделе дается характеристика свойств опухоли, как ткани. Во втором разделе описываются особенности ОСК, как туморогенного начала неоплазии. В третьем разделе суммированы литературные данные, характеризующие взаимодействие эукариотической клетки и экстраклеточных нуклеиновых кислот. В четвертом разделе описаны современные методы лечения онкологических заболеваний, в том числе таргетные методы воздействия на ОСК.

1.1. Происхождение и организация опухоли: клеточный и молекулярный аспекты

В норме все клетки в организме находятся в состоянии гомеостаза. Они обладают определенными общебиологическими характеристиками, что позволяет им поддерживать правильную структуру тканей и работу органов. Нормальные клетки обладают следующим набором характеристик: (1) они способны контролировать свой рост и деление, реагируя на внешние сигналы; (2) подвержены программированной клеточной смерти (апоптозу); (3) имеют контактное торможение пролиферации, а также активно взаимодействуют друг с другом и с экстраклеточным матриксом (ЭКМ), что обеспечивает их удержание в исходном (свойственном им) месте; (4) обладают индивидуальными паттернами активированных генных платформ (при исходно одинаковом генотипе), что создает функциональное клеточное разнообразие и адаптацию к условиям внешней среды (Lansdowne, 2020).

Опухоль – комплексное генетическое заболевание, вызванное специфическими изменениями в генотипе клетки или группы клеток. Развитие новообразования считается многоэтапным процессом, в ходе которого генетические изменения дают определенные преимущества в делении клеток неопластического клона, в результате чего происходит прогрессивная трансформация нормальных клеток в злокачественные онкотрансформированные клетки. Генетические изменения, существенные для развития опухоли, обычно затрагивают три типа генов: протоонкогены, опухоль-супрессирующие гены и гены, связанные с репарацией ДНК (Копнин, 2004).

Протоонкогены – это нормальные клеточные гены, усиление или модификация функции которых превращает их в онкогены (процесс называется активацией). Они участвуют в ключевых процессах жизнедеятельности клетки: регуляции транскрипции, пролиферации, клеточного цикла, передачи сигнала и т.д. В результате их активации нарушается контроль клеточного роста и дифференцировки, что приводит к неотрансформации клетки.

Опухолевые супрессоры – это клеточные гены, инактивация которых резко увеличивает вероятность возникновения новообразования. При этом восстановление функции наоборот может подавить рост опухолевых клеток. Большинство опухолевых супрессоров участвуют в регуляции клеточного цикла, апоптоза или репарации ДНК и тем самым предотвращают накопление в организме клеток с генетическими и эпигенетическими аномалиями (Копнин, 2004).

Гены, связанные с репарацией ДНК – это группа генов, дефекты в которых могут приводить к нарушению репарации ДНК и увеличению геномной нестабильности, что создает условия для возникновения неопластической клетки. Регуляция функции этих генов осуществляется на генетическом и эпигенетическом уровнях. На генетическом уровне молекулярные события, приводящие к неотрансформации, связаны с мутациями, мультипликациями, инверсиями и делециями различных последовательностей генома. Эпигенетические изменения представляют собой различные уровни метилирования ДНК, специфическую модификацию гистонов, а также другие изменения как генетического материала клетки, так и ее структурных белковых компонентов. Нарушения в функционировании генетических элементов, приводящие к неопластическому перерождению клетки, в первую очередь обусловлены различными химическими и физическими воздействиями. К ним можно отнести радиацию, действие свободных радикалов и активных химических молекул, таких как, например, алкилирующие агенты.

Давно известно, что воспаление коррелирует с неопластической трансформацией близлежащих тканей. Имеется достаточно подтверждений тому, что хроническое воспаление (как правило, инфекционного происхождения) является фактором риска развития опухоли, ее прогрессирования и метастазирования (Greten, Grivennikov, 2019; Singh et al., 2019). Показано, что основной причиной развития опухоли при воспалении является действие свободных радикалов и многочисленных цитокинов, всегда сопровождающих воспалительный процесс.

В хроническом воспалительном микроокружении преобладают макрофаги. Вместе с лейкоцитами, также присутствующими в очаге воспаления, они генерируют высокие уровни активных форм кислорода (АФК) и азота для борьбы с инфекцией. В условиях постоянного повреждения ткани и клеточной пролиферации нахождение в локальной области в течение длительного времени свободных радикалов сопряжено с возникновением химических мутагенов, например, пероксинитрита, который реагирует с ДНК и вызывает мутации в пролиферирующих эпителиальных и стромальных клетках.

Кроме того макрофаги и Т-лимфоциты могут выделять фактор некроза опухоли-альфа (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) и другие сигнальные молекулы, приводящие к возникновению повреждений в ДНК (Singh et al., 2019).

Роль иммунной системы не сводится только к возможности индуцировать неопластический процесс. При возникновении очага опухолевого роста одновременно формируется так называемая опухоль-ассоциированная строма, которая инфильтрована иммунными клетками: Т- и В-клетками, макрофагами и дендритными клетками (ДК), супрессорными миелоидными клетками, NK-клетками (Singh et al., 2019; Ковалева, Подлесная, Грачев, 2022). В результате специфического цитокинового профиля, синтезируемого опухолью, иммунные клетки опухоль-ассоциированной стромы не только перестают «видеть» и уничтожать неопластические клетки, но, напротив, способствуют развитию опухоли и метастазированию (Greten, Grivennikov, 2019). Так, например, в норме макрофаги находятся в тканях и удаляют погибшие клетки (фагоцитируют апоптотические тельца), производят хемотоксические молекулы для привлечения других типов клеток, регулируют иммунные и барьерные функции, поддерживают ниши стволовых клеток (СК). Опухолевые клетки секретируют факторы, которые преобразуют макрофаги из клеток-антагонистов в клетки-помощники. Они продуцируют трансформирующий фактор роста- $\beta 1$ (Tumor growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$), под действием которого происходит трансформация инфильтрующих опухоль макрофагов в фенотип M2. Макрофаги с таким фенотипом ориентированы на поддержание роста опухоли. Они активно секретируют металлопротеиназы, разрушающие внеклеточный матрикс и способствующие прорастанию опухоли в близлежащие ткани. M2-макрофаги также секретируют фактор роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor, VEGF), который стимулирует ангиогенез опухолевого сайта, способствует миграции моноцитов в опухолевый очаг и совместно с TGF- $\beta 1$ инициирует формирование опухолевой стромы (Coussens, Werb, 2002; Бережной и др., 2008; Ковалева, Подлесная, Грачев, 2022).

Т-регуляторные клетки (T_{reg}) и супрессоры миелоидного происхождения (Myeloid-derived suppressor cells, MDSC), являющиеся регуляторным звеном в развитии иммунного ответа, также активируются клетками опухоли, что приводит к нейтрализации первичного иммунного ответа на возникший неоттрансформированный клон. Клетки опухоли продуцируют цитокин CCL22, привлекающий в сайт опухоли T_{reg} , которые продуцируя TGF- β инактивируют цитотоксические лимфоциты (снижается способность последних высвободить секреторные гранулы и цитотоксические молекулы). Воспалительные цитокины, продуцируемые клетками опухоли и ее микроокружением, активируют MDSC.

MDSC подавляют противоопухолевый иммунный ответ за счет продукции свободных радикалов кислорода, TGF- β , активации аргиназы-1 и активных форм азота. Они содействуют ангиогенезу и метастазированию (Малышев, 2012).

Парадоксально, что опухоль не только избегает иммунного надзора, но и привлекает и программирует иммунные клетки таким образом, что они начинают функционировать как проопухолевые элементы, образуя защитную ткань опухоли – опухоль-ассоциированную строму.

1.1.1. Основные характеристики и свойства опухолевой клетки и опухоли как ткани

Канонические особенности злокачественно перерожденных клеток включают несколько причинных функциональных характеристик, возникших в ходе многоэтапного развития опухоли и основанных на геномной нестабильности и воспалительных процессах: поддержание пролиферативной активности, избегание супрессии клеточного деления, приобретение репликативного бессмертия, устойчивость к апоптозу, инвазивность и метастазирование (Hanahan, Weinberg, 2011). Сама опухолевая ткань характеризуется активным ангиогенезом.

Указанные особенности позволяют опухолевым клеткам формировать устойчивую, активно развивающуюся структуру и метастазировать в другие органы и ткани организма.

1.1.1.1. Поддержание пролиферативного потенциала

Одна из главных особенностей опухолевых клеток – способность поддерживать постоянную пролиферативную активность. Нормальные ткани организма строго контролируют синтез факторов роста и деление клеток находится под полным контролем, что позволяет удерживать гомеостаз ткани. Опухолевые клетки с помощью различных механизмов приобретают способность регулировать скорость роста и деления самостоятельно, вне зависимости от потребностей организма.

В этом процессе преимущественно задействованы специфические пролиферативные сигналы (например, факторы роста), которые связываются с рецепторами клеточной поверхности, содержащими цитоплазматические тирозинкиназные домены. Такое взаимодействие активирует и поддерживает в активном состоянии внутриклеточные сигнальные пути, которые регулируют клеточный цикл, создавая условия для непрерывного деления клеток. Опухолевые клетки способны самостоятельно продуцировать пролиферативные сигналы, а также стимулировать нормальные клетки стромы (микроокружение опухоли) к синтезу указанных сигнальных молекул (Lemmon, Schlessinger, 2010).

Еще один механизм усиления пролиферативной активности – это увеличение количества рецепторов к пролиферативным лигандам на поверхности опухолевых клеток, что продуцирует гиперответ даже на ограниченное количество лигандов к ростовым факторам. В опухолевых клетках могут существовать структурные изменения в молекулах рецептора, что усиливает лиганд-зависимую активацию пролиферативного сигнала. Кроме того, известны соматические мутации, способствующие непрерывной активации сигнальных путей, запускаемых в норме ростовыми факторами (Hanahan, 2022).

Другой путь поддержания пролиферативной активности – нарушение механизмов отрицательной обратной связи. В здоровых клетках такой механизм ограничивает степень и продолжительность сигнальных событий после физиологической стимуляции (Chandrapaty, 2012; Hanahan, Weinberg, 2011).

Ярким примером такого нарушения являются мутации в гене, кодирующим опухолевый супрессор PTEN, что показано для многих типов опухолей (глиома, рак молочной железы, простаты). PTEN представляет собой негативный регулятор фосфатидилинозитол-3-киназного PI3K/Akt-сигнального каскада, основного сигнального пути роста и выживания клеток (Stambolic et al., 1998). Снижение или полное отсутствие функциональной активности фактора приводит к неконтролируемому делению неотрансформированной клетки. Несколько транскрипционных факторов участвуют в регуляции экспрессии гена *PTEN*, снижая синтез его мРНК, что в конечном счете определяет количество активного фактора. Снижение транскрипции PTEN может быть связано с белком p53, который является транскрипционным фактором, определяющим экспрессию гена *PTEN*, и синтез которого значительно снижен в опухолевых клетках. PTEN также репрессируется транскрипционными факторами SNAIL и SLUG, участвующими в процессах эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и метастазирования, экспрессия которых повышена в прогрессирующих опухолях (Chen, Liao, Yang, 2018).

1.1.1.2. Избегание супрессии клеточного деления

Описано несколько основных супрессоров, которые сдерживают пролиферативные сигналы, не давая клетке бесконтрольно делиться. К ним относятся белки семейства ретинобластомы (retinoblastoma-associated proteins, pRB/E2F), p53 – белки, участвующие в процессах апоптоза, пролиферации и старения.

Транскрипционный фактор E2F обеспечивает E2F-зависимую экспрессию генов, необходимых для репликации, метаболизма и синтеза ДНК, включая циклины E и A. В обычном состоянии E2F находится в комплексе с RB, при этом гистоновые деацетилазы и другие факторы ремоделирования хроматина связываются с E2F-чувствительными

промоторами и активно подавляют экспрессию E2F-зависимых генов. Таким образом гипофосфорилированные формы членов семейства RB блокируют вход в S-фазу, ингибируя E2F-транскрипционную программу (Sherr, McCormick, 2002). Нарушение этого механизма сбивает программу пролиферативных сигналов, что приводит к бесконтрольному делению клетки. Уровень фосфорилирования белков семейства RB регулируется циклин-зависимыми киназами. При фосфорилировании RB транскрипционный фактор E2F высвобождается и запускает синтез специфических генов, что приводит к началу деления клетки.

Транскрипционный фактор p53 экспрессируется в ответ на возникновение повреждений в ДНК, гипоксию, активацию онкогенов и регулирует клеточные программы, приводящие либо к остановке клеточного цикла, либо апоптозу клетки. В опухолевых клетках нарушены сигнальные пути, отвечающие за синтез этого супрессора, что так же приводит к неконтролируемому делению клеток (Hanahan, Weinberg, 2011).

Еще одной особенностью, позволяющей опухолевым клеткам бесконтрольно делиться, является избегание контактного торможения. Общеизвестно, что в нормальных клеточных культурах наблюдается торможение деления клеток при образовании монослоя. Такой механизм контроля клеточной популяции *in vitro* является аналогом взаимодействия клеток *in vivo*, позволяющим сохранить структуру и гомеостаз тканей и органов, который нарушается в ходе онкогенеза. Один из механизмов контактного торможения связан с активностью белка Merlin, который кодируется геном *NF2*. Merlin сосредоточен в зонах клеточной адгезии и связывает поверхностные молекулы клеточной адгезии с актиновыми филаментами, участвуя в механизме формирования кадгерин-зависимого клеточного контакта. Другой вариант контактного торможения связан с активностью белка эпителиальной полярности LKB1, который участвует в организации эпителиальных структур. Пониженная экспрессия указанных белков характерна для многих типов злокачественных опухолей (Hanahan, Weinberg, 2011).

1.1.1.3. Репликативное бессмертие

Для возможности формирования макроскопических опухолей, опухолевые клетки должны иметь неограниченный или близкий к таковому потенциал деления. В норме количество возможных удвоений клетки регулируется числом Хейфлика. В 1961 году американский ученый Леонард Хейфлик обнаружил, что на концах хромосом находятся tandemные повторы, представляющие собой последовательность $(-TTTAGGG-)^n$, которые защищают концы хромосом и укорачиваются с каждым циклом деления. Укорачивание хромосом происходит вследствие того, что ДНК-полимераза эукариот не способна синтезировать копию ДНК с самого конца. В этой связи, с каждым делением длина теломер

укорачивается на несколько нуклеотидов, соответствующих количеству нуклеотидов РНК праймера-затравки (Розенфельд и др., 2021). При достижении определенного лимита происходит процесс слияния концов хромосом, не защищенных теломерами, дестабилизация кариотипа и, как следствие, запускается процесс запрограммированной гибели клетки. Таким образом, длина теломер является одним из факторов, определяющих количество делений клетки и ее потомков. Механизм физиологического уменьшения длины теломер защищает организм от возникновения клеток, способных делиться бесконечно (Имянитов, 2010).

В клетке существует фермент теломераза, специфическая ДНК-полимераза, которая достраивает теломерные повторы на концах хромосом. В нормальных соматических клетках экспрессия этого фермента практически отсутствует, при этом в нормальных СК теломераза экспрессируется в детектируемом количестве. В клетках подавляющего процента опухолей (85 %), экспрессия указанного фермента повышена (Fernandez-Garcia, Ortiz-De-Solorzano, Montuenga, 2008).

Предполагаемый механизм активации теломеразы в неопластически трансформированных клетках аналогичен механизму, описанному для нормальных СК, и связан с Wnt/ β -catenin-сигнальным каскадом, который необходим для правильного развития всех многоклеточных организмов. β -catenin, находящийся в цитоплазматическом пространстве клетки и избегающий деградации благодаря сигналу Wnt, активирует экспрессию ферментативной субъединицы фермента теломеразы (TERT). В данном процессе участвует транскрипционный фактор KLF4, который направляет β -catenin на промотор гена *TERT*, запуская транскрипцию мРНК теломеразы. Указанный механизм активен в клетках многих опухолей, что сопровождается повышенным уровнем теломеразной активности и появлением свойства «репликативного бессмертия». Экспрессию гена теломеразы также активируют различные онкогены, например, фактор транскрипции c-Myc, участвующий в контроле пролиферации и дифференцировки клеток (Розенфельд и др., 2021).

Таким образом, одна из причин бессмертия опухолевого клона – это способность опухолевой клетки поддерживать длину теломер выше критического минимального уровня, запускающего программируемую клеточную гибель (апоптоз), которая сопровождается лизисом опухолевой ткани.

1.1.1.4. Устойчивость к апоптозу

Принято выделять два типа клеточной гибели: непрограммируемая и программируемая. К первому типу относится некроз – гибель клетки с развитием воспаления, в течение которого может нарушаться целостность и функционирование ткани. Ко второму типу относится апоптоз – поэтапно регулируемый вариант клеточной гибели, имеющий

энергозависимый биохимический механизм, направленный на сохранение функциональной активности ткани и органа. В норме элиминация клеток путем апоптоза постоянно происходит в активно делящихся тканях, таких как эпителий кишечника, кожа, кровь и играет функцию удаления старых и/или аберрантных клеток. Основным фактором, запускающим программу апоптоза, служит накопление большого количества повреждений в ДНК, которые клетка не может исправить. Апоптоз считается одним из основных механизмов защиты от развития неопластического перерождения (Имянитов, 2010).

Опухолевые клетки обладают разными механизмами обхода апоптоза. Наиболее распространенным вариантом является потеря функциональной активности гена *TP53*, главного внутриклеточного сенсора повреждений ДНК. Белок p53 индуцирует апоптоз, стимулируя экспрессию белков Noxa и Puma. Указанные белки являются сенситизаторами, предотвращающими активацию антиапоптотических функций Bcl-2 (Cao, Livas, Kyprianou, 2016). Кроме того, неотрансформированные клетки могут непосредственно увеличивать экспрессию антиапоптотических регуляторов, таких как BclL-2, Bcl-xL, или сигналов выживания IGF1/2 посредством подавления проапоптотических факторов (Bax, Bim, Puma) (Hanahan, Weinberg, 2011; Кушлинский, Немцова, 2014).

Принято считать, что некроз является закономерным событием в ответ на резкие внешние изменения (гипоксия, ожог, повреждение ткани). Однако в последнее время появились данные, что в некоторых случаях некроз может происходить под генетическим контролем клетки (Proskuryakov, Konoplyannikov, Gabai, 2003). При гибели клеток вследствие некроза в окружающую ткань высвобождаются провоспалительные сигналы, что привлекает иммунные клетки в очаг повреждения. Также высвобожденные провоспалительные цитокины, например, IL-1 α , могут напрямую стимулировать пролиферацию соседних клеток, что потенциально способствует прогрессированию опухоли (Hanahan, Weinberg, 2011; Zhao et al., 2021). В контексте понятия «опухоль» такие привлеченные иммунные клетки способствуют ангиогенезу, пролиферации и инвазии.

1.1.1.5. *Инвазия и метастазирование*

Процесс инвазии и метастазирования состоит из нескольких дискретных шагов, называемых инвазивно-метастатическим каскадом или колонизацией (Hanahan, Weinberg, 2011). Он включает в себя: (1) локальную инвазию (прорастание в близлежащие ткани); (2) интравасию – миграцию опухолевых клеток в близлежащие кровеносные и/или лимфатические сосуды; (3) перенос клеток через лимфатическую и/или кровеносную системы; (4) экстравазию – переход из просвета сосуда в паренхиму отдаленных тканей; (5)

формирование микроскопических узелков опухолевых клеток – микрометастазов; (б) рост макроскопической опухоли.

Показано, что опухолевые клетки могут метастазировать не по одиночке, а группой в составе кластера (Škovieřová et al., 2018).

Существует две основных программы, в процессе которых опухолевая клетка становится способной инвазировать и метастазировать. Первая программа связана с приобретением клетками, обладающими эпителиальными чертами, характеристик мезенхимальных клеток, которые по своей природе способны к перемещению. При этом в клетке начинают синтезироваться белки, характерные для мезенхимальных клеток и снижается экспрессия белков, обуславливающих эпителиальные свойства. Клетка приобретает мезенхимальные физиологические и функциональные черты, у нее появляется способность изменения формы (образование фило- и ламеллоподий), она теряет контакты с окружающими клетками и ЭКМ и открепляется от базальной мембраны. Этот процесс назван ЭМП. Считается, что программа ЭМП является ключевой в развитии метастазирования (Sökeland, Schumacher, 2019).

Вторая программа связана с приобретением опухолевыми клетками свойств, характеризующихся амёбным способом перемещения, так называемая Rho/ROCK программа (Friedl, Wolf, 2003).

Также предложен принципиально иной механизм метастазирования, основанный на присутствии в плазме крови циркулирующих нуклеиновых кислот. Известно, что в плазме крови и интерстициальной жидкости всегда присутствуют фрагменты дцДНК, появившиеся в результате апоптотической или некротической гибели клеток. Группой ученых (Garacia-Olmo, Garacia-Olmo, Martinez, 2000; García-Olmo et al., 1999) был предложен механизм метастазирования, обусловленный горизонтальным переносом генетического материала. Реинфузия плазмы крови животных-опухоленосов, не содержащей каких-либо клеток, здоровым особям приводила к возникновению той же самой патологии. Этот факт заставил авторов выдвинуть предположение, что трансформация здоровых клеток в опухолевый фенотип может осуществляться за счет горизонтального переноса током крови фрагментов ДНК, содержащих онкогены, онкосупрессоры или иные, иницирующие неотрансформацию клетки, молекулы ДНК. Этот предположительный механизм был назван «генометастазированием» (García-Olmo et al., 2010).

1.1.1.6. Ангиогенез

Как и в нормальной ткани, клетки опухоли нуждаются в получении питания, выводе продуктов распада и углекислого газа. Эти требования осуществляет опухолевая сосудистая

сеть, возникающая в процессе ангиогенеза. В норме образование новых сосудов активно идет в процессе эмбриогенеза, во взрослом организме этот процесс останавливается и временно запускается только в «особых» случаях (заживление ран, женский репродуктивный цикл). Напротив, в процессе развития опухоли ангиогенез практически всегда активен, что заставляет обычно покоящуюся сосудистую сеть образовывать новые сосуды, способствующие поддержанию функциональной устойчивости постоянно увеличивающейся в размерах опухолевой ткани.

Основными регуляторами ангиогенеза являются фактор роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) и тромбоспондин-1 (TSP-1). Передача сигнала VEGF происходит через три типа рецепторов тирозинкиназы (VEGFR1-3) и регулируется на множественных уровнях. Активация экспрессии VEGF может происходить как под воздействием гипоксии, так и сигнальных молекул, синтезируемых клетками опухоли или ее окружения. Кроме того, VEGF может в латентной форме храниться в экстраклеточном матриксе, высвобождаясь и активируясь под действием матриксных металлопротеиназ (например, MMP9), активная экспрессия которых идет в инвазирующих клетках. TSP-1 является негативным регулятором ангиогенеза. Связываясь с трансмембранными рецепторами эндотелиальных клеток, указанный белок противодействует ангиогенным стимулам (Hanahan, Weinberg, 2011).

В настоящее время известно, что клетки врожденного иммунитета, а именно макрофаги, нейтрофилы и тучные клетки играют существенную роль в развитии патологического ангиогенеза. Эти клетки инфильтруют предраковые сайты, собираясь на периферии очага, и способствуют переключению ранее «молчащей» ткани к стимуляции локальной инвазии, росту возникшей опухоли и образованию новой опухоль-ассоциированной сосудистой сети (Albini et al., 2018).

Кровеносные сосуды, образующиеся в опухолях, обычно аберрантны. Они извилистые и деформированные и образуют беспорядочно разросшуюся капиллярную сеть.

Таким образом опухоль представляет собой ткань организма, которая вышла из под морфогенетического контроля и приобрела ряд свойств, позволяющих ей, используя ресурс жизнеобеспечения организма, развиваться как независимый орган, увеличиваться в размерах и активировать новые функционально-генетические механизмы (приобретенные нарастающим потоком все более злокачественного фенотипа), определяющие ее прогрессию.

1.1.2. Иерархическая система организации опухоли

Долгое время существовала «стохастическая» модель строения опухоли, подразумевающая, что все клетки имеют одинаковый туморогенный и пролиферативный

потенциал, способны к метастазированию и образованию в новом месте очага опухоли, гистологически идентичному исходному образцу. В этой связи терапия онкологических заболеваний была направлена на уничтожение максимального количества клеток (оперативное удаление, химио-/лучевая терапия) вне зависимости от их индивидуальных особенностей. Однако такие методы лечения являлись малоэффективными и сохранялся высокий процент рецидивов заболеваний.

В конце XX века появились новые данные, меняющие представление о строении опухоли. На смену «стохастической» пришла «иерархическая» модель организации опухоли, которая постулирует, что опухоль гетерогенна по своей природе, и на вершине иерархической лестницы находятся ОСК (Чехун и др., 2012). То есть опухоль состоит из набора клеток, обладающих разными характеристиками, и в этом плане схожа с нормальными тканями организма, где за рост и регенерацию отвечают СК.

ОСК составляют небольшую субпопуляцию клеток опухоли (по разным данным 1–7 %), хотя их количество может в сильной степени варьировать в зависимости от стадии заболевания и индивидуальных особенностей пациента, и обладают основными характеристиками, схожими с нормальными СК: способность симметрично/асимметрично делиться, бесконечный пролиферативный потенциал. ОСК характеризуются высокой экспрессией VEGF. В настоящее время появляется все больше подтверждений тому, что именно указанные клетки ответственны за метастазирование, агрессивное развитие опухоли, устойчивость к лекарственным средствам и радио-/химиотерапии (Beier et al., 2007; Lathia et al., 2015; Qiang et al., 2009; Rysaj, Tang, 2014; Schreck et al., 2010). Остальная часть опухоли представлена в разной степени дифференцированными потомками, а также опухолевой стромой. Коммитированные опухолевые клетки имеют высокий пролиферативный потенциал, однако не способны к образованию графта при трансплантации.

Впервые теория о том, что СК участвуют в развитии опухоли, была выдвинута еще в 1877 году Вирховым и его студентом Конхаймом, которые сформулировали постулат о том, что происхождение опухоли объясняется наличием в организме «эмбриональных остатков» – рассеянных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), которые остались неиспользованными во время развития организма. Эта теория получила подтверждение, когда из перевитых крысам ЭСК была получена опухоль – тератома. Тератомы содержат дифференциальные элементы всех трех эмбриональных зародышевых листков, и, как правило, являются доброкачественными, диагностируемыми у детей в первые годы жизни. В 1960-е и 1970-е годы начали появляться работы по тератокарциномам, злокачественным опухолям, более

агрессивным, чем тератомы, образованным из недифференцированных и дифференцированных клеток всех трех эмбриональных зародышевых листков (Carr, 2019).

До 80-х годов проблема гетерогенного строения опухоли была отодвинута на второй план, и основной упор в вопросах развития и прогрессирования онкологических заболеваний делался на изучение влияния онкогенов и геномной нестабильности.

Прорыв в постановке и изучении роли ОСК в развитии опухоли был сделан в 1994–1997 годах John E. Dick с коллегами на модели острого миелоидного лейкоза. В работе было показано, что только небольшая популяция опухолевых клеток способна инициировать опухоль при перевивке SCID мышам. В серии других экспериментов было установлено, что указанные клетки обладают высокой способностью к самообновлению, что является основной характеристикой СК (Bonnet, Dick, 1997). Опухоли, возникающие после трансплантации, состояли из смеси туморогенных клеток и их дифференцированных потомков и были подобны исходной опухоли. Это явилось доказательством того, что в процессе развития опухоли ОСК продуцируют два типа клеток: аналогичные исходной, стволовой, и более дифференцированные, которые теряют свой канцерогенный потенциал в результате дифференцировки.

В 2003 году Аль-Хадж с коллегами впервые смог идентифицировать и выделить ОСК из опухоли солидной формы, а именно рака молочной железы, показав, что только часть раковых клеток имеют туморогенные свойства (Al-Hajj et al., 2003). Позднее ОСК были идентифицированы и описаны в солидных опухолях других нозологий, таких как опухоли мозга, легких, толстого кишечника и др. (Dalerba et al., 2007; O'Brien et al., 2007; Singh et al., 2004; Singh et al., 2003).

Доказательство существования ОСК перевернуло представление мирового научно-медицинского сообщества о поиске терапевтических мишеней для эффективного лечения онкологических заболеваний. Активное развитие получили таргетные подходы лечения, направленные либо на элиминацию ОСК, либо на блокирование их туморогенных свойств.

Несмотря на то, что огромное количество сил брошено на поиск эффективных методов терапии, многие функции и свойства ОСК подробно изучены, а количество публикаций в этой области с каждым годом увеличивается, эффективность лечения опухолей оставляет желать лучшего. Как показывает практика, природа ОСК настолько сложна, а геномная пластичность настолько эффективна, что «убить» указанные клетки крайне сложно. В последующей главе литературного обзора будут подробно рассмотрены основные свойства ОСК, которые характеризуются сверхэкспрессией определенных генных платформ и проявляются в активизации различных сигнальных каскадов.

1.2. Опухолевые стволовые клетки

1.2.1. Опухолевые стволовые клетки как организующие единицы на вершине иерархической структуры опухоли

ОСК обладает характерным набором свойств, которые придают ей способность образовывать злокачественную опухоль, представляющую собой специфическую патологическую ткань организма.

Основными признаками, характерными для ОСК, являются: самообновление, способность производить дочернюю коммитированную клетку опухоли, а также долгосрочный потенциал к клональному возобновлению популяции опухолевых клеток (Clarke et al., 2006; O'Brien, Kreso, Jamieson, 2010). Солидные опухоли организованы иерархически с небольшим количеством ОСК, стимулирующих рост опухоли, метастазирование и возобновляющих популяцию перерожденных клеток после вмешательств, то есть обуславливающих возникновение рецидивов заболевания (Gilbert, Ross, 2011a). Еще одной особенностью ОСК является способность формировать определенное микроокружение (нишу ОСК). ОСК выделяют специфические хемокины и сигнальные молекулы, привлекающие в сайт опухоли макрофаги, лимфоциты, моноциты и другие иммунные клетки. Оказавшиеся в очаге опухоли иммунные клетки, а также фибробласты, создающие стромальную ткань опухоли, изменяют свои исходно «надзирающие свойства» и начинают работать в сторону поддержания роста опухоли (смена поляризации) (Coussens, Werb, 2002; Бережной и др., 2008; Ковалева, Подлесная, Грачев, 2022). Нормальные СК (например, гемопоэтические СК), которые расположены внутри стволовых ниш костного мозга, так же секретируют многочисленные факторы, которые определяют функционирование клеток стволовой ниши. Различие между ОСК и нормальными СК заключается в том, что функционирование последних строго регулируется гуморальным фоном, который в свою очередь создают клетки ниши, а ОСК функционирует независимо от регуляторных сигналов сформированной ими стромальной ниши (Borlongan, Saha, Wang, 2024; Efremov et al., 2018).

Набор указанных характеристик позволяет ОСК доминировать по сравнению с другими клетками организма, инициировать появление и поддерживать рост и распространение опухоли в организме.

1.2.2. Молекулярные маркеры опухолевых стволовых клеток

С момента открытия ОСК их биология изучена достаточно глубоко, и в настоящее время существует множество работ, описывающих молекулярные особенности ОСК, при

помощи которых можно выделить эти клетки из общей опухолевой массы, а также целенаправленно воздействовать на них.

Молекулярные маркеры ОСК можно разделить на: (1) молекулы, расположенные на мембране клетки, позволяющие в том числе их фенотипировать (рецепторы, поверхностные антигены); (2) белки общеклеточного метаболизма; (3) маркеры регуляторных сетей: транскрипционные факторы, сигнальные молекулы, обеспечивающие пост-транскрипционную и эпигенетическую регуляцию. Последние участвуют в активации сложной сети сигнальных путей, обеспечивающих основные свойства ОСК, и будут подробно описаны в последующих разделах литературного обзора.

Молекулярные маркеры широко используются для обнаружения и выделения ОСК из общей опухолевой массы методами сортировки FACS (Fluorescence-activated cell sorting) или MAGS (Magnet activated cell sorting). На сегодняшний день для ОСК различных нозологий описано множество таких маркеров. Наиболее часто встречающиеся маркеры представлены в **Таблице 1**. Большинство из них принадлежит к трансмембранным гликопротеинам/протеогликанам, которые образуют обширную сеть на поверхности клетки и составляют часть мембранного белкового комплекса – гликокаликса. Активно развитый гликокаликс является отличительной особенностью ОСК по сравнению с дифференцированными клетками опухоли (Mallard, Tiralongo, 2017).

Основной проблемой таргетной терапии, направленной на элиминацию ОСК, является отсутствие универсальности маркеров ОСК как между разными типами опухолей, так и их индивидуальными особенностями внутри одного типа опухоли (Kripnerova et al., 2019; Sukowati, 2019; Taussig et al., 2008). В одних и тех же диагностируемых опухолях у разных пациентов уровень ОСК, определяемый по одному из общепринятых маркеров, может в значительной степени варьироваться. Так, например, количество ОСК глиобластомы, детектируемых по маркеру CD133, у разных пациентов варьировало от 0 до 82 % (Kase et al., 2013). Кроме того, есть данные об изменении уровня экспрессии маркеров в одной опухоли с течением времени по мере ее прогрессии и изменения функционального состояния клеток (Puchinskaya, 2016). Поэтому обычной практикой для диагностики ОСК является использование нескольких молекулярных маркеров одновременно. То же касается и таргетной (нацеленной на ОСК) терапии, где использование нескольких молекулярных мишеней или комбинация нескольких подходов дают более эффективный результат (Deonaraín, Kousparou, Epenetos, 2009).

Таблица 1. Наиболее часто встречающиеся молекулярные маркеры ОСК, характерные для разных типов опухолей.

Маркер ОСК	Краткая характеристика	Тип опухоли	Литературный источник
CD133 (AC133)	Трансмембранный гликопротеин , участвующий в процессах клеточной дифференцировки, ЭМП. Также является маркером нейральных СК. В мембране находится в основном в составе липидных рафтов , формирующих часть белкового комплекса, регулирующего структуру и динамику образования «выпячиваний» (микроворсинок/ ресничек).	Глиобластома; колоректальный рак; опухоли простаты, яичников, поджелудочной железы, легких; меланома; остеосаркома; лейкемия; гепатоцеллюлярная карцинома; плоскоклеточный рак полости рта.	(Ludwig, Kornblum, 2017; Moreno-Londoño, Robles-Flores, 2024; Zhang et al., 2024)
CD44	Трансмембранный гликопротеиновый рецептор , участвующий в межклеточных взаимодействиях, адгезии и процессах миграции, инвазии, дифференцировки и пролиферации.	Опухоли яичников, простаты, поджелудочной железы, желудка; колоректальный рак; карцинома печени; немелкоклеточный рак легкого; рак молочной железы.	(Mesrati et al., 2021; Ponomarev et al., 2023; Zhang et al., 2024)
CD24	Гликозилированный сиалогликопротеин . Экспрессируется как на поверхности мембраны, так и в цитоплазме. Участвует в процессах межклеточного взаимодействия и взаимодействия клетки с матриксом, пролиферации, адгезии, инвазии, миграции, метастазирования.	Лимфома, опухоли нервной системы, почек, поджелудочной железы; назофарингеальные опухоли; гепатоцеллюлярный, мелкоклеточный раке легкого.	(Yang et al., 2023)
Integrin α	Трансмембранный гликопротеин I типа (рецептор клеточной поверхности), участвующий в процессах клеточной адгезии, передачи сигналов от ЭКМ внутрь клетки. Активация интегринов при связывании лиганда запускает механизмы передачи сигнала, участвующего в	Глиобластома; рак молочной железы, шейки матки, простаты; гепатоцеллюлярная карцинома; аденокарцинома пищевода; плоскоклеточные карциномы.	(Krebsbach, Villa-Diaz, 2017)

CD90	дифференцировке клеток, экспрессии генов, отвечающих за подвижность клетки, ее полярность, пролиферацию, выживаемость.		
	Гликозилфосфатидилинозитол-заякоренный гликопротеин (GPI-AP) , представляет собой молекулу клеточной адгезии и принадлежит к семейству иммунноглобулинов. Играет важную роль в процессах воспаления, заживления ран, клеточной адгезии, росте нейронов и дифференцировки СК.	Гепатоцеллюлярная карцинома; опухоли желудка, легких, поджелудочной железы; глиома; плоскоклеточный рак пищевода.	(Shaikh, Kala, Nivsarkar, 2016; Zhang et al., 2024)
ErCAM	Молекула адгезии эпителиальных клеток. Мембранный белок , участвует в процессах межклеточного взаимодействия, миграции, пролиферации и дифференцировки. В мембране располагается в комплексе с тетраспанинами, интегринами и CD44. Эти комплексы подобно рафтам обогащены длинными насыщенными ацильными цепями и холестерином.	Рак молочной железы, поджелудочной железы; колоректальный рак, гепатоцеллюлярная карцинома.	(Marhaba et al., 2008; Zhang et al., 2024)
LGR5	Содержащий лейцин-богатый домен белок G-связанный рецептор 5 – трансмембранный рецептор . Участвует в процессах клеточной подвижности, ЭМП, активации сигнальных путей Wnt/ β -catenin и Notch.	Опухоли желудка, поджелудочной железы, яичников, шейки матки; гепатоцеллюлярная карцинома; рак молочной железы; колоректальный рак.	(Ahmed et al., 2023; Zhang et al., 2024)
ALDH1 (Aldehyde dehydrogenase 1),	Внутриклеточный фермент, участвующий в окислении альдегида до карбоновых кислот и синтезе ретиноевой кислоты.	Рак яичников, легкого, шейки матки, толстой кишки, молочной железы; гепатоцеллюлярная карцинома.	(Puchinskaya, 2016; Zhang et al., 2024)

Генетическая пластичность ОСК в значительной степени усложняет поиск подходящей терапии и ее эффективность. Современные методы лечения онкологических заболеваний достаточно эффективны, однако, если не произошло полной элиминации ОСК, то возникновение рецидива – лишь вопрос времени.

По данным сайта Cancer Therapy Advisor (интернет-ресурс <https://www.cancertherapyadvisor.com/factsheets/cancer-recurrence-statistics/>) уровень рецидивов онкологических заболеваний на 2019 год варьировал от ~10 % (для опухолей с низким уровнем рецидивов: эстроген-зависимый рак молочной железы, лимфома Ходжкина, ранние стадии остеосаркомы) до 85–100 % (опухоли с высоким уровнем рецидивов: рак яичников, глиобластома). Очевидно, что существующие методы терапии онкологических заболеваний не справляются с проблемой полной элиминации ОСК. В связи с этим поиск новых более универсальных маркеров ОСК и подходов направленного удаления указанных клеток до сих пор являются актуальными.

1.2.3. Основные характеристики опухолевых стволовых клеток и определяющие их молекулярные сигнальные пути

1.2.3.1. Поддержание низкодифференцированного состояния

ОСК и ЭСК имеют много общих характеристик, такие как потенциал дифференцировки, самообновление и поддержание низкодифференцированного статуса. Исследования показали, что сходные механизмы могут быть вовлечены в регуляцию как ОСК, так и ЭСК.

ОСТ-4, NANOG и SOX2 – три плюрипотентных факторов транскрипции, которые, как известно, способствуют перепрограммированию соматических клеток в ЭСК-подобное состояние. По существующим данным из терминально дифференцированных фибробластов можно получить индуцированные плюрипотентные СК путем одновременной активации четырех ключевых транскрипционных факторов: ОСТ-4, SOX2, KLF4 и с-Мус (Takahashi, Yamanaka, 2006). В опухолях указанные транскрипционные факторы способствуют сохранению стволовых функций ОСК. Подобно ЭСК указанные факторы сверхэкспрессируются в ОСК многих типов опухолей, что положительно коррелирует с повышенной туморогенностью, метастазированием и устойчивостью к лечению (Liu, Yu, Liu, 2013).

ОСТ-4 активирует сигнальный каскад Oct-4/Tcl1/Akt1. При этом TCL1 транскрипционно контролируется ОСТ-4 и усиливает киназную активность АКТ1, активация

которого может способствовать пролиферации клеток, а также ингибированию апоптоза, химиорезистентности и выживанию ОСК (Müller et al., 2016).

SOX2 участвует в Sox2/Orai1/STIM1-сигнальном пути. Депо-управляемый вход Ca^{2+} (SOCE, Store-operated calcium entry) играет важную роль во множестве физиологических и патофизиологических процессов, включая апоптоз, устойчивость к химио-/радиотерапии, клеточной пролиферации и поддержании стволовых свойств ОСК (Chen et al., 2019). Ключевыми компонентами SOCE являются белки ORAI1 и STIM1. ORAI1 расположен в цитоплазматической мембране, тогда как STIM1 в мембране эндоплазматического ретикулума, как кальциевый сенсор. При снижении содержания ионов Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме STIM1 меняет свою конформацию и диффундирует вместе с мембраной эндоплазматического ретикулума к плазматической мембране. Там он соединяется с ORAI1 и/или STIM2 каналом и за счет контакта типа «белок–белок» активирует их, что способствует входу ионов Ca^{2+} из внеклеточной среды в цитозоль. Повышение экспрессии SOX2 снижает экспрессию ORAI1, тем самым снижая SOCE (Liu, Yu, Liu, 2013; Циркин, Сизова, 2020). Кроме того, SOX2 регулирует передачу сигналов FGF (фактор роста фибробластов), IL-4/STAT6 и EGFR-SRC-AKT, а также поддерживает и/или усиливает ключевые сигнальные каскады, необходимые для опухолевой прогрессии (с-Myc, Wnt1, Wnt2 и Notch1) (Müller et al., 2016).

NANOG является прямой мишенью пути LIF/Stat3, а также участвует в поддержании самообновления ОСК посредством передачи сигналов от рецептора IGF1 (инсулиноподобный фактор роста 1). Сверхэкспрессия NANOG усиливает экспрессию многих молекул, связанных с функционированием ОСК, таких как CD133, ABCG2, ALDH1A1 и CD44 (Liu, Yu, Liu, 2013).

KLF4 (Krüppel-like Factor 4) относится к семейству эволюционно консервативных транскрипционных факторов типа «цинковые пальцы». Транскрипционные факторы семейства KLF участвуют во многих процессах, включая развитие, дифференцировку, пролиферацию как в нормальных тканях в процессе эмбриогенеза, так и в процессе развития неоплазии. Как было сказано ранее, KLF также участвует в процессе активации теломеразы в опухолевых клетках, тем самым способствуя сохранению теломерных повторов. Роль KLF в онкогенезе неоднозначная. Показана его проопухолевая роль в поддержании, миграции и инвазии рака молочной железы. С другой стороны, при опухолях желудочно-кишечного тракта он действует как супрессор, ингибируя рост опухоли и метастазирование (He, He, Xie, 2023). На культурах колоректального рака человека показано, что KLF регулирует сохранение мезенхимальных и стволовых свойств Lgr5+, CD44+, EpCAM+ ОСК посредством TGF- β 1/Smad/Snail-сигнального пути (Leng et al., 2020).

С-Мус – фактор транскрипции, управляющий обширной генной сетью, которая участвует в регуляции роста, развития и пролиферации клеток, а также играет важную роль в поддержании функциональной устойчивости СК. Уровень экспрессии с-Мус на эмбриональной стадии развития значителен. При снижении пролиферативной активности клеток в развитых тканях и органах экспрессия указанного фактора снижается (Elbadawy et al., 2019).

С-Мус является мишенью Wnt/ β -catenin-сигнального пути. Именно этот сигнальный каскад участвует в поддержании плюрипотентного состояния СК (Fernandez et al., 2014). Когда сигнальный путь Wnt деактивирован, сохраняется низкий цитоплазматический уровень β -catenin. При активации Wnt-сигнального каскада количество β -catenin в цитоплазме увеличивается, и фактор мигрирует в ядро, где он служит транскрипционным активатором для с-Мус и циклина D1, участвующих в регуляции клеточного цикла (Elbadawy et al., 2019; Müller et al., 2016; Zhang et al., 2019). С-Мус, в свою очередь, кооперируясь с транскрипционными факторами SOX2, NANOG и OCT-4, активирует транскрипцию ряда генов, связанных с сохранением стволовых свойств клетки. Например, гена *HIF2a*, кодирующего транскрипционный фактор, участвующий в молекулярном механизме самообновления ЭСК (Das et al., 2019).

Поддержание недифференцированного состояния как опухолевых клеток, так и многих других типов СК (ЭСК, индуцированные плюрипотентные СК, гемопоэтические СК) также связано с инактивацией сигнального каскада ретиноевой кислоты (Ablain, Thé, 2014).

Витамин А или ретинол – жирорастворимый витамин, необходимый позвоночным организмам для эмбриогенеза, нормального роста и развития. Модель метаболизма ретинола в клетке представляет собой следующую схему. Он связывается с транстретином и ретинол-связывающим белком, образуя тройной комплекс, который взаимодействует с рецептором STRA6 на поверхности клетки-мишени. Внутри цитоплазмы ретинол образует комплекс с клеточным ретинол-связывающим белком и окисляется до ретинальдегида алкогольдегидрогеназой. На следующем этапе метаболизма ретинальдегид преобразуется в ретиноевую кислоту с помощью ретинальдегиддегидрогеназы. Затем ретиноевая кислота, взаимодействуя с клеточным рецептором CRABP, транспортируется в ядро. В ядре ретиноевая кислота формирует ассоциат с рецепторами RAR и RXR, которые принадлежат к семейству лиганд-зависимых транскрипционных регуляторов. Весь этот комплекс связывается с промоторной областью генов, чувствительных к ретиноевой кислоте, в результате чего происходит активация последних (Khillan, 2014).

Компоненты сигнального пути ретиноевой кислоты взаимодействуют с факторами роста фибробластов и компонентами многих других сигнальных каскадов, в частности с Wnt/ β -catenin, Shh (Sonic hedgehog), которые определяют дифференцировку клеток и поддержание недифференцированного состояния (Das et al., 2014). Кроме того, ретинол активирует PI3 киназу, взаимодействуя с IGF1 рецептором. Это приводит к активации Akt/PKB посредством фосфорилирования по серину 308 и серину 473, что активирует нижестоящие целевые комплексы mTORC1 и mTORC2, а в конечном итоге – экспрессию специфичных для СК генов *NANOG* и *OCT-4* (Khillan, 2014).

Показано, что добавление ретиноевой кислоты к СК индуцирует их дифференцировку (Illendula, Fultang, Peethambaran, 2020). Интригующим является факт, что ОСК не имеют ферментов метаболизма ретинола, то есть не способны самостоятельно производить ретиноевую кислоту. Они получают ретиноевую кислоту путем диффузии от соседних дифференцированных клеток (из своего микроокружения) (Khillan, 2014).

1.2.3.2. Асимметричное/симметричное деление

Асимметричное деление – механизм, обычно используемый СК для поддержания гомеостаза тканей. В процессе такого деления происходит образование двух дочерних клеток, одна из которых остается стволовой, сохраняя функцию самообновления, а вторая, коммитированная клетка, претерпевает дальнейшую дифференцировку. Такой механизм позволяет не только производить специализированные клетки различных тканей, но также поддерживать численность популяции СК, предотвращая их деплецию или ненормальное увеличение количества. Как ОСК, так и нормальные СК иногда расширяют свою популяцию под воздействием определенных процессов, таких как развитие, повреждение тканей и рост опухоли. Они достигают этой цели посредством симметричного деления, в результате которого образуются две дочерние СК (Yoo, Kwon, 2015). Показано, что нарушение регуляции между асимметричным и симметричным делениями и сдвиг в сторону последнего может привести к дисплазии ткани и является фактором риска развития туморогенного процесса (Bu et al., 2013; Chao, Yan, Bu, 2024).

В контексте понятия «опухоль» асимметричное деление позволяет ОСК, аналогично СК в здоровых тканях, воспроизводить дочерние дифференцированные клетки, образующие основную массу опухоли и придающие ей гетерогенное строение (Li et al., 2022). Скорость асимметричного деления не высокая, и такой тип деления свойственен опухолям на ранних стадиях развития. Симметричный тип деления ОСК характеризуется высоким пролиферативным уровнем (Bu et al., 2013).

При асимметричном делении в процессе развития опухоли одна из клеток, сохраняющая стволовые свойства, может приобретать еще более агрессивные характеристики. Например, было показано, что при асимметричном делении ОСК глиобластомы клетка, наследующая маркер стволовости CD133, одновременно обогащается рецепторами эпидермального фактора роста (EGFR, Epidermal growth factor receptor) и p75NTR (p75 neurotrophin receptor, нейротрофиновый рецептор 75), участвующими в процессах развития опухоли и метастазирования. Эти два рецептора, взаимодействуя друг с другом, защищают клетку от давления сигналов к дифференцировке и способствуют приобретению устойчивости к стандартным схемам лечения темозоломидом и/или ионизирующим излучением (Hitomi et al., 2021).

Асимметричное деление – четко контролируемый процесс, зависящий как от внутренних, так и от внешних факторов. Внутренние факторы представляют собой распределенные на апикальной и базальной сторонах клетки специфические белки, а также органеллы (митохондрии, лизосомы, эндоплазматический ретикулум), мРНК и другие клеточные компоненты, которые в процессе деления будут наследоваться между клетками неравномерно.

Так, в СК млекопитающих ГТФ-связывающий белок CDC42 способствует накоплению aPKC, который формирует комплекс с PAR6/PAR3 на апикальной стороне клетки. Активированный aPKC фосфорилирует NUMB, тем самым деактивируя его тормозящее действие на Notch-сигнальный путь. Это способствует активации программы сохранения стволовых свойств в дочерней клетке, которая в последствии остается стволовой. В базальной части адаптерный белок Miranda подвергается деградации. Это приводит к освобождению транскрипционного фактора PROX1, инициирующего программу дифференцировки (Chao, Yan, Wu, 2024).

Внешняя регуляция деления СК/ОСК и «судьбы» дочерних клеток обеспечивается сигналами, поступающими из микроокружения (стволовых ниш). СК (в первую очередь нормальные СК) находятся в тесном контакте с клетками стволовой ниши, что имеет решающее значение для поддержания стволовости и потенциала самообновления. Во время деления только одна из дочерних клеток может контактировать со стволовой нишей благодаря перпендикулярной ориентации митотического веретена к поверхности ниши. Потомок, соприкасающийся со стволовой нишей, сохраняет способность к самообновлению. Другая клетка, расположенная от нее дистально, уходит в дифференцировку (Majumdar, Liu, 2020; Yoo, Kwon, 2015).

Внешними сигналами, позволяющими одной из дочерних клеток сохранять стволовые свойства, являются секретируемые микроокружением лиганды (цитокины и ростовые факторы), к которым относятся TGF- β , WNT, SHN и NOTCH. Внутриклеточные регуляторы PTEN, BMI1, p53, p21 обеспечивают интеграцию этих сигналов, также участвуя в процессах самообновления и поддержания стволовых функций как нормальных, так и ОСК (Chao, Yan, Bu, 2024; Yoo, Kwon, 2015).

Wnt-сигнальный путь состоит из сети 19 Wnt-лигандов, 10 рецепторов Frizzled (FZD) и нескольких корецепторов, включая LRP5/6, ROR1/2, PTK7 и RYK. Связывание Wnt-лигандов с рецепторным комплексом FZD-LRP5/6, расположенным на клеточной поверхности, приводит к активации Wnt/ β -catenin-сигнального каскада, также известного как **канонический путь Wnt**. Эти события приводят к накоплению в цитоплазме белков β -catenin и их перемещению в ядро, где они взаимодействуют с семейством транскрипционных факторов TCF (T-cell specific factor)/LEF (Lymphoid enhancerbinding factor), регулируя экспрессию генов-мишеней Wnt, таких как *AXIN2*, *NKD1*, *MYC*, *CCND1*, *TERT*, *HES1* и др. (Rajakulendran et al., 2019). Инактивация β -catenin характеризуется формированием «деструктивного комплекса», включающего в себя протеинкиназу GSK3, опухолевый супрессор APC, белок Axin и казеинкиназу 1 α (CK1 α). GSK3 фосфорилирует β -catenin, что приводит к его убиквитинированию убиквитинлигазой E3 (β -TrCP) и последующей деградации в протеасоме. В этом случае миграция β -catenin в ядро прекращается, что позволяет репрессорному комплексу TCF/LEF связываться с промоторной областью и подавлять транскрипцию целевых генов. Несколько корепрессоров участвуют в этом процессе. Наиболее интенсивно изучаемыми являются корепрессоры семейства TLE (Transducing-like enhancer protein)/Groucho, которые благодаря наличию на своих N-концах консервативного богатого глутамином домена Q связываются с центральной частью TCF/LEF, усиливая его специфическую активность (Cadigan, Waterman, 2012; Kumar et al., 2021; Rajakulendran et al., 2019).

Показано, что канонический путь Wnt имеет решающее значение для поддержания стволовых свойств ОСК в результате активации многочисленных генных платформ, основными маркерами активности которых являются OCT-4, CD24, Prom1, CD44 и ALDH1 (Manni, Min, 2022).

Notch-сигнальный путь активируется в результате взаимодействия пяти лигандов (Jagged-1, -2 и Delta-like-1, -3 и -4) и четырех специфических рецепторов Notch (Notch 1–4), которые представляют собой трансмембранные белки типа I. Notch обеспечивает межклеточную коммуникацию ближнего действия, при которой происходит взаимодействие

с лигандами, присутствующими на соседних клетках. Связывание лигандов Notch с их рецепторами запускает расщепление последних металлопротеиназами ADAM10 и ADAM17, что приводит на первом этапе к отщеплению внеклеточной части рецептора. На втором этапе происходит расщепление γ -секретазой трансмембранной части рецептора, после чего внутриклеточный домен высвобождается из плазматической мембраны и перемещается в ядро. Здесь он взаимодействует с репрессорным комплексом CSL (CBF1/Suppressor of Hairless/LAG1, также называемым RBPJ) и конвертирует его в коактиваторный, тем самым запуская транскрипцию целевых генов (Kumar et al., 2021; Xia et al., 2022).

Сигнальный путь Notch активен в нормальных СК и в ОСК. Он контролирует их самообновление и препятствует дифференцировке. На клетках линий медуллобластомы, глиобластомы, колоректального рака было показано, что сигнальный путь Notch активирован именно в ОСК (Wang, Sullenger and Rich, 2012; Bisset et al., 2023). Ингибирование компонентов пути приводит к снижению пролиферации и выживаемости клеток. В этой связи в некоторых типах опухолей сигнальный каскад Notch можно использовать для таргетного воздействия на ОСК (Kumar et al., 2021).

Основными компонентами *сигнального пути Hedgehog* являются лиганды SHH (Sonic hedgehog), IHH (Indian Hedgehog) и DHH (Desert hedgehog), рецепторный белок с 12-трансмембранными доменами Patched (PTCH), 7-трансмембранный G-белок-сопряженный рецептор Smoothened (SMO), цитоплазматический супрессор слитого белка (SUFU) и факторы транскрипции глиомо-ассоциированного онкогена (GLI). В отсутствие лигандов PTCH1 ингибирует накопление SMO, что приводит к блокировке активности Hedgehog-пути. Связывание лигандов Hedgehog с PTCH1 вызывает интернализацию и деградацию последних, тем самым высвобождая SMO, который способствует диссоциации комплекса SUFU-GLI. Это активирует факторы транскрипции GLI и их транслокацию в ядро, тем самым запуская экспрессию генов-мишеней Hedgehog, таких как *GLI1* и *PTCH* (Kumar et al., 2021; Xia et al., 2022).

Сигнальный путь Hedgehog активен в различных типах опухолей, в том числе при раке молочной железы (Cui et al., 2010), в медуллобластомах, глиобластомах, саркомах, при колоректальном раке (Douard et al., 2006; Ruiz i Altaba, Sánchez, Dahmane, 2002).

Активация сигнальных путей Wnt, Notch и Hedgehog обеспечивает способность ОСК к самообновлению и неограниченной пролиферации. Блокировка указанных сигнальных путей, активных в клетках определенных опухолей, приводит к торможению их роста и снижению агрессивности.

Помимо упомянутых выше факторов, некоторые неканонические сигнальные пути, например, Мус-сигнальный путь, могут напрямую или опосредованно влиять на тип деления клеток (симметричный/асимметричный). На модели первичных нейральных СК мышей показано, что баланс между поддержанием и дифференцировкой СК зависит от соотношения убиквитинированных и деубиквитинированных ключевых факторов транскрипции СК, опосредованных парами убиквитинлигаз E3 (TRIM32) и деубиквитинирующих ферментов (USP7). Так, TRIM32 убиквитинирует с-Мус, что приводит к деградации последнего, приводя к запуску программы дифференцировки (Chao, Yan, Bu, 2024; Nicklas et al., 2019). Кроме того есть данные, что TRIM32 также взаимодействует с рецептором ретиноевой кислоты α (RAR α), усиливая его транскрипционную активность, что приводит к дифференцировке первичных нейральных СК (Sato et al., 2011).

Как показал анализ литературы, деление на две дочерние клетки как нормальных СК в здоровых тканях, так и ОСК имеет общие базовые характеристики. Тонкий механизм регуляции между двумя типами деления (симметричным и асимметричным) позволяет обоим типам клеток контролировать численность самих себя и своих коммитированных потомков (Bu et al., 2013; Chao, Yan, Bu, 2024; Yoo, Kwon, 2015).

1.2.3.3. Эпителиально-мезенхимальный переход, аноикис, метастазирование

Одним из возможных механизмов возникновения ОСК считается дедифференцировка опухолевых клеток, то есть образование клетки с фенотипом ОСК из «дифференцированного потомства». Это означает, что неоднородная система строения опухоли, где на вершине иерархической структуры находятся ОСК, не статична, и возможны переходы между субпопуляциями опухолевых клеток (Friedmann-Morvinski, Verma, 2014; Фармаковская и др., 2015). Эту идею поддерживают исследования, показывающие спонтанное возникновение клеток с фенотипом ОСК из популяции дифференцированных нормальных клеток, либо, в случае опухолей, из популяции клеток, в которой они были целенаправленно удалены. Так, например, в работе (Chaffer et al., 2011) на примере первичной культуры эпителиальных клеток молочной железы человека было показано, что клетки с фенотипом ОСК (CD44^{hi}) могут спонтанно появляться *in vitro* в общей массе клеток и в культуре отсортированных CD44^{lo} клеток, а также в системе *in vivo* при перевивке NOD/SCID мышам CD44^{lo} популяции.

Считается, что ЭМП играет значительную роль при трансформации опухолевых клеток в ОСК-подобное состояние (Mani et al., 2008; Singh, Settleman, 2010; Tanabe et al., 2020; Wang et al., 2015).

ЭМП – обратимый процесс приобретения клетками с изначально эпителиальным фенотипом набора морфологических признаков и функциональных свойств мезенхимальных

клеток. В ходе ЭМП клетка теряет контакты с окружением, открепляется от базальной мембраны, становится способной к подвижности и инвазии, что обусловлено глобальным изменением профиля экспрессии и метаболизма. Таким образом, ЭМП определяет прометастатический потенциал клеток, что позволяет опухоли осуществлять инвазию в окружающие ткани и диссеминировать в организме. Перечисленные свойства характерны для ОСК, что указывает на тесную взаимосвязь молекулярных характеристик клеток в состоянии ЭМП и ОСК. Активация ЭМП сопряжена с агрессивным развитием опухоли, устойчивостью к лечению и неблагоприятным прогнозом для пациента (Kahlert, Joseph, Kruyt, 2017).

Потеря клеткой связи с базальной мембраной и микроокружением происходит за счет разрушения адгезивных контактов, в первую очередь за счет снижения синтеза E-кадгерина, нарушением его связи с β -catenin и микрофиламентами. β -catenin, освобожденный от связи с E-кадгерином, проникает в ядро клетки и усиливает экспрессию некоторых звеньев Wnt-сигнального пути, что в свою очередь дополнительно активирует запуск ЭМП. Кроме того, β -catenin становится частью TCF/LEF комплекса, который также участвует в программе запуска ЭМП (Kalluri, Weinberg, 2009).

На первом этапе ЭМП наблюдается разрушение субапикальных плотных контактов (снижение экспрессии клаудина, окклюдина и ZO-1), десмосом и щелевых контактов (снижение синтеза коннексина). Происходит перестройка цитоскелета, увеличивается количество виментиновых микрофиламентов, в результате чего формируются мембранные выросты (ламеллоподии, филоподии), усиливается синтез фибронектина и N-кадгерина, теряется апикально-базальная полярность и приобретает, так называемая, передне-задняя полярность (Lamouille, Xu, Derynck, 2014). Находясь в таком состоянии, клетка обладает направленной подвижностью и способностью осуществлять инвазию в окружающие ткани и кровеносные сосуды (Greaves, Calle, 2022; Пучинская, 2015).

Механизмы регуляции ЭМП разнообразны. В этом процессе принимают участие ростовые факторы, ауто-, пара- и эндокринные сигналы, сигнальные молекулы, активирующие внутриклеточные сигнальные пути, и транскрипционные факторы. Следует отметить немаловажную роль опухолевой стромы, которая при помощи синтеза ЭМП-индуцирующих сигнальных молекул, таких как HGF (Hepatocyte growth factor), EGF (Epidermal growth factor), PDGF (Platelet-derived growth factor) и TGF- β , активирует транскрипционные факторы, участвующие в запуске указанного процесса (Kalluri, Weinberg, 2009). Недавно было показано, что иммуносупрессирующие и хемотаксические цитокины, способствующие привлечению иммунных клеток в опухолевое микроокружение, такие как IL-6, IL-8, IL-10 и TNF- α , также индуцируют ЭМП в опухолевых клетках (Greaves, Calle, 2022).

Факторы, влияющие на ЭМП, можно разделить на три группы: сигнальные молекулы, запускающие процесс ЭМП; транскрипционные факторы, участвующие в передаче сигнала и активации/торможении синтеза определенных генов; эффекторы (маркеры) – белки, кодируемые генами-мишенями, экспрессия которых обуславливает эпителиальный и/или мезенхимальный фенотип и функциональные свойства клетки.

В запуске ЭМП принимает участие широкий спектр сигнальных путей: TGF- β /BMP (Bone morphogenetic protein), Wnt/ β -catenin, TKR (Tyrosine kinase receptor), T-lymphoma invasion and metastasis inducing protein 1/Rac family small GTPase1, Notch, Hedgehog, YAP/TAZ (Deshmukh et al., 2021; Škovierová et al., 2018). Следует отметить, что в большинстве клеточных процессов, включая ЭМП, ответ на конкретный сигнал не является результатом одного линейного сигнального пути, а отражает интеграцию путей, которая может происходить на нескольких уровнях. То есть запуск ЭМП является результатом сложных взаимодействий, которые существуют между внутриклеточными сигнальными путями. Блокирование одного сигнального каскада приводит к активации «обходного пути», в результате чего добиться полного выключения программы ЭМП в опухолевых клетках крайне сложно (Deshmukh et al., 2021; Lamouille, Xu, Derynck, 2014).

Основной сигнальной молекулой, запускающей ЭМП, считается цитокин TGF- β . TGF- β связывается с двумя разными рецепторами серин/треонинкиназы: TGF- β типа I (T β RI) и типа II (T β RII), которые могут активировать SMAD-зависимый и SMAD-не зависимый пути активации этого сигнального пути (Chen, Liao, Yang, 2018; Škovierová et al., 2018; Гапонова и др., 2020). В первом варианте активированный T β RI фосфорилирует комплекс SMAD2/3, который в свою очередь связывается со SMAD4. Вместе они формируют гетерогенный агрегат, который транспортируется в ядро и регулирует транскрипцию ряда генов, участвующих в процессе активации ЭМП. TGF- β /SMAD сигнальный каскад сам участвует в регуляции, так и регулируется другими сигнальными путями, такими как Ras, PI3K, Wnt/ β -catenin/LEF (Kalluri, Weinberg, 2009; Škovierová et al., 2018). Во втором случае активация ЭМП происходит посредством PI3K/Akt-сигнального каскада, который также запускается через рецепторы TGF- β (Škovierová et al., 2018) (**Рисунок 1**).

TGF- β -сигнальный путь активирует транскрипционные факторы, являющиеся ключевыми регуляторами ЭМП: SNAIL1, SNAIL2 (SLUG), ZEB и TWIST (**Рисунок 1**). Комплекс транскрипционных факторов SNAIL (SNAIL1 и SNAIL2) связывается с последовательностью E-бокса в промоторной области гена *CDH1*, кодирующего E-кадгерин, что приводит к репрессии его транскрипции (Škovierová et al., 2018).

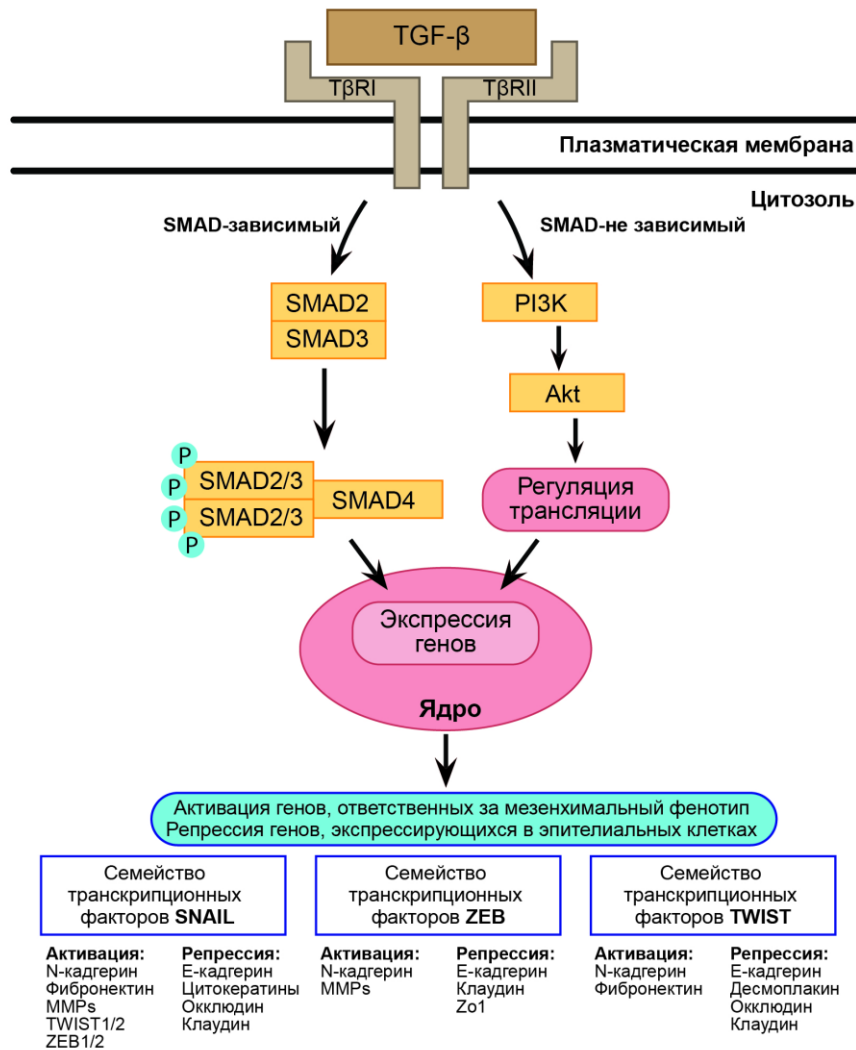


Рис. 1. Схема активации ЭМП посредством цитокина TGF-β. TGF-β связывается со своими рецепторами (TβR) и активирует ЭМП при помощи SMAD-сигнального пути. SMAD2/3 комплекс фосфорилируется и связывается с белком SMAD4. Далее образованный комплекс попадает в ядро и взаимодействует с транскрипционными факторами, регулируя тем самым экспрессию генов, специфических для ЭМП. Ключевыми транскрипционными факторами являются SNAIL, ZEB и TWIST. Кроме того, TGF-β может индуцировать ЭМП через SMAD-независимый путь, активируя каскад PI3K/Akt, что также приводит к транскрипционной регуляции факторов ЭМП.

Вторая группа транскрипционных факторов, участвующих в процессе активации ЭМП – семейство ZEB (Zinc finger E-box-binding homeobox), состоящее из ZEB1 и ZEB2. Активация указанных молекул сопряжена с развитием устойчивости к терапевтическим агентам, ассоциирована с репрессией проапоптотических генов и регулирует TGF-β, Wnt и Ras-MAPK-сигнальные каскады. Показано, что повышенная экспрессия ZEB коррелирует с последующей активацией SNAIL1 (Lamouille, Xu, Derynck, 2014; Lemma et al., 2013; Škovierová et al., 2018).

Третья группа транскрипционных факторов представлена семейством спираль-петля-спираль (helix-loop-helix) содержащих белков TWIST1 и TWIST2. Наподобие SNAIL и ZEB эти транскрипционные факторы связываются с промоторной областью гена *CDH1* и ингибируют экспрессию Е-кадгерина, а также репрессируют активность генов, ответственных за формирование эпителиального фенотипа, и активируют гены, способствующие формированию мезенхимальных свойств, например, активирует экспрессию N-кадгерина (Škovierová et al., 2018). Показано, что TWIST1 участвует в программах самообновления, устойчивости к апоптозу в клетках лейкемии, подавляет let-7i, что активирует ARID3B (chromatin modifier AT-rich interacting domain 3B), который в свою очередь запускает экспрессию генов, ответственных за стволовые характеристики (Chen, Liao, Yang, 2018). TWIST1 может активироваться TNF- α посредством активации NF- κ B-сигнального пути. Кроме того, гипоксия или сверхэкспрессия HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1- α) активируют синтез TWIST, напрямую связываясь с гипоксия-зависимым элементом в проксимальной области промотора гена *TWIST* (Yang, Wu, 2008).

Известно, что транскрипционный фактор BMI1 также может индуцировать ЭМП и способствовать метастазированию клеток опухоли. Кроме того, указанный белок играет роль в функционировании ОСК и поддержанию их свойств, и, в частности, влияет на процесс самообновления. Он напрямую связывается с опухолевым супрессором PTEN, ингибируя его активность (Liu et al., 2017). Как было сказано выше, снижение или полное отсутствие функциональной активности PTEN поддерживает неконтролируемую пролиферацию неоттрансформированных клеток.

В процессе ЭМП клетка претерпевает **реорганизацию актинового цитоскелета** таким образом, что приобретает способность к формированию выпячиваний в мембране, которые называются ламеллоподиями, а также шиповидных отростков на краях ламеллоподий которые носят название филоподий. Эти структуры дают клетке возможность направленного движения. Изменение цитоскелета и мембранная пластичность являются отличительными особенностями ОСК, благодаря которым указанные клетки способны осуществлять инвазию в окружающие ткани и кровеносные сосуды, тем самым распространяясь по организму (метастазирование) (Zhang et al., 2012).

Регуляцию перестройки актинового цитоскелета осуществляют белки семейства Rho-ГТФаз (семейство ферментов гидролаз, которые связывают и гидролизуют гуанозинтрифосфат): RhoA, Rac1 и Cdc42. RhoA способствует образованию актиновых стрессовых волокон. Rac1 и Cdc42 способствуют образованию ламеллоподий и филоподий. Активация Rho-ГТФаз регулируется факторами обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF),

белками, активирующими ГТФазы (GAP), и ингибиторами диссоциации гуаниновых нуклеотидов (GDI). Следует отметить, что Rho-ГТФазы также регулируют образование комплексов межклеточных соединений и стабильность адгезии (Lamouille, Xu, Derynck, 2014). Цитоплазматический катенин p120, который вырабатывается в процессе ЭМП, подавляет активность Rho. Это может способствовать диссоциации клеточных соединений и активировать Rac и Cdc42, тем самым индуцируя механизм мобильности клеток (Kourtidis, Ngok, Anastasiadis, 2013; Lamouille, Xu, Derynck, 2014).

Преобразование апикально-базальной полярности в передне-заднюю включает взаимодействие между Rho-ГТФазами и белками, определяющими эту самую апикально-базальную полярность. В формировании апикального компартмента участвуют белки PAR-комплекса (PAR6, PAR3 и aPKC). Базолатеральный компартмент формируют белки Scribble комплекса, а также DGL (Discs large) и LGL (Lethal giant larvae).

Для достижения направленной полярности комплексы PAR и Scribble вместе с белком PATJ комплекса Crumbs перемещаются к переднему краю клетки, где Rac1 и Cdc42 активируют полимеризацию актина и образование выпячиваний мембраны. Напротив, RhoA локализуется в задней части клетки и способствует разборке адгезивных комплексов и сокращению клетки. PI3K играет центральную роль в инициации передне-задней полярности и участвует в привлечении Cdc42 и Rac1 к переднему краю клетки (Grosheva et al., 2000; Lamouille, Xu, Derynck, 2014).

Отделившись от своего окружения и имея функцию направленной подвижности, клетка может достигнуть сосуда и проникнуть в кровяное русло. Большинство солидных опухолей включены в сложную сеть внеклеточного матрикса, базальной мембраны и сосудистой сети, представляющую собой множественные физические барьеры, которые необходимо преодолеть метастатическим опухолевым клеткам.

Первым барьером на пути движения является базальная мембрана, далее — окружающий клетку экстрацеллюлярный матрикс. В процессе деградации указанных элементов активную роль играют матриксные металлопротеиназы (основные MMP-2 и MMP-9), экспрессия которых повышена при ЭМП и регулируется сложной сетью описанных сигнальных путей (Notary et al., 2006; Lamouille, Xu, Derynck, 2014). Кроме того, одной из мишеней деградации MMP является E-кадгерин, что дополнительно способствует поддержанию мезенхимального фенотипа (Škovierová et al., 2018).

Преодолев базальную мембрану, опухолевые клетки оказываются в непосредственном контакте со стромальными фибробластами. Секретируемые опухолью ростовые факторы, такие как PDGF и TGF- β , изменяют фенотип фибробластов к фенотипу мио-фибробластов

(Bierie, Moses, 2006). Такие модифицированные опухолью стромальные фибробласты являются богатым источником протеолитических ферментов, в том числе ММР и катепсинов (Bhowmick, Neilson, Moses, 2004; Olumi et al., 1999; Sternlicht et al., 1999), которые могут стимулировать рост клеток опухоли и инвазию. Наличие активированных стромальных фибробластов создает благоприятные условия для миграции опухолевых клеток.

Экспериментально было показано, что одной из предпосылок для метастатического роста опухоли является индукция ангиогенеза (Bergers, Benjamin, 2003). Для проникновения в просвет сосуда опухолевые клетки должны разрушить сосудистую базальную мембрану и попасть в кровяное русло. В экспериментах *in vivo* было показано, что проникновение в кровяное русло зависит от деятельности ММР-9, супрессия которой лимитирует скорость метастазирования (Kim et al., 1998).

Еще одной важной функцией, приобретаемой клеткой в процессе ЭМП, является развитие *устойчивости к аноикису*. Аноикис – это запрограммированная клеточная гибель эндотелиальных и эпителиальных клеток путем апоптоза, индуцируемая в процессе открепления от ЭКМ или нарушений связи с клеточным микроокружением. В норме аноикис предотвращает колонизацию отделившихся клеток в новом месте и способствует поддержанию тканевого гомеостаза. Резистентность к аноикису является характерным свойством ОСК. Так, например, было показано, что ОСК в культурах рака молочной железы MDA-MB-453 и MDA-MB-231 были устойчивы к аноикису в отличие от клеток, не обладающих фенотипом ОСК. При этом совместное культивирование двух субпопуляций клеток придавало последним устойчивость к аноикису («эффект свидетеля») (Kim et al., 2016).

Существует два типа активации аноикиса: внешний, инициирующийся в процессе получения и обработки внеклеточных сигналов (например, при взаимодействии Fas-рецептора и Fas-лиганда), и внутриклеточный, запускающийся в ответ на возникновение сигналов внутриклеточного происхождения (**Рисунок 2**).

Во внутриклеточном механизме главную роль играют проапоптотические белки Вах и Вак, которые транспортируются на внешнюю мембрану митохондрий, олигомеризуются, в результате чего в мембране митохондрий формируются каналы. Цитохром С выходит в цитоплазму и в комплексе с каспазой-9 и белком Араф формирует апоптосому. Указанный комплекс активирует каспазу-3, что запускает программу апоптоза. Активатором такого пути также служит Bim, член BH3-only семейства, находящийся во взаимодействии с динеиновым комплексом цитоскелета, когда клетка прикреплена к ЭКМ. При нарушении клеточного взаимодействия, Bim высвобождается и дополнительно активирует олигомеризацию Вах и Вак. Другие члены BH3-only семейства, такие как Bad, Bik, Bmf, Noxa и Puma, так называемые

сенсализаторы, подавляют функцию антиапоптотического белка Bcl-2, который в свою очередь, предотвращает олигомеризацию Bax/Bak (Cao, Livas, Kyriakou, 2016; Kim et al., 2012; Paoli, Giannoni, Chiarugi, 2013).

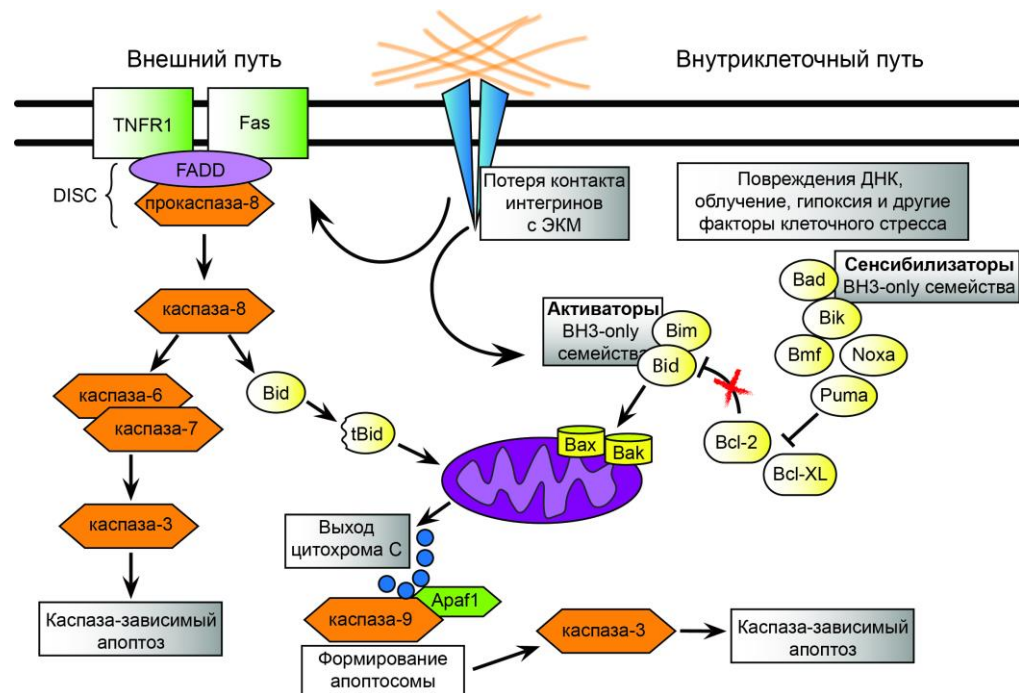


Рис. 2. Пути активации аноикса. Потеря клеткой взаимодействия с ЭКМ приводит к снижению уровня сигналов выживания, таким образом активируя аноикс, запускающийся через рецепторы смерти или митохондрии. Внешний путь активации происходит за счет взаимодействия специфических лигандов с Fas и/или TNFR1 рецепторами. При этом формируется FADD комплекс и либо через активацию каспазы-7, либо посредством укороченной формы Bid (tBid) происходит высвобождение митохондриального цитохрома C, далее сборка апоптосомы и протеолиз мишени. Внутриклеточный путь индуцируется увеличением количества проапоптотических молекул, таких как Bad, Bik, Puma, Bmf и Noxa, которые противодействуют антиапоптотическим белкам семейства Bcl-2. В результате этого активируется митохондриальный путь запуска аноикса (рисунок на основе работы (Paoli, Giannoni, Chiarugi, 2013) с модификациями).

Внешний механизм активации аноикса происходит через активацию Fas-рецепторов специфическими лигандами, такими как TNF- α , FasL и TRAIL. Происходит их олигомеризация, в результате чего каспаза-8 связывается с DED-доменом (Death Effector Domain) комплекса FADD (Fas-associated death domain) и продуцируется DISC (Death-inducing signaling complex). DISC стимулирует активацию каспазы-8 путем ее димеризации. В таком виде каспаза-8 выходит в цитоплазму и активирует, в свою очередь, каспазы-7 и -3, что запускает каспаза-зависимый апоптоз (**Рисунок 2**).

FLIP (FLICE-inhibitory protein) – эндогенный ингибитор рецептор-опосредованного апоптоза. Он состоит из двух DED-доменов и каспаза-8-подобного домена, имеющим большее

сродство к DISC. FLIP предотвращает активацию каспазы-8, которая происходит за счет взаимодействия с DED. В нормальных условиях открепление клетки от ЭКМ приводит к усилению синтеза Fas и FasL и снижению FLIP. В опухолевых клетках экспрессия FLIP повышена, что приводит к развитию устойчивости к апоптозу (Riley et al., 2013). Кроме того, как уже было сказано, активация специфических сигнальных путей, запускающих программу ЭМП, а также регуляция синтеза интегринов вносят вклад в развитие резистентности к апоптозу.

Интегрины представляют собой большое семейство гомологичных трансмембранных белков клеточной адгезии, которые связывают матрикс с цитоскелетом или служат молекулами межклеточной адгезии путем распознавания фибронектина и ламинина – основных связующих компонентов ЭКМ. Интегрины регулируют передачу сигнала в клетку из ЭКМ при помощи интегрин-активирующихся сигнальных молекул, таких как FAK (Focal adhesion kinase), PI3-K, ERK1/2 (Extracellular signal regulated kinase). FAK активируется путем автофосфорилирования, которое происходит в процессе того, когда интегрины связаны с ЭКМ, то есть клетка находится в «правильной» взаимосвязи со своим окружением. В этом случае инициируется каскад сигналов, приводящий к активации MAP-киназ, ERK1/2, а также PI3-K/Akt и Ras/Raf/Mek/Erk-сигнальных путей, которые защищают клетку от апоптоза. Снижение фосфорилирования FAK приводит к тому, что указанные молекулярные пути выключаются и перестают защищать клетку от проапоптотических сигналов (Costa da et al., 2018; Frisch, Ruoslahti, 1997; Vachon, 2011).

Кроме того, потеря клеткой связи с ЭКМ в норме приводит к аккумуляции цитоплазматического Bim за счет ингибирования его расщепления протеасомами. При ЭМП инициируется фосфорилирование Bim и его последующая деградация за счет активации ERK и PI3K/Akt-сигнальных путей (Kim et al., 2012). Активация PI3K/Akt также часто ассоциирована со снижением синтеза проапоптотических белков Bim, Bax, Noxa, p21 и p53 (Cao, Livas, Kyprianou, 2016).

Транскрипционные факторы, участвующие в программе ЭМП, также играют важную роль в развитии устойчивости к апоптозу. Так, TWIST способствует повышению активности Bcl-2. SNAIL напрямую супрессирует транскрипцию генов, вовлеченных в процесс апоптоза. Подавление активности PTEN, наблюдаемое в процессе ЭМП и происходящее за счет связывания указанного белка с Bmi1 (Liu et al., 2017), активирует PI3-K/Akt-сигнальный путь и инактивирует Bad (Cao, Livas, Kyprianou, 2016). Снижение синтеза E-кадгерина, приводит, как уже было сказано, к высвобождению цитоплазматического β -catenin, который в свою

очередь перемещается в ядро и активирует гены, связанные с процессами миграции, инвазии и прогрессии клеточного цикла (*c-Myc*, *Cyclin D*, *c-JIN*, *MMP-1*) (Cao, Livas, Kyprianou, 2016).

Циркулируя в кровеносном русле, опухолевая клетка способна **закрепиться на новом месте**. В этом процессе также активную роль принимают интегрины. Так, например, для гематологических заболеваний (множественная миелома, В-лимфома) показано, что опухолевые клетки в процессе циркуляции в кровяном русле начинают синтезировать интегрин- $\beta 7$, благодаря чему происходит связывание со специфическими лигандами на поверхности клеток эндотелия сосудов и закрепление опухолевой клетки в новом сайте (Greaves, Calle, 2022; Sökeland, Schumacher, 2019).

В последнее время появились работы, указывающие на обратимость процесса ЭМП и существование понятия мезенхимально-эпителиального перехода, который играет существенную роль в процессе закрепления опухолевой клетки в новом месте и формирования нового очага, гистологически и фенотипически аналогичного исходной опухоли. Кроме того, есть данные, что в процессе метастазирования опухолевые клетки имеют промежуточный эпителиально-мезенхимальный фенотип, когда наблюдается коэкспрессия маркеров, характерных как для эпителиального, так и мезенхимального фенотипов. В таком переходном состоянии в клетке сохраняется экспрессия мРНК Е-кадгерина и повышена транскрипция гена виментина. Промежуточный ЭМП также характеризуется более низкой экспрессией факторов транскрипции ETV1, PRRX1, ZEB1, ZEB2, TWIST1, SNAIL1 и SNAIL2 по сравнению с полноценным ЭМП (Kahlert, Joseph, Krut, 2017; Yang et al., 2020a).

Как было сказано выше, клетки опухоли часто метастазируют не по одиночке, а в составе кластеров. По своим характеристикам клетки в составе кластера неоднородны. В клетках на периферии кластера наблюдается повышенная экспрессия мезенхимальных маркеров, тогда как в центре может сохраняться эпителиальный фенотип (Škovierová et al., 2018; Гапонова и др., 2020).

Таким образом, ЭМП определяет клеточную пластичность – способность клеток к изменению фенотипа в определенных условиях. Обратимость указанного процесса и непостоянство экспрессии определенных маркеров затрудняет изучение данного процесса, а также его роли в развитии и прогрессии неоплазии. Тем не менее, накоплено большое количество работ, связывающих ЭМП с состоянием «стволовости» опухолевых клеток. ЭМП определяет одно из базовых свойств ОСК – способность к инвазии и образованию нового очага опухоли. К тому же сигнальные пути, запускающие ЭМП и активирующие программу СК (Notch, Hedgehog, WNT/ β -catenin, NF- κ B), тесно взаимосвязаны (Eun, Ham, Kim, 2017). По-видимому, экспрессия маркеров ЭМП, а также активация сигнальных путей, описанных в

данном разделе, является одним из признаков наличия в клетке свойств, характерных для ОСК.

1.2.3.4. Эффлюкс и детоксикация лекарственных средств, химио-/радиоустойчивость

Существует несколько механизмов, благодаря которым ОСК, и, следовательно, опухоль в целом устойчивы к лечению как методами химио-/радиотерапии, так и различными терапевтическими агентами.

Известно, что ОСК обладают механизмами более быстрого реагирования на появление АФК внутри клетки. АФК – кислородосодержащие молекулы, характеризующиеся коротким временем жизни и своими высокореактивными свойствами. Они способны повреждать молекулу ДНК, РНК и/или белков, а также мембраны и вызывать ответ клетки на повреждение (активация репаративной машины). Благодаря способности быстро нейтрализовать АФК, ОСК устойчивы к радиотерапии и некоторым видам химиотерапии, где активными действующими метаболитами являются АФК (Zeng et al., 2023).

Еще к одному механизму резистентности ОСК можно отнести их способность в ответ на стрессовые условия останавливать клеточный цикл в G0-фазе клеточного цикла, превращаясь в молчащие ОСК. Клетки могут входить в такое состояние в ответ на гипоксию, недостаток питательных веществ или при других неблагоприятных условиях. Так как большинство терапевтических препаратов нацелено на активно пролиферирующие клетки, ОСК в «молчащем» состоянии успешно избегают пагубного воздействия терапевтических агентов. При возвращении нормальных условий и исчезновении факторов стресса ОСК возобновляют клеточный цикл и начинают активно пролиферировать, тем самым вызывая рецидив заболевания (Zeng et al., 2023; Zhang et al., 2024).

Также устойчивость ОСК к лекарственным средствам связывают с активностью белков-переносчиков АТФ-связывающей кассеты (ABC-транспортёры) и альдегиддегидрогеназы (ALDH). Семейство ABC-транспортёров включает в себя Р-гликопротеины (P-gp, MDR1, ABCB1), белки множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) (MRP1, ABCC1), белок устойчивости к раку молочной железы (BCRP, ABCG2). В норме они локализуются преимущественно в плазматической мембране клеток и отвечают за транспорт полезных веществ (например, витаминов) в клетку и выведение из нее вредных токсинов и ксенобиотиков. Сверхэкспрессия этих белков при некоторых типах солидных опухолей, а также острой миелоидной лейкемии и миеломе приводит к АТФ-зависимому оттоку из клетки широкого спектра традиционных химиотерапевтических агентов (Safa, 2022). Белки семейства ALDH окисляют токсические альдегиды до карбоновых кислот, а также участвуют в утилизации АФК в цикле ретиноевой кислоты и связаны с обменными функциями

в клетке. Показано, что повышенная экспрессия ALDH в опухоли имеет положительную корреляцию с рецидивами и является индикатором плохого прогноза лечения у онкологических больных (Khoury et al., 2012; Pommergaard et al., 2022; Xue et al., 2020). Для многих типов опухолей повышенная экспрессия ALDH является маркером ОСК (Huang et al., 2020).

Поразительным является недавно описанное свойство ОСК восстанавливать свою клеточную структуру после ухода клетки в апоптоз, вызванный повреждениями ДНК (Jinesh et al., 2013). На линии клеток рака мочевого пузыря человека было показано, что вместо того, чтобы формировать апоптозные тельца, апоптотические пузырьки сливаются вместе и формируют подобную щиту структуру, названную «blebbishields». Исследования трансмиссионной электронной микроскопии выявили пузырчатую цитоплазму и почти неповрежденное ядро в молодом «пузырчатом щите», и относительно полноценную цитоплазму на поздней стадии его формирования. Примечательно, что ядро имело множество активных ядрышек, цитоплазма также имела электронно-плотные цитоплазматические ядрышки, неповрежденные митохондрии, шероховатую эндоплазматическую сеть и апоптотические Гольджи-кластеры. Сливаясь друг с другом, «пузырчатые щиты» формируют клетки, которые способны экспортировать красители, демонстрируют химическую устойчивость и экспрессию многих маркеров ОСК. Подкожное введение указанных клеточесфер иммунодефицитным мышам свидетельствует, что клетки такого происхождения являются туморогенными (Jinesh et al., 2013). Полученные данные предполагают, что указанный путь – еще один из механизмов выживания ОСК после их апоптотического разрушения вследствие пагубного воздействия терапевтических агентов или иммунной системы организма.

1.2.3.5. Эффект Варбурга

Дифференцированные клетки организма в аэробных условиях получают энергию АТФ путем расщепления глюкозы в процессе окислительного фосфорилирования, протекающего в митохондриальном матриксе. При недостатке кислорода клетка использует гликолиз, который менее эффективен и поэтому менее предпочтителен.

В 1924 году Отто Варбургом было показано, что опухолевые клетки используют гликолиз для получения энергии как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Такой вариант «аэробного гликолиза» был назван эффектом Варбурга (Warburg, 1956). Аэробный гликолиз более быстрый, чем окислительное фосфорилирование, но также как и обычный гликолиз гораздо менее эффективный с точки зрения синтеза АТФ, образующихся на единицу

потребленной глюкозы, что приводит к аномально высокой скорости поглощения глюкозы опухолевыми клетками (Sancho, Barneda, Heeschen, 2016).

В результате аэробного гликолиза появляются два конечных метаболитических продукта: пируват и лактат, которые затем могут быть секретированы и захвачены соседними опухолевыми клетками, использующими окислительный метаболизм, и непосредственно использоваться в цикле трикарбоновых кислот для обеспечения роста опухоли в условиях недостатка окислительных субстратов. Двухнаправленный транспорт лактата и пирувата («в» и «из» опухолевых клеток) осуществляется с помощью семейства монокарбоксилированных транспортеров (например, MCT1 и MCT4) (Pavlidis et al., 2009). Это позволяет опухолевым клеткам, с активным аэробным гликолизом, снабжать питанием соседние опухолевые клетки и другие клетки опухоль-ассоциированной стромы, в которых осуществляется окислительный метаболизм.

Несмотря на то, что измененный путь метаболизма свойственен всем опухолевым клеткам, считается, что метаболизм ОСК несколько отличается от остальной популяции дифференцированных опухолевых клеток. В зависимости от обстоятельств ОСК опухолей одного типа могут получать энергию либо путем анаэробного гликолиза, либо используя окислительное фосфорилирование (Sancho, Barneda, Heeschen, 2016). Это обстоятельство предполагает, что основным фактором, влияющим на выбор ОСК пути метаболизма, является состояние окружающей среды в данный конкретный момент времени, что показывает высокую степень их пластичности и способности адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды. Несмотря на расхождение мнений в вопросе особенностей метаболизма ОСК, во многих работах показано, что сдвиг в сторону гликолиза способствует поддержанию стволовых свойств клеток и является признаком ОСК (Liu et al., 2014; Shen et al., 2015).

Одна из причин предпочтения ОСК гликолиза, как предполагается, является образование интермедиатов, участвующих в процессе поддержания клеточной пролиферации. Так, например, промежуточный продукт гликолиза глюкозо-6-фосфат (G6P) используется в пентозофосфатном пути для образования НАДФ (Никотинамидадениндинуклеотидфосфата), который обеспечивает быструю пролиферацию опухолевых клеток. Дополнительно усиление метаболического притока к пентозофосфатному пути повышает уровень антиоксиданта глутатиона, в результате чего опухолевые клетки избегают накопления АФК и поддерживают более благоприятную среду для своего выживания (Yasuda, Ishimoto, Baba, 2021).

Механизм переключения ОСК с одного типа метаболизма на другой до сих пор остается под вопросом. Известно, что пируват дегидрогеназа 1 (PDK1) фосфорилирует субъединицу E1 α пируватдегидрогеназы и инактивирует ее ферментный комплекс, который превращает

пируват в ацетил-кофермент А, тем самым ингибируя окисление пирувата через цикл трикарбоновых кислот, что необходимо для выработки энергии. Показано, что количество PDK1 повышено в гипоксичных участках опухоли, где преобладающим является гликолиз. Также известно, что количество PDK1 положительно коррелирует с пролиферацией опухоли, метастазированием и неблагоприятным прогнозом лечения (Peng et al., 2018).

Все больше данных указывает на то, что стромальные и иммунные клетки, составляющие микроокружение опухоли, также участвуют в метаболизме опухолевых клеток, переключаясь на производство метаболитов, которые доставляются в ОСК и используются в цикле трикарбоновых кислот. Так, опухоль-ассоциированные фибробласты в результате взаимодействия с опухолевыми клетками начинают производить лактат. ОСК могут использовать лактат в качестве субстрата для митохондриального окислительного фосфорилирования. Эта концепция широко известна как обратный эффект Варбурга (Pavlides et al., 2009; Yasuda, Ishimoto, Baba, 2021). Такое видение взаимодействия клеток внутри опухоли свидетельствует о том, что ОСК обладают способностью изменять метаболизм клеток опухоль-ассоциированной стромы, обеспечивая для своего функционирования богатое энергией микроокружение, необходимое для роста и прогрессии.

1.2.4. Свойства опухолевых стволовых клеток – заключение

Иерархическая организация опухоли подразумевает, что в своем составе опухоль содержит дифференцированные клетки, составляющие основную массу опухоли, и ОСК, ответственные за возникновение, рост, развитие опухоли, химио-/радиорезистентность, возникновение рецидивов заболевания, инвазию и метастазирование. ОСК составляют небольшой процент от общего количества клеток, который может изменяться в зависимости от типа опухоли, стадии заболевания и внешних факторов (давление терапии, общая локализация опухолевого очага, индивидуальные особенности организма).

Управляющие функции ОСК, диктующие практически неизбежное развитие опухоли, определяются разнообразием уникальных свойств, которыми обладает данный тип клеток. Как уже было замечено ранее, эти свойства во многом схожи со свойствами нормальных СК. Тем не менее существует одно принципиальное отличие, которое заключается в том, что нормальная СК находится под контролем сигнальных стимулов, посылаемых ей стволовой нишей, тогда как ОСК игнорирует любые ограничивающие сигналы и формирует свою окружающую среду (опухолевая стромальная ниша), гуморальная мощь которой позволяет держать под контролем надзирающую функцию иммунной системы (Efremov et al., 2018; Ефремов и др., 2019a, b).

Обобщая проведенный анализ литературы, можно констатировать, что основные свойства ОСК включают: самообновление, неограниченный пролиферативный потенциал, асимметричное деление, ЭМП (инвазия, метастазирование), мембранная пластичность, аноиксис, избегание иммунного надзора, способность формировать микроокружение (стволовую нишу), измененный метаболизм (эффект Варбурга), генетическая пластичность (изменение метаболизма ферментов, ответственных за репарацию ДНК, способность формировать «blebbishelds»), лекарственная устойчивость. Перечисленные свойства свидетельствуют об огромном потенциале выживаемости, присущем ОСК, и ставят под сомнение возможность нахождения подхода, позволяющего элиминировать эти клетки из организма, сохранив при этом жизнеспособность самого организма.

Первым шагом в направлении таргетного воздействия на ОСК является поиск специфических маркеров, позволяющих определить ОСК в массе опухоли.

Помимо классического метода окраски антителами против поверхностных маркеров (CD34, CD133, EpCAM; CD166, CD38 (маркеры острого миелогенного лейкоза); CD138 (маркер для терминально дифференцированных В-лимфоцитов); CD24 (маркер фактора эпителиальной клеточной адгезии EpCAM или ESA); B5 (ABCB5 АТР-связывающий белок)) (O'Brien, Kreso, Jamieson, 2010), разработаны альтернативные методы детекции и выделения ОСК из опухолевой массы. К ним относятся методы лимитирующих разведений и метод формирования сфер (Cianciosi et al., 2021). Еще одним подходом в выявлении ОСК является их способность выбрасывать из цитоплазмы определенные липофильные флуоресцентные красители, такие, как Hoechst 33342 или родамин-123 (Brown et al., 2010). Эта особенность позволяет не только идентифицировать ОСК с помощью проточной цитометрии, но и собирать их для различных исследований, как фракцию неокрашенных или слабоокрашенных клеток, с помощью сортировки. Известно, что опухолевая клетка, обладающая иницирующими характеристиками, способна к миграции и имеет многочисленные нарушения в системах формирования актинового цитоскелета и, как следствие, легко деформируется. Это позволило на примере двух типов клеток (MDA-MB-436 и MCF-7) провести сортировку ОСК по их способности к деформации (Zhang et al., 2012). Тем не менее «золотым стандартом» доказательства наличия стволовых свойств у опухолевой клетки до сих пор остается анализ формирования графта у экспериментальных животных. Считается, что только ОСК способны давать устойчивый развивающийся трансплантат, по своим морфологическим и гистологическим характеристикам идентичный исходной опухоли (Fulawka, Donizy, Halon, 2014).

Вторым шагом в разработке подходов таргетного воздействия на ОСК может быть выявление новых, неизвестных ранее биологических характеристик ОСК, используя которые можно физически уничтожить эту клетку. Еще более заманчивым и впечатляющим могло бы быть нахождение подхода, в котором бы сочетались два элемента: специфический маркер ОСК и возможность через его присутствие в ОСК физически уничтожить эту практически неубиваемую клетку.

В настоящей работе было открыто новое свойство низкодифференцированных клеток, включая ОСК, – способность интернализировать экстраклеточные фрагменты дцДНК естественным (природным) механизмом без использования каких-либо трансфецирующих агентов. Найденное новое свойство было рутинно использовано для детекции ОСК в массе опухоли методами FACS или флуоресцентной микроскопии в случае использования флуоресцентно-меченого зонда дцДНК. На основании нового биологического явления был разработан подход, позволяющий физически уничтожить ОСК или лишить их туморогенного начала непосредственно в очаге опухолевого роста.

Поскольку главным элементом такого подхода являются фрагменты дцДНК, которые захватываются ОСК естественным природным механизмом, следующий раздел литературного обзора посвящен характеристике источников экстраклеточной ДНК в организме, известным механизмам интернализации экстраклеточной ДНК клетками и функциональной значимости экстраклеточной дцДНК, образующейся и присутствующей в организме.

1.3. Экстраклеточная двуцепочечная ДНК

1.3.1. Источники свободной экстраклеточной ДНК в организме

Давно показано наличие свободной внеклеточной ДНК в различных жидкостях организма: плазме крови, слюне, моче, жидкости спинного мозга. Концентрация такой свободной ДНК у здоровых доноров колеблется от 10 до 100 нг/мл (Козлов, 2013). Эти значения могут изменяться при наличии патологических процессов в организме, таких как травмы, воспаление, аутоиммунные или онкологические заболевания.

Свободную внеклеточную ДНК можно разделить на два типа: эндогенную («self» ДНК), имеющую происхождение из собственных клеток организма, и экзогенную, полученную из внешних источников. Существует несколько теорий появления эндогенной экстраклеточной ДНК, основными из которых являются: образование пула ДНК в результате гибели клеток или «теория клеточной гибели», и активная секреция ДНК живыми клетками или «теория метаболической ДНК» (Gahan, Swaminathan, 2008; Peters, Pretorius, 2011).

В случае первого варианта экстраклеточная ДНК представлена фрагментами клеточной и митохондриальной ДНК из соматических клеток, образующихся в процессе их гибели путем апоптоза или некроза. Также внеклеточная ДНК происходит из эритробластов, ядра которых энуклеируются в процессе дифференцировки в эритроциты (Козлов, 2013). Отдельно можно выделить нетоз (NETosis) – «взрывной» процесс выброса ДНК нейтрофилами, в результате чего формируется подобие сети из ДНК с прикрепленными цитоплазматическими и гранулированными белками, как процесс антибактериальной защиты (Pisetsky, 2012). Во втором случае («теория метаболической ДНК») предполагается секреция нуклеиновых кислот в плазму крови пролиферирующими активированными лимфоцитами (Gahan, Stroun, 2010; García-Olmo et al., 2010).

Источниками появления чужеродной экстраклеточной ДНК в организме являются ДНК эмбрионов, бактериальная и вирусная ДНК. Также источником внеклеточной ДНК являются манипуляции с кровью, различные трансплантации, половой акт, ДНК продуктов питания, консументная микрофлора, микробиота кишечника.

Очевидно, что при манипуляциях с кровью и трансплантации в обязательном порядке произойдет попадание донорской ДНК, будь то кровь или строма, в реципиентный организм. ДНК разрушенных сперматозоидов, так же как и ДНК плода, попадает в кровь матери (Bianchi, Dennis Lo, 2001; Dyer et al., 1997). Появление экзогенной ДНК в организме через желудочно-кишечный тракт убедительно продемонстрировано в работах (Hohlweg, Doerfler, 2001; Palka-Santini et al., 2003; Schubbert, Lettmann, Doerfler, 1994). Микробиота кишечника представлена несколькими килограммами основного консумента *Escherichia coli* (*E. coli*). При разрушении клеток кишечника выделяется огромное количество ДНК, также попадающей в кровоток.

Известно, что активность СК, в том числе ОСК, регулируется не только опухоль-ассоциированной стромой, но и факторами, циркулирующими в кровяном русле. В кровоток в зависимости от ситуации в организме попадает большое количество цитокинов и других индукторов воспаления. Помимо этого, как уже было сказано, в кровяном русле присутствует большое количество «self» ДНК и РНК, которые активно воздействуют на клетки иммунной системы. В литературе отсутствует информация о взаимодействии этих нуклеиновых кислот со СК различного генеза. Тем не менее очевидно, что в организме фрагменты дцДНК являются триггером многих процессов.

1.3.2. Механизмы интернализации нуклеиновых кислот

В настоящее время исследуется достаточно обширный список препаратов и подходов лечения различных заболеваний, основанный на принципах воздействия на клетку

фрагментами нуклеиновых кислот после их попадания во внутриклеточное пространство. Основным направлением применения таких препаратов является генная терапия – целенаправленное изменение жизнедеятельности клетки путем вмешательства на молекулярно-генетическом уровне (замена мутаций собственных генов или привнесение здоровых копий извне). Синтетические нуклеиновые кислоты также получили широкое применение для модуляции экспрессии генов. Использование антисмысловых олигонуклеотидов (ASO, antisense oligonucleotide) и малых интерферирующих РНК является двумя вариантами наиболее широко распространенной стратегии для подавления экспрессии генов (Watts, Corey, 2012). В онкотерапии появилось новое направление, так называемая молекулярная терапия опухолей, основанная на действии нуклеиновых кислот (NA-based cancer molecular therapies). В этом случае используются короткие синтетические олигонуклеотидные дуплексы, которые при попадании в опухолевую клетку мимикрируют естественные двуцепочечные разрывы (ДЦР) ДНК, конкурируя своими двуцепочечными концами за ферменты репарации. Вследствие этого нарушается ход репарации ДЦР хроматина, индуцированных действием радио-/химиотерапии (Berthault et al., 2022). В литературе такие олигонуклеотиды называют siDNA (small interfering DNA).

Несмотря на очевидную актуальность вопроса о механизмах интернализации нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих, в последнее десятилетие крайне мало работ посвящено тематике естественной интернализации нуклеиновых кислот без использования трансфецирующих агентов или конструкций. Общепринятой стала парадигма, что без внесения модификаций в ДНК и без трансфецирующих факторов нуклеиновые кислоты не способны проникать в клетку. Однако следует отметить, что вплоть до 2010 года таким исследованиям было уделено достаточно внимания и однозначно показано, что это возможно. В настоящем разделе мы рассмотрим имеющиеся представления относительно вопроса естественной интернализации фрагментов экстраклеточной ДНК в различные типы клеток млекопитающих, хотя свежих данных в этой области крайне мало.

Процесс доставки экстраклеточной ДНК в клетку можно разделить на три основных стадии: взаимодействие молекулы со специфическими факторами клеточной мембраны, проникновение через мембрану в цитоплазматическое пространство и далее в ядро клетки.

Начальным этапом взаимодействия клетки и экстраклеточной ДНК является их контакт и преодоление экстраклеточным материалом нуклеиновых кислот цитоплазматической мембраны. Общепринято, что эукариотическая клетка имеет отрицательный заряд поверхности, что, как считается, обусловлено мембранно-связанными гликопротеинами и ассоциированными с ними остатками сиаловой кислоты (Eisenberg et al., 2021). Также

общеизвестно, что дцДНК, имеющая негативно заряженный сахарофосфатный остов, является отрицательно заряженной молекулой. Очевидно, что при такой интерпретации будет возникать электростатическое отталкивание между клеточной мембраной и молекулами ДНК, что должно предотвращать связывание ДНК с клеткой. Однако согласно проведенным исследованиям установлено, что ДНК способна достаточно эффективно проникать в клетки в отсутствие каких-либо трансфецирующих агентов.

В большинстве работ показано, что ДНК проникает в клетки по пути эндоцитоза. Эндоцитоз – процесс поглощения клетками объектов окружающей среды путем адсорбирования их мембраной с последующим ее впячиванием внутрь клетки и образованием везикул, в которых захваченные извне объекты проходят последующую утилизацию. Существует два вида эндоцитоза: фагоцитоз и пиноцитоз. Среди предполагаемых механизмов, которые могут участвовать в поглощении ДНК клетками, разными исследовательскими группами назывались практически все известные типы эндоцитоза (Amyere et al., 2001; Khalil et al., 2006).

Одним из наиболее простых способов проникновения ДНК внутрь клетки является фагоцитоз апоптозных телец, содержащих фрагментированную ДНК (Lawen, 2003; Savill et al., 1993). Фагоцитоз – процесс поглощения твердых частиц клеткой за счет выпячиваний клеточной поверхности и обхвата акцептируемого возбудителя (субстрат), который индуцируется активаторами сборки актина и сигнальными каскадами с участием малых ГТФаз. Фагоцитоз апоптозных телец способны осуществлять различные клетки, такие как фибробласты человека, макрофаги, эндотелиальные клетки аорты быка, дендритные клетки, эндотелиальные клетки печени, моноциты человека, клетки сосудов гладкой мускулатуры (García-Olmo et al., 1999; Holmgren et al., 1999; Lawen, 2003). Поглощение внеклеточного субстрата занимает весьма короткий отрезок времени. Достаточно одного часа для утилизации деградированного клеточного материала при совместном культивировании апоптотизирующих и реципиентных клеток (Hall et al., 1994; Holmgren et al., 1999).

В отличие от фагоцитоза, пиноцитоз представляет собой поглощение клеткой жидкости и растворенных в ней веществ. Пиноцитоз можно подразделить на жидкофазное поглощение, макропиноцитоз и рецептор-опосредованный (адсорбционный) пиноцитоз. Известны три типа рецептор-опосредованного эндоцитоза. Это клатрин-зависимый, кавеоло-зависимый и флотелин-зависимый эндоцитоз. Клатрин-зависимый эндоцитоз характеризуется образованием покрытых изнутри белком клатрином инвагинаций цитоплазматической мембраны. Сформированные везикулы содержат рецепторы, ассоциированные с G-белками, через которые проводится иницирующий сигнал, активирующий различные молекулярные

внутриклеточные каскады. Интернализация везикул опосредуется кластирезацией клатрина и полимеризацией кавина (Hayer et al., 2010; Kaksonen, Roux, 2018; Mettlen et al., 2018).

Кавеолы и кавеоло-зависимый эндоцитоз связаны с формированием холестеринowych микродоменов (холестеринowych рафтов). В этих структурах также сгруппированы различные рецепторы и, в первую очередь, скавенджер-рецепторы (SR, scavenger receptor) и гликозилфосфатидилинозитол-заякоренные белки (GPI-AP, glycosylphosphatidylinositol-anchored protein). Отличительным признаком этих образований является фиксация факторов в холестериновом рафте, а кластеризация кавеолина и полимеризации кавина опосредует интернализацию кавеол (Busija, Patel, Insel, 2017; Gu et al., 2017; Hubert, Larsson, Lundmark, 2020; Martinez-Outschoorn, Sotgia, Lisanti, 2015).

Существует еще один возможный вариант интернализации фрагментов дцДНК механизмом флотеллин-зависимого эндоцитоза. Белки семейства SPFH (Stomatins, Prohibitins, Flotillins, HflK/C), определяют формирование «сигналом» которые интернализуются в клетку клатрин-/кавеолин-/динамин-независимым эндоцитозом. Этот тип интернализации, так же как и в случае кавеолярного эндоцитоза, ассоциирован с микродоменами, сформированными холестеринowymi рафтами (Meister, Tikkanen, 2014; Otto, Nichols, 2011).

Эффективность рецептор-опосредованного эндоцитоза определяется степенью связывания поглощаемых молекул с поверхностью клетки, что, в свою очередь, зависит от эффективности их взаимодействия с компонентами клеточной мембраны, либо от аффинности по отношению к соответствующим рецепторам, а также представленности этих рецепторов на цитоплазматической мембране клетки.

В процессе исследований было обнаружено несколько различных механизмов проникновения нуклеиновых кислот в клетки. Помимо адсорбционного эндоцитоза было показано вовлечение фагоцитоза и макропиноцитоза, обеспечивающих интернализацию в клетки молекул размером до 2 нм (Gottlieb et al., 1993). Вероятно, при высоких концентрациях ДНК в среде, когда происходит насыщение мембранных рецепторов, макропиноцитоз может быть преобладающим механизмом.

При небольших концентрациях ДНК во внеклеточном пространстве эндоцитоз может протекать в результате взаимодействия с белками, расположенными в мембране клетки. Было выделено и описано большое количество клеточных белков, с разной специфичностью и эффективностью связывающих олигонуклеотиды и протяженные молекулы ДНК (Diesbach De et al., 2000; Herz, Strickland, 2001; Челобанов, Лактионов, Власов, 2006). Молекулярная масса выделенных белков варьировала от 15 до 147 кДа (Челобанов, Лактионов, Власов, 2006). В работе (Yakubov et al., 1989) показано два мембранных белка размером 79 и 90 кДа,

участвующих в поглощении культурой клеток фибробластов мыши L929 коротких ($n = 8, 9, 10$ и 16 п.н.) олигонуклеотидов. В работе сделано предположение, что указанные белки могут осуществлять циркуляцию внутрь клетки и обратно и повторно участвовать в процессе интернализации олигонуклеотидов. Определенное время циркуляции составляет 10 мин, а количество таких факторов на клетку порядка $120\,000$. В работе (Loke et al., 1989) также показан захват олигонуклеотидов путем эндоцитоза и был изолирован белок размером 80 кДа, который дополнительно способен связываться с транспортной РНК и плазмидной ДНК.

В более поздних работах описываются мембранные белки, которые потенциально могут связываться с ASO. Показано, что свободная фракция модифицированных фосфоротиоатом двуцепочечных олигонуклеотидов может неспецифично взаимодействовать с несколькими типами мембранных белков, таких как интегрины, G-белок-связанные рецепторы (GPCRs), рецепторы тирозинкиназы (RTKs), TLRs, EGFRs, SR-B, липоптротеины низкой плотности (LDLR), асиалогликопротеиновые рецепторы (ASGPR). Большинство этих белков задействовано в клатрин-опосредованном пути эндоцитоза (Terada et al., 2022).

Выявленные в приведенных работах белки обладают различным сродством к поли-, олиго- и мононуклеотидам. Были получены экспериментальные данные, свидетельствующие в пользу того, что транспорт молекул ДНК в лимфоциты, моноциты, нейтрофилы и клетки скелетных мышц происходит путем взаимодействия ДНК с белками, расположенными на клеточной поверхности (Bennett, 1993; Hefeneider et al., 1990; Schubbert et al., 1997). Однако большинство из описываемых в литературе ДНК-связывающих белков, обнаруженных на поверхности различных культивируемых клеток, не были окончательно охарактеризованы, и их роль в процессе поглощения клетками ДНК остается неясной. Также было показано, что небольшие молекулы нуклеиновых кислот могут проходить через мембрану клеток благодаря наличию в ней специальных белковых каналов (Hanss et al., 1998; Leal-Pinto et al., 2005; Shi et al., 2007) или с помощью прохождения через локальные отверстия в клеточной мембране (Budker et al., 2000).

Считается, что из-за низкого значения pH внутри эндосом, возможности их слияния с клеточными лизосомами, содержащими литические ферменты, а также из-за присутствия клеточных нуклеаз в цитоплазме клетки высока вероятность расщепления интернализованной в клетку ДНК еще до того, как она проникнет в ядро. Показано, что при интернализации ASO путем макропиноцитоза происходит слияние везикулы с лизосомами, где происходит разрушение ДНК и, как следствие, ингибируется их функция. Тем не менее описан ряд механизмов, способствующих процессам сохранения ДНК в цитоплазме и ее транспорта во внутриядерное пространство. При интернализации путем энергозатратного эндоцитоза,

молекулы терпевтической ДНК быстро транспортируются в ядро, проявляя свои функции. Белки ANXA2 участвуют в сохранении олигонуклеотидов от деградации ферментами лизосом. Также показано, что ГТФаза RAB5c и липид LBPA принимают участие в высвобождении ASO в цитозоль клетки (Terada et al., 2022). Во других работах было продемонстрировано проникновение экзогенной ДНК (плазмидные конструкции) в ядро с последующим проявлением биологической активности и экспрессией переносимых генов (Anker et al., 1980; Bergsmedh et al., 2002; Filaci et al., 2004; Holmgren et al., 1999).

Для проникновения чужеродной ДНК в ядро клетки ей необходимо преодолеть ядерную мембрану – естественный барьер, отделяющий геномную ДНК клетки от цитоплазмы. Ядерная мембрана состоит из внутренней и наружной частей, ядерных поровых комплексов и ламина, представляющей собой сетчатую структуру, расположенную между внутренней мембраной и хроматином. ДНК, находящаяся в непосредственной близости от ядерной мембраны, может попасть внутрь ядра либо в процессе деления клетки, когда ядерная мембрана разрушается и вновь конструируется, захватывая чужеродную ДНК, либо специфично импортироваться в ядро через ядерный поровый комплекс (Crisp et al., 2006; Hébert, 2003; Ondrej et al., 2008). Предполагается, что ламина, а также актин, присутствующий как в ядре, так и в цитоплазме клетки, участвуют в процессах доставки ДНК в непосредственную близость к ядру и опосредуют ее проникновение во внутриядерное пространство. Было показано, что движение пришедшей в ядро ДНК ограничено, по сравнению с движением ДНК в цитоплазме. Предполагается, что при попадании в ядро ДНК находится в связанном состоянии с некоторыми внутриядерными структурами (ядерным матриксом). Это определяет нахождение ДНК в строго определенном районе ядра. Известно, что районы, в которых присутствуют естественные или индуцированные ДЦР, являются предпочтительными для локализации экстраклеточной ДНК (Ondrej et al., 2008).

Лок и Замечник с соавторами (Loke et al., 1989; Zamecnik et al., 1994) в своих работах показали возможность транспорта коротких олигонуклеотидов в ядро реципиентной клетки. В экспериментах использовали культуры клеток человека HeLa, лимфомы Буркитта, лимфобластной лейкемии Т-клеток, линию миелоидных клеток мыши и фибробласты зародыша цыпленка. Оказалось, что олигонуклеотиды достигают ядра в течение нескольких минут. Через 60 мин олигонуклеотиды концентрируются в ядре реципиентной клетки.

Размер ДНК является критическим фактором, влияющим на процесс проникновения ДНК в ядро клетки. Структура ядерной поры налагает строгое ограничение на размер проникающих частиц: внешний канал ядерной поры составляет 9–10 нм в диаметре. Показано, что ДНК размером до 300 п.н. свободно проникает в ядро путем пассивной диффузии (Ludtke

et al., 1999; Munkonge et al., 2003). Не покрытая белками линейная ДНК, состоящая из 200 п.н., имеет размеры около 70 нм в длину и 2 нм в диаметре и, так как она не формирует глобулярную структуру, то легко проходит сквозь узкий канал ядерной поры. Для более протяженных молекул ДНК появляются стерические затруднения, препятствующие свободному проникновению молекул в ядро клетки. Доставка протяженной ДНК в ядро представляет собой энергозатратный процесс. При этом необходимо наличие сигнала ядерной локализации, представляющего собой положительно заряженный олигопептид, содержащий несколько остатков лизина и аргинина (Crisp et al., 2006; Hébert, 2003). После выхода из эндосомального компартмента ДНК появляется в свободной форме в цитозоле, где, в зависимости от размеров молекулы, может либо свободно проникнуть в ядро, либо остаться в цитоплазме, если ее размер превышает 1 т.п.н. В последнем случае высока вероятность деградации ДНК клеточными нуклеазами. Связывание ДНК с белками, содержащими сигналы ядерной локализации, значительно повышает эффективность доставки ДНК в ядро, которая возрастает больше чем на 80 % (Luo et al., 1999). ДНК, связанная с ядерными белками, транскрипционными факторами, гистонами, HMG (high mobility group)-белками, эффективно проникает в ядро. При этом наблюдается дозозависимый эффект: как минимум 3–4 сигнала ядерной локализации должны приходиться на 100 п.н. ДНК. При повышении количества сигналов эффективность доставки возрастает. Связывание ДНК с сигналом ядерной локализации в настоящее время представляет собой один из перспективных методов доставки молекул дцДНК в ядро.

В работе (Rogachev et al., 2006) на культуре клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 был проведен количественный анализ и анализ качественных признаков ДНК, транспортируемой во внутриклеточное пространство. Экстраклеточная дцДНК через очень короткий промежуток времени (менее минуты, если клетки активно делятся) обнаруживалась в цитоплазме и ядерном пространстве в не деградированном, исходном виде. Инкубация дцДНК в культуральной среде приводила к ее деградации. Было обнаружено, что деградированная ДНК также доставляется в указанные внутриклеточные компартменты. Установлено, что протяженные, более 10 т.п.н., молекулы дцДНК немедленно оказываются в ядре клетки. При этом более короткие фрагменты (1.5 т.п.н.) распределяются равномерно между цитоплазмой и ядром. Количественная оценка показала, что во внехромосомном пространстве ядра клеток MCF-7 содержание фрагментированной экстраклеточной дцДНК может составлять до 2 % от массы гаплоидного генома.

Цитологический анализ поведения флуоресцентно-меченой экстраклеточной ДНК при ее контакте с клетками выявил, что уже в течение первых минут меченый материал

обнаруживается в цитоплазме, заключенный в вакуоли (Rogachev et al., 2006). В этот момент в ядерном пространстве метка практически не выявляется. Через 14 часов инкубации вся метка оказывается сконцентрированной в ядерных компартментах. Меченый материал располагается в ядре в виде конгломератов и имеет интенсивное свечение.

Как следует из проведенного краткого анализа литературы, экстраклеточная ДНК в различной форме способна достигать ядра реципиентной клетки, где возможно ее включение в различные процессы клеточного метаболизма. Процесс утилизации экстраклеточной ДНК внутриклеточной локализации в большей степени гипотетичен. Одним из путей утилизации фрагментов дцДНК, захваченных из окружающей среды и транспортированных в клетку, помимо деградации, может быть использование их в качестве субстрата репаративно-рекомбиногенного процесса (Berthault et al., 2022; Лихачева и др., 2008).

1.3.3. Функциональная значимость экстраклеточной ДНК в организме

Двуцепочечная фрагментированная экстраклеточная экзогенная и эндогенная ДНК является участником, индуктором и индикатором различных процессов, протекающих в организме. В первую очередь, экзогенные нуклеиновые кислоты являются патоген-ассоциированными молекулярными паттернами, активирующими различные звенья иммунной системы, направленные на удаление патогена. Экстраклеточная дцДНК эндогенного происхождения также может выступать в качестве активатора иммунного ответа организма (Barbalat et al., 2011; Bode et al., 2011; Iwasaki, Medzhitov, 2010; Krieg, 2002; Medzhitov, Janeway, 2000; Takeshita, Ishii, 2008). Фрагменты как экзогенной, так и эндогенной дцДНК, доставленные в цитоплазму иммунных клеток, активируют палитру цитозольных сенсоров и индуцируют начальные этапы развития адаптивного иммунного ответа (Barber, 2011a; Barber, 2011b; Sharma, Fitzgerald, 2011). ДцДНК является индуктором аутоиммунных процессов (Almqvist, Winkler, Mårtensson, 2011; Choubey, 2012; Kaczorowski et al., 2012) и представляет собой один из сигналов «эффекта свидетеля» (Ermakov et al., 2009). Показано, что «взрывное» увеличение концентрации ДНК в плазме крови приводит к системной воспалительной реакции и сепсису (Castellheim et al., 2009; Kaczorowski et al., 2012; Saukkonen et al., 2007). Нуклеиновые кислоты, включая дцДНК, входят в состав экзосом и, как предполагается, могут являться камертоном функционального состояния организма, по которому определенные популяции клеток настраивают свои физиологические и молекулярные процессы (Cai et al., 2013; Rashed et al., 2017).

На клеточном уровне фрагменты дцДНК (а именно открытые двуцепочечные концы этих фрагментов), доставленные во внутреннее пространство не иммунной клетки,

активируют остановку клеточного цикла и индуцируют репаративные процессы (Berthault et al., 2022; MacDougall et al., 2007; Zou, 2007). При определенных условиях эти фрагменты становятся участниками репаративного процесса, интерферируя его корректное прохождение и, согласно полученным в лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН экспериментальным данным, могут интегрировать в реципиентный геном (Dolgova et al., 2012a; Likhacheva et al., 2007; Лихачева и др., 2008).

Вопрос горизонтального переноса генетического материала хорошо изучен у прокариот, многократно показан для низших многоклеточных животных (Andersson, 2005; Sibbald et al., 2020; Soucy, Huang, Gogarten, 2015) и известны доказанные примеры переноса генов у млекопитающих. Так, известен процесс поглощения ДНК разрушенных раковых клеток другими «чувствительными» клетками организма, в результате чего происходит злокачественная трансформация этих клеток. Процесс назван «генометастазирование» (García-Olmo, Picazo, García-Olmo, 2012; Yakubov et al., 2007). В работах (Bergsmedh et al., 2002; Holmgren et al., 1999; Sakamoto, Ochiya, Yoshioka, 2023) приводятся доказательства горизонтального переноса генов при поглощении апоптотических телец и экстраклеточных везикул. Известна работа переноса экстраклеточного материала в яйцеклетку сперматозоидами, захватившими высокополимерную ДНК из окружающей среды, у мидий (Ерохин, Кузнецов, 2009). В недавней работе (Xia et al., 2021) показан горизонтальный перенос специфического уникального гена между насекомым и растением. В 2007 году была присуждена Нобелевская премия за разработку технологии, где основополагающим является гомологичная рекомбинация доставленных внутрь клетки фрагментов нокаутной ДНК (интернет-ресурс <https://lenta.ru/articles/2007/10/08/nobelmed/>).

В литературе крайне мало данных, предполагающих участие экстраклеточной дцДНК в процессах жизнедеятельности и функционирования ОСК. Тем не менее, проведенный краткий обзор дает основания предположить, что в случае интернализации экстраклеточных фрагментов дцДНК в ОСК, эти ДНК-молекулы будут выступать в качестве триггерных факторов и при определенных обстоятельствах могут модулировать молекулярные характеристики указанных клеток.

Таким образом, дцДНК попадает в эукариотическую клетку, где может присутствовать как транзитный элемент. Она обнаруживается как в цитоплазме, так и в ядерном пространстве. Известно, что при определенных обстоятельствах экстраклеточная дцДНК может интегрировать в геном с использованием механизмов гомологической рекомбинации или негомологичного встраивания. В клетке экстраклеточная дцДНК становится участником многочисленных молекулярных процессов, связанных с метаболизмом нуклиновых кислот,

белковым синтезом и регуляцией сигнальных каскадов, что в конечном итоге проявляется в изменении функционального состояния клетки-реципиента.

Мы полагаем, что если будут найдены новые принципы попадания дцДНК в эукариотическую клетку, происходящего без участия трансфецирующих агентов и основанного на ранее неизвестных биологических свойствах клетки, то на основе этих принципов можно будет создать абсолютно новые подходы воздействия на клетку, связанные как с активирующими, так и блокирующими механизмами, которые запускают интернализованные фрагменты дцДНК. Возможно, что новая парадигма быстро найдет свое применение в онкологической практике и будет направлена на воздействие на клетки опухоли, обладающие биологическими особенностями, находящимися в рамках новых принципов интернализации экстраклеточных фрагментов дцДНК в клетку.

1.4. Современные подходы лечения онкологических заболеваний

С развитием подробного представления о работе отдельных звеньев иммунитета в ответ на возникновение неоплазии, а также глубокого понимания сети молекулярных механизмов, реализующихся в развивающейся опухоли, арсенал способов борьбы со злокачественными новообразованиями значительно расширился. Последнее десятилетие знаменовалось бурным развитием клеточной и пассивной иммунотерапии, разработкой новых и улучшением уже имеющихся онколитических вирусов, а также адъювантов, стимулирующих развитие адаптивного противоракового иммунитета. К сожалению, несмотря на большое разнообразие разработок, многие из которых достигли I и II фаз клинических исследований, только единицы из них одобрены к практическому применению.

Общепринятой терапией вне зависимости от происхождения опухоли является использование различных схем циторедуцирующего воздействия. В случае солидных опухолей применяют хирургическое удаление опухолевого очага с последующим продолжением химиотерапии. Широко используется облучение и терапия гормонами в случае гормонозависимых опухолей.

В последние годы, в связи с углублением представлений о механизмах противоопухолевого иммунного ответа организма, активное развитие получили разработки противораковых вакцин различного происхождения. Считается, что в борьбе с опухолью в первую очередь задействовано клеточное звено иммунитета. В связи с этим возникла идея использования иммунных клеток для создания противораковых вакцин. К клеточным методам иммунотерапии, или адоптивной терапии, относятся: дендритноклеточные вакцины, вакцины на основе натуральных киллеров и CAR T-лимфоцитов (Yi et al., 2023; Волков, 2016).

1.4.1. ДК-вакцины

ДК – профессиональные антигенпрезентирующие клетки, главная функция которых заключается в захвате антигена, его процессинга и представления на поверхности вместе с молекулами главного комплекса гистосовместимости I и II классов (МНС-I и II). В таком виде антиген распознается наивными Т-лимфоцитами, что в дальнейшем приводит к активации иммунного ответа против захваченного антигена. Таким образом классические ДК-вакцины представляют собой аутологичные ДК, нагруженные опухолевым антигеном *ex vivo* (Волков, 2016).

На сегодняшний день единственной одобренной управлением по контролю качества пищевых продуктов и медикаментов США (FDA, Food and drug administration) ДК-вакциной является Sipuleucel-T. Вакцина представляет собой аутологичные ДК, нагруженные рекомбинантным гибридным белком, состоящим из простатической кислой фосфатазы и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF). Применение Sipuleucel-T позволило продлить медиану выживаемости мужчин с неоперабельным метастатическим раком предстательной железы на 4.1 месяца (Kantoff et al., 2010).

1.4.2. CAR T-клетки

Определенные успехи достигнуты в разработке метода адоптивный клеточной иммунотерапии, основанного на использовании химерных антигенных Т-клеточных рецепторов (CAR). CAR Т-клетки представляют собой модифицированные *ex vivo* аутологичные Т-лимфоциты больного, нацеленные к уничтожению опухолевых клеток, экспонирующих распознаваемый CAR антиген. Особенностью химерного рецептора является способность Т-лимфоцитов взаимодействовать с клетками-мишенями без участия МНС-I/II, экспрессия которых в опухолевых клетках, как правило, снижена (Dhatchinamoorthy, Colbert, Rock, 2021; Warabi, Kitagawa, Hirokawa, 2000). Наилучшие результаты при терапии CAR Т-клетками были получены для опухолевых заболеваний В-клеточной природы (лимфома, лейкоз, множественная миелома (ММ)). В настоящее время одобрены FDA два варианта терапии анти-CD19 CAR Т-клетками при заболевании острой лимфобластной лейкемией (KymriachTM) и крупноклеточной В-лимфомой (YescartaTM) (Arabi et al., 2018).

Развитие этого направления выливается в огромное количество клинических исследований, направленных как против гематологических заболеваний (порядка 65 % всех исследований), так и против солидных опухолей (рак простаты, глиобластома, саркома, рак яичников и др.). Следует отметить, что результаты лечения солидных опухолей имеют достаточно низкую эффективность – только в 9 % случаев наблюдается ремиссия (Hou et al.,

2019; Pettitt et al., 2018). Кроме того, терапия CAR T-клетками сопряжена с развитием негативных последствий. Наиболее часто встречаемым осложнением является синдром высвобождения цитокинов вследствие ответа иммунной системы организма на сверхсекрецию нескольких цитокинов (IFN- γ и IL-6) опухолевыми клетками-мишенями. Еще одной проблемой адоптивной терапии, которую предстоит решить, является атака CAR T-клетками здоровых тканей, клетки которых могут экспрессировать опухолевый антиген (Pettitt et al., 2018).

1.4.3. NK-клетки

Первые клинические исследования с использованием NK-клеток для иммунотерапии онкологических заболеваний начались еще 30 лет назад. Для развития цитотоксического ответа (опосредованного, заключающегося в секреции воспалительных цитокинов, или прямого – лизиса клетки-мишени путем выброса гранул, содержащих гранзимы или перфорин) NK-клеткам не требуется преимунизация антигеном, благодаря чему их использование привлекает все больше внимания исследователей. Основными рецепторами, регулирующими эффекторную функцию NK-клеток, являются иммуноглобулино-подобные рецепторы клеток-киллеров (killer cell immunoglobulin-like receptors, KIRs), которые, взаимодействуя с МНС-I молекулами на поверхности клеток, генерируют сигнал для развития цитолитической активности NK. Активность NK-клеток также регулируется другими клетками иммунной системы напрямую или опосредованно с помощью ряда сигнальных молекул (IL-2, IL-12, IL-18, IL-21, TGF- β и др.) (Fang, Xiao, Tian, 2017; Волков, 2016).

Основными подходами использования NK-клеток в иммунотерапии онкологических заболеваний являются: введение аутологичных NK, *ex vivo* модифицированных NK (дополнительно активированных при помощи цитокинов, например, IL-2, обработанных антителами или экспрессирующих CAR), либо введение сигнальных молекул непосредственно в организм больного с целью активировать, увеличить количество и повысить устойчивость NK. В клинических исследованиях используют аутологичные, аллогенные NK, а также инъекции клеточной линии NK-92 – единственной линии, применение которой одобрено FDA (Suen et al., 2018; Tonn et al., 2001). Как и в случае с CAR T-лимфоцитами, применение NK в основном направлено на лечение гематологических заболеваний. Объективный клинический ответ на лечение NK для гематологических заболеваний варьируется от 25 % до 100 % (Hu, Tian, Zhang, 2019).

1.4.4. Онколитические вирусы

Еще одним перспективным методом лечения опухолей являются онколитические вирусы, специфически реплицирующихся в злокачественных клетках. Показано, что онколитические вирусы способствуют иммуногенной гибели неотрансформированных клеток, что в свою очередь ведет к развитию противоопухолевого иммунного ответа (Tsun et al., 2016). С развитием генной инженерии стало возможным модифицировать онколитические вирусы таким образом, что значительно повысилось их сродство к злокачественно-перерожденным клеткам. Так, делеция вирусного гена E1B 55-kDa исключает возможность вируса инактивировать клеточный белок p53, что делает невозможным его размножение в здоровых клетках в отличие от неотрансформированных. Другими примерами повышения сродства онколитических вирусов к опухолевым клеткам являются: делеция гена тимидинкиназы, встройка генов *GM-CSF*, *IFN- β* (Seymour, Fisher, 2016; Tsun et al., 2016).

Первым онколитическим вирусом, одобренным к применению FDA для лечения меланомы в 2015 году, стал Talimogene laherparepvec (T-VEC, Imlygic®). За последние два десятилетия девять разных вирусных семейств, включая как ДНК, так и РНК-содержащие вирусы, перешли из доклинических исследований в рандомизированные клинические исследования. Преимущество вирусных вакцин состоит в том, что их использование показывает удовлетворительные результаты при лечении солидных опухолей (меланома, глиома, рак молочной железы, поджелудочной железы, мочевого пузыря, прямой кишки) (Eissa et al., 2018).

Одной из главных задач, которые предстоит решить в рамках оптимизации использования вирусных вакцин, является улучшение системы доставки. Большинство вирусных препаратов вводится интратуморально, что в определенных случаях может быть технически невозможным. В этом смысле разработанный в настоящем исследовании терапевтический режим «Каранахан» имеет также ряд ограничений в применении, связанных со сложностью доставки препарата ДНК ко всей массе опухолевых клеток.

1.4.5. Метронормная малодозовая химиотерапия циклофосфамидом

Метронормная малодозовая химиотерапия предстает собой способ лечения онкологических заболеваний, когда в организм больного в течении длительного непрерывного периода через определенные промежутки времени вводятся дозы химиотерапевтического препарата, существенно меньше максимально переносимых доз. Отличие метронормной от конвенционной химиотерапии заключается в том, что снижение дозировки цитостатика повышает переносимость лечения, в результате чего нет необходимости в длительных

перерывах между введением препарата. При стандартных схемах химиотерапии такие перерывы необходимы для восстановления функций нормальных активно пролиферирующих тканей, также подверженных воздействию химиотерапевтических агентов (Basar et al., 2024).

Основными векторами воздействия метрономной химиотерапии являются подавление процесса ангиогенеза и коррективка состояния иммунных клеток, инфильтрующих опухоль.

Опухоль-инфильтрующие клетки подвержены супрессии опухолью и, находясь в опухолевом очаге, не способны в полной мере выполнять свои иммунные функции. Как оказалось, метрономная терапия циклофосфамидом (торговое название циклофосфан, ЦФ) в малодозовом режиме приводит к реполяризации прораковых характеристик популяции MDSC, элиминации T_{reg} s и одновременной активации популяций клеток врожденного иммунитета, инфильтрующих опухоль. Именно это свойство ЦФ рассматривается в настоящее время как терапевтически важное и может быть охарактеризовано как регуляторная терапия, ремоделирующая строму опухоли и создающая основу для проявления противораковой активности факторов врожденного и адаптивного иммунитета. Кроме того показано, что метрономная терапия ЦФ способствует увеличению количества цитотоксических Т-лимфоцитов в опухолевом очаге, а также созреванию антиген-презентирующих ДК (Basar et al., 2024; Maiti, 2014).

Антиангиогенный эффект метрономной химиотерапии связан с воздействием на эндотелиальные клетки сосудов опухоли. Происходит снижение уровня их пролиферации и миграции. Уменьшается количество циркулирующих мультипотентных предшественников эндотелиальных клеток, вышедших из костного мозга. Также в эндотелиальных и опухолевых клетках снижается уровень синтеза проангиогенных факторов (VEGF, PDGF, FGF-2) и увеличивается уровень антиангиогенных факторов (TSP-1, -2, IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-8, TNF- α) (Basar et al., 2024).

Следует отметить, что ЦФ является одним из наиболее эффективных и часто используемых цитостатиков в применении режимов малодозовой метрономной химиотерапии (Basar et al., 2024; Doloff, Chen, Waxman, 2014; Heylmann et al., 2013; Maiti, 2014; Nakahara et al., 2010; Radojicic et al., 2010; Salem, El-Naggar, Cole, 2010; Wu, Waxman, 2014)

Введения цитостатика в малых дозах в сочетании с CpG иммуномодуляторами, вакцинами или цитокинами значительно усиливает его терапевтический эффект (Berraondo et al., 2007; Guiducci et al., 2005; Marabelle et al., 2017; Medina-Echeverez et al., 2011; Tsung et al., 2002). Разноплановая противораковая направленность делает метрономную малодозовую химиотерапию ЦФ в комбинации с различными иммуномодуляторами перспективным базовым подходом для лечения онкологических заболеваний.

1.5. Опухолевая стволовая клетка как мишень в противоопухолевой терапии

Обладая наивысшим злокачественным потенциалом из всей массы опухоли, ОСК стали предпочтительной мишенью для разработки различных терапевтических агентов и технологий, с целью их элиминации и улучшения прогноза для онкологических больных.

Уже неоднократно было отмечено, что ОСК обладают огромным арсеналом средств для собственной защиты от различных повреждающих факторов, будь то физическое воздействие или лекарственные препараты. Эти клетки способны не просто предотвращать свою гибель, но и восстанавливаться после видимой запрограммированной деградации. Именно эта популяция клеток несет ответственность за рецидивы онкологических заболеваний. Считается, что после циторедуктирующей терапии выжившие ОСК становятся резистентными к следующим аналогичным обработкам и приобретают более злокачественный фенотип. Одной из главных проблем таргетной терапии, направленной на ОСК, является отсутствие «идеальной» мишени, позволяющей селективно воздействовать на низкодифференцированные клетки опухолей (Lee et al., 2025).

1.5.1. Известные техники таргетного воздействия на опухолевые стволовые клетки

Для таргетного воздействия на ОСК используются два основных типа терапевтических инструментов: (1) антитела к целевым поверхностным клеточным или трансмембранным белкам, специфическим для ОСК, или к участникам сигнальных путей, задействованных в их функционировании; (2) низкомолекулярные ингибиторы или «малые молекулы», нацеленные на специфические сигнальные каскады или индуцирующие дифференцировку ОСК, тем самым делая их чувствительными к терапии (Maucourt et al., 2021).

Существует два основных типа антител – антагонисты и агонисты. Принцип действия **антагонистов** заключается в связывании с определенным поверхностным маркером (рецептором) или с элементом сигнального каскада, участвующего в проведении сигнала внутрь клетки. Благодаря этому происходит блокирование его передачи. Основные сигнальные пути, на которые нацелены антитела – Wnt, Notch, Hedgehog, NF- κ B, PI3K/AKT/mTOR, играющие роль в поддержании плюрипотентного состояния ОСК, процессах дифференцировки и пролиферации (Yang et al., 2020b). Обширное количество моноклональных антител-антагонистов проходят различные фазы клинических исследований (Koury, Zhong, Nao, 2017; Yang et al., 2020b). Порядка 50 препаратов одобрены к применению в медицинской практике (Baldo, 2016). Другими вариантами работы антител являются блокада рецепторов (конкуренция за связывание с рецептором факторов роста и пролиферации) и фагоцитоз (поглощение покрытых антителами клеток активированными макрофагами,

моноцитами, фагоцитирующими клетками печени (клетки Купфера) и селезенки) (Scheinberg et al., 2005). Первым зарегистрированным в 2011 году конъюгатом стал brentuximab vedotin, анти-CD30 антитело, конъюгированное с токсином микротрубочек ауристатином. Препарат используется для лечения лимфомы Ходжкина и анапластической клеточной лимфомы. В 2013 году был зарегистрирован ado-trastuzumab emtansine. Препарат представляет собой антитело против HER2, конъюгированное с токсином микротрубочек мейтансином и используется для лечения метастатического HER2-позитивного рака молочной железы (Zhu, Choi, Shah, 2015).

К моноклональным антителам, разрешенным для клинического применения, относятся: rituximab – антитело к рецептору CD20 (лечение рецидивов и рефрактерных форм CD20+ В-клеточных лимфом); trastuzumab – гуманизированное моноклональное антитело к рецептору HER2; cetuximab – моноклональное антитело класса IgG1, с высокой специфичностью блокирующее прикрепление лиганда к EGFR (лечение опухолей головы и шеи) (Белоцерковский, Жуковец, Тризна, 2011; Борисов, Сакаева, 2015; Моисеенко, 2003). Интересно заметить, что niclosamide, одобренное FDA как противоглистное средство, также действует как ингибитор Wnt/ β -catenin-пути. Различными исследованиями было установлено, что препарат также обладает противоопухолевыми свойствами – избирательно воздействует на ОСК при раке яичников (Yang et al., 2020c).

Основные принципы действия **антител-агонистов** связаны с двумя видами цитотоксичности: комплемент-зависимой и антитело-зависимой. В первом случае антитело связывается с антигеном на поверхности опухолевой клетки. Это запускает систему комплемента, что в конечном итоге приводит к гибели клетки-мишени. Во втором случае антитело своим вариабельным участком связывается с антигеном на поверхности опухолевой клетки, а постоянным доменом с рецептором на поверхности цитотоксического лимфоцита, таким образом удерживая их в непосредственной близости (ADCC). В результате тесного контакта лимфоцит высвобождает секреторные лизосомы, содержащие перфорины и гранзимы, в клетку-мишень. Перфорины нарушают целостность клеточной мембраны, а гранзимы, являющиеся представителями семейства сериновых протеаз, индуцируют каспаза-зависимый апоптоз (Fang, Xiao, Tian, 2017; Lim et al., 2024; Моисеенко, 2003).

К агонистам относятся антитела, направленные на восстановление ингибированных сигнальных путей, блокада которых позволяла опухолям уходить от иммунного надзора. В результате прерывания антителом такого ингибирующего пути, торможения развития иммунного ответа организма на опухоль не возникает. Две мишени контрольных точек иммунного ответа наиболее изучены и представляют особый интерес: цитотоксический Т-

лимфоцит-ассоциированный белок 4 (CTLA-4) и рецептор программируемой клеточной гибели-1 (PD-1) (Lim et al., 2024; Тер-Ованесов и др., 2017). Первым одобренным в 2011 году FDA блокатором CTLA-4 рецептора стало антитело ipilimumab. Препарат был разрешен к применению при лечении метастатической меланомы (Darvin et al., 2018; Peng, Bao, 2022). За этим последовало активное изучение и разработка других ингибиторов контрольных точек иммунитета. Уже в 2014 году для лечения неоперабельной и метастатической меланомы были одобрены еще два антитела: nivolumab и pembrolizumab. Nivolumab является полностью человеческим моноклональным антителом, pembrolizumab – гуманизированным моноклональным антителом. Оба антитела нацелены на PD-1 (IgG4) и блокируют взаимодействие между рецептором PD-1 и его лигандами PD-L1 и PD-L2 (Zhu, Choi, Shah, 2015; Графанов и др., 2018).

По своей структуре антитела делятся на моно- и биспецифические. В отличие от моноспецифических антител, имеющих две идентичные легкие и тяжелые цепи, биспецифические антитела имеют разные антигенсвязывающие домены. Несмотря на значительные успехи в случае применения моноспецифических антител, часто у пациентов наблюдается первичная или приобретенная устойчивость к их воздействию, вызванная активацией альтернативных рецепторов или сигнальных путей в злокачественных клетках. Помимо этого, взаимодействие между опухолевыми клетками и их микроокружением также вносят вклад в развитие резистентности к лечению (Zhu, Choi, Shah, 2015). В этой связи биспецифические антитела имеют преимущество, так как могут инактивировать несколько альтернативных путей активации ОСК, а также привлекать к опухоли цитотоксические клетки и нести токсические реагенты.

Первое зарегистрированное для клинического применения биспецифическое антитело – catumaxomab (анти-EpCAM/CD3). В 2009 году препарат был зарегистрирован Европейским медицинским агентством для лечения больных с асцитом, вызванным прогрессированием онкологических заболеваний органов женской репродуктивной системы. Следующим одобренным к клиническому применению биспецифическим антителом стало blinatumomab (анти-CD19/CD3, в 2014 году одобрено FDA). Антитело blinatumomab предназначено для лечения острого В-лимфобластного лейкоза путем формирования цитолитического клеточного синапса Т-лимфоцитов и CD19-экспрессирующих В-лимфоцитов. Также одобрено FDA ингибитор рецепторов тирозинкиназы (RTKs) lapatinib, одновременно взаимодействующее с EGFR и HER2 и применяющееся в комбинированной терапии HER2-позитивного рака молочной железы (Zhu, Choi, Shah, 2015; Солопова, Мисюрин, 2019).

На сегодняшний день клинические исследования проходят десятки биспецифических антител, направленных на разнообразные мишени: белки RTKs (анти-EGFR/HER3, HER2/HER3, EGFR/IGF1R), CD3/EpCAM, CD3/CEA, CD3/PSMA, CD3/CD33, CD28/CSPG4, CD64/CD19 и другие (Zhu, Choi, Shah, 2015; Солопова, Мисюрин, 2019).

«*Малые молекулы*» – это искусственно синтезированные вещества. Они способны проникать внутрь клеток и действовать на различные мишени: блокировать внутриклеточную часть рецепторов или белки, участвующие в передаче сигнальных путей, ответственных за основные функции ОСК. Мишени для указанных препаратов аналогичны тем, которые используют для разработки моноклональных антител (Müller et al., 2017).

Первый низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы imanitib был одобрен FDA к применению в клиническом использовании в 2001 году. С этого момента разработка новых низкомолекулярных ингибиторов получила толчок к развитию. За последние 20 лет наблюдалось значительное увеличение числа таргетных препаратов для лечения онкологических заболеваний. На сегодняшний день в США и Китае одобрено в общей сложности 89 противоопухолевых «малых молекул». Эти препараты охватывают широкий спектр мишеней, включая киназы, эпигенетические регуляторные белки, ферменты репарации ДНК (Yang et al., 2020c; Zhong et al., 2021).

Несмотря на значительное разнообразие существующих антител и вариантов их конструирования, пассивная иммунотерапия все еще нуждается в улучшениях. Основной проблемой является поиск подходящих мишеней, которые удовлетворяли бы всем требованиям клинического применения выбранных терапевтических антител.

1.6. Заключение

Опухоль – это абберантный орган, живущий независимо от организма по своим законам. При этом опухоль нельзя назвать чужеродной организму структурой. Это перерожденная своя собственная ткань, но не поддающаяся влиянию законов морфогенеза. Единственное что этому квази органу требуется, это пространство и питательная среда, что он и получает от организма. Далее неоплазия развивается по четко выраженным законам, а именно: неконтролируемый рост, метастазирование (генерализация) и гибель носителя вместе, как бы парадоксально это ни было, с причиной гибели. Бросается в глаза очевидно странная философски-ориентированная ситуация, когда «губительное для организма нечто погибает вместе со своим хозяином». Это означает, что опухоль – это не «чужой», а «родное существо, потерявшее рассудок и ведущее к самоубийству».

Сказанное означает, что вопрос разрушения опухоли как квази-органа всегда будет иметь большое количество непреодолимых трудностей, связанных с невозможностью отделить возникшее «тканевое начало с чужеродными характеристиками» от собственных тканей организма.

Проведенный анализ литературы дает представление о важнейших особенностях опухолевой ткани, свидетельствующий о пластичности неоплазии по всем возможным молекулярным механизмам функционирования. Более того стало очевидным, что опухоль – это гетерогенная самоорганизующаяся ткань, где на вершине иерархической структуры находятся практически неубиваемые ОСК. Мы полагаем, что элиминация ОСК из очага опухолевого роста является приоритетной задачей практической онкологии, поскольку лишенная туморогенного начала (в виде ОСК) опухоль быстро разрушается системой иммунного надзора организма, вышедшей из-под контроля опухоли.

1.7. Краткая историческая ремарка к настоящему исследованию

В наших предыдущих работах было установлено, что инъекции препаратов фрагментированной дцДНК обладают лейкопротекторным/лейкостимулирующим эффектом при вызванной ЦФ миелосупрессии мышей (Долгова и др., 2009).

Также было показано, что при внутривенном введении смертельно облученным γ -радиацией мышам (9.6 Гр) препарата на основе дцДНК человека происходит спасение экспериментальных животных от гибели. В селезенках у таких мышей детектировались селезеночные колонии, что свидетельствовало о спасении стволовых клеток крови, которые мигрировали в селезенку, сформировали там колонии, благодаря чему произошло восстановление кроветворной и иммунной систем организма (Likhacheva et al., 2007).

Полученные данные косвенно свидетельствовали, что фрагменты экстраклеточной дцДНК в первую очередь оказывают воздействие на клетки костного мозга (ККМ) мышей, в частности на гемопоэтические стволовые клетки (ГСК). Было выдвинуто предположение, что экстраклеточная ДНК достигает внутренних компартментов ККМ и участвует в процессе репарации ДЦР, вызванных действием как кросслинквирующего цитостатика ЦФ, так и радиации (Dolgova et al., 2012a; Likhacheva et al., 2007).

Дальнейший анализ был направлен на изучение молекулярных событий, отражающих взаимодействие фрагментов дцДНК и ККМ. Эксперименты были выполнены как в системе *in vivo* при внутривенном/внутрибрюшинном введении экстраклеточной дцДНК в организм мышей и последующего анализа ККМ (**Рисунок 3 А**), так и в системе *ex vivo* при совместном культивировании ККМ с экстраклеточной дцДНК (**Рисунок 3 Б**) (Dolgova et al., 2012b).

В первом случае мышам вводили внутривенно ЦФ (200 мкг/кг) и через 18 часов ежедневно 12 раз вводили препарат дцДНК человека (0.5 мг/инъекцию). Далее извлекали ККМ мышей и из ядерной фракции выделяли ДНК. Указанную ДНК использовали в качестве матрицы в ПЦР со специфическими праймерами, подобранными на ген каспазы-3 человека, и анализировали Саузерн-блот гибридизацией. В качестве зонда для гибридизации использовали меченый ^{32}P фрагмент гена каспазы-3 человека (~260 п.н.) (**Рисунок 3 А**). Анализ полученных результатов демонстрировал присутствие фрагментов человеческой ДНК в ядерной фракции ККМ мышей. Как следует из рисунка, размер этих фрагментов составлял не менее 260 п.н. ПЦР-фрагменты гена каспазы-3 человека обнаруживались в ядерном пространстве ККМ вплоть до последней экспериментально подтвержденной точки: 13 суток после обработки (Dolgova et al., 2012b). Появление специфического сигнала гибридизации свидетельствовало о присутствии в образце видоспецифической матрицы человеческого происхождения (Dolgova et al., 2012b).

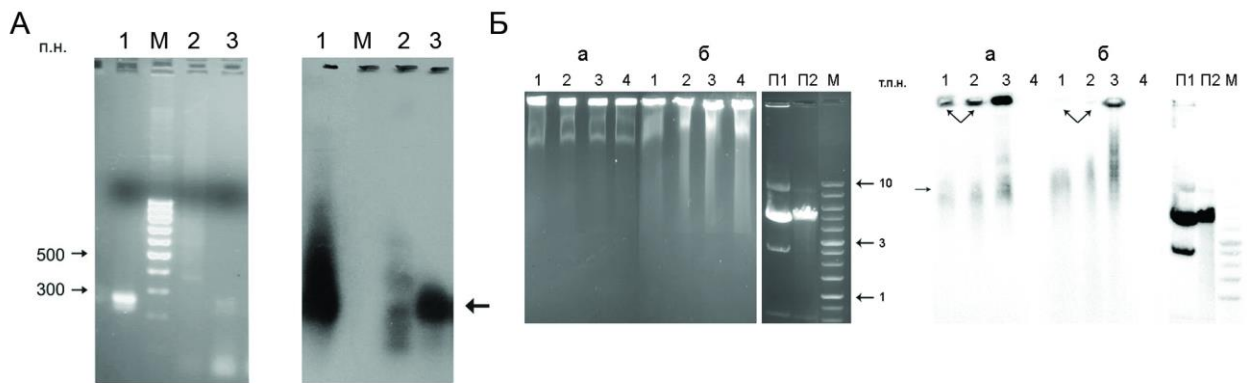


Рис. 3. Анализ интернализации экстраклеточной дцДНК в клетки костного мозга мышей. **А)** Агарозный гель (слева) продуктов ПЦР с использованием специфических праймеров на ген каспазы-3 человека и использованием в качестве матрицы: суммарной ДНК, выделенной из плаценты человека (1), ДНК ККМ мышей (2) и ДНК ядерной фракции ККМ мышей, выделенной через 8 часов после внутривенного введения экспериментальным животным фрагментированной дцДНК человека (3). Авторадиограф этого же геля (справа). Стрелкой указан гибридизационный сигнал, соответствующий продукту ПЦР с праймерами на ген каспазы-3. **Б)** *Ex vivo* культивирование ККМ с рEGFP-N1 плазмидной ДНК после рестрикции SmaI (1), HindIII (2), суперскрученной формы плазмиды (3) или без добавления экстраклеточной дцДНК (4) в течение 7 часов. (а) ККМ intactных мышей; (б) ККМ мышей, обработанных ЦФ (200 мкг/кг) за 18 часов до выделения ККМ. Агарозный гель (слева) ядерной фракции ККМ и гибридизация по Саузерну того же геля с ^{32}P -меченым зондом последовательности GFP-гена (справа). Стрелками указаны гибридизационные сигналы (Dolgova et al., 2012b).

Во втором случае из трубчатых костей мышей СВА/Лас вымывали ККМ. При этом было сформировано две группы мышей: intactные и обработанные ЦФ (200 мкг/кг) за 18 часов до начала эксперимента. Полученные таким образом ККМ инкубировали *ex vivo* с рEGFP-N1

плазмидной ДНК после рестрикции SmaI, HindIII и суперскрученной формой. Далее, как и в предыдущей серии экспериментов, из клеток выделяли ядра, заливали их в блоки легкоплавкой агарозы, проводили электрофорез и Саузерн-блот анализ, используя в качестве зонда для гибридизации ^{32}P -меченый ген GFP (Рисунок 3 Б). *Оказалось, что экстраклеточная плазмидная ДНК в недеградированной форме присутствовала в ядре клеток костного мозга. Анализируя сигнал гибридизации, было сделано предположение, что в ККМ мышей происходит замыкание молекул плазмиды в мономерное или мультимерное кольцо* (Dolgova et al., 2012b). Проведенные эксперименты по *in situ* гибридизации и *in situ* ПЦР свидетельствовали, что ДНК-материал исходно экстраклеточной локализации детектировался в 0.01–0.1 % ККМ мышей (Dolgova et al., 2012b).

Таким образом независимыми подходами в нескольких последовательных исследованиях было показано, что экстраклеточная дцДНК интернализуется во внутренние компартменты (в том числе в ядерное пространство) небольшого количества (0.01–0.1 %) ККМ мышей и присутствует внутри клетки в недеградированном виде (линеаризованная и кольцевая формы плазмидной ДНК). Во внутриклеточных компартментах экстраклеточные фрагменты сохраняются вплоть до последней экспериментально подтвержденной точки: 13 суток после обработки (Dolgova et al., 2012b).

Также была проведена серия исследований, в которых анализировались различные физиологические, клеточные, молекулярные параметры, проявляющиеся у здоровых экспериментальных мышей при сочетании воздействия ЦФ и фрагментированной дцДНК. В результате проведенной работы были описаны новые биологические эффекты, главным из которых являлся феномен «окна смерти» (Dolgova et al., 2012a). Указанный феномен заключался в том, что при введении мышам экстраклеточной/экзогенной ДНК в определенный промежуток времени после воздействия ЦФ, происходила массовая гибель животных. Оказалось, что феномен «окна смерти» обусловлен интерференцией процесса репарации на этапе восстановления основных интермедиатов – ДЦР. Интерференция проявлялась таким образом, что клетки, как предполагалось, в первую очередь ГСК, не могли корректно завершить процесс репарации, в результате чего погибали путем апоптоза. У мышей в костном мозге исчезала популяция белого ростка кроветворения, а также наблюдалась инволюция иммунных органов (тимус, селезенка). Параллельно с этим происходила активация оппортунистической инфекции. В отсутствие возможности активировать иммунную систему организма, у мышей развивалось системное воспаление, переходящее в полиорганную недостаточность и, как следствие, наступала гибель животных (Dolgova et al., 2012a). *Полученные результаты означали, что фрагменты дцДНК доставляются в костный мозг, взаимодействуют с*

клетками определенной клеточной популяции, что приводило к развитию симптома «окна смерти» и всех вышеописанных эффектов. Основной клеточной популяцией, которая могла отвечать за описанные события, могла быть популяция ГСК.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы и оборудование

В работе были использованы следующие реактивы: α - P^{32} дезоксинуклеозидтрифосфаты (α - ^{32}P -dATP) – ЗАО Научно-производственная фирма «Нуклид-ТранС» (г. Москва), мембрана Zeta-Probe (Bio-Rad, США) и мембрана Hybond-N (Amersham, Швеция). Для включения флуоресцентной метки в ДНК зонд использовали предшественники: тетраметилродамин-5(6)-[5-(3-карбоксаминоаллил)-2'-дезоксинуридин-5'-трифосфат] (TAMRA-5'-dUTP) и флуоресцеин-5(6)-карбоксамидокапроил-[5-(3-аминоаллил)-2'-дезоксинуридин-5'-трифосфат] (Flu-12'-dUTP) (Biosan, Россия). Для приготовления цитологических препаратов использовали Antifade DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane), глицерин (Sigma Aldrich, США); флуоресцентные красители, окрашивающие хроматин: DAPI (40,6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma Aldrich, США), Hoechst (Thermo Fisher Scientific, США). Кросслинкирующие цитостатики: митомицин С (Sigma Aldrich, США), циклофосфамид (торговая марка Эндоксан®, Baxter oncology, Германия). Для анализа цитокинов использовали коммерческую тест-систему «human cytokine 27-Plex kit» (Bio-Rad, США). Для проведения qPCR использовали SYBR Green PCR Master Mix (БиоЛабмикс, Россия). Выделение ДНК из агарозы осуществляли при помощи «DNA cleaning kit» (Медиген, Россия); кДНК получали с помощью «Mint-2 cDNA synthesis kit» (Evrogen, Россия). Для проведения RNAseq использовали наборы Illumina TruSeq RNA sample preparation kit, v.2. (Illumina, США) и MiSeq Reagent Kit v.3 (Illumina, США).

Для молекулярных работ использовали: этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), диметилсульфоксид (DMSO), додецилсульфат натрия (SDS), глицин, BSA, катионный краситель Basic Blue 41 (BB41), пропидиум йодид (Sigma Aldrich, США); $MgCl_2$ (Fluka, Швейцария); фосфатно-солевой буфер (Phosphate-buffered saline, PBS), этидиум бромид, трис гидрохлорид (Tris-HCl), плазмиды pUC19 (Медиген, Россия), pEGFP-N1 (Clontech, США), pBlueScript SK(+) (Addgene, США); NaCl (Реахим, Россия); бромфеноловый синий, Triton X-100, N-Lauroylsarcosine, DTT (дителиотреитол), фиколл, спермин и спермидин (Serva, Германия); агарозу (Диаэм, Россия); легкоплавкую агарозу (Low Melt Ultra-Pure DNA Grade Agarose) (Bio-Rad, США); параформальдегид (AppliChem, Германия), метанол (ХимМед, Россия); TRIzol (Thermo Fisher Scientific, США); верографин (торговая марка Урографин®, Bayer Schering Pharma, Германия). Ингибиторы эндоцитоза: азид натрия, 5-(N-этил-N-изопропил)амилорид (EIPA), цитохалазин Д, метил- β -циклодекстрин (M β CD), нистатин, диназор, вортманин, хлорпромазин, декстран (Sigma Aldrich, США).

Для микробиологических методов использовали: бакто-пептон (DIFCO Laboratories, США); бактериальный агар (AppliChem, Германия), дрожжевой экстракт (Медиген, Россия); 5-бromo-4-хлоро-3-индолил- β -D-галактопиранозид (X-gal), изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (IPTG) (SibEnzyme, Россия), компетентные клетки *E. coli*: XL2-Blue MRF', DH5 α (коллекция ИЦиГ СО РАН).

Для культуральных работ использовали питательные среды: DMEM, α MEM, RPMI-1640, коллагеназу, 0.25 % раствор трипсина-ЭДТА (Gibco, США); FBS (Fetal bovine serum, фетальная бычья сыворотка) (HyClone, США); антибиотики пенициллин/стрептомицин (Sigma Aldrich, США) или гентамицин (БиотоТ, Россия); FGF-b (Sigma-Aldrich, USA); культуральный пластик (TPP, Швейцария); меж-фильтры 40 и 70 мкм (BD Bioscience, США).

Ферменты: эндонуклеазы рестрикции (HindIII, EcoRV и др.) (SibEnzyme, Россия); ДНКазы I (Serva, Германия); РНКазы (ООО «Самсон-Мед», Россия); 0.25 % трипсин (Sigma Aldrich, США); протеиназа К (Bioron, Германия); Big Dye 3.1 (Applied Biosystems, США); Taq-полимераза, Pfu-полимераза, фрагмент Кленова (Evrogen, Россия).

Антитела: меченые FITC антитела к модифицированному гистону γ H2AX и изотип-контроль – меченные FITC козы антитела против IgG кролика (Sigma, США). Меченые FITC антитела к CD34 мыши и изотип-контроль – меченые FITC крысиные антитела к IgG2a (BD Pharmingen, США). Моноклональные антитела к CD73, CD20, CD19, CD45, CD44 и CD133 человека (BD Biosciences, США). Меченые FITC антитела к CD133 человека, меченые APC антитела к CD90 человека и FITC или APC-меченые мышинные антитела к IgG1 в качестве изотип-контроля (Miltenyi Biotec, Германия). Меченые PE-Cy5 антитела против c-Kit мыши, меченые FITC антитела против Sca-1 мыши и соответствующие изотип-контроли: PE-Cy5 c-Kit isotype, FITC Sca-1 isotype (Biolegend, США).

Оборудование: Molecular Imager FX Pro+ (Bio-Rad) и программа Quantity One; центрифуга Eppendorf 5810 R; ультрацентрифуга L8-M (Beckman, США); цитоцентрифуга Cytospin 4 (Thermo Scientific, США); амплификатор T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США); qPCR амплификатор QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США) и программа QuantStudio Design & Analysis или qPCR амплификатор Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) и программа StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems, США); CO₂-инкубатор (Mettler, Германия); ЯМР томограф «BioSpec 117/16USR» NMR (Bruker, Германия); флуориметр Qubit 2.0 (Invitrogen, США); спектрофотометр Nanodrop 2000 (Eppendorf, США); проточный цитометр BD FACSAria III (BD Bioscience, США); Bio-Plex Protein Assay System (Bio-Rad, США); микротом Reichert-Jung (Austria); электронный микроскоп JEM 1400 (Jeol Ltd., Япония), снимки были сделаны с помощью интегрированной цифровой камеры Jeol и боковой цифровой камеры

Veleta (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Германия). Система автоматизированной микроскопии живых клеток Live Cell Imager Cell IQ (CM Technologies, Финляндия). Флуоресцентные микроскопы AxioImager M1 (Zeiss, Германия) и Axioskop 2 Plus (Zeiss, Германия), программы ISIS V. 5.4.9 (MetaSystems) или ZEN 2010 B SP1. Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM 780 NLO (Zeiss, Германия) и ZEN 2010 B SP1 программа. RNAseq проводили на приборе MiSeq (Illumina, США).

Праймеры. Для амплификации каспазы-3 человека: Pr. 3 5'-AGCACATTAAGCTTCACTCA-3', Pr. 4. 5'-TTTTATAACTGTTGTCCAGGGA-3'. Для наработки *Alu*-повтора человека: Pr. 9 5'-CGAGGCGGGAGGATCACTTGAGCCC-3' и Pr. 11 5'-GCGCGCGCCACCACGCCCCGGC-3'. Стандартные M13 праймеры: 5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3', 5'-GATCTTACCGCTGTTGAGAT-3'. Праймеры на участок гена *Amp* в плазмиде pUC19: 5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3', 5'-GATCTTACCGCTGTTGAGAT-3'. На константные области VDJ-локуса: JH 5'-ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT-3', FR1c 5'-AGGTGCAGCTGSWGSAGTCDGG-3', Fr3c 5'-GACACGGCCGTGTATTACTC-3', FR2b 5'-GTCCTGCAGGCCCCCGGAAAAAGTCTGGAGTGG-3'. Гены домашнего хозяйства человека: RPLP0-for 5'-AGGCCTTCTTGGCTGATCCATCT-3', RPLP0-rev 5'-TATCCTCGTCCGACTCCTCCGA-3'. Гены домашнего хозяйства мыши: β -act-for 5'-GGTGTGATGGTGGGAGAAGC-3', β -act-rev 5'-TCTCCATGTCTGTCCTCCAGTTGG-3'; Ptger2-for 5'-CCTGCTGCTTATCGTGGCTG-3', Ptger2-rev 5'-GCCAGGAGAATGAGGTGGTC-3'. Специфические праймеры для qPCR, валидирующего результаты RNAseq, приведены в работах (Dolgova et al., 2025; Petrova et al., 2022; Potter et al., 2017). Random primer 5'-NNNNNN-3' (БиоЛабмикс, Россия).

2.2. Экспериментальные животные

В экспериментах использовали однополых 2–6 месячных мышей линий CBA/Lac и C57BL/6, которые разводились в стандартных условиях вивария при Институте цитологии и генетики СО РАН. Животные содержались в пластиковых клетках, по 5–10 особей в каждой, и имели свободный доступ к воде и пище (корм ПК120-1 (Лабораторснаб, Москва)). А также иммунодефицитных мышей линий SCID (Charles river) и Nu/J SPF статуса в возрасте 6–7 недель. Указанные животные содержались в ЦКП «SPF-виварий» 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*.

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.

2.3. Опухолевые модели

В экспериментах были использованы следующие линии клеток опухоли мыши и человека.

2.3.1. Карцинома мышцы Кребс-2

Культура клеток Кребс-2 была заимствована из коллекции ИЦиГ СО РАН. Для получения асцитной формы опухоли клетки перевивали мышам линии СВА/Лас внутрибрюшинно в объеме 200 мкл (2 млн клеток). Для формирования солидных опухолей клетки Кребс-2 перевивали внутримышечно в заднюю правую лапу в необходимом количестве в 100 мкл среды RPMI-1640 или PBS. В ходе экспериментов, как только солидные опухоли начинали пальпироваться (примерно через 7 дней после перевивки), каждые 1–2 дня проводили измерение их объема с помощью штангенциркуля. Объем опухоли рассчитывали, используя стандартную формулу $\text{длина} \times \text{высота} \times \text{ширина}$.

2.3.2. Устойчивая к действию циклофосфида лимфосаркома мышей

Устойчивая к действию циклофосфида лимфосаркома мышей (RLS) (Андреева и др., 2006; Андреева, Шестопалова, Попова, 2006) (resistant lymphosarcoma), была предоставлена из коллекции ИЦиГ СО РАН. Для формирования асцитной формы клетки опухоли отбирали из мышей с 10-дневным асцитом, разводили физиологическим раствором и перевивали внутрибрюшинно экспериментальным животным линии СВА/Лас в количестве 1 млн/мышь.

2.3.3. Карцинома мышцы Льюис

Карцинома Льюис представляет собой иммуногенную опухоль, характеризующуюся метастазированием в легкие в 100 % случаев (Мауо, 1972). Карцинома легких Льюис возникла спонтанно у мышей C57BL/6 в 1951 г. Штамм получен в ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия) из Национального института рака США в сентябре 1973 г. и был любезно предоставлен из

коллекции ИЦиГ СО РАН для настоящей работы. Культуру клеток перевивали на мышах линии C57BL/6.

2.3.4. Гепатокарцинома мыши Г-29

Культура клеток гепатокарциномы Г-29 была предоставлена из коллекции ИЦиГ СО РАН. Для получения трансплантата клетки опухоли выделяли от мышей с 10-дневным асцитом, разводили физиологическим раствором и перевивали экспериментальным животным линии СВА/Лас в количестве 2 млн/мышь (для формирования асцитной формы опухоли внутрибрюшинно) или 1 млн/мышь (для формирования солидного трансплантата – внутримышечно в заднюю лапу).

2.3.5. Глиобластома человека U87

Культура клеток глиобластомы человека U87 была любезно предоставлена «SPF-вивариум» ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия). Культивацию производили в среде DMEM, содержащей 10 % FBS при 37 °C и 5 % атмосфере CO₂.

2.3.6. В-лимфома человека, индуцированная вирусом Эпштейна-Барр

Культура клеток была получена из аспирата клеток костного мозга пациента с диагнозом множественная миелома в НИИ фундаментальной и клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск, Россия) и любезно предоставлена для проведения настоящей работы. Подробности получения культуры следующие.

2.3.6.1. Пациент

В исследование был включен пациент С. (мужчина, 60 лет) с диагнозом: множественная миелома (C90.0 WHO 10.0) с поражением костей черепа, грудного и поясничного отделов позвоночника, мягкотканым компонентом грудины, правой лопатки. В результате ранее проведенного лечения (4 курса PAD; 5 курсов VCD) диагностирована полная ремиссия.

Пациент С. поступил в отделение гематологии Клиники иммунопатологии Института фундаментальной и клинической иммунологии для проведения аутологичной трансплантации периферических гемопоэтических стволовых клеток в сочетании с костномозговыми мезенхимальными стромальными клетками в соответствии с медицинской технологией, разрешенной Министерством здравоохранения РФ (Разрешение Росздравнадзора ФС №2008/014 от 30.01.2008 г.). Пациент подписал информированное согласие на обследование и лечение в соответствии с Хельсинской декларацией от 1975 г. (Patient gave informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki of 1975).

По результатам обследования подтверждена полная ремиссия заболевания: бета-2-микроглобулин – 1.190 мг/л (N – 0.670-2.329 мг/л; IMMULITE 2000, Siemens); электрофорез белков сыворотки крови – М-градиента парапротеина не обнаружено; миелограмма пунктата крыла подвздошной кости – препараты костного мозга достаточной клеточности, представлены все ростки кроветворения – без особенностей, плазматических клеток не обнаружено, атипичных элементов не обнаружено.

2.3.6.2. Получение культуры клеток

Из крыла подвздошной кости пациента был получен аспират костного мозга в объеме 50 мл, из которого путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина (1.078 г/л) была выделена фракция костномозговых моноклеарных клеток в количестве 700 млн. Для получения мезенхимальных стволовых клеток костномозговые моноклеарные клетки инкубировали в пластиковых флаконах (100 млн/флакон, 150 см², TPP, Швейцария) в питательной среде α MEM с 10 % FBS, дополненной 100 мкг/мл гентамицина и 5 % пулированного лизата человеческих тромбоцитов, при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Через 48–72 ч неприкрепленные к пластику клетки удаляли, а прилипающую фракцию клеток культивировали до получения конфлюентного монослоя в среде α MEM с 20 % FBS и 5 нг/мл основного фактора роста фибробластов FGF- β . Отделение мезенхимальных стволовых клеток от поверхности флакона осуществляли с использованием 0.25 % трипсина и 0.02 % ЭДТА в течение 10 мин.

В результате на первом пассаже (на 14 сутки после получения аспирата костного мозга) было получено 21.5 млн мезенхимальных стволовых клеток, большая часть из которых (19 млн клеток) была криоконсервирована в растворе человеческого альбумина («Микроген», Россия), содержащем 10 % DMSO. Остальные 2.5 млн мезенхимальных стволовых клеток продолжали культивировать с целью дальнейшей количественной экспансии.

На втором пассаже (через 35 суток) было получено 13.8 млн мезенхимальных стволовых клеток. Была проведена оценка фенотипа генерированных клеток, после чего 12.5 млн мезенхимальных стволовых клеток было криоконсервировано. Оставшиеся 1.3 млн мезенхимальных стволовых клеток продолжили культивировать. С течением времени была получена культура индуцированной вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ) В-лимфомы (подробное описание в разделе 3.2.2.1).

2.3.6.3. Характеристика культуры клеток

Анализ клеточной культуры был заказан и выполнен в сертифицированной лаборатории «ИНВИТРО» (ООО «ИНВИТРО», медицинская лицензия ЛО-43-01-002895 от 01.11.2018, <https://www.invitro.ru>).

Для определения наличия ДНК вируса Эпштейна-Барр, из клеток описанной линии была выделена общая ДНК. ВЭБ-специфическая ДНК была обнаружена методом ПЦР со специфическими праймерами (анализ № 351URO). Для проведения FISH-анализа генотипа, клетки осаждали при 400 g в течение 5 мин и дважды промывали PBS. 10 млн клеток фиксировали смесью метанола и уксусной кислоты (3:1). Клетки анализировали методом FISH на наличие перестроек в локусе 14q32 гена *IGH*, делеций/амплификаций локуса 1q21 гена *CKS1B* и 1p32 гена *CDKN2C*, а также делеций локусов 13q14.2, 13q34 и 17p13 генов *DLEU*, *LAMP* и *TP53*, соответственно (анализ № 5.121). Для каждого варианта анализировали 200 ядер.

2.4. Эксперименты на модели клеток линии U87

Для получения солидной опухоли глиобластомы U87 мышам линии Nu/J 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 линии SCID. 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» с использованием T2-взвешенного изображения (weighted techniques) в аксиальной, коронарной и саггитальной плоскостях.

2.4.1. Хирургическое удаление ортотопического ксенотрансплантата

Для эксперимента с хирургическим вмешательством животные содержались в «SPF виварии» Института цитологии и генетики СО РАН, в описанных выше условиях. Всем мышам (15 особей) субкортикально перевили суспензию клеток линии U87 (300 тыс. клеток в 3 мкл среды DMEM на мышь) на глубину 2.5–3 мм (отсчет от поверхности кожи) в теменную долю левого полушария головного мозга.

Планирование и выбор доступа для оперативного вмешательства осуществлялись по данным предоперационного МРТ-сканирования. Оценивался объем (волюметрия полуавтоматическим методом) и глубина залегания опухоли относительно кожи. На основании снимков подбирался наикратчайший проекционный доступ к образованию и планировался допустимый объем резекции. Оценивалось отношения опухоли к

ликворопроводящим путям, что позволило избежать вскрытия желудочков головного мозга во время операции. Сканирование производилось на высокочастотном МР-томографе «BioSpec 117/16USR» с напряженностью магнитного поля в 11.7 Тесла в трех проекциях, с использованием T2-ВИ. Проведение операций осуществлялось на базе Федерального центра нейрохирургии г. Новосибирск.

Технология нейрохирургического вмешательства состояла из следующих технических приемов и хирургических процедур (**Приложение 1**). Анестезиологическое пособие: ксилавет – 120 мкг на мышь с средним весом 21 г, телазол – 300 мкг/мышь. Комбинация ксилавет/телазол физиологическим раствором доводилась до 100 мкл и вводилась внутримышечно. Продолжительность анестезиологического пособия составляла в среднем 35–40 минут. Антибиотикопрофилактика: внутривенно или подкожно вводилось 80 мкг/мышь гентамицина. Мышь фиксировалась на планшете и укрывалась стерильной салфеткой. Производилась блефарорафия с двух сторон путем наложения одиночных швов, с целью профилактики язвенного кератита и для предотвращения попадания антисептических средств в глаза мыши. Кожа в области разреза обрабатывалась антисептиком (спиртовой раствор хлоргексидина) и инфильтрировалась 1 % раствором новокаина. Производился срединный линейный разрез мягких тканей головы. Скальп отводился четырьмя швами держалами взятыми на «москиты». Производилась субпериостальная диссекция и обнажалась кость. Далее, при помощи системы «Stryker» и алмазного бура с диаметром наконечника 2 мм, накладывалось краниотомическое окно в проекции перевитой опухоли (левая теменно-затылочная область) на глубину до *lamina vitrae* и размерами 0.5×0.5 см. Выбор точки также зависел от локализации образования в головном мозге мыши, которая оценивалась по данным предоперационных снимков. В процессе «дриллинга» операционное поле орошалось теплым физиологическим раствором, для предупреждения нагревания кости, подлежащих тканей и сплавления костной стружки с поверхностью бура. Операционная рана промывалась стерильным теплым физиологическим раствором (температура 36–37 °C) для удаления костной стружки. Пинцетом и костным элеватором удалялся остаток *lamina vitrae*. Операционная рана обкладывалась стерильными салфетками, смоченными физиологическим раствором. Производилась кортикотомия и последующая резекция опухоли в области теменной доли с использованием инсулинового шприца. Далее проводился тщательный гемостаз. Стоит отметить, что пластика краниотомического дефекта в кости не проводилась. Рана ушивалась непрерывным обвивным швом на кожу. Использовался рассасывающийся шовный материал на атравматической игле – Викрил 6/0. Проводилась финальная обработка

швов и области операционной раны спиртовым раствором хлоргексидина. Швы, наложенные в ходе блефарорафии, снимались.

В течении десяти суток после операции швы на скальпе обрабатывались спиртовым раствором хлоргексидина. Перед проведением адъювантной химиотерапии был выделен пятидневный промежуток времени для восстановления мышечной массы после хирургического вмешательства и заживления послеоперационных ран. В данный период всем мышам производились инъекции антибиотика широкого спектра действия гентамицина в дозировке 80 мкг/мышь.

2.5. Получение суммарной нативной ДНК человека

Препарат суммарной нативной ДНК человека был выделен из плацент здоровых женщин безфенольным методом, который позволяет получить полноценный геном, сохраняя фрагменты ДНК, прочно ассоциированные с белками ядерного матрикса. Фрагментация ДНК осуществлялась ультразвуком с использованием ультразвукового дезинтегратора при частоте 22 КГц, в результате чего получали смесь фрагментов ДНК размером от 200 до 6000 п.н. Полученный препарат ДНК хранили в физиологическом растворе при -20°C . Данный препарат является фармакопейным препаратом (Регистрационное удостоверение ЛСР-004429/08) и в качестве объекта промышленной собственности принадлежит компании ООО «Панаген».

2.6. Синтез TAMRA-ДНК зонда

Последовательность ДНК зонда представляет собой *Alu*-повтор человека. *Alu* фрагмент был наработан в реакции ПЦР с использованием в качестве матрицы человеческой суммарной ДНК (раздел 2.5) и праймеров 9 и 11 (последовательность праймеров в разделе 2.1).

Полученный *Alu* фрагмент (278 п.н.) был клонирован в плазмиду pBlueScript SK(+) по сайту рестрикции EcoRV и просеквенирован с использованием стандартных M13 праймеров. Последовательность *Alu*-повтора человека состояла из конечной и начальной части двух tandemно расположенных повторов: *AluJ* и *AluY* (AC002400.1, 53494-53767). Далее указанную плазмиду использовали в качестве матрицы для получения меченого флуорохромом TAMRA двуцепочечного ДНК зонда.

Мечение ДНК проводили при помощи ПЦР, добавляя к смеси стандартных нуклеотидов TAMRA-5'-dUTP, по методике, описанной в работе (Сайфитдинова, 2008). В качестве праймеров использовали стандартные M13 праймеры (раздел 2.1). От невключившихся нуклеотидов избавлялись переосаждением ДНК (Сайфитдинова, 2008).

Включение метки TAMRA-5'-dUTP измеряли с помощью спектрофотометра Nanodrop и рассчитывали путем сравнения сигнала до и после ПЦР-переосаждения.

Аналогичный протокол использовали для получения меченого Flu-5'-dUTP дцДНК зонда.

2.7. Введение TAMRA-5'-dUTP предшественника в образцы суммарной ДНК человека при помощи фрагмента Кленова

В качестве матрицы использовали суммарную нативную ДНК человека (раздел 2.5). Матричную ДНК кипятили на водяной бане 5 мин и быстро переносили в лед. Реакцию проводили в 50 мкл. Реакционная смесь содержала 0.5–1 мкг матричной ДНК, 1×буфер для фрагмента Кленова (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 0.5 мг/мл BSA; 50 mM ЭДТА, pH 8.0), 0.1 mM раствор нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP, 65 мкМ dTTP и 35 мкМ dUTP-5'-TAMRA, 0.1 mM random primer и фрагмент Кленова (5 ед.). Реакцию проводили в течение часа при комнатной температуре, затем останавливали добавлением 1 мкл 0.5 М ЭДТА. Переосаждали ДНК добавлением 0.1 объема 3 М ацетата натрия, pH 5.2 и 2 объема этанола и последующим центрифугированием в течение 10 мин, 12 000 g.

2.8. Сложнокомпозиционный препарат двуцепочечной ДНК

Сложнокомпозиционный препарат двуцепочечной ДНК (*ДНК-микс*) представляет собой смесь нативной и модифицированной геномной ДНК, выделенной из плаценты человека и из спермы лосося, фрагментированной до размеров 200–6000 п.н. Препарат является предметом промышленной собственности ООО «КАРАНАХАН» (Патент RU 2662354 C1 от 25.07.2018 «Способ лечения онкологических заболеваний»).

2.9. Выделение ДНК из клеток после обработки экстраклеточной двуцепочечной ДНК

Клетки инкубировали с соответствующим вариантом экстраклеточной дцДНК (TAMRA-ДНК зонд или как указано в тексте работы). Суспензию клеток промывали несколько раз культуральной средой или PBS, пропускали через меж-фильтр 70 мкм. После этого клетки инкубировали с 10 mM MgCl₂ и 10 мкг/мл ДНКазы в течение 10 мин при 37 °С. Далее клетки промывали дважды и инкубировали с 20 мкг/мл протеиназы К в течение 30 мин при 37 °С. Далее клетки осаждали центрифугированием (400 g, 5 мин). При необходимости супернатант собирали и переосаждали из него ДНК. Методами ПЦР, qPCR и измерением концентрации дцДНК в пробе подтверждали исчерпывающую обработку ДНКазой поверхности клеток. Осадок клеток ресуспендировали в PBS с добавлением ЭДТА (50 mM) и SDS (1 %). К

полученному лизату добавляли протеиназу К до 200 мкг/мл, помещали на 30 мин на 58 °С. После обработки протеиназой проводили экстракцию равным объемом фенол/хлороформа, переосаждали ДНК, промывали 70 % спиртом и растворяли в небольшом объеме mQ H₂O. Концентрацию ДНК мерили с помощью флуориметра Qubit 2.0.

2.10. Выделение ДНК из ядер клеток костного мозга экспериментальных мышей

ККМ мышей вымывали из трубчатых костей физиологическим раствором, ресуспендировали в 0.5 мл лизирующего буфера (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 10 mM ЭДТА, 0.15 mM спермин, 0.15 mM спермидин) с 0.1 % Тритоном X-100 и инкубировали 10 мин на льду. Смесь наслаивали на 3 объема раствора 10 % сахарозы в лизирующем буфере и центрифугировали при 500 g в течение 20 мин при 4 °С. Супернатант (цитоплазматическую фракцию) отбিরали. Осадок ядер промывали буфером, повторно осаждали центрифугированием и ресуспендировали в соответствующем объеме буфера (10 mM Трис-HCl pH 7.4, 50 mM ЭДТА, 1 % SDS, 200 мкг/мл протеиназы К) и инкубировали 2 ч при 58 °С. ДНК очищали по стандартному протоколу экстракции фенол/хлороформом, осаждали и растворяли в воде.

Полученную таким образом геномную ДНК фракционировали в градиенте NaCl с добавлением 50 mM ЭДТА. Градиент готовили путем аккуратного наслаивания аликвот по 1 мл 10 %, 15 %, 20 %, 25 % и 30 % NaCl. Затем ДНК наслаивали поверх градиента и центрифугировали со скоростью 43 000 об/мин в течение 2.5 ч в ультрацентрифуге L8-M. Фракции по 250 мкл собирали, переосаждали из них ДНК и анализировали с помощью флуориметра Qubit 2.0 и методом гель-электрофореза.

2.11. Детекция и сортировка TAMRA+ клеток

Клетки инкубировали в соответствующей среде без добавления FBS с TAMRA-ДНК зондом (из расчета 0.5 мкг ДНК на 1 млн клеток, если не указано другое) в темноте, при комнатной температуре или в CO₂-инкубаторе, в течение 40–60 мин. Далее клетки три раза промывали средой с добавлением FBS или PBS. В зависимости от эксперимента проводили анализ либо при помощи инвентированного флуоресцентного микроскопа AxioObserver Z1 и программы ZEN. Либо готовили цитологические препараты. Для этого 1–2×10⁵ клеток переносили методом цитоцентрифугирования (1000 об/мин, 1 мин) на предметное стекло, наносили Antifade DABCO с добавлением 0.5 мкг/мл DAPI, покрывали покровным стеклом и анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Axioskop 2 Plus и программного обеспечения ZEN. При необходимости анализ клеток в культуральной среде

или на цитологических препаратах проводили при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 780 NLO и программы ZEN. Анализ с использованием микроскопического оборудования был выполнен на базе Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов Сибирского отделения Российской академии наук. При анализе цитологических препаратов патологически измененные клетки исключали из рассмотрения путем оценки автофлуоресценции. Клетки с неспецифической флуоресценцией, обусловленной повреждением клеточных компонентов (например, накоплением активных форм кислорода, метаболическими нарушениями, дисфункцией митохондрий), исключались из анализа TAMRA+ клеток.

В суспензии клетки анализировали на проточном цитометре BD FACSAria III в Центре коллективного пользования проточной цитометрией ИЦиГ СО РАН. Для детекции TAMRA-флуоресценции использовали лазер с длиной волны 488 нм и канал 585/42 (канал PE). При этом процент TAMRA+ клеток оценивали относительно контроля, то есть клеток, инкубированных в среде без добавления TAMRA-ДНК зонда. Долю TAMRA+ клеток оценивали в популяции, гейтированной по параметрам прямого и бокового светорассеяния (FSC/SSC), соответствующей нормальным неповрежденным клеткам. Для анализа распределения по клеточному циклу клетки окрашивали пропидий йодидом, исчерпывающе обрабатывали РНКазой и анализировали с помощью указанного цитометра.

2.12. Анализ доставки радиоактивно-меченой экстраклеточной ДНК в клетки Кребс-2

Анализ проводился на асцитной форме опухоли Кребс-2 *in vitro*. Для сравнения в качестве известного параметра были взяты ККМ мышей. Клетки асцита отбирали у одной мыши без обработок, у другой мыши через 18 часов после укола ЦФ в дозе 200 мг/кг веса животного, ККМ были взяты у мыши без обработок. ККМ осаждали на градиенте фиколл-верографина. Образцы всех клеток трижды отмывали PBS, помещали в лунки – асцит по 10 млн клеток, ККМ – по 5 млн клеток. К образцу добавляли либо 0.75 мкг меченого фрагмента гена GFP размером около 0.7 п.н. (фрагмент метили ³²P в реакции ПЦР в стандартных условиях), либо 0.77 мкг плазмиды pEGFP-N1, расщепленной рестриктазой HindIII. Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе с 5 % содержанием CO₂, 95 % влажности воздуха при 37 °C. Клетки собирали через 1, 2, 4 или 8 часов после добавления ДНК. Промывали 3 раза PBS. Ресуспендировали в 30 мкл PBS, добавляли 40 мкл 1.5 % легкоплавкой агарозы и заливали блоки. Застывшие блоки вынимали, помещали в 500 мкл буфера (1 % саркозил, 50 мМ ЭДТА, 1 мг/мл протеиназы К) и обрабатывали при 58 °C в течение 12 часов. Далее заливали 1 % агарозный гель и, поместив туда блоки агарозы, фракционировали электрофорезом. После разгонки агарозные гели с

образцами, инкубированными с меченым фрагментом, высушивали. Интенсивность включения меченого фрагмента оценивалась на приборе PhosphoImager. Материал образцов, инкубированных с плазмидой pEGFP-N1, переносили по Саузерну на мембраны Zeta-Probe (Bio-Rad) и гибридизовали с меченым фрагментом гена GFP. Интенсивность гибридизации также оценивали на приборе PhosphoImager.

2.13. Определение заряда клеток

2.13.1. Электрофорез в свободном объеме

Клетки помещали в диализный пакет, исходя из соотношения 1 млн/1 мл раствора PBS. Герметично закрытый мешок помещали в электрофоретическую камеру, заполненную PBS, используемого в качестве буфера. Контакт содержимого диализного пакета с буфером контролировали с помощью мостиков из ватмана 3ММ. Электрофорез проводили в течение 30 мин, 4 В/см. По окончании электрофореза пакет аккуратно делили посередине, клетки отбирали из зон, соответствующих положительному («+») и отрицательному («-») полюсам, и осаждали при 400 g в течение 5 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в 500 мкл физиологического раствора, и каждую фракцию инкубировали с TAMRA-ДНК зондом. В установочных экспериментах с эритроцитами, имеющими отрицательный заряд, было показано, что эритроциты мигрируют в направлении анода («+»).

Содержание TAMRA⁺ клеток определяли с помощью FACS-анализа и флуоресцентной микроскопии. Подсчет TAMRA⁺ клеток проводили в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 21 марта 2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации», пункт № 11.4 «Методика микроскопического исследования». Для каждого образца исследовали порядка 9 000 клеток. Было проведено четыре независимых исследования для клеток Кребс-2 и шесть для ВЭБ-индуцированной В-лимфомы.

2.13.2. Обработка клеток катионным красителем Basic Blue 41

5×10^5 клеток в 500 мкл физиологического раствора обрабатывали красителем Basic Blue 41 (BB41) в концентрации 2.7 мкг/мл в течение 20 мин при комнатной температуре. В зависимости от типа эксперимента клетки обрабатывали TAMRA-ДНК зондом до или после обработки. Содержание BB41⁺ и TAMRA⁺ клеток оценивали с помощью FACS-анализа.

2.13.3. Микрогелевый электрофорез

Клетки, обработанные TAMRA-ДНК зондом, промывали один раз физиологическим раствором, осаждали и снова ресуспендировали в необходимом объеме физиологического раствора. 2×10^5 клеток цитоцентрифугировали на предметном стекле, наносили 20 мкл 2 % легкоплавкой агарозы, содержащей Antifade DABCO с добавлением DAPI (0.5 мкг/мл), и накрывали покровным стеклом. После полимеризации агарозы препарат помещали в электрофоретическую камеру, заполненную PBS, используемым в качестве буфера. Контакт препарата с буфером создавали с помощью мостиков из ватмана 3ММ. Электрофорез проводили в течение 30 мин, 4 В/см. Цитологические препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа AxioImager.M1 и программного обеспечения ZEN.

2.14. Обработка клеток протеолитическими ферментами

Клетки обрабатывали 0.25 % раствором трипсина-ЭДТА, 0.05 % раствором коллагеназы или 0.002 % раствором протеиназы К в течение 30 мин при температуре 37 °С. Предобработанные таким образом клетки далее промывали и инкубировали с TAMRA-ДНК зондом. Клетки анализировали либо с помощью проточного цитометра, либо помещали в 12-луночный планшет и анализировали с помощью флуоресцентного конфокального микроскопа (как описано в пункте 2.7).

2.15. Обработка клеток ингибиторами эндоцитоза

Клетки обрабатывали следующими ингибирующими соединениями: азидом натрия, EIPA, цитохалазином Д, МβCD, нистатином, диназором, вортманнином, хлорпромазином, декстраном в концентрациях, указанных на соответствующих рисунках, в течение 30 мин при температуре 37 °С. Далее клетки промывали и инкубировали с TAMRA-ДНК зондом. Содержание TAMRA+ клеток анализировали с помощью проточного цитометра. Для каждого тестируемого соединения проводили от трех до шести независимых измерений.

2.16. Анализ продолжительности репаративного цикла методом «комет»

Мышам с перевитой асцитной опухолью делали инъекцию ЦФ (200 мг/кг, если не указано другой дозировки). Далее в контрольные точки (указаны в соответствующих разделах главы «Результаты») производили забор клеток асцита. Если опухолевые клетки находились в культуре, в околочлеточную среду добавляли митомицин С (10–20 мкг/мл), инкубировали 1 час в CO₂-инкубаторе. Далее клетки промывали PBS трижды и заливали в блоки легкоплавкой агарозы в PBS объемом 80 мкл и в количестве 1 000 клеток на блок. Затем блоки

обрабатывали лизирующим буфером (50 мМ ЭДТА, 1 % N-Lauroylsarcosine и 1 мг/мл протеиназы К) в течение 30 мин при 50 °С и переносили в 0.5 М ЭДТА. Перед дальнейшими обработками клетки, фиксированные в агарозе, отмывали в ТЕ-буфере (10 мМ Tris-HCl, pH 7.6; 1 мМ ЭДТА) в течение 15–30 мин. Затем блоки устанавливали в одинаковом направлении и проводили электрофорез (30 мин, 0.75 В/см) в трис-ацетатном буфере с добавлением бромистого этидия. Затем блоки высушивали и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа AxioImager и программы ISIS. Анализ содержания ДЦР производили с использованием параметра «хвостовой момент» (длина хвоста кометы×процент ДНК в кометном хвосте) в программе CASP (Comet Assay Software Project) (Collins, 2004).

2.17. Определение цитокинового профиля TAMRA+ и TAMRA– клеток ВЭБ-индуцированной В-лимфомы

Клетки ВЭБ-индуцированной В-лимфомы инкубировали с TAMRA-ДНК зондом из расчета 1 мкг ДНК на 1 млн клеток в 300 мкл среды α MEM в течение 30 мин. Затем клетки осаждали (400 g, 5 мин), один раз промыли этой же средой и ресуспендировали в α MEM с 10 % FBS. Далее клетки были пропущены через проточный цитометр с получением на выходе либо суммарной популяции клеток (TAMRA+ и TAMRA– клетки), либо отсортированной популяции TAMRA– клеток. Затем клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в среде α MEM с 10 % FBS и также помещали по 50 тыс. клеток на лунку в CO₂-инкубатор. Все образцы инкубировали в течение 24-х часов. Затем среду отбирали, центрифугировали, и в надосадочной жидкости проводили оценку продукции цитокинов. В каждой группе было проанализировано по три образца.

Концентрацию 27 цитокинов (IL-1 β , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, Eotaxin, FGF-basic, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , VEGF) в супернатантах оценивали методом проточной цитометрии на 2-х лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, USA) с использованием коммерческих тест-систем (human cytokine 27-Plex) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

2.18. RNAseq-анализ

Клетки опухоли инкубировали с TAMRA-ДНК зондом, отмывали и сортировали при помощи проточного цитометра на две популяции TAMRA+ и TAMRA–. Процедура сортировки клеток была произведена несколько раз (3–5) и было собрано не менее 5×10^6

клеток. Суммарную РНК из клеток выделяли с помощью реагента TRIzol согласно инструкции производителя. Библиотеки конструировали с помощью набора для подготовки образцов РНК Illumina TruSeq RNA sample preparation kit, v.2; кДНК получали с помощью набора для подготовки образцов РНК Illumina TruSeq RNA sample preparation kit, v.2. кДНК загружали в MiSeq (Illumina), используя MiSeq Reagent Kit v.3 (Альбиоген, Россия). Полученные прочтения были очищены от адаптерных последовательностей с помощью пакета TrimGalore (Babraham Institute) с последующим удалением коротких прочтений (<20 нуклеотидов).

Целевые последовательности (все варианты транскриптов Homo Sapiens, Mus musculus) были скачаны с <https://www.ensembl.org/index.html>. Далее они были объединены в одну большую последовательность, внутри которой индивидуальные транскрипты были разделены спейсерами маскированных последовательностей длиной 200 нуклеотидов. Картирование прочтений на полученную мишень проводилось с помощью пакета ReadsMap компании Softberry (Softberry Inc., Mount Kisco, США) (Engström et al., 2013). Прочтения выравнивались в строгих условиях (не более одной инсерции/делеции на выравнивание). Для финального анализа оставались только «лучшие» (с наименьшим количеством несовпадений) выравнивания для каждой пары прочтений, из которых в дальнейшем, с целью исключить «перепредсказания», анализировались только те выравнивания, которые были уникальными (уникально картированными) для каждого гена. Для нормализации использовались гены гистонов: все уникальные прочтения, картированные на все гены гистонов в TAMRA+ и TAMRA- клетках, складывались и суммы приводились к одному значению. Коэффициент нормализации составил 1.075 для TAMRA+ клеток. Гены были отсортированы в порядке убывания соотношения числа уникальных прочтений на транскрипт в клетках TAMRA+ и TAMRA-.

Согласно литературным данным, были выявлены функциональные группы генов, характеризующие определенные свойства ОСК. Гены с измененной экспрессией в TAMRA+ клетках относительно TAMRA- клеток были выделены из этих групп на основе данных RNAseq. Далее для валидации результатов, полученных RNAseq, для выбранных генов был проведен анализ экспрессии методом qPCR. Полный список генов, отобранных для сравнения после картирования прочтений, а также сравнение с литературными данными представлены в **Приложении 2**.

2.19. Поиск специфических сайтов связывания полианионов/гепарина/дцДНК в факторах клеточной мембраны TAMRA+ клеток

По данным RNAseq были отобраны сверхэкспрессирующиеся в TAMRA+ клетках Кребс-2 и ВЭБ-индуцированной В-лимфомы гены, ответственные за синтез протогликанов, скавенджер-рецепторов и гликозилфосфатидилинозитол-заякоренных белков клеточной мембраны. Специфические последовательности, связывающие гепарин, полианионы и дцДНК были взяты из опубликованных работ (анализ литературы в платформах: Scopus, Web of Science, PubMed, Google Scholar). Поиск гомологичных последовательностей аминокислот в белках клеточной мембраны TAMRA+ клеток проводили при помощи сервиса blastp (на сайте <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Последовательности кластеров положительно заряженных аминокислот в белках были проанализированы вручную.

2.20. Валидирующий qPCR

Клетки ВЭБ-индуцированной В-лимфомы и карциномы Кребс-2 были разделены на субпопуляции TAMRA+ и TAMRA– при помощи проточной цитометрии, после чего из клеток была выделена РНК и синтезирована кДНК (по методике, описанной в пункте 2.15). Синтез кДНК для каждой группы осуществлялся с использованием набора для синтеза кДНК Mint-2. Праймеры были выбраны с использованием ресурса NCBI PrimerBLAST для области, включающей границы между экзонами (за исключением случаев, когда последний экзон был длиной более 1 кб). Специфичность праймеров предварительно проверялась с использованием в качестве матрицы суммарной кДНК методом ПЦР.

Для каждого раунда qPCR была произведена независимая сортировка клеток. Реакцию проводили с использованием набора SYBR Green PCR Master Mix. В качестве референтных генов использовали *β-act* (β -актин) мыши и *RPLP0* (рибосомальный белок, ключевой компонент большой 60S субъединицы) человека. Каждый образец анализировали в трех повторах. Для каждого гена проводили от трех до шести независимых qPCR. Анализ проводили с использованием системы QuantStudio 5 и программного обеспечения QuantStudio Design & Analysis. Относительную экспрессию выбранных генов оценивали с помощью метода $\Delta\Delta C_t$.

2.21. Подсчет копий молекул экстраклеточной ДНК в клетках Кребс-2 методом qPCR

Подготовка ДНК. После инкубации клеток Кребс-2 с экстраклеточной ДНК, все процедуры по выделению ДНК из клеток были выполнены, как описано в разделе 2.9.

Для построения калибровочной кривой использовали стандартные праймеры M13 или праймеры, подобранные на ген *Amp*, содержащийся в плазмиде pUC19. В реакцию добавляли 0, 0.5, 5, 50, 500, 5000 и 50 000 пг ДНК плазмиды pUC19 и ДНК *Alu*-повтора. Каждая концентрация анализировалась в трех повторах. Линейная зависимость C_t от содержания матричной ДНК строилась с помощью программного обеспечения StepOne v2.3. Количество ДНК pUC19 и *Alu*-повтора, присутствующих в ядерной или цитоплазматической фракциях клеток Кребс-2, определяли с помощью программного обеспечения StepOne v2.3. В реакцию qPCR добавляли 100 нг ДНК-матрицы. ДНК, выделенную из интактных клеток Кребс-2, использовали в качестве отрицательного контроля (продукта не наблюдалось). Эксперименты по qPCR проводили в трех независимых повторах.

Преобразование данных qPCR в количество копий экстраклеточной ДНК. Данные qPCR, полученные на основе калибровочной кривой, преобразовывали в абсолютные числа молекул плазмид или *Alu*-повторов следующим образом: 100 нг ДНК Кребс-2, добавленные в каждую реакцию qPCR, равняется ~8 333 клеткам (из расчета 12 пг/клетку). Учитывая, что TAMRA+ клетки являются теми же клетками, которые интернализировали плазмидную ДНК, при помощи FACS-анализа был определен точный процент клеток, которые интернализировали оба типа ДНК (X). Следовательно, разделив измеренное qPCR количество копий экстраклеточной ДНК на количество клеток, полученное по формуле $\frac{8\,333 \times X}{100}$, получается усредненное значение количества молекул ДНК на клетку.

2.22. Определение содержания ДНК В-клона в образцах ДНК сфер культуры В-лимфомы и ДНК ксенографта методом qPCR

Количественное определение молекул ДНК проводилось методом qPCR с использованием SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, США). Для построения калибровочных кривых использовались праймеры JH/FR3c и специфические праймеры на область гена *RPLP0* для ДНК человека или область гена рецептора простагландина E 2 (*Ptger2*) для ДНК мыши (последовательности указаны в разделе 2.1); в реакцию добавляли различные концентрации очищенной ДНК В-клона длиной 500 п.н. (последовательность перестроенного VDJ-локуса), суммарной ДНК, выделенной из плаценты человека, и ДНК мыши. Каждая концентрация тестировалась в трех повторах.

Линейный график зависимости C_t от содержания ДНК был построен с использованием программного обеспечения Microsoft Excel. В каждую реакцию qPCR добавляли матричную ДНК (обычно 100 нг, если не указано иное). Количество копий В-клона, присутствующих в

ДНК из клеток сфер культуры, определяли с помощью наклона калибровочной кривой. Количество материала человеческого и мышиноного происхождения в ксенотрансплантате SCID мышей определяли с помощью программного обеспечения Step One v2.3. Все реакции были представлены в виде тройных повторов, эксперимент повторяли несколько раз (от трех до девяти) с использованием системы Step One Real-Time PCR System.

2.23. Выделение клеток асцита Кребс-2 на фиколл-верографиновом градиенте

У мыши после терапевтических процедур отбирали 0.1 мл асцита, ресуспендировали в 3 мл PBS и наносили на 3 мл фиколл-верографины (плотность 1.077 г/см³), центрифугировали 30 мин, 1 500 об/мин (на центрифуге Eppendorf 5810 R). Верхнее интерфазное кольцо отбирали, прокалывая пипеткой слой жидкости над ним, промывали один раз PBS.

2.24. Гистологический анализ тканей и органов мышей

Фрагменты органов фиксировали в 4 % параформальдегиде, обезживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли ксилолом, заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной до 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Просмотр препаратов и микросъемку проводили на световом микроскопе AxioImager ZI.

2.25. Статистические методы

Графики построены в программе Microsoft Excel (Microsoft, США) либо GraphPad Prism v.8 (GraphPad Software, США). На графиках приведены среднее значение (Mean) или медиана (Median) $\pm$ стандартное отклонение (SD).

В случае парного сравнения выборок использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (выборка не имеет нормального распределения) или параметрический t-тест Стьюдента (нормальное распределение выборки). В случае апостериорных сравнений использовали непараметрические критерии Манна-Уитни с учетом поправки Бонферони, метод Бенджамини-Йекутиели и однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA, критерий множественных сравнений Краскела-Уоллиса, если не указано другое). При множественных сравнениях разных точек у 3-х и более групп использовали двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA). Достоверность отличия кривых Каплана-Мейера оценивали при помощи логарифмического рангового теста. Анализ таблиц сопряженности проводили с помощью критерия χ^2 . Статистический анализ выполнен с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v.8 или Statistica 10 (StatSoft, США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Основной целью настоящей работы является исследование нового ранее неизвестного явления интернализации экстраклеточной дцДНК в низкодифференцированные клетки различного генеза (ГСК, ОСК) природным механизмом без использования трансфецирующих факторов. Способность интернализованных фрагментов экстраклеточной дцДНК интерферировать процесс репарации ДЦР хроматина подразумевала, что такую ДНК можно использовать для таргетного воздействия на клетку, в том числе на ОСК. Эрадикация ОСК из опухолевого очага является основным условием успешной терапии онкологического заболевания, а описанные два свойства определяли возможность подбора терапевтического режима, таргетно воздействующего на указанные клетки.

Исходя из цели работы, дизайн настоящего исследования представлен пятью основными частями. Первая часть посвящена доказательству того, что в популяции ККМ мышей преимущественно низкодифференцированные клетки интернализуют экстраклеточную ДНК. Далее излагается логика исследования, в рамках которой изучение ККМ мышей послужило основой для перехода к изучению ОСК (разделы 3.1, 3.2). Во второй части проводится проверка наличия в культурах карциномы мыши Кребс-2 и В-лимфомы человека TAMRA+ клеток (интернализующих TAMRA-ДНК зонд), и представляются экспериментальные доказательства того, что они являются ОСК выбранных нозологий (раздел 3.3). Третья часть посвящена поиску механизма интернализации экстраклеточных фрагментов ДНК в клетки двух выбранных опухолевых моделей и определению особенностей строения ОСК, позволяющих им обладать указанным свойством (раздел 3.4). В начале четвертой части в хронологическом порядке приводятся результаты поиска режима эрадикации TAMRA+ ОСК и создания терапевтического режима «Каранахан» (разделы 3.5, 3.6). В пятой части приведены результаты терапии мышей с перевитыми экспериментальными злокачественными опухолями с использованием нового разработанного терапевтического режима (раздел 3.7).

Таким образом, работа выстраивает логический путь от фундаментального открытия (интернализация экстраклеточной ДНК как новое свойство низкодифференцированных клеток) к возможности его практического применения в лечении онкологических заболеваний.

3.1. Гемопозитические стволовые клетки мышей интернализуют экстраклеточную ДНК

Для окончательного понимания характера взаимодействия экстраклеточных фрагментов дцДНК с ККМ мышей необходимо было: (1) определить тип клеток в популяции ККМ, которые интернализуют фрагменты экстраклеточной дцДНК естественным природным механизмом; (2)

подтвердить наблюдаемое в многочисленных экспериментах явление интерференции идущего репаративного процесса находящимися в клетке фрагментами экстраклеточной дцДНК (в качестве модели был проанализирован репаративный процессинг фрагментов линейаризованной плазмидной ДНК, находящейся внутри клетки).

На первом этапе комплексного исследования было оценено количество CD34+ низкодифференцированных мультипотентных предшественников и CD34– ККМ, способных интернализировать экстраклеточные фрагменты дцДНК.

Для анализа взаимодействия экстраклеточной дцДНК с клетками нами был синтезирован и стандартизован специфический дцДНК зонд размером 500 п.н., меченый флуоресцентной меткой, представляющий собой последовательность *Alu*-повтора человека (TAMRA-ДНК зонд), являющийся удобной экспериментальной тест-молекулой (раздел 2.6). Благодаря этому стало возможным одновременно оценивать популяции низкодифференцированных CD34+ ККМ (меченных соответствующими антителами) и клеток, интернализирующих TAMRA-ДНК зонд, при помощи флуоресцентной микроскопии и FACS-анализа.

При анализе CD34+ клеток TAMRA-сигнал был обнаружен в 39.9 ± 2.1 % (Mean $\pm$ SD, $n = 20$) клеточной популяции (**Рисунок 4 А**). Из общей фракции ККМ, не содержащей CD34+ клетки (CD34–), TAMRA-меченая экстраклеточная ДНК обнаруживалась в 0.5 ± 0.3 % (Mean $\pm$ SD, $n = 3$) клеток (всего проанализировано 10 043 клетки) (**Рисунок 4 Б**).

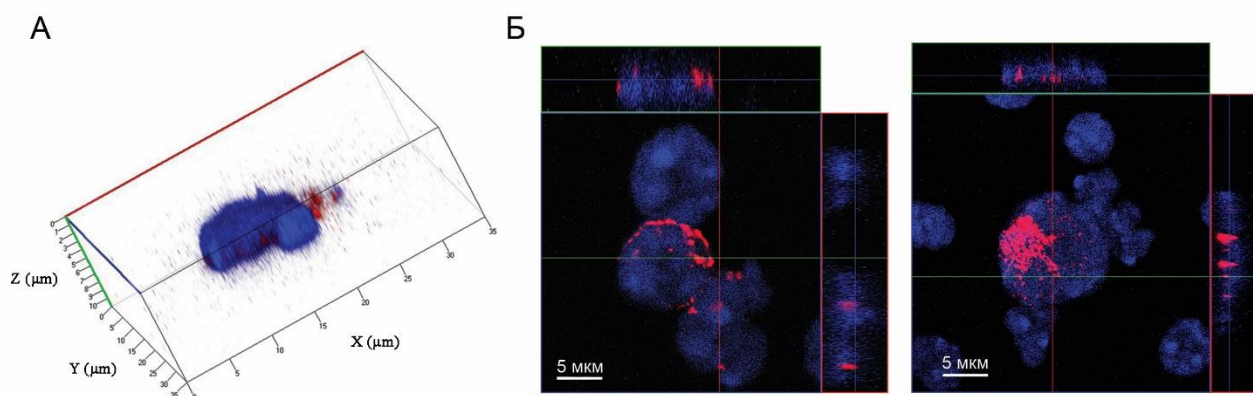


Рис. 4. Интернализация экстраклеточной ДНК в ККМ мышей. **А)** Цитологический анализ интернализации TAMRA-ДНК зонда в CD34+ ККМ мышей после совместного культивирования *ex vivo*. Представлено 3D-изображение ядра. Окраска по DAPI (синий цвет) – хроматин и границы ядра; TAMRA-сигнал (красный) – локализация исходно экстраклеточной ДНК внутри ядра. **Б)** Ортогональные проекции CD34– ККМ после совместного инкубирования с TAMRA-ДНК зондом (X- и Y-проекции показаны справа и сверху, Z-проекция в центре). TAMRA-сигнал соответствует экстраклеточной дцДНК и частично локализуется во внутриядерном пространстве.

Проведенный анализ с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа свидетельствует о том, что меченый материал как в популяции CD34+, так и в CD34– ККМ частично обнаруживается в ядерном пространстве клеток. Оценка распределения меченой дцДНК в CD34+ и CD34– ККМ показывает, что фрагменты экстраклеточной дцДНК в основном попадают в клетки популяции CD34+ мультипотентных гемопоэтических предшественников ($p < 0.001$, тест Манна-Уитни).

На втором этапе была проанализирована способность ГСК мыши интернализировать экстраклеточные фрагменты дцДНК. Известно, что ГСК мыши экспрессируют молекулы клеточной поверхности c-Kit и Sca-1 (Kyle-Cezar et al., 2007). В серии экспериментов на интактных ККМ мышей линии CBA/Lac была проведена оценка совместной локализации маркеров ГСК c-Kit и Sca-1 и одновременно способности этих клеток интернализировать TAMRA-ДНК зонд (индикатор TAMRA). 1 млн ККМ были окрашены антителами против поверхностных маркеров c-Kit, Sca-1, а также к ним был добавлен TAMRA-ДНК зонд (30 мин инкубации). После этого клетки были отмыты и проанализированы микроскопически для подсчета окрашенных клеток (**Таблица 2**).

Таблица 2. Анализ взаимосвязи между интернализацией TAMRA-ДНК зонда и присутствием маркеров c-Kit, Sca-1 в клетках интактного костного мозга мышей.

Кол-во клеток	TAMRA	c-Kit	Sca-1	TAMRA/ c-Kit*	TAMRA/ Sca-1*	Sca-1/ c-Kit	TAMRA/ Sca-1/c-Kit*
2850	154	267	49	38	11	11	10
	5.4 %	9.4 %	1.7 %	1.3 %	0.39 %	0.39 %	0.35 %

* $p < 0.001$ (критерий χ^2).

Было установлено, что количество клеток, несущих маркер c-Kit, преобладает и составляет 9.4 %. Клеток, положительных по маркеру TAMRA – 5.4 %, Sca1+ клеток – 1.7 %. Встречаются клетки с двойным окрашиванием TAMRA+/c-Kit+ – 1.3 %. Обнаружены единичные клетки с фенотипом TAMRA+/Sca1+ и Sca1+/c-Kit+ (по 0.39 %), и несколько клеток с тройным фенотипом TAMRA+/Sca-1+/c-Kit+ (0.35 %) (**Таблица 2**). С вероятностью $p < 0.001$ (критерий χ^2) наличие одного или обоих маркеров ГСК является определяющим фактором, что клетка обладает способностью интернализировать экстраклеточную ДНК.

Чтобы еще раз показать факт интернализации экстраклеточных фрагментов в ГСК, был осуществлен следующий экспериментальный подход. ККМ инкубировали с полным аналогом TAMRA-ДНК зонда, но без включения флуорохрома (Alu ДНК зонд). После отмытки от

субстрата клетки исчерпывающе обрабатывали ДНКазой и далее протеиназой К для полного удаления внешней дцДНК.

Из обработанных указанным выше способом клеток выделяли суммарную ДНК. В качестве контроля использовали суммарную ДНК, выделенную из интактных ККМ мышей. Результаты qPCR приведены на **Рисунке 5 А**. Расчет свидетельствует, что при выбранном соотношении дцДНК зонд/количество клеток (точка выхода на плато интернализации) в клетку доставляется $\sim 14\,000$ копий фрагмента размером 500 п.н., что составляет $\sim 6.5 \times 10^6$ п.н. или 0.2 % от гаплоидного генома. Кроме того, очередной раз подтвердились данные, что, попав во внутренние компартменты клетки, экстраклеточные фрагменты лигируются или сами на себя, или формируют ковалентно замкнутые мультимерные формы (**Рисунок 5 Б**).

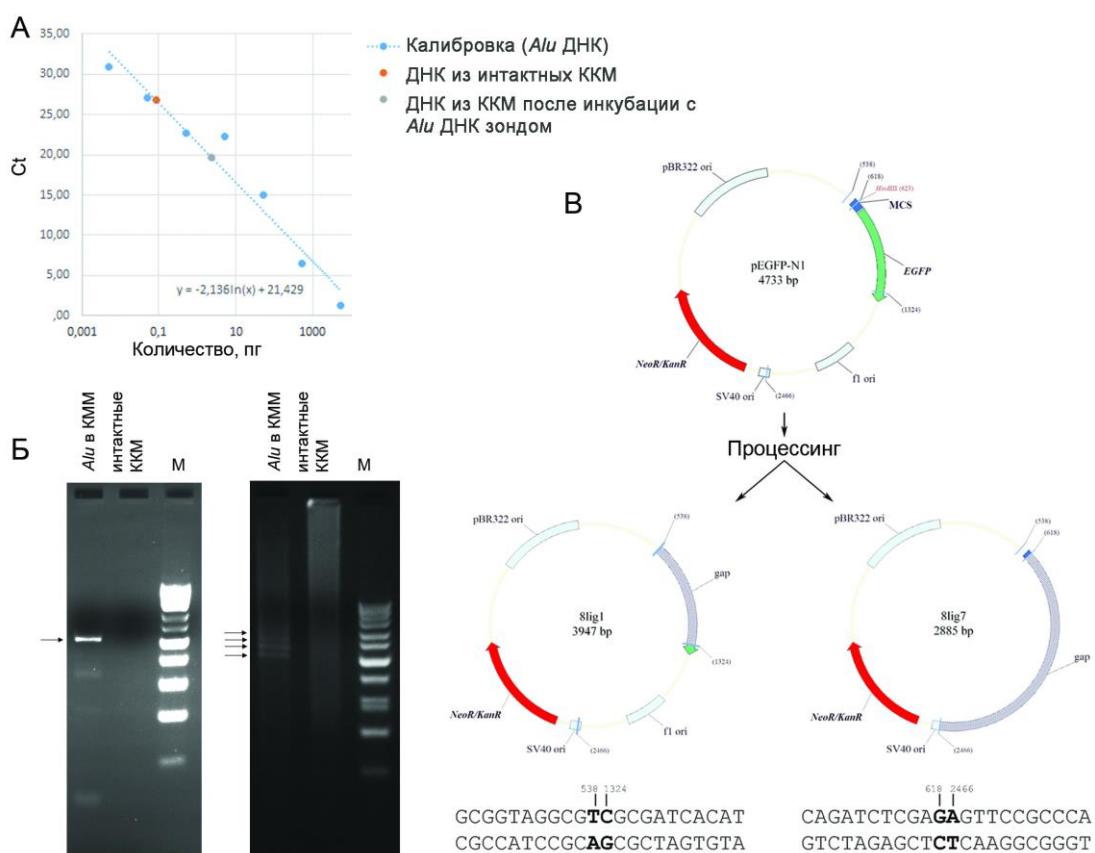


Рис. 5. Качественные и количественные характеристики интернализации экстраклеточной ДНК в ККМ мышей. **А)** Определение количества копий интернализованного дцДНК зонда по данным qPCR. **Б)** Электрофоретическая подвижность ПЦР-фрагмента с использованием M13 праймеров и матрицы ДНК, выделенной из ГСК мыши, проинкубированных с *Alu* ДНК зондом. Слева – продукт амплификации в аналитическом ПЦР с матрицы «*Alu* в ККМ» и с матрицей «ДНК из интактных ККМ»; справа – электрофорез продуктов qPCR с аналогичными матрицами. Стрелками обозначены ПЦР-продукты, синтезированные с конкатемеризованной в клетках *Alu* ДНК матрицы. **В)** Анализ геномной ДНК, выделенной из ККМ, инкубированных с линейной формой плазмиды pEGFP-N1. Представлена нуклеотидная последовательность двух плазмид,

выделенных из ядерной фракции (8lig1 и 8lig7). Схематично показан процессинг свободных двуцепочечных концов и последующее лигирование в кольцо.

Для характеристики процессов, происходящих с интернализированной в ККМ дцДНК в промежуток времени, когда идет репарация ДЦР, как интермедиатов репарации МЦС, экспериментальным мышам вводили ЦФ в дозе 200 мкг/кг. Через 18 часов после инъекции цитостатика ККМ вымывали средой для инкубации, промывали два раза и инкубировали с экстраклеточной ДНК.

Плазмидная ДНК pEGFP-N1 была гидролизована по находящемуся в полилинкере сайту рестрикции HindIII. К суспензии ККМ (20 млн) добавляли 100 мкг плазмидной ДНК и инкубировали 4 часа в CO₂-инкубаторе. После отмывок из ККМ были выделены ядра, из которых была выделена геномная ДНК. Для того чтобы оценить, связана ли плазмидная ДНК с хроматином, было осуществлено фракционирование ядерного лизата в градиенте NaCl (раздел 2.10). После градиентного центрифугирования ДНК собирали фракциями по 250 мкл, переосаждали и анализировали электрофорезом. Всего было собрано 23 фракции. ДНК присутствовала во фракциях № 7–10 и 23 (хроматин).

ДНК фракций № 7–10 делили на две части. Первую трансформировали в клетки *E. coli* XL2-Blue MRF' методом электропорации без каких-либо обработок. В результате во фракциях 7 и 8 не выросло ни одной колонии. В случае фракции 9 выросло 14 колоний, фракции 10 – 2 колонии и фракции 23 – 13 колоний. В качестве контроля клетки *E. coli* были протрансформированы аналогичным количеством исходной линейаризованной плазмиды, которую добавляли к ККМ. В данной группе выросших колоний не наблюдалось.

Вторую часть ДНК из фракций лигировали саму на себя (этап, необходимый для выявления процессинга линейных фрагментов внутри клетки), а затем трансформировали в электрокомпетентные клетки. В результате в случае ДНК из фракций 7 и 10 не выросло ни одной колонии, из фракции 8 – 8 колоний, из фракции 9 – 19 колоний. ДНК плазмид всех колоний была выделена и проанализирована электрофоретически. Было обнаружено, что часть выделенных плазмид соответствуют исходной мономерной форме плазмиды pEGFP-N1, несколько плазмид соответствуют мультимерным формам используемой в эксперименте исходной плазмиды и две плазмиды (8lig1 и 8lig7) оказались меньше по размеру, чем исходная мономерная форма. Эти плазмиды были получены из ДНК 8-й фракции после лигирования. Анализ нуклеотидной последовательности коротких плазмид показал, что обе плазмиды укорочены в области полилинкера. В случае плазмиды 8lig1 произошла делеция фрагмента размером 786 п.н. с 538 по 1 324 нуклеотиды. То есть, делетировано 85 п.н. в одну сторону от

сайта HindIII и 701 п.н. в другую. В случае плазмиды 8lig7 произошла делеция 1 848 п.н. с 618 по 2 466 п.н. То есть делетировано 5 п.н. в одну сторону и 1 843 п.н. в другую сторону от сайта гидролиза HindIII (**Рисунок 5 В**).

Таким образом было подтверждено, что фрагменты дцДНК, интернализирующиеся в ККМ, подвергаются изменениям, характерным для активно протекающего репаративного процесса, и являются непосредственными участниками этого процесса. Происходит частичное экзо-/эндонуклеазное расщепление свободных двуцепочечных концов ДНК, а также конкатемеризация или формирование кольцеобразной структуры (**Рисунок 5 Б, В**).

Совокупность полученных результатов доказывала факт интернализации фрагментов экстраклеточной дцДНК в низкодифференцированные ККМ мышей (CD34+, c-Kit+, Sca1+), а также предполагала возможность влияния этих фрагментов на молекулярные события, протекающие в данный момент в клетке.

3.2. Формирование основной идеи исследования

Показано, что ДНК, доставленная в низкодифференцированную клетку крови, участвует в процессе репарации повреждений, вызванных радиацией и воздействием кросслинкующего цитостатика ЦФ ((Dolgova et al., 2012a, b; Likhacheva et al., 2007), раздел 3.1).

Для развития дальнейшей идеи исследования принципиально важным являлся факт того, что ЦФ является стандартным препаратом при лечении злокачественных новообразований (Wu, Waxman, 2014). Вторым, не менее важным элементом, повлиявшим на дальнейшее развитие идеи, было новое сформированное понимание об иерархической организации развитой опухоли, где на вершине иерархической структуры находятся низкодифференцированные ОСК, по своим характеристикам близкие к нормальным СК, в том числе стволовым клеткам крови (Gilbert, Ross, 2009).

И наконец, последним элементом новой идеи было предположение, что ОСК, подобно стволовым клеткам крови, также обладают свойством интернализировать фрагменты экстраклеточной дцДНК естественным природным механизмом.

Таким образом, суть новой идеи заключается в следующем. Наличие негативного синергичного действия кросслинкующего цитостатика и фрагментов экстраклеточной ДНК, оказавшихся во внутриклеточном пространстве в момент репарации повреждений ДНК, и проявляющееся в виде гибели ГСК, ответственных за возобновление белого ростка кроветворения («окно смерти») (Dolgova et al., 2012a), подразумевало, **что если ОСК подобно ГСК захватывают экстраклеточные фрагменты ДНК, то можно подобрать режим**, при котором будет происходить аналогичное таргетное воздействие двух препаратов на ОСК. В

этом случае при проведении противоопухолевой терапии ОСК будут эрадицированы из очага роста злокачественного новообразования. Лишенная туморогенного начала опухоль будет окончательно резорбирована иммунной системой организма. Это предположение имело прикладное значение, так как одной из актуальных задач онкотерапии в настоящее время является таргетное воздействие на ОСК, ответственных за развитие опухоли, ее прогрессию, возникновение метастазов и рецидивов заболевания.

В этой связи для дальнейшего исследования были выбраны две опухолевые модельные системы: карцинома мышцы Кребс-2 и культура индуцированной вирусом Эпштейна-Барр В-лимфомы, полученная из аспирата костного мозга пациента с ММ, вследствие процессов вырождения, произошедших в ходе культивирования (обсуждается в разделе 3.3.2.1).

Выбор указанных моделей обуславливался следующими соображениями. Во-первых, использование двух различных биологических систем, человеческого и мышиноного происхождения, могло бы дать представление об универсальности исследуемого феномена интернализации экстраклеточной ДНК; во-вторых, обе модельные системы могли находиться как в виде культуры клеток, так и в форме солидных трансплантатов, что расширяло экспериментальные возможности анализа.

Предполагалось, что если в указанных культурах будут обнаружены клетки, способные интернализировать фрагменты экстраклеточной ДНК (TAMRA-ДНК зонд), то эти клетки будут являться ОСК выбранных опухолевых моделей Кребс-2 и В-лимфомы. Если предположение окажется верным, то используя выбранные модельные системы можно будет определить условия (режим) удаления ОСК из опухоли (культуры) сочетанным воздействием кросслинкующего цитостатика и препарата дцДНК. Результатом такой терапии будет резорбция опухоли (вырождение культуры) и вылечивание экспериментальных животных.

3.3. Опухолевые клетки, способные интернализировать экстраклеточные фрагменты ДНК, являются опухолевыми стволовыми клетками

3.3.1. Модель карциномы мышцы Кребс-2

3.3.1.1. Интернализация фрагментов экстраклеточной ДНК в клетки Кребс-2 как биологическое явление

Исходя из концепции иерархической организации опухоли, где на вершине находится небольшой процент ОСК, ответственных за инициацию, развитие опухоли, устойчивость к терапии и возникновение рецидивов, предполагалось, что в культуре клеток Кребс-2 также должен присутствовать незначительный процент указанных клеток. Следуя идеологии

исследования, описанной в предыдущем разделе, предполагалось, что это будут клетки, способные естественным путем интернализировать фрагменты дцДНК. Таким образом, на первом этапе исследования было необходимо определить, существуют ли в культуре Krebs-2 клетки с указанным свойством.

Как уже было сказано, для стандартизации анализа процесса интернализации экстраклеточной ДНК был синтезирован универсальный дцДНК зонд: ПЦР-фрагмент размером 500 п.н., представляющий собой последовательность *Alu*-повтора человека и содержащий ПЦР-инкорпорированный нуклеотид, модифицированный TAMRA-флуорохромом (TAMRA-5'-dUTP). Такой зонд имеет известную последовательность и длину, кроме того, его можно детектировать в клетках при помощи флуоресцентной микроскопии, FACS и ПЦР-анализа. В дальнейшем клетки, интернализирующие TAMRA-ДНК зонд, будут обозначаться как «**TAMRA+** клетки», а клетки, не обладающие такой способностью, – как «**TAMRA–**».

В результате проведенных экспериментов с использованием TAMRA-ДНК зонда и флуоресцентной микроскопии показано, что в культуре Krebs-2 присутствуют клетки, способные интернализировать экстраклеточную ДНК. Важно отметить, что меченый предшественник dUTP-5'-TAMRA, используемый для синтеза флуоресцентной ДНК, не интернализуется и не детектируется в клетках (**Рисунок 6 А, Б**).

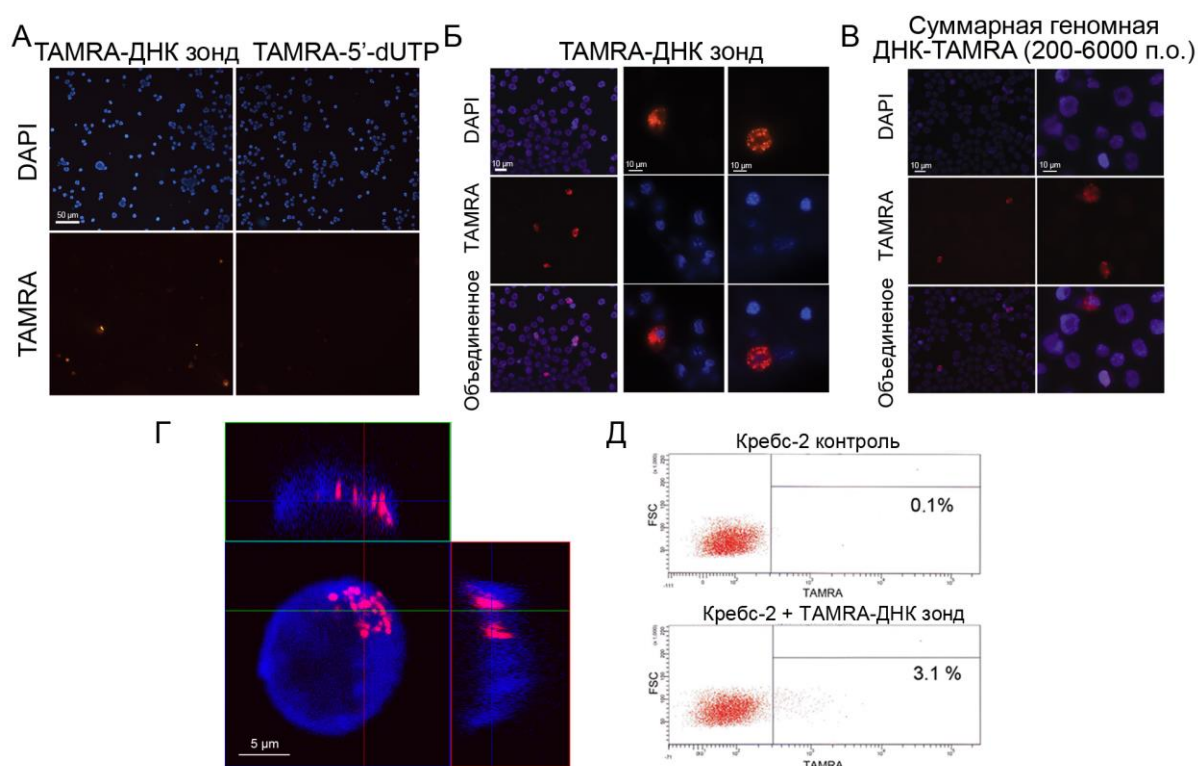


Рис. 6. Интернализация экстраклеточной дцДНК в клетки асцита Krebs-2. А) Цитофлуоресцентный анализ локализации TAMRA-ДНК зонда и меченого dUTP-5'-TAMRA-предшественника. Характерно, что клетки асцита не захватывают TAMRA-меченый

трифосфат. **Б)** Цитофлуоресцентный анализ локализации TAMRA-ДНК зонда. **В)** Цитофлуоресцентный анализ локализации TAMRA-меченой геномной ДНК человека (размер фрагментов 200–6000 п.н.). **Г)** Трехмерное изображение клетки Кребс-2, содержащей TAMRA-меченый материал, полученное с помощью лазерного конфокального микроскопа. **Д)** FACS-анализ интернализации TAMRA-ДНК зонда.

В клетки Кребс-2 также могут интернализироваться линейные фрагменты различных последовательностей, например, суммарная геномная ДНК, выделенная из плаценты человека (200–6000 п.н.), меченная флуоресцентной меткой с использованием фрагмента Кленова (**Рисунок 6 В**). При помощи FACS-анализа установлено, что $2.8 \pm 2.1 \%$ (Mean $\pm$ SD, $n = 13$) асцитных клеток Кребс-2 способны интернализировать TAMRA-ДНК зонд (**Рисунок 6 Д**, в качестве примера приведены данные одного из экспериментов).

Дополнительно было показано, что в клетки асцита Кребс-2 интернализуется ДНК плазмиды в суперскрученной форме. Фракция геномной ДНК клеток асцита, обработанных линейной и суперскрученной ДНК, выделенная после ДНКазной обработки клеток, была трансформирована в химически компетентные клетки *E. coli* (титр 10^7). При использовании образца ДНК, выделенной из асцитных клеток после коинкубации с суперскрученной ДНК, выросло ~500 трансформантов, идентичных исходному. При использовании образца ДНК, выделенной из асцитных клеток после коинкубации с линейной ДНК плазмиды, выросло два трансформанта, идентичных исходному, при аналогичных условиях обработки клеток и трансформации. В качестве контроля для трансформации использовали ДНК линейной плазмиды в том же количестве, которое добавляли к клеткам Кребс-2 (контроль контаминации образца ДНК линейной плазмиды кольцевыми структурами), а также ДНК, выделенную из нативных клеток Кребс-2. В контрольных образцах наблюдалось полное отсутствие роста колоний. Эти результаты подтвердили, что как и в случае ККМ, во внутриклеточном пространстве опухолевых клеток Кребс-2 линейные фрагменты ДНК могут замыкаться в кольцо.

Интригующим был вопрос, являются ли клетки Кребс-2, интернализирующие TAMRA-ДНК зонд и плазмидную ДНК, одними и теми же клетками. Асцитные клетки Кребс-2 обрабатывали одновременно TAMRA-ДНК зондом и ДНК суперскрученной формы плазмиды pUC19. Далее клетки сортировали на проточном цитометре по «TAMRA+ признаку» (**Рисунок 7 А**). Из сортированных клеток выделяли ДНК и трансформировали компетентные клетки *E. coli*. Результаты проведенных экспериментов свидетельствовали, что только TAMRA+ клетки содержали плазмидную ДНК (**Рисунок 7 Б**).

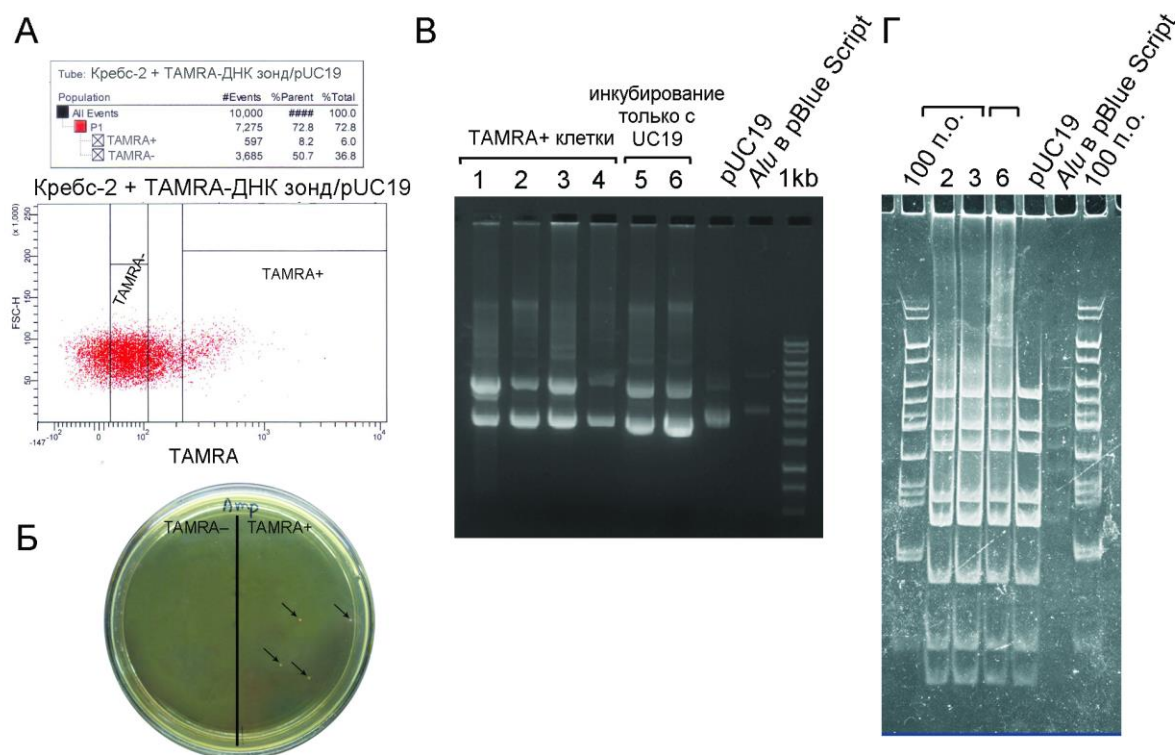


Рис. 7. Анализ интернализации линейного двуцепочечного TAMRA-ДНК зонда и суперскрученной формы плазмиды pUC19 в клетки Krebs-2 при одновременном добавлении обоих вариантов экстраклеточной ДНК. **А)** Плоты с проточного цитометра, отражающие параметры сортировки. **Б)** Результат трансформации компетентных клеток *E. coli* ДНК, выделенной из сортированных TAMRA+ и TAMRA– клеток. **В)** Электрофоретический анализ плазмид, выделенных из выросших колоний; 1–4 – плазмиды из группы TAMRA+ (из TAMRA– клеток колоний не выросло), 5–6 – плазмиды, выделенные из контрольной группы, в которой к клеткам Krebs-2 добавляли только pUC19; pUC19, Alu-pBlue Script – исходные плазмиды; 1kb – маркер. **Г)** Рестирикция плазмид мелкощепящей рестриктазой HaeIII.

Из выросших колоний были выделены плазмиды и проверены рестрикцией мелкощепящей рестриктазой (HaeIII). Анализ показал, что плазмиды, выделенные из группы TAMRA+ (Рисунок 7 В, Г, дорожки под номерами 2, 3), то есть выделенные из клеток, содержащих помимо плазмиды pUC19 еще и TAMRA-ДНК зонд, являются исходными плазмидами pUC19. Плазида, полученная из группы, где Krebs-2 инкубировали только с pUC19 (Рисунок 7 В, Г, дорожка под номером 6), также соответствует исходной плазмиде.

Анализ параметров интернализации TAMRA-ДНК зонда клетками Krebs-2 показал, что предел насыщаемости экстраклеточной ДНК достигается при соотношении 0.5 мкг/1 млн клеток. Прогрессивное 12-кратное увеличение количества меченого субстрата, добавляемого в культуральную среду, приводило только к 2.5-кратному увеличению количества асцитных клеток, захватывающих ДНК (Рисунок 8 А, Б).

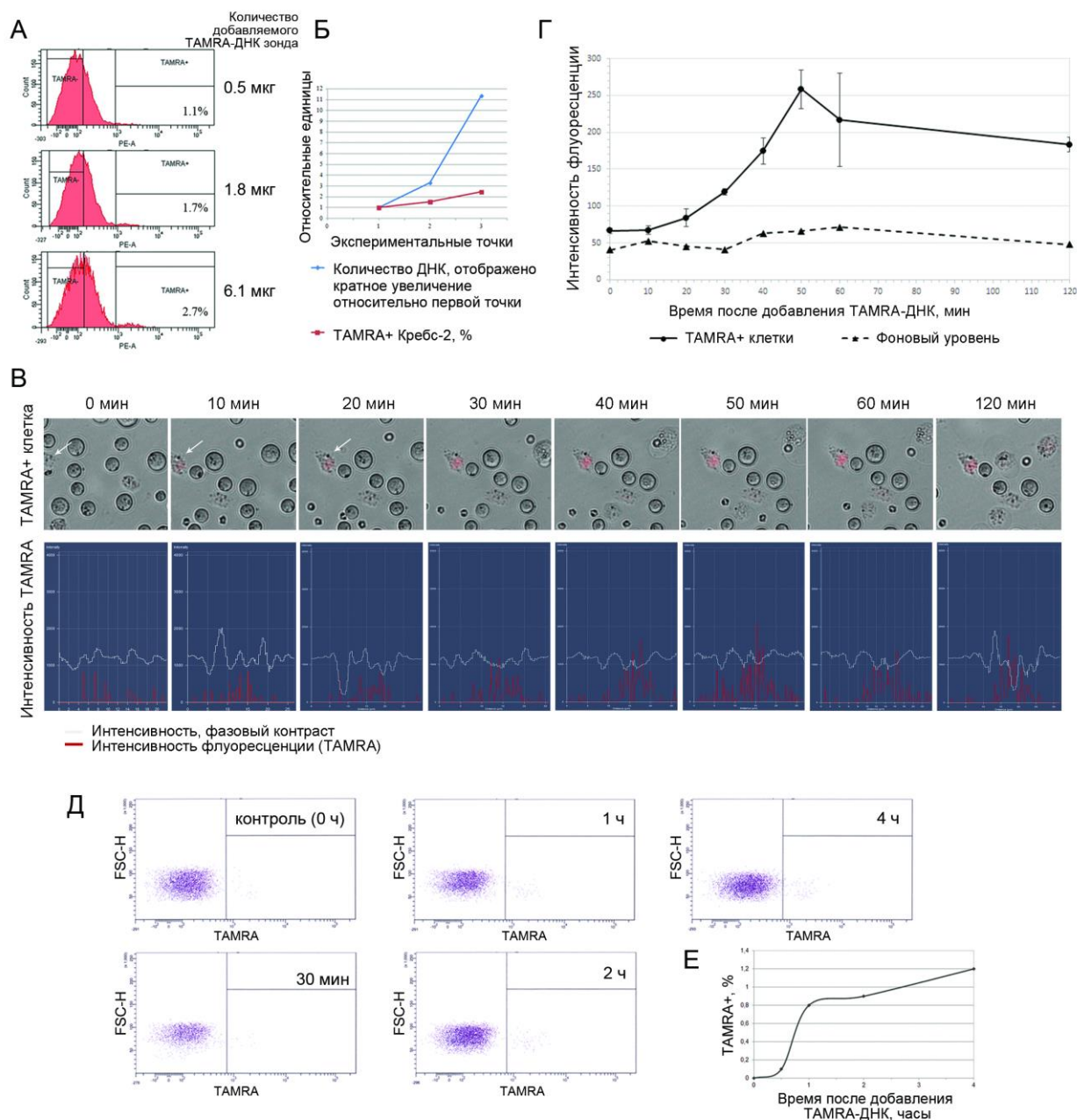


Рис. 8. Интернализация экстраклеточной дцДНК в клетки асцита карциномы мыши Krebs-2. **А, Б)** Оценка зависимости количества клеток с интернализованной дцДНК от количества меченого субстрата в инкубационной среде. Плоты с проточного цитометра (**А**) и соответствующий им график (**Б**). **В)** Конфокальный анализ динамики аккумуляции TAMRA-ДНК зонда в клетках Krebs-2 в течение 120 минут. Приведено изображение клетки в фазовом контрасте и флуоресцентном канале, а также графики, отображающие интенсивность флуоресцентного сигнала в векторе, проведенном сквозь клетку. **Г)** Графическое изображение динамики интернализации TAMRA-ДНК зонда. В каждой точке указано среднее значение интенсивности TAMRA-сигнала в векторе, проведенном сквозь клетку ($n = 4$). В качестве контроля приведен аналогичный график клетки, не интернализирующей ДНК. На графике приведено $\text{Mean} \pm \text{SD}$. **Д, Е)** Оценка зависимости количества клеток с интернализованной дцДНК от времени инкубации. Плоты с проточного цитометра (**Д**) и соответствующий им график (**Е**).

Также показано, что насыщение клетки фрагментами экстраклеточной ДНК происходит в течение первого часа инкубирования (50–60 мин). При этом клеточный состав остается постоянным, а только усиливается интенсивность свечения (**Рисунок 8 В**). Динамика интернализации дцДНК оценивалась следующим образом. Клетки были помещены в небольшом объеме среды в 16-луночный планшет, в околклеточную среду был добавлен TAMRA-ДНК зонд (0.5 мкг/1 млн клеток), материал анализировали с использованием лазерного конфокального микроскопа. Было выбрано поле клеток (~100 клеток), в котором было обнаружено четыре клетки, интернализирующие ДНК. Динамика интернализации графически представлена на **Рисунке 8 Г**. Видно, что максимум интернализации происходит в 50–60 мин с момента добавления ДНК в среду. В качестве отрицательного контроля приведен аналогичный график для клетки, не интернализирующей ДНК (фоновый уровень флуоресценции).

Увеличение времени экспозиции с меченым субстратом от 30 мин до 4 часов приводило к незначительному увеличению количества клеток, захватывающих дцДНК (15–20 %) (**Рисунок 8 Д**). Проведенные эксперименты свидетельствовали, что способность к интернализации является свойством ограниченной, постоянной популяции асцитных клеток.

Эксперименты с использованием в качестве экстраклеточной дцДНК αP^{32} -меченого зонда подтвердили способность клеток Кребс-2 к интернализации (**Рисунок 9 А**).

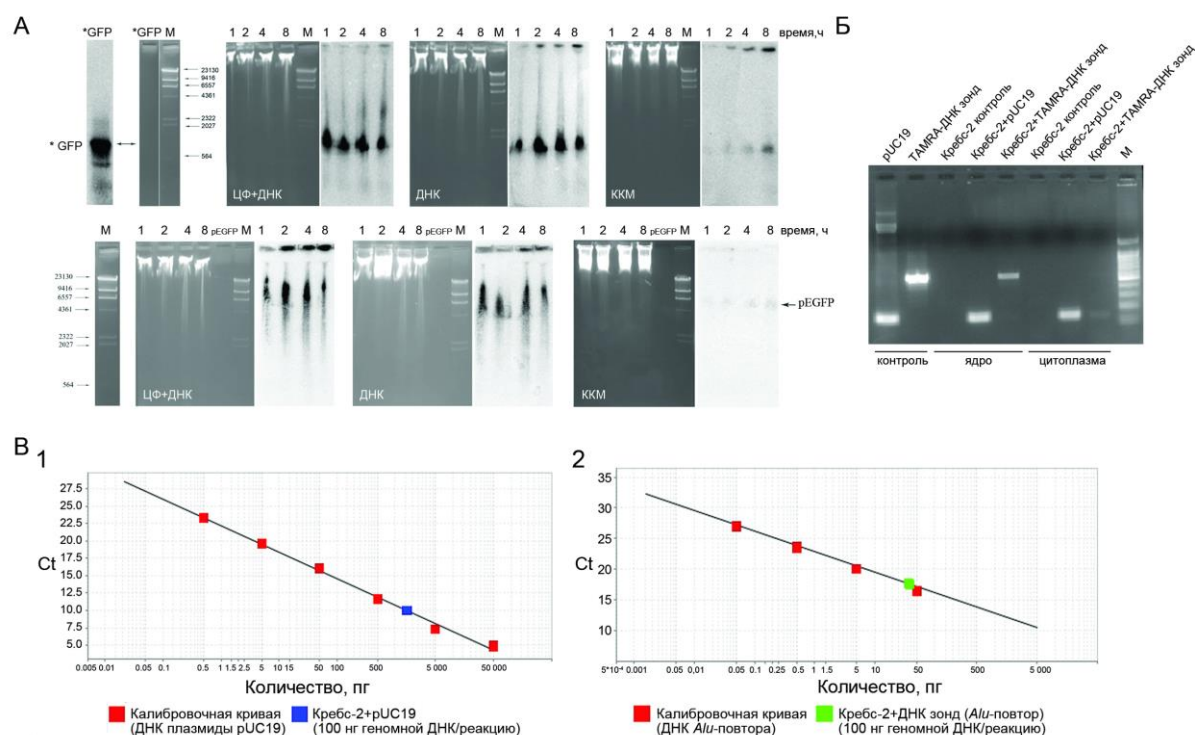


Рис. 9. Анализ интернализации экстраклеточной дцДНК в клетки асцита опухоли Кребс-2. **А) Верхняя панель.** В качестве зонда использовали αP^{32} ПЦР-меченый ген GFP (дорожка – *GFP). В прямой радиоактивной засветке оценивали способность асцитных клеток

интернализировать фрагменты дцДНК. Одновременно приводятся электрофоретические данные (слева) и результаты автордиографии (справа) для каждой опытной группы. **Нижняя панель.** В качестве ДНК зонда, добавляемого к клеткам асцита Кребс-2, использовали немеченую HindIII-линеаризованную плазмиду pEGFP-N1. Выделенную из клеток и фракционированную в агарозном геле ДНК переносили по Саузерну на мембрану с дальнейшей гибридизацией с αP^{32} -меченым зондом (ген GFP). М – маркер; «ЦФ+ДНК» – клетки асцита Кребс-2, выделенные через 18 часов после инъекции мышам ЦФ (200 мг/кг) и инкубированные с меченой ДНК (1, 2, 4 и 8 ч, соответственно); «ДНК» – клетки асцита интактной мыши, инкубированные с меченой ДНК (1, 2, 4 и 8 ч, соответственно); «ККМ» – клетки костного мозга интактной мыши, инкубированные с меченой ДНК (1, 2, 4 и 8 ч, соответственно). Приводятся электрофоретические данные (слева) и результаты автордиографии (справа). **Б)** Электрофоретический анализ продуктов ПЦР-амплификации ДНК-материала, интернализированного в главные клеточные компартменты клеток Кребс-2 после инкубирования с фрагментами экстраклеточной ДНК. **В)** Количественный анализ интернализации ДНК плазмиды pUC19 (1) и TAMRA-ДНК зонда (последовательность *Alu*-повтора) (2) в клетки Кребс-2, выполненный с помощью qPCR. На графиках приведена калибровочная кривая и данные, полученные с ДНК, выделенной после инкубации клеток с ДНК-пробой.

В первой серии экспериментов в качестве зонда использовался αP^{32} ПЦР-меченый ген GFP (Green fluorescent protein). Оценивалась в прямой радиоактивной засветке способность асцитных клеток интернализировать фрагменты дцДНК (**Рисунок 9 А**, верхняя панель). Чтобы исключить возможность появления неспецифического меченого материала, связанного с предполагаемой внутриклеточной деградацией меченого зонда до мономеров и последующего ресинтеза, и с уверенностью утверждать, что в клетке присутствует именно ДНК исходно экстраклеточной локализации, была проведена серия Саузерн-блот анализов. В качестве экстраклеточной ДНК использовалась немеченая, HindIII-линеаризованная плазида pEGFP-N1. Выделенная из клеток и фракционированная в агарозном геле ДНК переносилась по Саузерну на мембраны Zeta-Probe. Непрямая детекция интернализации ДНК плазмиды в клетки проводилась путем гибридизации мембран с αP^{32} -меченым зондом (ген GFP) (**Рисунок 9 А**, нижняя панель). Эти эксперименты подтвердили нахождение в клетке фрагментов ДНК исходно экстраклеточного происхождения.

На ККМ мышей было показано, что фрагменты ДНК, попадающие в клетку в момент репарации повреждений ДНК, вызванных действием цитостатика ЦФ, воздействуют на ход репарации таким образом, что клетки не могут завершить указанный процесс и погибают (Dolgova et al., 2012a). В этой связи в качестве положительного контроля интернализации ДНК в эксперименте были использованы ККМ мышей. Для проверки предположения о том, влияет ли цитостатик на способность клеток к интернализации ДНК, клетки Кребс-2 как нативные, так и после инъекции мышам ЦФ инкубировали с ДНК. Как видно из результатов Саузерн-блот

анализа (**Рисунок 9 А**, «ЦФ+ДНК», «ДНК»), как нативные Кребс-2 клетки, так и находящиеся под воздействием цитостатика способны к интернализации экстраклеточных фрагментов ДНК.

Далее были охарактеризованы некоторые молекулярные особенности процесса интернализации. Были оценены распределение по основным клеточным компартментам (цитоплазматическое пространство и ядро) и динамика интернализации ДНК различной формы – линейного двуцепочечного TAMRA-ДНК зонда размером 500 п.н. и суперскрученной плазмиды рUC19. Клетки Кребс-2 инкубировали с разными вариантами экстраклеточной ДНК в течение 1 часа, затем исчерпывающе обрабатывали ДНКазой и протеиназой К. После проведенных обработок из цитоплазматической и ядерной фракций выделяли ДНК, которая далее была использована в качестве матрицы для проведения ПЦР. Показано, что короткая линейная дцДНК обнаруживается преимущественно в ядерном пространстве клеток. Кольцевая плазида детектируется как в цитоплазме, так и в ядре (**Рисунок 9 Б**).

На последнем этапе с использованием метода qPCR была оценена копийность *Alu* фрагментов и молекул плазмид, интернализирующихся в клетки в условиях полного насыщения экстраклеточной ДНК (0.5 мкг ДНК/1 млн клеток Кребс-2, 1 час инкубирования) (**Рисунок 9 В**). Следует отметить, что в случае оценки интернализации плазмидной ДНК указанным методом детектировалась вся совокупность молекул ДНК как нативных, так и различной степени деградации (так как с использованием qPCR есть возможность оценивать лишь количество определенного участка плазмиды, на который подобраны праймеры, считая, что это количество коррелирует со всей совокупностью плазмид внутри клетки, как интактных, так и поврежденных).

Таким образом, следуя тому факту, что TAMRA+ клетки являются теми же клетками, которые интернализуют плазмидную ДНК, было оценено абсолютное число молекул плазмид, доставляемых в клетку. Показано, что $\sim 3.097 \pm 0.044$ млн копий плазмидной ДНК может локализоваться во внутреннем пространстве асцитных клеток Кребс-2. Для *Alu*-повтора количество интернализованной экстраклеточной ДНК составляет 425.268 ± 11.499 тыс. молекул на клетку.

3.3.1.2. Доказательство стволовой природы TAMRA+ клеток карциномы Кребс-2

Одним из маркеров как низкодифференцированных гемопоэтических предшественников, так и ОСК некоторых типов опухолей является поверхностный гликопротеин цитоплазматической мембраны CD34 (Radu et al., 2023). Было показано, что в асците Кребс-2 также присутствует ограниченная популяция клеток с признаками стволовых клеток, несущая характерный CD34-маркер. Результаты проточной цитометрии показали, что

$3.2 \pm 2.5\%$ (Mean $\pm$ SD, $n = 7$) асцитных клеток экспрессируют CD34 (Рисунок 10 А-1, приведены данные одного конкретного эксперимента).

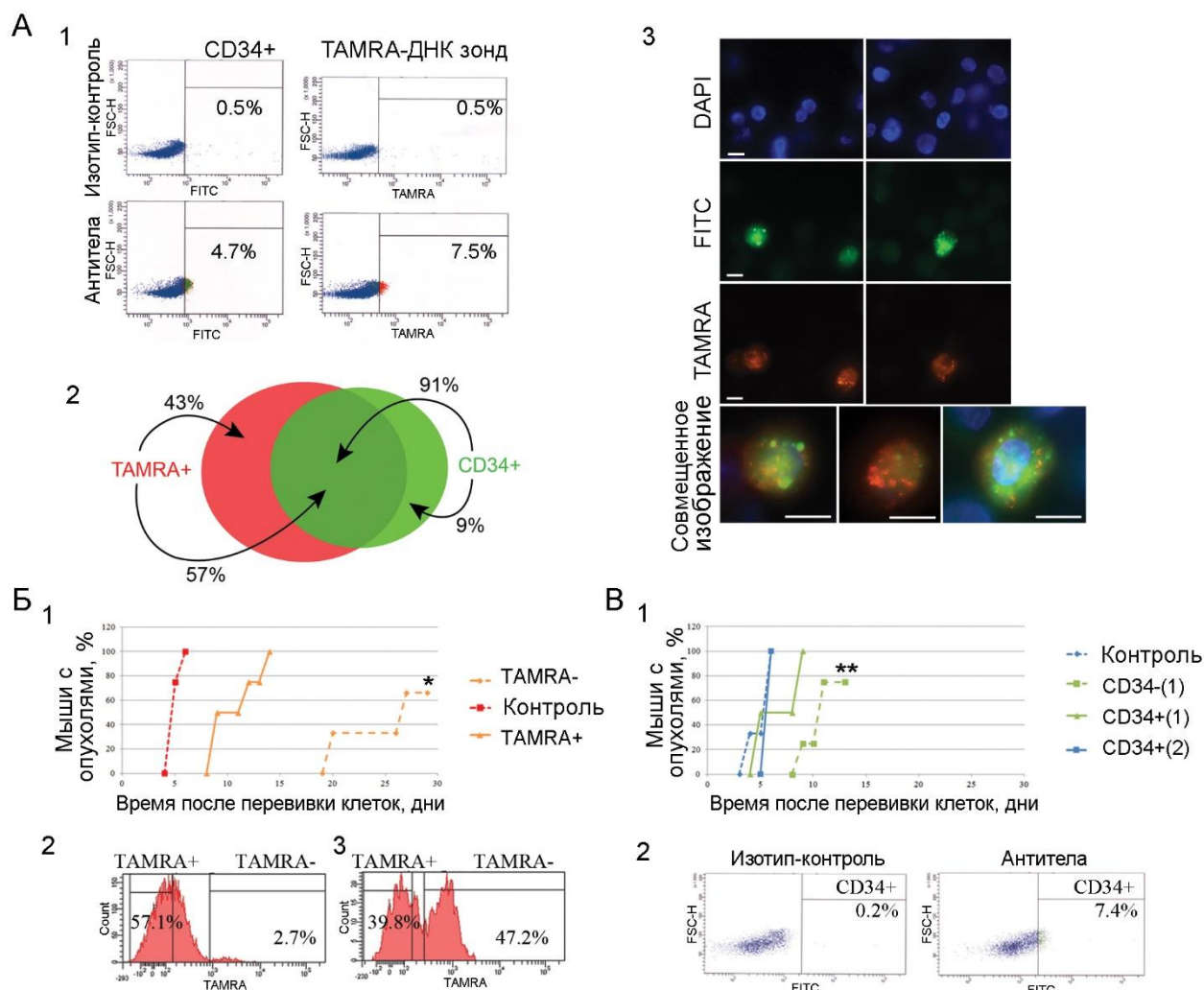


Рис. 10. Характеристика опухолевых свойств TAMRA+ клеток Кребс-2. **А**) 1 – FACS-анализ наличия CD34+ и TAMRA+ клеток в популяции Кребс-2; 2 – схематичное изображение перекрытия двух популяций (CD34+ и TAMRA+) клеток Кребс-2; 3 – цитофлуоресцентный анализ совместной локализации маркеров CD34+ и TAMRA+ в образце клеток асцита Кребс-2. Бар соответствует 10 мкм. **Б**) Характеристика перевивочного потенциала TAMRA+, TAMRA– и суммарной фракции (контроль) клеток Кребс-2. 1 – Графики, отображающие динамику появления опухолей ($n = 4$); 2 – FACS-анализ образцов клеток, подготовленных для сортировки, инкубированных с TAMRA-ДНК зондом; 3 – FACS-анализ обогащенного TAMRA+ клетками образца, который использовали для перевивки. **В**) Характеристика перевивочного потенциала CD34+, CD34– и суммарной фракции (контроль) клеток Кребс-2. 1 – графики, отображающие динамику появления опухолей ($n = 4$), для CD34+ приведены данные двух независимых экспериментов; 2 – FACS-анализ образцов клеток, обработанных анти-CD34 антителами и подготовленных для сортировки. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с «+» популяцией, логарифмический ранговый тест.

Проведенный FACS-анализ и оценка цитологических препаратов с помощью флуоресцентной микроскопии (проанализировано 320 клеток) свидетельствовали, что более 90 % CD34+ являются TAMRA-позитивными. Из популяции TAMRA+ клеток ~57 % составляют CD34+ клетки (**Рисунок 10 А-2, 3**).

В последующих тестах на экспериментальных животных был проанализирован опухолевый потенциал TAMRA+ и CD34+ асцитных клеток (суммарно было проведено семь серий экспериментов). Суспензию асцитных клеток обрабатывали либо TAMRA-ДНК зондом, либо анти-CD34 антителами. После этого клетки сортировали на две группы, несущие или не несущие исследуемый признак («+» и «-», соответственно). Было установлено, что TAMRA+ клетки индуцируют развитие графта, гистологически имеющего те же характеристики, что и исходная опухоль (данные не приведены), на 7–11 суток раньше, чем TAMRA– клетки ($p < 0.05$). Дальнейшее наблюдение показало, что в группе «TAMRA–» трансплантаты растут медленнее, опухолевые узлы размягченные и менее выражены.

Полученный результат свидетельствовал, что TAMRA+ клетки обладают признаком, характерным для ОСК – высоким опухолевым потенциалом. Однако начало роста трансплантата в образцах TAMRA+ клеток всегда фиксировалось позже, чем в контроле ($p < 0.01$), где перевивался нативный асцит, состоящий как из захватывающих ДНК клеток, так и более дифференцированных клеток и клеток стромы (**Рисунок 10 Б**). Причина приживания трансплантата из образца TAMRA– клеток будет подробно объяснена в разделе 3.3.1.3 и связана с потерей ОСК свойства интернализации фрагментов дцДНК в фазе митоза (~20 % ОСК от их общего количества). Кроме того, неравное и неполное перекрытие двух маркеров ОСК (TAMRA+ и CD34+) также может оказывать влияние на опухолевый потенциал TAMRA– популяции. В отсортированных TAMRA– клетках всегда будет оставаться незначительное количество клеток со стволовыми характеристиками, несущих маркер CD34, по которому сортировка не выполнялась, что будет давать «остаточную опухолевость» указанной популяции клеток.

Анализ перевивочного потенциала CD34+ и CD34– асцитных клеток показал, что негативная по маркеру популяция клеток образует графты с запозданием на 4–5 суток по сравнению с позитивной ($p < 0.01$). При этом CD34+ клетки инициировали рост опухоли в те же сроки, что и контрольный асцит (достоверного отличия нет) (**Рисунок 10 В**). Можно полагать, что в популяции CD34+ клеток именно клетки, способные захватывать ДНК (составляющие 91 % CD34+ клеток для данной серии экспериментов), обуславливают опухолевый потенциал. CD34– клетки также инициируют рост трансплантата. Это связано с тем, что CD34– клетки – это опухолевые активно пролиферирующие клетки. В их популяции присутствует

~3.0 % клеток, способных интернализировать TAMRA-ДНК зонд (**Рисунок 10 А-1-3**), то есть клеток с высоким туморогенным потенциалом. Вместе такое сообщество по способности инициировать рост графта догоняет чистую популяцию CD34+ клеток.

Разница во времени индукции роста трансплантатов CD34+ и TAMRA+ клеток, а также TAMRA+ клеток относительно контроля связана, по-видимому, с тем, что присутствие ДНК во внутренних компартментах клеток как само по себе, так и при процедурных манипуляциях (сортировке и центрифугировании) может негативно сказываться на их жизнеспособности. Тот факт, что контрольные графты начинают расти первыми по сравнению с TAMRA+, а также факт того, что CD34– трансплантаты достаточно быстро догоняют в росте своих контрагентов, может быть связан с синергичными взаимоотношениями различных популяций клеток (туморогенных, пролиферирующих и стромальных), присутствующих в трансплантируемых образцах. Известно, что строма создает физиологическую нишу для ОСК (Mcmillan, Negri, Mitsiades, 2013; Vermeulen et al., 2010), значит при физическом разделении этих популяций должна происходить потеря коммуникационных связей, приводящая к изменению характерных свойств этих типов клеток.

Эксперименты по перевивке CD34+ клеток имели еще одно значение. Первоначально можно было предполагать, что именно появление TAMRA-ДНК фрагментов внутри клеток обуславливает их повышенную туморогенность. Тот факт, что 91 % CD34+ клеток являются TAMRA+ и что CD34+ клетки обладают подобным TAMRA+ клеткам туморогенным потенциалом, свидетельствовал: интернализация ДНК не определяет повышение туморогенности клеток, а является индикатором клеток с этим свойством.

3.3.1.3. Два пика интернализации экстраклеточной ДНК связаны с ограничениями, возникающими при делении клеток

В наших ранних исследованиях было показано, что интернализация экстраклеточной ДНК в клетки MCF-7 имеет два пика в 60 мин и в 3 ч после начала инкубации (Rogachev et al., 2006).

Чтобы проверить, является ли такая динамика интернализации ДНК справедливой для Кребс-2 клеток, была проведена серия экспериментов с оценкой интернализации экстраклеточной дцДНК в условиях предобработки клеток этой же ДНК.

1 млн клеток асцита Кребс-2 обрабатывался в течение часа 1 мкг TAMRA-ДНК зонда. Далее ежечасно (до 3–4-х часов после начала инкубации) к образцам добавлялась каждая следующая порция тестируемого препарата ДНК. После инкубации образцы клеток исчерпывающе обрабатывались ДНКазой (для удаления остатков ДНК, находящихся вокруг и

на поверхности клеток). Далее по результатам проточной цитометрии были проведены сравнительные анализы количества TAMRA+ клеток.

Было обнаружено, что по прошествии 3–4-х часов после начала инкубации при повторном добавлении TAMRA-ДНК зонда в культуральную среду происходит достоверное увеличение TAMRA+ клеток на ~20 % (с 1.4 до 1.7 %) при фиксированном количестве клеток Кребс-2 (**Рисунок 11 А**). Аналогичный результат наблюдался в предыдущих экспериментах – с увеличением времени инкубирования клеток с экстраклеточной ДНК через четыре часа происходило увеличение количества TAMRA+ клеток с 0.8 до 1.2 % (**Рисунок 8 Д, Е**). Также количество интернализованной в клетки Кребс-2 ДНК увеличивалось в указанные временные точки при инкубации клеток с плазмидной ДНК pUC19 (оценивалось количество выросших трансформантов после трансформации химически компетентных клеток ДНК, выделенной из асцитных клеток после коинкубации с плазмидной ДНК (данные не приведены)).

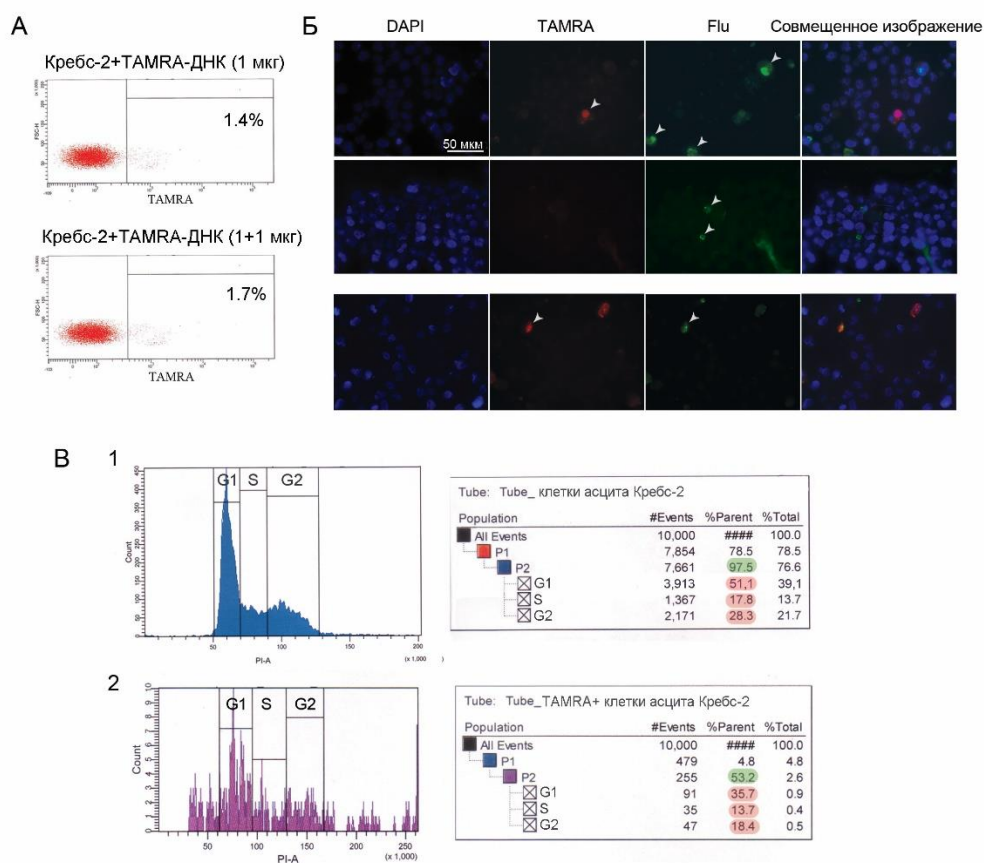


Рис. 11. Интернализация TAMRA-ДНК зонда в клетки Кребс-2 при его повторном добавлении в околклеточную среду. **А)** FACS-анализ интернализации дцДНК в клетки Кребс-2 при ее повторном добавлении через три часа после начала эксперимента, оценивался процент TAMRA+ клеток. **Б)** Цитофлуоресцентный анализ интернализации TAMRA-ДНК зонда в асцитные клетки Кребс-2 и Flu-ДНК зонда в эти же клетки при его повторном добавлении через три часа. Стрелками указаны клетки, интернализирующие флуоресцентно меченую ДНК. Верхняя панель отображает новые клетки, захватывающие ДНК через три часа после

первичного инкубирования с TAMRA-ДНК пробой, нижняя панель – клетку, в которую произошла интернализация обоих типов ДНК. **В)** Распределение суммарной популяции (верхние графики) и TAMRA+ (нижние графики) клеток Кребс-2 по клеточному циклу. Красным цветом выделены проценты клеток, находящиеся в G1, S и G2/M-фазах.

Для подтверждения того, что происходит именно увеличение процента клеток, интернализирующих ДНК, а не увеличение количества ДНК в одних и тех же клетках, была проведена дополнительная серия экспериментов. Клетки Кребс-2 инкубировали с TAMRA-ДНК зондом в течение 1 часа, отмывали и через три часа в культуральную среду добавляли Flu-ДНК зонд (Fluorescein, *Alu* дцДНК зонд, меченный флуоресцеином). Далее клетки анализировали при помощи флуоресцентной микроскопии. Показано, что вторая порция ДНК интернализуется преимущественно в TAMRA– клетки, то есть клетки, которые в первой точке анализа были не способны интернализировать ДНК. Следует отметить, что в образцах также наблюдались единичные клетки, позитивные по двум флуоресцентным маркерам (то есть захватившие как TAMRA-ДНК, так и Flu-ДНК зонд) (**Рисунок 11 Б**).

Эти результаты свидетельствуют о том, что по прошествии 3–4-х часов с начала инкубации Кребс-2 с экстраклеточной ДНК, происходит увеличение процента клеток, захватывающих экстраклеточную дцДНК на 13–30 % в зависимости от эксперимента.

Было проведено сравнение процента асцитных клеток, захватывающих экстраклеточную ДНК, и процента клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла (**Рисунок 11 В**). Оказалось, что распределение популяции TAMRA+ клеток по клеточному циклу не отличается от распределения суммарной популяции клеток асцита. В G2/M-фазы клеточного цикла находится порядка 20 % клеток. Можно предположить, что клетки, принципиально способные захватывать экстраклеточную дцДНК, находящиеся в процессе деления (G2/M), не интернализуют ДНК из околклеточного пространства. При выходе из М-фазы они становятся «готовыми» к этому процессу. Время повторной волны интернализации положительно коррелирует с длительностью G2/M-фазы, которая в среднем составляет порядка 4-х часов (Соорег, 2000). Проведенное сравнение процента клеток, находящихся в фазе деления, и процента увеличения TAMRA+ клеток через 4 часа после начала эксперимента, указывают на то, что увеличение количества TAMRA+ клеток, а также копий плазмид, выделяемых из клеток при таком режиме обработок экстраклеточной ДНК, является следствием появления дополнительной популяции клеток, способных к интернализации, которые ранее находились в процессе деления и не обладали этим свойством.

3.3.1.4. Поиск генов-кандидатов, доказывающих стволовую природу TAMRA+ клеток Кребс-2, методом RNAseq

На следующем этапе работы был проведен сравнительный RNAseq двух популяций клеток, TAMRA+ и TAMRA–, соответственно. Анализ профиля экспрессии генов, обуславливающих специфические характеристики ОСК, должен был дать окончательный ответ на вопрос касательно природы опухолевых клеток, обладающих способностью к интернализации ДНК.

Основные функции ОСК, отличающие указанные клетки от коммитированных опухолевых клеток, известны и досконально описаны во множестве работ. Также известны конкретные гены, участвующие в сигнальных каскадах, обеспечивающих особые характеристики указанных клеток (описано в разделе 1.2). Известно, что одну и ту же функцию в ОСК может обеспечивать широкий спектр сигнальных каскадов (в зависимости от биологического состояния клетки и внешних воздействий, таких как давление иммунной системы и/или терапии) (Deshmukh et al., 2021; Makena et al., 2020; Xu et al., 2025). Чтобы избежать скрининга факторов всех известных сигнальных каскадов, мы выбрали следующую экспериментальную стратегию. На первом этапе был проведен один раунд RNAseq, который дал первичную оценку различий в уровне транскрипции генов сигнальных каскадов. На основе результатов RNAseq были выбраны гены-кандидаты, экспрессия которых была подтверждена несколькими независимыми раундами qPCR. На основании qPCR была произведена оценка достоверности разницы экспрессии генов-кандидатов.

Используя признак интернализации TAMRA-ДНК зонда, TAMRA+ и TAMRA– популяции клеток Кребс-2 были препаративно изолированы в несколько приемов процедурой сортировки (BD FACSAria, Becton Dickinson). Оценка состояния сортированных клеток на цитологических препаратах показала, что обогащение TAMRA+ целевыми клетками составляло от 50 до 80 % и TAMRA– клетками до 100 % (**Рисунок 12**). Для получения и анализа РНК-транскриптов была применена технология RNAseq.

По техническим причинам было невозможно изолировать чистую популяцию TAMRA+ клеток в количестве, достаточном для последующего выделения РНК и проведения РНК-секвенирования (мы смогли достигнуть обогащения в 10–12 раз популяции TAMRA+ клеток, дальнейшая очистка подразумевала дополнительный раунд сортировки, что значительно снижало жизнеспособность клеток и, как следствие, количество и качество выделяемой РНК). При этом популяция TAMRA– клеток была сортирована с чистотой до 100 % (ввиду наличия большого количества клеток и возможности «жестко» выставить параметры сортировки). В связи с этим гены, имеющие разницу в экспрессии между двумя группами, но

экспрессирующиеся в TAMRA– клетках, не рассматривались (так как их экспрессия в образце TAMRA+ клеток могла обуславливаться примесью TAMRA– клеток). Были отобраны гены, экспрессирующиеся в TAMRA+ клетках и не экспрессирующиеся или экспрессирующиеся на экстремально низком уровне в TAMRA– клетках.

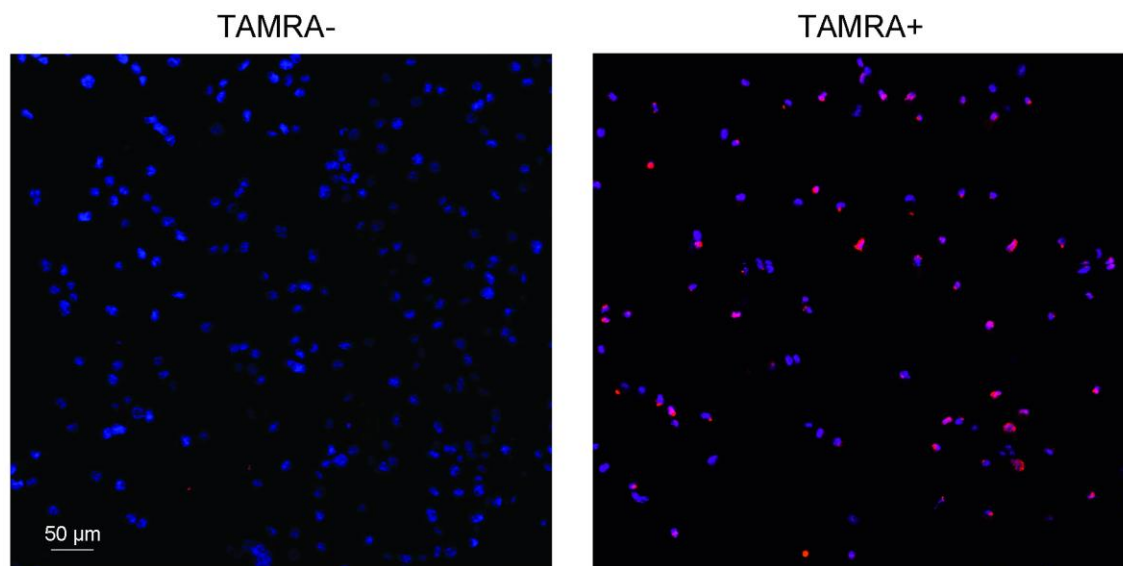


Рис. 12. Анализ обогащения популяции TAMRA– и TAMRA+ клеток Кребс-2 методом сортировки (BD FACSAria, Becton Dickinson).

После первичного анализа нами было отобрано порядка 300 генов. Для этих генов мы извлекли соответствующие последовательности мРНК, которые в дальнейшем использовались в качестве целевых последовательностей для картирования общего пула прочтений как для TAMRA+, так и для TAMRA– клеток. Всего было проведено три раунда картирования с последовательно увеличивающимися порогами специфичности, что позволило исключить значительное количество генов, не прошедших тест. В конечном счете было отобрано 168 генов. Данные о количестве прочтений для всех 168 генов, а также их краткая функциональная принадлежность приведены в **Приложении 2, Таблице 1**.

В экспериментах по пересевке TAMRA+ клеток Кребс-2 было показано, что указанные клетки обладают повышенным опухолевым потенциалом по сравнению с TAMRA– клетками, что является базовой характеристикой для ОСК (Al-Hajj et al., 2003; Bonnet, Dick, 1997). Основываясь на этих данных, было сделано предположение, что транскриптомный профиль TAMRA+ клеток должен быть представлен как генами, определяющими «стволовость» (симметричное/асимметричное деление, формирование и поддержание низкодифференцированного статуса), так и генами, определяющими «раковость» (детоксикация и МЛУ, устойчивость к апоптозу, ЭМП, клеточный метаболизм). Все

отобранные гены были проанализированы по их принадлежности к указанным категориям согласно их свойствам, охарактеризованным в оригинальных статьях.

Как уже было сказано, на основании данных RNAseq предварительно были отобраны гены-кандидаты (претенденты), которые принимают участие в интересующих сигнальных каскадах, представленных двумя категориями: отвечающие за «стволовые» и «раковые» свойства ОСК. Уровень экспрессии основных генов-кандидатов, относящихся к разным категориям, был верифицирован методом qPCR с последующим сравнительным анализом результатов обоих методов.

Гены «стволовости»

Стволовая клетка, в ее исходном значении как ЭСК, характеризуется двумя особенностями: способностью асимметрично делиться и способностью развиваться в любые типы клеток организма (свойство плюрипотентности), поддерживая такое свойство одной из дочерних клеток на протяжении многих актов деления.

Асимметричное деление СК обеспечивают сигнальные системы эмбриональных генов *Nh*, *Notch*, *Wnt* (Chao, Yan, Bu, 2024; Yoo, Kwon, 2015). Низкодифференцированный статус СК поддерживается в первую очередь сигнальной системой ретинола (Ablain, Thé, 2014). Таким образом, в категорию «стволовость» были выделены два указанных свойства СК. Гены, экспрессирующиеся в TAMRA+ клетках, были рассмотрены в рамках их принадлежности к метаболическим каскадам, определяющим эти свойства (Таблица 3).

Таблица 3. Гены, связанные с обеспечением «стволовых» функций» ОСК, имеющие повышенную экспрессию в TAMRA+ клетках Кребс-2 по сравнению с TAMRA– клетками, по данным RNAseq.

Асимметричное деление	Поддержание низкодифференцированного состояния	Другие факторы СК
<i>Asb4, Nfatc2, Ppap2b, Tcf7l2, Uty, Wnt5a, Dnaja4, Rab37, Thpo, Sox9</i>	<i>Zfp39, Abca1, Abca9, Abca13, Aldh1a1, Aldh1l1, Bmper, Crabp2, Cyp2d26, Cyp26a1, Eif2s3y, Igf1, Igf2, Pik3ip1, Rragd, Rbp7, Rrh</i>	<i>Clec11a, Lhx4, Gtf2a1l, Tbata, Mreg, Slc43a3, Ifi27l2b</i>

Всего к группе генов, определяющих стволовые свойства TAMRA+ клеток, было отнесено 34 гена. Способность клеток к асимметричному делению характеризуется активностью генов Wnt-зависимого сигнального каскада (10 генов). Поддержание плюрипотентного состояния на протяжении многочисленных делений определяется

сигнальным каскадом системы ретинола (17 генов). Для каждой группы отмечается наличие молекул, определяющих изменения активности определенных регуляторных каскадов. Для первой группы это активность транскрипционных факторов: Sox9, Nfatc2, Tcf7l2, фосфатазы Ppar2b, секретирующихся цитокинов Wnt5a, Thpo. Для второй группы это ростовые факторы Igf1, Igf2. Также для TAMRA⁺ клеток характерна экспрессия генов, принадлежащих другим молекулярным системам СК (третья группа). Это ростовой фактор Clec11a, транскрипционный фактор Lhx4, а также белки Gtf2a1l, Tbata, Mreg, Slc43a3, Ifi2712b.

Гены «раковости»

ОСК присущи следующие уникальные свойства, позволяющие им не зависеть от морфогенетических законов, определяющих упорядоченность клеточных систем организма. В первую очередь ОСК способны индуцировать развитие новой опухоли, характеризующейся той же гистологической картиной, что и первичная опухоль (Li et al., 2022). Далее, ОСК способны к метастазированию (Kalluri, Weinberg, 2009), что определяется свойством этих клеток осуществлять ЭМП. Происходит ремоделирование цитоскелета, вырабатываются факторы, меняющие структуру внеклеточного матрикса в окружении клетки. Клетка становится в состоянии преодолеть базальную мембрану и эндотелиальную стенку, переместиться по кровяному руслу, выйти в окружающую ткань и сформировать новое место существования. В процессе ЭМП в ОСК происходит последовательная активация соответствующих систем генов (Greaves, Calle, 2022; Zeng et al., 2023; Zhang et al., 2012). При этом ОСК приобретают свойство избегать атаки клеток иммунной системы (Greten, Grivennikov, 2019; Бережной и др., 2008) и активируют антиапоптотические гены (Cao, Livas, Kyprianou, 2016). Также для ОСК характерны другие уникальные свойства, такие как способность выводить и нейтрализовать токсические вещества (Safa, 2022), взаимодействовать с клетками окружающей стромы и стимулировать их к переходу на анаэробное дыхание (гликолиз) – эффект Варбурга (Liu, Jin, Fan, 2021; Sancho, Barneda, Heeschen, 2016). Регуляция роста и дифференцировки опухолевой клетки связана также с метаболизмом Ca^{2+} и определяется кальций-зависимой протеинкиназой C (PKC). В норме PKC выполняет функцию модулятора и уравнивает процессы роста и дифференцировки. Для опухолевой клетки всегда характерна гиперреактивность PKC, при этом она выполняет роль индуктора пролиферации, стимулирует образование фосфотирозина и усиливает бесконтрольное размножение клеток. PKC активируется 3-фосфоинозитид-зависимой киназой 1 (PDK1) (Peng et al., 2018). Каждое из перечисленных свойств характеризуется активностью определенного набора генов. Как и в первом случае, все отобранные гены были проанализированы по их участию в молекулярных событиях, определяющих выделенные свойства опухолевых клеток на основании характеристик,

приведенных в оригинальных статьях. Суммарно для категории «раковость» согласно данным, полученным из оригинальных статей, было отнесено 54 гена, которые определяют важнейшие специфические свойства опухолевых клеток (**Таблица 4**).

Также в результате анализа генов, сверхэкспрессирующихся в TAMRA+ клетках, была выделена группа генов, связанных с cAMP-зависимым сигнальным каскадом, вовлеченным в различные клеточные процессы, характерные для ОСК: клеточное выживание, устойчивость к апоптозу, ранний ответ на митогены, клеточная дифференцировка, метаболизм липидов и углеводов. Сеть cAMP-сигнального пути включает более 20 % (36 из 168) TAMRA+ специфических генов, которые в сумме обеспечивают положительную обратную петлю сохранения сигнального пути в активном состоянии. К указанным генам относятся: *Nt5e*, *Acpp*, *Pde4d*, *Pde7b*, *Igf1*, *Igf2*, *Pf4*, *Gpha2*, *Prok2*, *Nts*, *Wnt5a*, *Nppa*, *Adrb3*, *Fgfr1*, *Gpr97*, *Gpr128*, *Cacna1d*, *Cp*, *Pdk4*, *Riiad1*, *Trpv4*, *Abca1*, *Cd200*, *Gata6*, *Amy1*, *Nfatc2*, *Kcnq2*, *Itm2a*, *Pon1*, *Tal1*, *Per2*, *Slc2a4*, *Tdo2*, *Mmp2*, *Alox15*, *Mst1*.

Оставшиеся 55 генов также были охарактеризованы согласно их функциям без привязки к молекулярным системам, определяющим свойства ОСК. В этой группе генов также можно выделить гены белков, участвующих в метаболических путях в качестве активаторов или репрессоров молекулярных каскадов этих путей. Это факторы роста *Gdf6*, *Inhbe*; киназа *Srms*; транскрипционный фактор *Lass4/Cers4*; цитокины *Il-10*, *Il-17rb*.

Необходимо отметить, что более 40 генов, характерных для TAMRA+ ОСК Кребс-2 (распределенных по всем группам), входят в список корового набора генов, определяющих ЭМП опухолевых клеток (Deshmukh et al., 2021; Škovierová et al., 2018). При этом в списке находятся две важнейшие для ЭМП секретируемые триггерные молекулы – *Wnt5a* и *Igf*.

Часть генов функционально охарактеризованы недостаточно и представляют большой интерес, как потенциальные неизвестные мишени ОСК (на примере клеток Кребс-2).

Таблица 4. Гены, связанные с обеспечением «раковых» функций ОСК, имеющие повышенную экспрессию в TAMRA+ клетках Кребс-2 по сравнению с TAMRA– клетками, по данным RNAseq.

Онкогены, онко-супрессоры	Гены, характерные для раковых клеток	Репрессия иммунитета	МЛУ, детоксикация	Антиапоптотические гены	Реорганизация цитоскелета	Реорганизация внеклеточного матрикса, адгезия, перемещение в тканях	Перемещение в кровяном русле, выход из сосудов	Ангиогенез	Выживание в тканях	Метаболизм кальция
<i>Eef1a2, Per2, Rasgrp3, Sash1, Tal1</i>	<i>Oit3, Tnxb, Zfr2, VpreB3, Trim40</i>	<i>Arg2, Vsig4</i>	<i>Abca1, Abca13, Aldh1l1, Gstm3</i>	<i>Cd5l, Tnfrsf13c</i>	<i>Myo1b, Pdlim4, Ttl2, Tubb1, Trpv4, Upk1b, Cobl, Cp, Dock10</i>	<i>Pde4d, Prg4, Nrcam, Perp, Comp, Igsf3, Pvr11, S100a14, Adamts2, Acpp, Fcna, Fblim1, Dsc2, Col6a2, Col3a1, Hepacam, Itga9, Mmp2, Ltbp1</i>	<i>Selp, Lyve1, Cldn1</i>	<i>Pdzd3 (Pdzk1)</i>	<i>Wnk2, Gas6</i>	<i>Pdk4</i>

3.3.1.5. Верификация экспрессии генов-кандидатов методом qPCR

Для подтверждения результатов, полученных в RNAseq экспериментах, был проведен «возвратный анализ экспрессии генов» с использованием qPCR с кДНК, синтезированной с polyA мРНК TAMRA+ и TAMRA– клеток. В проведенных экспериментах были охарактеризованы основные гены выделенных групп обеих категорий. Объединенные результаты по проанализированным генам приведены на **Рисунках 13, 14** и в **Приложении 2, Таблице 1**. Полученные результаты представлены как кратное увеличение экспрессии генов в TAMRA+ клетках относительно TAMRA– клеток (принято за 1).

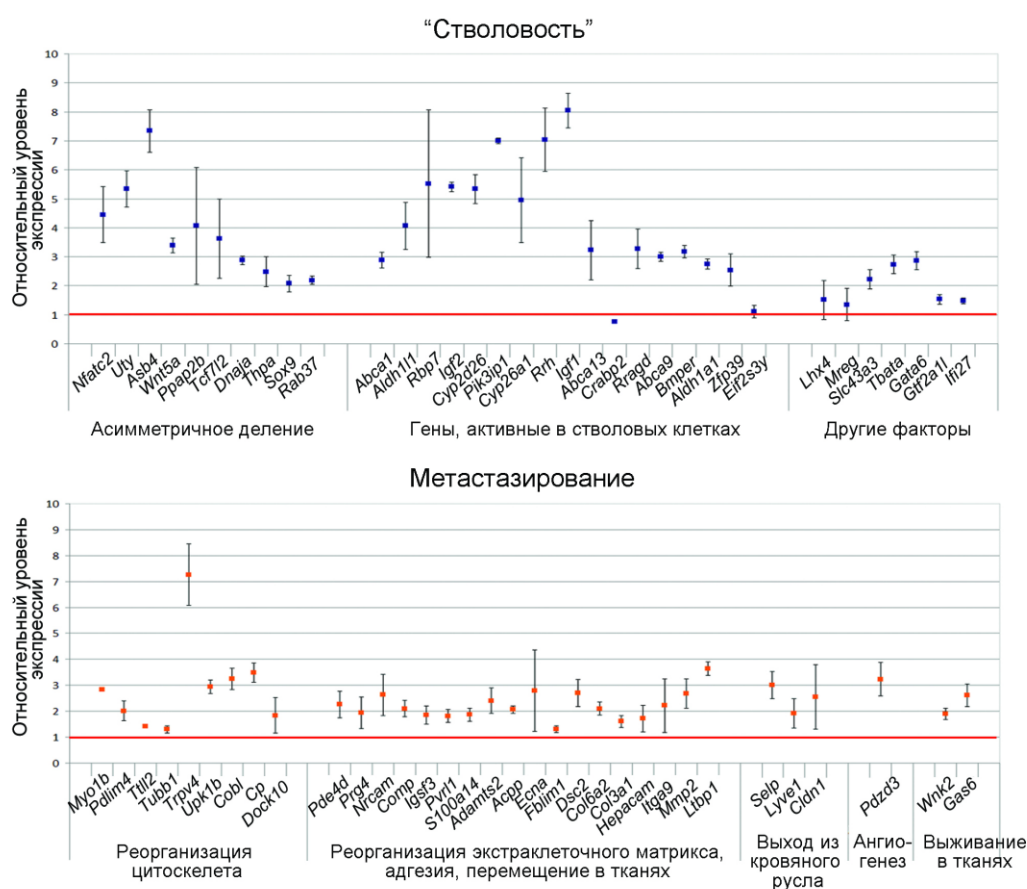


Рис. 13. Верифицирующий анализ экспрессии идентифицированных в RNAseq генов-кандидатов методом qPCR. Гены классифицированы в соответствии с категориями, характеризующими свойства «стволовости» и метастазирования. Красная линия обозначает базовый уровень экспрессии в TAMRA– клетках (принято за 1). На рисунке приведено Mean $\pm$ SD (n = 3–5).

Проведенный анализ подтвердил результаты RNAseq и позволил выделить группу генов, имеющих повышенную экспрессию в опухолевых клетках Кребс-2. В этот список вошли две пары генов: секретируемый фактор роста *Igf1* и активируемый им транскрипционный фактор *Nfatc2*, и цитокин *Wnt5* и его онтологический транскрипционный фактор *Tcf7l2*.

Известно, что Wnt5 является триггерной молекулой Wnt5-зависимого сигнального пути, а активируемый в результате запуска Wnt-сигнального каскада транскрипционный фактор Tcf712 запускает транскрипцию генов генной платформы, определяющей стволовые свойства TAMRA+ клеток Кребс-2 (Cadigan, Waterman, 2012; Rajakulendran et al., 2019). В свою очередь Igf2 является триггерной молекулой MAPK-сигнального каскада, а активируемый в результате запуска MAPK-зависимого сигнального пути его онтологический партнер – транскрипционный фактор Nfatc2, индуцирует транскрипцию генов генной платформы, определяющей раковую принадлежность клеток (Motzer et al., 2007).

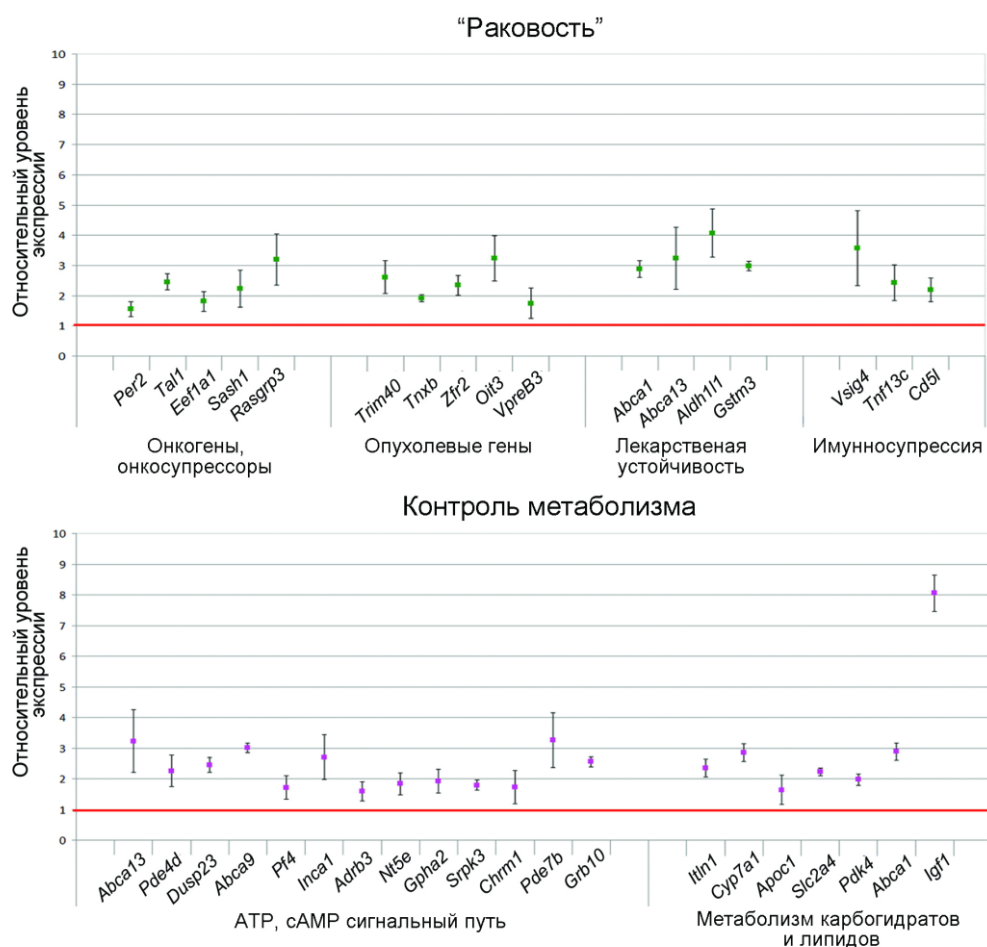


Рис. 14. Верифицирующий анализ экспрессии идентифицированных в RNAseq генов-кандидатов методом qPCR. Гены классифицированы в соответствии с категориями, характеризующими свойства «раковости» и контроля метаболизма клетки. Красная линия обозначает базовый уровень экспрессии в TAMRA– клетках. На рисунке приведено Mean ± SD (n = 3–5).

В общем списке генов с повышенной экспрессией выделяются две группы, составляющие более половины списка, определяющих стволовые свойства клеток – асимметричное деление и низкодифференцированное состояние. Повышенная экспрессия

таких генов может отражать онтологическую необходимость этого типа клеток, в первую очередь, контролировать и сохранять стволовые качества, которые дают клетке всю совокупность преимуществ перед коммитированной клеткой.

Сравнение генов, полученных в настоящем исследовании на модели карциномы мыши Кребс-2, с генами, ответственными за аналогичные функции в ОСК других нозологий по имеющимся литературным данным, приведено в **Приложении 2, Таблице 2**.

Таким образом на модели карциномы мыши Кребс-2 показано, что в клетках данной опухоли имеется небольшая популяция (2.8 ± 2.1 %), способная естественным механизмом захватывать фрагменты экстраклеточной дцДНК (TAMRA+ клетки). При этом 57 % популяции этих клеток также являются положительными по CD34-маркеру, характерному для ОСК других типов опухолей, а также ГСК. В свою очередь, порядка 90 % CD34+ клеток Кребс-2 способны интернализировать дцДНК. Как TAMRA+ клетки, так и CD34+ клетки Кребс-2 обладают повышенным опухоленными свойствами при анализе перевивки опухоли мышам. Верифицирующий анализ экспрессии генов-кандидатов методом qPCR подтвердил результаты RNAseq и показал, что в TAMRA+ клетках Кребс-2 по сравнению с клетками, не обладающими свойством интернализировать ДНК, повышена экспрессия генов, отвечающих за стволовые свойства (поддержание низкодифференцированного статуса, асимметричное деление, метастазирование), а также других генов, характерных для ОСК. Полученные экспериментальные данные означают, что клетки опухоли Кребс-2, обладающие признаком интернализации экстраклеточных фрагментов дцДНК, являются *опухолевыми стволовыми клетками*.

3.3.2. Модель индуцированной вирусом Эпштейна-Барр В-лимфомы человека

3.3.2.1. Характеристика полученной культуры

Из аспирата костного мозга больного ММ была получена фракция адгезивных клеток, представленная двумя субпопуляциями: с признаками мезенхимальных стромальных клеток (CD73+/CD20–/CD45–) и клеток, относящихся к В-клеточному ростку (CD73–/CD20+/CD45+/CD19^{dim}), составляющими 37 % и 47 % соответственно. Через 35 дней культивирования были получены плавающие сфероагрегаты, все клетки которых через три пассажа приобрели CD73–/CD20+/CD45+/CD19^{dim} набор поверхностных маркеров, характерный для В-клеток (**Рисунок 15**).

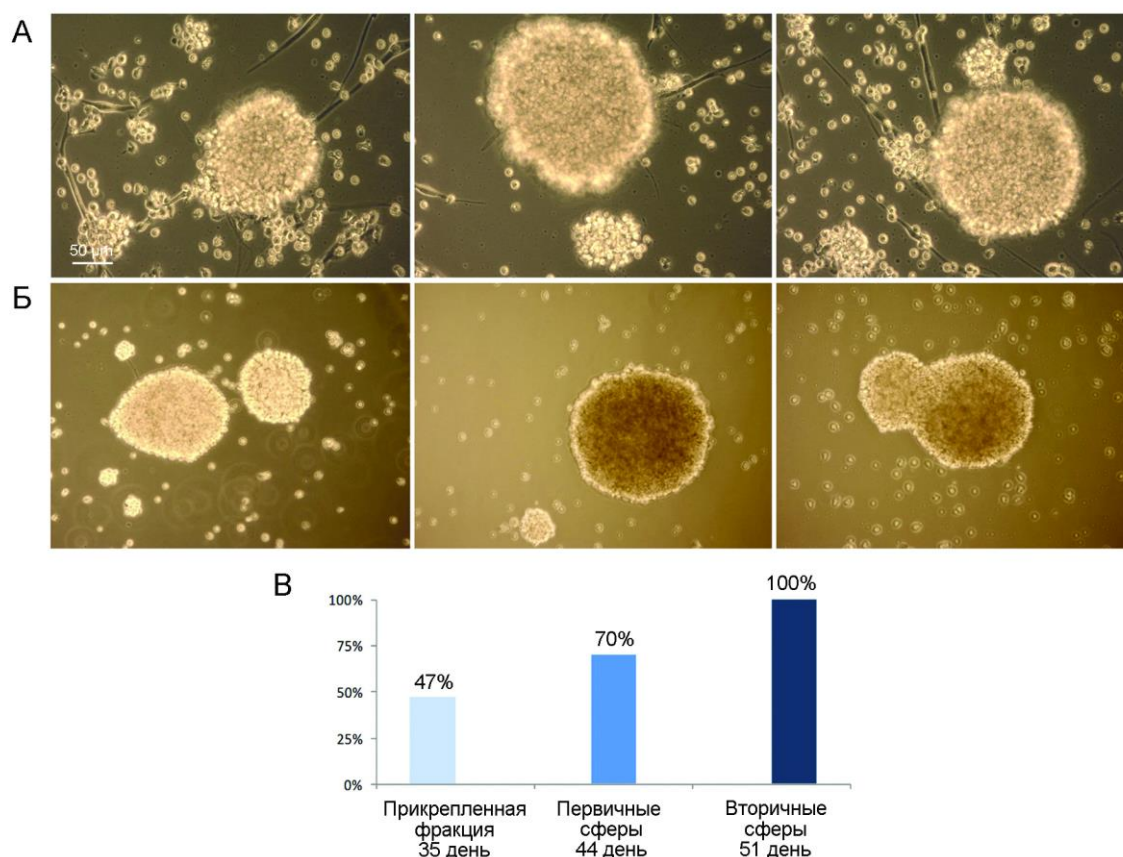


Рис. 15. Фенотипический анализ адгезивных клеток и клеток плавающих сфер, полученных из аспирата костного мозга больного ММ. **А)** Первичные сферы (через 42 суток с начала культивирования костномозговых мононуклеарных клеток). **Б)** Вторичные сферы, образовавшиеся через семь суток культивирования дезагригированных клеток первичных сфер (через 51 сутки с начала культивирования костномозговых мононуклеарных клеток), zoom: 1169×877. **В)** Относительное содержание CD73-/CD20+/CD45+/CD19^{dim} клеток в процессе культивирования костномозговых клеток больного ММ (во фракции адгезивных клеток и свободно плавающих первичных и вторичных сфер).

Была проведена серия экспериментов по анализу и характеристике полученной культуры, визуально выглядящей как свободноплавающие клетки, большая часть из которых способна собираться в сфероагрегаты в течение 10–24 часов после диспергирования. Одним из главных критериев принадлежности полученной клеточной линии к ММ или ВЭБ-индуцированной В-лимфоме является наличие или отсутствие заражения ВЭБ. Клеточные линии ММ никогда не инфицированы ВЭБ, тогда как в ВЭБ-индуцированных В-лимфомах он всегда присутствует (Drexler, Matsuo, 2000; Rowe et al., 1991). ВЭБ инфицирует В-клетки и нарушает механизмы регуляции пролиферации, а также подавляет апоптоз. Все эти нарушения приводят к переходу В-клеток в злокачественное состояние. Тем не менее, инфекция никогда не связана с интеграцией вирусной ДНК в геном организма. Принято считать, что вирус-

опосредованная иммортализация связана с особенностью синтетических процессов на латентных «0», «I», «II» стадиях размножения вируса (Price, Luftig, 2014).

Известно, что скорость пролиферации В-клона (в том числе инфицированного ВЭБ), значительно выше, чем у клонотипической клетки ММ (время удвоения 36–48 ч против 108–144 ч). При отсутствии иммунного контроля, он имеет селективные преимущества роста. Длительное культивирование таких смешанных культур приводит к вытеснению клеток ММ и последующему доминированию одного или нескольких клонов, положительных по ВЭБ. При дальнейшем культивировании остается только один доминирующий клон. Такие линии клеток известны как ВЭБ-индуцированные В-лимфомы (Drexler, Matsuo, 2000; Nilson, Ponten, 1975; Rowe et al., 1991). Проведенный ПЦР со специфическими праймерами подтвердил заражение исследуемой клеточной линии вирусом Эпштейна-Барр, изначально присутствующим в организме пациента.

ВЭБ-индуцированный В-клеточный лимфобластоз на начальных стадиях развития не демонстрирует хромосомных aberrаций в инфицированных В-клетках. Тем не менее, при длительном культивировании *ex vivo* такие aberrации появляются. В случае ММ злокачественная трансформация неизбежно сопровождается хромосомными aberrациями, которые всегда обнаруживаются при кариотипировании. Прежде всего, клетки ММ являются анеуплоидными. Наиболее частыми кариотипическими aberrациями в клетках ММ являются нарушения целостности первой хромосомы (1p,q), делеция 13-й хромосомы или ее плеча (13q) и делеция 17p. Дополнительное плечо первой хромосомы обнаруживается в 35–40 % случаев и приводит к дисфункции онкогенов *CKS1B*, *ANP32E*, *BCL9* и *PDZK1*. Делеция плеча 1p происходит в 30 % случаев ММ, нарушая функции *FAM46C*, *FAF1* и *CDKN2C*. Потеря 13-й хромосомы или ее плеча 13q приводит к потере гена-супрессора опухоли *RB1* и встречается в 50 % случаев ММ. Делеция плеча 17p приводит к потере гена-супрессора опухоли *TP53* и характерна для 10 % случаев ММ. Другие более или менее частые кариотипические aberrации в клетках ММ включают делеции плеч 11q (7 %, *BIRC2*, *BIRC3*), 14q (38 %, *TRAF3*) и 16q (35 %, *CYLD*, *WWOX*) (Fonseca, Monge, Dimopoulos, 2014; Hebraud et al., 2015; Martinez-Lopez et al., 2014).

Присутствие в культуре клеток ВЭБ предполагало, что полученная клеточная линия, скорее всего, относится к лимфобластоидным клеткам, индуцированным указанным вирусом. Таким образом, кариотип этих клеток должен быть либо интактен, либо иметь хромосомные aberrации, не относящиеся к наиболее распространенным для ММ. Для окончательной проверки принадлежности культуры к ВЭБ-индуцированной В-лимфоме был проведен ряд FISH-анализов, направленных на выявление хромосомных aberrаций, специфичных для ММ

(*TP53*, перестройки *IGH*, делеции 13-й хромосомы или ее локусов, а также aberrации первой хромосомы). Полученные результаты свидетельствовали об отсутствии хромосомных аномалий, связанных с ММ.

Для окончательного определения принадлежности полученной культуры к В-лимфоме, необходимо было доказать наличие клонотипической В-клетки. В экспериментах по идентификации клонотипической В-клетки в материале ДНК плавающих сфер была использована незначительно модифицированная методика, разработанная для выявления остаточной болезни ММ у пациентов («глубокое секвенирование» (Martinez-Lopez et al., 2014)).

Суть методики заключается в следующем. Зрелая В-клетка, прошедшая V(D)J-рекомбинацию, никогда не возвращается в костный мозг. Наоборот, для ММ переродившаяся В-клетка экспандирует костномозговые ниши, индуцируя патологические процессы. Проведенное лечение болезни приводит к практически полной эрадикации клеток ММ. Однако всегда остается вероятность остаточного заболевания в виде некоторого минимального количества опухолевых клеток, связанного со способностью клеток ММ преодолевать циторедукционную терапию. Метод глубокого секвенирования предназначен для выявления таких клеток. В костном мозге все клетки, включая незрелые В-лимфоциты, имеют неперестроенный VDJ-локус. Остаточные клонотипические В-клетки ММ, напротив, имеют идентичный VDJ-локус. Для наглядности схема описанной дифференцировки VDJ-локуса приведена на **Рисунке 16 А**. Из клеток аспирата костного мозга выделяется суммарная ДНК, с которой проводится один цикл амплификации со специально подобранными парами праймеров на стабильные области реорганизованного VDJ-локуса. Далее ПЦР продукты в полном объеме клонируют в плазмидном векторе и полностью секвенируют полученную библиотеку, или продукты ПЦР секвенируют на платформах NGS. Если при тотальном секвенировании обнаруживается хотя бы два одинаковых клона, это означает присутствие в костном мозге остаточной болезни.

Мы предложили следующую модификацию описанной методики. Предполагалось, используя специфические праймеры, описанные в работах по глубокому секвенированию (Belzen et al., 1997; Uchiyaama et al., 2003), получить специфический ПЦР продукт, который будет соответствовать VDJ-локусу клонотипической В-клетки исследуемой культуры. Количественную оценку В-клонотипических клеток в культуре, содержащих ДНК с таким VDJ-генотипом, оценить с помощью qPCR.

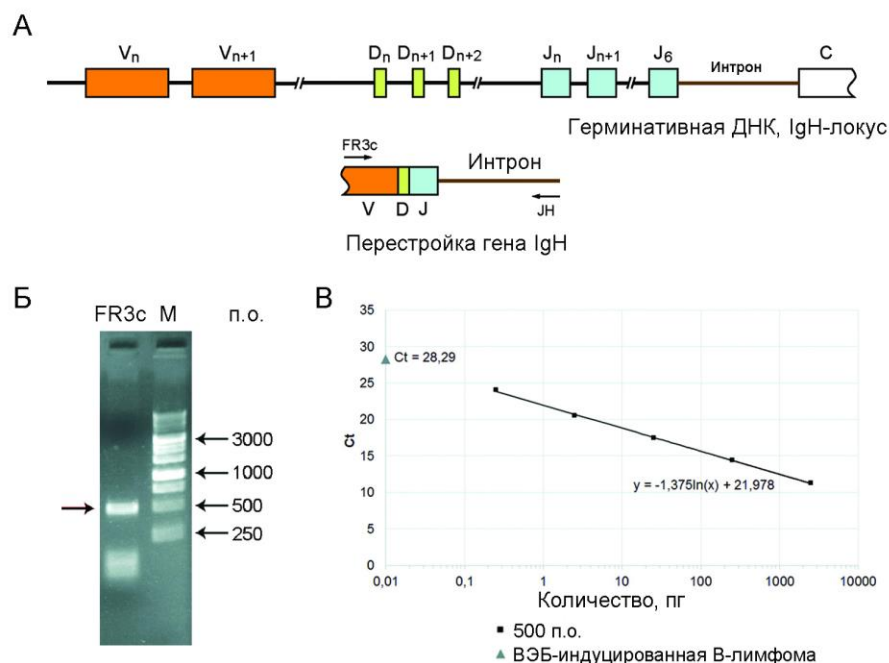


Рис. 16. Определение количества клонотипических В-клеток с реорганизованным VDJ-локусом в составе сфер культуры ВЭБ-индуцированной В-лимфомы. **А)** Схема дифференцировки VDJ-локуса в процессе рекомбинации. **Б)** ПЦР с ДНК, выделенной из культуры клеток, с праймерами JH/FR3c. Стрелкой обозначен фрагмент дифференцированного В-клона, размером 500 п.н. **В)** Количественное определение В-клона в составе ДНК, выделенной из культуры. Калибровочная кривая получена с использованием нескольких разведений очищенной ДНК В-клона (500 п.н.) и праймеров JH/FR3c. Точкой обозначено количество В-клонов в исследуемой ДНК, посчитанное при помощи формулы наклона калибровочной кривой.

Было синтезировано три пары праймеров на константные области VDJ-локуса с тем, чтобы добиться оптимальных условий для получения ПЦР-продукта. В результате проведенного поиска, используя праймеры JH/FR3c, был получен специфический фрагмент ~500 п.н. (далее в тексте обозначен «500») (**Рисунок 16 Б**). Фрагмент был клонирован и 12 из полученных клонов секвенированы. За исключением нескольких одиночных замен эти структуры оказались идентичными (последовательности предоставляются по официальному запросу в Ученый совет ИЦиГ СО РАН или Дирекцию ИЦиГ СО РАН). Полученный мажорный ПЦР-продукт и результаты секвенирования свидетельствовали о том, что в выделенной из материала сфер ДНК присутствует множество фрагментов с одинаковой ДНК-последовательностью.

Для решения вопроса избирательной посадки праймеров, ограниченной одной молекулой ДНК, что может привести к амплификации и наработке ПЦР-продукта, было проведено исследование по количественной оценке содержания ДНК, гомологичной

фрагменту «500» и соответствующему реорганизованному VDJ-локусу. Указанный анализ проводился при помощи qPCR путем сравнения с нормировочной кривой, полученной с очищенного фрагмента «500», и использования в качестве матрицы ДНК, выделенной из сфер исследуемой культуры. Было показано, что в 100 нг ДНК, выделенной из культуры клеток, содержится 0.01 пг ДНК В-клона (**Рисунок 16 В**).

Расчет количества клеток, несущих реорганизованный VDJ-локус, проводился по следующей схеме. 100 нг ДНК, использованное в реакции, представляет собой количество ДНК, выделенной из ~8 300 клеток (из расчета, что в 1 диплоидной эукариотической клетке содержится 12 пг ядерной ДНК). Значение 0.01 пг ДНК В-клона, полученное в результате qPCR, соответствует 13 200 копиям дцДНК фрагмента размером 500 п.н. В диплоидной клетке содержится две копии указанного фрагмента ДНК. Значит, в образце суммарной ДНК, выделенной из сфер культуры, содержится количество ДНК, соответствующее 6 600 клонотипическим В-клеткам, что в свою очередь составляет ~79.4 % от рассчитанного общего количества. Таким образом в составе сфер исследуемой культуры присутствует около 80 % клонотипических В-клеток.

Иммортализация ВЭБ-инфицированных В-клеток *in vitro* является моделью для изучения ВЭБ-опосредованного лимфомагенеза у человека. Указанные культуры являются системой для изучения ВЭБ-индуцированных лимфом *in vivo*, таких как лимфомы Беркитта, Ходжкина (в 30–40 % случаев они также ВЭБ-позитивны) (Price, Luftig, 2014). Таким образом, не смотря на «искусственное» происхождение ВЭБ-индуцированных клеточных линий, они могут служить образцом для изучения событий, происходящих *in vivo*.

3.3.2.2. Интернализация фрагментов экстраклеточной дцДНК в клетки ВЭБ-индуцированной В-лимфомы как биологическое явление

Была оценена способность клеток, составляющих 3D-образования, захватывать TAMRA-ДНК зонд. Оказалось, что во всех сферах присутствовало от одной до нескольких клеток, способных без какой-либо процедуры трансфекции интернализировать меченую ДНК во внутриклеточные компартменты. На протяжении двух часов количество клеток, способных захватывать TAMRA-ДНК зонд, не изменялось. Методами флуоресцентной микроскопии на цитологических препаратах и лазерной конфокальной микроскопии в системе *in vitro*, был проанализирован процент TAMRA+ клеток в сферах (**Рисунок 17**). Всего было проанализировано 23 сферы, каждая из которых состояла в среднем из 90 клеток. Содержание TAMRA+ клеток, находящихся в составе сфер, составило 3.3 % или в среднем три клетки на сферу. Клетки, лежащие по отдельности, не учитывались, хотя среди них также присутствовали клетки, позитивные по сигналу TAMRA.

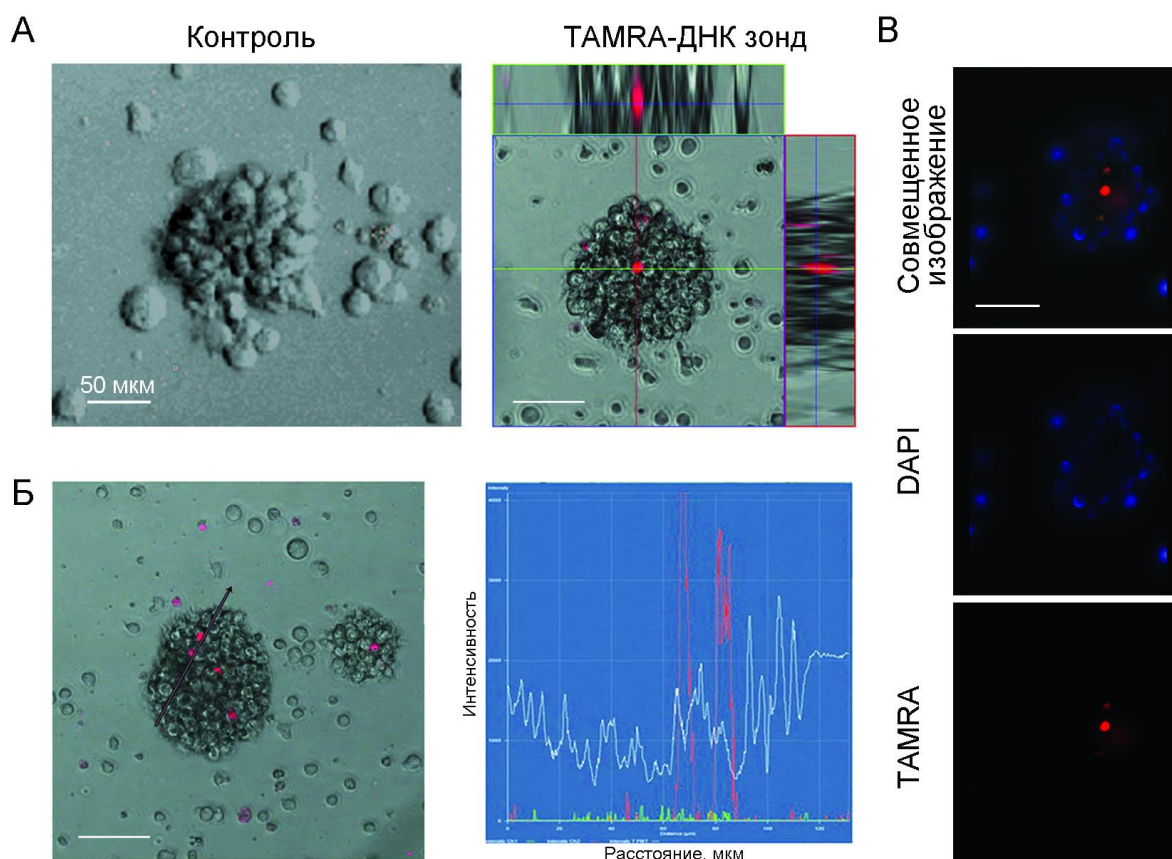


Рис. 17. Интернализация TAMRA-ДНК зонда в сферы ВЭБ-индуцированной В-лимфомы. **А)** Общий вид сферы без добавления экстраклеточной ДНК (контроль) и ортогональные проекции сферы через 20 мин после инкубирования с ДНК зондом, конфокальная микроскопия. Клетка, содержащая TAMRA-ДНК зонд, находится в центре сферы. **Б)** Сфера через 20 мин после инкубации с экстраклеточной ДНК, конфокальная микроскопия. Справа приведен график интенсивности TAMRA-сигнала, в векторе, проведенном через сферу (стрелка на левом изображении), полученный в программе ZEN. **В)** Флуоресцентная микроскопия распластанной сферы после инкубирования с TAMRA-ДНК зондом и окрашивания DAPI. В составе сферы визуализируются клетки, имеющие специфический TAMRA-сигнал. DAPI – окраска хроматина ядра, TAMRA – флуорохром ДНК зонда. Наличие сигнала в указанном фильтре свидетельствует о присутствии TAMRA-ДНК в клетке.

3.3.2.3. Доказательство стволовой природы TAMRA+ клеток ВЭБ-индуцированной В-лимфомы

Основными свойствами, которыми должна обладать ОСК гемопоэтических опухолей, являются: клонотипичность (все клетки обладают одинаково реорганизованным VDJ-локусом, то есть имеют моноклональное происхождение), клоногенность (способность формировать микроокружение (сферы) (Corre, Munshi, Avet-Loiseau, 2015; Prideaux, O'Brein, Chevassut, 2014; Zhao et al., 2017), способность формировать индивидуальные колонии из одной клетки) и туморогенность (способность давать в новом месте рост опухоли, идентичной исходной).

(1) Анализ принадлежности TAMRA+ клеток ВЭБ-индуцированной В-лимфомы к разным типам клеток, присутствующих в культуре

В костном мозге, из которого была получена культура, в норме детектируются два типа клеток, имеющих **клоногенные свойства**, это CD34+ стволовые гемопоэтические клетки крови, CD90+ мезенхимальные стволовые клетки. Кроме того, присутствует клоногенная клонотипическая В-клетка.

Для анализа принадлежности TAMRA+ клеток к гемопоэтическим предшественникам использовалось типирование клеток сфер антителами к CD34. Исходные клетки прилипающей фракции имели практически классический фенотип мезенхимальных стромальных клеток: CD105+, CD90+, CD73+, CD34–, CD3–, CD20–, HLA-DR–, CD16–, CD14–. Согласно ISCT (International Society for Cellular Therapy), мезенхимальные стромальные клетки позитивны по CD73, CD105 и CD90 и негативны по HLA-DR, CD45, CD34, CD19 или CD79α, CD14 или CD11b. В **Таблице 5** приведен список поверхностных маркеров, характеризующих клетки свободноплавающих сфер. В культуре наблюдается полное отсутствие клеток, несущих CD34-маркер. Полученный результат означает, что TAMRA+ клетки не являются CD34+ гемопоэтическими стволовыми клетками.

Таблица 5. Фенотип мезенхимальных стромальных клеток и клеток сфер, выраженный в процентном содержании клеток, несущих соответствующий поверхностный маркер.

		Мезенхимальные стромальные клетки	Клетки сфер
Стромальные маркеры	CD73	64.98	≤32.21
	CD90	98.41	1.13
	CD105	87.89	
	CD29		10.66
Маркеры ОСК	CD44		≤89.35
	CD133		≤3.05
Маркер стволовых кроветворных клеток	CD34	0.07	0
Маркеры макрофагального звена	HLA-DR	0.78	93.24
	CD14	0.88	5.07
	CD16	1.13	
Маркеры Т-клеток	CD3	0.67	2.03
	CD4		0
Маркеры В-клеток	CD19		0.27
	CD20	0.88	≤94.28

Дополнительно было проведено совместное типирование клеток сфер по способности интернализировать TAMRA-ДНК зонд, маркеру стволовости раковых клеток CD133 и маркеру В-клеток CD20 (**Таблица 6**). CD20 специфичен для В-лимфоцитов, также он присутствует на поверхности злокачественных клеток при большинстве В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний.

Таблица 6. Анализ взаимосвязи между интернализацией TAMRA-ДНК зонда (TAMRA+) и присутствием маркеров CD133 и CD20 в культуре В-лимфомы. Значения выражены в процентном содержании клеток, имеющих соответствующий фенотип.

TAMRA+	TAMRA+				TAMRA–			
	CD20+	CD20–	CD133+	CD133–	CD20+	CD20–	CD133+	CD133–
~6 %	4.4 %	2.0 %	5.1 %	0.6 %	12.5 %	~81 %	0 %	~94 %

Можно отметить, что практически 90 % TAMRA+ клеток несут маркер CD133 – промиелин, характерный для ОСК нескольких видов опухолей (Horn et al., 1999; Irollo, Pirozzi, 2013; Mizrak, Brittan, Alison, 2008; Sanai, Alvarez-Buylla, Berger, 2005). Кроме того, 4.4 % клеток, тинтернализующих TAMRA-ДНК зонд, позитивны одновременно по маркеру В-клеток CD20. Этот факт может означать, что эта популяция клеток составляет клонотипический В-клон.

Для анализа принадлежности TAMRA+ клеток к мезенхимальным стволовым клеткам проводили типирование клеток свободноплавающих сфер анти-CD90 антителами и одновременную детекцию клеток, позитивных по TAMRA-ДНК зонду. Эксперименты были сделаны как с использованием флуоресцентной микроскопии и анализа фиксированных клеток на цитологических препаратах (**Рисунок 18 А**), так и с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа и анализа живых клеток в системе *in vitro* (**Рисунок 18 Б**). Как свидетельствуют представленные рисунки, CD90+ и TAMRA+ представляют собой различные типы клеток культуры свободноплавающих сфер В-лимфомы.

Исследование совместной локализации CD90+ мезенхимальных стволовых клеток и TAMRA+ клеток выявило несколько характерных особенностей их взаимодействия. В сформированной неразрушенной сфере обязательно присутствуют оба типа указанных клеток. Часто они находятся в тесном клеточном контакте (**Рисунок 18 Б**).

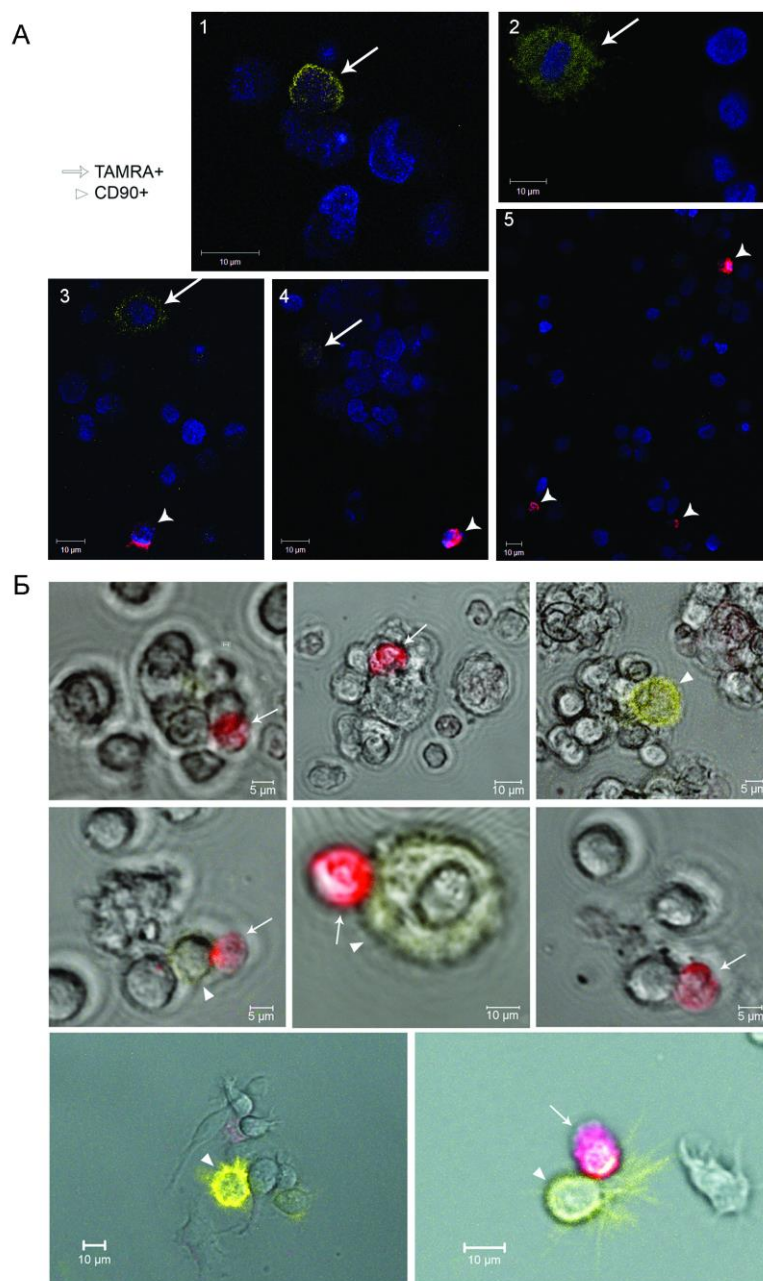


Рис. 18. Анализ принадлежности TAMRA+ клеток к мезенхимальным стволовым клеткам (CD90+) в культуре ВЭБ-индуцированной В-лимфомы. **А)** Изображения цитологических препаратов, полученные при помощи флуоресцентной микроскопии. **Б)** Изображения клеток *in vitro*, полученные при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа. Окраска ядер DAPI (синий цвет); CD90-APC антитела (желтый цвет); TAMRA-ДНК зонд (красный цвет). Стрелками отмечены мезенхимальные стволовые клетки (маркер CD90), TAMRA+ клетки.

Во многих случаях такого контакта наблюдается переход «TAMRA-материала» TAMRA+ клеток в CD90+ клетку (**Рисунок 19 А, Б**).



Рис. 19. Анализ совместной локализации клеток, несущих антитела к поверхностному маркеру CD90, и TAMRA+ клеток в культуре ВЭБ-индуцированной В-лимфомы. **А)** Изображения, характеризующие процесс перехода клеточного вещества от TAMRA+ клеток к мезенхимальным стволовым клеткам. Окраска ядер DAPI (синий цвет). Стрелками отмечены мезенхимальные стволовые клетки (маркер CD90), TAMRA+ клетки и области перехода клеточного вещества. **Б)** Переход TAMRA-материала в мезенхимальные стволовые клетки и мезенхимальные стволовые клетки, наполненные TAMRA-материалом; для некоторых клеток приведены профили интенсивности сигналов. **В)** Трансмиссионная электронная микроскопия. 1 – Типичное контактное взаимодействие между отдельными клетками. В центре снимка – одна из клеток контактирует с соседними посредством цитоплазматических тоннелей. Зоны

конгруэнтного контакта (протрузия со стороны одной клетки и инвагинация со стороны другой) показана стрелками. 2 – Поверхности клеток неровные из-за формирования полиморфных цитоплазматических отростков. Наблюдаются локусы слияния клеточных мембран в виде цитоплазматических мостиков (стрелка).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что между CD90+ мезенхимальными стволовыми клетками и TAMRA+ клетками идет активный прямой обмен клеточной информацией, при этом донором являются TAMRA+ клетки, а акцептором – мезенхимальные стволовые клетки. Результаты, полученные методом флуоресцентной микроскопии на фиксированных препаратах клеток, были подтверждены анализом контактного взаимодействия двух анализируемых типов клеток в культуре *in vitro* (**Рисунок 19 А, Б**). Трансмиссионный электронный микроскопический анализ подтвердил, что в культуре В-лимфомы междоу клетками имеются плотные взаимодействия и межклеточные соединения (цитоплазматические тоннели) (**Рисунок 19 В**). Можно предположить, что в данном случае детектируется взаимодействие CD90+ и TAMRA+ клеток, однако нельзя исключать возможности коммуникации других типов клеток в культуре.

При использовании сортировки клеток по признаку TAMRA+ и последующего qPCR, была проанализирована принадлежность TAMRA+ клеток к клонотипическим В-клеткам. Идея эксперимента состояла в следующем. Если TAMRA+ клетки составляют клонотипический В-клон, то в обогащенном после сортировки до 80 % образце (**Рисунок 20 А**), при количественной оценке в системе qPCR, будет детектироваться аналогичное или близкое к тому количество клонотипической ДНК реорганизованного VDJ-локуса. При этом в TAMRA– образце ПЦР-продукт детектироваться не должен. Были получены следующие цифровые значения. В TAMRA+ ДНК содержание В-клона составило 0.023 пг из 100 нг в реакции. В TAMRA– ДНК содержание В-клона составило 0.24 пг из 100 нг в реакции (**Рисунок 20 Б**). Исходя из результатов четырех независимых qPCR, разница между содержанием В-клеток в TAMRA+ против TAMRA– субпопуляциями составляет $\sim 10.5 \pm 4.1$ (Mean $\pm$ SD).

Также было проведено типирование указанных типов клеток комбинированным FISH-анализом с использованием ДНК зонда «500» (последовательность перестроенного VDJ-локуса) и оценкой TAMRA-ДНК (или Flu-ДНК) интернализации на одном препарате (**Рисунок 20 В**). Согласно полученным данным, оба типа клеток существуют как две независимые популяции.

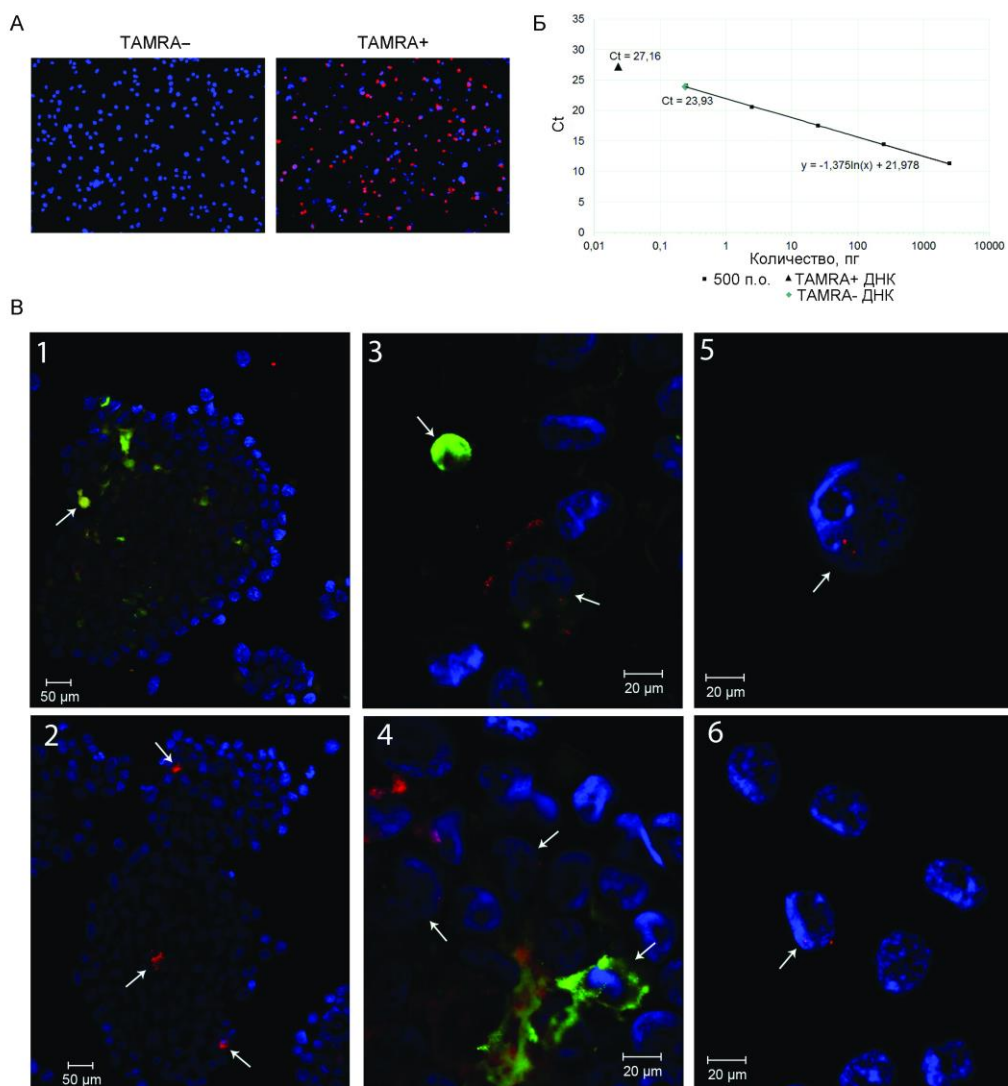


Рис. 20. Определение принадлежности TAMRA+ клеток ВЭБ-индуцированной В-лимфомы к субпопуляции клонотипических В-клеток. **А)** Оценка эффективности сортировки клеток ВЭБ-индуцированной В-лимфомы по признаку интернализации ДНК (TAMRA-ДНК зонд) «TAMRA+» – клетки, интернализирующие ДНК, обогащение до 80 %; «TAMRA–» – полное отсутствие клеток, интернализирующих ДНК. **Б)** Количественная оценка содержания ДНК В-клона (500 п.н.) в отсортированных TAMRA+ и TAMRA– клетках методом qPCR. Калибровочная кривая построена с использованием разных количеств ДНК, представляющей последовательность реорганизованного VDJ-локуса В-клона (500 п.н.), и праймеров JH/FR3c. Точками обозначены количества указанного фрагмента в ДНК из TAMRA+ и TAMRA– клеток. **В)** Препараты клеток культуры ВЭБ-индуцированной В-лимфомы после процедуры интернализации Flu- или TAMRA-ДНК зонда с последующей FISH с меченым TAMRA-флуорохромом ДНК-фрагментом «500», соответствующим реорганизованному VDJ-локусу клонотипической В-клетки. 1, 2 – целые сферы с Flu-ДНК зондом (1) и TAMRA-ДНК зондом (2); 3, 4 – фрагменты сфер; 5, 6 – клетки фракции свободно расположенных клеток и остатков разрушенных сфер. Стрелками указаны сайты специфической гибридизации ДНК зонда, клетки, захватившие меченый флуорохромом ДНК зонд. Окраска ядер DAPI.

Таким образом показано, что TAMRA+ клетки не относятся ни к CD34+ гемопоэтическим предшественникам, ни к мезенхимальным стволовым клеткам, ни к клонотипическим В-клеткам, присутствующим в культуре, а представляют собой отдельную субпопуляцию. При этом ~90 % TAMRA+ клеток несут маркер CD133, являющийся маркером ОСК для многих типов опухолей.

(2) Анализ клоногенных свойств TAMRA+ клеток В-лимфомы

Поскольку клетка, захватывающая ДНК зонд, всегда располагалась внутри в центре сферы, было сделано предположение, что именно эти клетки являются «единицами», организующими сборку сферы. Был проведен 12-часовой непрерывный мониторинг процесса сборки сфер. Сферы были ресуспендированы до отдельных клеток и проинкубированы с TAMRA-ДНК зондом. Через ~10 часов были обнаружены сформированные сферы (**Рисунок 21**).

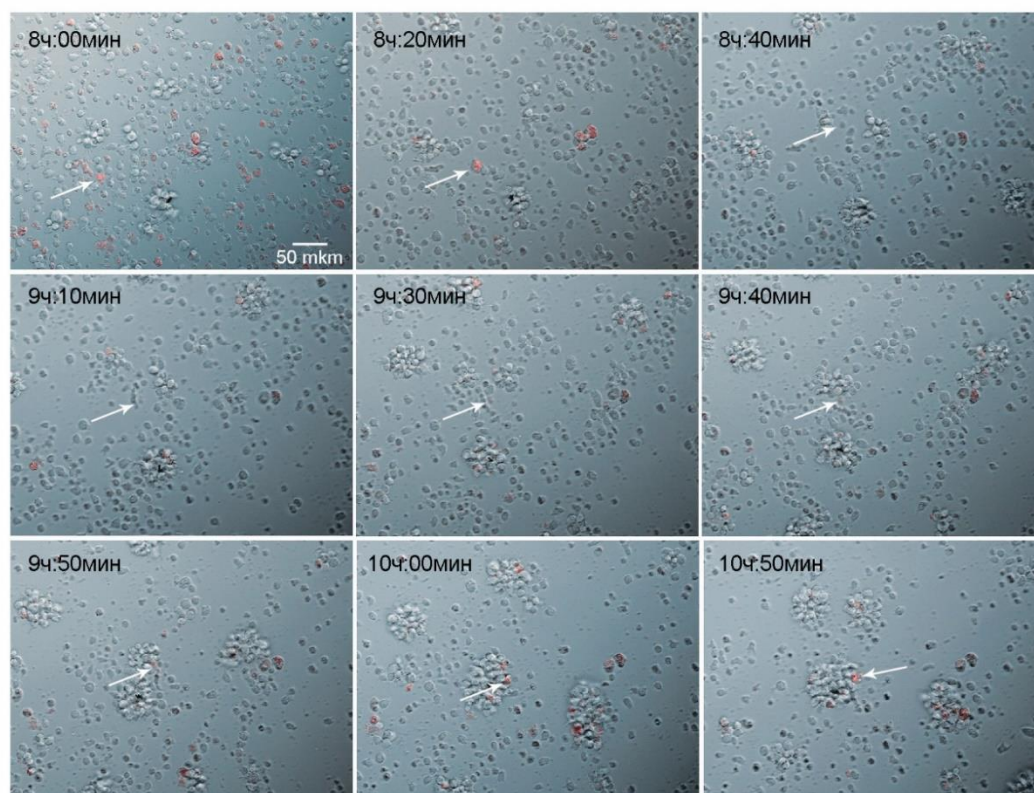


Рис. 21. Процесс формирования вторичных сфер, полученных из исходных диспергированных клеток культуры ВЭБ-индуцированной В-лимфомы. Стрелкой отмечена клетка, содержащая сигнал TAMRA, которая вместе с группой TAMRA– клеток формирует сферообразующий центр. На снимках «8ч 40мин», «9ч 10мин», «9ч 30мин», «9ч 40мин» клетка изменила месторасположение и находится вне фокуса. На изображении «9ч 50мин» наблюдаемая клетка объединилась с группой TAMRA– клеток. Снимки «10ч 00мин» и «10ч 50мин» демонстрируют сформированную вторичную сферу, содержащую TAMRA+ клетку. На рисунках приведено время с момента добавления TAMRA-ДНК зонда в околочлеточную среду.

На **Рисунке 21** показана динамика сборки сфер в виде последовательных снимков. Отмечается, что первоначально несколько (до 10) клеток, не обладающих способностью интернализировать TAMRA-ДНК зонд, образуют агрегат. После этого к ним (или они) подходит TAMRA+ клетка, и начинается активный этап сборки сферы.

Также участие TAMRA+ клеток в процессе сферообразования было продемонстрировано следующим способом. Клетки ВЭБ-индуцированной В-лимфомы были проинкубированы с TAMRA-ДНК зондом, далее TAMRA+ и TAMRA– клетки были отсортированы на проточном цитометре на две независимые популяции. В лунки 46-луночного планшета были нанесены клетки (150 тыс./500 мкл питательной среды с добавлением 10 % FBS и гентамицина): контроль (суммарная популяция клеток после инкубирования с экстраклеточной ДНК (TAMRA-ДНК зонд), пропущенная через проточный цитометр); «TAMRA–» (клетки, не интернализирующие дцДНК зонд); «TAMRA–» + ×1 «TAMRA+» (к популяции «TAMRA–» были добавлены отсортированные «TAMRA+» клетки до 6 %); «TAMRA–» + ×5 «TAMRA+» (к популяции «TAMRA–» клеток были добавлены отсортированные «TAMRA+» клетки до 30 %, то есть с пятикратным увеличением относительно исходной клеточной культуры). При помощи системы автоматизированной микроскопии живых клеток лунки планшета фотографировали каждый час в течение 17 часов (клетки находились при 37 °C и в 5 % атмосфере CO₂) (**Рисунок 22**).

Во всех группах, где присутствуют TAMRA+ клетки, сборка сфер начинается уже через два часа после ресуспендирования. В группе TAMRA– этот процесс значительно удлиняется – сборка сфер начинается только через 8 часов.

Образование сфероагрегатов в популяции TAMRA– клеток можно объяснить либо присутствием остаточных TAMRA+ клеток в культуре, либо тем, что CD90+ клетки, также присутствующие в культуре, в отсутствие TAMRA+ клеток принимают на себя роль сферообразующих «единиц». Тем не менее очевидно, что количество присутствующих TAMRA+ клеток влияет на скорость процесса сферообразования, следовательно, указанные клетки принимают участие в этом процессе, частично или полностью являясь сферообразующим центром.

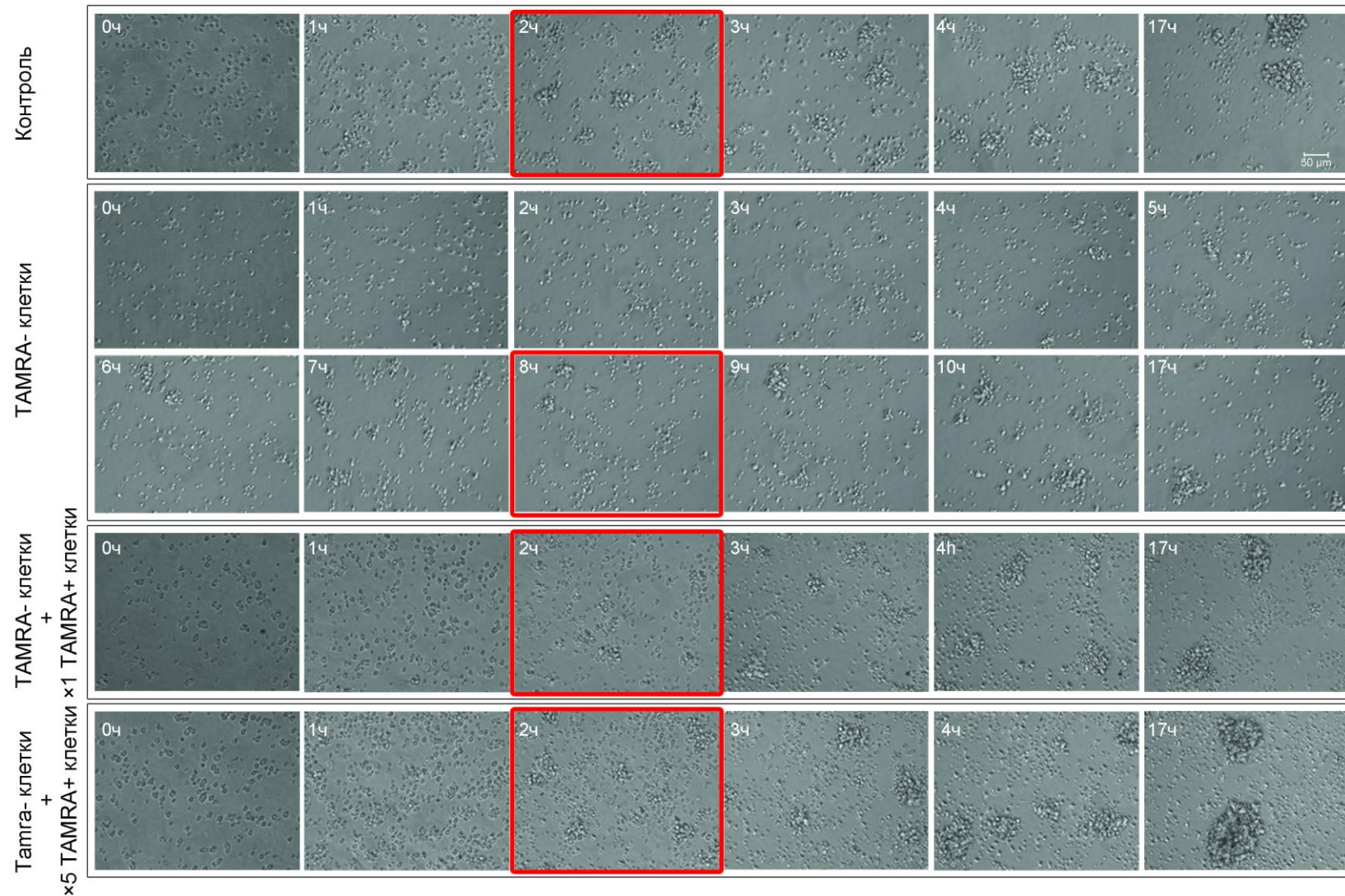


Рис. 22. Варианты агрегации клеток ВЭБ-индуцированной В-лимфомы через 17 часов культивирования после сортировки на TAMRA– и TAMRA+ популяции.

Дополнительно с использованием сортировки клеток (FACS) было проведено моноклонирование TAMRA+ и TAMRA– клеток В-лимфомы с последующим анализом их способности формировать клоны и возобновлять рост культуры. Эксперимент выполнен в двух независимых повторах. Установлено, что в популяции TAMRA+ клеток шесть из 96 клеток образовали сферу из единичной клетки, при этом две из них дали начало культуре с исходными свойствами. Во втором эксперименте клонообразование наблюдали для двух из 96 TAMRA+ клеток. В популяции TAMRA– клеток образования устойчивых клонов не зарегистрировано ни в одном из экспериментов ($n = 96$ в каждом; $p < 0.01$, критерий χ^2).

Таким образом показано, что TAMRA+ клетки в исследуемой культуре В-лимфомы имеют клоногенные свойства: способны восстанавливать популяцию клеток из единичной клетки и играют роль в процессе образования сфер, являясь сфероорганизующей единицей.

(3) Оценка продукции цитокинов TAMRA+ клетками

Сферы, как известно, состоят из небольшого количества ОСК, окруженных дифференцированными клетками, и представляют собой аналог стволовой ниши. Одним из вариантов для привлечения клеток, чтобы сформировать вокруг себя микроокружение (нишу), у ОСК является секреция определенного спектра хемоаттрактантов (хемокины, цитокины).

На следующем этапе работы была проведена оценка продукции цитокинов клетками сфер (Таблица 7). Для анализа продукции цитокинов клетки В-лимфомы, обработанные в различных вариантах (раздел 2.17), в количестве 50 тыс. клеток на лунку инкубировали в среде α МЕМ, содержащей 10 % FBS, в атмосфере CO₂ в течение 24 часов. Супернатант отделяли центрифугированием и количество цитокинов определяли в тест системе 27-Plex. В каждой группе было проанализировано по три образца.

Сравнивалась продукция цитокинов объединенной популяцией клеток сфер после инкубации с TAMRA-ДНК зондом и TAMRA-негативных клеток сфер. При этом первый образец, также как и второй, был проведен через процедуру FACS-процессинга. Такой подход позволял сравнить продукцию цитокинов клетками сфер, освобожденных от действия TAMRA+ клеток, и объединенной популяции сфероидных клеток. Это давало косвенную оценку влияния присутствия TAMRA+ клеток В-лимфомы на продукцию цитокинов сферами. Прямая оценка продукции цитокинов TAMRA+ клетками оказалась невыполнимой в связи с технической невозможностью отбора требуемого количества клеток.

Таблица 7. Анализ продукции цитокинов клетками сфер ВЭБ-индуцированной В-лимфомы.

Группа цитокинов	Цитокин	Продукция цитокинов (пг/мл)			
		Клетки сфер В-лимфомы после процедуры FACS			
		*	TAMRA+ и TAMRA– клетки	Только TAMRA– клетки	Эффект
Про- и противовоспалительные	IL-1 β	2	19	21	Без изменений
	TNF- α	8	< 8	47	↑ 5.8 раз
	IL1-ra	17	14	118	↑ 8.4 раза
	IL-10	9	24.2	23.4	Без изменений
Иммунно-регуляторные (Th1, Th2, Th9, Th17)	IL-2	2	< 2	< 2	Н/Д
	IFN- γ	20	< 20	< 20	Н/Д
	IL-12	2	< 2	4.3	Н/Д
	IL-4	2	12	25	↑ 2 раза
	IL-5	5	< 5	< 5	Н/Д
	IL-6	7	< 7	< 7	Н/Д
	IL-9	6	< 6	10.7	↑ 1.8 раза
	IL-13	2	5	5	Без изменений
	IL-15	3	4.1	< 3	Н/Д
	IL-17A	3	3.3	< 3	Н/Д
Ростовые факторы	G-CSF	2	< 2	< 2	Н/Д
	GM-CSF	2	< 2	< 2	Н/Д
	IL-7	3	< 3	19	↑ 6.3 раза
	FGF-b	4	< 4	4.8	Н/Д
	PDGF	4	< 4	8	↑ 2 раза
	VEGF	4	< 4	4.7	Н/Д
СХС- и СС-хемокины	IL-8	3	85	72	Без изменений
	IP-10	5	64	< 5	↓ 12.8 раз
	MCP-1	10	40	19.4	↓ 2 раза
	MIP-1 α	4	1 022	1 193	Без изменений
	MIP-1 β	4	3 444	4 052	Без изменений
	Rantes	8	637	793	Без изменений
	Eotaxin	10	< 10	< 10	Без изменений

* - минимальный порог чувствительности системы 27-Plex; Н/Д – не детектируется; Без изменений – эффект $\pm$ 20 %.

Удаление из общей популяции TAMRA+ клеток приводит к выраженному изменению профиля секретируемых цитокинов (Таблица 7). В частности, регистрируется 6–8-кратное увеличение уровня продукции TNF- α и IL-1ra, хотя синтез других про- и противовоспалительных цитокинов существенно не меняется (IL-1 β и IL-10, соответственно). 2-кратно возрастает продукция IL-4 и IL-9, относящихся к группе иммунорегуляторных

Th2/Th9 цитокинов, а также ростовых факторов (IL-7 – 6-кратно и PDGF – 2-кратно). Несмотря на относительно низкие абсолютные значения концентраций этих медиаторов (пг/мл), изменение уровня их секреции отчетливо детектировалось.

(4) Оценка опухолевых свойств TAMRA+ клеток

Для оценки опухолевого потенциала TAMRA+ клеток ВЭБ-индуцированной В-лимфомы было проведено три эксперимента по трансплантации клеток иммунодефицитным мышам. Диспергированные сферы были проинкубированы с TAMRA-ДНК зондом в течение 1 часа и отсортированы на проточном цитометре.

Первая трансплантация была выполнена внутривенно. Было сформировано три группы животных (самки мышей линии SCID): контроль без инъекции ($n = 3$), мыши, которым переливали отсортированные TAMRA+ клетки ($n = 5$), мыши, которым переливали TAMRA– клетки ($n = 5$). Внутривенно было перелито по 1 860 клеток каждой популяции.

Во втором случае мышам линии SCID подкожно было перелито по 2 250 отсортированных TAMRA+ клеток ($n = 7$). Контрольным мышам было перелито 10-кратное количество TAMRA– клеток (20 000) ($n = 8$).

В обоих описанных экспериментах развития графтов у экспериментальных животных детектировано не было. Отсутствие признаков заболевания было непонятным. Ожидалось, что TAMRA+ клетки, обладающие перечисленными выше характеристиками, являются ОСК, которые должны давать трансплантат при их выделении и трансплантации в качестве индивидуальной популяции. Тем не менее, разобщенные от сфер и сортированные TAMRA+ клетки не дали жизнеспособного графта. Поскольку было обнаружено выраженное цитокиновое взаимодействие между клетками сфер, было выдвинуто предположение, что дать начало новой опухоли может только сфера как единое целое, где, как предполагается, присутствуют как клоногенные клетки, включая TAMRA+ клетки, так и окружающие их клетки, несущие предположительно стромальную нагрузку. Кроме этого анализ литературных данных свидетельствовал, что для успешной трансплантации в случае лимфопролиферативных заболеваний требуется не менее 500 000 клоногенных клеток и стромальная предподготовка (Hosen, 2013; Matsui et al., 2004).

В третьем эксперименте была проведена подкожная трансплантация целых сфер и TAMRA– клеток. Было перелито суммарно 1 000 000 клеток, из которых TAMRA+ клетки составляли ~1–2 % (15 000–30 000 TAMRA+ клеток). Через 49 суток у одной из четырех мышей, которым прививали сферы, развился полноценный графт. Ни у одной из мышей с перелитыми TAMRA– клетками графт не развился ($n = 4$) (**Рисунок 23 А**).

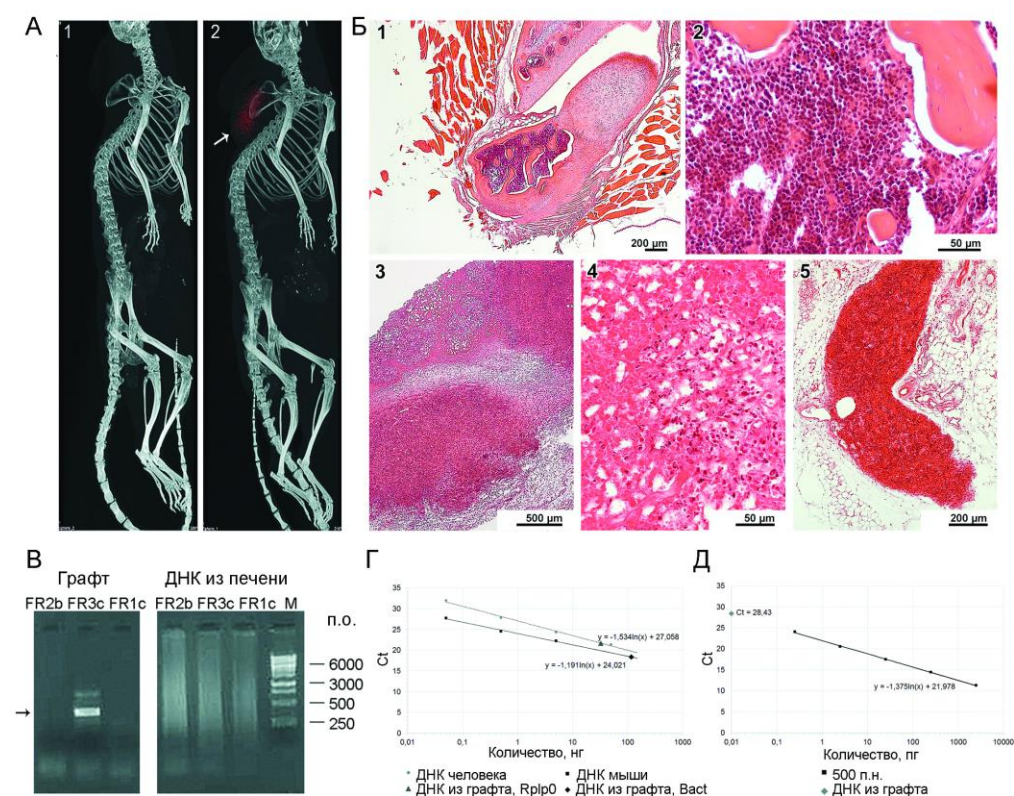


Рис. 23. Анализ ксенотрансплантата, выросшего у SCID мыши при перевивке сфер ВЭБ-индуцированной В-лимфомы человека. **А)** Компьютерная томограмма SCID мышей. 1 – Перевивка TAMRA– клеток. 2 – Перевивка клеток в виде сфероагрегатов, содержащих в своем составе 1–2 % TAMRA+ клеток. Подкожно перевитая опухоль обозначена красным цветом и стрелкой. **Б)** Патоморфологический анализ фрагментов костей, тканей и органов животного. 1 – Костно-хрящевое соединение, окруженное мышечными волокнами. Патоморфологических изменений нет. 2 – Костный мозг нормального клеточного состава. 3 – Некротизированный опухолевый конгломерат. 4 – Множество нейтрофильных гранулоцитов, эритроциты и клеточный детрит в очаге некроза опухоли. 5 – Опухолевый очаг среди жировой ткани. Видны многочисленные кровеносные сосуды со свободными просветами. Воспалительная реакция отсутствует. **В)** ПЦР с тремя наборами вырожденных праймеров (JH в каждом случае и FR2b, FR3c, FR1c) на константные участки VDJ-локуса с ДНК, выделенной из опухолевого трансплантата; на правой панели приведен электрофорез ПЦР-продуктов с ДНК, выделенной из печени мышей линии CBA/Lac. Наличие фрагмента говорит о присутствии множества одинаковых В-клонов в образце ДНК. **Г)** qPCR с ДНК, выделенной из опухолевого трансплантата. На графике приведены калибровочные кривые для ДНК человека (RPLP0 праймеры, суммарная ДНК человека в качестве матрицы) и ДНК мыши (Ptger2 праймеры, ДНК из клеток костного мозга мышей в качестве матрицы). Точками на калибровочных кривых обозначено количественное содержание ДНК человеческого и мышинного происхождения в опухолевом трансплантате. **Д)** Количественное определение копий В-клона в ДНК, выделенной из опухолевого трансплантата методом qPCR. Калибровочная кривая получена при помощи раститровки ДНК В-клона (500 п.н.) и праймеров JH/FR3c. Точкой обозначено количество В-клонов в исследуемой ДНК, посчитанное при помощи формулы наклона калибровочной кривой.

Чтобы выявить клинические признаки заболевания, в том числе возможность проявления признаков исходного заболевания пациента (ММ), из костного мозга которого была получена культура клеток, у мыши с индуцированным ксенографтом был проведен патоморфологический анализ тканей, частей скелета и некоторых органов. Результаты проведенного анализа представлены на **Рисунке 23 Б**.

Наиболее характерным патологическим проявлением ММ является формирование комплекса симптомов CRAB, из них наиболее значимым – форматный лизис костной ткани (Dowling, Kelly, Meenaghan, 2016). Проведенный анализ образцов, содержащих костно-хрящевые образования (общим числом 11), выявил присутствие опухолевой ткани в трех из них. В двух случаях обнаруживаются крупные очаги опухолевого роста в окружении мышечной и жировой ткани, кровеносных сосудов. В обоих случаях процесс сопровождался некрозом опухолевых узлов (в одном из препаратов наблюдалось ярко выраженное воспаление с обильной полиморфноклеточной инфильтрацией). Вместе с тем несколько в стороне, среди жировой клетчатки, наблюдались интактные очаги опухолевого роста без каких-либо признаков некроза и воспалительной реакции. В третьем образце опухолевые клетки были диффузно распределены среди костей, хрящей, мышц и жировой клетчатки. Признаков их инвазии в костную и хрящевую ткани при этом не выявлялось. Отсутствие интеграции раковых клеток в костную ткань и видимое отсутствие патологического лизиса костных и хрящевых структур не является характерным для развития и клинического проявления ММ. При подкожной прививке опухолевая клетка лишена возможности немедленной экспансии в костномозговое пространство, а при достижении костно-мозговых компартментов не имеет стромальной поддержки. Следствием этих причин является заселение опухолевыми клетками не костномозговых ниш, а наиболее благоприятных для выживания не свойственных В-лимфоме анатомических структур организма. Результаты патоморфологического анализа подтвердили, что перевиваемая культура клеток не является ММ, а представляет собой другую форму В-клеточной лимфомы.

Материал выросшего графта был проверен на наличие клонотипических В-клеток, которые были выявлены в перевиваемой культуре ВЭБ-индуцированной В-лимфомы человека. Были проведены аналогичные для культуры клеток (раздел 3.3.2.1) эксперименты по секвенированию перестроенного VDJ-локуса (последовательности предоставляются по официальному запросу в Ученый совет ИЦиГ СО РАН или Дирекцию ИЦиГ СО РАН). Кроме того, в графте была проведена количественная оценка содержания ДНК мышиноного и человеческого происхождения.

Содержание ДНК мыши и человека в графте оценивали с помощью qPCR с использованием видоспецифичных праймеров для генов домашнего хозяйства (ген *Ptger2* мыши и ген *RPLP0* человека) (**Рисунок 23 Г, Д**). Оказалось, что в материале ДНК, выделенной из опухолевого трансплантата, присутствует $38.1 \pm 14 \%$ человеческой ДНК и $61.9 \pm 14 \%$ мышинной ДНК (Mean $\pm$ SD, $n = 6$). Показано, что в 100 нг ДНК, выделенной из ксенографта содержится 0.009 пг ДНК В-клона. Расчет количества клеток, несущих реорганизованный VDJ-локус, проводился аналогично тому, как это было сделано для культуры клеток. Оказалось, что клонотипические В-клетки составляют $\sim 71 \%$ от рассчитанного общего количества клеток. Проведенная комплексная оценка предполагает, что человеческий материал ксенографта, скорее всего, представлен исключительно клонотипическими В-клетками. Секвенирование показало, что последовательность VDJ-локуса гомологична клонотипическим клеткам перевиваемой культуры В-лимфомы, а значит экспериментальная опухоль действительно является солидным трансплантатом В-лимфомы человека.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии клоногенных свойств у TAMRA+ клеток свободноплавающих сфер ВЭБ-индуцированной В-лимфомы человека. При этом у TAMRA– клеток отсутствуют как клоногенные свойства, так и способность образовывать графт. Для возможности роста трансплантата перевиваемые клетки должны содержать TAMRA+ клетки, находящиеся в составе сфер. По-видимому, наличие TAMRA– клеток обеспечивает стромальную поддержку TAMRA+ клеткам. В случае лимфопролиферативных заболеваний стромальная поддержка является необходимым условием как пролиферации опухолевых клеток, так и их успешной перевивки (Bogun et al., 2024; Hoferkova et al., 2024).

3.3.2.4. Поиск генов-кандидатов, доказывающих стволовую природу TAMRA+ клеток ВЭБ-индуцированной В-лимфомы, методом RNAseq. Верификация их экспрессии методом qPCR

Для молекулярного подтверждения принадлежности TAMRA+ клеток ВЭБ-индуцированной В-лимфомы к ОСК была оценена дифференциальная экспрессия мРНК генов, ассоциированных с сигнальными путями, характерными для ОСК (в сравнении с TAMRA– клетками).

Как и в случае модели Кребс-2, гены были разделены на функциональные группы, отвечающие за различные характеристики ОСК. Указанные функциональные группы были разделены на две категории: (1) гены «стволовости», кодирующие белки, участвующие в сигнальных каскадах, отвечающих за самообновление, формирование и поддержание низкодифференцированного состояния, ЭМП; (2) гены «раковости», отвечающие за антиапоптотические свойства, МЛУ, эффект Варбурга и иммуносупрессию. При анализе результатов RNAseq были отобраны гены каждой из обозначенных групп для TAMRA+/-

клеток. Принадлежность этих генов к сигнальным каскадам, характеризующих «стволовые» свойства опухолевых клеток, была независимо и достоверно подтверждена биоинформационным анализом в базе данных [STRING: functionalproteinassociationnetworks \(string-db.org\)](http://string-db.org).

По данным RNAseq из трех функциональных групп, характеризующих свойства симметричного/асимметричного деления, формирования и поддержания низкодифференцированного состояния, ЭМП, были выбраны гены, для которых, как для наиболее основополагающих в формировании свойств ОСК, далее был проведен валидирующий qPCR. Для статистической достоверности каждый анализ был повторен как минимум трижды. Следует отметить, что каждый анализ проводился независимо от предыдущего, то есть для каждого анализа культуру клеток независимо от предыдущего эксперимента обрабатывали дцДНК зондом, проводили сортировку клеток на TAMRA+ и TAMRA– популяции, выделяли мРНК, с которой синтезировали кДНК для последующего qPCR. Если разницы в синтезе мРНК не детектировалось, повторно qPCR не проводился. Анализ генов, принадлежащих ко второй категории (отвечающих за «раковые» свойства) был проведен на основании данных RNAseq и анализа в базе данных STRING.

Данные RNAseq и qPCR (где это было выполнено) по соотношению экспрессии основных генов, принимающих участие в обозначенных функциональных группах, в TAMRA+ и TAMRA– клетках ВЭБ-индуцированной В-лимфомы суммированы в **Приложении 2, Таблице 3.**

Гены, отвечающие за «стволовые» свойства опухолевых клеток

Во-первых, это сигнальные пути, контролирующие симметричное/асимметричное деление. Результаты RNAseq-анализа свидетельствовали, что в TAMRA+ клетках повышена экспрессия генов Wnt-сигнального каскада: Wnt-лигандов, транскрипционных факторов, активирующих транскрипцию таргетных генов, и некоторых таргетных генов. Снижена экспрессия рецепторов FZD и LRP и генов, кодирующих ингибиторы канонического Wnt-сигнального пути. Биоинформационный анализ баз данных демонстрирует тот факт, что выделенные в анализируемую группу факторы образуют сеть взаимодействий, характерную для Wnt-сигнального каскада. По данным qPCR в TAMRA+ клетках повышена экспрессия Wnt-лиганда WNT5a, рецепторов FZD5 и FZD7 и транскрипционных факторов TCF3, LEF1, активирующих транскрипцию таргетных генов Wnt-сигнального пути ($p < 0.05$) (**Рисунок 24 А; Приложение 2, Таблица 3**).

Во-вторых, это сигнальные пути и гены, отвечающие за поддержание низкодифференцированного состояния. В первую очередь, это набор генов, связанные с

циклом метаболизма ретиноевой кислоты. Результаты RNAseq показали, что в TAMRA+ клетках, по сравнению с TAMRA–, снижена экспрессия рецепторов ретиноевой кислоты RARA, RXRA и ферментов, отвечающих за превращение ретинола в ретиноевую кислоту LRAT, RDH10, ALDH1A3. В то время как экспрессия фермента CYP26A1, ответственного за деградацию ретиноевой кислоты, значительно повышена. Биоинформационный анализ баз данных свидетельствует, что выделенные в анализируемую группу факторы образуют сеть взаимодействий, характерную для сигнального каскада ретиноевой кислоты. По данным qPCR экспрессия рецепторов и ферментов, участвующих в биосинтезе ретиноевой кислоты и ее деградации, повышена в TAMRA+ клетках относительно TAMRA– ($p < 0.05$) (Рисунок 24 Б; Приложение 2, Таблица 3).

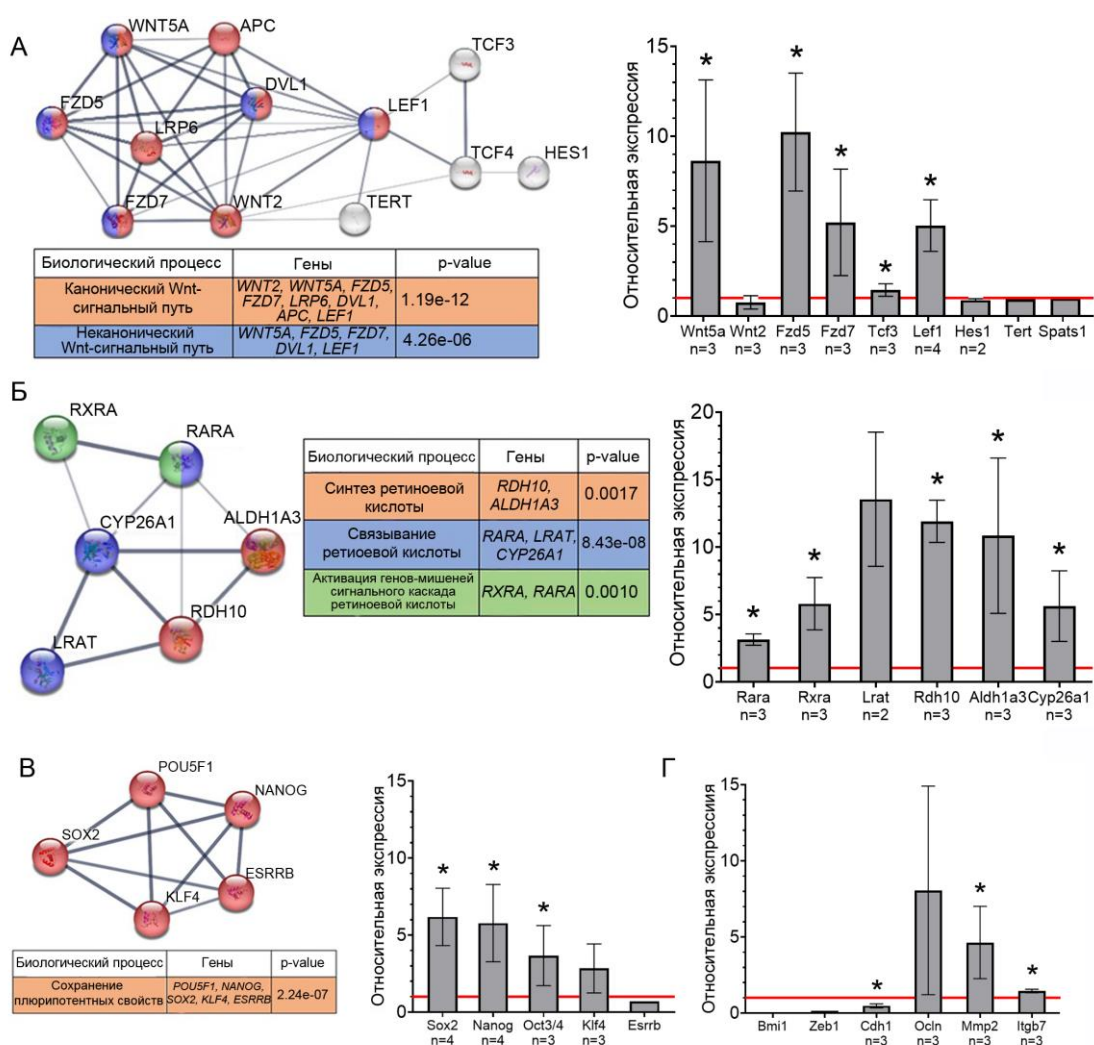


Рис. 24. Анализ экспрессии генов в TAMRA+ клетках ВЭБ-индуцированной В-лимфомы в сравнении с TAMRA– клетками. На рисунке приведены схематичные изображения белковых взаимодействий, биологические процессы, связанные с ними, и относительная экспрессия генов, кодирующих эти белки, по результатам qPCR. **А)** Wnt-сигнальный путь. **Б)** Каскад ретиноевой кислоты. **В)** Транскрипционные факторы, связанные с поддержанием низкодифференцированного состояния. **Г)** ЭМП. * $p < 0.05$, критерий Манна-Уитни.

Также методом qPCR были проанализированы уровни синтеза мРНК генов нескольких транскрипционных факторов, отвечающих за низкодифференцированный статус стволовой опухолевой клетки, таких как SOX2, NANOG, OCT-3/4 и KLF4 (Aminietal., 2014; VanSchaijketal., 2018). Указанные гены по результатам RNAseq-анализа попали в список генов, активных в анализируемых клетках. В этой связи эффективность синтеза мРНК этих генов требовала экспериментальной оценки. Биоинформационный анализ баз данных свидетельствует, что анализируемая группа транскрипционных факторов образует функциональную сеть, характерную для поддержания низкодифференцированного состояния стволовых клеток. Для достоверной оценки уровня экспрессии указанных транскрипционных факторов был проведен qPCR, валидирующий результаты RNAseq. Результаты qPCR показали, что в TAMRA+ клетках повышена экспрессия генов SOX2, NANOG, OCT-3/4 ($p < 0.05$) и есть тенденция к повышению KLF4 (**Рисунок 24 В; Приложение 2, Таблица 3**).

Была проанализирована платформа генов, отвечающая за ЭМП, как одну из базовых функций ОСК. По данным RNAseq в TAMRA+ клетках незначительно менялась экспрессия генов транскрипционных факторов BMI1, LEF1, ZEB1 и TWIST, генов белков, обеспечивающих апико-базальную полярность клетки, а также Е-кадгерина (ген CDH1), окклюдина и Rho-ГТФаз. В TAMRA+ клетках снижена экспрессия транскрипционных факторов BMI1 и ZEB1, а также Е-кадгерина. И повышена экспрессия окклюдина, металлопротеиназы MMP-2 и интегрин- β 7 (**Рисунок 24 Г; Приложение 2, Таблица 3**). ЭМП – это приобретение ОСК набора специфических свойств, позволяющих ей менять свое местонахождение в организме вне зависимости от множества контролирующих систем. Каждое из этих свойств поддерживается активностью определенного сигнального пути. Проведенный анализ показал, что биоинформационная сеть взаимодействий белков этого биологического процесса громоздкая и лишена главного назначения – демонстрации функциональной связи анализируемых факторов. В этой связи для ЭМП биоинформационный анализ баз данных не проводился.

Гены, отвечающие за «раковые» свойства ОСК

Во-первых, это сигнальные пути, отвечающие за антиапоптотические свойства клеток. По данным RNAseq экспрессия генов, связанных с индукцией апоптоза, различна в TAMRA+ и TAMRA– клетках. В обеих популяциях клеток повышена экспрессия одних ингибиторов апоптоза, а других – снижена. В TAMRA+ клетках также снижена экспрессия основных сигнальных (CASP8, CASP9) и эффекторных каспаз (CASP3, CASP7) (**Приложение 2, Таблица 3**). Скорее всего, в обоих типах клеток нарушены определенные механизмы апоптоза, что типично для любой формы опухолевых клеток. Биоинформационный анализ баз

данных свидетельствует, что анализируемая группа факторов образует функциональную сеть, связанную с индукцией апоптоза и контролем клеточного цикла.

Во-вторых, это гены, обеспечивающие иммуносупрессивную функцию. По данным RNAseq в TAMRA+ клетках незначительно (в рамках ошибки) снижена экспрессия некоторых ингибиторов эффекторных Т-лимфоцитов, таких как IL-10, IL-6, TGF- β 1, CCL22, CD274 и IDO1. Повышена экспрессия ингибитора Т-лимфоцитов CD200 и главного комплекса гистосовместимости класса-I,-G, обладающего иммуносупрессивной функцией (**Приложение 2, Таблица 3**). Биоинформационный анализ баз данных демонстрирует тот факт, что выделенные в анализируемую группу факторы образуют сеть взаимодействий, характерную для модуляции иммунного ответа организма.

В-третьих, в ОСК изменена экспрессия генов общей метаболической активности. По данным RNAseq экспрессия митохондриальных генов снижена в TAMRA+ клетках относительно TAMRA-. Относительная экспрессия генов, ответственных за процесс гликолиза, также снижена в TAMRA+ клетках (*HIF-1a*, *MYC*, *SLC2A1*, *SLC2A3*). Это свидетельствует о более низком уровне метаболической активности TAMRA+ клеток. Незначительно изменена транскрипционная активность генов, отвечающих за наличие эффекта Варбурга или обратного эффекта Варбурга (**Приложение 2, Таблица 3**). Биоинформационный анализ баз данных свидетельствует, что выделенные в анализируемую группу факторы образуют сеть взаимодействий, объединяющих несколько метаболических путей получения энергии.

Наконец, были проанализированы гены, связанные со свойством МЛУ. По данным RNAseq в TAMRA+ клетках снижена экспрессия ABC-транспортеров, генов *BARD1* и *GSTK1*, а также рецептора SMO и белка-участника MAP-сигнального пути, MAPK8 (**Приложение 2, Таблица 3**). МЛУ, как и ЭМП, – это набор специфических свойств, позволяющих ОСК быть нечувствительной к разнообразным ксенобиотикам и воздействию радиации. Каждое из этих свойств поддерживается активностью определенного сигнального пути. Проведенный анализ показал, что биоинформационная сеть взаимодействий белков, определяющих МЛУ ОСК, громоздкая и не демонстрирует функциональной связи анализируемых факторов. По этой причине для МЛУ биоинформационный анализ баз данных не проводился.

Основными функциями, отвечающими требованиям ОСК, являются те, которые относятся к первому разделу исследования (свойства «стволовости»). Именно они определяют опухолевую клетку среди общей опухолевой массы, как «стволовую». Для групп этих генов был проведен валидирующий qPCR, как необходимое подтверждение результатов RNAseq. Гены, которые были отнесены ко второй категории («раковые» свойства), в меньшей степени

характеризуют ОСК, хотя их экспрессия зачастую также повышена в ОСК. Было принято решение, что в данном случае анализа методом RNAseq будет достаточно для подтверждения наличия у TAMRA+ клеток указанных свойств без предоставления валидирующего qPCR.

Суммарно данные, полученные в биологических тестах и RNAseq, дают возможность сделать заключение о том, что TAMRA+ клетки ВЭБ-индуцированной В-лимфомы обладают полным набором характеристик ОСК. Эти клетки обладают клоногенными свойствами и определяют независимую от CD34+, CD90+ и В-клона популяцию клеток культуры. Выделяя хемокины, TAMRA+ клетки являются сферообразующим звеном, необходимым для успешного формирования сферы. Кроме того, наличие TAMRA+ клеток является обязательным условием для перевивки опухоли, и только клетки с указанной характеристикой способны из единичной клетки возобновить рост исходной культуры. В TAMRA+ клетках повышена экспрессия генов, ответственных за поддержание низкодифференцированного состояния, МЛЮ и ЭМП, что является важнейшими характеристиками ОСК.

3.3.3. Заключение по первым двум частям исследования

Многочисленные исследования на ГСК мышей, литературные источники, а также результаты, описанные в первых двух главах настоящей работы, не оставляют сомнений, что фрагменты экстраклеточной дцДНК способны интернализироваться во внутренние компартменты низкодифференцированных клеток. Независимые эксперименты в биологических тестах, а также анализ транскриптома методами RNAseq и qPCR на двух модельных системах – карциноме мыши Кребс-2 и ВЭБ-индуцированной В-лимфоме человека – показали, что клетки, способные естественным механизмом интернализировать экстраклеточные фрагменты дцДНК, обладают широким спектром свойств, характерных для ОСК, и таковыми являются.

Указанное свойство ново и уникально. Наиболее интригующим является факт того, что низкодифференцированные клетки различного генеза (ГСК, мезенхимальные стволовые клетки, ОСК) обладают такой функцией. То есть, по-видимому, все эти типы клеток связывает какая-то особенность строения и/или физиологии, позволяющая интернализировать экстраклеточную ДНК естественным природным механизмом. В этой связи определение механизма интернализации являлось важным элементом, характеризующим весь процесс захвата и поглощения фрагментов экстраклеточной дцДНК опухолевой стволовой клеткой. Во-первых, в определении сути процесса кроется ключ к пониманию биологических особенностей ОСК. Во-вторых, это открывает широкие возможности для разработок таргетного воздействия на указанные клетки, как основные мишени противоопухолевой

терапии. Третий раздел главы результатов посвящен определению механизма интернализации экстраклеточной дцДНК в ОСК на примере двух выбранных моделей клеток.

3.4. Механизм интернализации фрагментов экстраклеточной ДНК на моделях опухолевых клеток Кребс-2 и ВЭБ-индуцированной В-лимфомы

3.4.1. Первичное взаимодействие TAMRA-ДНК зонда с поверхностью клеток Кребс-2 и ВЭБ-индуцированной В-лимфомы

При анализе интернализации TAMRA-ДНК зонда в ГСК было отмечено, что вокруг TAMRA+/CD34+ клеток происходит формирование «розетки» – структуры, представляющей собой геометрически собранные клеточные группы, в центре которых располагаются TAMRA+ (дцДНК зонд)/CD34+ стволовые гемопоэтические клетки (**Рисунок 25**).

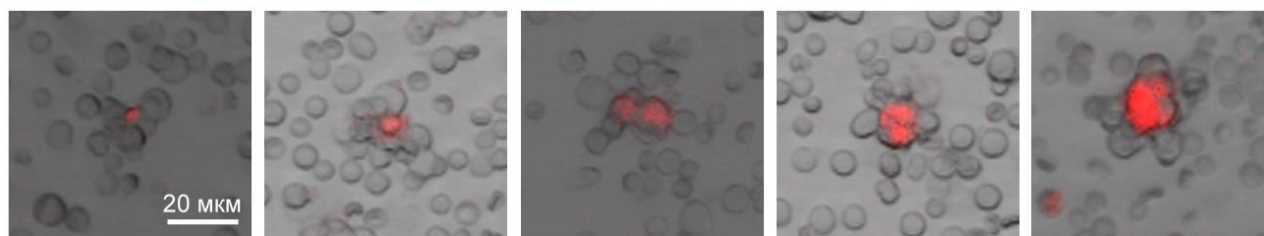


Рис. 25. Розетки костномозговых стромальных ниш, в центре которых находятся TAMRA+ клетки.

Такая геометрическая форма могла отражать события предформирования стволовой ниши, когда ГСК собирает вокруг себя клетки стромы. В настоящей работе на примере ВЭБ-индуцированной В-лимфомы показано, что TAMRA+ клетка является сферообразующим центром. Вокруг нее собирается сначала небольшая группа клеток, далее происходит формирование сфероподобной структуры (**Рисунок 21**). При цитологическом анализе сборки таких сфер не было замечено возможности механического передвижения клеток (образование псевдоподий).

Было сделано предположение, что физической основой первичного контакта стволовой клетки и стромальных клеток сопровождения является *положительный заряд мембраны стволовой клетки* и отрицательный заряд клеток стромы. Такое взаимодействие представляло бы собой эффективный, не требующий энергетических затрат механизм, определяющий первичную группировку клеток стромы вокруг стволовых клеток. Далее, после формирования первичного ниша/сфера-образующего центра, стволовая клетка за счет секреции хемокинов и экспрессии факторов мембраны удерживает ассоциированные в

первичное окружение клетки и дополнительно привлекает другие клетки стромы в сайт формирующейся ниши.

Общепринятым считается, что эукариотическая клетка имеет отрицательный заряд своей мембраны, что обусловлено мембранно-связанными гликопротеинами и ассоциированными с ними остатками сиаловой кислоты. Тем не менее, на основании предварительных наблюдений и полученных экспериментальных данных было сделано предположение, что стволовые клетки (любого происхождения, включая ОСК), обладают биологической особенностью, отличающей их от других типов клеток, позволяющей взаимодействовать с отрицательно заряженной молекулой дцДНК, а именно, положительным зарядом клеточной поверхности (*клеточной мембраны/гликокаликса*). Для определения элементов процесса взаимодействия с факторами поверхности клетки дцДНК зонда: а) была проведена серия электрофорезов в свободном объеме; б) оценен заряд («+»/«-») клеток, связывающих дцДНК зонд, с использованием специфического положительно заряженного красителя.

3.4.1.1. *Определение заряда клеток карциномы Кребс-2 и В-лимфомы, с которыми взаимодействует TAMRA-ДНК зонд*

Для определения заряда клеток, интернализирующих дцДНК зонд, впервые был использован метод электрофоретического разделения клеток в свободном объеме, при котором происходила частичная разнонаправленная миграция разнозаряженных клеток. После завершения электрофоретического разделения клетки отбирали из зон, соответствующих положительному («+») и отрицательному («-») полюсам, и обрабатывали TAMRA-ДНК зондом. Количество TAMRA+ клеток оценивали микроскопическим или FACS-анализом.

Для клеток карциномы Кребс-2 было проведено девять независимых экспериментов. Оказалось, что доля TAMRA+ клеток в катодной области («-») всегда была выше, чем в анодной («+») – 13.5 % против 1.65 %, $p < 0.05$ (**Рисунок 26 А**). Этот факт означал, что клетки, потентные связывать TAMRA-ДНК зонд, мигрирующие в ходе электрофореза в направлении катода, имеют общий положительный заряд.

Полного перемещения всех положительно заряженных клеток к отрицательному полюсу достигнуто не было. Теоретическая платформа, демонстрирующая условия, возникающие при электрофоретическом разделении клеток в свободном объеме, противоречива и дискутируется в работах по коллоидной химии (Evstratov, 2005; Golovanov, 1998; Liang et al., 2014). В настоящей работе анализируются исключительно результаты проведенных экспериментов без глубокого анализа сути физических явлений. Тем не менее

ниже приведены некоторые соображения, характеризующие условия, возникающие при электрофорезе в свободном объеме, препятствующие полному расхождению клеток с различным поверхностным зарядом к полюсам электрофоретической камеры.

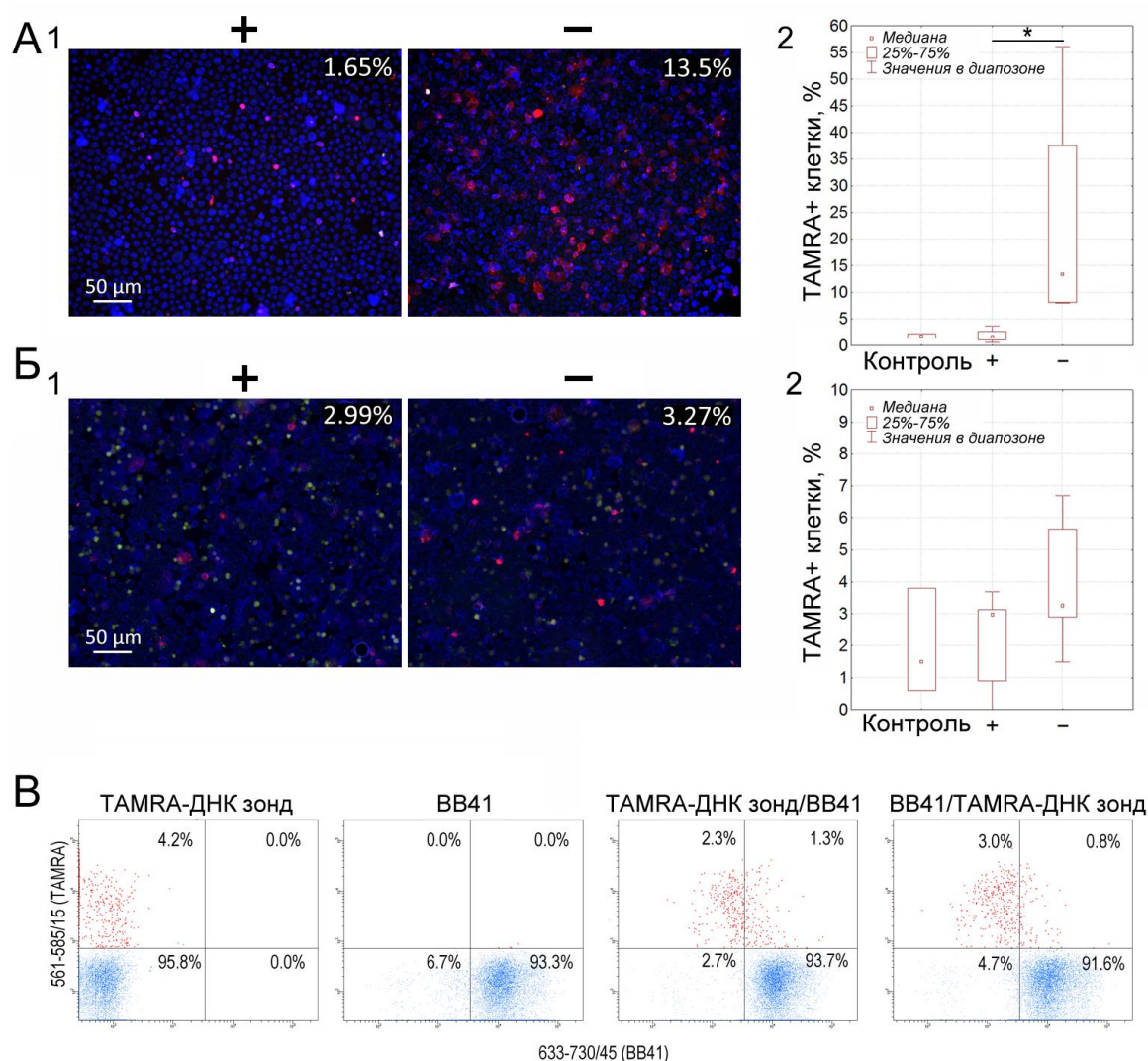


Рис. 26. Определение суммарного заряда клеток, интернализирующих ТАМРА-ДНК зонд. **А)** Карцинома Кребс-2. **Б)** ВЭБ-индуцированная В-лимфома. 1 – Флуоресцентный микроскопический анализ клеток, выделенных из двух частей электрофоретической камеры (герметично закрытый диализный пакет) с противоположным зарядом «+/-», обработанных ТАМРА-ДНК зондом. В верхнем правом углу указан процент клеток, захвативших меченый зонд. 2 – График, отображающий долю ТАМРА+ клеток в анодной «+» и катодной «-» частях камеры после электрофореза. Для Кребс-2 $n = 9$, для В-лимфомы $n = 4$, $*p < 0.05$, тест Манна-Уитни. **В)** FACS-анализ эффекта интернализации ТАМРА-ДНК зонда клетками Кребс-2 при смене последовательности добавления зонда и положительно заряженного красителя Basic Blue GRL 41.

Известно, что при движении молекулы, или как в данном случае целой клетки, в электрическом поле подвижность заряженного объекта зависит от заряда, силы сопротивления

среды и характера растворителя, который сам, чаще всего, является электролитом. В этих условиях вокруг заряженного объекта образуется ионная атмосфера, и он оказывается окруженным диффузным облаком противоионов. Присутствие ионной атмосферы вокруг заряженного объекта приводит к уменьшению его электрофоретической подвижности. Это обусловлено несколькими обстоятельствами. Во-первых, облако противоионов частично экранирует заряд самого объекта и, как следствие, ослабляет действие на него электрического поля. Во-вторых, само облако противоионов, обладая противоположным по отношению к заряженному объекту зарядом, будет взаимодействовать с электрическим полем и смещаться в противоположную сторону, тормозя его движение. Это явление называют электрофоретическим трением. В-третьих, при движении заряженного объекта отдельные ионы вокруг него тоже непрерывно перемещаются, то приближаясь, то удаляясь. Вследствие этого в ионной атмосфере происходит непрерывное замещение ионов. Для вновь входящих ионов требуется время, чтобы найти свое место в поле объекта и прийти в равновесие с его окружением, что приводит к нарушению сферически симметричной формы ионной атмосферы. В результате двойной электрический слой позади заряженного объекта растягивается и тормозит его движение. Это явление носит название релаксационного эффекта. В свете вышесказанного, макрофакторами, препятствующими полному электрофоретическому разделению разнозаряженных клеток, предположительно являются: быстрая нейтрализация заряда TAMRA⁺ клеток, растущий градиент ионов Na⁺ и Cl⁻ и связанное с ним истощение буферной емкости, а также увеличение локальной концентрации TAMRA⁻ клеток, имеющих отрицательный заряд поверхности.

Аналогично были проведены эксперименты по оценке распределения TAMRA⁺ клеток В-лимфомы после электрофореза в свободном объеме. Были получены совпадающие с культурой клеток Кребс-2 результаты. В большинстве экспериментальных электрофорезов к катоду двигалось большее количество TAMRA⁺ клеток по сравнению с перемещением к аноду. Однако в нескольких повторах эксперимента наблюдалось равномерное распределение TAMRA⁺ клеток по обеим частям электрофоретического объема, что снижало общепринятую достоверность результатов (3.27 % против 2.99 %, достоверной разницы в значениях нет) **(Рисунок 26 Б)**. Тем не менее полученные результаты свидетельствовали, что определенная часть TAMRA⁺ клеток В-лимфомы также имеет общий положительный заряд клеточной мембраны и мигрирует к катоду.

Также проверка предположения о том, что ОСК, интернализирующие дцДНК зонд, имеют общий положительный заряд клеточной мембраны, была проведена с помощью оценки

связывания дцДНК зонда с использованием пред- или постобработки клеток специфическим положительно заряженным красителем Basic Blue GRL 41 (BB41).

Идея эксперимента заключалась в том, что если связывание зависит от положительного заряда поверхности клетки или связано с иным фактором, присутствующим только на клетках с общим положительным зарядом, то при изменении последовательности добавления TAMRA-ДНК зонда и BB41 картина распределения меченого материала не изменится, и клетки будут находиться вне или частично вне облака окрашенных катионным красителем клеток. В противном случае будут наблюдаться достоверные видимые изменения в распределении меченых флуорохромным красителем и катионным красителем клеток.

Для начала была подобрана оптимальная концентрация красителя BB41, окрашивающая все клетки, имеющие отрицательный заряд (2.7 мг/мл BB41, 5×10^5 клеток в 500 мкл). Для культуры Кребс-2 было показано, что при изменении порядка обработки клеток двумя веществами расположение облаков клеток практически не меняется (3.6 ± 1.2 % TAMRA+ клеток в случае обработки сначала TAMRA-ДНК зондом, а потом красителем BB41 и 3.8 ± 0.9 % TAMRA+ клеток при использовании обратного порядка обработок, Mean $\pm$ SD, $n = 3$, статистически достоверной разницы нет) (**Рисунок 26 В**). Это подтверждает предположение, что взаимодействие дцДНК зонда происходит с клетками, имеющими «+» заряд поверхности, которые не окрашиваются BB41. Частичное перекрытие облаков BB41+ и TAMRA+ клеток можно объяснить тем, что распределение положительного заряда на TAMRA+ клетках не сплошное, а мозаичное, и перемежается с отрицательно заряженными участками, которые определяют окраску катионным красителем.

При FACS-анализе культуры клеток В-лимфомы выяснилось, что определенная часть клеток имеет выраженную автофлуоресценцию во всех каналах детекции. Несмотря на то, что мы постарались выставить границы субпопуляций в соответствующих квартилях графика так, чтобы отсечь автофлуоресцирующую популяцию и разграничить TAMRA+ и BB41+ клетки, общее распределение клеток не позволяло надежно отслеживать изменения, вызванные разнонаправленной обработкой TAMRA-ДНК зондом и BB41.

Проведенный анализ предполагает следующее. Для модели Кребс-2 *первым фактором взаимодействия* дцДНК с клеткой является ее *общий положительный заряд* или молекулярный элемент, присутствующий только на «+» клетке. Для ВЭБ-индуцированной В-лимфомы результаты, полученные в экспериментах по электрофоретическому разделению, также не противоречат предложенной концепции взаимодействия положительно заряженных ОСК с TAMRA-ДНК зондом.

3.4.1.2. Характеристика первичного взаимодействия фрагментов экстраклеточной ДНК с поверхностью клеток Кребс-2 и В-лимфомы

Электростатическое притягивание молекул экстраклеточной дцДНК к ОСК, имеющих общий положительный заряд клеточной мембраны, не может обеспечить непосредственно интернализацию фрагментов внутрь клетки, если только это не происходит путем пассивной диффузии сквозь клеточные поры. В связи с этим было необходимо определить, происходит ли последующее прочное (ковалентное) связывание фрагментов дцДНК с элементами клеточной мембраны ОСК.

Для ответа на этот вопрос был разработан экспериментальный дизайн, основой которого являлся клеточный микрогель-электрофорез. Предполагалось, что в зависимости от способа фиксации TAMRA-ДНК зонда на мембране клеток, в ходе электрофореза будет визуализировано изменение положения фрагментов ДНК, связанных с поверхностью клетки. Это позволит определить, зависит ли взаимодействие дцДНК только от заряда клетки или в связывании принимают участие другие факторы мембраны, определяющие химическое/молекулярное взаимодействие.

Были выбраны следующие параметры. Клетки Кребс-2 и В-лимфомы инкубировали с TAMRA-ДНК зондом до 5 мин и 60 мин. Электрофорез проводили либо в два этапа по 15 мин с визуализацией клеток на каждом этапе, либо 30 мин без промежуточной оценки. Были получены следующие результаты.

Для клеток Кребс-2 подвижность TAMRA-меченого ДНК-материала относительно клеточной поверхности зависела от времени инкубации. Для основной массы клеток после длительной инкубации с TAMRA-ДНК зондом (60 мин) и после проведенного фореза, меченый материал не менял своего расположения относительно исходного положения в клетке (**Рисунок 27 А-1**).

Для единичных клеток с вариантом длительного инкубирования с экстраклеточной ДНК (60 мин) показано полное «сдувание» TAMRA-меченого материала с клеточной поверхности, происходящее последовательно (**Рисунок 27 А-2**, клетка обозначена стрелкой). В случае короткого времени инкубирования с дцДНК зондом (3–5 мин) у подавляющего большинства TAMRA+ клеток обнаруживалось смещение TAMRA-меченого материала по поверхности клетки под воздействием внешнего электрического поля в направлении от минуса к плюсу. При этом формировался характерный серповидный рисунок (**Рисунок 27 А-3, 4**). Также в этом режиме у некоторых клеток часть TAMRA-материала смещалась, тогда как другая часть сохраняла свое положение внутри клетки (**Рисунок 27 А-3**).

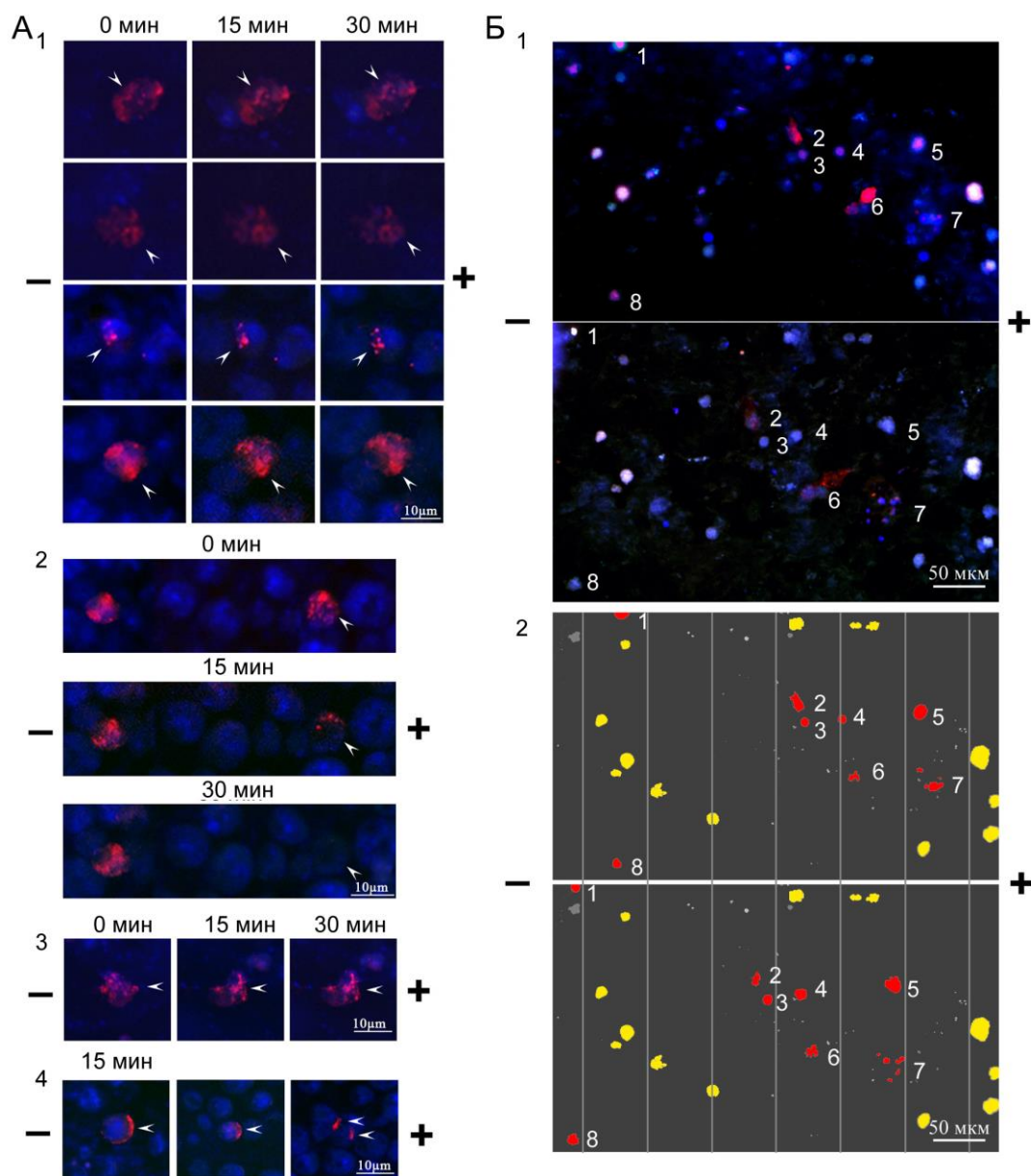


Рис. 27. Характеристика изменений пространственного положения TAMRA-ДНК зонда, ассоциирующегося с клетками Krebs-2 и клетками В-лимфомы, после проведенного микрогель-электрофореза. Приведены результаты флуоресцентного микроскопического анализа клеток после обработки TAMRA-ДНК зондом. Над блоками обозначена продолжительность электрофореза (в мин). Стрелками обозначен TAMRA-меченый материал. **А)** Культура клеток Krebs-2. 1 – TAMRA-ДНК зонд не меняет пространственного положения в ходе электрофоретической разгонки. Время инкубации с экстраклеточным ДНК зондом 60 мин. 2 – TAMRA-ДНК зонд последовательно «слущивается» в ходе электрофореза. Для наглядности приведена клетка, в которой меченый материал не меняет своего положения. Время инкубации с ДНК зондом 60 мин. 3 – TAMRA-ДНК зонд визуально не меняет своего положения. Время инкубации с зондом 3–5 мин. 4 – TAMRA-ДНК зонд «плывет по мембране» в сторону «+» электрода. Время инкубации с зондом 3–5 мин. **Б)** Культура клеток ВЭБ-индуцированной В-лимфомы. 1 – Электрофорез клеток. 2 – Схема электрофореза. Цифрами отмечены клетки, изменившие свое положение в результате проведения электрофореза по направлению к катоду («–»).

Полученные результаты были интерпретированы следующим образом. При длительной экспозиции весь TAMRA-ДНК зонд интернализуется внутрь клетки, что характеризуется его пространственной стабилизацией и отсутствием воздействия на него электрического поля. При короткой экспозиции часть TAMRA-ДНК зонда остается на поверхности мембраны, а часть интернализуется внутрь клетки. Та часть, которая осталась на поверхности, сдвигается по мембране в направлении от минуса к плюсу к противоположному краю клетки, при этом формируется серповидный рисунок. Интернализованный ДНК-материал визуально не меняет своего положения. Движение ДНК-материала по мембране предполагает тот факт, что TAMRA-ДНК зонд связан химической/молекулярной связью с подвижным фактором клеточной мембраны, который «плавает» в мембране (*элементы гликокаликса, холестеринные рафты*).

На препаратах обнаруживаются клетки, в которых TAMRA-ДНК зонд после связывания с поверхностью клетки не формирует прочной связи с факторами мембраны и полностью «слущивается» в ходе электрофореза. Предполагается следующий вариант объяснения эффекта. Компилируя к ранее описанным результатам (раздел 3.3.1.3), можно предположить, что эти клетки находятся в G2/M-фазе клеточного цикла и не имеют активного механизма интернализации ДНК, что связано с процессом деления. В этом случае контакт с клеткой определяется электростатическим взаимодействием как первой фазой интернализации, без участия специфических сайтов, обеспечивающих прочную фиксацию на клеточной мембране и последующую интернализацию.

Аналогичный подход был использован для анализа изменения положения TAMRA-ДНК зонда для клеток В-лимфомы после проведенного микрогель-электрофореза. Четко прослеживается, что TAMRA⁺ клетки двигаются в электрическом поле к отрицательному полюсу, то есть они несут общий положительный заряд (**Рисунок 27 Б-1, 2**). Для части клеток было обнаружено слущивание меченого материала в ходе электрофореза. Результат предполагает, что для части клеток меченый материал находится полностью внутри клетки, и что в таком состоянии клетка сохраняет общий положительный заряд. Для других отмеченных клеток меченый материал диссипирует в ходе фореа, но клетки, тем не менее, мигрируют в сторону катода. Некоторые TAMRA⁺ клетки не меняют своего положения в ходе электрофореза. Часть TAMRA-немеченых клеток также мигрируют к катоду.

Полученный результат определил *второй фактор* взаимодействия экстраклеточного TAMRA-ДНК зонда и клетки. Им является *химическое/молекулярное взаимодействие с элементами клеточной мембраны (гликокаликса)*. Обнаружены варианты непрочной

ассоциации меченого зонда и поверхности клеток Кребс-2, при которых экстраклеточные фрагменты ДНК диссипируют в результате приложения электрического поля.

Для модели В-лимфомы методом микрогель-электрофореза подтвердились результаты, свидетельствующие о положительном заряде большей части TAMRA+ клеток. При этом часть TAMRA+ клеток не меняет своего пространственного положения. Также обнаружен вариант непрочной ассоциации меченого зонда с клеточной поверхностью клеток В-лимфомы, при котором зонд слущивается в результате приложения электрического поля (**Рисунок 27 Б**, группа клеток № 6).

3.4.2. Молекулярная характеристика элементов клеточной мембраны TAMRA+ клеток Кребс-2 и В-лимфомы, определяющих взаимодействие с TAMRA-ДНК зондом

3.4.2.1. Влияние гепарина и протеаз на процесс связывания TAMRA-ДНК зонда с элементами мембраны клеток Кребс-2 и В-лимфомы

Так как было определено, что процессу интернализации дцДНК в ОСК предшествует прочное связывание молекул ДНК с элементами мембраны, на следующем этапе работы необходимым было определить с какими именно мембранными факторами происходит взаимодействие. Согласно логике литературного анализа эти факторы могли нести в своей структуре домены связывания гепарина, определяющие его и дцДНК конкурентное связывание.

Была проведена оценка взаимодействия TAMRA-ДНК зонда с клетками после их обработки гепарином. Оказалось, что гепарин в количестве 4 ед. предотвращает связывание дцДНК зонда с клетками Кребс 2 ($p < 0.05$) и в количестве 0.1, 0.5 и 4 ед. активности – с клетками В-лимфомы (**Рисунок 28 А, Б**). Таким образом подтвердилось, что для обеих выбранных моделей взаимодействие дцДНК зонда и гепарина с клеткой определяют одни и те же элементы клеточной поверхности.

Многочисленные исследования последних 20 лет свидетельствуют, что гепарин связывает многие клеточные и внеклеточные белки (Ishihara et al., 2019; Meneghetti et al., 2015; Ori, Wilkinson, Fernig, 2008; Torrent et al., 2012). Длительный поиск специфического сайта связывания гепарина привел к заключению, что в подавляющем большинстве случаев гепарин-связывающий сайт белков представляет собой **кластеры положительно заряженных аминокислот**, которые образуют ионные пары с пространственно разбросанными, негативно заряженными карбоксильными и сульфатными группами гликозаминогликанов. Для многих белков указанные кластеры сгруппированы в так называемом **коллаген-подобном домене** (Delacoux et al., 2000; Deprez, Inestrosa, 1995; Doi et

al., 1993; Muñoz, Linhardt, 2004). Другие факторы также несут гепарин-связывающий кластер положительно заряженных аминокислот, но по общей структуре не относящийся к коллаген-подобному домену (Ori, Wilkinson, Fernig, 2008). Для некоторых белков, как, например, C1q, установлены консенсусные последовательности аминокислот сайта связывания гепарина (Garlatti et al., 2010). Аргинин и лизин являются аминокислотами, формирующими положительно заряженные кластеры, заключенные в положительно заряженную бороздку (Doi et al., 1993). Аргинин формирует более устойчивую водородную связь и более сильное электростатическое взаимодействие с сульфатной группой по сравнению с лизином. В структуре домена, связывающего гепарин, наиболее часто встречаются неосновные аминокислоты серин и глицин.

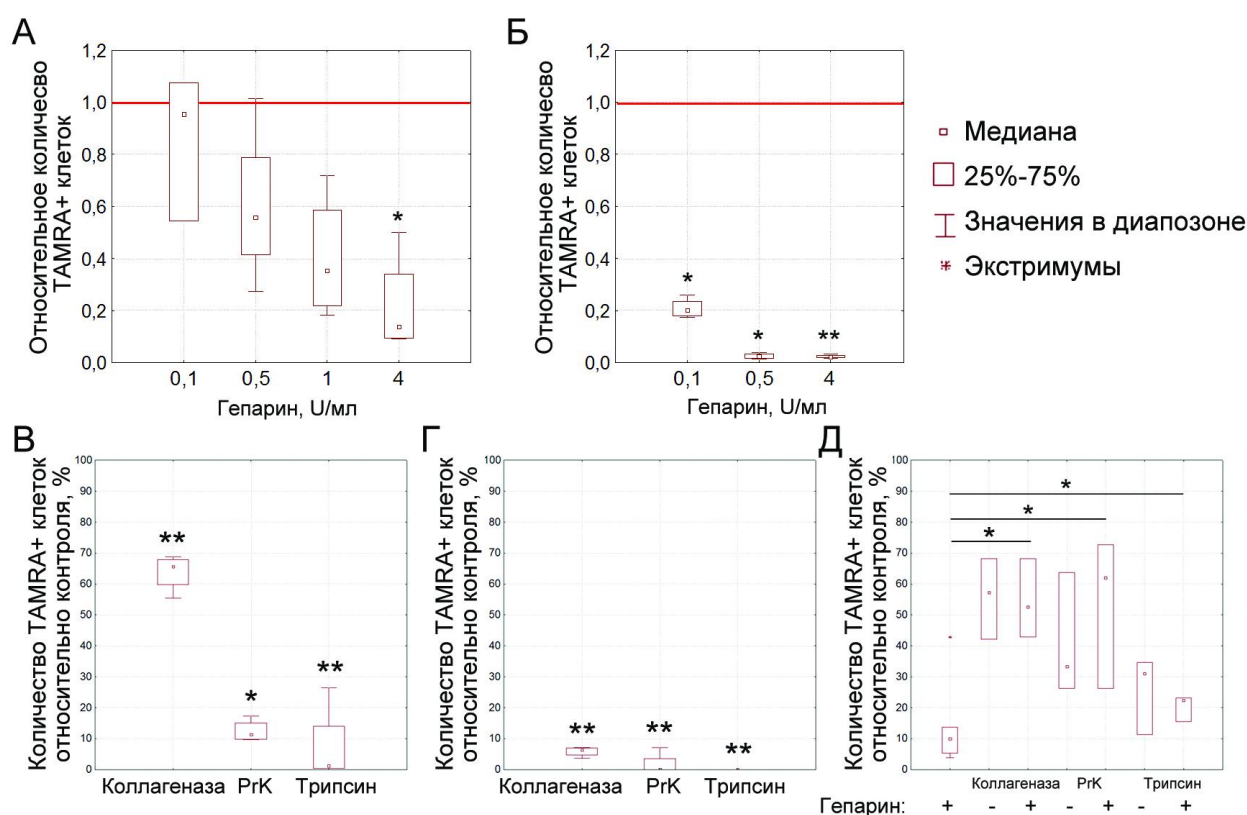


Рис. 28. Молекулярная характеристика мембранных факторов TAMRA+ клеток, определяющих взаимодействие с TAMRA-ДНК зондом. **А)** Анализ ингибирования гепарином взаимодействия TAMRA-ДНК зонда с клетками Krebs-2 ($n = 4$). **Б)** Анализ ингибирования гепарином взаимодействия TAMRA-ДНК зонда с клетками В-лимфоты ($n = 4$). **В-Д)** Влияние коллагеназы, протеиназы К и трипсина на взаимодействие TAMRA-ДНК зонда с клетками Krebs-2. Приведена доля TAMRA+ клеток (в %) относительно контрольных образцов клеток Krebs-2, инкубированных только с TAMRA-ДНК зондом, принятых за 100 %. Анализ содержания TAMRA+ клеток проводился на проточном цитометре BD FACS Aria III. **В)** Клетки Krebs-2 обрабатывали соответствующим ферментом в течение 10 мин, затем инкубировали с TAMRA-ДНК зондом ($n = 4$). **Г)** Клетки Krebs-2 первоначально инкубировали

с TAMRA-ДНК зондом, затем обрабатывали соответствующим ферментом в течение 10 мин ($n = 4$). Д) Клетки Кребс-2 обрабатывали соответствующей протеазой в течение 30 мин, в часть образцов добавляли гепарин, затем клетки инкубировали с TAMRA-ДНК зондом ($n = 3$). Достоверные различия относительно контроля или между группами (указано линией) оценены при помощи one-way ANOVA, критерий Краскела-Уоллиса, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$.

Общеизвестной характеристикой дцДНК и гепарина является одинаковый отрицательный заряд молекул. Можно предположить, что «+» заряд клеточной поверхности ОСК, образованный многочисленными положительно заряженными доменами, расположенными на белках, принадлежащих к различным функциональным группам, является конкурентным субстратом для обоих типов молекул. Это означает, что молекулы, связывающие гепарин, будут теми же самыми, которые связывают фрагменты дцДНК. Гепарин взаимодействует со специфическими *рецепторами факторов роста*, различными *протеогликанами* (PG, Proteoglycan), *скавенджер-рецепторами* (SR, Scavenger Receptor) и *кавеоло-ассоциированными гликопротеинами* (GP, Glycoprotein) (Doi et al., 1993; Ori, Wilkinson, Fernig, 2008; Ori, Wilkinson, Fernig, 2011).

Значит определен один из возможных элементов клеточной мембраны, который может связывать экстраклеточный дцДНК зонд в результате молекулярного взаимодействия. Это сайт связывания гепарина (полианионов), представляющий собой или кластеры положительно заряженных аргинина и лизина, входящих в состав коллаген-подобного домена (Delacoux et al., 2000; Deprez, Inestrosa, 1995; Doi et al., 1993; Muñoz, Linhardt, 2004), или кластеры положительно заряженных аминокислот, не имеющие общей гомологии с коллаген-подобным доменом (Ori, Wilkinson, Fernig, 2008), или консенсусная аминокислотная последовательность (Garlatti et al., 2010).

Далее было оценено влияние обработки протеазами – трипсином, протеиназой К (PrK, proteinase K) и коллагеназой – на процент клеток Кребс-2, взаимодействующих с экстраклеточным TAMRA-ДНК зондом. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют, что факторы клеточной мембраны (гликокаликса, холестеринных микродоменов), гидролизующиеся полностью или частично выбранными протеазами, являются эффективными компонентами механизма взаимодействия экстраклеточных фрагментов дцДНК и клетки. Предварительная обработка указанными ферментами снижает процент TAMRA+ клеток ($p < 0.01$ для коллагеназы и трипсина и $p < 0.05$ для PrK). При этом коллагеназа достоверно меньше влияет на изменение процента TAMRA+ клеток, чем PrK и трипсин ($p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно) (**Рисунок 28 В**). При первоначальной обработке клеток TAMRA-ДНК зондом детектируется минимальный процент TAMRA+ клеток для всех

трех протеаз ($p < 0.01$) (**Рисунок 28 Г**). Этот факт может означать что: (1) это именно то количество клеток, в которых фрагменты дцДНК находятся непосредственно внутри клетки; (2) до обработки протеазами часть фрагментов дцДНК зонда находятся в контакте с факторами гликокаликса/холестериновых микродоменов на поверхности клетки без интернализации, давая прирост детектируемых TAMRA+ клеток. При обработке протеазой флуоресцентно меченый ДНК-материал, который находится в связанном с элементами мембраны состоянии, отщепляется вместе с последними, и клетка теряет флуоресцентный сигнал.

В совокупности это означает, что *факторы клеточной мембраны в очерченный отрезок времени (30 мин) связываются с TAMRA-ДНК зондом без дальнейшей интернализации, за счет чего увеличивается процент TAMRA+ клеток*. При этом истинная интернализация либо отсутствует, либо находится на начальных стадиях. Можно предположить, что клетки связывают фрагменты дцДНК специфическими факторами гликокаликса/холестериновых микродоменов и длительно удерживают их, создавая высокую локальную концентрацию экстраклеточной ДНК в непосредственной близости к клетке. Возможно, такое явление является необходимым этапом для дальнейшего трафика экстраклеточных фрагментов дцДНК внутрь клетки.

Для характеристики элементов гликокаликса, участвующих в процессе связывания с TAMRA-ДНК зондом, на клетках Кребс-2 были проведены эксперименты по оценке конкурирующего влияния гепарина на захват дцДНК зонда в сочетании с обработкой протеазами. В предварительных экспериментах было показано, что после 30 мин инкубации с протеазами дальнейшего изменения процента TAMRA+ клеток не происходит. В этой связи для обработок протеазами было выбрано время инкубации равное 30 мин.

Оказалось, что предобработка клеток протеазами нивелировала ингибирующее действие гепарина, которое в противном случае привело бы к снижению детектируемого количества TAMRA+ клеток ($p < 0.05$) (**Рисунок 28 Д**).

Таким образом установлено, что обработка клеток Кребс-2 коллагеназой, РгК или трипсином и TAMRA-ДНК зондом в противоположной очередности в обоих случаях существенно снижает процент TAMRA+ клеток. Обработка клеток гепарином после гидролиза поверхностных белковых молекул протеазами не влияет на процент TAMRA+ клеток.

Эксперименты по обработке клеток РгК и TAMRA-ДНК зондом были выполнены на модели клеток В-лимфомы, где оценивалась миграция клеток в свободном объеме. РгК была выбрана в качестве основной протеазы, поскольку в экспериментах, выполненных на Кребс-2, показано ее наибольшее влияние на взаимодействие меченого дцДНК зонда с клетками.

Клетки обрабатывали PrK, проводили электрофорез в свободном объеме и после разделения клеток на популяции «-» и «+», суспензии клеток из обеих частей электрофоретического объема инкубировали с TAMRA-ДНК зондом (n = 4) (**Таблица 8**).

Таблица 8. Доля TAMRA+ клеток ВЭБ-индуцированной В-лимфомы (%) в катодной и анодной областях («-» и «+») при первичной обработке клеток PrK и последующего электрофоретического разделения в свободном объеме.

Наличие обработки	№ эксперимента	Контроль	«+» полюс	«-» полюс
PrK-	1	1.5	0.9	3.6
	2	3.8	3.7	5.7
PrK+	3	1.5	3.0	6.7
	4	0.5	0.0	1.4

Полученные результаты свидетельствуют, что миграция клеток к катоду или не связана, или частично связана с белковой частью клеточной поверхности, подвергшейся гидролизу PrK. По-видимому, TAMRA+ клетки В-лимфомы несут положительный заряд клеточной мембраны, определяемый белковой фракцией, неполный гидролиз которой не отменяет миграцию TAMRA+ клеток к отрицательному полюсу. Этот факт предполагает, что положительный заряд факторов клеточной мембраны распределен по всей ее толщине, включая часть, ориентированную как во внеклеточное пространство, так и прилегающую к цитоплазматической мембране.

Суммируя полученные данные, можно предположить, что дцДНК зонд участвует во взаимодействии с белками клеточной мембраны. Кроме того, детектируемый процент TAMRA+ клеток методами FACS-анализа и флуоресцентной микроскопии, по-видимому, определяется двумя популяциями клеток. А именно, TAMRA+ клетки, просто удерживающие меченый дцДНК зонд на своей поверхности, и клетки, интернализирующие TAMRA-ДНК зонд.

3.4.2.2. Динамика истинной интернализации TAMRA-ДНК зонда во внутриклеточные компартменты клеток Кребс-2 в случае пред- или постобработки протеиназой К

Полученные результаты предполагают, что связывание экстраклеточных молекул дцДНК с факторами клеточной мембраны и интернализация дцДНК внутрь клетки представляют собой два различных этапа взаимодействия ДНК с клеткой (**Рисунок 28 В, Г**). Важно было понять, является ли первый этап (связывание) необходимым для последующей интернализации молекул ДНК и есть ли взаимосвязь между двумя этими событиями.

Для ответа на поставленные вопросы на модели клеток Кребс-2 были проведены эксперименты с пред- или постобработкой PrK, как протеазой, продемонстрировавшей в предыдущих экспериментах наибольший эффект гидролиза белков мембраны (оцененный по проценту оставшихся TAMRA+ клеток), и анализом интернализации TAMRA-ДНК зонда во внутриклеточные компартменты. Указанные эксперименты должны были прояснить участие белков мембраны в механизме доставки экстраклеточных фрагментов дцДНК внутрь клетки.

Обнаружено существенное отличие, как в скорости появления детектируемого TAMRA-меченого материала, так и в интенсивности свечения обнаруживаемого TAMRA-ДНК зонда при анализе индивидуальных клеток, обработанных экстраклеточной ДНК до или после обработки PrK. В первом случае идет непрерывный активный набор клеткой меченого материала, достигая к 30 мин максимального значения, равного 250 ± 50 условных единиц флуоресценции. Во втором случае процесс набора останавливается через 7 минут инкубации и по числовым значениям не превосходит показатель клеток в нативных условиях на первую минуту измерения, равный 37 ± 14 условным единицам (**Рисунок 29 А**). При этом конфокальный анализ клеток свидетельствует о внутриклеточной локализации TAMRA-ДНК зонда (**Рисунок 29 Б**).

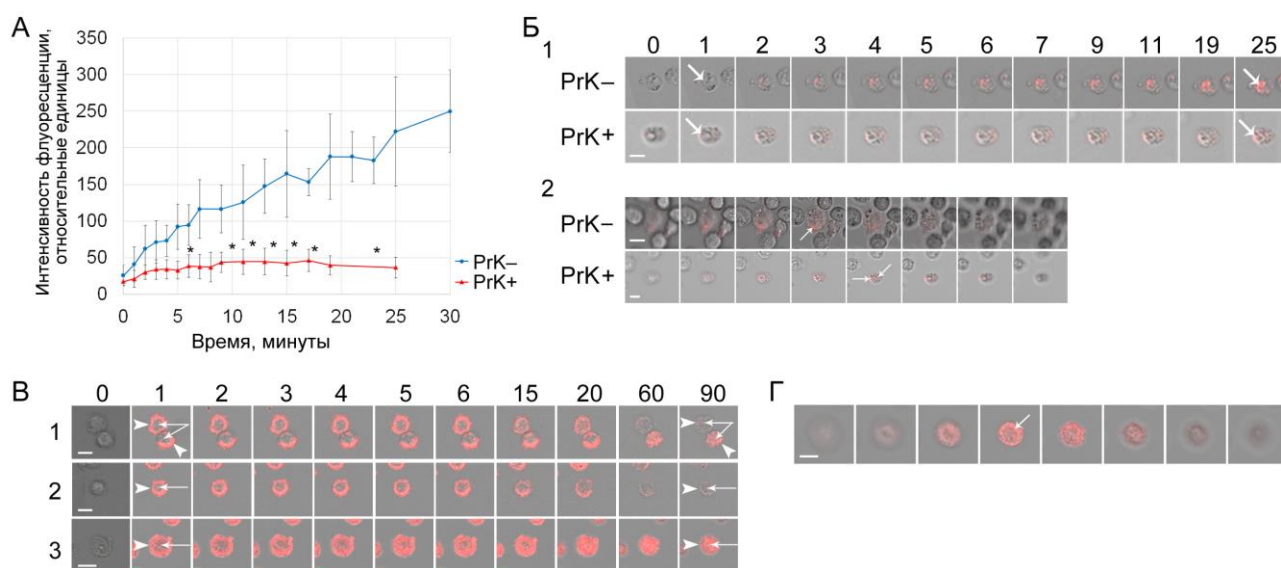


Рис. 29. Молекулярная характеристика мембранных факторов TAMRA+ клеток, определяющих взаимодействие с TAMRA-ДНК зондом. **А)** График накопления TAMRA-ДНК зонда в клетках без обработки и обработанных PrK в течение 30 мин. Приведено Mean $\pm$ SD, $n = 5$. Достоверные различия относительно контроля оценены при помощи one-way ANOVA, критерий Краскела-Уоллиса, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$. **Б)** 1 – Панель рисунков, демонстрирующих результаты, приведенные на графике «А». Цифрами обозначено время инкубации с TAMRA-ДНК зондом в минутах. 2 – Конфокальные срезы индивидуальных клеток в конечной точке инкубации, демонстрирующие локализацию дцДНК зонда во внутриклеточных

компартаментах. **В)** Варианты поведения TAMRA-ДНК зонда в клетках Кребс-2 после обработки PrK: (1) две клетки с различной судьбой меченого материала; (2) клетка, с поверхности которой меченый материал полностью диссипировал в результате обработки PrK; (3) клетка, в которой меченый материал после обработки PrK детектируется во внутренних клеточных компартментах. **Г)** Конфокальные срезы одной и той же клетки в конечной точке инкубирования, показано что меченый материал локализуется внутри клетки. Длинными стрелками указаны TAMRA+ клетки, короткими – локализация TAMRA-ДНК зонда внутри клетки. Бар соответствует 10 мкм.

Этот результат мог означать, что *для попадания внутрь клетки требуется фактор, который* в условиях эксперимента *не гидролизует PrK*, и что именно он является тем внешним субстратом, связавшись с которым TAMRA-ДНК зонд попадает внутрь клетки. Другие факторы определяют прочный контакт с клеточной мембраной, но не интернализацию.

Результаты экспериментов по обработке клеток протеазами и далее гепарином предполагают следующие возможные варианты расположения дцДНК-связывающих сайтов. (1) На поверхности клетки присутствуют как белки, содержащие оба сайта связывания гепарина и дцДНК, так и факторы, содержащие только сайт связывания дцДНК, причем вторые слабо подвержены гидролизу протеазами. (2) На белках, участвующих в связывании одновременно гепарина и дцДНК, часть сайтов связывания дцДНК не перекрывается с сайтами связывания гепарина и, как можно предположить, расположена в непосредственной близости с мембраной. Это предполагает, что гидролиз протеазами не охватывает всю массу гликокаликса, и сохраняются прилежащие к мембране сайты связывания дцДНК, за счет которых и осуществляется ее интернализация, детектируемая после обработки протеазами и гепарином. (3) Известно, что SR в составе кавеол интернализуются и выходят повторно на цитоплазматическую мембрану (Nichols et al., 2001). Обработка гепарином осуществляется в течение 30 мин с последующей тщательной отмывкой. Можно предположить, что обработка гепарином не влияет на интернализованные рецепторы, которые в этот момент погружены в цитоплазму. При добавлении дцДНК зонда эти рецепторы уже присутствуют на мембране и связывают/интернализуют дцДНК зонд.

Для подтверждения существования в один момент времени клеток, находящихся на разных этапах взаимодействия с экстраклеточным дцДНК зондом, а именно: прочно удерживающих TAMRA-ДНК зонд на поверхности без интернализации, интернализирующих дцДНК зонд и промежуточных вариантов, были проведены эксперименты с обработкой клеток PrK и оценкой динамики исчезновения меченого материала с поверхности клетки после проведенного процесса интернализации. Для Кребс-2 показано, что практически все клетки асцита предсмертной фазы развития карциномы (объем асцитной жидкости 10–20 мл, 14–17

день развития рака) выбрасывают на свою поверхность факторы, связывающие дцДНК зонд. Для этого случая установлено, что факторы клеточной поверхности, захватывающие дцДНК, могут иметь различную способность интернализировать дцДНК зонд и могут находиться как на разных типах клеток, так и присутствовать на одной клетке. То есть в один момент времени существуют два типа клеток с двумя вариантами поведения, связанного с взаимодействием дцДНК зонда с поверхностью клетки. (1) С присутствием меченого материала только на поверхности клетки без последующей интернализации, который исчезает в процессе обработки РгК (**Рисунок 29 В-1, 2**); (2) с присутствием меченого материала, который постепенно, в течение 1.5 часов инкубации с РгК в концентрации 50 мкг/мл, исчезает с поверхности клетки, но начинает визуализироваться внутри клеточного пространства (**Рисунок 29 В-3, Г**). Можно предположить, что в данном случае мы имеем дело с двумя типами опухолевых клеток – коммитированными клетками Кребс-2, в которых произошли отмеченные изменения, и стволовыми (для асцита Кребс-2 это ~2.8 %).

Таким образом, полученные данные подтверждают предположение, что в один момент времени существуют два типа клеток с двумя вариантами взаимодействия с дцДНК зондом. Первый тип клеток связывается с дцДНК зондом и удерживает его на поверхности без последующей интернализации. Второй тип клеток связывает дцДНК зонд и последовательно, в течение определенного времени (~1.5 часа), интернализует меченый материал во внутриклеточные компартменты.

3.4.3. Определение механизма интернализации дцДНК зонда в клетки

Показано, что экстраклеточная ДНК первично ассоциируется с ОСК за счет электростатического притяжения. Следующим этапом взаимодействия экстраклеточных молекул дцДНК и клетки является прочное (ковалентное) связывание с факторами клеточной мембраны, имеющими в своем составе гепарин/(полианион)-связывающий домен. При этом часть из указанных факторов не должна иметь жесткой фиксации на цитоплазматической мембране, так как они вместе со связанными молекулами ДНК могут перемещаться по поверхности клетки под действием электрического поля (**Рисунок 27 А-4**). Известно, что такими свойствами обладают PG гликокаликса, SR, GPI-AP, то есть белковые молекулы клеточной поверхности, входящие в структуру гликокаликса, структур кавеоларного и клатринового транспорта (Doi et al., 1993; Garlatti et al., 2010; Zurzolo, Simons, 2016). Эксперименты по обработке клеток протеазами и последующей ассоциацией с TAMRA-ДНК зондом показали, что указанные факторы подвержены протеазному расщеплению, в

результате чего ДНК зонд либо не ассоциируется с клеткой, либо уже ассоциированные молекулы ДНК отщепляются от поверхности клетки вместе с факторами мембраны.

Следующим логичным этапом взаимодействия экстраклеточной дцДНК и ОСК является непосредственно интернализация молекул во внутриклеточное пространство. Для определения механизма интернализации экстраклеточной ДНК в клетку был использован подход, при котором химически блокировали один из известных путей эндоцитоза, а затем оценивали процентное содержание клеток, интернализирующих TAMRA-ДНК зонд. Было проанализировано влияние восьми ингибиторов различных путей эндоцитоза на двух используемых в исследовании моделях (Таблица 9).

Таблица 9. Ингибиторы различных путей эндоцитоза и краткое описание механизма их действия.

Ингибитор	Путь эндоцитоза	Механизм действия
5-(N-этил-N-изопропил)-амилорид (EIPA)	Макропиноцитоз	Подавляет активность малых ГТФаз, которые необходимы для полимеризации актина и образования мембранных выростов.
Цитохалазин Д		Связывает «+» концы актиновых нитей, блокируя их полимеризацию.
Диназор	Динамин-зависимый путь эндоцитоза	Подавляет ГТФ-азную активность динамина.
Хлорпромазин	Клатрин-зависимый путь эндоцитоза	Диссоциирует клатрин и адаптерный комплекс с поверхности клетки.
Нистатин	Эндоцитоз, опосредованный липидными рафтами, в том числе кавеолин-зависимый путь эндоцитоза	Удаляет холестерин из состава липидных рафтов. При этом кавеолин высвобождается в цитоплазму и разрушается.
Метил-β-циклодекстрин (MβCD)		Имеет высокое сродство к холестерину за счет наличия гидрофобной сердцевины.
Вортманин	Рецептор-опосредованный эндоцитоз	Ингибирует клеточные фосфоинозитид-3'-киназы.
Азид натрия	Энергозависимые пути эндоцитоза (рецептор-опосредованный, макропиноцитоз)	Ингибирует синтез АТФ.

3.4.3.1. Влияние блокирования некоторых путей эндоцитоза на процент TAMRA+ клеток Кребс-2 и В-лимфомы

Для проверки возможности ингибирования связывания ДНК с элементами клеточной поверхности клетки предварительно обрабатывали ингибитором, отмывали и далее инкубировали с TAMRA-ДНК зондом. Долю ОСК, связывающих на клеточной поверхности молекулы экстраклеточной ДНК, определяли при помощи FACS-анализа.

Для Кребс-2 статистически достоверно, дозозависимо снижает процент TAMRA+ клеток блокатор кавеолин-зависимого пути интернализации – нистатин ($p < 0.05$). Диназор, блокатор динамин-зависимого эндоцитоза, в большей из использованных концентраций также достоверно снижает процент TAMRA+ клеток (125 мкг/мл, $p < 0.05$) (Рисунок 30).

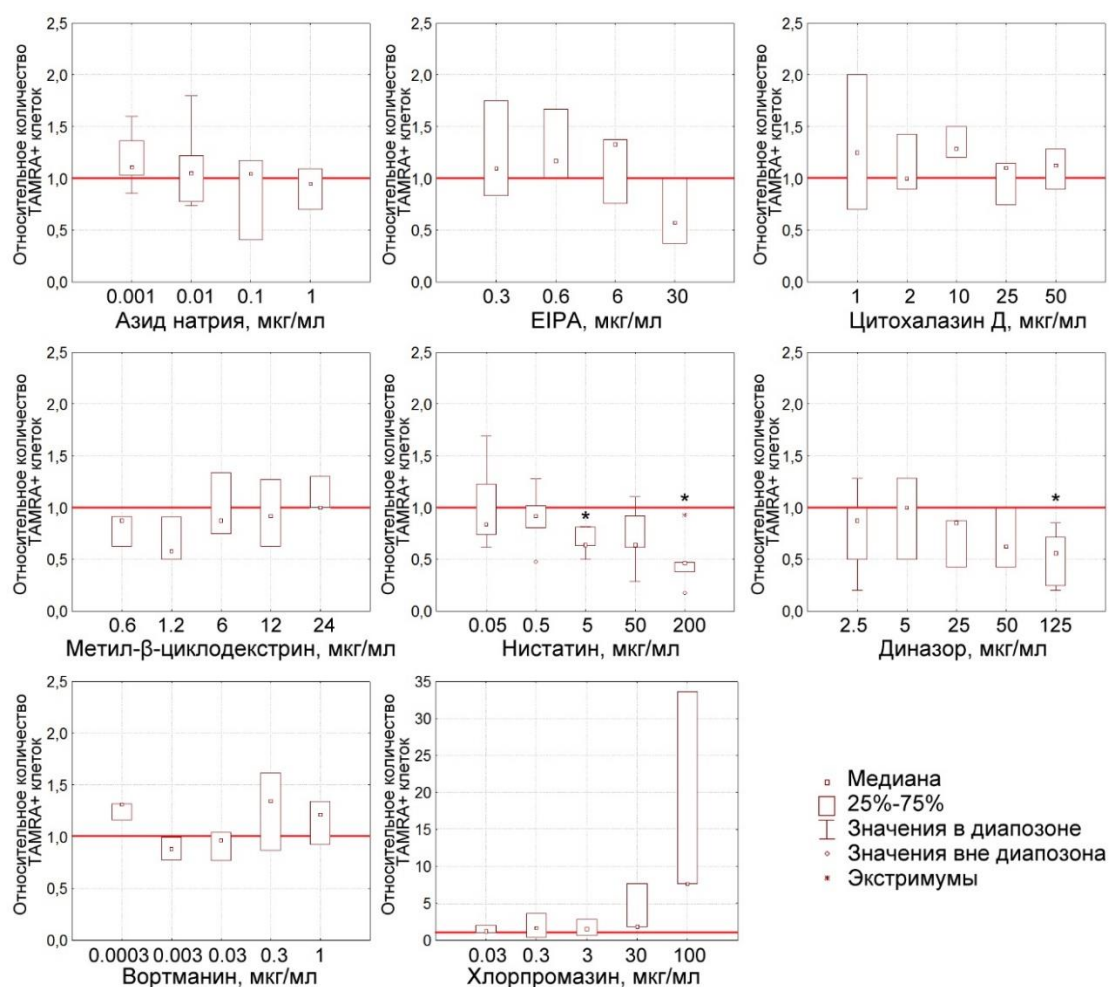


Рис. 30. Влияние ингибиторов эндоцитоза на связывание TAMRA-ДНК зонда с клетками Кребс-2. На графиках представлена доля TAMRA+ клеток после обработки различными концентрациями соответствующих ингибиторов. Звездочками обозначены значения, статистически отличающиеся от контрольного, без использования ингибитора (* $p < 0.05$, one-way ANOVA, критерий Краскела-Уоллиса). Красной линией обозначено содержание TAMRA+ клеток в интактном асците Кребс-2, принятое за 1 ($n = 3-6$).

Для ВЭБ-индуцированной В-лимфомы показано, что процент TAMRA+ клеток также достоверно снижается при обработке клеток ингибитором caveolin-зависимого пути интернализации – нистатином ($p < 0.01$ и $p < 0.05$ для концентраций 50 и 200 мкг/мл) (Рисунок 31). Азид натрия практически полностью дозозависимо блокирует взаимодействие ДНК зонда и клеток В-лимфомы ($p < 0.01$ и $p < 0.05$ для концентраций 1 и 2 мкг/мл), что свидетельствует о необходимости АТФ для связывания экстраклеточной ДНК и факторов мембраны клеток. Цитохалазин Д, блокатор полимеризации актина, во всех концентрациях подавляет взаимодействие дцДНК зонда с клеткой.

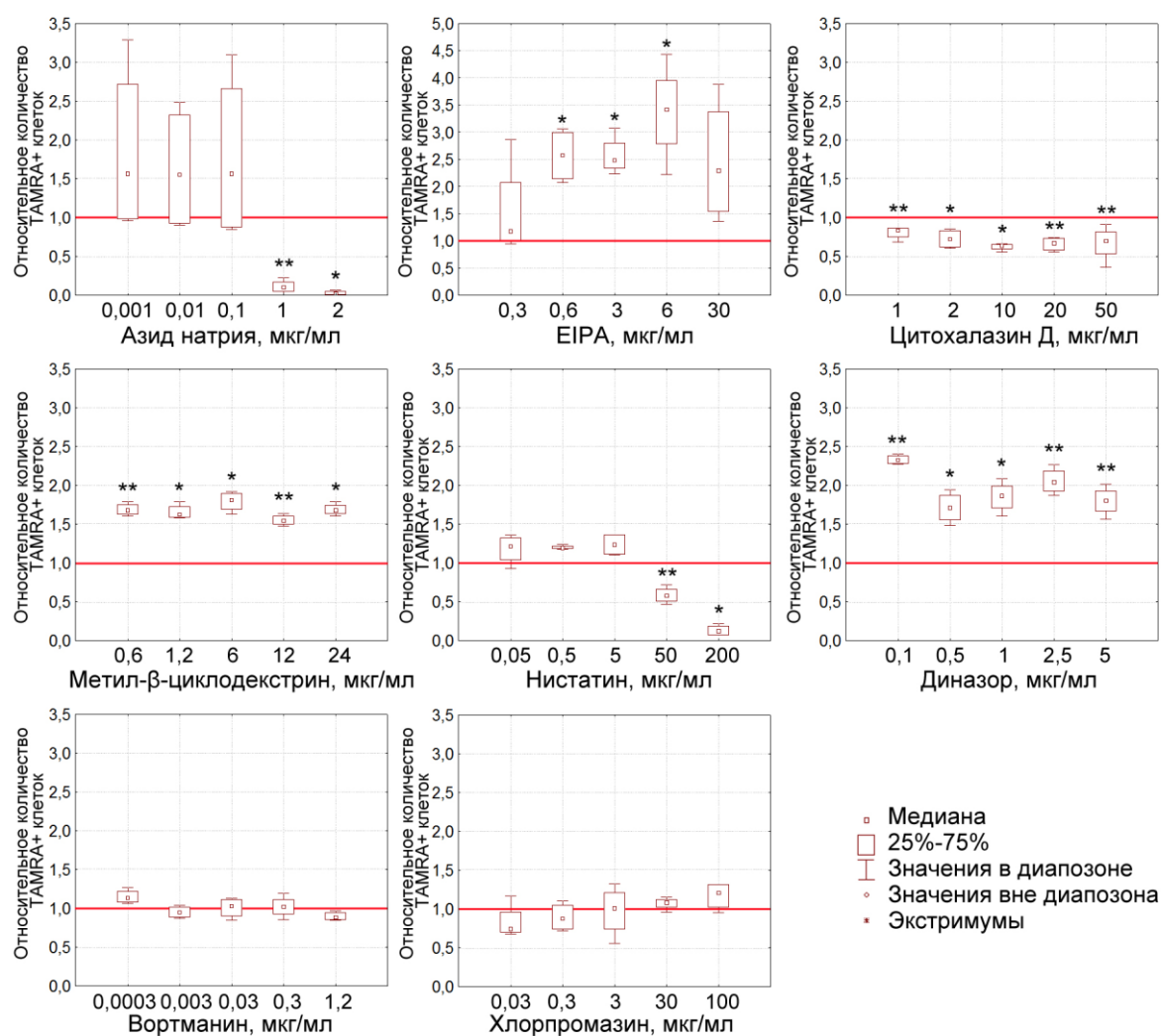


Рис. 31. Влияние ингибиторов эндоцитоза на связывание TAMRA-ДНК зонда с клетками В-лимфомы. На графиках представлена доля TAMRA+ клеток после обработки различными концентрациями соответствующих ингибиторов. Звездочками обозначены значения, статистически отличающиеся от контрольного, без использования ингибитора (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, one-way ANOVA, критерий Краскела-Уоллиса). Красной линией обозначено содержание TAMRA+ клеток в интактных клетках В-лимфомы, принятое за 1 ($n = 4$).

Было отмечено, что многие используемые ингибиторы нарушают гомеостаз мембраны обработанных опухолевых клеток, что приводит к значительному увеличению процента клеток, позитивных по признаку интернализации дцДНК зонда. Так, процент TAMRA+ клеток, детектируемый методом FACS, статистически значимо увеличивается для ингибиторов EIPA ($p < 0.05$ для концентраций 0.6, 3 и 6 мкг/мл); M β CD ($p < 0.01$ для концентраций 0.6 и 12 мкг/мл и $p < 0.05$ для концентраций 1.2, 6 и 24 мкг/мл) и диназора ($p < 0.01$ для концентраций 0.1, 2.5 и 5 мкг/мл и $p < 0.05$ для 0.5 и 1 мкг/мл). Цитологический анализ также свидетельствовал, что взаимодействие с TAMRA-ДНК зондом в этом случае является не специфическим ответом клетки, а связано с нарушением структуры цитоплазматической мембраны под действием химического агента.

3.4.3.2. Влияние блокирования некоторых путей эндоцитоза на интернализацию TAMRA-ДНК зонда во внутриклеточные компартменты клеток Кребс-2 и В-лимфомы

Как было определено ранее (раздел 3.4.2.1), взаимодействие клетки с TAMRA-ДНК зондом не всегда предполагает его интернализацию. Это могло означать, что в указанных в предыдущем разделе экспериментах по ингибированию, где блокирование эндоцитоза оценивалось по изменению процента TAMRA+ клеток, можно утверждать о блокировании связывания дцДНК зонда с элементами мембраны клеток, но не о его интернализации во внутриклеточные компартменты. В этой связи для обеих моделей были проведены эксперименты по оценке влияния ингибиторов на интернализацию TAMRA-ДНК зонда с использованием другого подхода.

Клетки обрабатывали соответствующим ингибитором в средней из выбранных концентраций или в концентрации, дающей наибольший достоверный эффект, и далее TAMRA-ДНК зондом. После инкубации с экстраклеточной ДНК клетки исчерпывающе обрабатывали RgK и ДНКазой, из таким образом обработанных клеток выделяли суммарную ДНК. С полученными образцами суммарной ДНК для всех ингибиторов был проведен qPCR-анализ с использованием праймеров на TAMRA-ДНК зонд и ген актина (для Кребс-2) или полимеразы человека (для В-лимфомы). Результаты экспериментов представлены в **Таблицах 10, 11**.

Полученные результаты сопоставили с результатами предыдущих экспериментов с использованием блокаторов различных путей эндоцитоза и оценкой доли TAMRA+ клеток. Показано, что полученные с использованием FACS-анализа данные не противоречат результатам qPCR.

Для Кребс-2 результаты, полученные при использовании описанных подходов, свидетельствовали о следующем: процесс интернализации TAMRA-ДНК зонда блокируется

ингибиторами эндоцитоза нистатином, диназором. qPCR-анализом установлено, что цитохалазин Д также ингибирует интернализацию TAMRA-ДНК зонда. В экспериментах, проведенных с учетом всех полученных в работе особенностей интернализации, оказалось, что цитохалазин Д оказывает самый сильный эффект ингибирования интернализации по сравнению с нистатином и диназором. Таким образом можно предположить, что для Кребс-2 TAMRA-ДНК зонд проникает во внутриклеточные компартменты *кавеолярным механизмом эндоцитоза* (нистатин, диназор) или *макропиноцитозом* (цитохалазин Д) (Таблица 10).

Таблица 10. Относительное содержание количества интернализированного TAMRA-ДНК зонда во внутриклеточные компартменты клеток Кребс-2 после инкубации с различными ингибиторами.

Ингибитор	№ эксперимента			Медиана
	1	2	3	
Гепарин	0.93	1.00		0.97
Азид натрия	1.83	1.77		1.80
ЕРА	2.99	1.93		2.46
Цитохалазин Д	0.19	0.27		0.23
МβCD	21.63	21.63	5.26	21.63*
Нистатин	0.45	0.30	0.42	0.42*
Диназор	2,12	0.80	0.51	0.80
Вортманнин		4.50	7.19	5.85
Хлорпромазин	33.85	23.38		28.62

Примечание: Приведены относительные значения, вычисленные как отношение количества TAMRA-ДНК зонда после использования каждого ингибитора к количеству, полученному для контрольного образца. Значения меньше единицы означают, что клетки Кребс-2, проинкубированные с ингибитором, интернализировали меньше ДНК, чем контрольные клетки без ингибитора. Нормировку в каждом исследуемом образце осуществляли с использованием гена домашнего хозяйства β-актина. * – достоверное отличие от контроля, $p < 0.05$ согласно критерию Манна-Уитни.

Подтвердились результаты первых экспериментов, свидетельствующие о нарушении структуры цитоплазматической мембраны при действии некоторых ингибиторов, что приводит к аберрантной повышенной интернализации TAMRA-ДНК зонда. Азид натрия практически не действует на интернализацию ДНК зонда, что предполагает независимость биологического эффекта от присутствия АТФ.

Как было отмечено ранее, гепарин существенно снижает количество TAMRA+ клеток. Проведенный ПЦР анализ с клетками Кребс-2 свидетельствует, что снижение количества TAMRA+ клеток в случае с гепарином отражает только факт поверхностного связывания ДНК зонда с факторами клеточной поверхности. Гепарин не влияет на эффективность процесса интернализации TAMRA-ДНК зонда, поскольку отношение количественных значений содержания TAMRA-ДНК зонда в клетках, обработанных гепарином и без обработки, равно единице. Это в свою очередь означает, что создание вокруг клетки высокой локальной концентрации экстраклеточного ДНК зонда, скорее всего, не является абсолютно определяющим и необходимым условием интернализации и, следовательно, не повышает ее эффективность.

Для В-лимфомы результаты qPCR также не противоречат данным экспериментов по оценке процентного содержания TAMRA+ клеток после проведенной обработки ингибиторами (**Таблица 11**). Интернализацию экстраклеточного дцДНК зонда блокируют цитохалазин Д – ингибитор макропиноцитоза; МβCD – участвует в разрушении липидных рафтов, ингибирует кавеоларный или флотелин-зависимый эндоцитоз; вортманнин – блокатор рецептор-опосредованного эндоцитоза, хлорпромазин – ингибитор клатринового пути эндоцитоза.

Таблица 11. Относительное содержание количества интернализованного TAMRA-ДНК зонда во внутриклеточные компартменты клеток В-лимфомы после инкубации с различными ингибиторами.

Ингибитор	№ эксперимента			Медиана
	1	2	3	
Гепарин	25.82		1	13.41
Азид натрия	0.83		1.47	1.15
ЕРА			1.84	1.84
Цитохалазин Д	0.11		0.14	0.13
МβCD	0.17		1.32	0.75
Нистатин	3.77	3.53		3.65
Диназор		5.73		5.73
Вортманнин		0.20	0.23	0.22
Хлорпромазин	0.16	0.76		0.46

Примечание: Приведены относительные значения, вычисленные как отношение количества TAMRA-ДНК зонда после использования каждого ингибитора к количеству, полученному для контрольного образца. Значения меньше единицы означают, что клетки В-лимфомы, проинкубированные с ингибитором, интернализовали меньше ДНК, чем контрольные клетки

без ингибитора. Нормировку в каждом исследуемом образце осуществляли с использованием гена домашнего хозяйства *RPLP0*.

Отмечен факт, что азид натрия не влияет на количество поглощенной ДНК, хотя в первой серии экспериментов было показано практически полное блокирование взаимодействия ДНК зонда с клеткой, что предполагает независимость эффекта интернализации, но зависимость связывания с факторами клеточной мембраны, от присутствия молекул АТФ. ЕРА также практически не влияет на интернализацию. При использовании гепарина, результаты qPCR-анализа интернализации экстраклеточной дцДНК клетками В-лимфомы оказались противоречивыми. Увеличение количества ДНК зонда в клетках связано, на наш взгляд, с длительностью нахождения культуры в культуральной среде, что приводит к изменению состава белков клеточной поверхности, аберрантному действию гепарина и нарушению целостности мембраны.

Полученные результаты свидетельствуют, что в случае В-лимфомы дцДНК зонд может интернализироваться как *кавеолярным*, так и *клатрин-зависимым механизмом*, а также *макропиноцитозом*.

Эффекты действия ингибиторов на процессы взаимодействия экстраклеточной ДНК с клетками и ее интернализацию сопоставлены в **Таблице 12**.

Таблица 12. Сопоставление действия ингибиторов на связывание с клеткой экстраклеточной ДНК и ее интернализацию.

Клеточная модель	Блокирование связывания с клетками (TAMRA+ клетки, %)	Блокирование интернализации (qPCR)
Кребс-2	Нистатин Диназор	Нистатин Диназор Цитохалазин Д
В-лимфома	Цитохалазин Д Нистатин Азид натрия	Цитохалазин Д MβCD Вортманин Хлорпромазин

Оказалось, что для Кребс-2 нистатин и диназор влияют как на захват ДНК зонда клеткой, так и его интернализацию. Цитохалазин Д не влияет на связывание с поверхностными факторами, но при этом блокирует интернализацию дцДНК зонда.

Для В-лимфомы оказалось, что М β CD, вортманин, и хлорпромазин не влияют на связывание дцДНК зонда с клеточной мембраной, при этом ингибируют появление экстраклеточной дцДНК во внутриклеточных компартментах. Цитохалазин Д – активный блокатор как связывания с клеткой, так и интернализации дцДНК зонда. Азид натрия выражено предотвращает связывание TAMRA-ДНК зонда с белками клеточной поверхности, но не влияет на его проникновение в клетку. Последнее предполагает участие АТФ в механизме химического/молекулярного взаимодействия дцДНК и факторов мембраны ОСК В-лимфомы.

Дополнительно было проведено исследование с обработкой клеток Кребс-2 декстран сульфатом с молекулярной массой 500 кДа. Известно, что такая обработка полностью блокирует захват и интернализацию лигандов SR, и в первую очередь гепарина и липопротеинов низкой плотности (Basu et al., 1979; Nishinaka et al., 2020; Tsubamotoa et al., 1994). Оценку проводили с использованием обработки клеток РгК и ДНКазой и последующим qPCR. Оказалось, что обработанные декстран сульфатом клетки полностью теряют способность связывать дцДНК зонд поверхностными белками и одновременно теряют способность интернализировать дцДНК зонд. Среднее относительное значение, полученное методом qPCR, характеризующее эффективность интернализации фрагментов TAMRA-ДНК зонда, составляет 0.08. Этот результат полностью соответствует микроскопическому анализу, где на препаратах не было обнаружено TAMRA+ клеток (данные не приводятся). Этот факт свидетельствует, что в процессе интернализации дцДНК зонда в ОСК принимают участие SR.

3.4.4. Анализ факторов, характеризующих молекулярный портрет ОСК, определенных на основании имеющихся литературных данных

Подводя итоги экспериментальной части по поиску механизма интернализации можно сделать следующее заключение. Процесс взаимодействия дцДНК и ОСК сложный и состоит из нескольких механистически выделяемых этапов. А именно, первичный контакт с факторами клеточной мембраны, опосредуемый электростатическим взаимодействием. Далее происходит формирование прочных контактов с факторами клеточной мембраны и следующая за этим интернализация комплекса фактора и связанного с ним дцДНК зонда механизмом эндоцитоза или макропиноцитоза.

3.4.4.1. Принцип организации мембранных факторов ОСК, опосредующих интернализацию экстраклеточных фрагментов ДНК

Был проведен биоинформационный анализ результатов RNAseq и литературный функциональный анализ факторов, отвечающих характеристикам, необходимым для

возможности участия в интернализации экстраклеточной ДНК в клетку. Результаты анализа механизма связывания и интернализации экстраклеточного дцДНК зонда в клетки, полученные в предыдущих разделах, свидетельствуют, что это должны быть фиксированные в мембране белки, несущие в своей структуре положительно заряженный домен, конкурентно связывающий гепарин и дцДНК, или консенсусную последовательность связывания дцДНК, аналогичного сайту C1q компонента (**Таблица 13**). Эти белки могут быть не жестко фиксированы на мембране и иметь локализацию только на ее внешней стороне, либо могут находиться в структуре липидных рафтов и интернализироваться внутрь клетки кавеоларным/клатриновым эндоцитозом или макропиноцитозом.

Таблица 13. Аминокислотная последовательность трех специфических полианион/гепарин/дцДНК-связывающих сайтов, определенных на основании литературного поиска в базах данных.

Функциональная группа (связывающий сайт)	Аминокислотная последовательность	Краткая характеристика	Ссылка
SR (коллаген-подобный домен)	GRGNPGAPGKPG RS GSPG PKG QKGEKGSV	Гепарин-связывающий домен выделен синим цветом	(Doi et al., 1993)
C1q белок (C1q-подобный домен)	VFTVT RQTHQPPAONSLIRFNA VLTPNQGDYDTSTG KFTCKVPG LYYFVYHASHTANLCVLLYRSG VKVVTF CGHTSKTNQVNSGGVL LRLQVGEEVWLAV	Гепарин-связывающий сайт выделен синим цветом; ДНК-связывающий сайт – красным	(Garlatti et al., 2010)
PG/GP, GPI-AP (кластер положительно заряженных аминокислот)	IFLLVTLVTVCACW KPSKRKQ KKLEKQNSLEYMDQNDD	Кластер положительно заряженных аминокислот выделен зеленым цветом	(Ori, Wilkinson, Fernig, 2008)

Полученные в результате информационной поисковой работы данные свидетельствуют, что белки, удовлетворяющие отмеченным характеристикам, относятся к трем функциональным группам факторов клеточной мембраны. Это PG/GP, SR и GPI-AP. Для PG характерным является C1q-подобный домен или домен с кластерами положительно

заряженных аминокислот, для SR – это коллаген-подобный домен, содержащий специфическую положительно заряженную белковую бороздку или домен с кластерами положительно заряженных аминокислот. GPI-AP, ассоциированные с липидными рафтами, в своем составе могут иметь любой из доменов. То есть был определен интегральный портрет факторов клеточной мембраны, участвующих в связывании и интернализации фрагментов экстраклеточной дцДНК.

Анализ, выполненный в работах (Gómez Toledo et al., 2021; Ori et al., 2009; Ori, Wilkinson, Fernig, 2008; Sarrazin, Lamanna, Esko, 2011), свидетельствует, что гепарин не имеет консенсусной последовательности связывания на белках, проанализированных в указанных работах. То же касается кластеров положительно заряженных аминокислот (аргинин, лизин). Существует много вариаций их расположения относительно друг друга, когда в сумме появляется положительно заряженный участок белковой последовательности (Jureti, Zoranic, Zucic, 2002; Sathyapriya, Vishveshwara, 2004).

В этой связи мы выделили три домена или три группы белков, которые в используемых в работе экспериментальных условиях связывают полианионы гепарин/дцДНК специфическими аминокислотными сайтами (последовательностями), и в своих рассуждениях опираемся именно на них. Однако следует отметить, что сайты связывания полианионов в составе PG, SR, GPI-AP не ограничиваются последовательностями, приведенными в **Таблице 13**.

Интегральный анализ полученных данных позволил сформулировать принцип организации факторов клеточной мембраны опухолевых стволовых (и возможно любых других низкодифференцированных) клеток, выраженный в концепции ***«групп-специфических факторов клеточной мембраны, формирующих ландшафт опухолевых стволовых клеток»***.

Как уже было сказано, определены три функциональные группы: элементы гликокаликса в виде PG/GP, SR и GPI-AP, которые принимают участие в процессе связывания и интернализации экстраклеточной дцДНК в клетку. Принцип организации факторов клеточной мембраны ОСК заключается в следующем. Молекулы-представители белков всех трех функциональных групп в доминирующем количестве обязательно должны присутствовать в клеточной мембране ОСК любого происхождения, что позволяет сохранить требуемую функциональность каждой группы. Однако это могут быть различные представители каждой из групп, что создает уникальный портрет каждого типа ОСК. Определяющей характеристикой всех включенных в перечень групп-специфических факторов является наличие в их структуре полианион (гепарин/дцДНК/декстран сульфат)-

связывающего домена, представленного или коллаген-подобным доменом, описанным для скавенджер-рецепторов А класса, формирующим положительно-заряженную бороздку, или кластерами положительно заряженных аминокислот, или консенсусным сайтом связывания гепарина или дцДНК (но не РНК молекулы) (**Таблица 13**).

3.4.4.2. Определение групп-специфических генов, сверхэкспрессирующихся в TAMRA+ клетках Кребс-2 и В-лимфомы

Для доказательства идеи принципа организации белков клеточной мембраны ОСК были проанализированы транскриптомы TAMRA+ клеток Кребс-2 и В-лимфомы. Согласно сформированному представлению на цитоплазматической мембране стволовых ОСК Кребс-2 и В-лимфомы присутствуют различные молекулы, принадлежащие к трем функциональным группам факторов (PG/GP, SR, GPI-AP). Активность, с которой происходит связывание дцДНК зонда и его интернализация, предполагала присутствие значительного количества белковых молекул, отвечающих за взаимодействие с дцДНК и, как следствие, активную транскрипцию соответствующих генов, которую можно было оценить RNAseq-анализом.

Было проведено сравнение генов трех списков: генов обобщенного портрета ОСК, полученного в результате литературного функционального анализа, сверхэкспрессирующихся генов транскриптомов TAMRA+ клеток Кребс-2 и В-лимфомы (по результатам RNAseq). Результаты сравнения представлены в **Таблице 14** и в **Приложении 2, Таблицах 4, 5**.

Таблица 14. Общая сравнительная таблица групп-специфических факторов интегрального молекулярного портрета поверхностных молекул «идеальной» ОСК и факторов мембраны ОСК Кребс-2 и В-лимфомы.

Функциональная группа	Портрет «гипотетической» ОСК, основанный на анализе литературы*	Кребс-2	В-лимфома
PG/GP	<i>Adipoq</i>	<i>Apoc1</i>	<i>ACVR1</i>
	<i>Caprin2</i>	<i>Catsperg2</i>	<i>CDH11</i>
	<i>Cdh13</i>	<i>Cd200</i>	<i>CDH17</i>
	<i>Clec4</i>	<i>Col3a1</i>	<i>CHODL</i>
	<i>Col12A1</i>	<i>Col6a2</i>	<i>COL4A5</i>
	<i>Fcn2</i>	<i>Cldn1</i>	<i>COL4A6</i>
	<i>Gldn</i>	<i>Dsc2</i>	<i>COL7A1</i>
	<i>Gpc3</i>	<i>Dnaja4</i>	<i>CTHRC1</i>
	<i>Hip</i>	<i>Fcna</i>	<i>FCRL3</i>
	<i>Itgam</i>	<i>Adgrg3</i>	<i>GPC1</i>
	<i>Ncam</i>	<i>Heparan</i>	<i>GPC2</i>
	<i>Otol1</i>	<i>Itm2a</i>	<i>IGF1R</i>

	<i>Sell</i> <i>Selplg</i>	<i>Itga9</i> <i>Itln1</i> <i>Jsrp1</i> <i>Lyve1</i> <i>Mreg</i> <i>Nectin1</i> <i>Ncam</i> <i>Psd2</i> <i>Pgr</i> <i>Selplg</i> <i>Rab15</i> <i>Tnfrsf13c</i>	<i>ITGA10</i> <i>ITGA5</i> <i>KCNIP3</i> <i>KEL</i> <i>NCAM</i> <i>SELL</i> <i>PODX1</i> <i>PTPRM</i> <i>TENM4</i> <i>TSPAN15</i> <i>TREML4</i> <i>VCAM1</i>
SR	<i>Marco</i> <i>Megf</i> <i>Scara</i> <i>Scarb</i>	<i>Marco</i>	<i>MEGF6</i> <i>SCARF2</i> <i>SCART1</i>
GPI-AP	<i>Aamp</i> <i>Ache</i> <i>Car4</i> <i>Cd14</i> <i>Cd24a</i> <i>Cd48</i> <i>Cd55</i> <i>Cd59a</i> <i>Cdh1</i> <i>Ceacam5</i> <i>Cntfr</i> <i>Cpm</i> <i>Fgfr</i> <i>Folr1</i> <i>Gpc3</i> <i>Gpihbp1</i> <i>H2-Q7</i> <i>Ly6a</i> <i>Lypd1</i> <i>Mdp1</i> <i>Msln</i> <i>Nrp1</i> <i>Parp1</i> <i>Plaur</i> <i>Robo</i> <i>Thy1</i>	<i>Cd55</i> <i>Fgfr1</i>	<i>CD14</i> <i>GDPD5</i>

* (Davies et al., 2015; Hussein, Amin, Tayebi, 2020; Ikezawa, 2002; Kinoshita, 2020; Ori, Wilkinson, Fernig, 2011; Sharonov, Balatskaya, Tkachuk, 2016)

Результатом проведенного сравнения стали следующие выводы. TAMRA+ клетки Кребс-2 и В-лимфомы транскрибируют с высоким индексом белки трех выделенных групп-факторов. При этом в списки для обеих анализируемых клеточных систем попали как гены, определенные в результате «функционального» поиска, так и дополнительные гены, специфические для каждого типа ОСК (Таблица 14; Приложение 2, Таблицы 4, 5). Сверхэкспрессия генов, кодирующих растворимые факторы, содержащие домены связывания полианиона (гепарин/дцДНК), была обнаружена как в Кребс-2 (*Comp*, *Tnn*), так и в клетках В-лимфомы (*COL5A1*, *COL22A1*, *COL5A2*, *COL6A1*, *COL16A6*).

3.4.4.3. Сравнение уровня экспрессии некоторых групп-специфических факторов в клетках Кребс-2 и В-лимфомы методом qPCR

Для проверки результатов RNAseq-анализа и подтверждения сформулированного принципа, был проведен qPCR обратно транскрибированных мРНК некоторых выбранных генов из обеих моделей. Полученные данные подтвердили сверхэкспрессию генов *Mreg*, *Prg4*, *Col3a1*, *Selp*, *Marco* and *Fgfr1* в клетках Кребс-2, и *CDH11*, *COL14A5*, *VCAM1*, *MEGF6*, *SCARF2*, *SCART1* и *CD14* генов в клетках В-лимфомы (Рисунок 32). Для генов, кодирующих протеогликан CDH17 и SELL, которые, как ожидалось, должны сверхэкспрессироваться в TAMRA+ клетках В-лимфомы согласно RNAseq-данным, методом qPCR такой сверхэкспрессии показано не было. Однако, суммируя общие данные, можно сделать вывод, что характер экспрессии специфических генов указывает на правильность предложенного принципа.

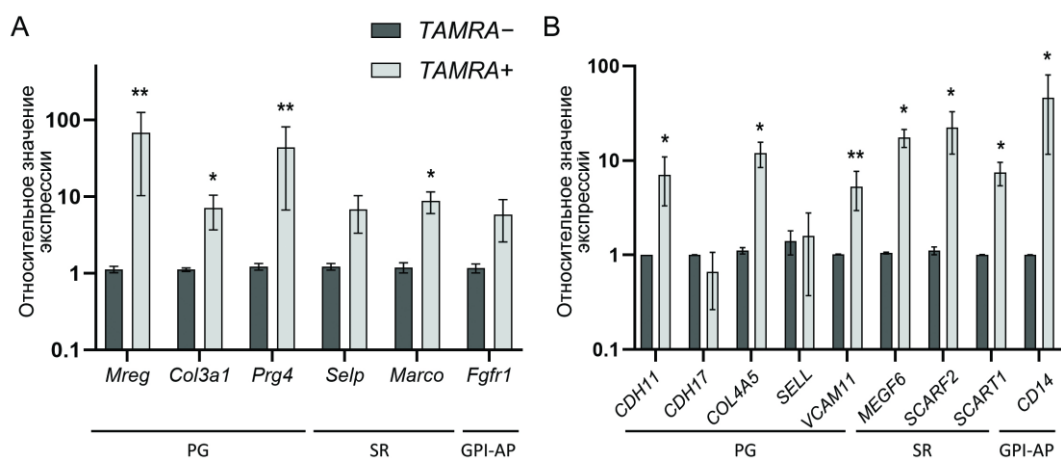


Рис. 32. Оценка относительного уровня экспрессии генов групп-специфических факторов, выявленных в ходе анализа транскриптома и предположительно участвующих в процессе

интернализации дцДНК. А) qPCR с кДНК, полученной из карциномы Кребс-2. Б) qPCR с кДНК, полученной из В-лимфомы. Для каждого гена было проведено от трех до пяти независимых раундов qPCR, каждая точка выполнена в трех повторах. На графике приведено Mean $\pm$ SD, * p <0.05, ** p <0.01 (тест Манна-Уитни).

Полученные результаты описывают новую биологическую особенность ОСК. Стволовая опухолевая клетка имеет особенный ландшафт клеточной поверхности – доминирующее присутствие на цитоплазматической мембране поверхностных белков, представленных тремя группами, объединенными общей функцией, а именно: PG/GP, SR и GPI-AP. Таким образом, на поверхности ОСК одновременно собраны в один функциональный агломерат три функциональные группы. Такая особенность позволяет объединить различные уникальные свойства, присущие различным типам клеток, в одной ОСК. При этом положительный заряд мембраны ОСК является их биологической особенностью, которая манифестируется в первичной ассоциации TAMRA-ДНК зонда (то есть фрагментов дцДНК) с положительно заряженной мембраной.

На основании проведенного анализа механизма интернализации ДНК складывается новое представление о том, что несмотря на кажущуюся гетерогенность поверхностного фенотипа ОСК, существует общий принцип. Есть три функциональные группы белков, в которых все представители имеют одно общее свойство – способность связывать отрицательно заряженные полианионы (наличие в молекуле последовательности аминокислот, обладающих положительным зарядом). Именно за счет этих белков осуществляется интернализация фрагментов дцДНК. Однако в каждом конкретном типе ОСК в указанные группы входят различные представители этих функциональных групп. В этом случае, при индивидуальном анализе разных типов ОСК, создается впечатление отсутствия специфических факторов, определяющих функцию. *Такое видение проблемы может являться разгадкой несостоятельности поиска универсального белкового маркера ОСК.*

Концептуальная схема, наглядно демонстрирующая логику экспериментальной работы и последовательные этапы проверки событий, имеющих место во время взаимодействия ОСК Кребс-2 и В-лимфомы с экстраклеточной дцДНК, приведена в **Приложении 3**.

Краткие выводы, полученные по результатам анализа механизма интернализации экстраклеточной дцДНК в ОСК, следующие.

1. ОСК имеют общий положительный заряд, который определяется хорошо развитым гликокаликсом с избыточным содержанием гепарин-связывающих доменов. Это свойство ОСК (или, по-видимому, любых других стволовых клеток) может обеспечивать начальную, энергонезависимую агрегацию с клетками других типов (формирование стволовой ниши).

2. ОСК имеют две особенности, связанные с взаимодействием с экстраклеточной дцДНК. PG/GP гликокаликса связывают дцДНК, не участвуя непосредственно в интернализации. Именно из-за обилия этих белков в гликокаликсе и наличия в их структуре гепарин/дцДНК-связывающих доменов TAMRA-ДНК зонд связывается с поверхностью клеток, обеспечивая интенсивную флуоресценцию, что позволяет обнаруживать ОСК в массе опухолевых клеток. Интернализация TAMRA-ДНК зонда в клетки происходит в результате связывания со SR и/или GPI-AP.

Таким образом, на основании полученных результатов сформулирована концепция нового принципа детекции стволовых клеток различного генеза, включая ОСК, с использованием дцДНК индикатора. Основным свойством таких клеток, позволяющим маркировать их и дифференцировать в массе коммитированных опухолевых клеток, будет общий положительный заряд и присутствие на поверхности этих клеток специфических сайтов связывания дцДНК, а меченый дцДНК зонд представляет собой универсальный инструмент для *in vitro* и *in vivo* детекции ОСК.

3.5. Основные этапы создания и принципы терапевтического режима «Каранахан»

Как уже было сказано, взаимодействие экстраклеточных фрагментов дцДНК происходит преимущественно с низкодифференцированными CD34⁺ и ГСК (разделы 1.7; 3.1).

Молекулы ДНК, попадая в клетку на фоне воздействия летальной дозы γ -радиации, спасали ее от губительного действия облучения, что выражалось в спасении стволовых клеток крови, заселении ими селезенки с образованием селезеночных колоний, восстановлении иммунной и кроветворной систем организма и, как следствие, спасении экспериментальных животных от гибели (Likhacheva et al., 2007).

Напротив, на фоне действия цитостатика ЦФ, происходила элиминация лимфоидного ростка кроветворения, что приводило к инволюции иммунных органов, активации оппортунистической инфекции и развитию системной воспалительной реакции. Все вместе перечисленные факторы вызывали гибель экспериментальных животных. Такой феномен был назван «окном смерти», где под указанным термином понимался промежуток времени после воздействия ЦФ (18–30 часов), когда попадание экстраклеточной дцДНК в ГСК мышей приводило к гибели указанных клеток и затем экспериментальных животных (Dolgova et al., 2012a). При этом ни в виде монопрепарата, ни в другие промежутки времени после воздействия ЦФ дцДНК негативных эффектов на клетки и организм в целом не оказывала.

Явления спасения и гибели стволовых клеток под воздействием экстраклеточной дцДНК можно было связать только с процессами, происходящими в клетке на фоне

воздействия внешнего фактора: облучения или цитостатика. Оба указанных воздействия приводят к возникновению повреждений в молекулах ДНК клетки и запуску процессов репарации. Нами был сделан вывод, что молекулы экстраклеточной дцДНК оказывают разнонаправленное воздействие именно на фоне происходящих процессов репарации молекул ДНК хроматина в стволовой клетке. Так как механизмы репарации повреждений, вызванных γ -радиацией и цитостатиком ЦФ, отличаются (NHEJ (non-homologous end joining, негомологичное объединение концов) в первом случае и HR во втором), а также имеют разные по продолжительности отрезки времени (Долгова и др., 2010), это объясняло разнонаправленный эффект воздействия (спасение в одном случае и губительный эффект во втором) и влияние времени введения экстраклеточной дцДНК после облучения/инъекции ЦФ, когда описанные события наблюдались.

При проведении стандартной химиотерапии с участием кросслинквирующих цитостатиков, включая ЦФ, в ДНК формируются МЦС, являющиеся причиной селективной гибели опухолевых клеток. В S-фазе, когда репликативная вилка сталкивается с повреждением (МЦС), запускается каскад репарационных событий, из которых наиболее легко детектируемым является появление и накопление ДЦР. ДЦР образуются после процессинга МЦС и восстановления целостности нити ДНК в указанном районе механизмом NER (Abdullah et al., 2017; Hashimoto, Anai, Hanada, 2016; Niedernhofer et al., 2004). На втором этапе ДЦР удаляются из клетки механизмом HR, после чего происходит восстановление репликативной вилки (Hashimoto, Anai, Hanada, 2016).

Анализируя время появления и репарации ДЦР, как основных интермедиатов репарации МЦС, образованных под воздействием ЦФ, в ККМ, была обнаружена следующая закономерность. ГСК погибают только если экстраклеточная дцДНК попадает внутрь клетки в момент снижения количества ДЦР (18–30 часов с момента обработки цитостатиком). В других промежутках времени негативного эффекта на ГСК не наблюдалось. В работе было сделано заключение, что экстраклеточная дцДНК, находясь в клетке в момент HR, интерферирует процесс репарации таким образом, что клетка либо не может его завершить, либо делает это некорректно, в результате чего погибает механизм апоптоза (Dolgova et al., 2012a).

В настоящей работе показано, что ОСК, как и ГСК, обладают свойством интернализировать экстраклеточные фрагменты дцДНК. В сумме этот факт и полученные ранее данные позволили сделать предположение, что, находясь внутри ОСК в момент репарации повреждений, вызванных воздействием цитостатика, и в чувствительный для ОСК промежуток времени, экстраклеточная дцДНК будет таргетно воздействовать на опухолевые

клетки, приводя к их эрадикации. Это послужило основой для разработки терапевтического режима «Каранахан» (с санскрита «убивающий причину»), сутью которого является хронометрическое малодозовое воздействие цитостатиком ЦФ с добавлением препарата на основе дцДНК в определенные временные промежутки после воздействия ЦФ, зависящие от продолжительности репаративного цикла конкретных опухолевых клеток. Под термином «репаративный цикл» мы понимаем время, необходимое конкретному типу опухолевых клеток для завершения репарации всех повреждений ДНК. Мы разделили репаративный цикл на две фазы: NER (когда количество ДЦР возрастает) и HR (количество ДЦР снижается). Таким образом, промежуток времени между началом возрастания количества ДЦР и стадией, когда количество ДЦР снижается до базового уровня (свойственного необработанным клеткам), и есть время полного цикла репарации для клеток данной конкретной опухоли.

Поиск режима эрадикации ОСК сочетанным воздействием цитостатика и препарата на основе дцДНК являлся многолетним кропотливым исследованием, включающем десятки экспериментов, в ходе которых подбирался как оптимальный состав препарата дцДНК, так и нетоксичный для организма режим его введения. Краткая демонстрация и описание всех поисковых экспериментов по подбору режима воздействия цитостатика и препарата дцДНК на опухолевые клетки приведена в **Приложении 4**. Более важным, как нам видится, является характеристика принципа действия режима «Каранахан» на опухолевые клетки, как итог указанных поисковых исследований. Поэтому в настоящем разделе основной акцент сделан на характеристику механизма работы (принцип действия) разработанного терапевтического режима «Каранахан». Также деально описаны технологические процедуры, необходимые для его применения.

Исходной моделью, на которой были обнаружены основные принципы эффекта воздействия терапевтического режима «Каранахан» на развитую опухоль, являлась карцинома мыши Кребс-2. Работа была начата в 2012 году. Можно выделить несколько принципиальных этапов его создания.

Базисом терапевтического режима является обнаруженный в работе новый общебиологический эффект: способность ОСК интернализировать фрагменты дцДНК естественными природным механизмом. Синтезированный двуцепочечный TAMRA-ДНК зонд позволил идентифицировать ОСК конкретной опухоли в массе опухолевых клеток. Также использование указанного дцДНК зонда позволило оценивать изменение количества ОСК в режиме «непрерывного анализа» после проведенных обработок. Механизм интернализации подробно описан в настоящем исследовании. В основе механизма лежит свойство фрагментов

экстраклеточной дцДНК взаимодействовать с гепарин-связывающим доменом структур гликокаликса ОСК за счет разницы зарядов.

Эксперименты свидетельствовали, что цикл репарации МЦС, индуцированных ЦФ, у Кребс-2 клеток имеет следующий профиль: 12-часовой период подъема количества ДЦР (фаза NER), 12-часовое плато и 12-часовую фазу HR, при которой происходит восстановление целостности ДНК хромосом. По окончании фазы HR двуцепочечные разрывы полностью репарируются (подробно в разделе 3.7.1.1).

В начальных экспериментах по оценке синергичного действия ЦФ и препарата на основе дцДНК (нативная дцДНК человека размером 200–6000 п.н.) были использованы многократные (до 12 повторов) ежечасные инъекции препарата дцДНК мышам с развитым асцитом Кребс-2 после однократного введения ЦФ. После проведенных обработок асцит перевивался в форме солидного графта здоровым мышам. Были получены следующие результаты. При введении препарата нативной ДНК человека в фазу NER (первые 12 часов от введения ЦФ), внутримышечные трансплантаты не приживаются. Если препарат дцДНК с теми же характеристиками вводить в фазу HR, то перевитые трансплантаты развиваются нормально. При обработке асцита препаратом дцДНК с другими характеристиками (смесь кросслинкерованной и нативной дцДНК спермы лосося) в фазу HR (18–30 часов), и последующей перевивке асцитных клеток в форме солидных трансплантатов, внутримышечные графты опять не приживаются. Однако если кросслинкерованной дцДНК спермы лосося обработать асцит в первые 12 часов (фаза NER), то солидные графты растут аналогично перевитым в контрольных условиях. На этом этапе работы была установлена смертельная токсичность указанной терапии с использованием как нативной ДНК человека, так и модифицированной ДНК спермы лосося. Последующие эксперименты показали, что токсичность применения кросслинкерованной дцДНК спермы лосося можно существенно понизить разбавлением модифицированного препарата нативной дцДНК спермы лосося (соотношение 2:5 соответственно). При этом эффект разрушения перевивочного потенциала асцита, обработанного такой ДНК, полностью сохраняется (**Рисунки 2, 3 в Приложении 4**).

Оказалось, что причиной эффекта разрушения опухолевого потенциала перевиваемых асцитных клеток является утрата ими TAMRA+ ОСК, которые эрадицируются из асцита проведенной обработкой (**Рисунок 1 в Приложении 4**).

Для детального описания происходящих событий были проведены многочисленные эксперименты, где использовались различные комбинации введения ЦФ и препарата дцДНК в режиме многократных инъекций. Было установлено, что при последовательной трехкратной обработке асцитных клеток, находящихся в процессе репарации МЦС, в следующем режиме:

первая и две последующие инъекции ЦФ за 0–2 часа до окончания каждого предыдущего репаративного цикла (36 часов для Кребс-2) и введения в терапию множественных инъекций препаратов ДНК, ОСК лишаются возможности завершить репаративный цикл, и асцит полностью резорбируется. Однако оказалось, что в результате такой обработки мыши погибали от системной воспалительной реакции. В добавление к этому у выживших мышей всегда возникали рецидивы (**Рисунок 5 в Приложении 4**).

Последовательный анализ полученных данных позволил решить проблему токсичности, возникающую при многократном введении препаратов дцДНК, и создать принцип «универсальности обработок» для различных опухолей. Логика идеи состояла в следующем: если разработать препарат ДНК, состоящий из нативной ДНК человека, ДНК спермы лосося и модифицированной ДНК спермы лосося, и вводить новую композицию однократно в точку разделения двух фаз репарации МЦС (18 часов от введения ЦФ для Кребс-2), то должны произойти следующие события. Нативная дцДНК человека не будет давать возможность ОСК, находящимся в фазе NER, завершить указанную фазу процесса репарации МЦС, а смесь кросслинкированной и нативной дцДНК спермы лосося не даст начаться процессу HR в клетках, «избежавших» воздействия немодифицированной дцДНК человека в фазе NER. На данном этапе работы был установлен оптимальный состав препарата на основе дцДНК, состоящий из трех композиций: нативная дцДНК человека, нативная дцДНК спермы лосося и кросслинкированная дцДНК спермы лосося в соотношении 7:5:2 (или 50 %, 36 % и 14 %) (далее **препарат ДНК-микс**) (**Рисунок 6 в Приложении 4**).

В последующих экспериментах на модели асцита Кребс-2 у всех мышей-асцитоносов, которым трехкратно вводили ЦФ и ДНК-микс в указанном выше режиме, асцит полностью резорбировался, и существенно увеличилась средняя продолжительность жизни экспериментальных животных. При этом произошло купирование процесса развития системной воспалительной реакции. Это означало, что найден нетоксичный режим введения ЦФ и ДНК-микс (три раза, привязанные к окончанию репаративного цикла). Принцип введения препаратов без индукции токсического эффекта является одним из важнейших параметров режима «Каранахан».

Несмотря на очевидный прогресс в понимании механизма воздействия препарата дцДНК в сочетании с кросслинкующим цитостатиком ЦФ, не удавалось предотвратить отдаленное развитие рецидивов после полного исчезновения асцита на 15–35 сутки от начала обработок (**Рисунок 6 в Приложении 4**). Возникла идея проанализировать состояние клеточной популяции асцита после проведенных обработок в последующие девять суток. Был обнаружен феномен индукции масштабного апоптоза коммитированных опухолевых клеток.

Также было обнаружено, что остаточные опухолевые клетки синхронизируются в G2/M-фазе клеточного цикла после проведенной терапии. Также было установлено, что при одновременном переходе остаточных опухолевых клеток из G2/M-фазы в чувствительную для интернализации экстраклеточной ДНК G1-фазу, процент TAMRA+ ОСК резко возрастает. Этот факт предполагал, что увеличение количества TAMRA+ ОСК связано с тем, что часть клеток этого типа переживает проведенную обработку. Возросший относительный процент клеток на фоне тотального падения общего количества клеток предполагал именно такое развитие событий. Полученный результат определил важнейшую точку терапии, а именно, точку синхронизации остаточных клеток опухоли, как коммитированных, так и стволовых, в G2/M-фазе (**Рисунки 7, 8 в Приложении 4**).

Известно, что ЦФ в этой фазе клеточного цикла индуцирует МЦС, при этом эти повреждения хроматина определяются клеткой только в следующей G1/S-фазе клеточного цикла после прохождения митоза. Кроме этого экспериментальные данные (раздел 3.3.1.3) свидетельствовали, что дцДНК в фазе G2/M не попадает внутрь опухолевой клетки, что связано с коллапсом актиновой архитектуры клетки в фазе митоза.

Взятое вместе позволило сформулировать идею четвертой (финальной) обработки опухолевых клеток, которая состояла в следующем. Если ввести четвертый раз ЦФ в синхронную G2/M-фазу, а в следующую за ней фазу G1 ввести препарат ДНК-микс, то будет осуществлено терапевтическое воздействие на пережившие начальную терапевтическую обработку выжившие ОСК. Одновременно будет завершен апоптоз оставшихся коммитированных клеток опухоли. Важным являлся тот факт, что промежуток времени между введением ЦФ и препарата ДНК-микс попадал в необходимую для активации репаративного процесса G1/раннюю S-фазу.

В следующей серии экспериментов на мышах с развитым асцитом и мышах с солидными опухолями было показано, что до 86 % мышей полностью вылечиваются от быстротечной неизлечимой карциномы Кребс-2. При этом ~25 % мышей погибали от системной воспалительной реакции. Оценка продолжительности жизни переживших лечение мышей свидетельствовала, что ~50 % животных прожили до окончания наблюдения (180 дней от начала эксперимента) без признаков опухоли (подробно в разделе 3.7.1.1).

В результате проведенной работы был создан терапевтический режим, который мы назвали «Каранахан». Общая схема терапии с определяющими ее элементами приведена на **Рисунке 33**.

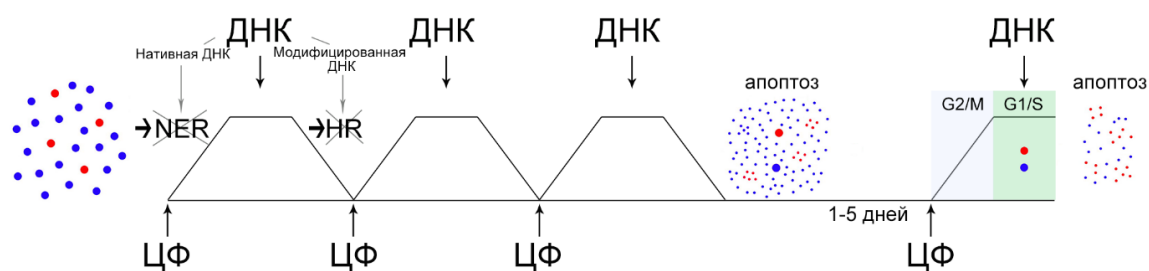


Рис. 33. Концептуальная схема терапевтического режима «Каранахан». **На первом этапе** опухолевые клетки подвергают трехкратному воздействию ЦФ и сложнокпозиционного препарата ДНК-микс, которые вводят в строгом соответствии с циклом репарации. В результате этой процедуры большинство ОСК эрадицируются на фоне крупномасштабного апоптоза коммитированных клеток. В то же время остаточные стволовые и коммитированные клетки опухоли синхронизируются в G2/M-фазе клеточного цикла. **На втором этапе** осуществляют четвертое введение ЦФ (в период синхронизации в G2/M-фазе клеточного цикла) и препарата ДНК-микс (также связанное с процессом репарации). Введение препарата ДНК-микс совпадает со временем синхронного перехода клеток в фазу G1. В результате все остаточные опухолевые клетки, как стволовые, так и коммитированные, полностью удаляются. Крупными синими точками схематически обозначены коммитированные опухолевые клетки, красными – ОСК. Мелкие точки этих же цветов обозначают апоптотические тельца разрушенных в результате апоптоза опухолевых клеток. Кривые линии отображают накопление и снижение количества ДЦР в опухолевых клетках (схематичное представление репаративного цикла).

3.6. Этапы анализа опухолевых клеток для разработки схемы терапии согласно режиму «Каранахан»

Для того чтобы определить схему введения препаратов ЦФ и ДНК-микс для проведения терапии конкретной опухоли с использованием режима «Каранахан», необходимо пошагово провести следующий анализ.

1. Определить присутствие в опухоли низкодифференцированных стволовых опухолевых клеток по способности захватывать TAMRA-ДНК зонд (TAMRA+ клетки).

2. Определить временной профиль цикла репарации МЦС, индуцированных кросслинкующим цитостатиком. Увеличение количества ДЦР в клетках до максимального значения (фаза NER), снижение количества ДЦР в клетках, достигающее до базового уровня (фаза HR), представляют собой продолжительность полного репаративного цикла. Количество ДЦР после обработки цитостатиком определяют при помощи анализа «кометных хвостов» (Collins, 2004).

В этом месте следует отметить, что начало репаративного цикла (фаза NER) в некоторых случаях начитается с падения нулевого значения ДЦР ориентировочно к 6 часам от первой инъекции ЦФ. Это связано с тем, что в это время (активация репаративного

механизма) происходит остановка синтетических процессов в клетке и закрытие всех функциональных одноцепочечных и двуцепочечных разрывов, связанных с идущей транскрипцией. В таких случаях при расчете времени репаративного цикла следует считать, что истинный репаративный цикл начинается именно с этого момента после первой инъекции ЦФ. Если проводить дальнейшую обработку цитостатиком, то время репаративного цикла будет приходиться на отрезок времени между точкой минимального значения (максимального падения) после первой инъекции ЦФ и минимальной точкой, достигшей базового уровня после максимального подъема количества ДЦР (далее по тексту при составлении временной схемы введения цитостатика обозначается, как «*поправка*»).

3. Определить день синхронизации клеток в G2/M-фазе клеточного цикла с последующим выходом из остановки клеточного цикла в G1-фазу. Для этого опухолевые клетки трижды обрабатываются цитостатиком по схеме, учитывающей продолжительность репаративного цикла, включая падение значения количества ДЦР после первого введения ЦФ (если оно имеется). Таким образом проводятся либо три последовательных обработки кросслинквирующим цитостатиком через равные промежутки времени, представляющие из себя время продолжительности репаративного цикла. Либо, в случае снижения количества ДЦР после первой обработки цитостатиком, первую обработку проводят в нулевой точке, вторую – в конечной точке полного репаративного цикла, определенного на предыдущем этапе, третью – в конечную точку истинного репаративного цикла, учитывающего падение количества ДЦР.

Поскольку определенные временные параметры не являются абсолютно точными, то для того, чтобы предотвратить возможность избегания терапевтического режима определенным количеством клеток, допускается уменьшение промежутков времени инъекций цитостатика не более чем на два часа от определенного времени продолжительности репаративного цикла.

Указанные обработки приводят к «запиранию» TAMRA+ ОСК в G2/M-фазе клеточного цикла на определенное время, после чего происходит синхронный выход и накопление клеток в чувствительной для терапии G1-фазе клеточного цикла. Анализ распределения по клеточному циклу после обработок цитостатиком проводят ежедневно при помощи FACS-анализа.

Необходимое замечание. В данном разделе диссертации приводится предполагаемый механизм синхронизации опухолевых клеток в G2/M-фазе клеточного цикла и синхронного перехода в G1-фазу.

Вероятно, процесс синхронизации как коммитированных опухолевых клеток, так и ОСК связан с различной структурой хроматина. Время репарации разных районов хромосом связано с наличием в них повторяющихся ДНК. Динамика репарации выглядит следующим образом. Сначала репарируются повреждения, локализованные в эухроматине, далее – интераклярном гетерохроматине и, возможно, в теломерах, и в последнюю очередь репаративная машина удаляет повреждения в массе центромерного гетерохроматина. Пространственные ограничения для белков репарации в центромерном гетерохроматине являются возможной причиной синхронного восстановления повреждений в разных клетках. На начальном этапе репарации все легкодоступные сайты связываются с репаративным комплексом и репарируются. Центромерный гетерохроматин остается труднодоступным районом для репарации и, как предполагается, динамика связывания белков репарации с сайтами в этом районе низкая (Cann, Dellaire, 2010; Goodarzi et al., 2008; Lorat et al., 2012). То есть все репаративные комплексы первоначально активны в легкодоступных сайтах эухроматина. Для того чтобы репарация произошла в районах гетерохроматина, необходимо, чтобы в данных участках сильно компактизованной ДНК произошла реорганизация хроматиновых фибрилл с образованием эухроматин-подобного состояния, где посадка репаративных белков становится возможной (Peterson, 2011). Вероятно, после завершения репарации повреждений ДНК в легкодоступных сайтах, факторы репарации одновременно перемещаются в сайты повреждения релаксированного центромерного гетерохроматина. И по-видимому, количество этих комплексов превышает количество поврежденных сайтов, которые должны быть восстановлены, что и является причиной одномоментного охвата всех повреждений, локализованных в центромерном гетерохроматине. Очевидно, что такая ситуация привязана к дозам цитостатика и количеству индуцируемых им МЦС.

4. Определение времени обработки сложнопозиционным препаратом ДНК-микс после обработки цитостатиком. Для успешной работы режима препарат ДНК-микс необходимо вводить разово каждый раз после инъекции цитостатика в точку демаркации фаз NER и HR. В этом случае одна составляющая препарата интерферирует процесс NER, а вторая – процесс HR. Время введения препарата ДНК-микс определяется исходя из графика репаративного цикла, полученного на втором этапе анализа (точка, когда количество ДЦР после обработки цитостатиком максимальное, или середина плато, если между временем достижения максимального значения ДЦР и началом снижения количества ДЦР существует отрезок времени).

5. Добавление к полученной схеме четвертой (финальной) обработки цитостатиком и препаратом ДНК-микс. Цитостатик вводится в день накопления клеток в G2/M-фазе

клеточного цикла, предшествующий выходу клеток из G2/M в G1-фазу (данные, полученные на третьем этапе анализа). Препарат ДНК-микс вводится по той же схеме: в момент перехода процессов NER и HR.

Таким образом, основываясь на результатах, полученных в настоящей работе и полученных нами ранее, был сформулирован принцип интерференции процесса репарации в ОСК за счет попадания в нужный момент внутрь клетки фрагментов экстраклеточной дцДНК. Был обнаружен механизм синхронизации ОСК в определенной, чувствительной для препаратов фазе клеточного цикла.

Заканчивая раздел, еще раз суммируем основной посыл полученных результатов. На основе найденных биологических феноменов был разработан терапевтический режим воздействия на злокачественные новообразования «Каранахан», использующий малодозовое хронометрическое воздействие цитостатиком, дополненное инъекциями сложнокомпозиционного препарата на основе дцДНК, зависящее от времени репаративного цикла конкретной опухоли.

Режим «Каранахан» был успешно апробирован на различных опухолевых моделях мышей и человека, чему посвящен следующий раздел результатов.

3.7. Применение нового терапевтического режима «Каранахан» на модельных опухолевых системах

3.7.1. Модель карциномы мышцы Кребс-2

Карцинома Кребс-2 может перевиваться животным в двух вариантах: солидном и асцитном, полученным из солидной формы (Klein, Klein, 1951). Первоначально была выбрана асцитная форма опухоли, так как (1) при нахождении клеток в «суспензии» технически существенно проще производить все аналитические процедуры, (2) клетки при инъекциях препарата дцДНК в асцит будут получать равномерный доступ к препарату, что необходимо для эффективного лечения с использованием режима «Каранахан», (3) асцитная форма Кребс-2 является в высшей степени злокачественным новообразованием, где средняя продолжительность жизни животных не превышает 14–17 суток от момента перевивки (2 млн клеток).

3.7.1.1. Модель карциномы мышцы Кребс-2 в асцитной форме

Для разработки схемы введения препаратов ЦФ и ДНК-микс, представляющих собой лечение с использованием режима «Каранахан», было необходимо выполнить все экспериментальные процедуры, описанные в предыдущем разделе (3.6).

Как уже говорилось, схема введения препаратов представляет собой четырехкратное введение кросслинквирующего цитостатика (ЦФ или ММС) и сложнокомпозиционного препарата на основе дцДНК (ДНК-микс). В процессе репарации МЦС, вызванных воздействием кросслинквирующего цитостатика, выделяют две фазы: NER и HR. Первая характеризуется повышением до максимального количества ДЦР, в ходе второй фазы эти разрывы репарируются. Таким образом увеличение ДЦР и их снижение до базового уровня определяют начало и конец репарации МЦС, то есть продолжительность репаративного цикла. Время первых трех обработок цитостатиком определяется длительностью репаративного цикла опухолевых клеток после обработки их кросслинквирующим цитостатиком. Четвертая (финальная) обработка цитостатиком проводится в момент синхронизации ОСК после трехкратной обработки цитостатиком. ДНК-микс вводится четырехкратно через один и тот же промежуток времени после каждого введения цитостатика. Время введения ДНК-микс соответствует максимальному содержанию ДЦР, определенному в ходе анализа репаративного цикла опухолевых клеток после обработки их кросслинквирующим цитостатиком.

Соответственно, для составления схемы лечения согласно режиму «Каранахан» необходимо: (1) определить наличие в опухоли TAMRA+ клеток; (2) определить временные параметры репаративного цикла – возвращение к базовому количеству ДЦР (для определения времени введения цитостатика) и максимальное количество ДЦР после обработки опухолевых клеток кросслинквирующим цитостатиком (для определения времени введения ДНК-микс); (3) определить время синхронизации клеток после трехкратной обработки кросслинквирующим цитостатиком (для определения времени финальной обработки цитостатиком).

Ранее показано, что от 2.8 ± 2.1 % асцитных клеток Кребс-2, которые являются ОСК, способны захватывать фрагменты экстраклеточной дцДНК (**Рисунок 6**).

Для определения времени накопления и репарации ДЦР после воздействия цитостатика ЦФ (репаративный цикл) мыши, несущие асцит, получали внутрибрюшинную инъекцию ЦФ (100 мкг/кг). Через каждые 6 часов у обработанных мышей отбирали асцит и проводили оценку количества ДЦР.

Количество фокусов репарации в клетках Кребс-2 оценивали двумя способами: с помощью антител к гистону γ H2AX, который фосфорилируется в местах разрывов нити ДНК (Niedernhofer et al., 2004), а также методом «комет» (comet assay) (Collins, 2004; Rojas, Lopez, Valverde, 1999). В первом случае было проведено четыре независимых серии экспериментов. Фокусы репарации, окрашенные конъюгированными с флуоресцентной меткой антителами,

оценивали или с помощью проточной цитометрии, или непосредственно на цитологических препаратах (Рисунок 34 А).

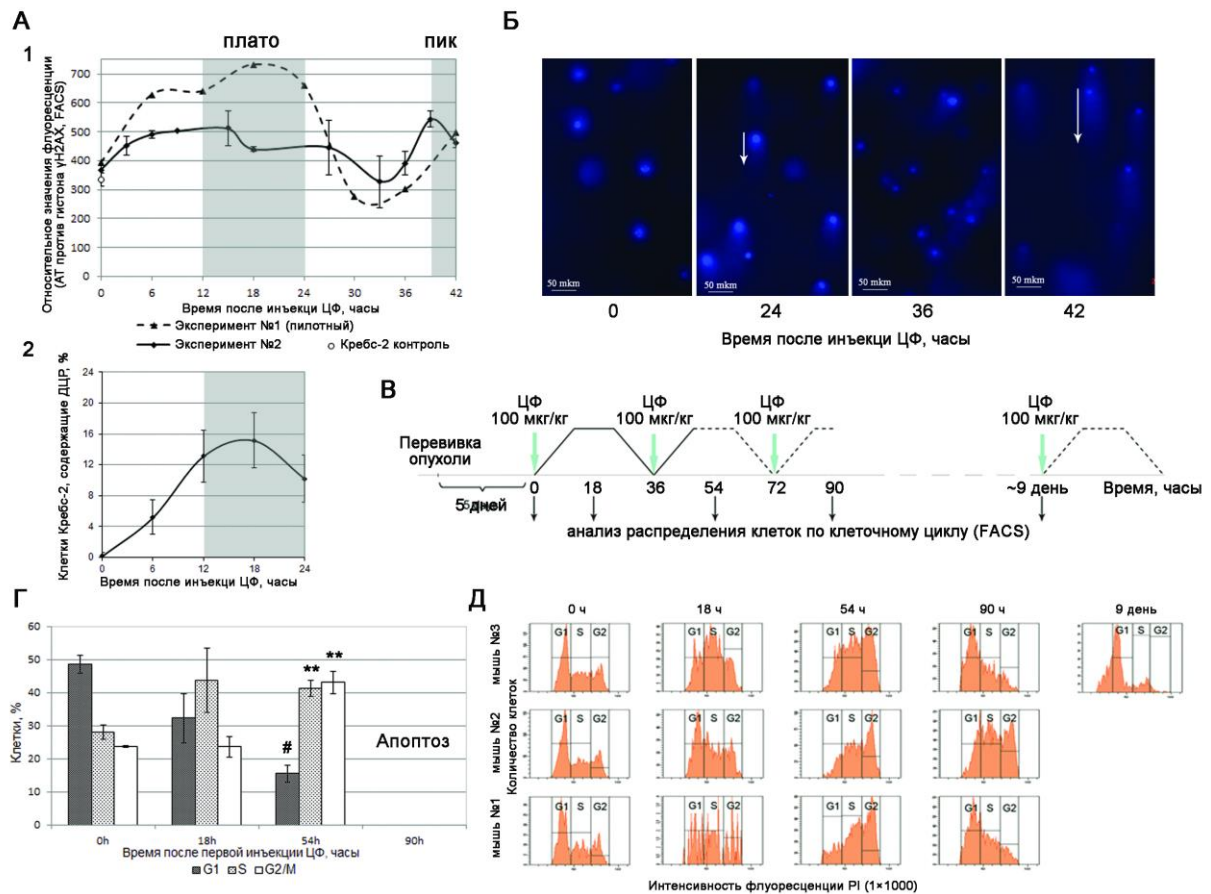


Рис. 34. Анализ биологических характеристик опухолевых клеток Кребс-2 мыши, необходимый для разработки терапевтической схемы введения ЦФ и препарата ДНК-микс согласно режиму «Каранахан». **А)** Определение времени репаративного цикла при помощи оценки динамики появления и снижения ДЦР, индуцированных обработкой ЦФ. **1)** Результаты двух независимых экспериментов по оценке методом FACS количества фокусов репарации, образованных гистоном γ H2AX; **2)** график процентного содержания клеток, содержащих фокусы репарации ДЦР (выполнено при помощи анализа цитологических препаратов на флуоресцентном микроскопе). **Б)** Оценка времени появления и снижения ДЦР методом «комет». Прослеживается соответствие времени появления и исчезновения характерного шлейфа «хвоста» (отмечено стрелками) и времени максимального и минимального количества ДЦР. **В)** Схема эксперимента по анализу клеточного цикла клеток Кребс-2 на фоне обработки цитостатиком по схеме «Каранахан». Динамика накопления и репарации ДЦР после обработки цитостатиком (репаративный цикл) схематично иллюстрирована кривой линией. **Г)** График, отображающий процентное соотношение клеток в разных фазах клеточного цикла в нулевую точку, через 18 и 54 часа после начала обработок. Приведено Mean $\pm$ SD (n = 3); #p<0.001; **p<0.01, достоверность результатов оценивалась относительно контроля (0 часов) с использованием критерия Манна-Уитни с учетом поправки Бонферони для множественных сравнений. **Д)** Плоты, полученные при помощи FACS-анализа, демонстрирующие распределение популяции опухолевых клеток по фазам клеточного цикла.

Во втором этом случае в программе CASP анализировали показатель «*хвостового момента*» (tail moment), который представляет собой параметр, представленный в относительных единицах измерения программы: процентное содержание ДНК в хвосте $\times$ длину хвоста (Collins, 2004). Такой метод анализа является одним из стандартизованных и общепринятых для оценки состояния целостности ДНК в клетках, кроме того он более универсален и удобен в использовании. Результаты анализа количества ДЦР в клетках методом «комет» не противоречили данным, полученным с использованием антител (**Рисунок 32 Б**). В дальнейшем было принято решение проводить оценку количества ДЦР с помощью метода «комет».

Результаты проведенного анализа свидетельствовали, что фаза накопления ДЦР составляет первые 12 часов (этап NER). После формирования всей совокупности ДЦР в асцитных клетках наблюдается длительный (12–24 часа) промежуток времени «ожидания», когда количество ДЦР не меняется. Далее с 24 до 36 часов после инъекции ЦФ идет фаза репарации ДЦР (этап HR) (**Рисунок 34 А, Б**). Таким образом, полное время цикла репарации клеток Кребс-2 составляет 36 часов с точкой перехода NER в HR в 18 часов (середина отрезка времени «ожидания»).

Для определения дня финальной (четвертой) обработки цитостатиком и препаратом ДНК-микс согласно терапевтическому режиму «Каранахан», было проанализировано время накопления клеток в G2/M-фазе клеточного цикла и время синхронного выхода клеток в чувствительную для терапии G1-фазу клеточного цикла. Для этого мышам трехкратно вводили ЦФ. Первая инъекция считалась «нулевой точкой», две последующие инъекции – в момент завершения цикла репарации, вызванного воздействием предыдущей инъекции цитостатика (без временной «поправки», так как снижения количества ДЦР через 6 часов после первой обработки ЦФ не наблюдалось): 0, 36, 72 ч, соответственно. Клетки отбирали для анализа клеточного цикла (**Рисунок 34 В-Д**). Установлено, что последовательные инъекции ЦФ в четко определенные временные точки приводят к остановке опухолевых клеток в S-фазе к 18 часам и сдвигу «ареста» в позднюю S/G2/M к 54 часам эксперимента ($p < 0.01$). Начиная с 90 часов и вплоть до девятых суток с момента первой инъекции ЦФ четкое деление клеток по количеству хроматина исчезает. В этот период времени клеточный материал уходит в зону апоптотического «мусора» (эксперимент повторен дважды). К девятым суткам оставшаяся клеточная популяция опухолевых клеток переходит в G1-фазу клеточного цикла (**Рисунок 34 Д**).

Анализ количества TAMRA+ клеток в асците Кребс-2, сконцентрированном на кольце фиколл-верографикового градиента (что позволяет отделить сохранившие морфологическую

целостность асцитные опухолевые клетки), свидетельствовал о существенном обогащении указанной популяции TAMRA+ клетками. Оценочный процент таких клеток в фиколла-верографиновом кольце составил 12.9 %, что более чем в 10 раз выше, чем в необработанном асците (данные не приведены). Совокупность полученных данных дает основание предполагать, что в анализируемую фазу терапевтической обработки, помимо апоптотического разрушения основной массы клеток асцита Кребс-2, сохранившиеся клетки, включая TAMRA+ ОСК, синхронно перешли в чувствительную к воздействию препарата ДНК-микс G1/S-фазу клеточного цикла.

Таким образом, к девятым суткам сохранившие жизнеспособность TAMRA+ ОСК и часть коммитированных опухолевых клеток выходят из репаративного процесса и стремятся завершить деление. Происходит синхронизация всех выживших после проведенной терапии остаточных ОСК, и они одновременно входят в следующую G1-фазу после предшествующей остановки в G2/M. Именно эта точка является критической для эрадикации ОСК из развитой опухоли. Препарат ДНК-микс вводится в точку демаркации двух фаз репаративного процесса, определенную на первых этапах исследования (18 часов, середина отрезка времени «ожидания»). Последующий анализ показал, что через несколько суток после такой синхронизации происходит естественное расхождение опухолевых клеток, в том числе и ОСК, по фазам клеточного цикла. Если пропустить время найденной синхронизации, то в обязательном порядке возникнут рецидивы, вызванные сохранившимися ОСК.

Основываясь на данных экспериментов по анализу биологических параметров клеток Кребс-2, была определена следующая схема лечения экспериментальных животных согласно терапевтическому режиму «Каранахан» (**Рисунок 35 А**).

Было проведено два полномасштабных эксперимента для проверки эффективности режима «Каранахан». В первом эксперименте ЦФ вводили мышам внутрибрюшинно в дозировке 100 мкг/кг по схеме 0, 36, 72 часа (в конечные точки каждого предыдущего цикла репарации ДЦР) и на 8-е сутки с момента первой инъекции – в день, предшествующий синхронному выходу клеток в G1-фазу клеточного цикла, чувствительную для обработки препаратом ДНК-микс. Препарат ДНК-микс вводили внутрибрюшинно в асцитную опухоль в дозировке 6 мг/инъекцию через 18 часов после каждой инъекции цитостатика (в точку перехода двух фаз репарации – от NER к HR).

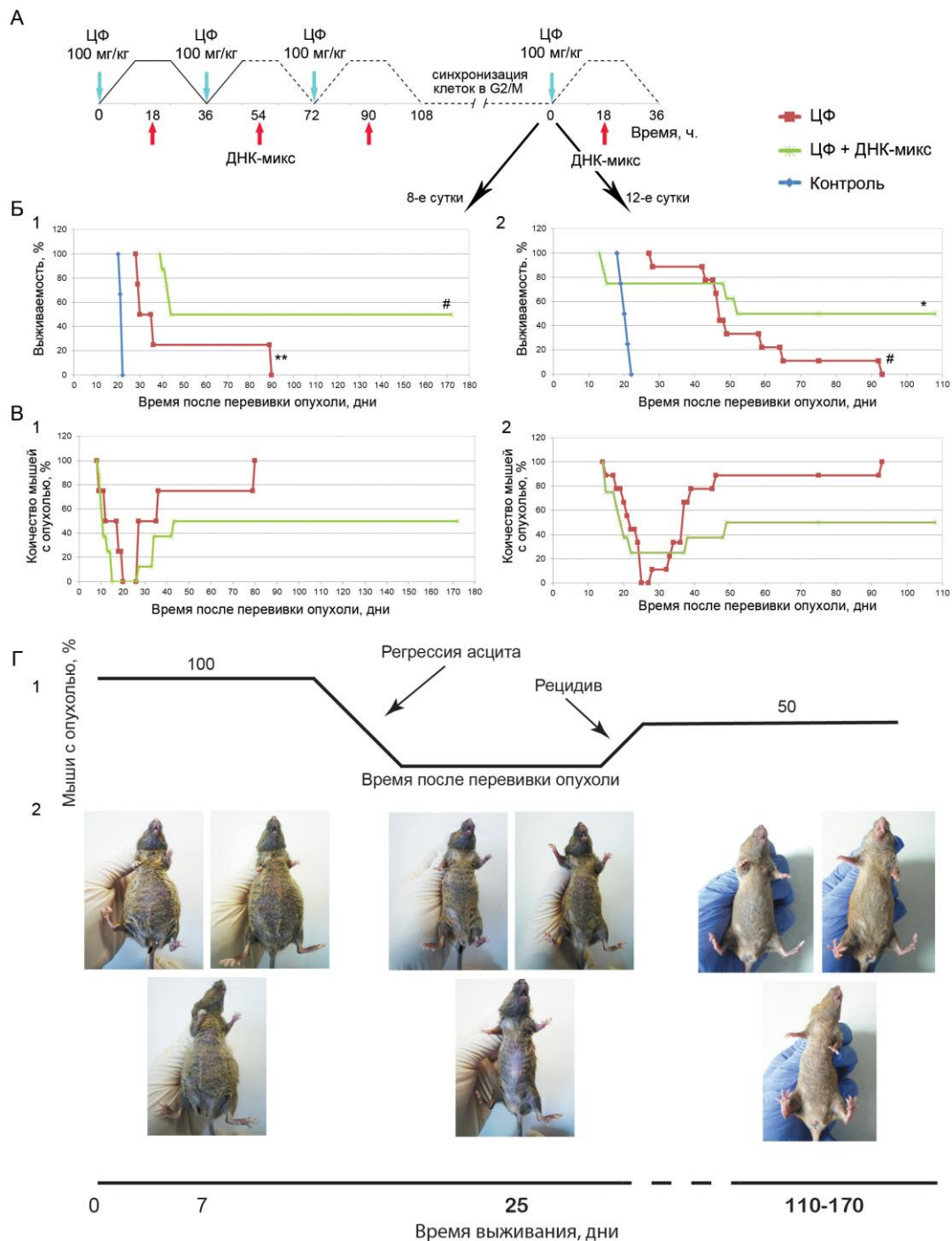


Рис. 35. Анализ лечения экспериментальных животных с асцитной формой опухоли Кребс-2 согласно терапевтическому режиму «Каранахан». **А)** Общая схема введения препаратов ЦФ и ДНК-микс. **Б)** Графики, отображающие результаты лечения – кривые Каплана-Мейера. **В)** Динамика фаз регрессии, ремиссии и рецидива асцита в экспериментальных группах. (1) Финальная обработка препаратами ЦФ и ДНК-микс была произведена на 8-е сутки с момента начала лечения; (2) финальная обработка ЦФ и препаратом ДНК-микс на 12-е сутки с первой инъекции цитостатика. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; # $p < 0.001$, логарифмический ранговый тест, сравнивается выживаемость экспериментальных групп по сравнению с контролем. **Г)** Иллюстрация результата лечения. (1) Общая схема динамики исчезновения первичного асцита и появления вторичного, произошедших с экспериментальными животными после

проведенной терапевтической процедуры и до 170-х суток эксперимента; (2) демонстрация мышей до терапии (левая группа панелей), в момент регрессии асцита (примерно на 25-е сутки от первой инъекции ЦФ, средняя группа панелей) и вылеченных мышей на 150-е сутки эксперимента (правая группа панелей).

Предложенная схема введения препаратов позволила в 50 % случаев полностью вылечить мышей от асцита Кребс-2 ($n = 8$, $p < 0.001$ по сравнению с контролем по данным логарифмического рангового теста) (**Рисунок 35 Б-1, В-1**). Результаты эксперимента свидетельствуют, что и ЦФ (в режиме 4-х инъекций без введения в терапию препарата ДНК-микс), и комбинированное действие ЦФ и препарата дцДНК демонстрируют ярко выраженный терапевтический эффект на развитие асцита. Однако в группе, получавшей ЦФ в виде монопрепарата («ЦФ»), у всех мышей развился вторичный асцит, и они все погибли к 80-м суткам наблюдения. Тем не менее в данной группе отмечено достоверное увеличение продолжительности жизни мышей относительно контроля ($n = 8$; $p < 0.01$). Также было отмечено, что лечение по схеме ЦФ+ДНК-микс достоверно увеличивает продолжительность жизни экспериментальных животных по сравнению с группой, где вводили цитостатик в виде монопрепарата ($p < 0.01$).

Патологоанатомический анализ тканей и органов животных экспериментальных групп в сравнении с контролем позволил сделать следующее заключение. В экспериментальных группах перитонеальный канцероматоз отсутствует. Свободных опухолевых клеток в брюшной полости, а также обрастания органов брюшной полости клетками опухоли не обнаруживается. У животных контрольной группы развивается типичная картина канцероматоза с диссеминацией клеток опухоли по полости брюшины. Опухолевые узлы разной величины обнаруживаются на поверхности печени, селезенки, тонком и толстом кишечнике и поджелудочной железе. В группе «ЦФ» основные нарушения выявлялись в легких, где у трех проанализированных животных имеются признаки метастазирования опухолевых клеток. В этой же группе у одного животного в результате обструкции выводных протоков наблюдался отек и некроз ацинусов поджелудочной железы. У одного проанализированного животного в группе «ЦФ+ДНК-микс», погибшего без асцита, никаких патологий обнаружено не было (данные не приведены).

Во втором эксперименте финальная (четвертая) обработка препаратами была проведена на 12-е сутки после первой инъекции ЦФ (16-е сутки от перевивки асцита), то есть на четверо суток позже, чем в первом эксперименте (**Рисунок 35 Б-2, В-2**). Такой подход позволил частично оценить продолжительность терминального терапевтического отрезка времени. По данным, полученным в работе (Dolgova et al., 2012b), фрагменты экстраклеточной

дцДНК детектируются во внутренних компартментах клеток до 13-х суток с момента интернализации. Это предполагало, что финальный терапевтический «удар» может быть эффективным на протяжении нескольких суток, когда происходит синхронизация опухолевых клеток в G2/M и синхронный переход этих клеток в G1/S.

Так же, как и в первом эксперименте, обе группы, получавшие терапию, продемонстрировали высокий терапевтический эффект. В группе «ЦФ+ДНК-микс» к 110-м суткам эксперимента сохранялось без признаков вторичного асцита 50 % животных ($n = 10$, $p < 0.05$). В группе «ЦФ» все мыши погибли к 90-м суткам от начала эксперимента ($n = 9$), также имеется достоверное отличие ($p < 0.001$) в продолжительности жизни по сравнению с контролем ($n = 4$). Между двумя экспериментальными группами («ЦФ» и «ЦФ+ДНК-микс») достоверного отличия нет, однако безрецидивная выживаемость у 50 % животных свидетельствует о влиянии добавления препарата ДНК-микс в терапию (**Рисунок 35 Б-2, В-2**).

Выжившие животные (самки) из группы «ЦФ+ДНК-микс» были разбиты на группы и ссажены с самцами (по 2 на 4 самки). Через два месяца у трех самок из обоих экспериментов появилось здоровое потомство: 9, 8 и 9 мышат соответственно. Одна мать съела мышат на третьи сутки (по всей вероятности, из-за отсутствия молока). У второй особи мышата погибли на вторые сутки, так же, по всей видимости, от голода вследствие отсутствия молока. Эта мышь принесла помет повторно, причем мышата жили и развивались нормально. Третья мышь так же съела новорожденных мышат.

Гибель животных в экспериментальных группах обуславливалась двумя причинами. Первое – это развитие вторичной опухоли. Второе – развитие полиорганной недостаточности. Среди погибших животных (50 % от общего числа) в 25–30 % случаев гибель была связана с развитием указанного синдрома. Общий вид течения эксперимента и соответствующий вид животных на определенных стадиях эксперимента приведены на **Рисунке 35 В**.

Полученные результаты свидетельствовали о высокой эффективности примененного режима. 50 % животных в двух повторах эксперимента полностью вылечились от неизлечимой скоротечной асцитной формы карциномы Кребс-2, что в первом приближении кажется невероятным.

3.7.1.2. Модель карциномы мыши Кребс-2 в солидной форме

После получения положительного результата в вылечивании асцитной формы карциномы Кребс-2, была проведена серия экспериментов по лечению солидного трансплантата Кребс-2. Проверка эффективности терапевтического режима на этой же опухолевой модели, только в ее солидном варианте, дала возможность сравнить

эффективность доставки препарата как в асците, так и в солидном трансплантате. Такое сравнение позволило оценить принципиальную возможность использования режима для солидных опухолей.

Для лечения солидных опухолей была использована та же схема введения ЦФ и препарата ДНК-микс, что и для асцитного варианта (**Рисунок 35 А**). Мышам было перевито внутримышечно по 300 тыс. клеток асцита Кребс-2. Через семь дней после перевивки, когда опухоль достигла размера $\sim 0.5 \text{ см}^3$, мышей обработали в соответствии с разработанной схемой: три внутрибрюшинных инъекции ЦФ в дозе 100 мг/кг с интервалом в 36 часов и внутриопухолевые инъекции препарата ДНК-микс в дозе 0.5 мг/инъекцию через 18 часов после каждой инъекции цитостатика (эрадикация основной массы ОСК Кребс-2). Для эффективной доставки препарата ДНК-микс к максимальному количеству клеток, одна обработка препаратом разбивалась на три инъекции в разные участки солидного узла. В качестве финального дня обработки были выбраны 8-е сутки после первой инъекции ЦФ. Этот режим был выбран, как показавший достоверно более высокую эффективность при лечении асцитной формы опухоли по сравнению с финальной обработкой на 12-е сутки (**Рисунок 35 Б, В**).

В случае асцитной формы опухоли в качестве показателя эффективности терапии использовали параметр продолжительности жизни животных, так как измерение размера или объема такой опухоли прижизненно было технически сложным и недостоверным. В случае солидных трансплантатов основными критериями являлись размер опухоли и ее наличие/отсутствие. Параметр продолжительности жизни в данном случае не являлся показательным. Экспериментальные животные могут жить с достаточно объемными опухолями. По этическим соображениям мыши выводились из эксперимента при достижении объема опухоли $\sim 3.5 \text{ см}^3$, что практически не отражало их естественную гибель от заболевания.

В группе, получавшей ЦФ в виде монопрепарата, к 17-м суткам опухоль отсутствовала у всех животных в группе (**Рисунок 36А**). Начиная с 18-х суток, были отмечены устойчивые рецидивы (статистическая разница по размеру опухоли по сравнению с контролем составляет $p < 0.01$).

В группе «ЦФ+ДНК-микс» признаки графта не определялись ни у одного животного до 29-х суток. На 30-е сутки опухоль появилась у одного животного, которое вывели из эксперимента на 60-й день. Шесть из семи мышей прожили без опухоли до 85 суток эксперимента. У четырех животных опухоль не появилась до 210 суток от начала эксперимента, после чего наблюдение было прекращено ($p < 0.001$ по сравнению с контролем,

Рисунок 36 А). Между двумя группами, получавшими лечение, статистически достоверных отличий по скорости роста опухолей нет, тем не менее видно, что в группе «ЦФ» у 100 % животных возник рецидив, тогда как в группе «ЦФ+ДНК-микс» на 60-е сутки рецидив наблюдался только у 14 %.

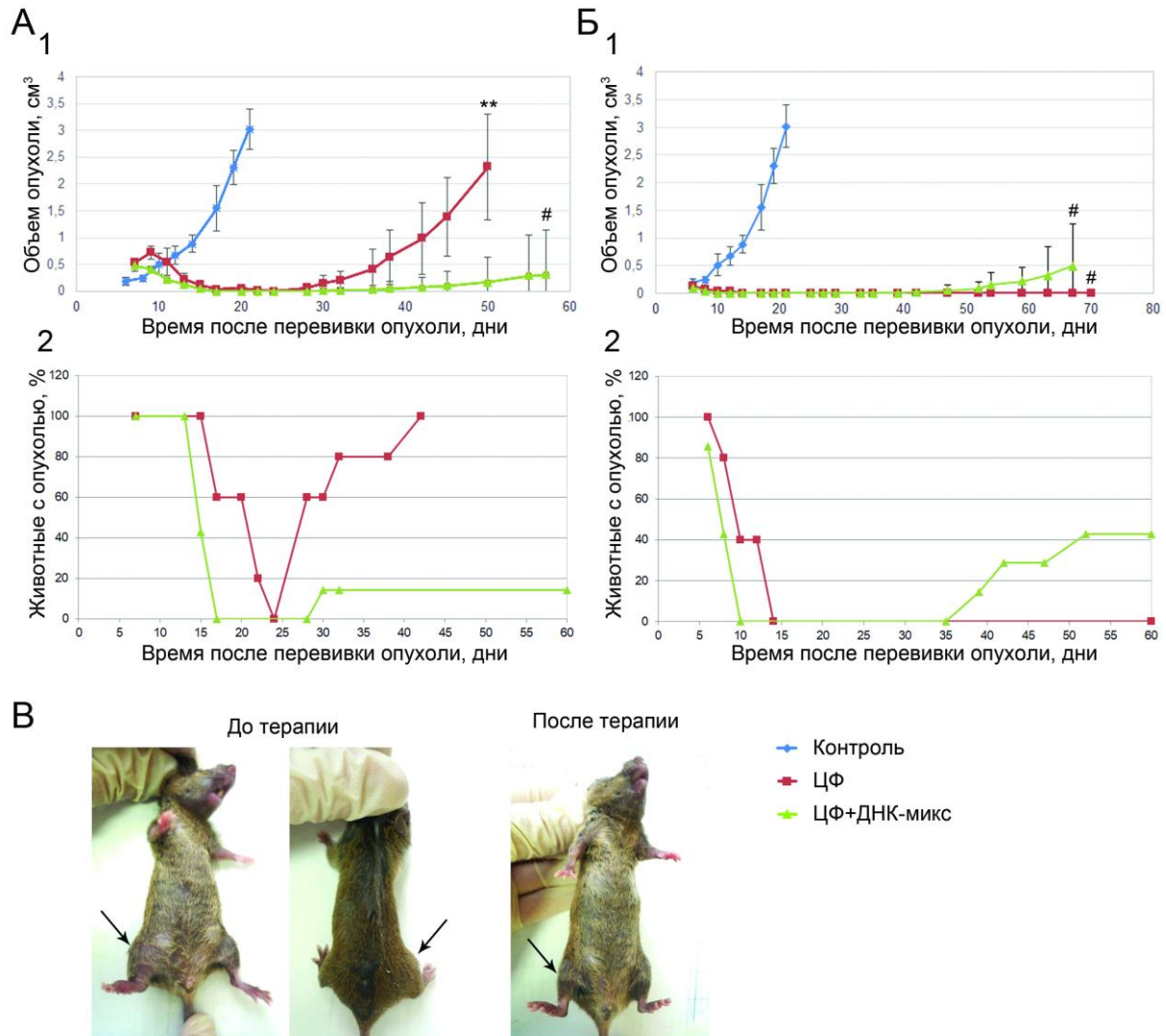


Рис. 36. Лечение солидной опухоли Krebs-2 согласно терапевтическому режиму «Каранахан». **А)** Динамика изменения размера опухоли (1) и количества животных с опухолью (2) при начале терапии трансплантата размером 0.5 см³. **Б)** Динамика изменения размера опухоли (1) и количества животных с опухолью (2) при лечении стабилизированного трансплантата на 2-е сутки с момента перевивки опухоли. **В)** Демонстрация результатов лечения. Представлено животное с опухолью исходного размера 0.5 см³ (до терапии) и то же животное, получавшее лечение ЦФ и препаратом ДНК-микс, через 210 дней от начала лечения (после терапии). Место перевивки опухоли обозначено стрелкой.

В случае стабилизированной опухоли, когда лечение начинали через двое суток после перевивки графта, в группе «ЦФ» на вторые сутки после начала терапии опухоль определялась

у всех семи животных, после чего ее признаки исчезли (**Рисунок 36 Б**). До 75-х суток эксперимента опухоль не пальпировалась ни у одного из животных. С 75-х по 110-е сутки все мыши из этой группы погибли без признаков опухоли. В группе «ЦФ+ДНК-микс» до 35-х суток опухоль не детектировалась ни у одного животного. К 60-м суткам опухоли не было у трех животных из шести. К 90-м суткам эксперимента три мыши без признаков опухоли погибли (**Рисунок 36 Б**). Достоверность разницы в скорости роста опухолей по сравнению с контролем в обеих группах, получавших терапию, составляет $p < 0.001$.

При использовании двух модельных систем, асцитной и солидной карциномы Кребс-2, убедительно продемонстрирована высокая эффективность предлагаемого режима «Каранахан». В обоих случаях в независимых экспериментах достигнуто полное вылечивание мышей от скоротечной неизлечимой карциномы (50 % случаев для асцита и до 86 % для солидной опухоли). Полученный результат обнадеживал, и в дальнейших исследованиях была проанализирована эффективность нового терапевтического режима с использованием других, не менее злокачественных, экспериментальных опухолевых моделей мыши и человека.

3.7.2. Модель асцитной гепатокарциномы мыши Г-29

3.7.2.1. Интернализация TAMRA-ДНК зонда в клетки Г-29

Чтобы оценить возможность применения терапевтического режима «Каранахан» на модели гепатокарциномы мыши Г-29, необходимо было убедиться, что в популяции опухолевых клеток присутствует субпопуляция, способная интернализировать TAMRA-ДНК зонд. Именно эти клетки, как предполагалось по аналогии с результатами экспериментов, выполненных на асците Кребс-2, являются отвечающими клетками при обработке ЦФ и препаратом ДНК-микс.

На **Рисунке 37 А-1, 2** представлен анализ процента TAMRA⁺ клеток в интактном асците Г-29 методом проточной цитометрии (1) и при подсчете на цитологических препаратах (2).

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.

3.7.2.2. Анализ репаративного цикла клеток Г-29

Анализ репаративного цикла клеток гепатокарциномы Г-29 был проведен на 10-суточном асците, когда объем развитой опухоли позволял отбирать биопсийный материал. Степень повреждения ДНК клеток асцита после однократной обработки ЦФ (накопление и репарация ДЦР) оценивали методом «комет».

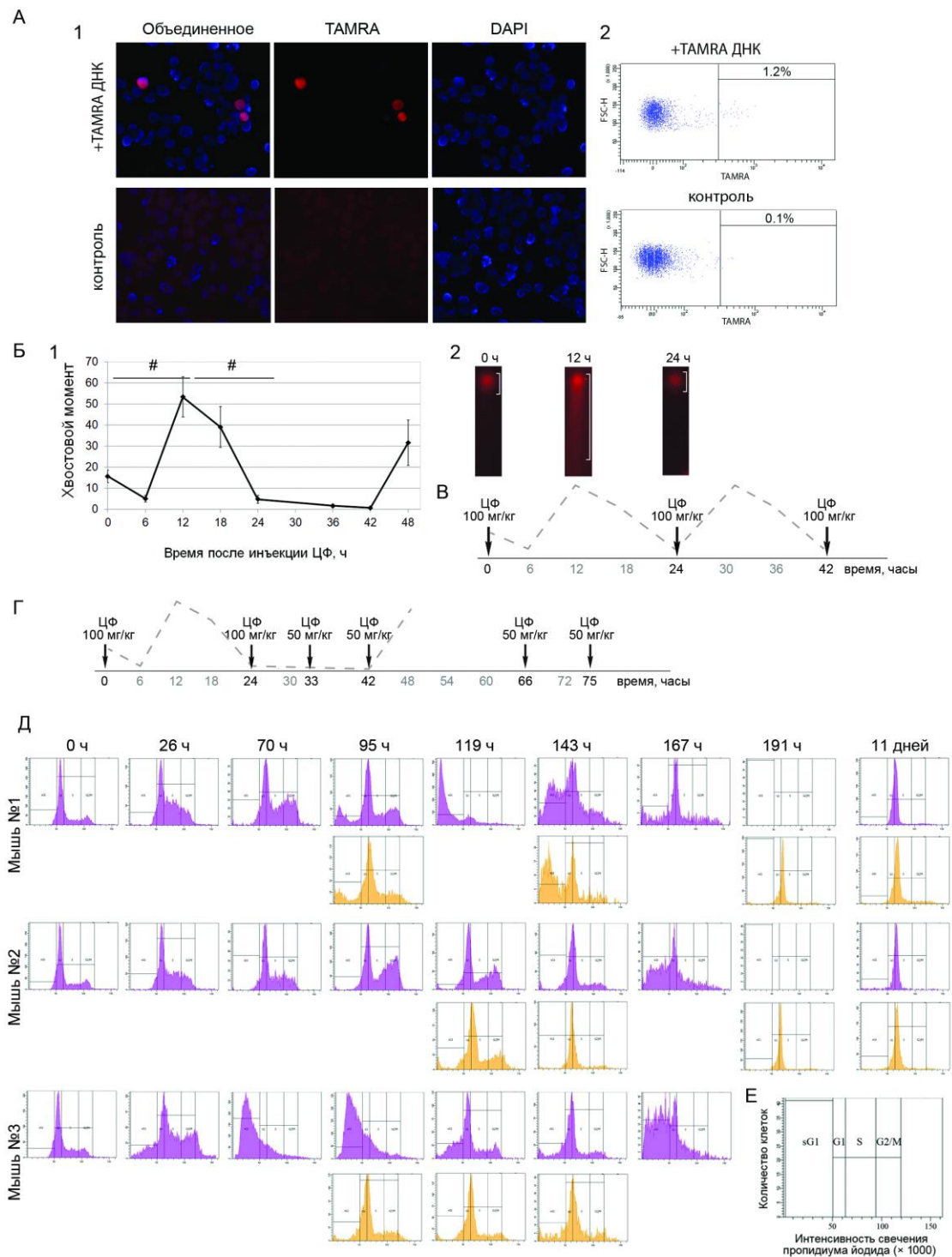


Рис. 37. Анализ биологических параметров опухолевых клеток гепатокарциномы Г-29, необходимый для разработки схемы введения ЦФ и препарата ДНК-микс согласно режиму «Каранахан». **А)** Интернализация TAMRA-ДНК зонда в клетки Г-29, растущие в асцитной форме. (1) Анализ методом флуоресцентной микроскопии; (2) анализ методом проточной цитометрии. **Б)** Анализ репаративного цикла гепатокарциномы Г-29 (увеличение и снижение количества ДЦР) методом «комет». (1) Данные, обработанные в программе CASP, представлены в виде графика, приведено Mean $\pm$ SD; # $p < 0.001$, one-way ANOVA, тест Краскела-Уоллиса; (2) демонстрационные микрофоты, характеризующие длину «кометных

хвостов», на основании которых определялись фазы репаративного цикла. **В)** Базовая схема обработки цитостатиком ЦФ, предполагающая накладывающиеся друг на друга три последовательных «ареста» клеточного цикла, позволяющие синхронизовать TAMRA+ клетки в G1/S-фазе. Динамика накопления и репарации ДЦР после обработки цитостатиком (репаративный цикл) схематично иллюстрирована пунктирной линией. **Г)** Модифицированная схема инъекций цитостатика ЦФ, на основе которой определяли клеточный цикл. **Д)** FACS-плоты, демонстрирующие распределение общей популяции клеток Г-29 по клеточному циклу после проведения терапевтических инъекций цитостатика ЦФ по схеме, приведенной в пункте «Г» (фиолетовые диаграммы). При наличии большого количества апоптотических клеток образец был предварительно очищен в фиколл-верографиновом градиенте (оранжевые диаграммы). **Е)** Схема гейтирования популяций клеток в зависимости от фазы клеточного цикла с соответствующими обозначениями.

Анализ результатов свидетельствует, что продолжительность репаративного цикла клеток гепатокарциномы Г-29 составляет 24 часа (**Рисунок 37 Б-1, 2**). Была составлена базовая схема трехкратного введения цитостатика на основе продолжительности репаративного цикла клеток Г-29, представляющая собой инъекцию ЦФ в нулевую точку (начало терапии), через 24 часа (окончание первого репаративного цикла) и через 42 часа (окончание второго репаративного цикла с учетом «поправки» (падение количества ДЦР в течение первых 6-и часов после обработки цитостатиком, подробно описано в разделе 3.6) (**Рисунок 37 В**).

3.7.2.3. Анализ времени синхронизации клеток Г-29

Следующим необходимым элементом при разработке новой терапевтической стратегии являлся этап определения времени синхронизации опухолевых клеток, включая ОСК (TAMRA+ клетки), в определенной фазе клеточного цикла. Исходя из многочисленного опыта проведения подобных экспериментов на разных опухолевых моделях, нами было отмечено, что синхронизация может детектироваться как в G2/M, так и в G1/S-фазе клеточного цикла, в зависимости от времени взятия образца опухоли.

Для гепатокарциномы Г-29 параллельно с анализом клеточного цикла в одних и тех же биопсийных образцах была определена доля TAMRA+ клеток. Значимый поцентный прирост этого типа клеток в определенный день после начала терапии на фоне масштабного апоптоза коммитированных опухолевых клеток означает синхронизацию ОСК в наблюдаемой фазе клеточного цикла. Дополнительно к базовой схеме были выбраны более сложные терапевтические режимы (**Рисунок 37 Г**), что было связано с неоднозначной трактовкой результатов оценки времени репаративного цикла. Многократно проведенный анализ репаративного цикла не дал однозначно трактуемых результатов об изменении количества ДЦР (следовательно, и об оценке фазы репаративного цикла для популяции клеток, находящейся в нечувствительной фазе клеточного цикла при первой обработке ЦФ) на отрезке

времени после 24-часовой точки. В этой связи режим введения цитостатика был определен, исходя из следующих соображений. Две инъекции ЦФ в дозе 100 мг/кг должны охватывать основной пик репарации ДЦР (0 и 24 часа). Две инъекции ЦФ в дозе 50 мг/кг, на 42-м и 66-м часу, – начало и конец второго цикла репарации ДЦР. Дополнительные инъекции ЦФ 50 мг/кг в точки между репаративными циклами (33 и 75 часов), как предполагалось, необходимы для того, чтобы воздействовать на клетки второй волны репаративного цикла, которые мы, по-видимому, не детектируем.

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-верографиновом градиенте и также анализировали методом проточной цитометрии (**Рисунок 37 Д, Е**).

Показано, что со 2-х по 11-е сутки клеточный цикл популяции асцитных клеток гепатокарциномы Г-29 претерпевает существенные изменения. Наблюдается отчетливый сдвиг в G2 и последующая стабилизация клеток в G1/S, которая на 8-е и 11-е 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 во всех группах к последним дням наблюдения, не удалось получить данные в объеме, необходимом для корректной статистической обработки для всех временных интервалов (**Рисунок 37 Д, Е**).

Параллельно с оценкой клеточного цикла на пятые сутки клетки инкубировали с TAMRA-ДНК зондом, и процент TAMRA+ клеток определяли микроскопическим анализом. На **Рисунке 38** представлены результаты анализа доли TAMRA+ клеток в биоптатах асцита, взятых у мышей по ходу проведения эксперимента. На графике приведены значения процентного содержания TAMRA+ клеток посуточно до 11-го дня от начала терапии для всех мышей группы (n = 3, мышь № 3 на 6-е сутки погибла).

Показано, что предложенный режим приводит к накоплению относительного количества TAMRA+ клеток на ~5–6-е сутки от первой инъекции цитостатика. Дальнейший анализ свидетельствует, что такие клетки полностью исчезают из анализируемых образцов к 8–11-м суткам эксперимента. На **Рисунке 38 Б** продемонстрированы снимки цитологических препаратов асцитных клеток до эксперимента и на 6 и 11 сутки от первой инъекции ЦФ. 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 фрагментируются. В образцах, взятых в этот день, TAMRA+ клетки не обнаруживаются.

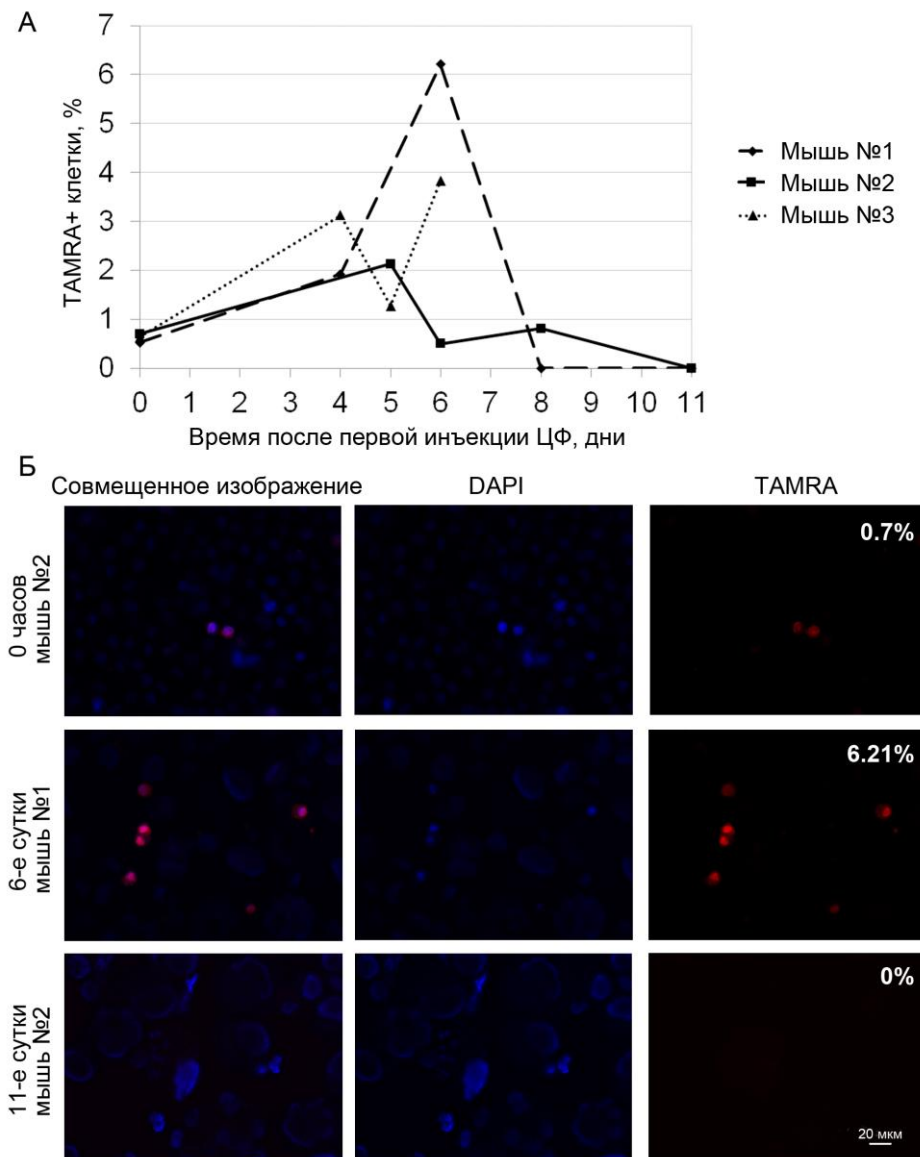


Рис. 38. Ежедневный анализ доли TAMRA+ ОСК в асците Г-29 после обработки мышей по схеме, приведенной на Рисунке 37 Г. **А)** Процент TAMRA+ клеток, оцененный индивидуально для трех животных. **Б)** Демонстрация цитологических препаратов. Видна разница в размере клеток Г-29 после обработок цитостатиком. Масштаб для всех снимков один. DAPI – окраска ядра (хроматина); TAMRA – флуоресцентный сигнал экстраклеточного ДНК зонда.

В этом эксперименте также был проведен анализ клеточного цикла в трех наиболее отличающихся по количеству TAMRA+ клеток временных точках (**Рисунок 39**). На 6-е 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.

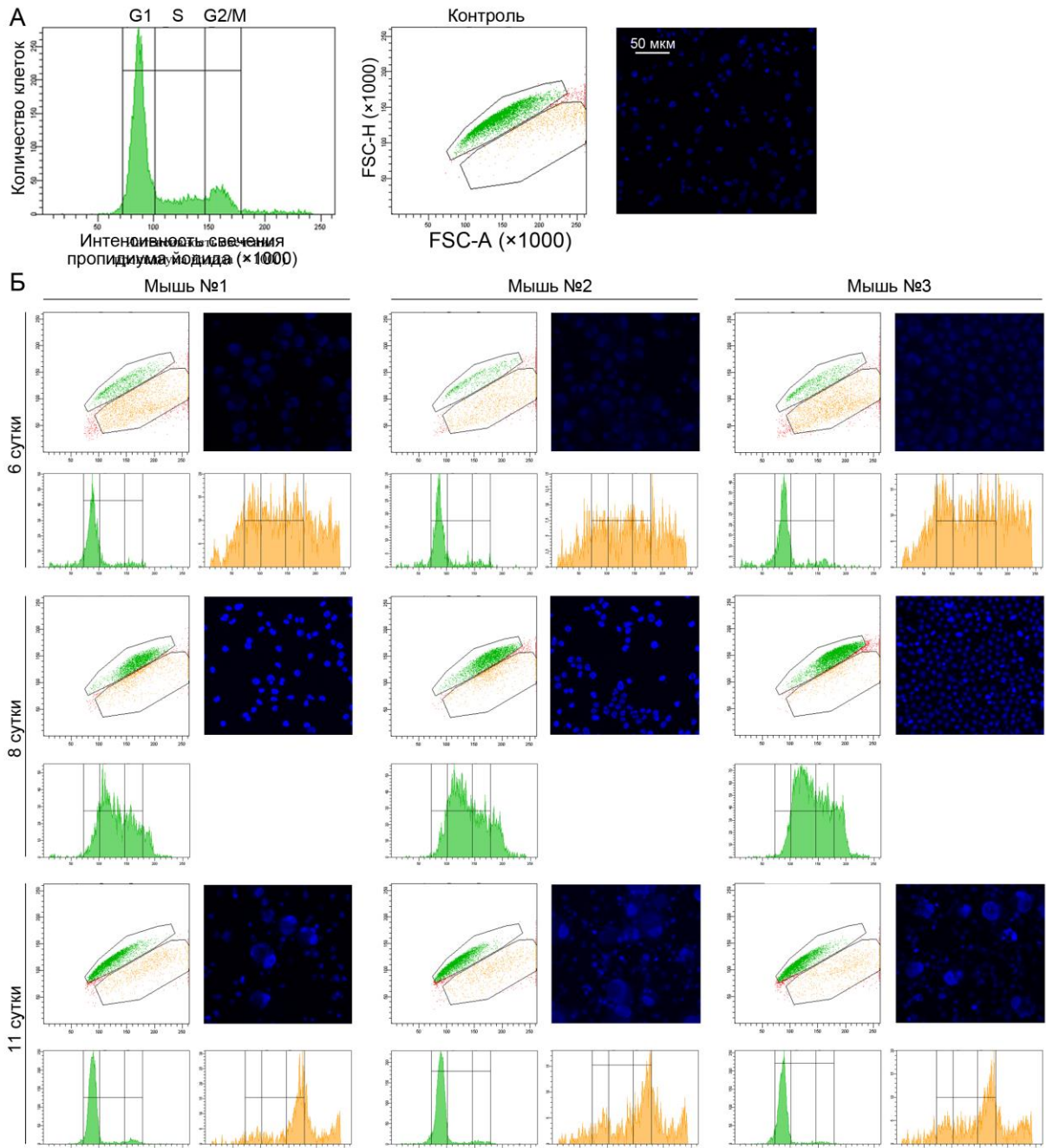


Рис. 39. Анализ состояния клеток асцита Г-29 после обработки ЦФ по схеме, указанной на Рисунке 35 Г. Анализ выполнен индивидуально для трех мышей на 6-е, 8-е и 11-е сутки после первой инъекции ЦФ. **А)** Распределение по клеточному циклу в исходной популяции асцитных клеток (слева). Плот (справа) показывает распределение клеток по размеру и гранулированности (зеленое и оранжевое облака). **Б)** Аналогичный анализ клеток асцита Г-29 после обработки ЦФ по разработанной схеме на 6-е, 8-е и 11-е сутки. Диаграммы (зеленая и оранжевая) показывают распределение клеток асцита по клеточному циклу отдельно для каждой выделенной популяции клеток. Визуальное состояние клеток на цитологическом препарате приведено справа. Изображения, полученные при помощи микроскопического анализа, приведены в одном масштабе, окраска DAPI (хроматин).

На плотях, обозначенных зеленым цветом, на 6-е сутки распределение клеток по клеточному циклу не отличается от распределения клеток в необработанном асците. На 8-е сутки четко видно смещение пика в G2/M с последующим возвращением в G1 на 11-е сутки, при этом в S/G2/M клетки практически отсутствуют (**Рисунок 39 Б**).

На плотях, обозначенных оранжевым цветом, на 6-е сутки видно смещение клеток по содержанию хроматина в G2/M и выравнивание количества клеток по всем выставленным гейтам, включая область апоптоза. На 8-е сутки популяция крупных клеток исчезает. На 11-е сутки популяция крупных клеток появляется снова. При этом содержание хроматина в этих клетках или соответствует G2/M-фазе, или выпадает за границы гейта в сторону увеличения содержания ДНК (**Рисунок 39 Б**).

Морфология общей популяции асцитных клеток характеризуется следующими изменениями. На 6-е сутки часть суммарной популяции асцитных клеток увеличивается в размерах, формируя независимую популяцию. На 8-е сутки популяция клеток крупного размера исчезает, при этом популяция «нормальных клеток» смещается в G2/M. На 11-е сутки популяция клеток «нормального» размера по содержанию ДНК попадает в ворота, определенные для G1-фазы клеточного цикла. При этом данная популяция микроскопически выглядит как остатки деградированных клеток. Клетки появившейся вновь крупной популяции имеют неправильную овальную форму, крупные, часто содержащие фрагментированные ядра. Общая цитологическая картина свидетельствует о масштабной деградации клеток асцита (**Рисунки 38 Б, 39 Б**).

Полученные результаты предполагают, что существенные изменения с клетками асцита произошли на 6-е и 11-е сутки от начала терапии, где обнаруживается накопление относительного количества TAMRA+ ОСК и смещение (синхронизация) в G2/M для одной, и смещение (синхронизация) в G2/M для второй дифференцированной популяции асцитных клеток.

3.7.2.4. 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») (**Рисунок 37 Г**), так и стандартная схема «3+1» (**Рисунок 37 В**). Также в предварительных экспериментах тестировалось количество вводимого препарата ДНК-микс.

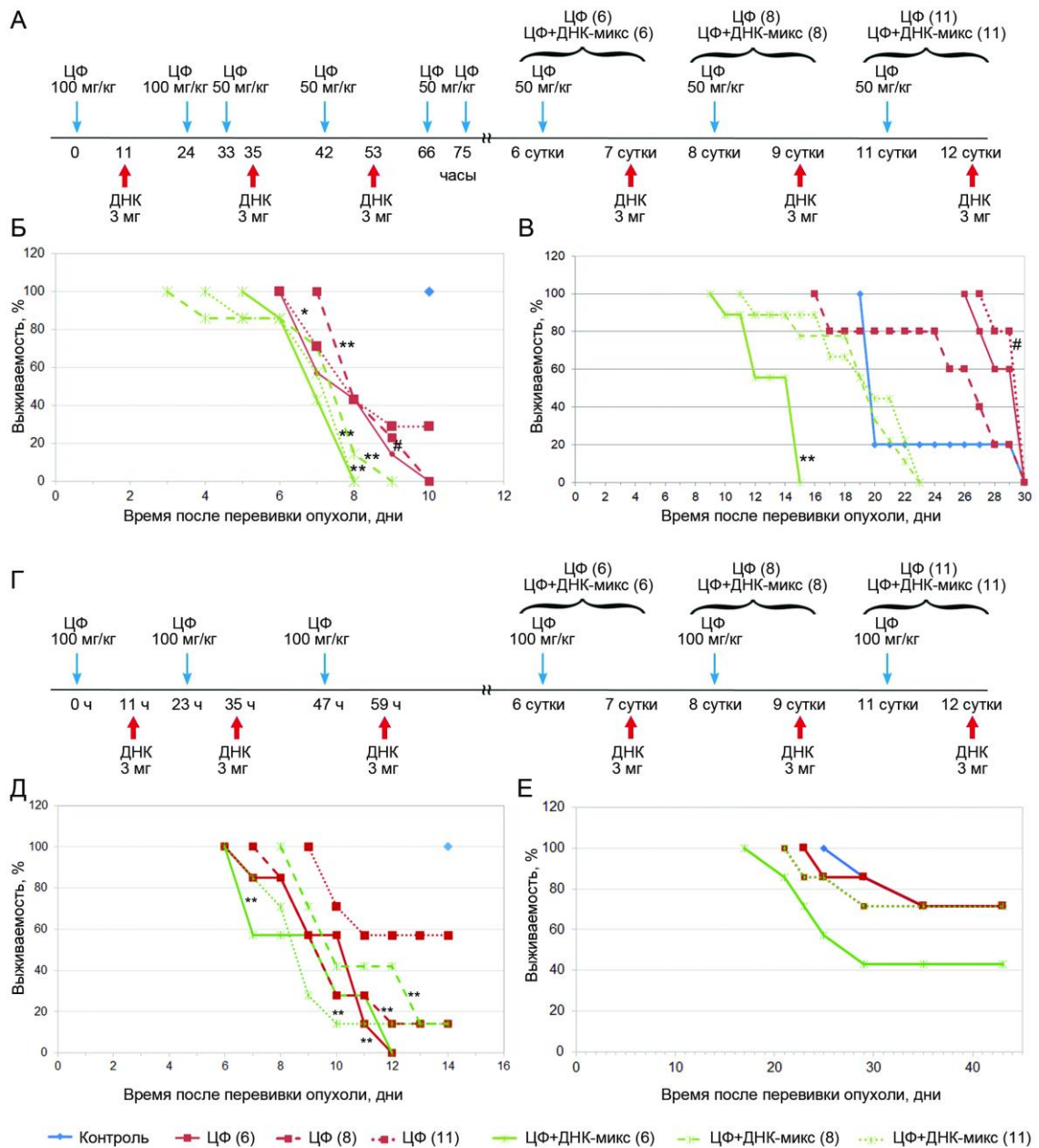


Рис. 40. Анализ комбинированного действия цитостатика ЦФ и препарата ДНК-микс на асцитную форму опухоли Г-29 в режимах «6+1» и «3+1». **А)** Схема введения препаратов в режиме «6+1». **Б)** Динамика гибели мышей с перевитым асцитом Г-29 (4 млн клеток внутрибрюшинно) при терапии в режиме «6+1» (в контроле $n = 5$, в экспериментальных группах $n = 7$). **В)** Динамика гибели мышей с перевитым асцитом Г-29 (2 млн клеток внутрибрюшинно) при терапии в режиме «6+1» (в контроле $n = 5$, в экспериментальных группах $n = 9$). **Г)** Схема введения препаратов в режиме «3+1». **Д)** Динамика гибели мышей с перевитым асцитом Г-29 (13 млн клеток внутрибрюшинно) при обработке экспериментальных животных в режиме «3+1» (в контроле $n = 5$, в экспериментальных группах $n = 7$). **Е)** Динамика гибели мышей с перевитыми солидными трансплантатами Г-29 (2 млн клеток внутримышечно) при терапии по схеме «3+1» ($n = 7$). # $p < 0.001$; ** $p < 0.001$, логарифмический ранговый тест.

Как показали четыре серии проведенных экспериментов (**Рисунок 40**), первоначально предложенные экспериментальные схемы и дозы препарата ДНК-микс являлись абсолютно токсичными для всех групп мышей как при асцитной форме опухоли, так и для ее солидного варианта. По-видимому, это связано с хронометрией применения цитостатика и препарата ДНК-микс, так как в случае карциномы Кребс-2 такой токсичности при лечении экспериментальных животных не наблюдалось. Другое объяснение результата может быть связано с биологическими особенностями опухоли Г-29. Возможно, одномоментная массовая гибель опухолевых клеток на фоне проводимой терапии приводила к развитию системного воспаления, с которым организм без дополнительной лекарственной поддержки был не в состоянии справиться.

В этой связи были проведены эксперименты с использованием стандартного режима «3+1» и введением в терапию инъекций препарата ДНК-микс в переносимой дозе 0.3 мг на мышшь (**Рисунок 41 А**). Уменьшение дозы препарата ДНК было обосновано результатами, полученными в настоящей работе, где экспериментально показано, что предел насыщения асцитных клеток (на примере Кребс-2) составляет ~0.5 мкг на 1 млн опухолевых клеток. То есть доза 0.3 мг значительно превышает количество терапевтических фрагментов ДНК, достаточное для полного насыщения ОСК асцита. Тем не менее, такая высокая концентрация ДНК в асците индуцирует апоптоз коммитированных раковых клеток, что необходимо для эффективности терапии. Результаты экспериментов приведены на **Рисунке 41 Б-Г**.

Оказалось, что выбранные условия терапии эффективно эрадицируют развитый асцит. В эксперименте были сформировано семь групп мышей ($n = 5$). Режим первых трех обработок был аналогичен для всех групп, получавших терапию. Финальное терапевтическое воздействие было проведено в различные дни после начала терапии, на 6-е, 8-е и 11-е сутки. Были получены следующие результаты. Медиана продолжительности жизни оказалась наиболее высокая в группах «ЦФ+ДНК (6)» и «ЦФ+ДНК (11)» и достигала 40 и 37 суток, соответственно, тогда как в контроле – 27 дней (**Рисунок 41 Б, В**). Нужно отметить, что в контроле, в группах «ЦФ+ДНК (6)», «ЦФ+ДНК (11)», «ЦФ (6)», «ЦФ (8)» были мыши, которые по выживаемости не укладывались в общую кривую: либо они гибли в начале эксперимента, либо, как в случае контроля, жили неожиданно долго (**Рисунок 41 Б**). Этот фактор является причиной отсутствия достоверных отличий в продолжительности жизни у экспериментальных групп по сравнению с контролем (логарифмический ранговый тест). Тем не менее, наибольшая терапевтическая эффективность наблюдается для групп, получавших совместную терапию ЦФ и препарата ДНК-микс. P-value для групп «ЦФ+ДНК (6)» и

«ЦФ+ДНК (11)» составляет 0.168 и 0.115, в то время как для групп, получавших только ЦФ – более 0.85.

Главным индикатором исследуемого терапевтического режима, на который было обращено внимание, являлась динамика развития асцита: его исчезновение, продолжительность ремиссии и время появления рецидива (**Рисунок 41 Г**).

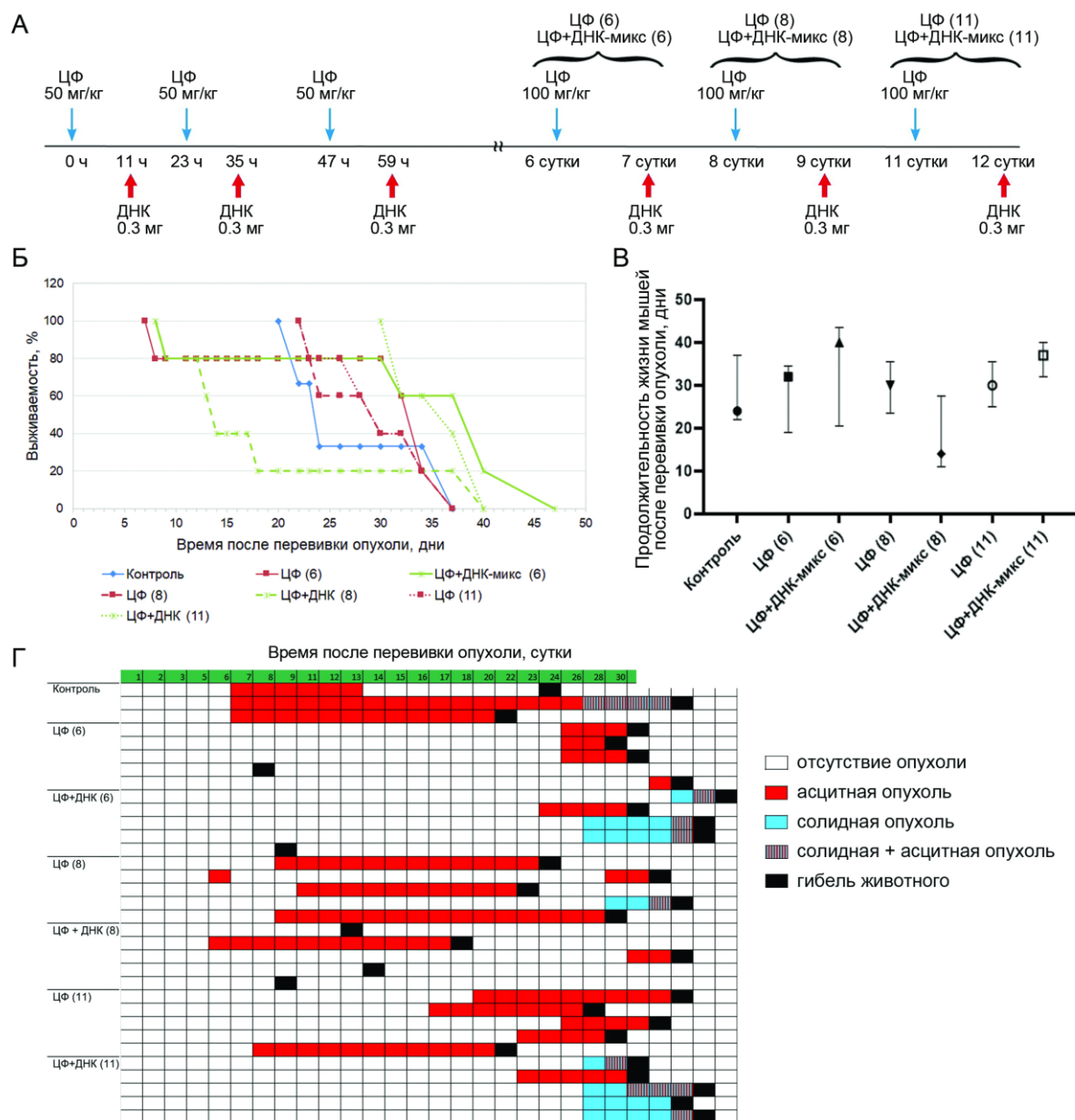


Рис. 41. Результаты лечения мышей с асцитной формой гепатокарциномы Г-29 согласно терапевтическому режиму «Каранахан». **А)** Схема обработки мышей ЦФ и препаратом ДНК-микс режиме «3+1» с использованием терапевтического количества препарата ДНК-микс. **Б)** Кривые Каплана-Мейера (n = 5). **В)** Медиана продолжительности жизни экспериментальных животных в группах (Median ± SD). **Г)** Анализ характера развития вторичного асцита у мышей.

Установлено, что при использовании режима «ЦФ (6)» и «ЦФ (11)» первичный асцит уходит полностью. Рецидив детектируется на 26-е сутки при использовании режима «ЦФ (6)» и на 17-е сутки при использовании режима «ЦФ (11)». При этом одна мышь 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 развивался 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 (**Рисунок 41 Г**).

В результате проведенных экспериментов удалось полностью избавиться от первичного асцита в группах «ЦФ+ДНК (6)» и «ЦФ+ДНК (11)» (**Рисунок 41 Г**). Тем не менее, вылечить экспериментальных мышей от вторичного асцита гепатокарциномы Г-29 не удалось ни в одной из групп. В группе «ЦФ+ДНК (8)» асцит развивался аналогично контролю. Касательно появления асцита в группах, где обработки проводились по 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 (**Рисунок 42**). Патоморфологические изменения свидетельствовали о внедрении опухолевых клеток во внутренние структуры тканей органов, что, по-видимому, и являлось причиной развития канцероматозных солидных образований.

В наших исследованиях, направленных на терапию асцитных форм рака, экспериментальная процедура предполагает интраперитонеальную трансплантацию опухолевых клеток асцитной жидкости. Вероятно, что для гепатокарциномы Г-29 такой способ приводит к созданию искусственного первичного канцероматоза. ОСК при такой ситуации избегают терапевтического воздействия препарата дцДНК, инвазируя в толщу или серозных оболочек, или брюшной стенки, что 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. По-видимому, именно солидное образование стимулирует развитие вторичного асцита.

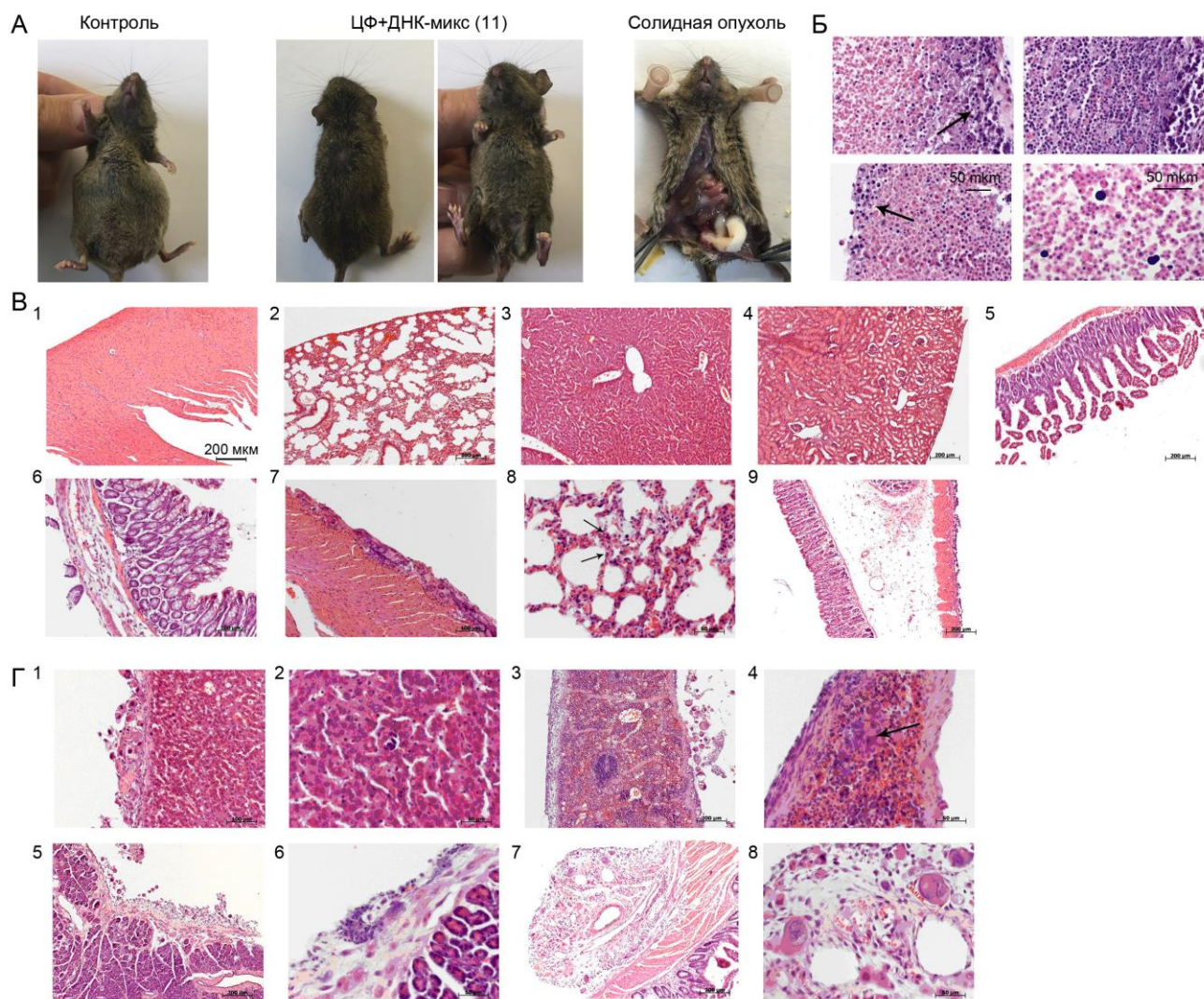


Рис. 42. Оценка патоморфологических параметров у животных с развитой асцитной опухолью Г-29 после проведения терапии с применением ЦФ и препарата ДНК-микс. **А)** Визуальное состояние экспериментальных животных. Стрелкой указано новообразование, обнаруживаемое в брюшной полости мышей. **Б)** Патоморфологический 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). **В)** (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. Обнаруживаются отдельные опухолевые клетки в капиллярах межальвеолярных перегородок (стрелки).

(9) Желудок. В адвентициальном слое стенки (правая часть микроснимка) видны многочисленные клетки опухоли, расположенные рыхлыми слоями. Г) (1) Скопление опухолевых клеток на поверхности капсулы печени (на микроснимке слева). (2) Печень. Группа клеток гепатомы в капилляре (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 вверху). (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.

Таким образом, применение терапевтического режима «Каранахан» («3+1»), основанного на эрадикации ОСК, демонстрирует эффективное редуцирующее воздействие на развивающийся асцитный трансплантат гепатокарциномы мышей Г-29.

3.7.3. Модель асцитной лимфосаркомы RLS, устойчивой к действию циклофосфамида

Асцитная злокачественная опухоль мышей RLS (лимфосаркома, резистентная к циклофосфамиду) была получена из лимфосаркомы, чувствительной к действию ЦФ, в результате инъекций малых доз указанного цитостатика (20 мг/кг) и последующей трансплантации (Mironova et al., 2006). Клетки асцитной лимфосаркомы RLS характеризуется пониженным уровнем экспрессии антионкогена *p53* и изначально повышенным уровнем экспрессии гена супрессии апоптоза *Bcl2* (Mironova et al., 2006), который, после многочисленных пассажей *in vivo*, был утерян (Patutina et al., 2011). Кроме того, RLS обладает повышенной экспрессией генов, принадлежащих к семейству ABC-транспортеров (*mdr1a/b*). Это свойство обеспечивает эффлюкс метаболитов ЦФ и препятствует их накоплению в клетке в необходимых для запуска апоптоза количествах. В литературе приводятся данные о том, что в культуре RLS 10 % клеток, обладают фенотипом МЛЮ (Mironova et al., 2006; Patutina et al., 2011), которые, по-видимому, представляют собой популяцию ОСК или содержат эту популяцию клеток.

3.7.3.1. Интернализация TAMRA-ДНК зонда клетками RLS

Учитывая то, что основной мишенью предложенной нами терапии являются ОСК, необходимо было в первую очередь убедиться, что этот тип клеток присутствует в асците RLS. На **Рисунке 43 А-1, 2** приведены результаты, демонстрирующие присутствие TAMRA+ клеток в интактном асците RLS, полученные методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. Было установлено, что TAMRA+ ОСК составляют около 1 % популяции асцитных клеток RLS.

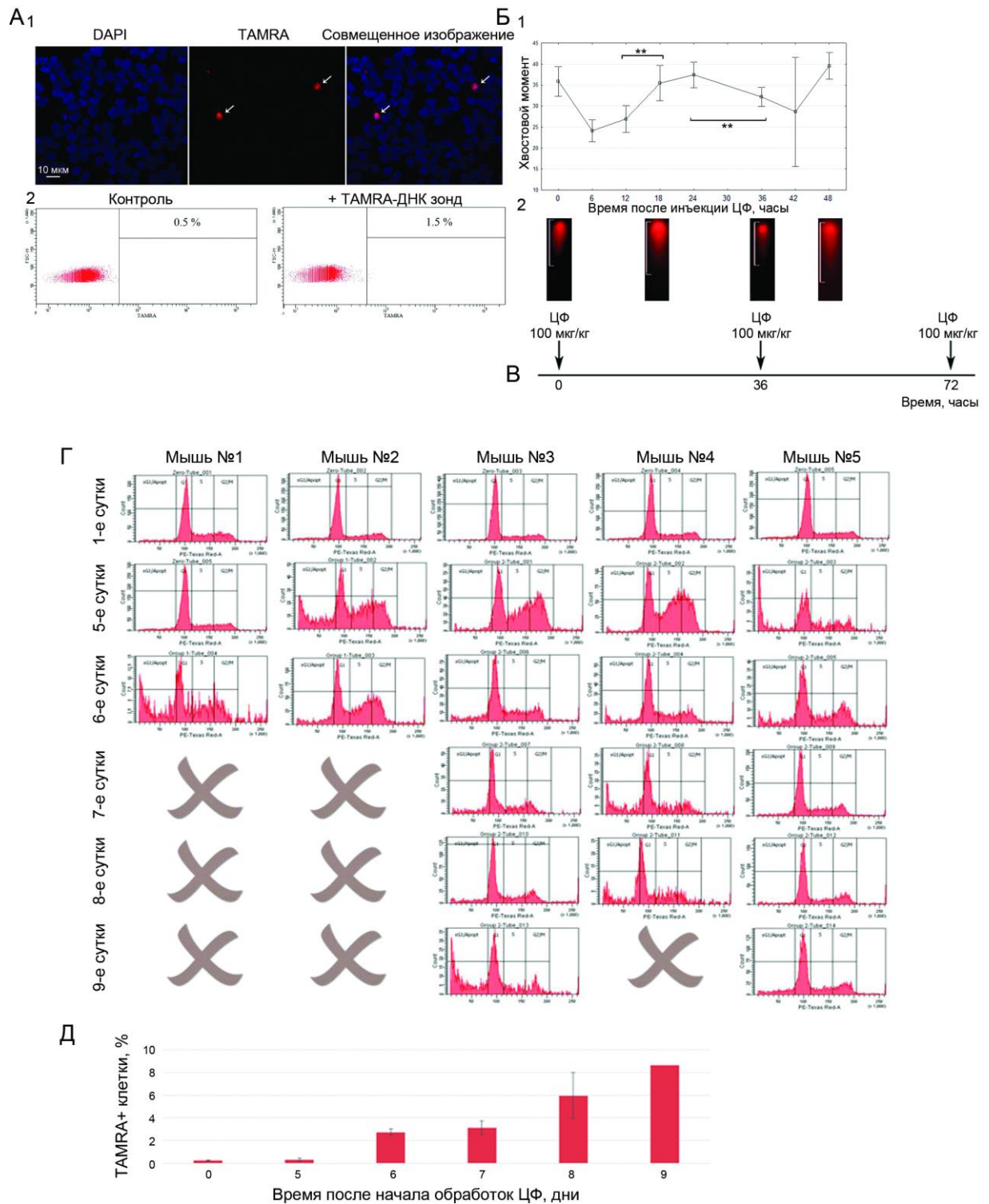


Рис. 43. Анализ биологических параметров клеток лимфосаркомы мыши RLS, необходимый для разработки схемы введения ЦФ и препарата ДНК-микс согласно терапевтическому режиму «Каранахан». **А)** Анализ интернализации TAMRA-ДНК зонда в клетки RLS методом флуоресцентной микроскопии (стрелками указаны TAMRA+ клетки) (1); методом проточной цитометрии (2). **Б)** График времени увеличения и снижения количества ДЦР в клетках RLS после однократного введения ЦФ в дозе 100 мг/кг, оцененный с помощью метода «комет» (1). На графике приведено Mean $\pm$ SD, достоверность отличий оценена при помощи t-теста Стьюдента (предварительно распределение значений «хвостового момента» протестировано

на принадлежность к нормальному распределению при помощи W-критерия Шапиро-Уилка), $**p < 0.01$. Визуальное представление длины кометных хвостов (2). **В)** Разработанная терапевтическая схема введения цитостатика, основанная на временных параметрах репаративного цикла, используемая для определения дня синхронизации клеток в G2/M-фазе клеточного цикла. **Г)** Плоты, полученные при помощи FACS-анализа, демонстрирующие распределение общей популяции клеток RLS по клеточному циклу после проведения терапевтических инъекций цитостатика ЦФ с интервалом в 36 часов. **Д)** Процент TAMRA+ клеток в асците RLS после обработки цитостатиком ЦФ по схеме «В». На графике приведены $\text{Mean} \pm \text{SD}$, $n = 3$.

3.7.3.2. Анализ продолжительности репаративного цикла клеток RLS

Далее необходимо было определить характеристики репаративного цикла МЦС в клетках RLS. Анализ был проведен на 6-суточном асците, когда его объем позволял отбирать биопсийный материал. После однократного введения кросслинквирующего цитостатика ЦФ оценивалась степень повреждения ДНК клеток методом «комет». Начало репаративного цикла характеризуется накоплением ДЦР в фазе NER. В ходе второй фазы (HR) происходит репарация ДЦР. Их снижение до базового уровня свидетельствует о завершении репаративного цикла. Установлено, что продолжительность репаративного цикла клеток асцитной лимфосаркомы RLS составляет 36 часов (**Рисунок 43 Б**). На основании полученных данных о временных параметрах репаративного цикла была разработана схема обработки мышей ЦФ для определения дня синхронизации TAMRA+ ОСК в чувствительной для их эрадикации фазе клеточного цикла (G2/M) (**Рисунок 43 В**).

3.7.3.3. Анализ времени синхронизации клеток RLS после обработки цитостатиком в терапевтическом режиме

Была проведена трехкратная обработка раковых клеток ЦФ в концентрации 100 мг/кг по схеме, приведенной на **Рисунке 43 В**. Асцитные клетки от пяти мышей на 1-е сутки (в качестве контрольной точки) и каждые 24 часа на протяжении 5–9 суток эксперимента отбирали и фиксировали 50 % метанолом. Фиксированные клетки использовали для анализа клеточного цикла на проточном цитометре. Главной задачей анализа было определение времени синхронизации субпопуляции ОСК (TAMRA+ клеток), специфичных для данного типа рака. Параллельно клетки инкубировали с TAMRA-ДНК зондом, и оценивали с помощью микроскопического анализа процент TAMRA+ клеток. Значимый прирост доли этого типа клеток в определенный день после начала терапии на фоне масштабного апоптоза комитированных опухолевых клеток означает синхронизацию ОСК в наблюдаемой фазе клеточного цикла.

Установлено, что на 5–6-е сутки наблюдается сдвиг клеточного цикла асцитных клеток RLS в G2/M-фазу (**Рисунок 43 Г**). На 7-е сутки происходит возврат и стабилизация клеток в G1-фазе. На **Рисунке 43 Д** показана динамика процентного содержания TAMRA+ клеток в биопсийном материале. Было замечено, что к 6-м суткам происходит значительное (до 3.5 %) увеличение процента TAMRA+ клеток, которое сохраняется до 7-х суток. При этом оказалось, что на 8-е и 9-е сутки процентное содержание TAMRA+ клеток скачкообразно увеличивается до 6 % и 8 % соответственно. Одновременно отмечается снижение количества асцита, что приводит к невозможности забора биопсийного материала. Для получения статистически значимой информации эксперимент был повторен несколько раз. Однако, вследствие токсического эффекта режима и повышенной агрессивности экспериментальной модели рака, что приводило к гибели животных, на 9-е сутки не удалось получить данных в количестве, необходимом для корректной статистической обработки. Тем не менее, как следует из анализа демонстрационных плотов, оказалось, что общая картина распределения клеток по клеточному циклу, начиная с 7-х суток, практически не меняется.

Полученные данные означали, что финальную обработку необходимо начинать *на 5-е сутки* от начала терапии. Изменение в процентном увеличении TAMRA+ клеток на 6–9-е сутки эксперимента можно объяснить следующим образом. Синхронизация TAMRA+ клеток до ~3.5 % происходит именно на 6-е сутки, и этот уровень остается неизменным еще сутки. Именно в это время наблюдается масштабный переход клеток асцита в G2/M-фазу. Увеличение роста процентного числа TAMRA+ клеток на 8-е и 9-е сутки эксперимента определяется уже не синхронизацией остановленных в G2/M ОСК, а быстрым делением избежавших терапевтического воздействия стволовых клеток, которые начинают выходить из состояния остановки клеточного цикла, что сопровождается прогрессивным увеличением их количества.

3.7.3.4. Характеристика эффективности лечения лимфосаркомы RLS согласно терапевтическому режиму «Каранахан»

Перед применением режима «Каранахан» был проведен цитологический анализ комбинированного действия кросслинкирующего цитостатика митомицина С (ММС) и препарата ДНК-микс на клетки асцитной опухоли RLS в системе *ex vivo* без финальной обработки (по схеме, аналогичной схеме на **Рисунке 43В**, дозировка ММС 10 мкг/мл). ММС воздействует на клетки напрямую, формируя МЦС. Таким образом ММС, в отличие от ЦФ, возможно применять в системе *ex vivo*. При этом время начала действия обоих цитостатиков (образование МЦС) практически не отличается и составляет 2–4 часа после обработки, что в

рамках анализируемых временных интервалов (каждые 6 часов) не влияет на определение времени репаративного профиля (Genka et al., 1990).

После трехкратной обработки клеток RLS препаратом MMC и MMC+ДНК-микс было подсчитано общее количество клеток и процентное содержание TAMRA+ клеток, а также оценено визуальное состояние клеток (**Таблица 15, Рисунок 44 А**).

Таблица 15. Анализ изменения процентного содержания TAMRA+ клеток в асците RLS после трехкратной обработки цитостатиком MMC *ex vivo*.

До обработок	После трехкратной обработки MMC <i>ex vivo</i>			
Количество клеток в лунке, млн	Группа	Количество проанализированных клеток	TAMRA+ клетки, %	Количество клеток в лунке, млн
10	Контроль	11 458	1.7	32.2
10	MMC	1 812	6.3	14.5
10	MMC+ДНК-микс	1 496	1.9	8.5

Трехкратная обработка клеток RLS препаратом MMC приводит к гибели основной массы коммитированных асцитных клеток и увеличению процента TAMRA+ клеток. На гибель коммитированных асцитных клеток указывает уменьшение числа клеток в лунке по сравнению с контролем. Для MMC (в качестве монопрепарата) общее количество клеток в лунке снизилось более чем в два раза (**Рисунок 44 Б**). Процент TAMRA+ клеток по сравнению с контролем возрос в 3.7 раза. MMC в синергизме с препаратом дцДНК приводит к четырехкратному снижению общего количества клеток, которое обусловлено гибелью как коммитированных потомков, так и низкодифференцированных резистентных ОСК. Показано снижение как общего числа клеток, так и процентного содержания TAMRA+ клеток. Это указывает на эффективность предложенной стратегии по эрадикации ОСК RLS, устойчивых к действию цитостатиков кросслинквирующего ряда (**Таблица 15, Рисунок 44**).

С учетом изложенных данных, полученных при определении времени синхронизации клеток лимфосаркомы RLS, были проведены эксперименты по трансплантации опухоли и последующего ее лечения. Для попытки предотвращения канцероматоза мышам трансплантировали клетки лимфосаркомы RLS, предварительно обработанные однократно *in vitro* MMC и препаратом ДНК-микс. Предполагалось, что в результате индукции репаративного процесса цитостатиком в комбинации с действием фрагментов ДНК произойдет остановка клеточного цикла, и ОСК потеряют способность инвазировать в

перитонеальные ткани при терапевтических проколах брюшной стенки. Было перевито по 1 млн клеток на мышь семи группам мышей ($n = 5$).

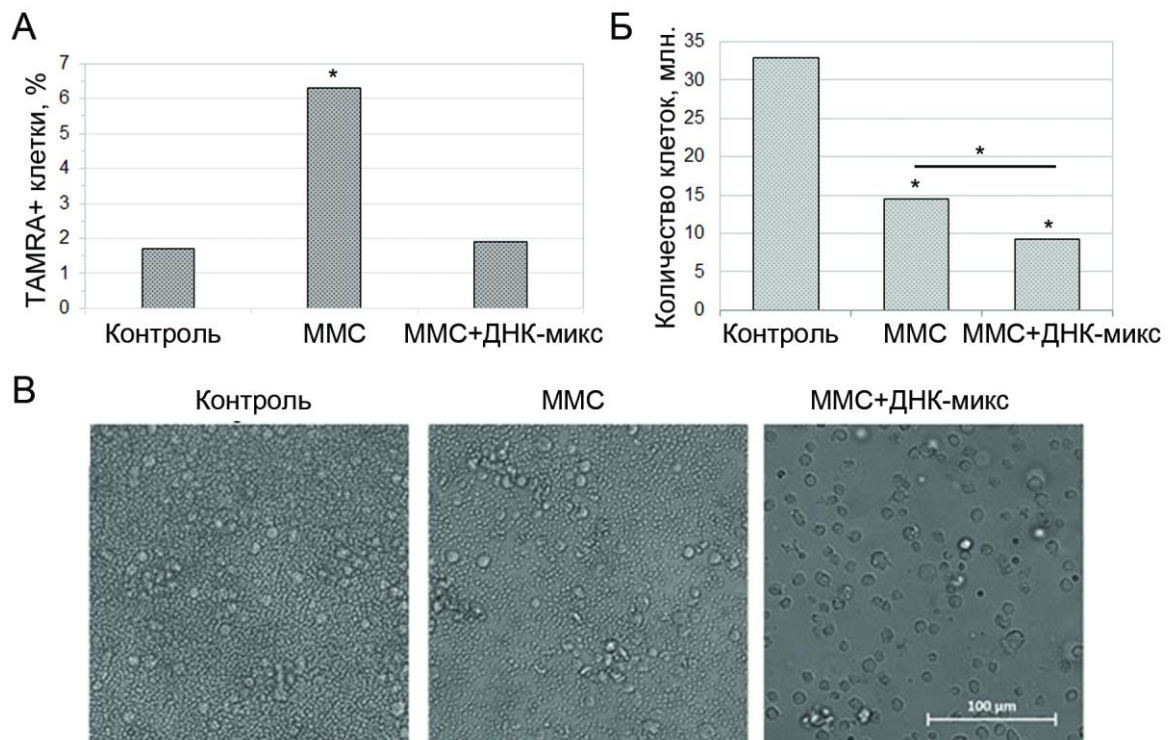


Рис. 44. Цитологический анализ комбинированного действия цитостатика MMC и препарата ДНК-микс на клетки опухоли RLS, переведенные в первичную культуру. **А)** Изменение процентного содержания TAMRA+ клеток после трех обработок MMC. **Б)** Подсчет общего количества живых клеток после трех обработок MMC. * $p < 0.01$, one-way ANOVA, критерий Краскела-Уоллиса. Если не обозначено линией, сравнения выполнены с контрольной группой. **В)** Визуальное представление состояния клеток в фазовом контрасте.

Терапевтические обработки цитостатиком ЦФ и препаратом дцДНК проводились в режиме «3+1» (финальная обработка на 5-е, 9-е и 12-е сутки) (**Рисунок 45 А**). Результаты терапии экспериментальных животных с перевитой асцитой лимфосаркомой RLS с использованием режима «Каранахан» представлены на **Рисунке 45 Б-Г**. Примененные обработки замедлили время появления опухолей (**Рисунок 45 Б**). Средняя продолжительность жизни мышей, обработанных по используемой схеме, практически во всех опытных группах достоверно отличалась от контрольной (**Рисунок 45 Г**). Оказалось, что в группах животных, у которых финальной точкой обработки ЦФ и препаратом дцДНК в режиме «3+1» были выбраны 5-е сутки, индикаторные показатели (редукция асцита, продолжительность жизни), превосходят аналогичные у других групп (**Рисунок 45 Г**). Следует заметить, что проведенная терапия не позволила избежать развития солидного узла в месте прокола брюшной стенки.

Для всех групп было характерно развитие вторичного солидного очага опухоли (Рисунок 45 Г).

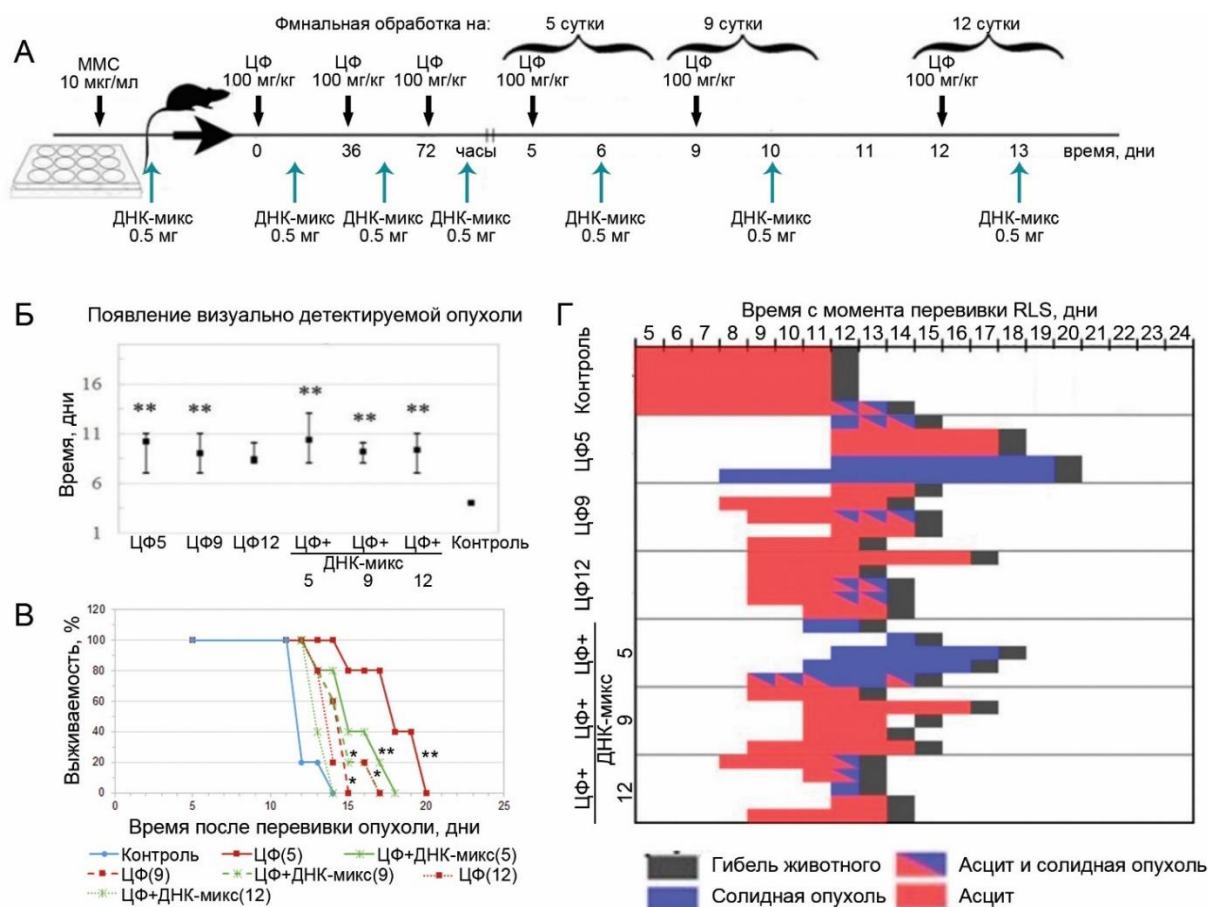


Рис. 45. Анализ терапии асцитной формы опухоли RLS согласно режиму «Каранахан». **А)** Схема обработки препаратами ММС, ЦФ и ДНК-микс в режиме четырехкратных обработок («3+1») с финальными обработками на 5-е, 9-е и 12-е сутки. **Б)** График, показывающий время начала визуальной детекции опухоли. **В)** Кривые Каплана-Мейера ($n = 5$), $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ относительно контроля, логарифмический ранговый тест. **Г)** Характер развития вторичной опухоли у мышей, обработанных ЦФ и препаратом ДНК-микс (в контроле и в каждой экспериментальной группе, результаты воздействия приведены для каждой индивидуальной мыши).

На **Рисунке 46** представлены результаты вскрытия и патоморфологического анализа мышей после проведения терапии.

Для мышей из групп «ЦФ+ДНК-микс (9)» (**Рисунок 46 Г**) и «ЦФ (9)» (**Рисунок 46 В**) структурно функциональные изменения деструктивного характера были обнаружены практически во всех органах. Для мыши из группы «ЦФ+ДНК-микс (5)» изменения ограничивались легкими, печенью, селезенкой и поджелудочной железой (**Рисунок 46 Б**). Проявились явные признаки канцероматоза и системного воспалительного процесса.

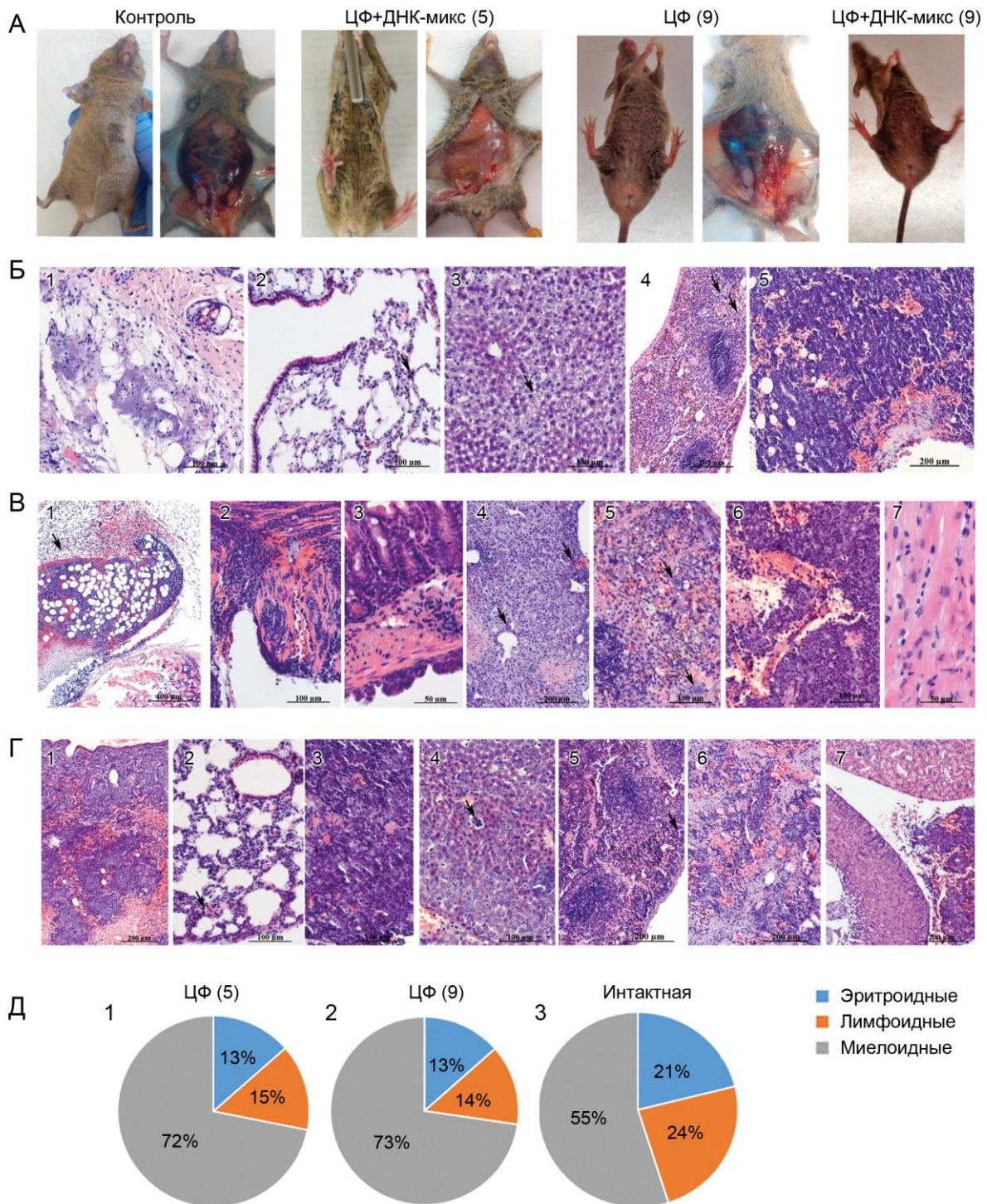


Рис. 46. Оценка патоморфологических параметров у животных с перевитой опухолью RLS после проведения терапии согласно режиму «Каранахан». **А)** Визуальное состояние экспериментальных животных до и после вскрытия. **Б)** Патоморфологический анализ органов мыши из группы «ЦФ+ДНК-микс (5)». Окраска гематоксилин-эозином. (1) Кожа. Участок с обширным некрозом. (2) Легкие. Умеренно выражено воспаление, в проекции отдельных межальвеолярных перегородок присутствуют мелкие группы (по 2–3 штуки) опухолевых клеток. (3) Печень. Умеренно выраженная очаговая вакуолярная дистрофия. (4) Селезенка. В пределах паренхимы органа обнаруживаются небольшие скопления клеток опухоли.

(5) Поджелудочная железа. Фрагменты с выраженными некротическими изменениями. **В)** Патоморфологический анализ органов мыши из группы «ЦФ (9)». Окраска гематоксилин-эозином. (1) Кожа. В сетчатом слое дермы на границе с подкожной жировой клетчаткой определяется полностью некротизированный фрагмент опухолевого имплантата. (2, 3) Тонкая кишка. Инфильтрат из лимфоцитов и опухолевых клеток. (4) Печень. Воспалительная инфильтрация, вокруг центральных вен и других сосудов выявляются клетки, похожие морфологически на клетки опухолевого имплантата. (5) Селезенка. редукция лимфатических фолликулов и небольшие скопления опухолевых клеток в красной пульпе. (6) Фрагмент опухоли в рыхлой соединительной ткани. (7) Миокард. В целом, структура соответствует норме, однако, на отдельных участках несколько снижена четкость границ и поперечнополосатого рисунка некоторых мышечных волокон. **Г)** Патоморфологический анализ органов мыши из группы «ЦФ+ДНК-микс (9)». Окраска гематоксилин-эозином. (1) Кожа. В сетчатом слое дермы расположен крупный опухолевый узел. (2) Легкие. Обнаруживается инвазия клеток опухоли в паренхиму органа. (3) Поджелудочная железа. Замещение железистой ткани клетками опухоли. (4) Печень. В просвете внутридольковых капилляров и других сосудов отмечаются мелкие скопления опухолевых клеток. (5) Селезенка. В красной пульпе выявляются разные по площади участки инфильтрации атипичными клетками имплантата, лимфатические фолликулы сокращены в размерах до периаартериальной области. (6) Крупный опухолевый узел. (7) Почка и надпочечник. Встречаются мелкие очаги некротизации. **Д)** Клеточный состав красного костного мозга. (1) Мышь из группы «ЦФ (5)»; (2) мышь из группы «ЦФ (9)»; (3) интактная мышь.

Дополнительно, был оценен клеточный состав красного костного мозга мышей из групп «ЦФ (5)» и «ЦФ (9)» (**Рисунок 46 Д-1, 2**). У обеих экспериментальных групп наблюдается сокращение процентного содержания клеток эритроидного и лимфоидного ряда и увеличение процента клеток миелоидного ряда, что соответствует основной причине заболевания, характерной для системной воспалительной реакции, и свидетельствует о развитии лимфо- и эритропений.

В настоящей части исследования была предпринята попытка использовать разрабатываемый режим «3+1» для лечения асцитной формы лимфосаркомы мыши RLS. При использовании наиболее эффективной схемы (три инъекции ЦФ и препарата дцДНК, вызывающие «запирание» раковых клеток в G2/M-фазе клеточного цикла и индукцию их апоптоза, а также финальная терапевтическая обработка этими препаратами на 5-е сутки от начала лечения) происходит элиминация TAMRA+ ОСК асцита RLS.

Известно, что опухоль RLS резистентна к цитостатику ЦФ. Так, при однократной инъекции ЦФ в концентрации 100 мг/кг, аналогичной использованной в настоящем исследовании, асцит уменьшается лишь на 16.5 % (Mironova et al., 2006). В настоящей работе удалось достичь полного исчезновения асцита в группе «ЦФ+ДНК (5)» и ухода асцита у 40 % мышей в группе «ЦФ (5)» (**Рисунок 45 Г**). Однако для лимфосаркомы RLS оказалось

характерным образованием солидных графтов, локализованных в месте интраперитонеальной трансплантации опухолевых клеток асцита. Этот факт свидетельствует о высокой степени канцероматозной активности лимфосаркомы RLS. Данные патоморфологического анализа также свидетельствуют о повышенной способности клеток опухоли RLS к метастазированию. По-видимому, для опухолей, клетки которых агрессивно инвазируют в ткани, простые перитонеальные инъекции терапевтических препаратов могут являться причиной развития вторичного солидного узла в месте прохождения иглы через брюшную стенку и серозные оболочки. Этот факт требует дополнительных экспериментов по разработке процедуры введения препаратов, исключающих инвазию асцитных клеток в брюшную стенку и серозные оболочки. Одним из таких подходов может быть покрытие иглы слоем вещества, разрушающего контактирующие с ним клетки.

Таким образом, асцитная форма RLS обладает свойствами высокоагрессивного рака, формирующего многочисленные канцероматозные солидные очаги роста. Используя найденный режим синхронизации раковых клеток RLS («3+1 (5)»), удалось полностью редуцировать асцит у экспериментальных животных. Тем не менее солидные очаги, возникающие, как правило, в области прокола брюшины, практически всегда сопровождали уход асцита и являлись, вместе с развитием системного воспаления, причиной быстрой гибели мышей.

3.7.4. Модель карциномы мыши Льюис

3.7.4.1. Интернализация TAMRA-ДНК зонда клетками карциномы Льюис

Основной мишенью терапевтического режима «Каранахан» являются ОСК, способные интернализировать дцДНК. В этой связи было определено наличие клеток этого типа в солидном графте карциномы Льюис по параметру интернализации TAMRA-ДНК зонда.

На **Рисунке 47 А** приведен цитологический анализ, демонстрирующий присутствие TAMRA⁺ клеток в опухоли карциномы Льюис. Процентное содержание TAMRA⁺ клеток (ОСК) в опухоли составило $8.9 \pm 1.6 \%$ (Mean $\pm$ SD).

3.7.4.2. Анализ репаративного цикла клеток карциномы Льюис

Анализ продолжительности репаративного цикла клеток карциномы Льюис был выполнен при помощи оценки динамики количества ДЦР методом «комет» после обработки клеток кросслинkerующим цитостатиком MMC *in vitro*.

Было установлено, что продолжительность репаративного цикла клеток карциномы Льюис составляет 30 часов (**Рисунок 47 Б**). Максимальное количество ДЦР (переход от фазы NER к фазе HR) наблюдается через 18 часов после воздействия цитостатика. При составлении

схемы введения препаратов в соответствии с режимом «Каранахан» это время используется для введения ДНК-микс.

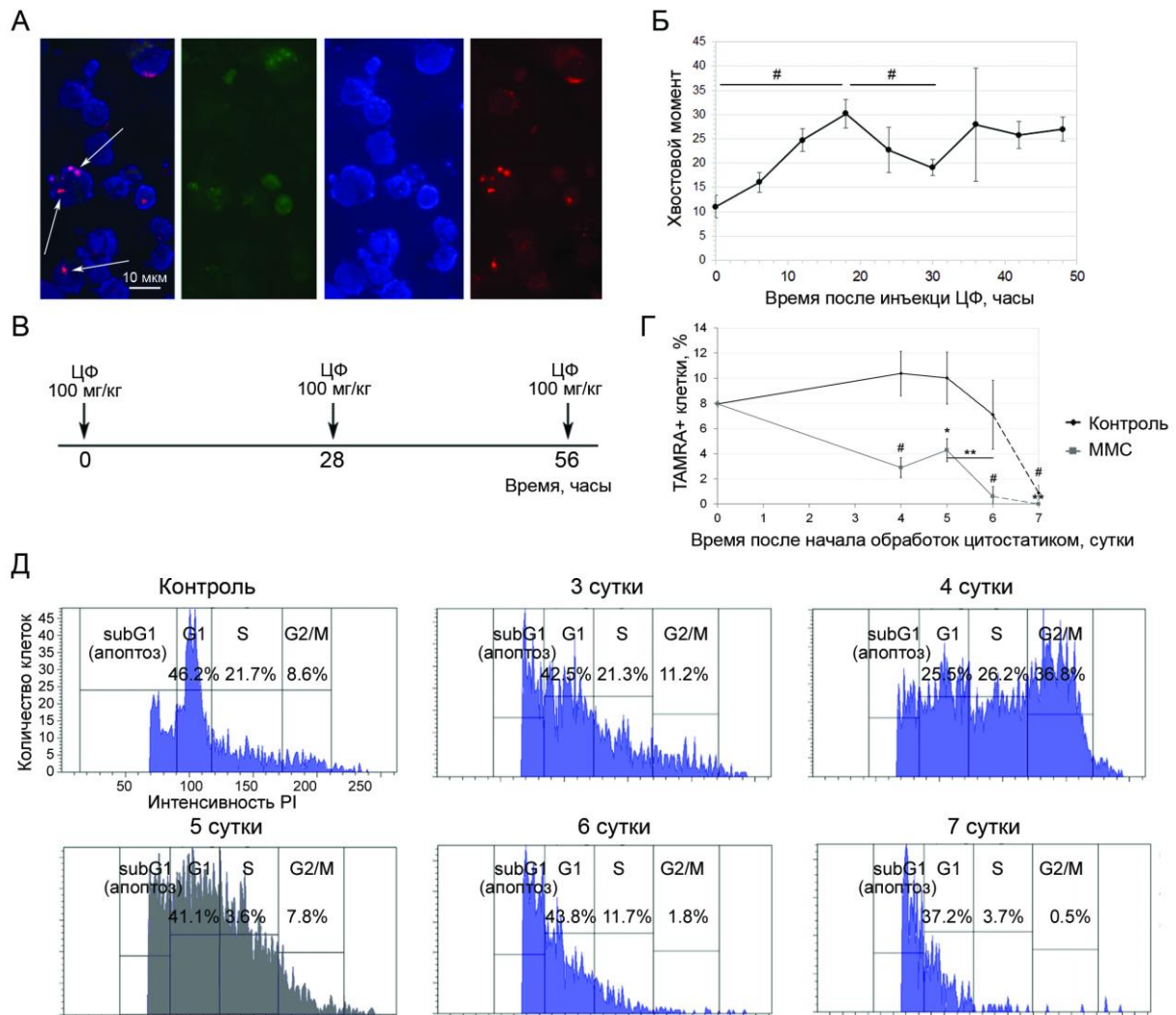


Рис. 47. Анализ биологических параметров клеток карциномы Льюис, необходимый для разработки терапевтической схемы введения ЦФ и препарата ДНК-микс согласно режиму «Каранахан». **А)** TAMRA+ клетки. Приведены изображения в каналах FITC, DAPI, TAMRA и совмещенное изображение. Стрелками указан специфический TAMRA-сигнал. **Б)** Анализ репаративного цикла клеток. Динамика количества ДЦР в опухолевых клетках после инкубирования с MMC, оцененная методом «комет». # $p < 0.001$, one-way ANOVA, тест Краскела-Уоллиса. **В)** Схема обработки мышей цитостатиком ЦФ, разработанная на основе параметров репаративного цикла, и необходимая для определения времени синхронизации клеток в G2/M-фазе клеточного цикла. **Г)** Динамика процентного содержания TAMRA+ клеток в контроле и после трехкратной обработки клеток MMC по схеме «В». Приведено Mean $\pm$ SD, # $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, two-way ANOVA. Если не обозначено линией, сравнение проводили с нулевой точкой. **Д)** Плоты, полученные при помощи FACS-анализа, отражающие распределение клеток по фазам клеточного цикла после трехкратной обработки мышей ЦФ. Контроль – клетки карциномы Льюис до обработки.

По результатам анализа была составлена схема трех обработок кросслинkerующим цитостатиком карциномы Льюис (**Рисунок 47 В**). Время обработок ЦФ было выбрано со смещением на 2 часа в сторону от начала терапии (интервал 28 часов), что предотвращало выход из остановки клеточного цикла клеток, заканчивающих репарацию первыми.

3.7.4.3. Определение времени синхронизации клеток карциномы Льюис

Время финальной обработки согласно терапевтическому режиму «Каранахан», приводящей к полной эрадикации ОСК, определяется в эксперименте после трех обработок кросслинkerующим цитостатиком (ММС, ЦФ). Существует два подхода для его определения: (1) ежедневный анализ количества TAMRA+ клеток; (2) ежедневный анализ распределения клеток по клеточному циклу.

(1) Анализ содержания TAMRA+ клеток после трехкратной обработки митомицином С

Анализ динамики доли TAMRA+ клеток среди опухолевых клеток карциномы Льюис показал, что их процентное содержание снижается на 4-е сутки ($p < 0.001$), затем незначительно возрастает на 5-е сутки, после чего опять уменьшается ($p < 0.01$) (**Рисунок 47 Г**). На 7-е сутки наблюдалось снижение доли TAMRA+ клеток как в экспериментальных образцах, так и в контроле ($p < 0.01$ для группы «ММС» и $p < 0.001$ для контрольной группы), что, по-видимому, связано с нежизнеспособностью клеток карциномы Льюис в культуре. В связи с этим кривые содержания TAMRA+ клеток после 6-х суток приведены пунктиром.

(2) Анализ пролиферативной активности клеток карциномы Льюис после трехкратной обработки мышей циклофосфамидом

Необходимо было определить время финальной обработки, когда все клетки находятся в G2/M-фазе, чтобы далее следовал день, когда клетки синхронно переходят в G1-фазу. Как уже было сказано ранее, накопление клеток в G1-фазе совпадает со временем увеличения процентного содержания TAMRA+ клеток. Это связано с тем, что в этот момент времени коммитированные опухолевые клетки завершают апоптоз. При этом «проскочившие» три обработки кросслинkerующим цитостатиком TAMRA+ ОСК в том же количестве присутствуют в анализируемой популяции, что приводит к увеличению их процентного соотношения. Такое поведение клеток будет означать, что определено время финальной обработки, когда ОСК синхронизованы в фазе клеточного цикла.

Установлено, что ОСК не интернализуют двуцепочечный ДНК зонд, находясь в G2/M-фазе клеточного цикла (раздел 3.3.1.3). Причина этого явления, по-видимому, лежит в изменении общеклеточных процессов, связанных с реконструкцией цитоскелета в связи с подготовкой и прохождением митоза. При этом цитостатик доставляется в клетку в любой

фазе клеточного цикла, в том числе и G2/M-фазе, а индуцируемые им МЦС будут определяться только в G1 и далее в S-фазе.

При определении схемы введения препаратов в соответствии с режимом «Каранахан», четвертое введение цитостатика назначается в момент, когда клетки находятся в G2/M-фазе. Препарат ДНК-микс вводится в соответствующей временной точке репаративного цикла, когда количество ДЦР максимально. То есть препарат ДНК-микс вводится в момент, когда клетки уже находятся в G1-фазе или начальной S-фазе. Такая обработка приведет к синхронной гибели оставшегося опухолевого начала в виде TAMRA+ ОСК. Следует в очередной раз отметить, что если не проводить финальную обработку, то TAMRA+ ОСК быстро восстанавливают свою функциональность и дают развитие рецидиву.

Для анализа времени синхронизации клеток карциномы Льюис мышам вводили ЦФ в дозе 100 мг/кг трижды с интервалом 28 часов согласно выбранной схеме (**Рисунок 47 В**). Анализ клеточного цикла клеток карциномы Льюис показал, что накопление клеток в G2/M-фазе наблюдается на 4-е сутки (**Рисунок 47 Д**). На 5-е сутки детектируется конечный апоптоз синхронизированных ранее в G2/M клеток и переход ОСК и остатков коммитированных клеток в G1-фазу.

Полученные результаты двух независимых анализов определили время финальной обработки цитостатиком на 4-е сутки (или 96 часов) после начала терапии. Именно в этот момент времени наблюдался минимальный процент TAMRA+ клеток и синхронное накопление клеток в G2/M-фазе.

Введение препарата ДНК-микс устанавливается в момент перехода фазы NER в фазу HR. Для опухоли Льюис он соответствовал 18 часам после каждого введения цитостатика. Таким образом финальная инъекция ДНК-микс приходится на 5-е сутки от начала терапии и приводит к эрадикации ОСК. В результате проведенного анализа была определена схема обработки цитостатиком ЦФ и препаратом ДНК-микс для карциномы Льюис (**Рисунок 48 А**).

3.7.4.4. Оценка эффективности терапевтического режима «Каранахан» на модели карциномы Льюис

Разработанная терапевтическая схема обработки опухоли была применена в нескольких экспериментах, выполненных в различные сезонные циклы и в два следующих один за другим года в двух вариантах, с перевивкой трансплантата в одну или две лапы.

Один очаг опухоли

По достижении опухолью объема 64–125 мм³ мышей обрабатывали согласно выбранной терапевтической схеме. Эксперимент был повторен дважды – в мае-августе 2019 и 2020 года (**Рисунок 48 Б, В**).

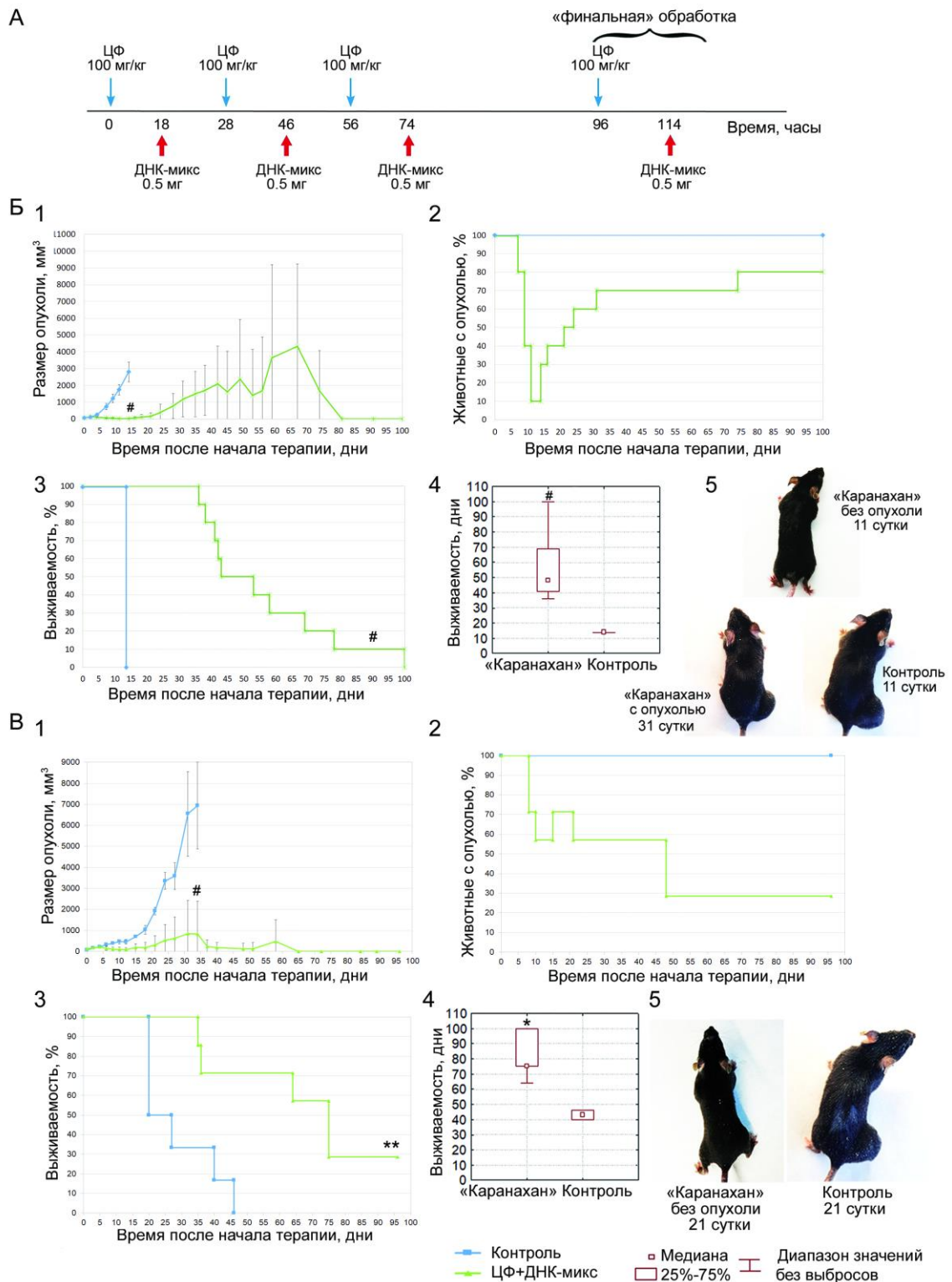


Рис. 48. Оценка эффективности режима «Каранахан» на модели карциномы Льюис. **А)** Схема введения препаратов, включающая внутрибрюшинные инъекции ЦФ (100 мг/кг) и внутриопухолевые инъекции препарата ДНК-микс (0.5 мг на инъекцию). **Б)** Результаты терапии экспериментальных животных в мае-августе 2019 года. **В)** Результаты терапии экспериментальных животных в мае-августе 2020 года. (1) Сравнение динамики роста опухолей в экспериментальной ($n = 8$ (Б), $n = 7$ (В)) и контрольной ($n = 10$ (Б), $n = 6$ (В)) группах, приведены $\text{Mean} \pm \text{SD}$. Достоверность оценивали при помощи метода

множественных сравнений Бенджамини-Йекутиели. (2) Динамика изменения количества мышей с опухолью. (3) График выживаемости мышей. Достоверность отличия от контроля оценивали при помощи логарифмического рангового теста. (4) График средней продолжительности жизни мышей, достоверность оценивали с помощью критерия Манна-Уитни. (5) Внешний вид экспериментальных животных. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$.

Май-Август 2019 г

В контрольной группе к 14-му дню средний объем опухоли составил 3 000 мм³, и мыши были выведены из эксперимента по этическим соображениям. После терапии «Каранахан» к 11-м суткам наблюдалось полное исчезновение опухолей у 90 % животных (**Рисунок 48 Б-1**). Начиная с 14-х суток стали появляться рецидивы опухоли. Рецидивы развивались последовательно и к 53-м суткам были зафиксированы у 80 % животных (**Рисунок 48 Б-2**). Средняя продолжительность жизни мышей составила для контрольной группы – 14 суток, а для экспериментальной группы – 48 суток (**Рисунок 48 Б-3, 4**). К 100-му дню эксперимента 10 % мышей после терапии «Каранахан» были живы.

Май-Август 2020 г

В контрольной группе к 27-му дню средний объем опухоли составил 3 500 мм³ (**Рисунок 48 В-1**), и мыши были выведены из эксперимента по этическим соображениям. После терапии «Каранахан» наблюдалось снижение размеров опухолей, с 8-х суток у некоторых мышей наблюдалась полная элиминация опухоли (**Рисунок 48 В-1, 2**). Начиная с 15-х суток у мышей без полной регрессии опухоли начинался ее рост. У двух животных (29 %) наблюдалось развитие рецидивов на 15–21-е сутки эксперимента, которые резорбировались к 45-м суткам и больше не появились. Без признаков опухолевого роста в данном эксперименте было зафиксировано 71 % мышей (**Рисунок 48 В-2**). 43 % животных погибли от развившегося симптомокомплекса, характерного для системной воспалительной реакции. Средняя продолжительность жизни мышей составила для контрольной группы – 43 суток, а для экспериментальной группы – 75 суток (**Рисунок 48 В-3, 4**). К 100-му дню эксперимента 29 % мышей были живы, у всех живых животных признаков опухолевого роста не было выявлено (**Рисунок 48 В-3**).

В среднюю продолжительность жизни были включены полностью вылечившиеся животные, которые погибли естественной смертью. Для того чтобы определить среднюю выживаемость в группе, продолжительность жизни этих мышей была принята за 100 суток.

В обоих экспериментах удалось полностью вылечить определенное количество мышей от карциномы Льюис. Тем не менее четко прослеживается эффективность терапии, связанная с годовым циклом, выражающаяся как в количестве выживших животных, так и в динамике развития рецидивов.

Два очага опухоли

Для оценки возможного влияния обработанного опухолевого очага на необработанный, мышам перевили клетки карциномы Льюис внутримышечно в две задних лапы. Было проведено две серии экспериментов – в марте и ноябре 2019 г (**Рисунок 49**). По достижении опухоли 125–343 мм³ (март 2019 г) или 64 мм³ (ноябрь 2019 г) мышей обрабатывали согласно терапевтической схеме (**Рисунок 48 А**), вводя препарат ДНК-микс в очаг опухолевого роста на правой лапе.

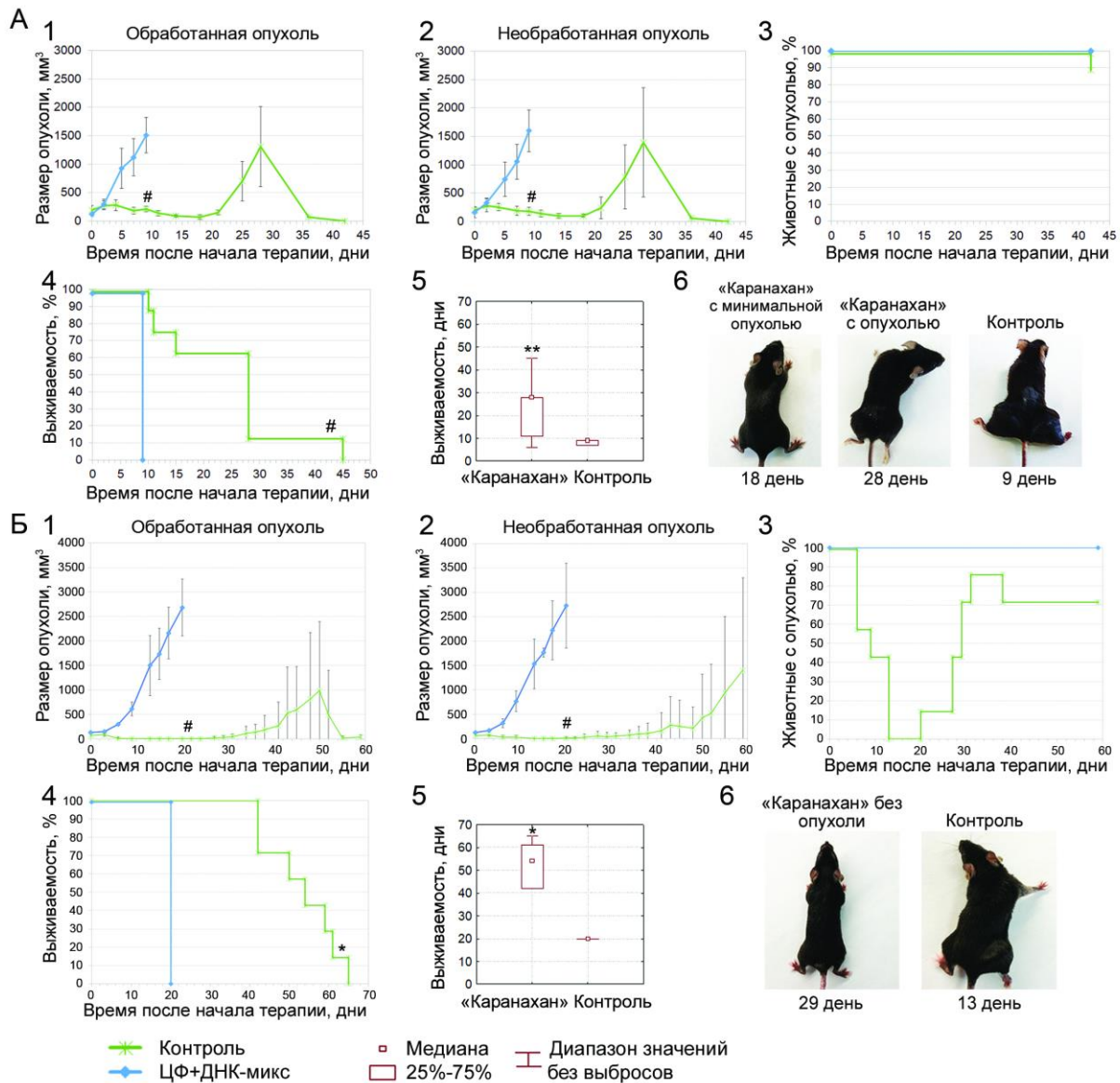


Рис. 49. Оценка эффективности терапии «Каранахан» на модели мышинной карциномы Льюис с перевивкой опухоли в обе задние лапы. **А)** Результаты терапии экспериментальных животных в марте-апреле 2019 года, лечение начинали при достижении объема опухоли 125–343 мм³. **Б)** Результаты терапии экспериментальных животных в ноябре-январе 2019 года, лечение начинали при достижении объема опухоли 64 мм³. Мышей обрабатывали ЦФ внутрибрюшинно (100 мг/кг) и ДНК-микс внутриопухолево (0.5 мг/инъекцию) согласно выбранной терапевтической схеме на Рисунке 46 А. Инъекции препаратом ДНК-микс

производились только в один графт (обозначен как «обработанная опухоль»). (1, 2) Сравнение динамики роста опухолей в экспериментальной ($n = 8$ (А, Б)), и контрольной ($n = 5$ (А), $n = 3$ (Б)) группах, приведены $\text{Mean} \pm \text{SD}$. Достоверность оценивали при помощи метода множественных сравнений Бенджамини-Йекутиели. (3) Динамика изменения количества мышей с опухолью. (4) График выживаемости мышей. Достоверность отличия от контроля оценивали при помощи логарифмического рангового теста. (5) График средней продолжительности жизни мышей, достоверность оценивали с помощью критерия Манна-Уитни. (6) Внешний вид экспериментальных животных. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$.

Март-апрель 2019 г

В контрольной группе средний объем обоих графтов достиг $1\,500\text{ мм}^3$ к 9-му дню эксперимента (**Рисунок 49 А-1, 2**). После терапии «Каранахан» наблюдалось снижение размеров опухоли, у 22 % животных опухоль в сайте обработки полностью резорбировалась на 18-е сутки после начала обработки. У 4 из 8 мышей, начиная с 21 суток, наблюдалось развитие рецидива опухоли. У 1 мыши на 42-е сутки от начала терапии опухоль полностью исчезла (**Рисунок 49 А-3**). Патоморфологический анализ легких не выявил наличие метастаз у этой мыши. 38 % мышей погибли до 18-х суток эксперимента от развившегося симптомокомплекса, характерного для системной воспалительной реакции (**Рисунок 49 А-4**). У погибших мышей не обнаружилось развитие метастазов в легких. Выявленное количество метастазов у оставшихся мышей экспериментальной группы было в 11 раз меньше по сравнению с контрольной группой. Средняя продолжительность жизни животных составила в контроле – 9 суток, а в экспериментальной группе – 28 суток (**Рисунок 49 А-5, 6**).

Ноябрь-январь 2019 г

В контрольной группе средний объем обоих графтов достиг $2\,700\text{ мм}^3$ к 20 дню эксперимента (**Рисунок 49 Б-1, 2**), и мыши были выведены из эксперимента по этическим соображениям. После терапии согласно режиму «Каранахан» наблюдается полная резорбция опухоли на 13–20 сутки после начала терапии. У 57 % животных опухоли на обеих лапах полностью резорбировались. У остальных мышей наблюдалось бессистемное развитие рецидива опухоли, начиная с 20–29 суток, вне зависимости от обработки опухоли (**Рисунок 49 Б-3**). Средняя продолжительность жизни животных составила в контроле – 20 суток, а в экспериментальной группе – 54 суток (**Рисунок 49 Б-4-6**).

В обоих экспериментах продемонстрирована эффективность терапии «Каранахан». Однако только в эксперименте, проведенном в ноябре 2019 года, удалось достичь полной длительной ремиссии у 60 % экспериментальных мышей. Этот факт свидетельствует, что аналогично экспериментам с одним привитым графтом, четко прослеживается эффективность терапии, связанная с временем ее проведения, выражающаяся как в количестве выживших животных, так и в динамике развития рецидивов. На это же обстоятельство указывает и

сравнительная средняя продолжительность жизни мышей в марте и ноябре 2019 года. Был обнаружен факт неравномерного изменения размера трансплантатов на разных лапах. Также необъяснимым оказался факт произвольного развития рецидивов у мышей экспериментальной группы в ноябре 2019 года.

Динамика роста обработанных и необработанных опухолей индивидуально по мышам в экспериментальной и контрольной группах и сравнение размера обработанной и необработанной опухолей в конечной точке эксперимента индивидуально по мышам в каждой группе представлены в работе (Ruzanova et al., 2022).

3.7.4.5. Влияние сезонных и годовых ритмов на эффективность терапевтического режима «Каранахан» на модели карциномы Льюис

Проведенные в разные сезоны года и в одно и тоже время в течение двух календарных лет однотипные эксперименты выявили темпоральную зависимость эффективности примененной терапии от календарных факторов (**Рисунок 50**).

Оказалось, что в экспериментах с двумя графтами, проведенными весной и осенью одного и того же года, наблюдались выраженные изменения в эффективности редукции опухоли и частоте возникновения и устойчивом развитии рецидивов. В осенний период эффективность терапии по количеству животных без опухоли составила 57 % к 65 суткам эксперимента, тогда как в группе весеннего периода – 13 % к 42 суткам.

Анализ частоты и устойчивого развития рецидивов свидетельствует, что в ноябре 2019 г. рецидивы возникли у трех мышей и имели устойчивый вектор развития. Характерным является отсутствие видимой зависимости между развитием рецидива и сайтом обработки. Рецидивы возникали как в обработанной лапе, так и в необработанной после полной резорбции опухоли в обеих лапах. В марте 2019 г. рецидивы возникали у четырех животных, также имели устойчивый вектор развития и заканчивались гибелью животного от развитого новообразования. Более того, три мыши погибли с малым размером опухоли, предположительно из-за системной воспалительной реакции, возникающей после проведенной терапии.

В экспериментах с одним графтом, проведенными в два идущих один за другим календарных года в летний период, также наблюдались выраженные отличия в эффективности редукции опухоли и частоте возникновения рецидивов. В 2019 г. только 20 % мышей на момент 100-х суток от начала терапии не имели признаков опухоли. Рецидивы имели выраженный устойчивый вектор развития, заканчивающийся гибелью животного от развитого новообразования. В то же самое время в 2020 г. около 70 % опытных животных на 100-й день эксперимента не имели видимых признаков опухоли, при этом у 3 % из них рецидивы

возникали, но имели неустойчивый вектор развития и резорбировались без дальнейшего развития опухоли. У других 30 % животных рецидивы имели выраженный устойчивый вектор развития, заканчивающийся гибелью животного от развитого новообразования.

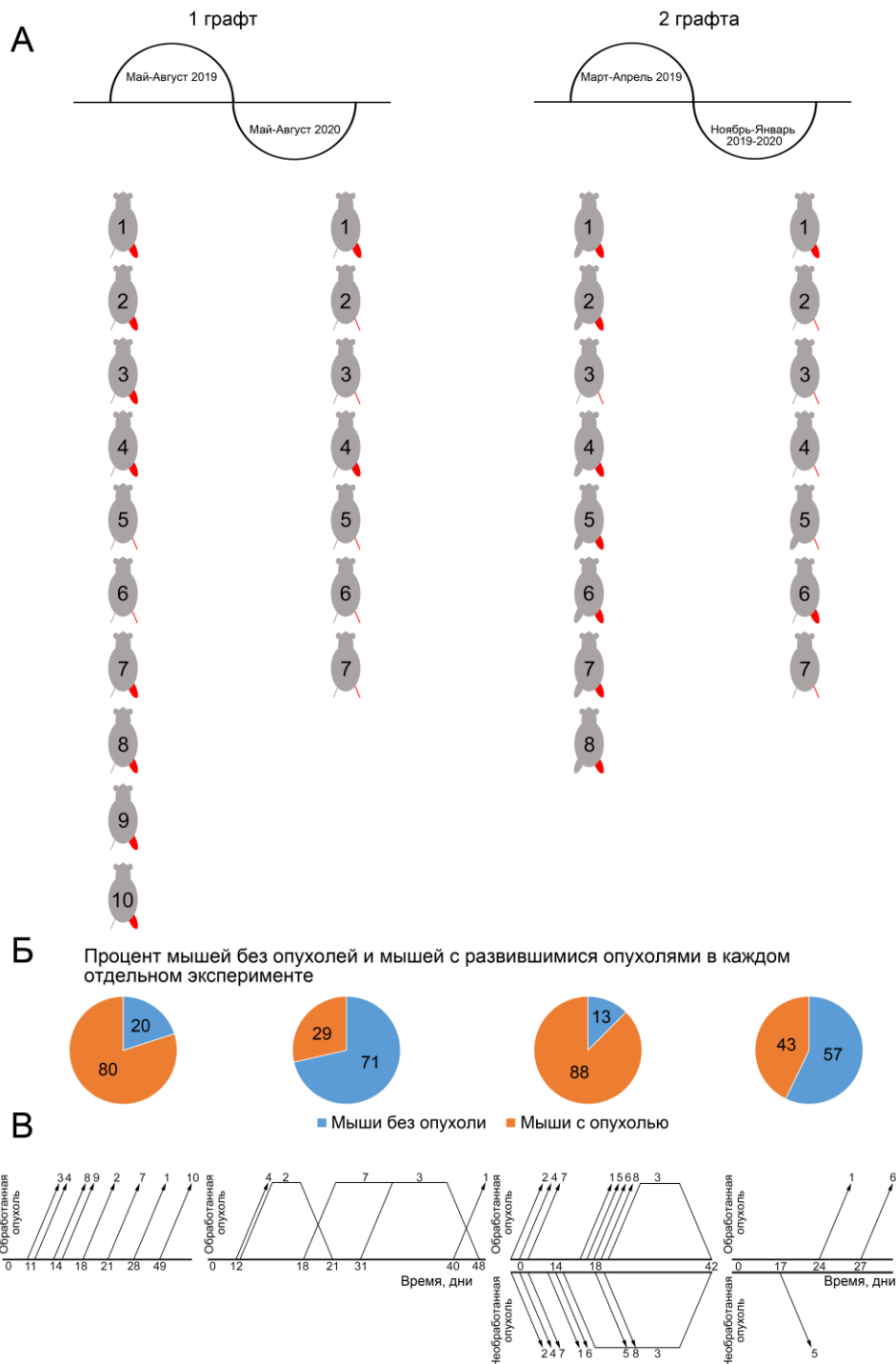


Рис. 50. Влияние сезонных и годовых ритмов на эффективность лечения мышей с перевитой карциномой Льюис согласно терапевтическому режиму «Каранахан». **А)** Схематическое изображение времени проведения экспериментов и изображение мышей, демонстрирующее наличие или отсутствие графта на момент завершения эксперимента. Красным выделена обрабатываемая лапа. Лапа в виде черты означает отсутствие опухоли. Объемная лапа

означает наличие опухоли. **Б)** График, демонстрирующий процентное соотношение мышей с опухолями и без опухоли. **В)** Схематическое изображение динамики возникновения и исчезновения рецидивов в разных лапах у экспериментальных мышей. Номер на графике соответствует номеру мыши на панели «А».

В целом проведенный сравнительный анализ выявил следующие закономерности. (1) Терапия эффективна как в случае одного, так и двух очагов опухолевого роста; (2) эффективность терапии зависит от ее сезонного применения и связана с годом применения для конкретной опухоли; (3) эффективность терапии зависит от количества очагов опухолевого роста; (4) наблюдается произвольное развитие рецидивов в экспериментальной группе, независимое от обработки опухоли препаратом ДНК-микс. Последнее явление могло быть связано с двумя обстоятельствами.

Во-первых, можно предположить, что между очагами опухолевого роста существует определенная коммуникация на уровне миграции ОСК. Механистическая схема такой коммуникации может выглядеть следующим образом. Не полностью эрадикарованное опухолевое начало (в виде ОСК) в любой из лап индуцирует рецидив в другой лапе. Пережившие лечение ОСК мигрируют в сайт, освободившийся от опухолевой массы вследствие проведенной терапии. В сайте бывшего нахождения опухоли уже созданы все условия для повторного заселения опухолевыми клетками. В первую очередь, сохраняется опухолевая капсула с остаточной опухоль-ассоциированной стромой, и, по-видимому, сохраняются стромальные ниши, необходимые для успешного «хоуминга» мигрирующих ОСК. То есть происходит диссеминация ОСК. Проведенный в дальнейшем анализ свидетельствовал о возможности такого развития событий (Ruzanova et al., 2022).

Второе предположение связано с развитием иммунного ответа на проведенную терапию (Sagiv-Barfi et al., 2018). В случае более эффективной редукции необработанного графта, возможно, сформированные и амплифицированные в селезенке CD8+Perf+ цитотоксические лимфоциты, в силу неизвестных обстоятельств, рекрутируются только в опухолевый очаг необработанной лапы, следствием чего является его более быстрая редукция. Этот феномен создает эффект явного превосходства развившегося адаптивного иммунного ответа над врожденным, определяемым по размерам опухоли в обеих лапах. В случае более эффективной редукции обработанного графта можно предположить, что в данном случае врожденный иммунный ответ превалирует над адаптивным. Возможны другие варианты, связанные с активностью независимого звена иммунитета, например, с активностью перитонеальных макрофагов.

Краткий вывод настоящей части исследования. На основании полученных данных можно предположить три разнонаправленных вектора развития иммунного ответа: (1) дифференцированная активность цитотоксических лимфоцитов в опухолевых очагах в силу пока неизвестных причин (анергия цитотоксических лимфоцитов в сайте обработки после проведенной терапии, связанная с активностью опухоли, отсутствие хемокинового рекрутирования CD8+Perf+ в сайт обработки); (2) активность клеток врожденного иммунного ответа в сайте обработки; (3) противоопухолевая активность перитонеальных макрофагов. Оказалось, что все три отмеченных возможности реализуются при проведении терапии «Каранахан», что было подробно исследовано в работе (Ruzanova et al., 2022).

Полученные результаты, а так же данные, представленные в работе (Ruzanova et al., 2022), свидетельствуют, что при применении терапевтического режима «Каранахан», помимо эрадикации ОСК и индукции масштабного апоптоза коммитированных опухолевых клеток, индуцируется противоопухолевый иммунный ответ, что является третьим вектором воздействия противоопухолевого режима «Каранахан».

3.7.5. Оценка эффективности терапевтического режима «Каранахан» на модели глиобластомы человека U87

Ключевым являлся вопрос об эффективности терапевтического режима «Каранахан» на экспериментальной модели опухоли человека с точки зрения его дальнейшей адаптации для клинического применения. Для анализа эффективности терапии была выбрана модель глиобластомы человека U87.

Несмотря на относительно низкую частоту встречаемости злокачественных новообразований центральной нервной системы, эти заболевания характеризуются высоким риском летальных исходов. Так, медиана выживаемости больных после постановки диагноза в среднем составляет 10–15 месяцев (Konar et al., 2017; Stupp et al., 2005). Глиомы составляют в среднем 24 % от всех опухолей головного мозга и являются вторыми по частоте встречаемости у взрослого населения (McNeill, 2016). Средняя продолжительность жизни пациентов с анапластической астроцитомой и глиобластомой составляет 15.2 и 6.9 месяцев соответственно (Gilbert, Ross, 2011b). По данным Cancer Research UK пятилетняя выживаемость пациентов с диагнозом анапластическая астроцитома составляет 25 %, тогда как больных глиобластомой – только 6 %. В этой связи использование в исследовании культуры клеток U87, как модели для разработки нового подхода лечения опухоли мозга, является актуальным выбором.

До середины 20-го века считалось, что нейральных 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 (Uchida et al., 2000). Было показано, что ОСК 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 (Brescia, Richichi, Pelicci, 2012; Gilbert, Ross, 2011b). В начале исследования было необходимо оценить присутствие в культуре U87 клеток, способных интернализировать TAMRA-ДНК зонд, которые, согласно полученным в настоящем исследовании данным, являются ОСК глиобластомы.

Была проведена оценка процентного содержания TAMRA+ клеток в культуре глиобластомы человека U87, которое составило $0.47 \pm 0.26\%$ (Рисунок 51 А, Б).

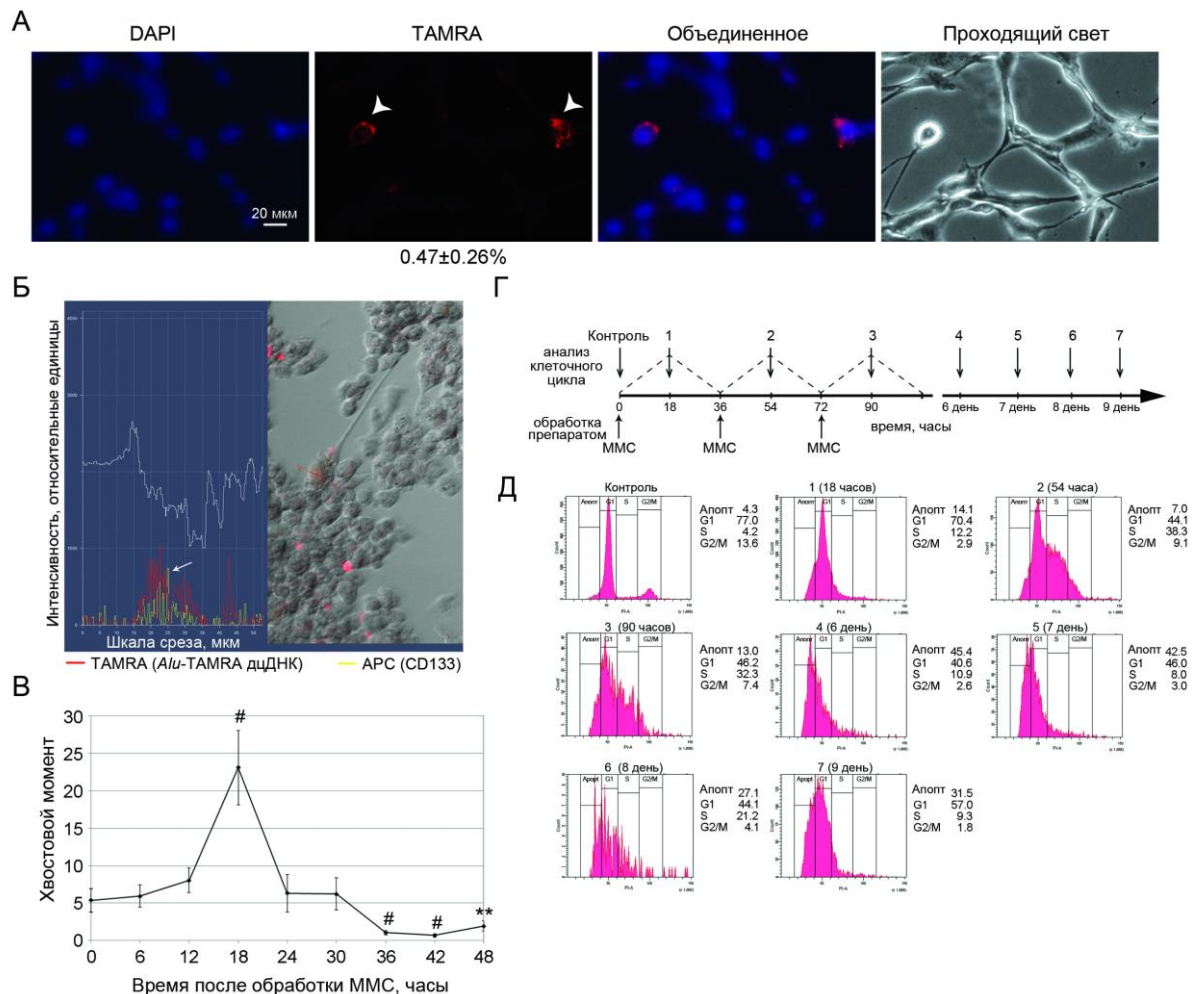


Рис. 51. Анализ биологических параметров клеток глиобластомы человека U87, необходимый для разработки схемы введения ЦФ и препарата ДНК-микс в соответствии с режимом «Каранахан». **А)** Анализ присутствия TAMRA+ клеток в культуре U87. DAPI – окраска

хроматина, TAMRA – сигнал TAMRA-ДНК зонда. **Б)** Объединенный профиль флуоресценции вдоль вектора, пересекающего отдельную клетку U87 (результат обработки изображения, полученного с помощью конфокального микроскопа LSM 780 NLO (Zeiss) в программном пакете ZEN). Белая стрелка указывает на место колокализации сигналов TAMRA-ДНК зонда и внутриклеточного пространства. **В)** График цикла репарации ДЦР, индуцированных действием цитостатика MMC, клеток культуры U87, полученный методом «комет». Количество ДЦР в клетках оценивали с использованием показателя «хвостовой момент». На графике приведены Mean $\pm$ SD; ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$, one-way ANOVA. **Г)** 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). Динамика накопления и репарации ДЦР после обработки цитостатиком (репаративный цикл) схематично отображена пунктирной линией. **Д)** Анализ распределения по клеточному циклу клеток глиобластомы U87 в течение терапии цитостатиком MMC. Плоты с проточного цитометра (BD FACSAria); G1, S, G2/M – фазы клеточного цикла; апопт. – апоптотизирующие клетки.

Кроме того, были проведены пилотные эксперименты по оценке возможности ксенотрансплантации клеток U87 иммунодефицитным мышам интрацеребрально (линия мышей SCID) и подкожно (мыши Nu/J).

При интрацеребральной трансплантации использовали по 400 тыс. клеток. На 33-й день с момента перевивки проводили МРТ головного мозга. Развитый графт хорошо детектировался у всех животных. При подкожной перевивке такого же количества клеток также были получены уверенно развивающиеся трансплантаты (данные не приводятся). В общей сложности эти результаты позволили использовать культуру U87 в качестве удобной репрезентативной модельной системы для определения режима эрадикации TAMRA+ ОСК U87 и оценки эффективности разрабатываемого режима лечения.

Далее необходимо было определить временную конфигурацию репаративного цикла клеток U87, что является базой для определения режима хронометрических обработок кросслинквирующим цитостатиком (когда каждая последующая обработка цитостатиком проводится в конечную фазу предыдущего репаративного цикла) и времени введения в терапию препарата ДНК-микс (в момент перехода фазы репарации механизмом NER в HR, что соответствует моменту максимального накопления ДЦР). Анализ образования и репарации ДЦР хроматина клеток глиобластомы U87 был произведен методом «комет» (**Рисунок 51 В**). Как видно из графика на **Рисунке 51 В**, максимум образования ДЦР в клетках U87 приходится на 18 часов с момента обработки цитостатиком ($p < 0.001$), репарация завершается к 36 часам с начала обработки.

Определенный таким способом режим трехкратных обработок цитостатиком позволяет определить день полной синхронизации ОСК в чувствительной для терапии фазе клеточного цикла и назначить день финальной обработки. Используя трехкратную обработку ММС, был определен день синхронизации опухолевых клеток в чувствительной для терапии фазе клеточного цикла (G1).

Схема обработок цитостатиком представлялась как трехкратная обработка культуры клеток *in vitro* средой с добавлением ММС (20 мкг/мл) в течение часа с последующей отмывкой после каждого эпизода культивирования с цитостатиком. Обработка цитостатиком производилась на временных отрезках, обрамляющих время найденного репаративного цикла (**Рисунок 51 Г**). Распределение культуры U87 по клеточному циклу выглядело следующим образом (**Рисунок 51 Д**). Сначала U87 клетки начинают накапливаться в S-фазе. К 54-му и 90-му часу после начала обработки идет накопление клеток в G2/M-фазе (сдвиг вправо). Минимальный показатель клеток в S и G2/M-фазе и идентичность плотов на протяжении 6–7-х суток свидетельствуют 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, эрадицирующей TAMRA+ (ОСК), обработки. На 8-й день четко определяется восстановление движения по клеточному циклу, которое характеризуется выходом клеток в фазу синтеза (21 % на 8-е сутки в отличие от 8 % на 7-е сутки).

На основании полученных результатов для клеток U87 была определена схема обработки цитостатиком и препаратом ДНК-микс согласно терапевтическому режиму «Каранахан» (**Рисунок 52 А**).

Для оценки эффективности применения разработанной стратегии лечения, было проведено несколько принципиально отличающихся вариантов исследований, позволяющих оценить: (1) воздействие на опухолевый потенциал культуры U87; (2) эффективность лечения уже развитого опухолевого очага. В первом случае клетки U87 предварительно обрабатывали препаратами *in vitro*, далее перевивали интрацеребрально иммуннодефицитным мышам и анализировали способность к образованию трансплантата. Во втором случае была протестирована эффективность лечения уже развитого графта. Использовали как терапию экспериментального подкожного трансплантата U87, так и максимально приближенного к реальным условиям ортотопического ксенографта в комбинации с его хирургическим удалением.

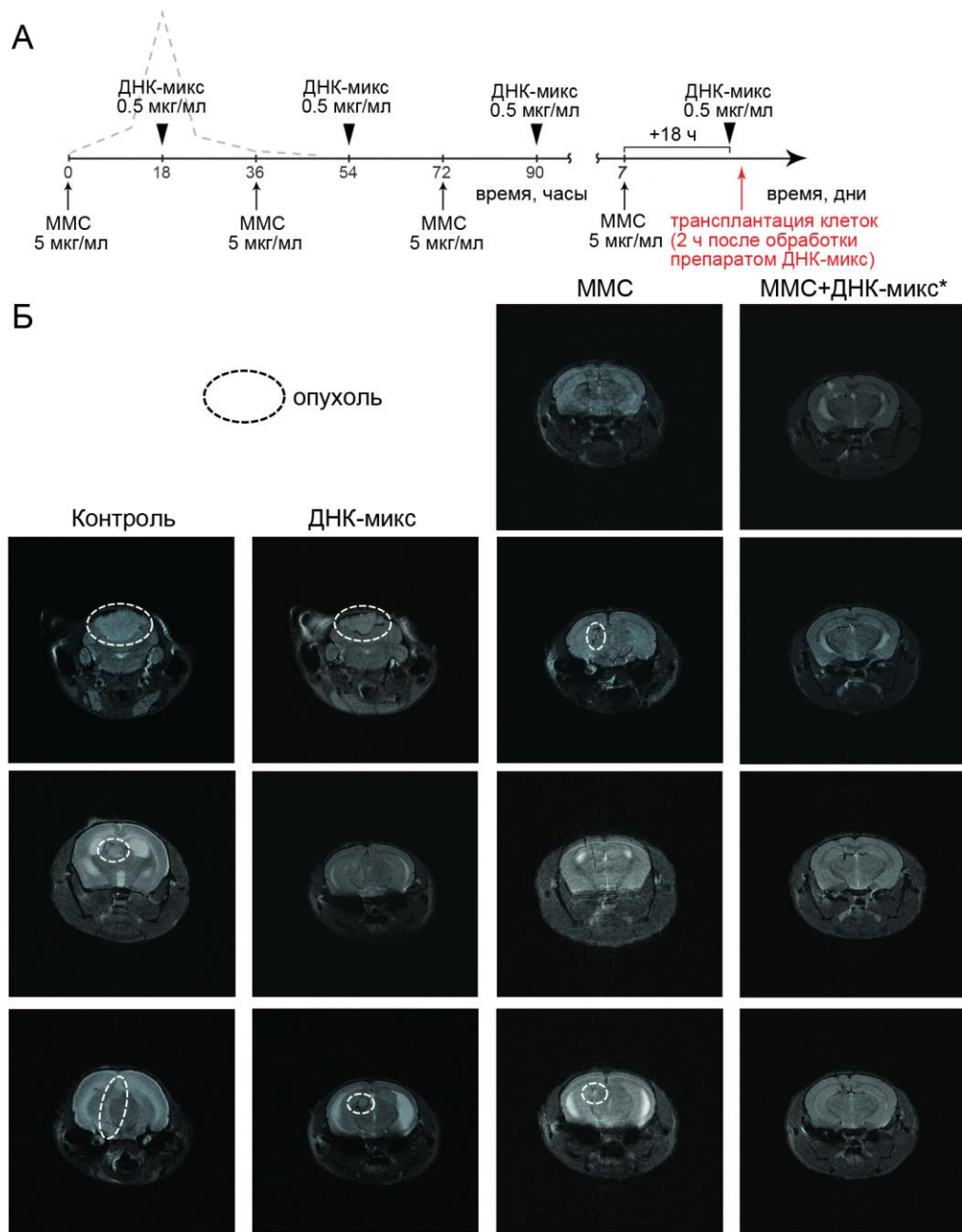


Рис. 52. Оценка влияния терапевтического режима «Каранахан» на туморогенный потенциал клеток глиобластомы человека U87 после обработки *in vitro*. **А)** Терапевтическая схема обработок клеток U87 препаратами ММС и ДНК-микс. Динамика накопления и репарации ДЦР после обработки цитостатиком (репаративный цикл) схематично обозначена пунктирной линией. **Б)** МРТ-анализ головного мозга SCID мышей через 24 суток после интрацеребральной трансплантации клеток U87. «Контроль U87» – положительный контроль, перевивка необработанных U87 клеток; «ДНК» – перевивка клеток, обработанных препаратом ДНК-микс в режиме монотерапии; «ММС» – перевивка клеток, обработанных только цитостатиком ММС; «ММС+ДНК-микс» – перевивка клеток, обработанных ММС и препаратом ДНК-микс. В группе «ММС+ДНК-микс» графты отсутствуют у всех животных. * $p < 0.05$ – отличие в скорости образования графта у экспериментальных животных по сравнению с контролем, логарифмический ранговый тест.

3.7.5.1. Оценка опухоленности клеток глиобластомы U87 после терапевтического воздействия согласно режиму «Каранахан» *in vitro*

Разработанная терапевтическая схема (**Рисунок 52А**) была использована для обработки культуры клеток U87 *in vitro* с их последующей интрацеребральной трансплантацией иммунодефицитным SCID мышам (400 тыс. в объеме 5 мкл/мышь). В первоначальных экспериментах при дозе цитостатика 20 мкг/мл не удалось обнаружить достоверной разницы при интрацеребральной перевивке как трансплантатов, обработанных только ММС, так и клеток, обработанных в режиме ММС+ДНК-микс в культуре. В обоих случаях графты не приживались.

В этой связи были проведены эксперименты с терапевтической дозой ММС равной 5 мкг/мл (Song et al., 2014). В последующих обработках культуры клеток U87 использовалась указанная терапевтическая доза ММС. Для обработки клеток U87 препаратом ДНК-микс была использована концентрация, составляющая 0.5 мкг/мл культуральной среды. Указанная концентрация препарата была выбрана из расчета, что в суспензии (или монослое клеток в данном случае) все клетки имеют свободный доступ к околклеточной среде, содержащей препарат дцДНК, в отличие от интратуморальных инъекций. По нашим данным, выполненным на модели Кребс-2, насыщаемость клеток экстраклеточной дцДНК наступает при дозировке ДНК 0.5 мкг/млн. клеток. В условиях данного эксперимента концентрация ДНК 0.5 мкг/мл соответствовала указанному параметру, когда происходит насыщаемость всех клеток, способных интернализировать экстраклеточные фрагменты ДНК.

Было сформировано 4 группы мышей (по 3-4 животного): 1) отрицательный контроль, инъекция физиологического раствора объемом 5 мкл (данные на рисунке не приводятся); 2) положительный контроль, перевивка необработанных U87 клеток, ~300 тыс. клеток/мышь; 3) ММС, в дозе 5 мкг/мл, перевивка ~400 тыс. клеток/мышь, обработанных только цитостатиком ММС; 4) ММС+ДНК, ~400 тыс. клеток/мышь, обработанных ММС в дозе 5 мкг/мл, и препаратом ДНК-микс по разработанной схеме. Количество обработанных клеток, используемое для трансплантации, превышало количество необработанных клеток, служившее контролем. На 24 сутки с момента трансплантации всем экспериментальным животным была сделана МРТ головного мозга и проведена оценка наличия опухоли. Результаты эксперимента представлены на **Рисунке 52Б**.

У всех контрольных мышей (n=3) и двух из трех мышей, которым перевивались клетки, обработанные ДНК-микс, сформировался интерцеребральный 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 ДНК-микс трансплантат, роста графта не было обнаружено ни у одного животного ($n=4$, $p<0.05$ по сравнению с контролем). Полученный результат предполагает, что проведенная обработка клеток глиобластомы цитостатиком ММС и препаратом ДНК-микс полностью эрадицирует опухолевое начало графта, представленного TAMRA+ клетками.

3.7.5.2. Оценка эффективности терапевтического режима «Каранахан» на модели подкожного ксенотрансплантата глиобластомы человека U87

Было проведено пять экспериментов с подкожной трансплантацией глиобластомы U87 и применением терапевтического режима «Каранахан». Результаты всех экспериментов соответствуют друг другу. Результаты последнего эксперимента, где были учтены все обнаруженные проблемы (например, неравномерный начальный рост опухолевых трансплантатов и связанный с этим разброс цифровых значений размеров опухолей) приведены в качестве иллюстрации.

Клетки U87 были перевиты самкам Nu/J мышей подкожно в межлопаточную область в количестве 1 млн/мышь. Через 15 дней были отобраны животные с прижившимися трансплантатами. Мыши были обработаны препаратами по разработанной схеме (Рисунок 53 А).

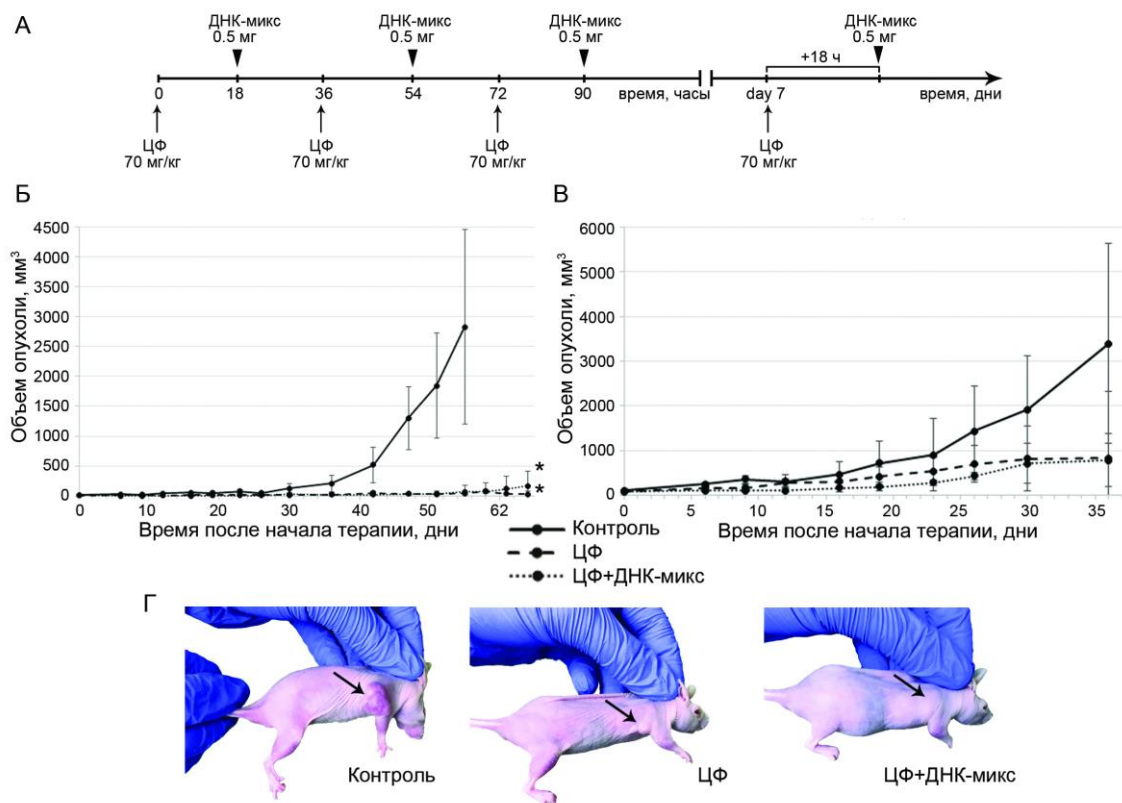


Рис. 53. Оценка эффективности терапевтического режима «Каранахан» на модели подкожного ксенотрансплантата глиобластомы человека U87. А) Схема терапии. Б) Динамика роста

графта у мышей с исходным размером опухоли до 5 мм³ (n = 7). **В)** Динамика роста графта у мышей с исходным размером опухоли, превышающим 5 мм³ (n = 6). На графиках приведены Mean ± SEM, *p<0.05, one-way ANOVA, критерий множественных сравнений Краскела-Уоллиса. **Г)** Фотографии животных после проведенной терапии.

В качестве кросслинквирующего цитостатика использовали ЦФ в дозе 70 мг/кг на инъекцию, который вводили внутривенно. Ввиду основной идеи постараться максимально приблизиться к клинической ситуации, в данной серии экспериментов дозировка цитостатика была снижена и адаптирована к той, что используют при проведении химиотерапевтического лечения в клинической практике. Сложнокомпозиционный препарат дцДНК вводили в дозе 0.5 мг на инъекцию интратуморально в три точки. Размер опухолей измерялся каждые три дня и объем опухолей рассчитывался по формуле $0.5 \times (\text{ширина})^2 \times \text{длина}$.

Терапия была проведена отдельно для мышей с исходным размером опухоли до 5 мм³ (**Рисунок 53 Б**) и мышей с опухолями, превышающими 5 мм³ (**Рисунок 53 В**). Оказалось, что разработанный режим эффективно тормозит развитие подкожного ксенотрансплантата в обеих отобранных категориях как в группе, получавших только цитостатик, так и в группе, получавших комбинированную терапию (**Рисунок 53 Г**). При этом в случае начала терапии с исходным небольшим размером опухоли (до 5 мм³) разница скорости роста опухолей в обеих экспериментальных группах по отношению с контролем достоверна (p<0.05). Во втором случае, когда исходный размер опухолей достаточно существенный (80–100 мм³) видна тенденция к замедлению скорости роста, достоверных отличий от контроля нет. В других аналогичных экспериментах было показано, что комбинированное воздействие ЦФ и препарата ДНК-микс имеет тенденцию более эффективного воздействия на развитие экспериментальной опухоли по сравнению с терапией только цитостатиком (данные не приводятся).

3.7.5.3. Оценка эффективности терапевтического режима «Каранахан» на модели ортотопического ксенотрансплантата глиобластомы U87 в комбинации с хирургическим удалением

В настоящем разделе приводятся результаты лечения экспериментальной глиобластомы человека U87 в приближенных к клиническим условиях с использованием режима «Каранахан» в сочетании с хирургическим удалением ортотопического ксенотрансплантата. Эксперимент состоял из двух этапов: хирургического удаления опухоли и терапии с использованием кросслинквирующего цитостатика ЦФ и препарата ДНК-микс согласно определенным индикаторным параметрам. Выбор цитостатика связан с несколькими обстоятельствами. (1) Только кросслинквирующий агент создает рекомбиногенную ситуацию,

при которой все составляющие терапии эффективны (репаративный процесс нарушений структуры хроматина темозоломидом детально не описан и не был адаптирован к принципу, описанному для терапевтического режима «Каранахан»). (2) ЦФ действует системно. (3) Показано, что около 20 % активного метаболита ЦФ, фосфорамид мустарда, преодолевает гематоэнцефалический барьер (Genka et al., 1990), при этом развитие опухоли и оперативное вмешательство усиливает эффективность доставки кросслинкующего метаболита в головной мозг за счет разрушения гематоэнцефалического барьера.

Для проведения эксперимента были взяты 15 иммунодефицитных мышей линии SCID. Всем мышам субкортикально в левую теменно-затылочную область головного мозга была выполнена перевивка суспензии клеток линии U87. Далее мыши были разделены на три группы по 5 особей: первая группа («ЦФ+ДНК») в послеоперационном периоде получала полную схему противоопухолевой терапии – циклофосфамид и препарат ДНК-микс, вторая группа («ЦФ») – цитостатик циклофосфамид в качестве монотерапии, третья («Контроль») – инъекции физиологического раствора.

До проведения лечения всем мышам было проведено хирургическое удаление опухолей. 12 мышей из 15 были успешно прооперированы, в послеоперационном периоде неврологического дефицита не наблюдалось. Гнойно-септических осложнений не отмечалось. В ходе интраоперационного этапа три мыши погибли в результате различных причин: остановки кровообращения, вызванной гипотермией, аспирации содержимого желудка в дыхательные пути из-за передозировки наркозного препарата. На пятый день после операции всем мышам было выполнено послеоперационное МРТ-сканирование. Производилась оценка радикальности удаления опухоли по стандартным критериям: тотальное удаление (свыше 95 % объема опухоли), субтотальное (80–94 %), частичное (50–79 %). В **Таблице 16** представлены результаты волюметрической оценки опухолей на пред- и послеоперационных этапах.

Таким образом, в группе «ЦФ+ДНК» удалось добиться тотального удаления опухолей у 3-х из 4-х мышей, в группе «ЦФ» – у 2-х из 4-х и в группе контроля – у 2-х из 4-х мышей.

Терапия согласно режиму «Каранахан» проводилась по той же разработанной схеме (**Рисунок 52 А**). Инъекции ЦФ производились внутривенно, доза каждой инъекции составляла 70 мг/кг, суммарная дозировка – 280 мг/кг. Данную схему химиотерапевтического воздействия получали две группы: «ЦФ+ДНК» и «ЦФ». Препарат ДНК-микс вводится подкожно над областью краниотомического окна в черепной коробке животного в количестве 0.5 мг в 100 мкл физиологического раствора на мышь. Данную схему получала только группа «ЦФ+ДНК». Контрольные МРТ-сканирования проводились на 17-е и 30-е сутки с момента

окончания терапии. На **Рисунке 54 А** представлены результаты всех четырех МРТ-сканирований, выполненных за весь период эксперимента для одного и того же экспериментального животного.

Таблица 16. Послеоперационная оценка остаточного объема ортотопических ксенотрансплантатов глиобластомы U87 у SCID мышей.

Группа	Номер животного	Предоперационное сканирование. Объем опухоли, мм ³	Послеоперационное сканирование. Объем опухоли, мм ³	Радикальность удаления опухолей
ЦФ +ДНК	1_1	4.692	0	100 % Тотальное
	1_2	3.1032	0	100 % Тотальное
	1_3	5.622	2.222	61 % Частичное
	1_4	2.446	0	100 % Тотальное
ЦФ	2_1	5.662	0	100 % Тотальное
	2_2	2.818	2.718	-
	2_3	1.974	0	100 % Тотальное
	2_4	63.364	16.251	75 % Частичное
Контроль	3_1	3.434	0	100 % Тотальное
	3_2	41.736	16.5475	61 % Частичное
	3_3	0.134	0.2385	-
	3_5	5.106	0	100 % Тотальное

По данным предоперационного сканирования во всех трех группах визуализируются единичные объемные образования с четкими границами, с субкортикальной локализацией в проекции теменной доли (отмечены белыми стрелками, **Рисунок 54 А**). На 17-е сутки после проведенной терапии в группе «ЦФ+ДНК» опухолевого роста не наблюдалось у 75 % особей. В группах «ЦФ» и «Контроль» была зафиксирована диссеминация опухоли по ликворным путям на базальную поверхность мозга (**Рисунок 54 А**, опухоли обведены белым пунктиром).

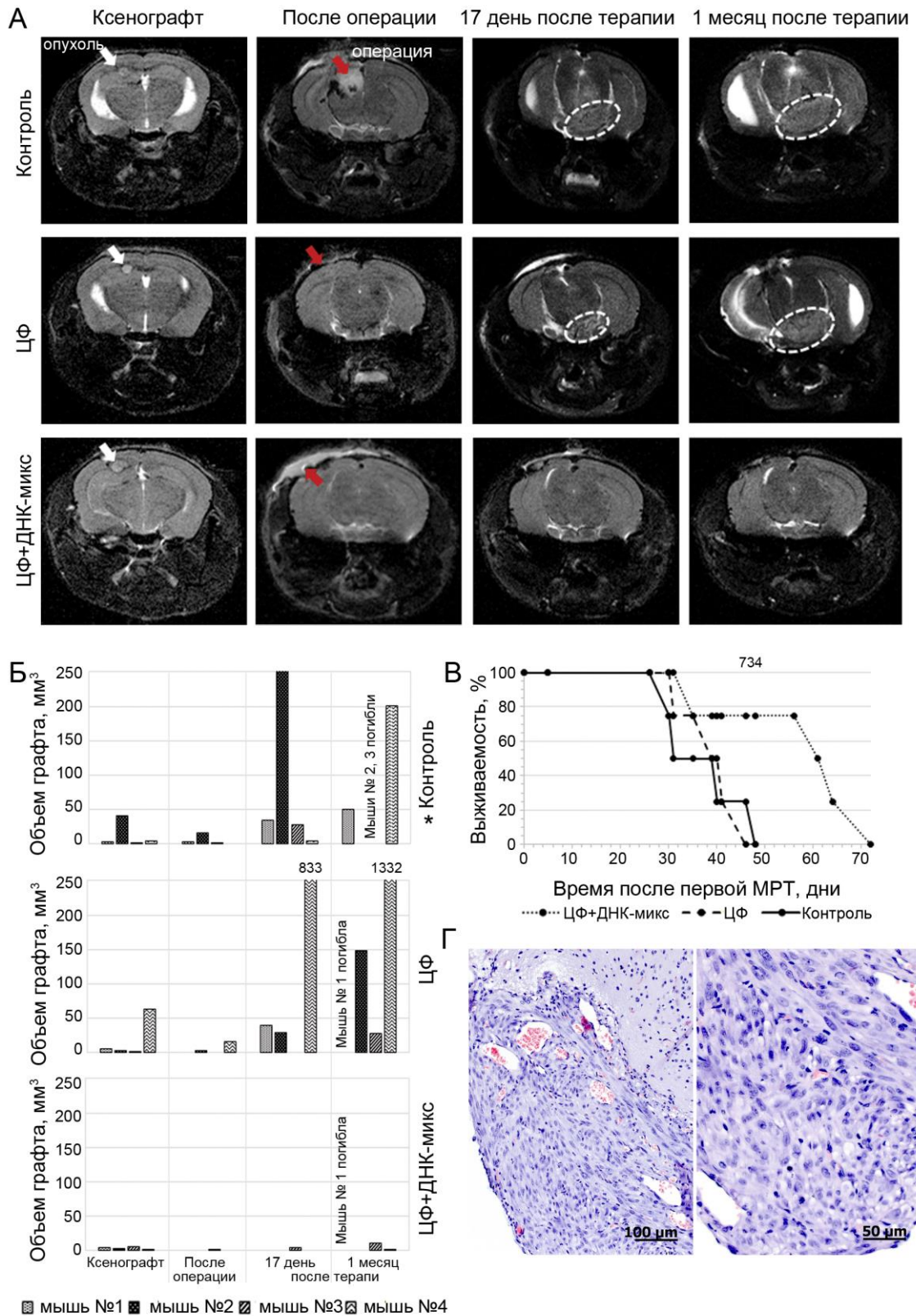


Рис. 54. Характеристика состояния опухолевого очага и анализ выживаемости мышей после проведенных терапевтических процедур. **А)** Данные четырех последовательных серий МРТ-сканирования, проведенных в ходе эксперимента. Ксенографт до проведения операции обозначен белыми стрелками. Область хирургического вмешательства отмечена красными стрелками. Опухоли, детектируемые после проведения терапии, обведены белым пунктиром.

Б) Гистограммы динамики роста опухолей индивидуально по мышам в группах: «ЦФ+ДНК», «ЦФ» и «Контроль». **В)** График выживаемости мышей в ходе эксперимента (кривые Каплана-Мейера); $*p < 0.05$, логарифмический ранговый тест. За начало эксперимента принят момент предоперационного МРТ-сканирования. **Г)** Гистологический анализ рецидивирующей опухоли у животного из группы «ЦФ+ДНК».

Через 1 месяц после проведенной терапии в группе «ЦФ+ДНК» не отмечалось развития опухолевого графта у одной мыши (25 %), одна мышь погибла (25 %), у двух других визуализировались объемные образования в проекции первичной локализации опухоли, однако, данные волюметрии показали, что динамика роста опухолей значительно снижена в группе «ЦФ+ДНК» по сравнению с двумя другими (**Рисунок 54 Б**). В группах «ЦФ» и «Контроль» отмечалось увеличение объема опухолей и инфильтративный тип роста.

По данным МРТ-сканирования было установлено, что применение терапевтического режима «Каранахан» приводило к выраженному цитостатическому эффекту, что значительно снижало скорость роста опухолей (**Рисунок 54 А-В**). Применение режима «Каранахан» увеличило медиану выживаемости мышей в группе «ЦФ+ДНК» в два раза относительно группы контроля: 62 дня против 35 дней (с момента первого МРТ-сканирования, $p < 0.05$, логарифмический ранговый тест). Медиана выживаемости в группе «ЦФ» составила 40 дней и не продемонстрировала достоверных различий относительно группой контроля ($p = 0.94$) (**Рисунок 54 В**).

Гистологический анализ рецидивирующей опухоли показал, что образование является глиобластомой, то есть исходно перевиваемой опухолью (**Рисунок 54 Г**).

Таким образом, эффективность лечения ортотопического трансплантата глиобластомы U87 с использованием режима «Каранахан» в сочетании с хирургическим удалением опухоли свидетельствует, что дополнение терапии ЦФ препаратом дцДНК, обеспечивающее эффективную эрадикацию TAMRA+ ОСК, может лечь в основу нового терапевтического подхода к лечению глиобластом.

3.7.6. Заключение

В разделе были приведены результаты апробации терапевтического режима «Каранахан», основанного на методе хронометрического, малодозового введения цитостата и сложнокомпозиционного препарата дцДНК по индивидуальной для каждой опухоли схеме, зависящей от времени репарации ДЦР каждого конкретного типа клеток. Основным принципом воздействия ДНК является обнаруженное в настоящей работе свойство ОСК интернализировать во внутриклеточное пространство фрагменты дцДНК, которые, находясь в

клетке в момент перехода фаз репарации NER в HR, интерферируют процесс репарации таким образом, что ОСК либо погибают, либо теряют свои туморогенные свойства. Принцип воздействия именно на ОСК является основой эффективности терапевтического режима «Каранахан». Эффективность режима не зависит от иммуногенности опухоли (Кребс-2), устойчивости к действию цитостатика (RLS) и связана или с физическим нарушением фрагментами дцДНК некоторых базовых структурных элементов при идущем репаративном процессе, или конкуренции за взаимодействие с репаративными белками и их стабилизации на экстрахромосомальных фрагментах с формированием «неразрешаемых» комплексов ДНК/белок. Длительное нахождение клетки в таком состоянии приводит к активации апоптоза и лизису.

Преимуществом данной терапии является ее универсальность – возможность применения для опухолей различной нозологии, а также персонифицированный подход, учитывающий определенные биологические характеристики опухоли. Сложность заключается в том, что для максимальной эффективности необходимо, чтобы препарат ДНК-микс был доставлен ко всем ОСК, что затруднительно в случае солидных опухолей, расположения опухолей вне доступа инъекций, а также наличия диссеминированных молчащих ОСК. Терапия цитостатиком, который доставляется ко всем клеткам в организме системно, в виде монопрепарата по схеме «Каранахан» также достоверно демонстрирует высокую эффективность.

3.8. Общее заключение к разделу результатов

В настоящей работе было открыто ранее неизвестное явление – способность небольшого процента опухолевых клеток интернализировать экстраклеточные двуцепочечные фрагменты ДНК естественным природным механизмом без использования трансфецирующих агентов. На двух клеточных моделях: карциноме мыши Кребс-2 и культуре клеток ВЭБ-индуцированной В-лимфомы человека было показано, что такие клетки являются ОСК, обладая всеми признаками, характерными для указанного типа клеток. В биологических тестах продемонстрирована туморогенность и клоногенность клеток этого типа. Установлено, что в клетках, способных захватывать TAMRA-ДНК зонд (то есть способных интернализировать фрагменты экстраклеточной дцДНК), повышена экспрессия генов, характерных для ОСК. При интернализации во внутриклеточное пространство в клетку может попадать до 425.3 ± 11.5 тыс. молекул дцДНК размером порядка 500 п.н. При этом фрагменты процессируются и лигируются в кольцевую структуру.

Полученные результаты открывают широкие перспективы для возможности детектировать ОСК в опухолях различной этиологии с использованием меченого флуорохромом (например, TAMRA) дцДНК зонда. В клинической практике это позволяет отслеживать эффективность любой применяемой терапии для каждого конкретного пациента при помощи анализа доли TAMRA+ клеток в биопсийных или операционных образцах (Dolgova et al., 2018).

В работе впервые в мире установлен механизм интернализации экстраклеточных фрагментов в низкодифференцированные эукариотические клетки, включая ОСК.

Доказано, что ОСК в отличие от коммитированных опухолевых клеток обладают развитым гликокаликсом с преобладанием положительного поверхностного заряда. Эта отличительная особенность позволяет ОСК за счет сил электростатического притяжения аккумулировать отрицательно заряженные фрагменты дцДНК на своей поверхности. Следующий этап взаимодействия экстраклеточной дцДНК с клеткой состоит в формировании химической/молекулярной связи с белками клеточной мембраны за счет гепарин-связывающего домена, либо за счет ДНК-связывающих доменов в составе SR и/или GPI-AP. На последнем этапе происходит интернализация экстраклеточных фрагментов дцДНК в клетку путем кавеолин-зависимого эндоцитоза и макропиноцитоза в случае Кребс-2, либо клатрин- и кавеолин-зависимого эндоцитоза и макропиноцитоза в случае В-лимфомы.

Другим принципиально важным элементом настоящего исследования является разработка терапевтического режима лечения опухолей, основанного на принципе совместного воздействия на опухолевые клетки кросслинкирующего цитостатика и сложнокомпозиционного препарата на основе дцДНК. Основной мишенью такой терапии являются ОСК, которые при правильно подобранном режиме обработок полностью удаляются из очага опухолевого роста. В данном диссертационном исследовании терапевтический режим был апробирован на нескольких моделях опухолей мышей, а также на модели глиобластомы человека U87 и показал высокую эффективность.

Таким образом, в настоящем исследовании на основании ранее неизвестных науке биологических свойств стволовых клеток различного генеза, включая ОСК, удалось разработать и применить на практике новый подход к лечению экспериментальных злокачественных неоплазий, в основе которого лежит эрадикация ОСК.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании детально проработаны два экспериментальных направления. Первое посвящено открытию нового общебиологического свойства опухолевых стволовых клеток и описанию нескольких связанных с ним последствий. Второе направление логически вытекает из первого и предлагает на основе открытого явления новую парадигму терапии пациентов со злокачественными новообразованиями. В разделе «Обсуждение» будут высказаны некоторые мысли и соображения относительно места нового свойства ОСК в биологии стволовых клеток и проведен сравнительный анализ нового терапевтического подхода со стандартными и современными методами лечения онкологических больных.

4.1. Новое общебиологическое свойство ОСК – способность интернализировать фрагменты экстраклеточной дцДНК естественным природным механизмом

4.1.1. Опухолевая клетка, способная интернализировать TAMRA-ДНК зонд, является опухолевой стволовой клеткой

Основываясь на ранее полученных результатах, что фрагменты экстраклеточной дцДНК попадают во внутриклеточное пространство ГСК и участвуют в молекулярных процессах, происходящих в клетках, в настоящем исследовании было выдвинуто предположение, что экстраклеточная дцДНК может взаимодействовать схожим образом с ОСК. Указанное предположение было проверено на двух моделях опухолевых клеток: карциноме мыши Кребс-2 и культуре ВЭБ-ндуцированной В-лимфомы человека. Основным инструментом исследования был меченый флуорохромом TAMRA фрагмент дцДНК (TAMRA-ДНК зонд) с известной последовательностью (раздел 2.6).

Показано, что в обеих опухолевых моделях существует популяция клеток, способная интернализировать TAMRA-ДНК зонд, а также протяженные линейные (до 6 т.п.н.) и кольцевые фрагменты дцДНК. В работе даны качественные и количественные характеристики указанного процесса.

В среднем процент клеток, интернализирующий экстраклеточную дцДНК, в разных сообществах опухолевых клеток составляет от 1 до 8 %. Время насыщения клеток экстраклеточной ДНК составляет от 40 до 60 мин при количественном соотношении порядка 0.5 мкг экстраклеточной ДНК на 1 млн опухолевых клеток. Показано, что короткие линейные фрагменты уже в течение нескольких минут попадают в цитоплазматическое пространство клетки, плазмидная ДНК и протяженные молекулы ДНК (6 т.п.н.) практически моментально

оказываются в ядерном пространстве клетки (настоящее исследование, (Rogachev et al., 2006)). Количественный анализ, выполненный при помощи qPCR на модели клеток Кребс-2, свидетельствует, что в клетку может интернализироваться $\sim 3.097 \pm 0.044$ млн копий плазмидной ДНК и $425.268 \pm 1\,1499$ тыс. молекул *Alu* фрагмента (500 п.н.).

Интригующим оказался факт увеличения процента клеток на 15–20 % относительно исходного значения, интернализирующих ДНК, при добавлении новой порции ДНК в околочлеточную среду через 3–4 часа после первой «волны» интернализации. Это означало, что через 3–4 часа появляется дополнительная популяция клеток, которая в первую точку анализа не имела возможность к интернализации, и у которой указанное свойство появилось (или возобновилось). При рассмотрении возможных причин такого явления, было выдвинуто предположение о его связи с прохождением клеткой фаз клеточного цикла, в ходе которого принципиально меняются ее структурная организация и биохимическое состояние, и в особенности – с нахождением клетки в митозе.

Как известно, в процессе интернализации и транспортировки экстраклеточной дцДНК в клетку немаловажную роль играют элементы цитоскелета (Hall et al., 1994; Holmgren et al., 1999). В митозе актиновые филаменты и структура цитоплазматической мембраны претерпевают реорганизацию, нацеленную на основную в данный момент времени функцию: расхождение хроматина (хромосом) к разным полюсам клетки и формирование перешейка, определяющего деление цитоплазматической мембраны на две дочерние клетки. Вероятно, в этот момент времени механизм, при помощи которого дцДНК интернализуется в клетку, не активен и заново активируется только по окончании деления. Клетка переходит в G1-фазу и восстанавливает все синтетические процессы, заблокированные в ходе митоза, в том числе восстанавливается структура цитоплазматической мембраны, которая в первую очередь отвечает за процесс интернализации ДНК.

На высказанные соображения указывают результаты экспериментов по определению механизма интернализации фрагментов дцДНК в клетку, где показано, что это клатрин-/кавеолин-зависимый транспорт. Как известно, основным «мотором» такой интернализации является актин (Mooren, Galletta, Cooper, 2012). В митозе «актиновый мотор» направлен на процесс расхождения хромосом к полюсам и непосредственно на акт деления клетки, и, по всей видимости, остальные функции, связанные с динамикой актинового скелета, находятся в репрессированном состоянии. Кроме того, есть данные о том, что эффективность эндоцитоза в значительной степени зависит от фазы клеточного цикла. Это связано не только с реорганизацией актиновых микрофиламентов, но также функциональным состоянием лизосом в период деления клетки. Так, на синхронизированной культуре клеток гепатомы крысы

(НТС 7288с) было показано, что эффективность эндоцитоза различных субстратов при переходе из G1-фазы клеточного цикла в позднюю S-фазу снижается в 5–10 раз, находится на критически низком уровне в период G2-фазы и восстанавливается после прохождения митоза (Quintart et al., 1979).

Основной вывод из полученных результатов состоит в том, что во время митоза клетка не в состоянии интернализировать экстраклеточные фрагменты ДНК по причине реорганизации цитоскелета, а также биохимической и молекулярной подготовки к делению. При переходе в G1-фазу эта способность возобновляется. Этот вывод имеет важное практическое следствие, которое было учтено при разработке нового терапевтического режима лечения злокачественных новообразований. Терапевтическое действие препарата дцДНК будет не эффективным при его введении в терапию без учета времени нахождения клеток опухоли в митозе. Это следствие всегда принималось во внимание при планировании временного режима обработки препаратами, отталкивающегося от биологии ОСК и составляющего основу нового терапевтического режима «Каранахан».

В экспериментах по перевивке графта мышам, а также молекулярными методами было показано, что клетки, захватывающие TAMRA-ДНК зонд, обладают всеми характерными признаками ОСК и по сути таковыми являются. Они туморогенны и при перевивке образуют графт, гистологически соответствующий исходной опухоли – признак, свойственный только ОСК. Одним из наиболее показательных фактов являлся тот, что наличие TAMRA+ клеток служит обязательным условием для успешной перевивки опухоли. При их отсутствии в трансплантируемом образце графт не перевивается. TAMRA+ клетки клоногенны и образуют колонии и свободноплавающие сферы. В них повышена экспрессия генов, ответственных за основные отличительные свойства ОСК (поддержание низкодифференцированного состояния, асимметричное деление, ЭМП, миграция и метастазирование, особенности метаболизма).

4.1.2. Три элемента, определяющие интернализацию TAMRA-ДНК зонда в клетку

Обнаруженный феномен, а именно способность ОСК интернализировать экстраклеточные фрагменты дцДНК, ставил основной вопрос: каков механизм этого явления? В экспериментах по сборке сфер В-лимфомы было обнаружено, что сферообразующий центр, состоящий из TAMRA+ клетки и нескольких не окрашивающихся клеток, собирается в течение 20 мин, и выглядит это как притяжение TAMRA+ клетки и TAMRA– контрагентов. При детальном анализе формирования сфер не было обнаружено признаков механического движения (мерцание псевдоподий). Это наблюдение позволило предположить, что два типа

клеток имеют различный заряд клеточной поверхности, за счет которого происходит притяжение.

Для двух выбранных модельных систем (карциномы Кребс-2 и ВЭБ-индуцированной В-лимфомы человека) были проведены серии экспериментов с разделением клеток по заряду в системе электрофореза в свободном объеме, а также с использованием обработки катионным красителем Basic Blue GRL 41 и последующей обработкой TAMRA-ДНК зондом. *Проведенное комплексное исследование дало возможность предполагать, что одним из отличий TAMRA+ ОСК обеих опухолевых моделей является общий положительный заряд клеточной мембраны, который определяет первичный контакт экстраклеточных фрагментов ДНК с поверхностью клетки. Положительный заряд ОСК является первым элементом процесса интернализации фрагментов экстраклеточной дцДНК.*

Полученные результаты отличаются от общепринятой концепции суммарного отрицательного заряда поверхности клеток и дают основание предполагать, что ОСК, в отличие от коммитированных потомков, имеют положительный заряд клеточной мембраны. Информации касательно положительного заряда клеточной поверхности ОСК в мировой литературе нет. Однако в работе (Fuchs, Blau, 2020) имеются данные, что между стволовыми клетками и клетками стволовых стромальных ниш могут существовать электростатические взаимодействия, что предполагает разноименный заряд стволовых и стромальных клеток и возможность наличия у клетки положительного заряда в принципе. Ввиду критически малого количества информации относительно этого вопроса, далее будут выдвинуты предположения, основывающиеся на результатах, полученных в настоящем исследовании.

Методом микрогель-электрофореза было установлено, что вторым этапом взаимодействия экстраклеточных фрагментов дцДНК с ОСК является *химическое/молекулярное взаимодействие со специфическими факторами клеточной цитоплазматической мембраны*, которые имеют способность передвигаться по мембране клетки. Под воздействием электрического поля с TAMRA-ДНК зондом, находящимся в контакте с клеткой, происходили следующие изменения. У части клеток обнаруживалось смещение меченой дцДНК к краю клетки с формированием характерного серповидного рисунка. У некоторых клеток детектируемая TAMRA-меченая дцДНК не меняла своего первоначального положения. У нескольких клеток детектировалось полное исчезновение (слушивание) TAMRA-ДНК зонда, исходно ассоциированного с клеткой. Мы предполагаем следующую общую схему начальных этапов взаимодействия полианиона и клетки.

Заряд является иницирующим фактором взаимодействия дцДНК с клеточной мембраной. Обнаруженный эффект слушивания может являться демонстрацией этого

события. Это также означает, что заряд не отвечает за прочность удержания фрагментов дцДНК в непосредственной близости к мембране и их интернализацию внутрь клетки.

После электростатического притягивания дцДНК фиксируется на поверхности клетки прочной связью с белками клеточной поверхности, и при воздействии электрического тока комплексы мигрируют по клеточной мембране к «+» полюсу, не диссоциируя с клеткой. Это предполагает, что движение происходит за счет отрицательного заряда дцДНК, и что дцДНК связана с факторами клеточной мембраны, прочно заякоренными в мембране. Последний вариант, когда экстраклеточная ДНК не меняет расположения внутри клетки, по всей видимости, связан с тем, что это уже интернализованная дцДНК, и воздействие внешнего электрического поля не оказывает влияния на ее расположение.

И наконец, показано, что гепарин конкурирует за связь TAMRA-ДНК зонда с клеткой, но, по-видимому, не предотвращает его интернализацию, хотя также может интернализироваться во внутриклеточные компартменты. Это означает, что для ДНК существуют свои факторы, определяющие ее интернализацию. Был сформулирован основной вопрос, связанный с процессом интернализации экстраклеточных фрагментов ДНК внутрь клетки, который звучал следующим образом: какие факторы клеточной поверхности определяют связывание дцДНК зонда и его интернализацию?

4.1.3. Гликокаликс и его участие в процессе интернализации фрагментов дцДНК в ОСК

Основными компонентами, формирующими структуру гликокаликса, являются протеогликаны и гликопротеины, а также белки внеклеточного матрикса. В структуре гликокаликса также находятся различные мембран-связанные белки, ассоциированные или с липидными рафтами, или структурированные клатрином. Гликокаликс имеет отрицательный заряд, что определяет его взаимодействие с компонентами плазмы. Отрицательный заряд зависит от сульфатации боковой цепи гликозаминогликанов (ГАГ). Считается, что заряженная сетка гликокаликса действует как макромолекулярное сито, отталкивая отрицательно заряженные молекулы, а также эритроциты и тромбоциты. Некоторые амфотерные молекулы с небольшим положительным зарядом, например, альбумин, также могут связываться с элементами гликокаликса (Becker, Chappell, Jacob, 2010; Pries, Secomb, Gaehtgens, 2000; Reitsma et al., 2007).

Гликокаликс и образующие его PG/GP, GPI-AP (подробно описаны в следующем разделе) и SR являются характерной чертой опухолевых/стволовых опухолевых клеток. В настоящее время насчитывается около 30 гликопротеинов клеточной поверхности ОСК. Факторы гликокаликса являются участниками всех процессов, обеспечивающих

функциональные особенности ОСК. Гликокаликс играет решающую роль при взаимодействии рецептор-лиганд опухолевых клеток и их окружения, обеспечивая ЭМП, выход в циркуляцию, аноиксис, экстравазацию и выживание в ином месте локализации. РГ влияют на пролиферацию и рост клеток в результате взаимодействия с факторами роста. Высокая экспрессия некоторых GP (например, муцина 1) коррелирует с развитием агрессивных раков (Ahrens et al., 2020; Barnes et al., 2018; Knelson, Nee, Blobe, 2014; Kuo et al., 2018; Mallard, Tiralongo, 2017; Mitchell, King, 2014; Paszek et al., 2014; Vitale et al., 2019). Таким образом, гликокаликс является общепринятым структурным компонентом поверхности ОСК, обеспечивающим ее разнообразные функции.

Для анализа процесса интернализации был использован подход, при котором анализировалось конкурентное влияние на интернализацию TAMRA-ДНК зонда полианионов гепарина и декстран сульфата. Проведенные в исследовании эксперименты свидетельствуют о выраженных конкурентных взаимоотношениях в процессе взаимодействия с клеткой между TAMRA-ДНК зондом (150 кДа), гепарином (12–16 кДа) и декстран сульфатом (500 кДа). Показано, что полианионы конкурируют с дцДНК за различные факторы гликокаликса, определяющие контакт фрагментов дцДНК с клеткой и их интернализацию.

Описана парадоксальная ситуация, свидетельствующая о том, что многие компоненты в целом отрицательно заряженного гликокаликса связывают отрицательно заряженные гепарин и декстран сульфат. Основными элементами связывания являются домены положительно заряженных аминокислот и коллаген-подобные домены, широко представленные в составе факторов гликокаликса, относящихся к функционально и структурно различным группам белков (Doi et al., 1993; Fannon, Forsten, Nugent, 2000; Ori, Wilkinson, Fernig, 2008; Tsubamotoa et al., 1994).

Для гепарина установлено, что сайты связывания полианиона в белках характеризуются наличием кластеров положительно заряженных аминокислот, которые в отсутствии гепарина образуют ионные пары с отрицательно заряженным сульфатом полисахарида. Неэлектростатические взаимодействия, такие как водородные связи и гидрофобные взаимодействия, также могут способствовать стабильности гепарин-белковых комплексов (Muñoz, Linhardt, 2004; Ori, Wilkinson, Fernig, 2008). Известно, что гепарин специфически связывается с положительно заряженным доменом, так называемым коллаген-подобным доменом, характеризующимся или специфическим положительно заряженным сайтом связывания, или следующими друг за другом кластерами положительно заряженных аминокислот (Delacoux et al., 2000; Deprez, Inestrosa, 1995; Doi et al., 1993; Muñoz, Linhardt, 2004; Ori, Wilkinson, Fernig, 2008). Коллаген-подобный домен представлен в структуре PGs

гликокаликса и SR-H класса (Chiodelli et al., 2015; Meneghetti et al., 2015; Muñoz, Linhardt, 2004; Ori, Wilkinson, Fernig, 2008; Ori, Wilkinson, Fernig, 2011). Кроме того, известно, что гепарин связывается со специфическим сайтом, имеющим консенсусную последовательность аминокислот, расположенную в структуре коллаген-подобного домена C1q фактора комплемента (Garlatti et al., 2010). И наконец, гепарин связывается и интернализуется в клетку рецептором класса SR-H (Harris, Baggenstoss, Weigel, 2009; Harris, Weigel, Weigel, 2008; Urano et al., 1997).

Из полученных в работе результатов следует, что гепарин ингибирует связывание дцДНК с белками клеточной поверхности. Это означает, что дцДНК конкурентно связывается с теми же доменами, что и гепарин. При этом интернализация дцДНК не ингибируется гепарином, что свидетельствует о другом факторе клеточной мембраны, определяющим доставку дцДНК зонда в клетку. Удивительным оказалось, что декстран сульфат ингибирует как связывание, так и интернализацию.

Известно, что SR определяют интернализацию лигандов различного типа (Alquraini, Khoury El, 2020; PrabhuDas et al., 2017; Weigel, 2020). Рецептор класса SR-A имеет в своей структуре коллаген-подобный домен, формирующий положительно заряженную бороздку (Doi et al., 1993). Описано, что указанный сайт связывает полианионы, в первую очередь ацетилированные липопротеины низкой плотности, и доставляет их во внутренние компартменты клетки. Анализ аминокислотной последовательности коллаген-подобного домена SR-A свидетельствует, что помимо специфической «+ бороздки», сформированной кластером положительно заряженных аминокислот, имеются дополнительные кластеры сгруппированных R и K аминокислотных остатков. В завершение, в структуре анализируемого домена расположено несколько сайтов специфического связывания дцДНК, определенных кристаллографически в другой работе (Garlatti et al., 2010). Это предполагает участие SR-A в связывании и интернализации дцДНК зонда. Суммируя данные, общая картина взаимодействия гепарина и дцДНК зонда будет следующей. Связывание дцДНК зонда со специфическими сайтами PG гликокаликса ОСК будет конкурентно ингибироваться гепарином, что подтверждается в экспериментах по анализу изменения процента TAMRA+ клеток. Одновременно дцДНК зонд связывается и интернализуется SR, предположительно А-класса. Гепарин при этом имеет другого партнера-рецептора интернализации SR-H класса. Значит, в этом случае конкурентного ингибирования не происходит, что экспериментально подтверждается результатами qPCR, где обработка гепарином не влияет на количество интернализованного дцДНК зонда.

Этот вывод подкрепляется анализом конкурентного ингибирования связывания и интернализации дцДНК зонда декстран сульфатом 500 кДа. Проведенные эксперименты свидетельствуют, что декстран сульфат полностью блокирует как сайты связывания дцДНК зонда на поверхности клеток (цитологический анализ, данные не приводятся), так и сайты связывания с рецепторами, интернализирующими дцДНК зонд (qPCR анализ).

Декстран сульфат – искусственный полианион, который конкурирует с гепарином за связь с SR-H (Harris, Weigel, 2008; Nishinaka et al., 2020), ингибирует SR-A-опосредованную интернализацию acetyl-LDL и AGE (advanced glycation end-product) (Goldstein et al., 1979; Nishinaka et al., 2020), при этом интернализуется в комплексе с LDL при участии другого типа SR (Basu et al., 1979). Декстран сульфат функционирует как «индуктор интернализации» за счет формирования межмолекулярного моста между экстраклеточными доменами. Известно, что декстран сульфат может одновременно физически связывать внеклеточный домен NRP1 и скавенджер-рецептор SREC-I, что способствует их скоординированной интернализации в эндотелиальные клетки (Narazaki, Segarra, Tosato, 2008). Также декстран сульфат связывает вирион вируса простого герпеса и специфический клеточный рецептор (по-видимому, скавенджер-рецептор), опосредуя интернализацию патогена (Dyer et al., 1997). Таким образом, декстран сульфат является комплексным лигандом поверхностных молекул, включая PG и SR, которые выполняют различные функции и отвечают за связь с полианионами (гепарином, дцДНК зондом), что и определяет его конкурентные преимущества по отношению к дцДНК зонду.

Проведенный анализ свидетельствует, что в процессе захвата и интернализации TAMRA-ДНК зонда принимают участие домены положительно заряженных аминокислот и коллаген-подобные домены, находящиеся в белках PG/GP, GPI-AP и SR, широко представленных в структуре гликокаликса и являющихся третьим элементом процесса интернализации.

4.1.4. Формирование общего положительного заряда клеточной мембраны ОСК

Открытым к обсуждению остается вопрос относительно отрицательного заряда, сформированного сульфатированными ГАГ, который, как общепризнанно, всегда доминирует. Предлагаются следующие варианты объяснения движения TAMRA+ положительно заряженных клеток к отрицательному полюсу в экспериментах по электрофоретической разгонке в свободном объеме.

В работах последних лет появились данные о различной степени сульфатированности PG/GP опухолевых клеток (Pasquale De, Pavone, 2020; Peixoto et al., 2019; Sarrazin, Lamanna,

Esko, 2011). Возможная низкая степень сульфатированности PG/GP TAMRA+ клеток может являться основанием доминирования «+» заряда, сформированного специфическими гепарин/дцДНК-связывающими доменами. Если при этом происходит кластеризация и мультимеризация PG, то положительный заряд усиливается тесным сближением молекул, несущих положительно заряженные домены на N-конце (Cheng, Nichols, 2016; Furini, Verderio, 2019; Sarrazin, Lamanna, Esko, 2011; Singh, Carraher, Schwarzbauer, 2010). Для рассматриваемого случая возможен вариант латерального (горизонтального) множественного контакта линейных молекул дцДНК с «шапкой» положительно заряженных доменов мультимера PG/GP. Такой механизм описан для начала формирования внеклеточного матрикса с участием коллагена, гепаринсульфата, фибронектина/интегринов, гиалуроновой кислоты или мультивалентов амилоида (Ahrens et al., 2020; Iannuzzi, Irace, Sirangelo, 2015; Sarrazin, Lamanna, Esko, 2011; Singh, Carraher, Schwarzbauer, 2010).

Известно, что коллаген несет домен связывания полианиона (гепарин/дцДНК). При анализе экспрессии генов двух выбранных моделей (карцинома Кребс-2, ВЭБ-индуцированная В-лимфома) был отмечен следующий факт. В обоих транскриптомах присутствуют транскрипты генов, продукты которых (коллагены) секретируются во внеклеточную среду и составляют структуру внеклеточного матрикса. Одновременно к высокоэкспрессирующимся генам относятся гены *ITGA10*, *5*, *1* (Integrin- $\alpha 10$, $\alpha 5$, $\alpha 1$), являющиеся рецепторами к коллагену, который также характерен для обоих транскриптомов. Транскрипция в одной и той же клетке такой функциональной пары может свидетельствовать о непрямом механизме связывания экстраклеточной дцДНК и белков клеточной поверхности через прокладку «коллагенов внеклеточного матрикса» и специфического отрицательно заряженного рецептора к коллагену (Maksimenko, Turashev, 2014).

Кластеры «+» аминокислот или сайты специфического связывания полианионов вынесены вовне от поверхности цитоплазматической мембраны на N-конец PG/GP и пространственно разобщены с ГАГ, фиксированными в средней части коровых белков (Sarrazin, Lamanna, Esko, 2011). В этом случае можно рассматривать вариант локальных контактов (взаимодействия) молекулы ДНК с различными участками молекул PG, расположенных и на N-конце, и находящихся в тесной близости к мембране. В такой ситуации фрагмент дцДНК размером 500 п.н. (~150 кДа) обходит «-» заряд ГАГ, образуя над ним выгиб. Анализ последовательностей белков PG Кребс-2 и В-лимфомы, полученных в ходе RNAseq, свидетельствует, что полианион-связывающий домен может располагаться как на верхней части молекулы, вовне от клеточной мембраны, так и в нижней, прилегающей к цитоплазматической мембране части (**Приложение 2, Таблицы 4, 5, Приложение 3**).

Возможно, что именно эта часть протеогликана отвечает за связывание с дцДНК после протеолитического разрушения слоя гликокаликса, окружающего клетку, как это было показано в проведенных экспериментах.

Интригующим является возможное одновременное межмолекулярное взаимодействие с доменами PG и SR или PG и специфического рецептора, как это показано для вириона вируса простого герпеса или Ang-3 (Pasquale De, Pavone, 2020; Sarrazin, Lamanna, Esko, 2011). В этом случае наблюдаемое выраженное множественное взаимодействие меченого дцДНК зонда с поверхностными PG/GP TAMRA+ клетки (создание высокой локальной концентрации фрагментов дцДНК в ближайшем клеточном пространстве) может являться условием его эффективной интернализации. В настоящем исследовании показано, что обработка протеазами не отменяет факт интернализации дцДНК зонда, при этом отменяет его четко детектируемое связывание с клеточной поверхностью, что предполагает гидролиз белковых факторов связывания и длительного удерживания полианиона. Такая ситуация возможна при хорошо развитом гликокаликсе, или локальной кластеризации/мултимеризации PG/GP. В этом случае сульфатированная сеть ГАГ не позволяет ферменту достичь прилегающих к цитоплазматической мембране сайтов связывания полианионов, которые отвечают за процесс интернализации (Furini, Verderio, 2019).

Отрицательный заряд ГАГ может быть компенсирован взаимодействием с молекулами многочисленных лигандов, связывающихся с ГАГ и запускающих различные сигнальные каскады (Elfenbein, Simons, 2010; Pasquale De, Pavone, 2020; Sarrazin, Lamanna, Esko, 2011). Так, показано, что альбумин, имея слабый положительный заряд боковой цепи молекулы, может связываться с ГАГ прочной связью (Adamson, Clough, 1992; Chen et al., 2016; Pries, Secomb, Gaehtgens, 2000; Zhu et al., 2011).

В работах (Chen et al., 2016; Le et al., 2019) приводятся данные, что основная масса клеток организма все-таки имеет общеклеточный нейтральный заряд, при этом все клетки опухоли заряжены отрицательно. Известно, что опухоль-реактивные нейтрофилы имеют общеклеточный положительный заряд, что позволяет им обнаруживать и лизировать клетки опухоли. Положительный общеклеточный заряд ОСК, отличающий этот тип клеток от коммитированных опухолевых клеток, может являться простым механизмом избегания атаки опухоль-реактивными нейтрофилами, способствующим выживанию стволовых клеток опухоли.

То есть положительный заряд клеточной мембраны не является «абсолютно невозможным» и для ОСК может рассматриваться, как универсальный сигнальный

механизм, а также механизм первичного межклеточного контакта и физического принципа спасения от опухоль-реактивных нейтрофилов.

4.1.5. Предполагаемый механизм эндоцитоза дцДНК зонда

В исследовании, используя набор ингибиторов различных путей эндоцитоза, установлено, что интернализация дцДНК зонда осуществляется кавеолин-зависимым путем для ОСК Кребс-2 и одновременно клатрин-зависимым эндоцитозом и кавеолярным механизмом для ОСК ВЭБ-индуцированной В-лимфомы.

Как уже говорилось («Результаты», раздел 3.4.3), существует три типа рецептор-опосредованного эндоцитоза. Это клатрин-, кавеолин- и флотелин-зависимый эндоцитоз. Клатрин-зависимый эндоцитоз осуществляется за счет образования инвагинаций цитоплазматической мембраны, покрытых изнутри белком клатрином (Hayer et al., 2010; Kaksonen, Roux, 2018; Mettlen et al., 2018). Кавеолы и кавеолин-зависимый эндоцитоз связаны с формированием холестерина микродоменов (холестериновых рафтов), в которых расположено большое количество различных рецепторов, включая, SR и GPI-AP (Busija, Patel, Insel, 2017; Gu et al., 2017; Hubert, Larsson, Lundmark, 2020; Martinez-Outschoorn, Sotgia, Lisanti, 2015). Флотеллин-зависимый эндоцитоз связан с участием белков семейства SPFH (Stomatins, Prohibitins, Flotillins, HflK/C), определяющих формирование «сигналом». Этот тип интернализации, так же как и в случае кавеолярного эндоцитоза, ассоциирован с микродоменами, сформированными холестеринными рафтами (Meister, Tikkanen, 2014; Otto, Nichols, 2011).

В микродоменах (рафтах) сгруппированы рецепторы с различными функциями. Часть рецепторов относится к группе SR (Alquraini, Khoury El, 2020; PrabhuDas et al., 2017). Также важным компонентом рафтов являются GPI-AP. Рецепторы этого типа не имеют трансмембранного домена, а фиксируются в мембране за счет инозитола, связанного с холестеринной подушкой (Zurzolo, Simons, 2016).

GPI-AP вовлечены во многие клеточные процессы и являются индукторами фосфорилирования внутриклеточных факторов, запускающих передачу сигнала, активирующего молекулярные каскады. В результате трансдукции сигнала запускается пролиферативный процесс, активируется продукция цитокинов и развивается окислительный взрыв (Hussein, Amin, Tayebi, 2020; Martinez-Outschoorn, Sotgia, Lisanti, 2015). Часть GPI-AP рецепторов (например, FGFR, рецептор фактора роста фибробластов) имеет в своей структуре сайты связывания гепарина, а значит предположительно и дцДНК зонда, что может

свидетельствовать об их участии в интернализации дцДНК (Fannon, Forsten, Nugent, 2000; Kinoshita, 2020; Ori, Wilkinson, Fernig, 2008).

Также оба типа клеток могут интернализировать дцДНК зонд макропиноцитозом. Для макропиноцитоза характерно участие в поглощении внешнего субстрата разветвленной актиновой сети, связанной с плазматической мембраной, управляющей динамическими выступами с дорсальной поверхности клетки (филоподии). При этом в процессе макропиноцитоза в местах образования складок генерируется липидный медиатор, фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат, присутствие которого необходимо для связывания внешнего субстрата (Canton, 2018).

Таким образом, кавеолин, клатрин, флотеллин определяют три типа районов плазматической мембраны, которые вовлечены в механизм интернализации и являются потенциальными сайтами связывания и доставки во внутренние компартменты фрагментов дцДНК. PG/GP, SR и GPI-AP, ассоциированные с этими районами цитоплазматической мембраны, являются акцепторами дцДНК зонда и элементами его доставки в клетку. Концентрация молекул фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата в мембранных складках, сформированных актин-зависимыми выпячиваниями цитоплазматической мембраны, также может являться молекулярным маркером специфических сайтов на мембране, участвующих в поглощении внешнего субстрата.

В контексте настоящей работы можно рассматривать любой из возможных механизмов интернализации дцДНК фрагментов, одним из которых может быть формирование молекулярного моста между акцептором дцДНК зонда и SR. В этом случае создание высокой локальной концентрации зонда на поверхности клетки за счет ассоциации с не интернализуемыми белками может являться условием создания непрерывного потока ДНК в клетку независимо от ее концентрации в окружающей среде.

Таким образом, третьим элементом процесса интернализации является эндоцитоз, осуществляемый или кавеолин-, клатрин-зависимым путем или макропиноцитозом.

4.1.6. Принцип организации элементов гликокаликса на цитоплазматической мембране ОСК

В результате проведенного исследования сформулировано новое представление об одном из неизвестных ранее принципов молекулярной организации белковых комплексов, определяющих ландшафтный молекулярный портрет цитоплазматической мембраны ОСК. Принцип можно рассматривать в виде двух частей.

Первая часть принципа молекулярной организации поверхностных белков ОСК связана с необходимостью присутствия в составе их мембраны трех функциональных групп факторов.

На поверхности ОСК находятся несколько (в исследовании описано три: PG/GP, SR, GPI-AP) групп белковых факторов, каждая из которых специализирована в одном конкретном направлении функциональной активности (Doi et al., 1993; Garlatti et al., 2010; Ori, Wilkinson, Fernig, 2008).

Все три группы представлены на клеточной мембране ОСК как доминирующие по количеству молекулярные паттерны, образованные трансмембранными или фиксированными в мембране представителями PG/GP, SR и GPI-AP (**Рисунок 55**). Представители всех групп имеют одну общую характеристику. В их структуре присутствует домен аминокислот с ярко выраженным положительным зарядом или специфический сайт связывания дцДНК. Эти три характеристики (обилие на клеточной поверхности, фиксация на мембране и присутствие положительного аминокислотного домена в структуре) определяют два свойства этих клеток, отличающих их от коммитированных потомков. Это общий положительный заряд и способность связывать и интернализировать во внутриклеточные компартменты полианионы, включая гепарин и дцДНК.

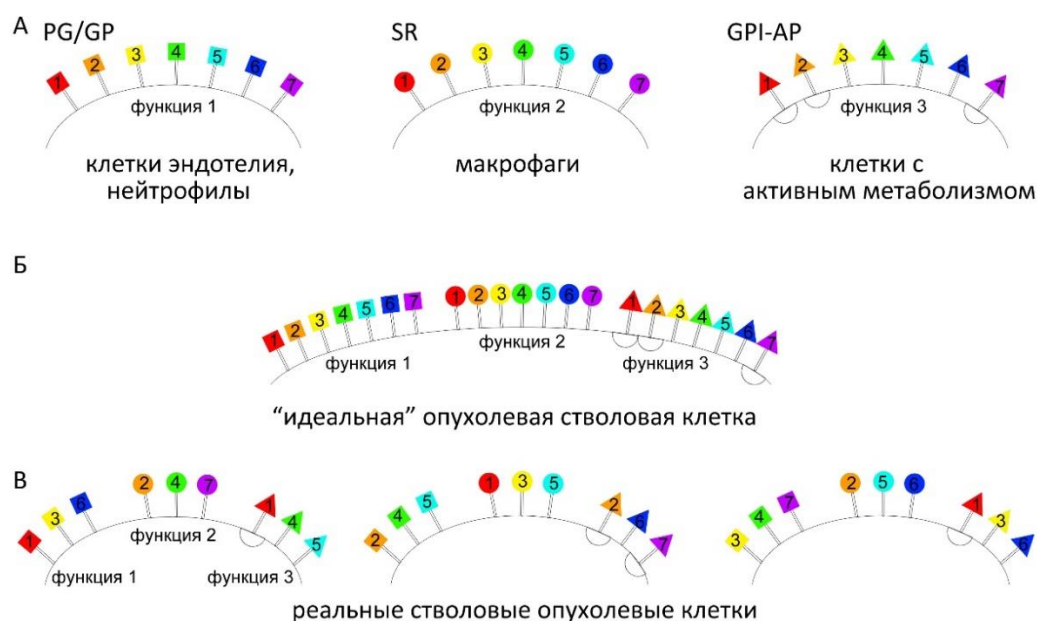


Рис. 55. Визуализация принципа молекулярной организации «стволовой клетки», определяющего молекулярный портрет ее клеточной поверхности. **А)** Специализированные клетки организма с функциями, привносимыми в ОСК. Геометрические фигуры и цифры указывают на специализированный по функции паттерн белков, характерный именно для указанного типа клеток. PG/GP – протеогликан/гликопротеины (квадраты); SR – сквенжер-рецепторы (кружки); GPI-AP – гликозилфосфатидилинозитол-заякоренные белки

(треугольники). **Б)** Молекулярный портрет белков мембраны «идеальной» ОСК. **С)** Молекулярный портрет белков мембраны реальных ОСК.

Вторая часть принципа молекулярной организации поверхностных белков ОСК связана с разнообразием индивидуальных представителей трех выделенных функциональных групп, создающих уникальный по представительству, но сохраняющий требуемую функцию, молекулярный ландшафт поверхности различных ОСК (возможно, как различной этиологии, так и одной и той же опухоли).

По-видимому, молекулы-представители белков всех трех групп обязательно должны присутствовать в составе клеточной мембраны любой стволовой опухолевой клетки, что позволяет сохранить требуемую функциональность, определяемую каждой из групп. Однако это могут быть различные представители каждой из групп, что создает уникальный портрет каждого типа стволовых опухолевых клеток, сохраняя при этом необходимые, связанные с особенностями каждой из групп, функции (**Рисунок 55**).

Такой тип организации позволяет использовать основное свойство всех охарактеризованных функциональных групп, способность захватывать и интернализировать фрагменты дцДНК в клетку (например, TAMRA-ДНК зонд), в качестве универсального индикатора ОСК. Это открывает возможность оценки количества ОСК в биопсийных образцах, что необходимо для установления степени агрессивности опухоли (Dolgova et al., 2018). Также оценка остаточного количества ОСК могла бы позволить определить эффективность подобранной терапии для конкретного пациента и, главное, сделать прогноз относительно возможного возникновения рецидива или возобновления роста опухоли.

4.1.7. Возможность неспецифического попадания экстраклеточной ДНК в клетку в результате нарушения структуры билипидного слоя цитоплазматической мембраны

В рамках обсуждения механизма взаимодействия и интернализации экстраклеточной дцДНК в ОСК существенным являлся вопрос о возможности ее неспецифического проникновения в клетки. Одним из обсуждаемых (спекулятивных) вариантов неспецифического попадания экстраклеточной ДНК в цитоплазматическое пространство клетки могла быть пассивная диффузия через поры в мембране.

В норме клеточная мембрана является естественной границей между содержимым клетки и внешней средой и препятствует прямому обмену их компонентов (заряженные ионы, полярные молекулы, белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты, макромолекулы). Одна из основных функций мембраны заключается в поддержании внутреннего гомеостаза клетки.

Нарушение структуры мембраны приводит к беспрепятственному двустороннему обмену между содержимым клетки и межклеточного вещества, что приводит к гибели клетки (Hirata, Mishima, 2024; Zhang et al., 2018). Другими словами, неспецифическое проникновение веществ в/из клетки возможно только в случае повреждения либо клеточной мембраны (билипидный слой), либо специализированных механизмов обмена с межклеточным веществом.

В экспериментах настоящего исследования использовали молекулы дцДНК размером более 200 п.н.: TAMRA-ДНК зонд (500 п.н.); линейаризованная ДНК плазмиды (>2500 п.н.); суммарная ДНК человека, препарат ДНК-микс (200–6000 п.н.). Известно, что молекула ДНК размером 500 п.н. в компактном состоянии может достигать размеров 10–50 нм и более, а в вытянутом – до микрометра.

Для процесса пассивной диффузии из-за стерического отталкивания, а также необходимости преодоления гидратной оболочки, эффективный диаметр поры должен существенно превышать гидродинамический радиус проходящей через нее молекулы. Это обусловлено явлением «стесненной диффузии» (hindered diffusion), при которой взаимодействие молекулы со стенками поры и ее гидратной оболочкой резко снижает коэффициент переноса даже для молекул, размер которых меньше диаметра поры (Deen, 1987). Еще более затруднена пассивная диффузия заряженных молекул, так как образуется электростатическое взаимодействие со стенками поры. Экспериментальные данные по транспорту нуклеиновых кислот через нанопоры показывают, что для эффективного прохождения отношение диаметра поры к диаметру молекулы должно составлять порядка 5–10 (Wanunu et al., 2010). Таким образом, для обсуждаемого гипотетического процесса свободной диффузии фрагментов дцДНК, используемых в настоящей работе, **диаметр образующейся поры должен иметь размер как минимум больше 10–20 нм, а для протяженных молекул ДНК – не менее 100–200 нм.** В абсолютном большинстве случаев образование в мембране пор такого размера является губительным для клетки из-за потери мембранного потенциала, неконтролируемого входа ионов Ca^{2+} , осмотического дисбаланса и утечки жизненно важных метаболитов (аминокислот, АТФ, нуклеотидов).

Известно, что поры менее 1 нм в диаметре могут закрываться спонтанно, однако для восстановления пор большего диаметра необходима активация специфической репаративной системы, направленной на восстановление целостности мембраны (Cooper, Mcneil, 2015).

Для предотвращения гибели клетки пора диаметром $\geq 10\text{--}20$ нм должна быть немедленно устранена механизмами репарации мембраны, в противном случае внутриклеточные повреждения приобретают необратимый характер (Mcneil, Kirchhausen, 2005). Модель обратимой электропорации свидетельствует, что выживание клетки возможно, только если

индуцированные поры остаются нестабильными и в течении миллисекунд коллапсируют после прекращения воздействия (Kotnik, Rems, Tarek, 2019). Следует особо отметить, что экстренные механизмы репарации мембраны, работающие в клетке, для пор размера >20 нм неэффективны (Mcneil, Kirchhausen, 2005). Это означает, что в случае появления разрывов большего размера, осмотическое разрушение клетки произойдет раньше, чем в нее проникнет дцДНК и клетка восстановит билипидный слой системой репарации.

Известно, что существенные нарушения в структуре клеточной мембраны могут быть вызваны воздействием стрессовых факторов, таких как гипоксия, и ксенобиотиков. К последним относятся специфические порообразующие агенты (например, антимикробные пептиды). Их действие приводит к осмотическому лизису клеток, однако даже при этом размер образующихся пор недостаточен для пассивного прохождения крупных фрагментов ДНК (Brogden, 2005).

В настоящем исследовании показано, что экстраклеточные фрагменты ДНК интернализуются в низкодифференцированные клетки как в естественных условиях, так и в период действия цитостатика.

К цитостатикам, применяемым в лечении онкологических заболеваний, для которых показана способность нарушать целостность клеточной мембраны, относятся таксол и производное хлорокина – тиоколхикозид. Это тубулин-связывающие химические агенты, формирующие поры за счет физического взаимодействия с липидами мембраны. Было показано, что оба препарата индуцируют стабильные ионные поры в мембранах клеток, что приводит к неспецифическому лизису опухолевых клеток (Ashrafuzzaman et al., 2012).

Однако для алкилирующих цитостатиков (ЦФ, ММС), используемых в настоящей работе, повреждение мембраны клетки является конечным этапом гибели клетки и связано с апоптозом, который индуцирован нарушением метаболических процессов и/или некорректно протекающим процессом репарации в результате специфического действия цитостатиков.

Таким образом, прямое образование кросслинквирующими цитостатиками стабильной поры размером 10–20 нм с последующим выживанием клетки – событие крайне маловероятное. Более того, образование пор 10–20 нм с сохранением жизнеспособности само по себе является пограничным сценарием, возможным лишь при уникальном стечении факторов.

Учитывая крайнюю маловероятность возможности неспецифической интернализации TAMRA-ДНК зонда в клетки, прямая оценка состояния мембраны жизнеспособных клеток, интернализирующих экстраклеточную ДНК, не проводилась. Однако артефакты, связанные с погибшими клетками и возможной неспецифической детекцией экстраклеточной ДНК в них, были строго исключены в каждом эксперименте (раздел 2.11).

Кроме того, в настоящем исследовании при анализе клеток *ex vivo* (в культуральной среде), не было отмечено окрашивания ядер клеток, интернализирующих TAMRA-ДНК зонд, красителем DAPI. Указанный краситель в нормальных условиях и при стандартных концентрациях не проникает в живую клетку (согласно инструкции производителя), что свидетельствует о целостности цитоплазматической мембраны TAMRA+ клеток. В пользу этого утверждения также говорят следующие результаты, полученные в работе. Выделение ядер ККМ мышей и анализ их целостности Гимза окрашиванием после инкубации с TAMRA-ДНК зондом; наличие динамики интернализации экстраклеточной ДНК и определенных количественных характеристик данного процесса: насыщение клеток, интернализация определенного количества экстраклеточной ДНК (до ~0.2 % от гаплоидного генома); частичное экзонуклеазное расщепление экстраклеточных фрагментов дцДНК, лигирование в кольцо, формирование конкатемеров (разделы 3.1, 3.3.1.1). Все эти процессы были бы невозможны в случае неспецифической интернализации путем диффузии или попадания экстраклеточной ДНК в мертвую клетку.

Подводя итог, результаты, полученные в настоящей работе, говорят в пользу того, что интернализация ДНК является специфическим процессом, имеющим конкретный описанный механизм, свойственным живым клеткам.

4.2. Воздействие экстраклеточных фрагментов дцДНК на ОСК

Возможность определения ОСК непосредственно в очаге опухолевого роста является не единственным преимуществом обнаруженного нового свойства (способности интернализировать экстраклеточные фрагменты дцДНК естественным природным механизмом) этого типа низкодифференцированных клеток.

В наших ранних исследованиях было показано, что ДНК может принимать участие в процессах репарации ДНК ГСК либо спасая их при летальной дозе γ -облучения, либо вызывая их гибель при попадании в клетку на фоне воздействия цитостатика ЦФ («окно смерти») (Dolgova et al., 2012a; Likhacheva et al., 2007). Как уже неоднократно подчеркивалось ранее, такие эффекты воздействия могли быть связаны только с молекулярными событиями, происходящими в этот момент в клетках, а именно: репарацией повреждений ДНК хроматина.

Многочисленные эксперименты по интернализации экстраклеточной ДНК в клетки, не находящиеся под воздействием γ -радиации или кросслинквирующего цитостатика, не выявили деструктивных воздействий ни на клетки, ни на организм животных. Кроме того, не на всех временных отрезках после воздействия указанных агентов возникают нарушения, детектируемые в клетке.

Подготовительные эксперименты показали, что состав экстраклеточной ДНК (нативная или кросслинкированная) и время ее попадания после воздействия цитостатика играют принципиальную роль в интерференции молекулярных процессов, проходящих в клетке. Так, нативная дцДНК оказывает воздействие, оказываясь в клетке в первую фазу репарации, которая происходит по механизму NER. Кросслинкированная дцДНК воздействует на процесс репарации во второй фазе, когда повреждения ДНК клетки восстанавливаются механизмом HR.

Описанные механизмы процесса репарации МЦС ДНК несколько противоречивы, тем не менее существует принципиальная картина репарации, схожая во многих литературных источниках. Указанный процесс имеет множество нюансов и конкретный механизм, который выбирает клетка, зависит от ее биохимического состояния (наличие и способность синтезировать специфические репаративные белки), биологического состояния (фаза клеточного цикла, наличие внешних воздействий) в конкретный момент времени, когда повреждение было получено и детектировано клеткой. Суммируя все экспериментальные данные, можно предположить потенциальный механизм, с помощью которого происходит влияние фрагментов экстраклеточной ДНК, находящихся в ядерном пространстве клетки, на процесс репарации.

4.2.1. Возможные механизмы интерференции процесса репарации МЦС экстраклеточными фрагментами дцДНК, интернализованными во внутрисклеточное пространство ОСК

По-видимому, образованные МЦС могут распознаваться в любой фазе клеточного цикла. Есть данные, что в G0/G1-фазе при блокировании транскрипции индуцированными МЦС активируется система репарации клетки (Ahmed, Kato, Gautier, 2024; Hanada et al., 2006). В этом случае две специфические эндонуклеазы производят с двух сторон от МСЦ надрезы в одной из цепей ДНК, после чего происходит «выворачивание вовне» короткого участка ДНК (аддукта), связанного со второй цепью ковалентной сшивкой. Одноцепочечная брешь достраивается TLS-полимеразами (REV1; ДНК-полимеразы η , ι , κ и ζ) по матрице – цепи ДНК, к которой присоединен аддукт. Далее происходит нуклеазное выщепление участка с повреждением во второй цепи, и вновь образованный участок одноцепочечной ДНК также достраивается по матрице первой цепи. Такой механизм активируется, если МЦС образовалась в активно транскрибируемом районе, и характерен в первую очередь для неделящихся клеток (Ahmed, Kato, Gautier, 2024; Aqeel et al., 2021).

Опухолевые клетки относятся к активно делящимся клеткам, для которых общепринятым является другой путь репарации, в основе которого лежит обнаружение МЦС

в S-фазе клеточного цикла в процессе репликации ДНК. Репликативная вилка останавливается из-за невозможности дальнейшего расплавления нити ДНК по причине ковалентно соединенных МЦС цепей. Именно в этот момент из-за рассинхронизации синтеза лидирующей и опаздывающей цепей образуется трехразветвленная структура дцДНК, имеющая одноцепочечный участок ДНК. Такая форма является субстратом для Mus81 эндонуклеазы, которая осуществляет надрез указанного одноцепочечного участка, вследствие чего возникает ДЦР. Далее происходит фосфорилирование гистона H2AX, формирование фокусов репарации, полномасштабная активация репаративной машины клетки (**Рисунок 56 А, Б**) (Silva De et al., 2000).

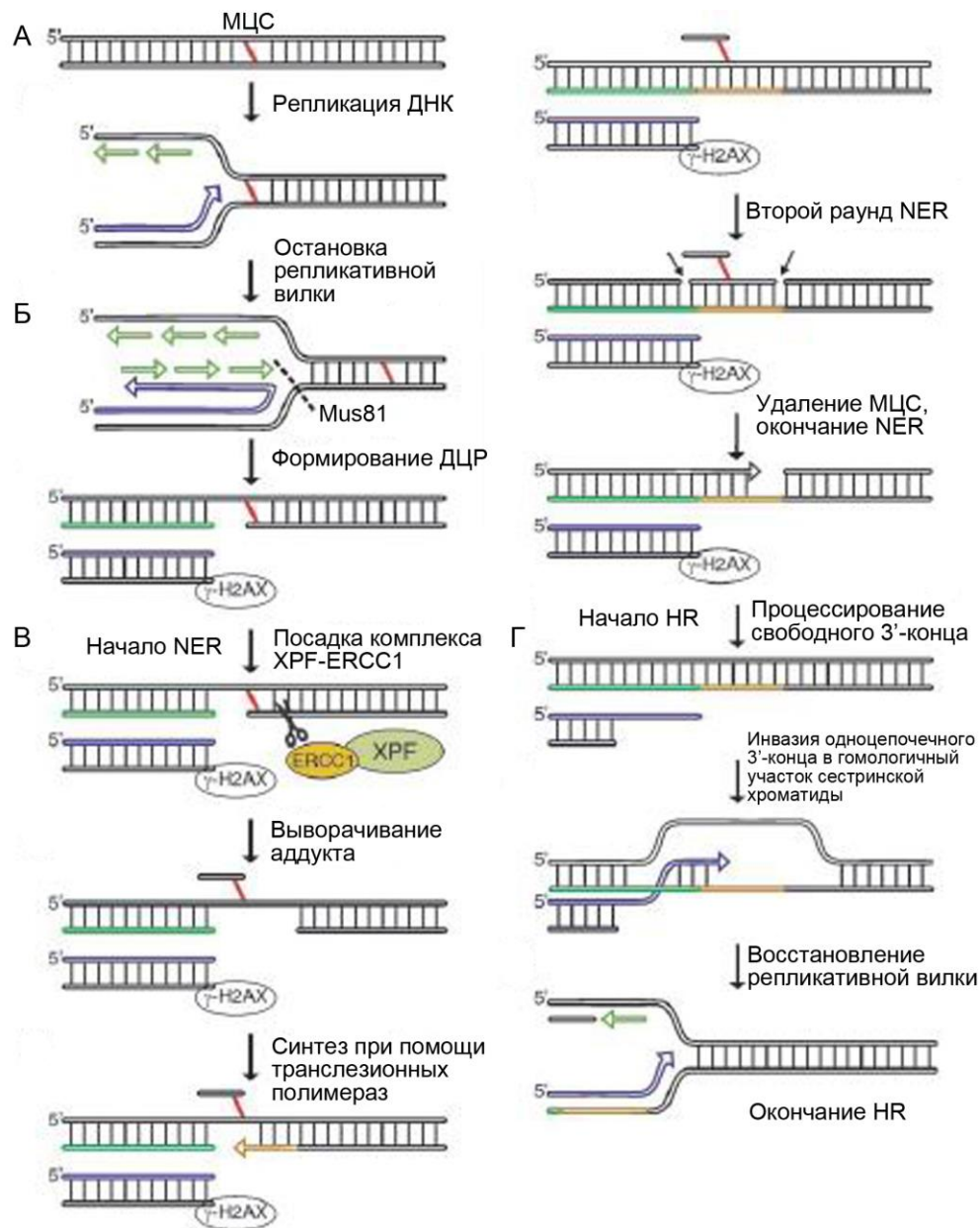


Рисунок 56. Обобщенная схема репарации МЦС в S-фазе клеточного цикла эукариотических клеток (рисунок по (Niedernhofer et al., 2004) с корректировками).

На первом этапе процесса происходит удаление МЦС за счет NER. Для этого требуется активность гетеродимера ERCC1-XPF, надрезающего ДНК дуплекс по одной цепи в нереплицированном районе от МЦС. «Выворачивание» кросслинкованного аддукта от центра спирали создает одноцепочечный участок, который затем расширяется до нескольких сот пар оснований (Akkari et al., 2001; Rothfuss, Grompe, 2004; Silva De et al., 2000). Следующим шагом в репарации предполагается TLS через сайт МЦС. После второго раунда эксцизии ERCC1-XPF и XPG и матричного синтеза репарация МЦС завершается. Таким образом сайт МЦС удаляется из нити ДНК, однако остается ДЦР (**Рисунок 56 В**). Максимальное накопление ДЦР в клетках, вероятно, является периодом до начала следующей фазы репарации, которая происходит по механизму HR. HR между дочерними молекулами ДНК может заново восстановить репликативную вилку. Предполагается, что Mus81 эндонуклеаза формирует свободный одноцепочечный 3'-конец разрезанного дуплекса, который инвазирует и спаривается с другой дочерней молекулой таким образом, что образуется праймер для полимеризации. Далее следует консервативная HR и восстановление репликативной вилки (**Рисунок 56 Г**).

Снижение количества ДЦР говорит о том, что началась вторая фаза репарации – HR. То есть пик количества ДЦР приходится на популяцию клеток, часть из которых еще находится в фазе NER, а часть уже начала следующую фазу репарации, HR. Именно этот период времени был выбран нами для обработки сложнотопозиционным препаратом дцДНК. Было сделано предположение, что одна составляющая часть препарата будет воздействовать на фазу NER, а вторая – на HR (**Рисунок 33**). Клетка будет «заперта» в «незавершающемся» репаративном процессе, что приведет к ее каспаза-индуцированному апоптозу (оценено по специфической нуклеосомной фрагментации, индукция которой осуществляется системой CAD/ICAD (caspase-activated DNase/inhibitor CAD), активированной каспазной системой) (Alyamkina et al., 2015). В такой ситуации любая клетка, включая ОСК и СК различного генеза, погибнет, лишённая возможности завершить репарацию. Этот обнаруженный принцип был в дальнейшем подтвержден как в многочисленных экспериментах, так и в клинической практике.

Все описанные процессы являются крайне пластичными и экстраклеточная ДНК, находясь в момент активированной репаративной системы в клетке, может становиться непосредственным участником любого из них (Лихачева и др., 2008).

В настоящем исследовании показано, что нативная составляющая препарата дцДНК, попадая в ОСК в первую фазу репарации (NER), негативно влияет на клетки. Наиболее вероятным механизмом такого участия является интерференция процесса репарации путем

конкурирования за белки репарации, которые должны репарировать ДНК хроматина. Такой механизм подробно описан в литературных источниках. Так, в последнее время даже появилось новое направление в лечении онкологических заболеваний, молекулярная терапия опухолей, основанная на действии нуклеиновых кислот (NA-based cancer molecular therapies). В этом случае используются короткие синтетические олигонуклеотидные дуплексы, которые при попадании в опухолевую клетку мимикрируют естественные ДЦР, направляя на себя и фиксируя ферменты репарации ДНК и, тем самым, нарушая ход репарации ДЦР, возникших под действием радио-/химиотерапии в хроматине (Berthault et al., 2011; Berthault et al., 2022). В литературе такие олигонуклеотиды называют малыми интерферирующими ДНК (siDNA, small interfering DNA). Вероятно, свободные двуцепочечные концы в составе фрагментов экстраклеточной ДНК в ОСК распознаются факторами репарации NER наравне с повреждениями нитей хроматина, конкурируя за связывание с белками репарации, в результате чего ОСК не в состоянии корректно завершить первый этап репарации.

Показано, что экстраклеточная кросслинкированная ДНК (то есть содержащая в своем составе МЦС) интерферирует вторую фазу репарации, идущую по пути консервативной HR. Механизм такого эффекта экстраклеточной дцДНК является более дискуссионным. Возможно, вновь появившиеся МЦС в составе пришедшей извне ДНК продолжают поддерживать систему NER в активном состоянии, что либо аттенуирует, либо не дает начаться процессу HR.

Другим вариантом интерференции может являться наличие частичной гомологии в участке экстраклеточной дцДНК, находящейся рядом с фокусом репарации, и процессированным одноцепочечным 3'-концом цепи хроматина, готовым к инвазии в сестринскую нить ДНК. Возможно, спаривание происходит с фрагментом интернализованной экстраклеточной ДНК. Это может приводить либо к некорректному достраиванию нити ДНК с нарушением последовательности критического для функционирования клетки гена, либо к невозможности восстановления репликативной вилки. Можно предположить, что фрагменты дцДНК длительное время конкурируют за сайт отжига. Неразрешение или некорректное разрешение интермедиата может являться причиной губительных для опухолевых клеток последствий (Тронов, Крамаренко, Карпухин, 2005). В обоих случаях некорректное завершение процесса репарации приводит к тому, что клетка не может восстановить продвижение по клеточному циклу и, вероятно, погибает путем апоптоза.

Кроме того, известно, что свободные двуцепочечные концы активируют систему иерархических киназ, которые индуцируют остановку клеточного цикла (Zou, 2007; Лихачева и др., 2008). В работах (MacDougall et al., 2007; Zou, 2007) получены данные,

свидетельствующие об активации checkpoint ответа клетками при интернализации в ядро синтетических олигонуклеотидов (dA)₇₀ – (dT)₇₀. В растворе ДНК синтетических праймеров может находиться в нескольких формах, образующих тупые двуцепочечные концы, одноцепочечные участки ДНК, переходящие в дуплекс, а также крестообразные формы. В другой работе (Huang, Clarkin, Wahl, 1996) было показано, что ДНК линейной формы плазмиды pBSKSII⁺, инъецированная в человеческие фибробласты, вызывала остановку клеточного цикла. По-видимому, именно присутствие двуцепочечных концов фрагментов экстраклеточной ДНК после ее интернализации приводит репаративную систему клетки в действие. Одновременно с этим может происходить активация специфической системы аварийного лигирования (Derbyshire et al., 1994; Lee et al., 2005; Lees-Miller, Meek, 2003; Wang et al., 2005).

Таким образом, еще одним вариантом влияния экстраклеточных двуцепочечных концов ДНК на процесс репарации может являться активация ими иерархических киназ и последующее специфическое аварийное лигирование (как это наблюдается при разрывах, вызванных жестким γ -облучением (Lees-Miller, Meek, 2003)). Возникает молекулярный хаос, результатом которого может быть неспецифическое объединение ДЦР клетки путем NHEJ. В этом случае репаративные факторы, появление которых индуцировано фрагментами экстраклеточной дцДНК (FA-белки, Ku70/80, лигаза IV, лигаза III), в первую очередь и предпочтительно ассоциируются с двуцепочечными разрывами хромосом, лигируя разрывы.

4.3. Терапевтический режим «Каранахан» как новый принцип лечения злокачественных новообразований

В нашей ранней работе на модели ККМ мышей (Dolgova et al., 2012a) были получены результаты, свидетельствующие о том, что немедленно после появления в организме мышей экстраклеточной фрагментированной ДНК происходит исчезновение из пространства клеток свидетеля ДЦР – гистона γ H2AX, что говорит о завершении репарации указанных повреждений. Этот факт также подтверждает возможность обсуждавшегося в предыдущем разделе варианта развития событий при взаимодействии экстраклеточных фрагментов ДНК с репаративной системой клетки.

Обнаруженный эффект интерференции экстраклеточными фрагментами ДНК процесса репарации, протекающего в ОСК и индуцированного действием кросслинкующего цитостатика, сделал возможным разработку принципиально нового терапевтического режима, нацеленного на эрадикацию ОСК. Такой режим получил название «Каранахан» и основан на хронометрическом малодозовом введении кросслинкующего цитостатика и

комбинированном действии сложнокомпозиционного препарата дцДНК. Оба препарата вводятся в организм в строго определенные временные рамки, которые зависят от биологических особенностей клеток конкретных опухолей и определяются индивидуально для каждого случая. То есть был получен персонифицированный подход к лечению онкологических заболеваний, таргетно воздействующий на ОСК.

4.4. Отличия принципов таргетного воздействия на ОСК при использовании режима «Каранахан» от известных подходов

Терапевтический режим «Каранахан» представляет собой процедуру, при которой фрагменты экстраклеточной дцДНК интернализуются в ОСК и интерферируют процесс репарации МЦС. Это происходит при хронометрическом, привязанном к репаративному циклу опухолевых клеток, введении кросслинкующего цитостатика ЦФ и также хронометрическом, ориентированном на фазы процесса репарации МЦС (NER и HR), введении препарата дцДНК. Анализ событий, происходящих при такой обработке, характеризуется индукцией тотального апоптоза коммитированных опухолевых клеток и синхронизации ОСК в чувствительной для финальной обработки фазе клеточного цикла (G1) в определенный день после начала терапии. Проведенная финальная обработка приводит к апоптотическому разрушению опухолевого начала в виде ОСК.

В вопросе таргетного воздействия на ОСК режим «Каранахан» занимает исключительное место. Несмотря на огромное разнообразие современных вариантов таргетного воздействия на ОСК (в первую очередь – применение антител), поиск подходящих мишеней для указанной терапии продолжает оставаться актуальной проблемой. Это связано с тем, что мишень для моноспецифических антител должна удовлетворять ряду требований: играть причинную роль в развитии опухоли, экспрессироваться преимущественно (желательно исключительно) на опухолевых клетках.

Ограничения таргетного воздействия антител на ОСК заключаются в том, что указанные клетки обычно присутствуют в очень небольших количествах, а маркеры ОСК зачастую перекрываются как с нормальными стволовыми клетками, так и с некоторыми дифференцированными клетками. Кроме того, в ряде случаев отсутствие определенных маркеров также может являться признаком ОСК (Lee et al., 2025).

Сложность фармакокинетики, гетерогенность опухоли, активация альтернативных сигнальных путей, развитие местных и системных аутоиммунных реакций, иммуносупрессивные свойства опухолевого микроокружения также вносят свой вклад в появление устойчивости неотрансформированных низкодифференцированных клеток к

таргетному воздействию (Sharma et al., 2017; Zhu, Choi, Shah, 2015; Моисеенко, 2003; Darwin et al., 2018).

В этом разрезе одним из преимуществ терапевтического режима «Каранахан» является универсальность используемого «индикатора» – способности ОСК интернализировать фрагменты дцДНК. В настоящем исследовании показано, что за процесс интернализации дцДНК в клетки отвечает развитая сеть гликокаликса, характерная для ОСК, имеющая представителей таких групп белков клеточной мембраны, как PG/GP, содержащие коллаген-подобные домены и кластеры положительно заряженных аминокислот, SR и GPI-AP. При этом для каждой конкретной опухоли представители этих групп белков на поверхности ОСК могут отличаться, однако функция, которую они выполняют (интернализация дцДНК) не меняется. Это означает, что в сравнении с клеточной и пассивной иммунотерапиями, формат терапии «Каранахан» является универсальным и не зависит от общепринятых таргетных маркеров.

Эффективность терапевтического режима «Каранахан» была подтверждена на нескольких опухолевых моделях мышей (карцинома Кребс-2, лимфосаркома RLS, карцинома Льюис, гепатокарцинома Г-29) и линии глиобластомы человека U87 в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Следует отметить, что в нескольких исследованиях по оценке эффективности режима «Каранахан» в качестве сравнительных методов терапии были использованы антитела к чекпоинт молекулам (PD1/PD1L), аптамеры, CpG-олигонуклеотиды (Ruzanova et al., 2021; Sagiv-Barfi et al., 2018). Режим «Каранахан» в сравнении показал существенно и достоверно более высокий терапевтический эффект, который выявлялся на опухолях любого типа и во многих случаях приводил к вылечиванию высокого процента экспериментальных мышей от злокачественных быстротекущих экспериментальных раков.

4.5. Терапевтический режим «Каранахан»: дополнительные характеристики и место среди подходов лечения злокачественных новообразований

По своей структуре терапевтический режим «Каранахан», разработанный в настоящем исследовании, сочетает в себе двойное действие: хронометрическое малодозовое введение ЦФ, основанное на данных о продолжительности репаративного цикла опухолевых клеток, дополненное синергичным воздействием препарата дцДНК, селективно достигающем ОСК. То есть режим «Каранахан» совмещает в себе преимущества воздействия на иммунную систему малодозовой химиотерапии (Basar et al., 2024), а также дополняется эффектом таргетного воздействия на ОСК.

Можно предположить, что основными векторами воздействия режима «Каранахан», объединяющими его с современными методами лечения, являются: (1) эффект действия

хронометрической/метрономной малодозовой химиотерапии ЦФ и сложнокомпозиционного препарата дцДНК, при котором, по-видимому, происходит активация антигенпрезентирующих ДК; (2) день финальной обработки ЦФ и препаратом дцДНК, который идеологически совпадает с днем повторного введения цитостатика при метрономной малодозовой химиотерапии ЦФ, что вызывает развитие эффекта разрушения супрессорной функции опухоль-ассоциированной стромы. Это означает, что режим воздействия «Каранахан» может полностью заместить эффекты технологии метрономной малодозовой химиотерапии ЦФ, включая разрушение супрессивного вектора опухоли (T_{regs} , MDSC); активацию инфильтрующих опухоль иммунных клеток и антигенпрезентирующих ДК; рекрутирование периферических иммунных клеток в сайт опухолевого очага.

В работе (Manrique et al., 2016) показано, что Т-эффекторы и секретируемый ими IFN- γ необходимы для эрадикации нескольких экспериментальных иммуногенных опухолей. Этими же авторами в *in vitro* тестах установлено, что ингибирующее действие малодозовой метрономной химиотерапии ЦФ связано с CD11+/Gr1^{dim} моноцитарной фракцией, но не с активностью CD11+/Gr1^{hi} гранулоцитов, и что туморицидное действие осуществляется за счет секреции оксида азота, а не свободных радикалов кислорода.

Другая группа ученых на моделях опухолей мозга также продемонстрировала участие различных популяций иммунных клеток в эрадикации экспериментальных глиом. Показано, что метрономная химиотерапия ЦФ сопровождается увеличением числа ДК, НК, туморицидных макрофагов, В-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов в опухолевой строме, что, как считают авторы, свидетельствует об активном привлечении этих популяций клеток врожденного иммунитета в опухолевый очаг. Также возможна M1/N1 реполяризация тумор-ассоциированных M2-макрофагов и N2-нейтрофилов и *in situ* созревание Т-киллеров (Wang et al., 2018; Wu et al., 2020; Zheng et al., 2017).

Проведенный ПЦР-анализ паттерна других генов, экспрессирующихся в ткани опухоли, свидетельствует о развитии иммунного ответа после проведенной терапии (Doloff, Chen, Waxman, 2014; Doloff, Waxman, 2012; Jordan, Waxman, 2016; Wu, Waxman, 2014). Показана высокая экспрессия IL-15; IL-18; Fas/FasL; Cxcl9, 10, 11, 12; Tlr12, Csf1, Icam2, Vcam1. Одновременно экспрессия протуморогенного VEGFa прогрессивно снижается.

В работе (Khan et al., 2020) была продемонстрирована эффективность малодозовой метрономной химиотерапии ЦФ при лечении агрессивной, метастазирующей, устойчивой к действию цисплатина опухоли молочной железы EMT6-CDDP, которая была связана с инфлюксом интратуморальных CD4⁺ и CD8⁺ клеток.

Считается, что одним из главных противоопухолевых эффектов малодозовой метрономной химиотерапии ЦФ является селективное разрушение супрессорной активности опухоль-ассоциированной стромы (Simsek, Esin, Yalcin, 2019).

В современной технологии, основанной на принципе *in situ* вакцинации, основным индуцирующим иммунный ответ фактором являются CpG-олигонуклеотиды. CpG-олигонуклеотиды активируют ДК, инфильтрирующие опухоль. В терапии «Каранахан» также используются молекулы дцДНК, которые, помимо участия в репаративном процессе в ОСК, также активируют профессиональные свойства антигенпрезентирующих ДК (Alyamkina et al., 2010a; Alyamkina et al., 2010b; Alyamkina et al., 2012; Orishchenko et al., 2013). В наших работах (Ruzanova et al., 2022; Ruzanova et al., 2021) показано, что режим воздействия «Каранахан» способствует развитию как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа, что, как уже было сказано выше, является совокупностью хронометрического воздействия ЦФ и фрагментов дцДНК.

Исключительное действие терапевтического режима «Каранахан» заключается в том, что при его использовании происходит эрадикация ОСК, что делает остаточную опухоль максимально чувствительной к действию активированного иммунитета.

Дополнительно необходимо отметить, что режим «Каранахан» также был апробирован на моделях лимфомы мыши A20 и первичных клеточных линиях глиобластомы человека, полученных из операционных образцов (Ruzanova et al., 2021; Долгова et al., 2018). Результаты этих экспериментов полностью соответствуют основной линии доказательств эффективности нового терапевтического режима, представленных в настоящей работе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При лечении злокачественных опухолей принципиальным являются несколько факторов.

В первую очередь – определение типа опухоли. Если новообразование находится на ранних стадиях прогрессии, то любое лечение следует разработанным, находящимся в правовом поле, протоколам лечения и клиническим рекомендациям. Выбор адекватных средств и протоколов лечения является вторым фактором успешной терапии онкологического заболевания.

В случае перехода заболевания в терминальную стадию прогрессии, когда больной переводится в паллиативный статус, появляется законная возможность использования наукоемких нестандартных, но имеющих богатую научную предысторию, протоколов лечения (Федеральный закон от 21.11.2011 №323-ФЗ ред. от 08.06.2020, статья 37, пункт 15) (интернет-ресурс <https://base.garant.ru/12191967/9db18ed28bd6c0256461e303941d7e7a/>). И здесь возникает третий принципиальный фактор, сокращающий время, необходимое для внедрения новой техники, – это организация пилотных КИ с одобрительным решением локального этического комитета, что позволяет применять новые технологии в паллиативных случаях.

В настоящее время помимо рассмотренных выше средств и протоколов лечения злокачественных новообразований, направленных либо на опухолевую ткань в целом, либо на таргетные молекулы как коммитированной опухолевой клетки, так и ОСК, появились три технологических подхода, основанных не на воздействии на целевые индивидуальные молекулы в опухолевой клетке, а на запуске интегральных многофакторных процессов, результатом которых является лизис развитой опухоли. Это *in situ* вакцинация (Sagiv-Barfi et al., 2018), малодозовая метрономная химиотерапия ЦФ (Wu, Waxman, 2014), а также разработанный в настоящей работе терапевтический режим «Каранахан».

Все три подхода основаны на хронометрическом введении препаратов в соответствии с определенными параметрами биологических часов опухолевой клетки, что позволяет воздействовать в точки ее минимальной защищенности.

In situ вакцинация инициирует всеохватывающий иммунный ответ на малигнизированную ткань, что приводит к распаду опухоли и вылечиванию экспериментальных животных (Sagiv-Barfi et al., 2018).

Малодозовая метрономная химиотерапия ЦФ направлена на разрушение опухолево-ассоциированной стромы, являющейся основой развития опухоли. При таком подходе также

происходит лизис опухолевого очага, и животные выживают. Основным ограничением указанных подходов является их применимость исключительно к иммуногенным опухолям (Penel, Adenis, Bocci, 2012).

Терапевтический режим «Каранахан», по-видимому, является универсальным подходом лечения опухолей различной этиологии как иммуногенных, так и неиммуногенных, основанным на уничтожении (эрадикации) ОСК, разрушении опухоль-ассоциированной стромы и активации противовопухолевого иммунного ответа.

Терапевтический режим основан на трех открытиях, совершенных в лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН, включая настоящую работу.

1. Обнаружение универсального для низкодифференцированных туморогенных опухолевых клеток молекулярного индикатора – способности захватывать фрагменты экстраклеточной дцДНК естественным природным механизмом.

2. Выявление способности доставленных во внутренние клеточные компартменты фрагментов ДНК интерферировать процесс репарации МЦС таким образом, что ОСК или погибает, или теряет свои туморогенные свойства. Лишенная основы бесконечного существования опухоль уничтожается защитными системами организма (свойство, детально охарактеризованное ранее и подтвержденное в настоящем исследовании созданием режима «Каранахан»).

3. Обнаружение механизма синхронизации ОСК в чувствительной для обработок фазе клеточного цикла и использование найденного временного расписания для их эрадикации.

При применении подхода «Каранахан» для каждой опухоли подбирается режим обработки цитостатиком и сложнокомпозиционным препаратом на основе дцДНК по схеме «3+1». Время первых трех обработок определяется длительностью репаративного цикла опухолевых клеток после обработки их кросслинkerующим цитостатиком. Финальная обработка проводится в момент синхронизации ОСК после трехкратной обработки цитостатиком в G1-фазе клеточного цикла, когда клетки чувствительны для обработки. Применение указанного режима приводит к полному уничтожению ОСК и эрадикации опухоли в целом.

Таким образом, терапевтический режим «Каранахан» является уникальным подходом, позволяющим оказывать одновременно три причинных терапевтических воздействия на опухоль. Во-первых, происходит эрадикация ОСК, в результате чего опухоль лишается туморогенного начала. Во-вторых, инициируется всеохватывающий лизис коммитированных опухолевых клеток. В-третьих, происходит активация противовопухолевого иммунного ответа. Эти три составляющие не оставляют опухоли шанса выживания и малигнизированная

ткань распадается. Как было сказано выше, важной характеристикой режима «Каранахан» является возможность его применения к любому типу опухолей, содержащих ОСК, независимо от иммуногенности опухоли и иммунного статуса организма.

В настоящем исследовании приводятся результаты, в которых экспериментально доказываются новые, ранее не известные свойства ОСК. Описываются механизмы, влияющие на протекание репаративных процессов в ОСК, и приводятся результаты лечения животных, несущих экспериментальные опухоли, в соответствии с терапевтическим режимом «Каранахан», в основе которого лежат полученные новые экспериментальные данные о биологии ОСК и опухоли в целом.

ВЫВОДЫ

1. Гемопозитические стволовые клетки мышей, несущие маркеры CD34, c-Kit, Sca-1, интернализуют фрагменты экстраклеточной двуцепочечной ДНК во внутренние компартменты. При этом линейные фрагменты претерпевают концевой гидролиз и лигируются в кольцо.

2. В культурах карциномы мыши Кребс-2 и В-лимфомы человека, индуцированной вирусом Эпштейна-Барр, именно опухолевые стволовые клетки обладают свойством интернализации фрагментов дцДНК естественным природным механизмом (TAMRA-ДНК зонд в качестве индикаторной молекулы). Показано, что указанные клетки обладают основными характеристиками опухолевых стволовых клеток, а именно:

- (а) клоногенностью (анализ формирования сфер и цитокинового профиля);
- (б) способностью при перевивке формировать графт, имеющий гистологические характеристики, аналогичные исходной опухоли. При этом клетки, не интернализирующие ДНК, графт образовывать не способны;
- (в) повышенной экспрессией генов, участвующих в сигнальных каскадах, свойственных опухолевым стволовым клеткам (первичный RNAseq-анализ транскриптома с последующей валидацией генов-кандидатов методом qPCR);
- (г) снижение количества клеток, способных интернализировать фрагменты экстраклеточной ДНК, в очаге обработанной опухоли до уровня, не детектируемого экспериментально, всегда коррелирует с ее резорбцией и сопровождается выживанием мышей от скоротечных неизлечимых экспериментальных опухолей.

3. Механизм интернализации двуцепочечной ДНК в опухолевые стволовые клетки заключается в первичном электростатическом притягивании отрицательно заряженных молекул ДНК к мембране клетки, имеющей общий положительный заряд. Далее происходит образование прочных контактов фрагментов ДНК с гепарин-связывающими сайтами, находящимися в составе протеогликанов/гликопротеинов, скавенджер-рецепторов и гликозилфосфатидилинозитол-заякоренных белков. Сам процесс интернализации осуществляется кавеоларным, клатрин-зависимым механизмом эндоцитоза, а также макропиноцитозом.

4. Локализованные на поверхности опухолевых стволовых клеток белки, содержащие гепарин-связывающие сайты, вовлеченные в процесс интернализации, образуют три функциональные группы: протеогликаны/гликопротеины, скавенджер-рецепторы и

гликозилфосфатидилинозитол-заякоренные белки. Для опухолевых стволовых клеток различных типов опухолей эти группы представлены различными белками.

5. Разработан экспериментальный режим воздействия на злокачественные новообразования («Каранахан»), приводящий к удалению опухолевых стволовых клеток из опухолей, в основе которого лежит хронометрическое синергичное воздействие кросслинкирующего цитостатика и сложнокомпозиционного препарата двуцепочечной ДНК.

6. Режим воздействия «Каранахан» апробирован на моделях *in vivo*: Кребс-2 в асцитном и солидном вариантах, гепатокарциноме Г-29, лимфосаркоме RLS, карциноме Льюис, глиобластоме человека U87. На трех модельных системах показано, что режим воздействия «Каранахан» позволяет достичь стойкой ремиссии у 50–86 % мышей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФК – активные формы кислорода
- ВЭБ – вирус Эпштейна-Барр
- ГАГ - гликозаминогликаны
- ГСК – гемопоэтическая стволовая клетка
- ГТФазы – семейство ферментов гидролаз, которые связывают и гидролизуют гуанозинтрифосфат
- ДК – дендритная клетка
- дцДНК – двуцепочечная ДНК
- ДЦР – двуцепочечные разрывы
- ККМ – клетки костного мозга
- ММ – множественная миелома
- МЦС – межцепочечная сшивка
- МЭП – мезенхимально-эпителиальный переход
- ОСК – опухолевая стволовая клетка
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- СК – стволовая клетка
- ЦФ – циклофосфамид (торговое название циклофосфан)
- ЭКМ – экстраклеточный матрикс
- ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход
- ЭСК – эмбриональная стволовая клетка
- ЭР – эндоплазматический ретикулум
- ABC – ATP-binding cassette, белки АТФ-связывающих кассет
- ADC – antibody-drug conjugate, конъюгаты антитело-препарат
- ASO – antisense oligonucleotide, антисмысловые олигонуклеотиды
- CAR – chimeric antigen receptor, химерный антигенный рецептор
- CASP – comet assay software project
- CTLA-4 – цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок-4
- DED – death effector domain, домен эффектора смерти
- DISC – death-inducing signaling complex, сигнальный комплекс, индуцирующий смерть
- EGFR – epidermal growth factor receptor, рецептор эпидермального фактора роста
- EIPA – 5-(N-этил-N-изопропил) амилорид
- FA-белки – Fanconi Anemia, белки анемии Фанкони

FACS – fluorescence-activated cell sorting, флуоресцентная сортировка клеток

FADD – Fas-associated death domain, белок, взаимодействующий с доменом смерти Fas-рецептора

FBS – fetal bovine serum, фетальная бычья сыворотка

FDA – food and drug administration, управление по контролю качества пищевых продуктов и медикаментов

Flu - fluorescein

GFP – green fluorescent protein

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

GP – glycoprotein, гликопротеин

GPI-AP – glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, гликозилфосфатидилинозитол-заякоренный белок

HR – homologous recombination, гомологичная рекомбинация

HIF-1 α – hypoxia-inducible factor 1- α , фактор, индуцируемый гипоксией 1 α

KIR – killer cell immunoglobulin-like receptor, иммуноглобулино-подобный рецептор клеток-киллеров

LEF – lymphoid enhancerbinding factor, фактор связывания лимфоидного энхансера

M β CD – метил- β -циклодекстрин

MDSC – myeloid-derived suppressor cells, супрессоры миелоидного происхождения

Mean – среднее значение

Median – медиана

MHC-I и II – молекулы главного комплекса гистосовместимости I и II классов

MMC – mitomycin C, митомицин C

MMP – matrix metalloproteinase, матриксная металлопротеиназа

NER – nucleotide excision repair, эксцизионная репарация нуклеотидов

NHEJ – non-homologous end joining, нехомологичное объединение концов

NK-клетки – natural killer, естественные киллеры

PBS – phosphate-buffered saline, фосфатно-солевой буфер

PD-1 – белок запрограммированной клеточной смерти-1

PDK1 – 3-phosphoinositide-dependent kinase-1, 3-фосфоинозитид-зависимая киназа 1

PDL1 – лиганд запрограммированной смерти 1

PDGF - platelet-derived growth factor, тромбоцитарный фактор роста

PG – proteoglycan, протеогликан

PKC – протеинкиназа C

pRB – retinoblastoma-associated protein, белок ретинобластомы

PrK – proteinase K, протеиназа К

qPCR - quantitative polymerase chain reaction, количественная ПЦР

RLS – cyclophosphamide resistant lymphosarcoma, лимфосаркома, устойчивая к действию циклофосфида

RTK – receptor tyrosine kinase, рецептор тирозинкиназы

SD – standard deviation, стандартное отклонение

SHH – сигнальный путь Sonic Hedgehog

siDNA – small interfering DNA, малые интерферирующие ДНК

SOCE – store-operated calcium entry, депо-управляемый вход Ca^{2+}

SR – scavenger receptor, скавенджер-рецептор

TCF – T-cell specific factor, фактор Т-клеток

TGF- β – tumor growth factor- β , трансформирующий фактор роста β

TLS – translesion polymerase, транлезионная (ошибочная) полимераз

TNF- α – tumor necrosis factor- α , фактор некроза опухоли-альфа

T_{reg} – Т-регуляторные клетки

TSP – тромбоспондин

VDJ – variable diversity joining, участок генома, кодирующий переменные области цепей антител и Т-клеточных рецепторов

VEGF – vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abdullah U.B. et al. RPA activates the XPF - ERCC 1 endonuclease to initiate processing of DNA interstrand crosslinks // EMBO J. – 2017. – Vol. 36, № 14. – P. 2047–2060.
2. Ablain J., Thé H. De. Retinoic acid signaling in cancer: The parable of acute promyelocytic leukemia // Int. J. Cancer – 2014. – Vol. 135, № 10. – P. 2262–2272.
3. Adamson R., Clough G. Plasma proteins modify the endothelial cell glycocalyx of frog mesenteric microvessels // J. Physiol. – 1992. – Vol. 445, № 1. – P. 473–486.
4. Ahmed A., Kato N., Gautier J. Replication-independent ICL repair: from chemotherapy to cell homeostasis // J. Mol. Biol. – 2024. – Vol. 436, № 13. – P. 168618.
5. Ahmed E.M. et al. The Expression of Stem Cell Marker LGR5 and Its Coexpression with B-Catenin in Sporadic Colorectal Carcinoma and Adenoma: A Comparative Immunohistochemical Study // Med. – 2023. – Vol. 59, № 7. – P. 1233.
6. Ahrens T.D. et al. The Role of Proteoglycans in Cancer Metastasis and Circulating Tumor Cell Analysis // Front. Cell Dev. Biol. 2020. Vol. 8. P. 749.
7. Akkari Y.M.N. et al. The 4N cell cycle delay in Fanconi anemia reflects growth arrest in late S phase // Mol. Genet. Metab. – 2001. – Vol. 74, № 4. – P. 403–412.
8. Al-Hajj M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2003. – Vol. 100, № 7. – P. 3983–3988.
9. Albini A. et al. Contribution to Tumor Angiogenesis From innate immune Cells within the Tumor Microenvironment : implications for immunotherapy // Frintiers Immunol. – 2018. – Vol. 9, P. 527.
10. Almqvist N., Winkler T.H., Mårtensson I.L. Autoantibodies: Focus on anti-DNA antibodies // Self Nonself – 2011. – Vol. 2, № 1. – P. 11.
11. Alquraini A., Khoury J. El. Scavenger receptors // Curr. Biol. – 2020. – Vol. 30, № 14. – P. R790–R795.
12. Alyamkina E.A. et al. Exogenous allogenic fragmented double-stranded DNA is internalized into human dendritic cells and enhances their allostimulatory activity // Cell. Immunol. – 2010a. – Vol. 262, P. 120–126.
13. Alyamkina E.A. et al. Effect of double-stranded DNA on maturation of dendritic cells in vitro // Cell. Immunol. – 2010b. – Vol. 266, P. 46–51.
14. Alyamkina E.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.

15. Alyamkina E.A. et al. Combination of cyclophosphamide and double-stranded DNA demonstrates synergistic toxicity against established xenografts // *Cancer Cell Int.* – 2015. – Vol. 15, № 32. – P. 35.
16. Amini S. et al. The expressions of stem cell markers: Oct4, Nanog, Sox2, nucleostemin, Bmi, Zfx, Tcl1, Tbx3, Dppa4, and Esrrb in bladder, colon, and prostate cancer, and certain cancer cell lines // *Anat. Cell Biol.* – 2014. – Vol. 47, № 1. – P. 1–11.
17. Amyere M. et al. Origin, originality, functions, subversions and molecular signalling of macropinocytosis // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2001. – Vol. 291, № 6–7. – P. 487–494.
18. Andersson J.O. Lateral gene transfer in eukaryotes // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2005. – Vol. 62, № 11. – P. 1182–1197.
19. Anker P. et al. The role of extracellular DNA in the transfer of information from T to B human lymphocytes in the course of an immune response // *Int. J. Immunogenet.* – 1980. – Vol. 7, № 6. – P. 475–481.
20. Aqeel A. et al. Interstrand Crosslink Repair: New Horizons of DNA Damage Repair // *DNA - Damages and Repair Mechanisms.* : IntechOpen, 2021. C. 234.
21. Arabi F. et al. Antigenic targets of CAR T Cell Therapy. A retrospective view on clinical trials // *Exp. Cell Res.* 2018. T. 369. № 1. C. 1–10.
22. Ashrafuzzaman M. et al. Chemotherapy Drugs Form Ion Pores in Membranes Due to Physical Interactions with Lipids // *Chem Biol Drug Des* – 2012. – Vol. 80, P. 992–1002.
23. Baldo B.A. Safety of biologics therapy: Monoclonal antibodies, cytokines, fusion proteins, hormones, enzymes, coagulation proteins, vaccines, botulinum toxins // *Safety of Biologics Therapy.* : Springer Cham, 2016. C. 29–56.
24. Barbalat R. et al. Nucleic acid recognition by the innate immune system // *Annu. Rev. Immunol.* – 2011. – Vol. 29, P. 185–214.
25. Barber G.N. Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses // *Curr. Opin. Immunol.* – 2011a. – Vol. 23, № 1. – P. 10–20.
26. Barber G.N. Cytoplasmic DNA innate immune pathways // *Immunol. Rev.* – 2011b. – Vol. 243, № 1. – P. 99–108.
27. Barnes J.M. et al. A tension-mediated glyocalyx–integrin feedback loop promotes mesenchymal-like glioblastoma // *Nat. Cell Biol.* – 2018. – Vol. 20, № 10. – P. 1203–1214.
28. Basar O.Y. et al. Optimizing cancer therapy: a review of the multifaceted effects of metronomic chemotherapy // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2024. – Vol. 12, P. 1369597.
29. Basu S.K. et al. Degradation of low density lipoprotein . dextran sulfate complexes

associated with deposition of cholesteryl esters in mouse macrophages. // J. Biol. Chem. – 1979. – Vol. 254, № 15. – P. 7141–7146.

30. Becker B.F., Chappell D., Jacob M. Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: The fringe benefit // Basic Res. Cardiol. – 2010. – Vol. 105, № 6. – P. 687–701.

31. Beier D. 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.

32. Belzen N. Van et al. Detection of minimal disease using rearranged immunoglobulin heavy chain genes from intermediate- and high-grade malignant B cell non-Hodgkin ' s lymphoma // Leukemia – 1997. – Vol. 11, P. 1742–1752.

33. Bennett R.M. As Nature Intended? The Uptake of DNA and Oligonucleotides by Eukariotic Cells // Antisense Res. Dev. – 1993. – Vol. 3, P. 235–241.

34. Bergers G., Benjamin L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch // Nat. Rev. Cancer – 2003. – Vol. 3, № 6. – P. 401–410.

35. Bergsmedh A. et al. Loss of the p21(Cip1/Waf1) cyclin kinase inhibitor results in propagation of horizontally transferred DNA // Cancer Res. – 2002. – Vol. 62, № 2. – P. 575–579.

36. Berraondo P. et al. Eradication of large tumors in mice by a tritherapy targeting the innate, adaptive, and regulatory components of the immune system. // Cancer Res. – 2007. – Vol. 67, № 18. – P. 8847–55.

37. Berthault N. et al. Comparison of distribution and activity of nanoparticles with short interfering DNA (Dbait) in various living systems // Cancer Gene Ther. – 2011. – Vol. 18, № 10. – P. 695–706.

38. Berthault N. et al. Inhibition of DNA Repair by Inappropriate Activation of ATM , // Cells – 2022. – Vol. 11, P. 2149.

39. Bhowmick N.A., Neilson E.G., Moses H.L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression // Nature – 2004. – Vol. 432, № 7015. – P. 332–337.

40. Bianchi D.W., Dennis Lo Y.M. Fetomaternal cellular and plasma DNA trafficking: the Yin and the Yang // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2001. – Vol. 945, P. 119–131.

41. Bierie B., Moses H.L. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer // Nat. Rev. Cancer – 2006. – Vol. 6, № 7. – P. 506–520.

42. Bode C. et al. CpG DNA as a vaccine adjuvant // Expert Rev. Vaccines – 2011. – Vol. 10, № 4. – P. 499–511.

43. Bogun L. et al. Overlapping Stromal Alterations in Myeloid and Lymphoid Neoplasms // Cancers (Basel). – 2024. – Vol. 16, P. 2071.

44. Bonnet D., Dick J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell // *Nat. Med.* – 1997. – Vol. 3, P. 730–737.
45. Borlongan M.C., Saha D., Wang H. Tumor Microenvironment: A Niche for Cancer Stem Cell Immunotherapy // *Stem Cell Rev. Reports* – 2024. – Vol. 20, № 1. – P. 3–24.
46. Brescia P., Richichi C., Pelicci G. Current strategies for identification of glioma stem cells: Adequate or unsatisfactory? // *J. Oncol.* – 2012. – Vol. 2012, P. 376894.
47. Brogden K.A. Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria? // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2005. – Vol. 3, P. 238–250.
48. Brown M.D. et al. Identification of a cancer stem cell enriched side population using Hoechst 33342 based isolation // *Cancer Stem Cells* – 2010. – Vol. 44, № 0. – .
49. Bu P. et al. Asymmetric division: A marker for cancer stem cells? // *Oncotarget* – 2013. – Vol. 4, № 7. – P. 950–951.
50. Budker V. et al. Hypothesis: Naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process // *J. Gene Med.* – 2000. – Vol. 2, № 2. – P. 76–88.
51. Busija A.R., Patel H.H., Insel P.A. Caveolins and caveolae in the trafficking, maturation, and degradation of caveolae: Implications for cell physiology // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 2017. T. 312. № 4. C. C459–C477.
52. Cadigan K.M., Waterman M.L. TCF/LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2012. – Vol. 4, № 11. – .
53. Cai J. et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells // *J. Mol. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 5, № 4. – P. 227–238.
54. Cann K.L., Dellaire G. Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax // *Biochem Cell Biol* – 2010. – Vol. 89, № 1. – P. 45–60.
55. Canton J. Macropinocytosis: New Insights Into Its Underappreciated Role in Innate Immune Cell Surveillance // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 0, № OCT. – P. 2286.
56. Cao Z., Livas T., Kyprianou N. Anoikis and EMT: Lethal “liaisons” during cancer progression // *Crit. Rev. Oncog.* – 2016. – Vol. 21, № 3–4. – P. 155–168.
57. Capp J.P. Cancer stem cells: From historical roots to a new perspective // *J. Oncol.* – 2019. – P. 5189232.
58. Castellheim A. et al. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis // *Scand. J. Immunol.* – 2009. – Vol. 69, № 6. – P. 479–491.
59. Chaffer C.L. et al. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state // *Pnas* – 2011. – Vol. 108, № 19. – P. 7950–7955.

60. Chandarlapaty S. Negative feedback and adaptive resistance to the targeted therapy of cancer // *Cancer Discov.* – 2012. – Vol. 2, № 4. – P. 311–319.
61. Chao S., Yan H., Bu P. Asymmetric division of stem cells and its cancer relevance // *Cell Regen.* – 2024. – Vol. 13, № 1. – P. 1–10.
62. Chen B. et al. Targeting Negative Surface Charges of Cancer Cells by Multifunctional Nanoprobes // *Theranostics* – 2016. – Vol. 6, № 11. – P. 1887–1898.
63. Chen S.C., Liao T.T., Yang M.H. Emerging roles of epithelial-mesenchymal transition in hematological malignancies // *J. Biomed. Sci.* – 2018. – Vol. 25, № 1. – P. 37.
64. Chen Y.F. et al. Store-Operated Ca^{2+} entry in tumor progression: From molecular mechanisms to clinical implications // *Cancers (Basel)*. – 2019. – Vol. 11, № 7. – P. 1–22.
65. Cheng J.P.X., Nichols B.J. Caveolae: One Function or Many? // *Trends Cell Biol.* 2016. T. 26. № 3. C. 177–189.
66. Chiodelli P. et al. Heparin/heparan sulfate proteoglycans glycomic interactome in angiogenesis: Biological implications and therapeutical use // *Molecules*. 2015. T. 20. № 4. C. 6342–6388.
67. Choubey D. DNA-responsive inflammasomes and their regulators in autoimmunity // *Clin. Immunol.* – 2012. – Vol. 142, № 3. – P. 223.
68. Cianciosi D. et al. The molecular basis of different approaches for the study of cancer stem cells and the advantages and disadvantages of a three-dimensional culture // *Molecules* – 2021. – Vol. 26, № 9. – P. 2615.
69. Clarke M.F. et al. Cancer stem cells - Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66, № 19. – P. 9339–9344.
70. Collins A.R. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations // *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part B Mol. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 26, № 3. – P. 249–261.
71. Cooper G.M. The Eukaryotic Cell Cycle // *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000. Вып. 2nd.
72. Cooper S.T., Mcneil P.L. Membrane Repair: Mechanisms and Pathophysiology // *Physiol Rev* – 2015. – Vol. 95, P. 1205–1240.
73. Corre J., Munshi N., Avet-Loiseau H. Genetics of multiple myeloma : another heterogeneity level? // *Blood* – 2015. – Vol. 125, № 12. – P. 1870–1877.
74. Costa P.E. da et al. Src kinase activation by nitric oxide promotes resistance to anoikis in tumour cell lines // *Free Radic. Res.* – 2018. – Vol. 52, № 5. – P. 592–604.
75. Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and Cancer // *Wound Heal. Stem Cells Repair*

Restorations, Basic Clin. Asp. – 2002. – Vol. 420, № 6917. – P. 860–867.

76. Crisp M. et al. Coupling of the nucleus and cytoplasm: Role of the LINC complex // J. Cell Biol. – 2006. – Vol. 172, № 1. – P. 41–53.

77. Cui W. et al. Expression and regulation mechanisms of Sonic Hedgehog in breast cancer // Cancer Sci. – 2010. – Vol. 101, № 4. – P. 927–933.

78. Dalerba P. et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2007. – Vol. 104, № 24. – P. 10158–10163.

79. Darvin P. et al. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers // Exp. Mol. Med. – 2018. – Vol. 50, № 12. – P. 1–11.

80. Das B. et al. MYC Regulates the HIF2a Stemness Pathway via Nanog and Sox2 to Maintain Self-Renewal in Cancer Stem Cells versus Non-Stem Cancer Cells // Cancer Res. – 2019. – Vol. 79, № 16. – P. 4015–4025.

81. Das B.C. et al. Retinoic acid signaling pathways in development and diseases // Bioorg. Med. Chem. – 2014. – Vol. 22, № 2. – P. 673–683.

82. Davies N.A. et al. The contributions of oxidative stress, oxidised lipoproteins and AMPK towards exercise-associated PPAR γ signalling within human monocytic cells // Free Radic. Res. – 2015. – Vol. 49, № 1. – P. 45–56.

83. Deen W.M. Hindered Transport of Large Molecules in Liquid-Filled Pores // AIChE J. – 1987. – Vol. 33, № 9. – P. 1409–1425.

84. Delacoux F. et al. Unraveling the amino acid sequence crucial for heparin binding to collagen V // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275, № 38. – P. 29377–29382.

85. Deonarain M.P., Kousparou C.A., Epenetos A.A. Antibodies targeting cancer stem cells: A new paradigm in immunotherapy? // MAbs – 2009. – Vol. 1, № 1. – P. 12–25.

86. Deprez P.N., Inestrosa N.C. Two heparin-binding domains are present on the collagenic tail of asymmetric acetylcholinesterase // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol. 270, № 19. – P. 11043–11046.

87. Derbyshire M.K. et al. Nonhomologous recombination in human cells // Mol. Cell. Biol. – 1994. – Vol. 14, № 1. – P. 156–169.

88. Deshmukh A.P. et al. Identification of EMT signaling cross-talk and gene regulatory networks by single-cell RNA sequencing // 2021. – Vol. 118, P. 2102050118.

89. Dhatchinamoorthy K., Colbert J.D., Rock K.L. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation // Front. Immunol. – 2021. – Vol. 12, P. 636568.

90. Diesbach P. De et al. Identification, purification and partial characterisation of an oligonucleotide receptor in membranes of HepG2 cells // Nucleic Acids Res. – 2000. – Vol. 28, № 4. – P. 868–874.

91. Doi T. et al. Charged collagen structure mediates the recognition of negatively charged macromolecules by macrophage scavenger receptors // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268, № 3. – P. 2126–2133.
92. Dolgova E. V. et al. Internalization of exogenous DNA into internal compartments of murine bone marrow cells // *Russ. J. Genet. Appl. Res.* – 2012a. – Vol. 2, № 6. – 440–452.
93. Dolgova E. V. et al. «Delayed death» phenomenon: A synergistic action of cyclophosphamide and exogenous DNA // *Gene* – 2012b. – Vol. 495, № 2. – P. 134–145.
94. Dolgova E. V. et al. Novel Cancer Stem Marker and Its Applicability for Grading Primary Human Gliomas // *Technol. Cancer Res. Treat.* – 2018. – Vol. 17, P. 1–8.
95. Dolgova E. V. et al. Internalization of extracellular double-stranded DNA as a potential marker of cancer stem cells in Epstein-Barr virus-induced B-cell lymphoma // *Cancer biomarkers* – 2025. – Vol. 42, № 5. – P. 1–13.
96. Doloff J.C., Chen C.S., Waxman D.J. Anti-tumor innate immunity activated by intermittent metronomic cyclophosphamide treatment of 9L brain tumor xenografts is preserved by anti-angiogenic drugs that spare VEGF receptor 2 // *Mol. Cancer* – 2014. – Vol. 13, № 1. – P. 1–13.
97. Doloff J.C., Waxman D.J. VEGF receptor inhibitors block the ability of metronomically dosed cyclophosphamide to activate innate immunity-induced tumor regression. // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72, № 5. – P. 1103–1115.
98. Douard R. et al. Sonic Hedgehog-dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer // *Surgery* – 2006. – Vol. 139, № 5. – P. 665–670.
99. Dowling M., Kelly M., Meenaghan T. Multiple myeloma: managing a complex blood cancer // *Br. J. Nurs.* – 2016. – Vol. 25, № 16. – P. S18–S28.
100. Drexler H.G., Matsuo Y. Malignant hematopoietic cell lines: In vitro models for the study of multiple myeloma and plasma cell leukemia // *Leuk. Res.* – 2000. – Vol. 24, № 8. – P. 681–703.
101. Dyer A.P. et al. Dextran sulfate can act as an artificial receptor to mediate a type-specific herpes simplex virus infection via glycoprotein B // *J. Virol.* – 1997. – Vol. 71, № 1. – P. 191–198.
102. Efremov Y.R. et al. Cancer Stem Cells: Emergent Nature of Tumor Emergency. // *Front. Genet.* – 2018. – Vol. 9, P. 544.
103. Eisenberg S. et al. Mapping the electrostatic profiles of cellular membranes // *Mol. Biol. Cell* – 2021. – Vol. 32, № 3. – P. 301–310.
104. Eissa I.R. et al. The current status and future prospects of oncolytic viruses in clinical trials against melanoma, glioma, pancreatic, and breast cancers // *Cancers (Basel)*. – 2018. – Vol. 10, № 10. – P. 356.
105. Elbadawy M. et al. Emerging roles of C-myc in cancer stem cell-related signaling and

resistance to cancer chemotherapy: A potential therapeutic target against colorectal cancer // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, № 9. – P. 2340.

106. Elfenbein A., Simons M. Auxiliary and autonomous proteoglycan signaling networks // *Methods in Enzymology*. : Academic Press Inc., 2010. C. 3–31.

107. Engström P.G. et al. Systematic evaluation of spliced alignment programs for RNA-seq data // *Nat. Methods* 2013 1012 – 2013. – Vol. 10, № 12. – P. 1185–1191.

108. Ermakov A. V. et al. Oxidative stress as a significant factor for development of an adaptive response in irradiated and nonirradiated human lymphocytes after inducing the bystander effect by low-dose X-radiation // *Mutat. Res.* – 2009. – Vol. 669, № 1–2. – P. 155–161.

109. Eun K., Ham S.W., Kim H. Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting // *BMB Rep.* – 2017. – Vol. 50, № 3. – P. 117–125.

110. Evstrapov A.A. Physical methods of microparticle transport and separation control in liquid media. I. Dielectrophoresis, photophoresis, optophoresis, optical tweezers // *Nauchnoe Priborostr.* – 2005. – Vol. 15, № 1. – P. 3–20. [In Russian].

111. Fang F., Xiao W., Tian Z. NK cell-based immunotherapy for cancer // *Semin. Immunol.* 2017. T. 31. C. 37–54.

112. Fannon M., Forsten K.E., Nugent M.A. Potentiation and inhibition of bFGF binding by heparin: A model for regulation of cellular response // *Biochemistry* – 2000. – Vol. 39, № 6. – P. 1434–1445.

113. Fernandez-Garcia I., Ortiz-De-Solorzano C., Montuenga L.M. Telomeres and telomerase in lung cancer // *J. Thorac. Oncol.* – 2008. – Vol. 3, № 10. – P. 1085–1088.

114. Fernandez A. et al. The WNT receptor FZD7 is required for maintenance of the pluripotent state in human embryonic stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2014. – Vol. 111, № 4. – P. 1409–1414.

115. Filaci G. et al. Spontaneous transgenesis of human B lymphocytes // *Gene Ther.* – 2004. – Vol. 11, № 1. – P. 42–51.

116. Fonseca R., Monge J., Dimopoulos M.A. Staging and prognostication of multiple myeloma // *Expert Rev. Hematol.* – 2014. – Vol. 7, № 1. – P. 21–31.

117. Friedl P., Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms // *Nat. Rev. Cancer* – 2003. – Vol. 3, № 5. – P. 362–374.

118. Friedmann-Morvinski D., Verma I.M. Dedifferentiation and reprogramming: Origins of cancer stem cells // *EMBO Rep.* 2014. T. 15. № 3. C. 244–253.

119. Frisch S.M., Ruoslahti E. Integrins and anoikis // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1997. – Vol. 9, № 5. – P. 701–706.

120. Fuchs E., Blau H.M. Tissue Stem Cells: Architects of Their Niches // *Cell Stem Cell* – 2020. – Vol. 27, № 4. – P. 532–556.
121. Fulawka L., Donizy P., Halon A. Cancer stem cells - the current status of an old concept: Literature review and clinical approaches // *Biol. Res.* – 2014. – Vol. 47, № 1. – P. 1–9.
122. Furini G., Verderio E. Spotlight on the Transglutaminase 2-Heparan Sulfate Interaction // *Med. Sci.* – 2019. – Vol. 7, № 1. – P. 5.
123. Gahan P.B., Stroun M. The virtosome-a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger // *Cell Biochem. Funct.* – 2010. – Vol. 28, № 7. – P. 529–538.
124. Gahan P.B., Swaminathan R. Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – Vol. 1137, № 1. – P. 1–6.
125. Garacia-Olmo D., Garacia-Olmo D.C., Martinez E. Horizontal transfer of DNA and the «genometastasis hypothesis» // *Blood* – 2000. – Vol. 95, № 2. – P. 724–725.
126. García-Olmo D. et al. Detection of genomically-tagged cancer cells in different tissues at different stages of tumor development: Lack of correlation with the formation of metastasis // *Cancer Lett.* – 1999. – Vol. 140, № 1–2. – P. 11–20.
127. García-Olmo D.C. et al. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70, № 2. – P. 560–567.
128. García-Olmo D.C., Picazo M.G., García-Olmo D. Transformation of non-tumor host cells during tumor progression: theories and evidence // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2012. – Vol. 12, № SUPPL. 1. – P. S199-207.
129. Garlatti V. et al. Cutting Edge: C1q Binds Deoxyribose and Heparan Sulfate through Neighboring Sites of Its Recognition Domain // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 185, № 2. – P. 808–812.
130. Genka S. et al. Brain and plasma pharmacokinetics and anticancer activities of cyclophosphamide and phosphoramidate mustard in the rat // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 1990. – Vol. 27, № 1. – P. 1–7.
131. Gilbert C.A., Ross A.H. Cancer Stem Cells: Cell Culture, Markers and Targets for New Therapies // *J Cell Biochem* – 2009. – Vol. 108, № 5. – P. 1031–1038.
132. Gilbert C.A., Ross A.H. Cancer stem cells theories and practice / Editor. S. Shostak. : InTech, 2011a. 422 P.
133. Gilbert C.A., Ross A.H. Glioma Stem Cells: Cell Culture, Markers and Targets for New Combination Therapies. , 2011b. 80–104 P.
134. Goldstein J.L. et al. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition // *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U. S. A. – 1979. – Vol. 76, № 1. – P. 333–337.

135. Golovanov M.V. Analysis of biophysical theory of living cell electrophoresis // J. N.N. Blokhin Russ. Cancer Res. Cent. RAMS – 1998. – P. 30–33.

136. Gómez Toledo A. et al. A Systems View of the Heparan Sulfate Interactome // J. Histochem. Cytochem. – 2021. – Vol. 69, № 2. – P. 105–119.

137. Goodarzi A.A. et al. ATM Signaling Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks Associated with Heterochromatin // Mol. Cell – 2008. – Vol. 31, № 2. – P. 167–177.

138. Gottlieb T.A. et al. Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells // J. Cell Biol. – 1993. – Vol. 120, № 3. – P. 695–710.

139. Greaves D., Calle Y. Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) and Associated Invasive Adhesions in Solid and Haematological Tumours // Cells. 2022. Vol. 11. № 4. P. 649.

140. Greten F.R., Grivennikov S.I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences // Immunity – 2019. – Vol. 51, № 1. – P. 27–41.

141. Grosheva I. et al. p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion // J. Cell Sci. – 2000. – Vol. 114, P. 695–707.

142. Gu X. et al. Caveolins and caveolae in ocular physiology and pathophysiology // Prog. Retin. Eye Res. 2017. Vol. 56. P. 84–106.

143. Guiducci C. et al. Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. // Cancer Res. – 2005. – Vol. 65, № 8. – P. 3437–46.

144. Hall S.E. et al. Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin // J Immunol. – 1994. – Vol. 153, № 7. – P. 3218–3227.

145. Hanada K. et al. The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strands breaks // EMBO J. – 2006. – Vol. 25, № 20. – P. 4921–4932.

146. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions // Cancer Discov. – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 31–46.

147. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: The next generation // Cell – 2011. – Vol. 144, № 5. – P. 646–674.

148. Hanss B. et al. Identification and characterization of a cell membrane nucleic acid channel // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1998. – Vol. 95, № 4. – P. 1921–1926.

149. Harris E.N., Baggenstoss B.A., Weigel P.H. Rat and human HARE/stabilin-2 are clearance

receptors for high- and low-molecular-weight heparins // *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* – 2009. – Vol. 296, № 6. – P. G1191-1199.

150. Harris E.N., Weigel J.A., Weigel P.H. The human hyaluronan receptor for endocytosis (HARE/stabilin-2) is a systemic clearance receptor for heparin // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283, № 25. – P. 17341–17350.

151. Harris E.N., Weigel P.H. The ligand-binding profile of HARE: hyaluronan and chondroitin sulfates A, C, and D bind to overlapping sites distinct from the sites for heparin, acetylated low-density lipoprotein, dermatan sulfate, and CS-E // *Glycobiology* – 2008. – Vol. 18, № 8. – P. 638.

152. Hashimoto S., Anai H., Hanada K. Mechanisms of interstrand DNA crosslink repair and human disorders // *Genes Environ.* – 2016. – Vol. 38, P. 9.

153. Hayer A. et al. Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation // *J. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 191, № 3. – P. 615–629.

154. He Z., He J., Xie K. KLF4 transcription factor in tumorigenesis // *Cell Death Discov.* – 2023. – Vol. 9, № 1. – P. 1–13.

155. Hébert E. Improvement of exogenous DNA nuclear importation by nuclear localization signal-bearing vectors: A promising way for non-viral gene therapy? // *Biol. Cell.* 2003. Vol. 95. № 2. P. 59–68.

156. Hebraud B. et al. Role of additional chromosomal changes in the prognostic value of t(4;14) and del(17p) in multiple myeloma: The IFM experience // *Blood* – 2015. – Vol. 125, № 13. – P. 2095–2100.

157. Hefeneider S.H. et al. Identification of a cell-surface DNA receptor and its association with systemic lupus erythematosus // *J. Invest. Dermatol.* – 1990. – Vol. 94, № 6 SUPPL. – P. 79S-84S.

158. Herz J., Strickland D.K. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor // *J. Clin. Invest.* – 2001. – Vol. 108, № 6. – P. 779–784.

159. Heylmann D. et al. Human CD4+CD25+ Regulatory T Cells Are Sensitive to Low Dose Cyclophosphamide: Implications for the Immune Response // *PLoS One* – 2013. – Vol. 8, № 12. – P. e83384.

160. Hirata Y., Mishima E. Membrane Dynamics and Cation Handling in Ferroptosis // *Physiology* – 2024. – Vol. 39, № 2. – P. 73–87.

161. Hitomi M. et al. Asymmetric cell division promotes therapeutic resistance in glioblastoma stem cells // *JCI Insight* – 2021. – Vol. 6, № 3. – P. e130510.

162. Hoferkova E. et al. Stromal cells engineered to express T cell factors induce robust CLL cell proliferation in vitro and in PDX co-transplantations allowing the identification of RAF inhibitors

as anti-proliferative drugs // *Leukemia* – 2024. – Vol. 38, P. 1699–1711.

163. Hohlweg U., Doerfler W. On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice // *Mol. Genet. Genomics* – 2001. – Vol. 265, № 2. – P. 225–233.

164. Holmgren L. et al. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies // *Blood* – 1999. – Vol. 93, № 11. – P. 3956–3963.

165. Horn P.A. et al. Expression of AC133, a novel hematopoietic precursor antigen, on acute myeloid leukemia cells. // *Blood* – 1999. – Vol. 93, № 4. – P. 1435–7.

166. Hosen N. Multiple myeloma-initiating cells // *Int. J. Hematol.* – 2013. – Vol. 97, № 3. – P. 306–312.

167. Hotary K. et al. A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program // *Genes Dev.* – 2006. – Vol. 20, № 19. – P. 2673.

168. Hou B. et al. Efficiency of CAR-T Therapy for Treatment of Solid Tumor in Clinical Trials: A Meta-Analysis // *Dis. Markers* – 2019. – Vol. 2019, P. 3425291.

169. Hu Y., Tian Z., Zhang C. Natural Killer Cell-Based Immunotherapy for Cancer: Advances and Prospects // *Engineering* – 2019. – Vol. 5, № 1. – P. 106–114.

170. Huang L.C., Clarkin K.C., Wahl G.M. Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1996. – Vol. 93, № 10. – P. 4827–4832.

171. Huang T. et al. Stem cell programs in cancer initiation, progression, and therapy resistance // *Theranostics* – 2020. – Vol. 10, № 19. – P. 8721–8743.

172. Hubert M., Larsson E., Lundmark R. Keeping in touch with the membrane; Protein- And lipid-mediated confinement of caveolae to the cell surface // *Biochem. Soc. Trans.* 2020. Vol. 48. № 1. P. 155–163.

173. Hussein N.H., Amin N.S., Tayebi H.M. El. GPI-AP: Unraveling a New Class of Malignancy Mediators and Potential Immunotherapy Targets // *Front. Oncol.* 2020. T. 10. C. 537311.

174. Iannuzzi C., Irace G., Sirangelo I. The effect of glycosaminoglycans (GAGs) on amyloid aggregation and toxicity // *Molecules*. 2015. Vol. 20. № 2. P. 2510–2528.

175. Ikezawa H. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins // *Biol. Pharm. Bull.* 2002. Vol. 25. № 4. P. 409–417.

176. Illendula A., Fultang N., Peethambaran B. Retinoic acid induces differentiation in neuroblastoma via ROR1 by modulating retinoic acid response elements // *Oncol. Rep.* – 2020. – Vol. 44, № 3. – P. 1013–1024.

177. Ireson C.R., Kelland L.R. Discovery and development of anticancer aptamers // *Mol.*

Cancer Ther. – 2006. – Vol. 5, № 12. – P. 2957–2962.

178. Irollo E., Pirozzi G. CD133: to be or not to be, is this the real question? // Am. J. Transl. Res. – 2013. – Vol. 5, № 6. – P. 563–81.

179. Ishihara M. et al. Heparinoid complex-based heparin-binding cytokines and cell delivery carriers // Molecules – 2019. – Vol. 24, № 24. – P. 4630.

180. Iwasaki A., Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system // Science – 2010. – Vol. 327, № 5963. – P. 291.

181. Jinesh G.G. et al. Blebbistatins, the emergency program for cancer stem cells: sphere formation and tumorigenesis after apoptosis // Cell Death Differ. – 2013. – Vol. 20, P. 382–395.

182. Jordan M., Waxman D.J. CpG-1826 immunotherapy potentiates chemotherapeutic and anti-tumor immune responses to metronomic cyclophosphamide in a preclinical glioma model // Cancer Lett. – 2016. – Vol. 373, № 1. – P. 88–96.

183. Jureti D., Zoranic L., Zucic D. Basic Charge Clusters and Predictions of Membrane Protein Topology // J. Chem. Inf. Comput. Sci – 2002. – Vol. 42, P. 620–632.

184. Kaczorowski D.J. et al. Mammalian DNA is an endogenous danger signal that stimulates local synthesis and release of complement factor B // Mol. Med. – 2012. – Vol. 18, № 1. – P. 851–860.

185. Kahlert U.D., Joseph J. V., Krut F.A.E. EMT- and MET-related processes in nonepithelial tumors: importance for disease progression, prognosis, and therapeutic opportunities // Mol. Oncol. – 2017. – Vol. 11, № 7. – P. 860.

186. Kaksonen M., Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2018. Vol. 19. № 5. P. 313–326.

187. Kalluri R., Weinberg R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition // J. Clin. Invest. 2009. Vol. 119. № 6. P. 1420–1428.

188. Kantoff P.W. et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer // N. Engl. J. Med. – 2010. – Vol. 363, № 5. – P. 411–422.

189. Kase M. 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.

190. Khalil I.A. et al. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery // Pharmacol. Rev. – 2006. – Vol. 58, № 1. – P. 32–45.

191. Khan K.A. et al. Immunostimulatory and anti-tumor metronomic cyclophosphamide regimens assessed in primary orthotopic and metastatic murine breast cancer // npj Breast Cancer – 2020. – Vol. 6, P. 29.

192. Khillan J.S. Vitamin A/retinol and maintenance of Pluripotency of stem cells // Nutrients – 2014. – Vol. 6, № 3. – P. 1209–1222.

193. Khoury T. et al. Aldehyde dehydrogenase 1A1 expression in breast cancer is associated with stage, triple negativity, and outcome to neoadjuvant chemotherapy // *Mod. Pathol.* – 2012. – Vol. 25, № 3. – P. 388–397.
194. Kim J. et al. Requirement for Specific Proteases in Cancer Cell Intravasation as Revealed by a Novel Semiquantitative PCR-Based Assay // *Cell* – 1998. – Vol. 94, № 3. – P. 353–362.
195. Kim S.Y. et al. Cancer Stem Cells Protect Non-Stem Cells From Anoikis: Bystander Effects // *J. Cell. Biochem.* – 2016. – Vol. 117, № 10. – P. 2289–2301.
196. Kim Y.N. et al. Anoikis resistance: An essential prerequisite for tumor metastasis // *Int. J. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 2012, P. 306879.
197. Kinoshita T. Biosynthesis and biology of mammalian GPI-anchored proteins // *Open Biol.* 2020. Vol. 10. № 3. P. 190290.
198. Klein G., Klein E. The transformation of a solid transplantable mouse carcinoma into an «ascites tumor» // *Cancer Res.* – 1951. – Vol. 11, № 6. – P. 466–469.
199. Knelson E.H., Nee J.C., Blobel G.C. Heparan sulfate signaling in cancer // *Trends Biochem. Sci.* 2014. Vol. 39. № 6. P. 277–288.
200. Konar S.K. et al. A systematic review of overall survival in pediatric primary glioblastoma multiforme of the spinal cord // *J Neurosurg Pediatr.* – 2017. – Vol. 19, № 2. – P. 239–248.
201. Kotnik T., Rems L., Tarek M. Membrane Electroporation and Electroporation : Mechanisms and Models // *Annu. Rev. Biophys.* – 2019. – Vol. 48, P. 63–91.
202. Kourtidis A., Ngok S.P., Anastasiadis P.Z. P120 catenin: An essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression // *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* : Elsevier B.V., 2013. P. 409–432.
203. Koury J., Zhong L., Hao J. Targeting Signaling Pathways in Cancer Stem Cells for Cancer Treatment // *Stem Cells Int.* – 2017. – Vol. 2017, P. 2925869.
204. Krebsbach P.H., Villa-Diaz L.G. The Role of Integrin $\alpha 6$ (CD49f) in Stem Cells: More than a Conserved Biomarker // *Stem Cells Dev.* – 2017. – Vol. 26, № 15. – P. 1090–1099.
205. Krieg A.M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects // *Annu. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol. 20, P. 709–760.
206. Kripnerova M. et al. Urothelial cancer stem cell heterogeneity // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2019. – Vol. 1139, P. 127–151.
207. Kumar V. et al. The Role of Notch, Hedgehog, and Wnt Signaling Pathways in the Resistance of Tumors to Anticancer Therapies // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2021. – Vol. 9, P. 650772.
208. Kuo J.C.H. et al. Physical biology of the cancer cell glycocalyx // *Nat. Phys.* – 2018. – Vol. 14, № 7. – P. 658–669.

209. Kyle-Cezar F. et al. Expression of c-kit and Sca-1 and their relationship with multidrug resistance protein 1 in mouse bone marrow mononuclear cells // *Immunology* – 2007. – Vol. 121, № 1. – P. 122–128.
210. Lam C.G. et al. Science and health for all children with cancer // *Science* (80-.). – 2019. – Vol. 15, № 363. – P. 1182–1186.
211. Lamouille S., Xu J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. Vol. 15. № 3. P. 178–196.
212. Lansdowne L. Cancer Cells vs Normal Cells | Technology Networks [Электронный ресурс]. URL: <https://www.technologynetworks.com/cancer-research/articles/cancer-cells-vs-normal-cells-307366> .
213. Lathia J.D. et al. Cancer stem cells in glioblastoma // *Genes Dev.* – 2015. – Vol. 29, P. 1203–1217.
214. Lawen A. Apoptosis - An introduction // *BioEssays*. 2003. T. 25. № 9. C. 888–896.
215. Le W. et al. Detection of cancer cells based on glycolytic-regulated surface electrical charges // *Biophys. Reports* – 2019. – Vol. 5, № 1. – P. 10–18.
216. Leal-Pinto E. et al. Presence of the nucleic acid channel in renal brush-border membranes: Allosteric modulation by extracellular calcium // *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* – 2005. – Vol. 289, № 1. – P. F97-106.
217. Lee H. et al. Cancer stem cells: landscape, challenges and emerging therapeutic innovations // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2025 101 – 2025. – Vol. 10, № 1. – P. 1–38.
218. Lee S.H. et al. The SET domain protein Metnase mediates foreign DNA integration and links integration to nonhomologous end-joining repair // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2005. – Vol. 102, № 50. – P. 18075–18080.
219. Lees-Miller S.P., Meek K. Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining // *Biochimie* – 2003. – Vol. 85, № 11. – P. 1161–1173.
220. Lemma S. et al. Biological roles and prognostic values of the epithelial-mesenchymal transition-mediating transcription factors Twist, ZEB1 and Slug in diffuse large B-cell lymphoma // *Histopathology* – 2013. – Vol. 62, № 2. – P. 326–333.
221. Lemmon M.A., Schlessinger J. Cell signaling by receptor-tyrosine kinases // *Cell* – 2010. – Vol. 141, № 7. – P. 1117.
222. Leng Z. et al. Krüppel-like factor 4 regulates stemness and mesenchymal properties of colorectal cancer stem cells through the TGF- β 1/Smad/snail pathway // *J. Cell. Mol. Med.* – 2020. – Vol. 24, № 2. – P. 1866–1877.
223. Li Z. et al. Asymmetric Cell Division and Tumor Heterogeneity // *Front. Cell Dev. Biol.*

– 2022. – Vol. 10, № July. – P. 1–8.

224. Liang W. et al. Rapid and label-free separation of burkitt's lymphoma cells from red blood cells by optically-induced electrokinetics // PLoS One – 2014. – Vol. 9, № 6. – P. e90827.

225. Likhacheva A.S. et al. Exogenous DNA can be captured by stem cells and be involved in their rescue from death after lethal- dose γ -radiation // Gene Ther. Mol. Biol. – 2007. – Vol. 11, P. 305–314.

226. Lim S.H. et al. Agonist Antibodies for Cancer Immunotherapy: History, Hopes, and Challenges // Clin. Cancer Res. – 2024. – Vol. 30, № 9. – P. 1712–1723.

227. Liu A., Yu X., Liu S. Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: Small genes make a big difference // Chin. J. Cancer – 2013. – Vol. 32, № 9. – P. 483–487.

228. Liu C., Jin Y., Fan Z. The Mechanism of Warburg Effect-Induced Chemoresistance in Cancer // Front. Oncol. – 2021. – Vol. 11, № September. – P. 1–16.

229. Liu P.P. et al. Metabolic regulation of cancer cell side population by glucose through activation of the Akt pathway // Cell Death Differ. – 2014. – Vol. 21, № 1. – P. 124–135.

230. Liu Y. et al. Downregulation of Bmi-1 suppresses epithelial-mesenchymal transition in melanoma // Oncol. Rep. – 2017. – Vol. 37, № 1. – P. 139–146.

231. Loke S.L. et al. Characterization of oligonucleotide transport into living cells // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1989. – Vol. 86, № 10. – P. 3474–3478.

232. Lorat Y. et al. Beyond repair foci: DNA double-strand break repair in euchromatic and heterochromatic compartments analyzed by transmission electron microscopy // PLoS One – 2012. – Vol. 7, № 5. – P. e38165.

233. Ludtke J.J. et al. A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA // J Cell Sci. – 1999. – Vol. 112, № Pt 12. – P. 20133–1241.

234. Ludwig K., Kornblum H.I. Molecular markers in glioma // J. Neurooncology – 2017. – Vol. 134, № 3. – P. 505–512.

235. Luo D. et al. Controlled DNA delivery systems // Pharm. Res. – 1999. – Vol. 16, № 8. – P. 1300–1308.

236. MacDougall C.A. et al. The structural determinants of checkpoint activation // Genes Dev. – 2007. – Vol. 21, № 8. – P. 898–903.

237. Maiti R. Metronomic chemotherapy // J. Pharmacol. Pharmacother. – 2014. – Vol. 5, № 3. – P. 186.

238. Majumdar S., Liu S.-T. Cell division symmetry control and cancer stem cells // AIMS Mol. Sci. – 2020. – Vol. 7, № 2. – P. 82–101.

239. Makena M.R. et al. Cancer stem cells: Road to therapeutic resistance and strategies to

overcome resistance // BBA - Mol. Basis Dis. – 2020. – Vol. 1866, № 4. – P. 165339.

240. Maksimenko A. V., Turashev A.D. Endothelial glycocalyx of blood circulation system. I. Detection, components, and structural organization // Russ. J. Bioorganic Chem. – 2014. – Vol. 40, № 2. – P. 119–128.

241. Mallard B.W., Tiralongo J. Cancer stem cell marker glycosylation: Nature, function and significance // Glycoconjugate J. 2017 344 – 2017. – Vol. 34, № 4. – P. 441–452.

242. Mani S.A. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells // Cell – 2008. – Vol. 133, № 4. – P. 704–715.

243. Manni W., Min W. Signaling pathways in the regulation of cancer stem cells and associated targeted therapy // MedComm – 2022. – Vol. 3, № 4. – P. 1–34.

244. Manrique S.Z. et al. Definitive activation of endogenous antitumor immunity by repetitive cycles of cyclophosphamide with interspersed Tolllike receptor agonists // Oncotarget – 2016. – Vol. 7, № 28. – P. 42919–42942.

245. Marabelle A. et al. Intratumoral immunotherapy: using the tumor as the remedy // Ann. Oncol. – 2017. – Vol. 28, № suppl_12. – P. xii33–xii43.

246. Marhaba R. et al. CD44 and EpCAM: Cancer-Initiating Cell Markers // Curr. Mol. Med. – 2008. – Vol. 8, № 8. – P. 784–804.

247. Martinez-Lopez J. et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma // Blood – 2014. – Vol. 123, № 20. – P. 3073–3079.

248. Martinez-Outschoorn U.E., Sotgia F., Lisanti M.P. Caveolae and signalling in cancer // Nat. Rev. Cancer. 2015. Vol. 15. № 4. P. 225–237.

249. Matsui W. et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells // Blood – 2004. – Vol. 103, № 6. – P. 2332–2336.

250. Maucourt C. et al. Differentiation of Cancer Stem Cells by Using Synthetic Small Molecules: Toward New Therapeutic Strategies against Therapy Resistance // ChemMedChem – 2021. – Vol. 16, № 1. – P. 14–29.

251. Mayo J.G. Biologic characterization of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor. // Cancer Chemother. Rep. 2 – 1972. – Vol. 3, № 1. – P. 325–30.

252. Mcmillin D.W., Negri J.M., Mitsiades C.S. The role of tumour-stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities // Nat. Rev. Drug Discov. – 2013. – Vol. 12, № 3. – P. 217–228.

253. Mcneil P.L., Kirchhausen T. An emergency response team for membrane repair // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2005. – Vol. 6, P. 499–505.

254. McNeill K.A. Epidemiology of Brain Tumors // Neurol. Clin. 2016. Vol. 34. № 4. P. 981–

998.

255. Medina-Echeverez J. et al. Successful colon cancer eradication after chemoimmunotherapy is associated with profound phenotypic change of intratumoral myeloid cells // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 186, № 2. – P. 807–815.

256. Medzhitov R., Janeway C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways // *Immunol. Rev.* – 2000. – Vol. 173, P. 89–97.

257. Meister M., Tikkanen R. Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: A flotillin point of view // *Membranes (Basel)*. 2014. Vol. 4. № 3. P. 356–371.

258. Meneghetti M.C.Z. et al. Heparan sulfate and heparin interactions with proteins // *J. R. Soc. Interface*. 2015. Vol. 12. № 110. P. 0589.

259. Mesrati M.H. et al. CD44: A multifunctional mediator of cancer progression // *Biomolecules* – 2021. – Vol. 11, № 12. – P. 1850.

260. Mettlen M. et al. Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis // *Annu. Rev. Biochem.* 2018. T. 87. C. 871–896.

261. Mironova N. et al. Animal Model of Drug-Resistant Tumor Progression // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2006. – Vol. 1091, № 1. – P. 490–500.

262. Mitchell M.J., King M.R. Physical biology in cancer. 3. The role of cell glycocalyx in vascular transport of circulating tumor cells // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* – 2014. – Vol. 306, № 2. – P. C89-97.

263. Mizrak D., Brittan M., Alison M.R. CD133: molecule of the moment. // *J. Pathol.* – 2008. – Vol. 214, № 1. – P. 3–9.

264. Moek K.L. et al. The antibody-drug conjugate target landscape across a broad range of tumour types // *Ann. Oncol.* – 2017. – Vol. 28, № 12. – P. 3083–3091.

265. Mooren O.L., Galletta B.J., Cooper J.A. Roles for Actin Assembly in Endocytosis // *Annu Rev Biochem* – 2012. – Vol. 81, P. 661–686.

266. Moreno-Londoño A.P., Robles-Flores M. Functional Roles of CD133: More than Stemness Associated Factor Regulated by the Microenvironment // *Stem Cell Rev. Reports* – 2024. – Vol. 20, № 1. – P. 25–51.

267. Motzer J. et al. Oncogenic NFATc2 is a key downstream transcription factor in K-Ras induced pancreatic cancer cell proliferation // *Pancreas* – 2007. – Vol. 35, № 4. – P. 418.

268. Müller M. et al. The role of pluripotency factors to drive stemness in gastrointestinal cancer // *Stem Cell Res.* – 2016. – Vol. 16, № 2. – P. 349–357.

269. Müller S. et al. Targeting Cancer Stem Cells with Small Molecules // *Isr. J. Chem.* – 2017. – Vol. 57, № 3. – P. 239–250.

270. Munkonge F.M. et al. Emerging significance of plasmid DNA nuclear import in gene therapy // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003. Vol. 55. № 6. P. 749–760.
271. Muñoz E.M., Linhardt R.J. Heparin-binding domains in vascular biology // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004. Vol 24. № 9. P. 1549–1557.
272. Nakahara T. et al. Cyclophosphamide enhances immunity by modulating the balance of dendritic cell subsets in lymphoid organs // *Blood* – 2010. – Vol. 115, № 22. – P. 4384–4392.
273. Narazaki M., Segarra M., Tosato G. Sulfated polysaccharides identified as inducers of neuropilin-1 internalization and functional inhibition of VEGF 165 and semaphorin3A // *Blood* – 2008. – Vol. 111, № 8. – P. 4126–4136.
274. Nichols B.J. et al. Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and golgi complex // *J. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 152, № 3. – P. 529–541.
275. Nicklas S. et al. A complex of the ubiquitin ligase TRIM32 and the deubiquitinase USP7 balances the level of c-Myc ubiquitination and thereby determines neural stem cell fate specification // *Cell Death Differ.* – 2019. – Vol. 26, № 4. – P. 728–740.
276. Niedernhofer L.J. et al. The Structure-Specific Endonuclease Ercc1-Xpf Is Required To Resolve DNA Interstrand Cross-Link-Induced Double-Strand Breaks // *Mol. Cell. Biol.* – 2004. – Vol. 24, № 13. – P. 5776–5787.
277. Nilson K., Ponten J. Classification and Biological Nature of Established Human Hematopoietic Cell Lines // *Int. J. Cancer* – 1975. – Vol. 15, P. 321–341.
278. Nishinaka T. et al. A comparative study of sulphated polysaccharide effects on advanced glycation end-product uptake and scavenger receptor class A level in macrophages // *Diabetes Vasc. Dis. Res.* – 2020. – Vol. 17, № 1. – P. 1479164119896975.
279. O'Brien C.A. et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice // *Nature* – 2007. – Vol. 445, № 7123. – P. 106–110.
280. O'Brien C.A., Kreso A., Jamieson C.H.M. Cancer stem cells and self-renewal // *Clin. Cancer Res.* – 2010. – Vol. 16, № 12. – P. 3113–3120.
281. Olumi A. et al. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium // *Cancer Res.* – 1999. – Vol. 59, № 19. – P. 5002–5011.
282. Ondrej V. et al. Intranuclear trafficking of plasmid DNA is mediated by nuclear polymeric proteins lamins and actin // *Acta Biochim Pol.* – 2008. – Vol. 55, № 2. – P. 307–315.
283. Ori A. et al. Identification of Heparin-binding Sites in Proteins by Selective Labeling * □ // *Mol. Cell. Proteomics* – 2009. – Vol. 8, № 10. – P. 2256–2265.
284. Ori A., Wilkinson M.C., Fernig D.G. The heparanome and regulation of cell function: Structures, functions and challenges // *Front. Biosci.* 2008. Vol. 13. № 11. P. 4309–4338.

285. Ori A., Wilkinson M.C., Fernig D.G. A systems biology approach for the investigation of the heparin/heparan sulfate interactome // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, № 22. – P. 19892–19904.
286. Orishchenko K.E. et al. Effect of human double-stranded DNA preparation on the production of cytokines by dendritic cells and peripheral blood cells from relatively healthy donors Review Article // *Cancer Ther.* – 2013. – Vol. 8, P. 191–205.
287. Otto G.P., Nichols B.J. The roles of flotillin microdomains-endocytosis and beyond // *J. Cell Sci.* 2011. Vol. 124. № 23. P. 3933–3940.
288. Palka-Santini M. et al. The gastrointestinal tract as the portal of entry for foreign macromolecules: fate of DNA and proteins // *Mol. Genet. Genomics* – 2003. – Vol. 270, № 3. – P. 201–215.
289. Paoli P., Giannoni E., Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression // *Biochim Biophys Acta.* – 2013. – Vol. 1833, № 12. – P. 3481–3498.
290. Pasquale V. De, Pavone L.M. Heparan sulfate proteoglycan signaling in tumor microenvironment // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. № 18. P. 1–29.
291. Paszek M.J. et al. The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival // *Nature* – 2014. – Vol. 511, № 7509. – P. 319–325.
292. Patutina O.A. et al. Cyclophosphamide Metabolite Inducing Apoptosis in RLS Mouse Lymphosarcoma Cells Is a Substrate for P-Glycoprotein // *Transl. from Byulleten' Eksp. Biol. i Meditsiny* – 2011. – Vol. 152, № 9. – P. 318–322.
293. Pavlides S. et al. The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma // *Cell Cycle* – 2009. – Vol. 8, № 23. – P. 3984–4001.
294. Peixoto A. et al. Protein glycosylation and tumor microenvironment alterations driving cancer hallmarks // *Front. Oncol.* – 2019. – Vol. 9, P. 380.
295. Penel N., Adenis A., Bocci G. Cyclophosphamide-based metronomic chemotherapy: After 10 years of experience, where do we stand and where are we going? // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2012. – Vol. 82, № 1. – P. 40–50.
296. Peng F. et al. Glycolysis gatekeeper PDK1 reprograms breast cancer stem cells under hypoxia // *Oncogene* – 2018. – Vol. 37, № 8. – P. 1062–1074.
297. Peng S., Bao Y. A narrative review of immune checkpoint mechanisms and current immune checkpoint therapy // *Ann. Blood* – 2022. – Vol. 7, P. 33.
298. Peters D.L., Pretorius P.J. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA — A new paradigm in genetic behaviour // *Clin. Chim. Acta* – 2011. – Vol. 412, № 11–12. – P. 806–811.
299. Peterson C.L. The Ins and Outs of Heterochromatic DNA Repair // *Dev Cell* – 2011. –

Vol. 20, № 3. – P. 285–287.

300. Petrova D.D. et al. The new general biological property of stem-like tumor cells. Part II. Surface molecules, which belong to distinctive groups with particular functions, form a unique pattern characteristic of a certain type of tumor stem-like cells // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 24. – P.15800.

301. Pettitt D. et al. CAR-T Cells: A Systematic Review and Mixed Methods Analysis of the Clinical Trial Landscape // *Mol. Ther.* – 2018. – Vol. 26, № 2. – P. 342–353.

302. Pisetsky D.S. The Origin and Properties of Extracellular DNA: From PAMP to DAMP // *Clin. Immunol.* – 2012. – Vol. 144, № 1. – P. 32.

303. Pommergaard H.C. et al. Aldehyde dehydrogenase expression may be a prognostic biomarker and associated with liver cirrhosis in patients resected for hepatocellular carcinoma // *Surg. Oncol.* – 2022. – Vol. 40, P. 101677.

304. Ponomarev A.S. et al. Molecular Mechanisms of Tumor Cell Stemness Modulation during Formation of Spheroids // *Biochem.* – 2023. – Vol. 88, № 7. – P. 979–994.

305. Potter E.A. et al. A strategy to eradicate well-developed Krebs-2 ascites in mice // *Oncotarget* – 2016. – Vol. 7, № 10. – P. 11580–11594.

306. Potter E.A. 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.

307. PrabhuDas M.R. et al. A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease // *J. Immunol.* – 2017. – Vol. 198, № 10. – P. 3775–3789.

308. Price A.M., Luftig M.A. Dynamic Epstein-Barr Virus Gene Expression on the Path to B-Cell Transformation // *Adv Virus Res.* – 2014. – Vol. 88, P. 279–313.

309. Prideaux S.M., O’Brein E.C., Chevassut T.J. The genetic architecture of multiple myeloma // *Adv. Hematol.* – 2014. – Vol. 2014, P. 864058.

310. Pries A.R., Secomb T.W., Gaehtgens P. The endothelial surface layer // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 2000. Vol. 440. № 5. P. 653–666.

311. Proskurina A.S. et al. Erratum to : Results of multicenter double- blind placebo-controlled phase II clinical trial of Panagen preparation to evaluate its leukostimulatory activity and formation of the adaptive immune response in patients with stage II-IV breast cancer // *BMC Cancer* – 2016. – Vol. 16, P. 117.

312. Proskuryakov S.Y., Konoplyannikov A.G., Gabai V.L. Necrosis : a specific form of programmed cell death ? // *Exp. Cell Res.* – 2003. – Vol. 283, P. 1–16.

313. Puchinskaya M. V. Cancer stem cell markers and their prognostic value // *Arkh. Patol.* –

2016. – Vol. 78, № 2. – P. 47–54.

314. Qiang L. et al. Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines // *Cancer Lett.* – 2009. – Vol. 279, № 1. – P. 13–21.

315. Quintart J. et al. Endocytosis and chloroquine accumulation during the cell cycle of hepatoma cells in culture // *J. Cell Biol.* – 1979. – Vol. 82, № 3. – P. 644–653.

316. Radojcic V. et al. Cyclophosphamide resets dendritic cell homeostasis and enhances antitumor immunity through effects that extend beyond regulatory T cell elimination // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2010. – Vol. 59, № 1. – P. 137–148.

317. Radu P. et al. CD34—Structure, Functions and Relationship with Cancer Stem Cells // *Medicina (B. Aires).* – 2023. – Vol. 59, № 5. – P. 938.

318. Rajakulendran N. et al. Wnt and notch signaling govern self-renewal and differentiation in a subset of human glioblastoma stem cells // *Genes Dev.* – 2019. – Vol. 33, № 9–10. – P. 498–510.

319. Rashed M.H. et al. Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18, № 3. – P. 538.

320. Reitsma S. et al. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization // *Pflugers Arch.* – 2007. – Vol. 454, № 3. – P. 345.

321. Riley J.S. et al. Prognostic and therapeutic relevance of FLIP and procaspase-8 overexpression in non-small cell lung cancer // *Cell Death Dis.* 2013 412 – 2013. – Vol. 4, № 12. – P. e951–e951.

322. Rogachev V.A. et al. Qualitative and quantitative characteristics of the extracellular DNA delivered to the nucleus of a living cell // *Cancer Cell Int.* – 2006. – Vol. 6, P. 23.

323. Rojas E., Lopez M.C., Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: Methodology and applications // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* – 1999. – Vol. 722, № 1–2. – P. 225–254.

324. Rothfuss A., Grompe M. Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway // *Mol. Cell. Biol.* – 2004. – Vol. 24, № 1. – P. 123–134.

325. Rowe M. et al. Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferative disease in the SCID mouse model: implications for the pathogenesis of EBV-positive lymphomas in man // *J. Exp. Med.* – 1991. – Vol. 173, P. 147–158.

326. Ruiz i Altaba A., Sánchez P., Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells // *Nat. Rev. Cancer* 2002 25 – 2002. – Vol. 2, № 5. – P. 361–372.

327. Ruzanova V. et al. Chronometric Administration of Cyclophosphamide and a Double-Stranded DNA-Mix at Interstrand Crosslinks Repair Timing, Called “Karanahan” Therapy, Is Highly Efficient in a Weakly Immunogenic Lewis Carcinoma Model // *Pathol. Oncol. Res.* – 2022. – Vol. 27,

№ 28. – P. 1610180.

328. Ruzanova V.S. et al. Experimental Comparison of the In Vivo Efficacy of Two Novel Anticancer Therapies // *Anticancer Res.* – 2021. – Vol. 41, № 7. – P. 3371–3387.

329. Rycaj K., Tang D.G. Cancer stem cells and radioresistance // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2014. – Vol. 90, № 8. – P. 615–621.

330. Safa A.R. Drug and apoptosis resistance in cancer stem cells: a puzzle with many pieces // *Cancer Drug Resist.* – 2022. – Vol. 5, № 4. – P. 850–872.

331. Sagiv-Barfi I. et al. Eradication of spontaneous malignancy by local immunotherapy // *Sci. Transl. Med.* – 2018. – Vol. 10, № 426. – P. 1–12.

332. Sakamoto Y., Ochiya T., Yoshioka Y. Extracellular vesicles in the breast cancer brain metastasis: physiological functions and clinical applications // *Front. Hum. Neurosci.* – 2023. – Vol. 17, P. 1278501.

333. Salem M.L., El-Naggar S.A., Cole D.J. Cyclophosphamide induces bone marrow to yield higher numbers of precursor dendritic cells in vitro capable of functional antigen presentation to T cells in vivo // *Cell. Immunol.* – 2010. – Vol. 261, № 2. – P. 134–143.

334. Sanai N., Alvarez-Buylla A., Berger M.S. Neural Stem Cells and the Origin of Gliomas // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 353, № 8. – P. 811–822.

335. Sancho P., Barneda D., Heeschen C. Hallmarks of cancer stem cell metabolism // *Br. J. Cancer* – 2016. – Vol. 114, № 12. – P. 1305–1312.

336. Sarrazin S., Lamanna W.C., Esko J.D. Heparan sulfate proteoglycans // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2011. – Vol. 3, № 7. – P. 1–33.

337. Sathyapriya R., Vishveshwara S. Interaction of DNA with clusters of amino acids in proteins // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol. 32, № 14. – P. 4109–4118.

338. Sato T. et al. TRIM32 promotes neural differentiation through retinoic acid receptor-mediated transcription // *J. Cell Sci.* – 2011. – Vol. 124, № 20. – P. 3492–3502.

339. Saukkonen K. et al. Association of cell-free plasma DNA with hospital mortality and organ dysfunction in intensive care unit patients // *Intensive Care Med.* – 2007. – Vol. 33, № 9. – P. 1624–1627.

340. Savill J. et al. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis // *Immunol. Today* – 1993. – Vol. 14, № 3. – P. 131–136.

341. Saxena M., Bhardwaj N. Re-Emergence of Dendritic Cell Vaccines for Cancer Treatment // *Trends in Cancer* – 2018. – Vol. 4, № 2. – P. 119–137.

342. Schaijck B. Van et al. Subcellular localisation of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: a review // *J. Clin. Pathol.* – 2018. – Vol. 71, № 1. – P. 88–91.

343. Scheinberg D.A. et al. Antibody Therapies of Cancer // *Cancer Chemotherapy & Biotherapy: Principles & Practices* / под ред. B. A. Chabner, D. L. Longo, Chabner B.A. : Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 4th Edition. P. 666–699.
344. Schreck K.C. 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.
345. Schubbert R. et al. Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1997. – Vol. 94, № 3. – P. 961–966.
346. Schubbert R., Lettmann C., Doerfler W. Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice // *Mol. Gen. Genet.* – 1994. – Vol. 242, № 5. – P. 495–504.
347. Seymour L.W., Fisher K.D. Oncolytic viruses: Finally delivering // *Br. J. Cancer* – 2016. – Vol. 114, № 4. – P. 357–361.
348. Shaikh M.V., Kala M., Nivsarkar M. CD90 a potential cancer stem cell marker and a therapeutic target // *Cancer Biomarkers* – 2016. – Vol. 16, № 3. – P. 301–307.
349. Sharma P. et al. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy // *Cell* – 2017. – Vol. 168, № 4. – P. 707–723.
350. Sharma S., Fitzgerald K.A. Innate Immune Sensing of DNA // *PLOS Pathog.* – 2011. – Vol. 7, № 4. – P. e1001310.
351. Sharonov G. V., Balatskaya M.N., Tkachuk V.A. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins as regulators of cortical cytoskeleton // *Biochem.* 2016. Vol. 81. № 6. P. 636–650.
352. Shen Y.A. et al. Metabolic reprogramming orchestrates cancer stem cell properties in nasopharyngeal carcinoma // *Cell Cycle* – 2015. – Vol. 14, № 1. – P. 86–98.
353. Sherr C.J., McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer // *Cancer Cell* – 2002. – Vol. 2, № 2. – P. 103–112.
354. Shi F. et al. In situ entry of oligonucleotides into brain cells can occur through a nucleic acid channel // *Oligonucleotides* – 2007. – Vol. 17, № 1. – P. 122–133.
355. Sibbald S.J. et al. Lateral Gene Transfer Mechanisms and Pan-genomes in Eukaryotes // *Trends Parasitol.* – 2020. – Vol. 36, № 11. – P. 927–941.
356. Silva I.U. De et al. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells // *Mol. Cell. Biol.* – 2000. – Vol. 20, № 21. – P. 7980–7990.
357. Simsek C., Esin E., Yalcin S. Metronomic Chemotherapy: A Systematic Review of the

Literature and Clinical Experience // J. Oncol. – 2019. – Vol. 2019, P. 5483791.

358. Singh A., Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer // *Oncogene* – 2010. – Vol. 29, P. 4741–4751.

359. Singh N. et al. Inflammation and cancer // *Ann. Afr. Med.* – 2019. – Vol. 18, № 3. – P. 121–126.

360. Singh P., Carraher C., Schwarzbauer J.E. Assembly of fibronectin extracellular matrix // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2010. Vol. 26. P. 397–419.

361. Singh S. et al. Identification of human brain tumour initiating cells // *Nature* – 2004. – Vol. 432, № 7015. – P. 396–401.

362. Singh S.K. et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63, № 18. – P. 5821–5828.

363. Škovierová H. et al. Molecular regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in tumorigenesis (Review) // *Int. J. Mol. Med.* – 2018. – Vol. 41, № 3. – P. 1187–1200.

364. Sökeland G., Schumacher U. The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade // *Mol. Cancer* – 2019. – Vol. 18, № 1. – P. 12.

365. Song X. 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, № 6. – P. e1281.

366. Soucy S.M., Huang J., Gogarten J.P. Horizontal gene transfer: building the web of life // *Nat. Rev. Genet.* – 2015. – Vol. 16, № 8. – P. 472–482.

367. Stambolic V. et al. Negative Regulation of PKB / Akt-Dependent Cell Survival by the Tumor Suppressor PTEN // 1998. – Vol. 95, P. 29–39.

368. Sternlicht M.D. et al. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis // *Cell* – 1999. – Vol. 98, № 2. – P. 137–146.

369. Stupp R. et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 352, № 10. – P. 987–996.

370. Suen W.C.W. et al. Natural Killer Cell-Based Cancer Immunotherapy: A Review on 10 Years Completed Clinical Trials // *Cancer Invest.* – 2018. – Vol. 36, № 8. – P. 431–457.

371. Sukowati C.H.C. Heterogeneity of hepatic cancer stem cells // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2019. – Vol. 1139, P. 59–81.

372. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors // *Cell* – 2006. – Vol. 126, № 4. – P. 663–676.

373. Takeshita F., Ishii K.J. Intracellular DNA sensors in immunity // *Curr. Opin. Immunol.* – 2008. – Vol. 20, № 4. – P. 383–388.

374. Tanabe S. et al. Interplay of EMT and CSC in Cancer and the Potential Therapeutic Strategies // *Front. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 11, P. 904.
375. Taussig D.C. et al. Anti-CD38 antibody – mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells // 2008. – Vol. 112, № 3. – P. 568–575.
376. Temizoz B., Kuroda E., Ishii K.J. Vaccine adjuvants as potential cancer immunotherapeutics // *Int. Immunol.* – 2016. – Vol. 28, № 7. – P. 329–338.
377. Terada C. et al. Chemistry of Therapeutic Oligonucleotides That Drives Interactions with Biomolecules // *Pharmaceutics* – 2022. – Vol. 14, № 12. – P. 2647.
378. Tonn T. et al. Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92 // *J Hematother Stem Cell Res.* – 2001. – Vol. 10, № 4. – P. 535–544.
379. Torrent M. et al. The «CPC clip motif»: A conserved structural signature for heparin-binding proteins // *PLoS One* – 2012. – Vol. 7, № 8. – P. e42692.
380. Tsubamoto Y. et al. Dextran sulfate, a competitive inhibitor for scavenger receptor, prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits // *Atherosclerosis* – 1994. – Vol. 106, № 1. – P. 43–50.
381. Tsun A. et al. Oncolytic immunotherapy for treatment of cancer // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* : Springer New York LLC, 2016. P. 241–283.
382. Tsung K. et al. Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced T cell-dependent tumor rejection. // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62, № 17. – P. 5069–5075.
383. Uchida N. et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2000. – Vol. 97, № 26. – P. 14720–14725.
384. Uchiyama M. et al. Consensus primers for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell lymphomas // *J. Clin. Pathol.* – 2003. – Vol. 56, P. 778–780.
385. Urano K. et al. Internalization of fractionated 3H-heparin by the scavenger-like receptor in rat liver parenchymal cells in primary culture // *Drug Deliv. J. Deliv. Target. Ther. Agents* – 1997. – Vol. 4, № 3. – P. 181–185.
386. Vachon P.H. Integrin Signaling, Cell Survival, and Anoikis: Distinctions, Differences, and Differentiation // *J. Signal Transduct.* – 2011. – Vol. 2011, P. 1–18.
387. Vermeulen L. et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment // *Nat. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 12, № 5. – P. 468–476.
388. Vitale D. et al. Proteoglycans and glycosaminoglycans as regulators of cancer stem cell function and therapeutic resistance // *FEBS J.* 2019. Vol. 286. № 15. P. 2870–2882.
389. Wang H. et al. DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65, № 10. – P. 4020–4030.

390. Wang J., Sullenger B.A., Rich J.N. Notch signaling in cancer stem cells // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2012. – Vol. 727, P. 174–185.
391. Wang S.S. et al. Links between cancer stem cells and epithelial– mesenchymal transition // *Onco. Targets. Ther.* 2015. Vol. 8. P. 2973–2980.
392. Wang X. et al. Understanding the multifaceted role of neutrophils in cancer and autoimmune diseases // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9, P. 2456.
393. Wanunu M. et al. Rapid electronic detection of probe-specific microRNAs using thin nanopore sensors // *Nat. Nanotechnol.* – 2010. – Vol. 5, P. 807–814.
394. Warabi M., Kitagawa M., Hirokawa K. Loss of MHC class II expression is associated with a decrease of tumor-infiltrating T cells and an increase of metastatic potential of colorectal cancer: immunohistological and histopathological analyses as compared with normal colonic mucosa and adenomas // *Pathol. Res. Pract.* – 2000. – Vol. 196, № 12. – P. 807–815.
395. Warburg O. On the origin of cancer cells // *Science* – 1956. – Vol. 123, № 3191. – P. 309–314.
396. Watts J.K., Corey D.R. Silencing disease genes in the laboratory and the clinic // *J. Pathol.* – 2012. – Vol. 226, № 2. – P. 365–379.
397. Weigel P.H. Systemic Glycosaminoglycan Clearance by HARE/Stabilin-2 Activates Intracellular Signaling // *Cells*. 2020. Vol. 9. № 11. P. 2366.
398. Wu J., Waxman D.J. Metronomic cyclophosphamide schedule-dependence of innate immune cell recruitment and tumor regression in an implanted glioma model // *Cancer Lett.* – 2014. – Vol. 353, № 2. – P. 272–280.
399. Wu S.Y. et al. Natural killer cells in cancer biology and therapy // *Mol. Cancer* – 2020. – Vol. 19, № 1. – P. 1–26.
400. Xia J. et al. Whitefly hijacks a plant detoxification gene that neutralizes plant toxins // *Cell* – 2021. – Vol. 184, № 7. – P. 1693-1705.e17.
401. Xia R. et al. The role of Hedgehog and Notch signaling pathway in cancer // *Mol. Biomed.* – 2022. – Vol. 3, № 1. – P. 44.
402. Xu J. et al. Cancer stem-like cells stay in a plastic state ready for tumor evolution // *Neoplasia* – 2025. – Vol. 61, P. 101134.
403. Xue J. et al. The clinical and prognostic impact of aldehyde dehydrogenase 1 in non-small cell lung cancer: A meta-analysis // *Transl. Cancer Res.* – 2020. – Vol. 9, № 3. – P. 1914–1925.
404. Yakubov L.A. et al. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: Involvement of specific receptors? // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1989. – Vol. 86, № 17. – P. 6454–6458.
405. Yakubov L.A. et al. Natural Human Gene Correction by Small Extracellular Genomic

DNA Fragments // Cell Cycle – 2007. – Vol. 6, № 18. – P. 1–9.

406. Yang J. et al. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2020a. Vol. 21. № 6. P. 341–352.

407. Yang L. et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy // Sig Transduct Target Ther. 2020b. Vol. 5. № 1. P. 8.

408. Yang M.H., Wu K.J. TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): implications in metastasis and development // Cell Cycle – 2008. – Vol. 7, № 14. – P. 2090–2096.

409. Yang Y. et al. Emerging agents that target signaling pathways in cancer stem cells // J. Hematol. Oncol. – 2020c. – Vol. 13, P. 60.

410. Yang Y. et al. Targeting CD24 as a novel immunotherapy for solid cancers // Cell Commun. Signal. – 2023. – Vol. 21, № 1. – P. 1–14.

411. Yasuda T., Ishimoto T., Baba H. Conflicting metabolic alterations in cancer stem cells and regulation by the stromal niche // Regen. Ther. – 2021. – Vol. 17, P. 8–12.

412. Yi M. et al. Exploiting innate immunity for cancer immunotherapy // Mol. Cancer – 2023. – Vol. 22, № 1. – P. 1–55.

413. Yoo Y.D., Kwon Y.T. Molecular mechanisms controlling asymmetric and symmetric self-renewal of cancer stem cells // J. Anal. Sci. Technol. – 2015. – Vol. 6, № 1. – P. 28.

414. Zamecnik P. et al. Electron micrographic studies of transport of oligodeoxynucleotides across eukaryotic cell membranes // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1994. – Vol. 91, № 8. – P. 3156–3160.

415. Zeng Z. et al. Regulation and signaling pathways in cancer stem cells: implications for targeted therapy for cancer // Mol. Cancer – 2023. – Vol. 22, № 1. – P. 1–31.

416. Zhang H. Le et al. c-Myc maintains the self-renewal and chemoresistance properties of colon cancer stem cells // Oncol. Lett. – 2019. – Vol. 17, № 5. – P. 4487–4493.

417. Zhang S. et al. Cancer stem cells : a target for overcoming therapeutic resistance and relapse // Cancer Biol Med – 2024. – Vol. 20, № 12. – P. 985-1020.

418. Zhang W. et al. Microfluidics separation reveals the stem-cell-like deformability of tumor-initiating cells // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2012. – Vol. 109, № 46. – P. 18707–18712.

419. Zhang Y. et al. Plasma membrane changes during programmed cell deaths // Cell Res. – 2018. – Vol. 28, № 1. – P. 9–21.

420. Zhao H. et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention // Signal Transduct. Target. Ther. – 2021. – Vol. 6, № 1. – P. 263.

421. Zhao P. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells regulate stemness of multiple myeloma cell lines via BTK signaling pathway // Leuk. Res. – 2017. – Vol. 57, P. 20–26.

422. Zheng X. et al. Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8. № 29. P. 48436–48452.
423. Zhong L. et al. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives // *Signal Transduct. Target. Ther.* – 2021. – Vol. 6, № 1. – P. 201.
424. Zhu X.D. et al. Caveolae-dependent endocytosis is required for class a macrophage scavenger receptor-mediated apoptosis in macrophages // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, № 10. – P. 8231–8239.
425. Zhu Y., Choi S.H., Shah K. Multifunctional receptor-targeting antibodies for cancer therapy // *Lancet Oncol.* – 2015. – Vol. 16, № 15. – P. e543–e554.
426. Zou L. Single- and double-stranded DNA: Building a trigger of ATR-mediated DNA damage response // *Genes Dev.* – 2007. – Vol. 21, № 8. – P. 879–885.
427. Zurzolo C., Simons K. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: Membrane organization and transport // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2016. Vol. 1858. № 4. P. 632–639.
428. Андреева Е.М. и др. Участие генов MDR1A, MDR1B, P53 и BCL-2 в формировании устойчивости клеток лимфосаркомы RLS мышей к терапевтическому действию циклофосфана // *Новосибирский государственный университет* – 2006. – Vol. 4, № 1. – P. 21–26.
429. Андреева Е.М., Шестопалова Л.В., Попова Н.А. Характеристика ультраструктуры лимфосарком LS и RLS мышей, оппозитных по чувствительности к апоптогенному действию циклофосфана // *Новосибирский государственный университет* – 2006. – Vol. 4, № 1. – P. 14–20.
430. Белоцерковский И.В., Жуковец А.Г., Тризна Н.М. Комплексный подход в лечении злокачественных опухолей головы и шеи. Перспективы использования таргетных препаратов // *Онкологический журнал* – 2011. – Vol. 5, P. 96–99.
431. Бережной А.Е. и др. Молекулярные Механизмы Взаимодействия Опухоли И Иммунной Системы // *Вопросы Онкологии* – 2008. – Vol. 54, № 6. – P. 669–683.
432. Борисов К., Сакаева Д. Современная парадигма лечения распространенного HER2-позитивного рака молочной железы: двойная блокада рецептора HER2 и конъюгаты моноклонального антитела с цитостатическим агентом // *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена* – 2015. – Vol. 4, № 5. – P. 78–86.
433. Волков Н.М. Клеточные методы иммунотерапии // *Практическая Онкология* – 2016. – Vol. 17, № 2. – P. 90–98.
434. Гапонова А.В. и др. Эпителиально-мезенхимальный переход: злокачественная прогрессия и перспективы противоопухолевой терапии // *Acta Naturae* – 2020. – Vol. 12, № 3. – P. 4–23.
435. Графанов Р. и др. Современные возможности терапии ингибиторами контрольных

точек при метастатическом уротелиальном раке // Исследования и практика в медицине – 2018. – Vol. 5, № 1. – P. 74–81.

436. Долгова Е.В. и др. Лейкостимулирующее действие фрагментов экзогенной ДНК, защищенных протамином, при вызванной циклофосфаном миелосупрессии мышей // Вопросы Онкологии – 2009. – Vol. 6, № 55. – P. 761–764.

437. Долгова Е.В. и др. Репарация межцепочечных сшивок молекулы ДНК // Вавиловский журнал генетики и селекции – 2010. – Vol. 14, № 2. – P. 332–356.

438. Долгова Е.В. и др. Оценка эффективности эрадикации стволовых инициирующих раковых клеток на примере первичных культур глиобластомы человека // Вавиловский журнал генетики и селекции – 2018. – Vol. 22, № 7. – P. 825–836.

439. Ерохин В.Е., Кузнецов А.В. Информационная и регуляторная роль растворённого в морской воде органического вещества // Морський екологічний журнал – 2009. – Vol. 2, № 8. – P. 64–79.

440. Ефремов Я.Р. и др. Инь и янь плюрипотентности: результаты анализа генов, демонстрирующих повышенную экспрессию в инициирующих опухолевых клетках асцитной карциномы Кребс-2 // Математическая биология и биоинформатика – 2019a. – Vol. 14, № 1. – P. 160–187.

441. Ефремов Я.Р. и др. Стволовые раковые клетки: «служба спасения» для опухолей в условиях генерализованного клеточного стресса // Математическая биология и биоинформатика – 2019b. – Vol. 14, № 1. – P. 306–326.

442. Имянитов Е.Н. Молекулярные механизмы опухолевого роста // Вопросы Онкологии – 2010. – Vol. 56, № 2. – P. 117–128.

443. Ковалева О.В., Подлесная П.А., Грачев А.Н. Цитотоксическая активность макрофагов и ее роль в патогенезе опухолей // Альманах клинической медицины – 2022. – Vol. 50, № 1. – P. 13–20.

444. Козлов В.А. Свободноклеточная внеклеточная ДНК в норме и при патологии // Медицинская иммунология – 2013. – Vol. 15, № 5. – P. 399–412.

445. Копнин Б.П. Опухолевые супрессоры и мутаторные гены // Канцерогенез - М. : Медицина, 2004. P. 125–156.

446. Кушлинский Н.Е., Немцова М.В. Молекулярные Механизмы Опухолевого Роста // Медицинские новости – 2014. – Vol. 9, P. 29–36.

447. Лихачева А.С. и др. Участие экзогенной ДНК в молекулярных процессах, протекающих в соматической клетке // Вестник ВОГиС – 2008. – Vol. 12, № 3. – P. 426–473.

448. Малышев И.Ю. Матричное репрограммирование иммунных клеток и роль его

нарушения в патогенезе опухолей // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН – 2012. – Vol. 23, № 2. – P. 21–33.

449. Масленникова А., Стрекалова А. Статистический анализ онкологических заболеваний в России // ФГБОУ ВО «Сибирский государственный индустриальный университет» – 2016. – Vol. 4–1, № 11. – P. 62–66.

450. Мерабишвили В.М. Закономерности риска возникновения злокачественных опухолей и анализ эффективности противораковой борьбы на современном этапе // Междисциплинарный научный и прикладной журнал «Биосфера» – 2013. – Vol. 5, № 1. – P. 124–138.

451. Моисеенко В.М. Моноклональные Антитела В Лечении Злокачественных Опухолей // Практическая Онкология – 2003. – Vol. 4, № 3. – P. 148–156.

452. Поттер Е.А. 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 – 2016a. – Vol. 20, № 1. – P. 96–107.

453. Поттер Е.А. 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 – 2016b. – Vol. 20, № 1. – P. 108–124.

454. Поттер Е.А. и др. Режим однократной инъекции препарата двуцепочечной ДНК после каждой инъекции циклофосфана, приводящий к эрадикации первичного асцита Кребс-2 // Вавиловский журнал генетики и селекции – 2016c. – Vol. 20, № 5. – P. 716–722.

455. Поттер Е.А. 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 – 2016d. – Vol. 20, № 5. – P. 723–735.

456. Пучинская М.В. Эпителиально-мезенхимальный переход в норме и патологии // Архив патологии – 2015. – Vol. 1, P. 75–83.

457. Розенфельд И.И. и др. Патолофизиологическое значение теломеразы в онкогенезе // Международный журнал медицины и психологии – 2021. – Vol. 4, № 4. – P. 146–152.

458. Семакова А., Микшис Н. Адьювантные технологии в создании современных вакцин // Проблемы особо опасных инфекций – 2016. – Vol. 2, P. 28–35.

459. Солопова О., Мисюрин В. Биспецифические антитела в клинике и клинических исследованиях (обзор литературы) // Клиническая онкогематология – 2019. – Vol. 12, № 2. – P. 125–144.

460. Тер-Ованесов М. и др. Ниволумаб – ингибитор рецептора программированной смерти-1: роль в лечении злокачественных опухолей // Медицинский алфавит – 2017. – Vol. 16, № 1. – Р. 23–28.
461. Тронов В.А., Крамаренко И.И., Карпухин А.В. Рак толстой кишки: дефицит репарации, нестабильность генома, устойчивость к апоптозу, оценка риска развития заболевания // Вопросы Онкологии – 2005. – Vol. 51, № 2. – Р. 159–166.
462. Фармаковская М.Д. и др. Роль эпителиально-мезенхимального перехода в регуляции свойств раковых стволовых клеток солидных опухолей // Российский биотерапевтический журнал – 2015. – Vol. 4, № 14. – Р. 3–8.
463. Циркин В.И., Сизова Е.Н. Са-каналы, управляемые кальциевым депо (обзор литературы) // Успехи физиологических наук – 2020. – Vol. 51, № 2. – Р. 37–54.
464. Челобанов Б.П., Лактионов П.П., Власов В.В. Белки, участвующие в связывании и поглощении клетками нуклеиновых кислот // Биохимия – 2006. – Vol. 71, № 6. – Р. 725–741.
465. Чехун В.Ф. и др. Гетерогенность Опухоли — Динамичное Состояние // Онкология – 2012. – Vol. 14, № 1. – Р. 4–12.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

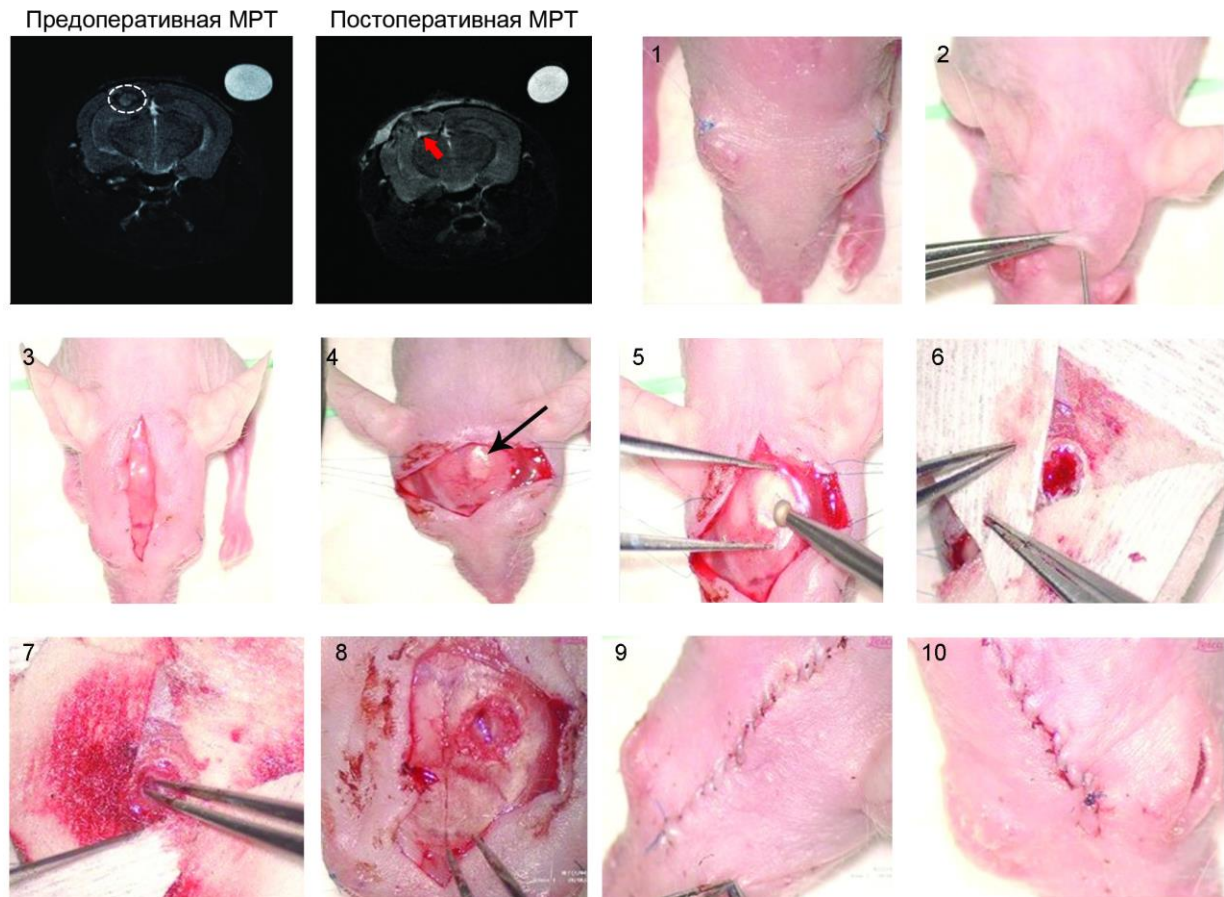


Рис. 1. Последовательность шагов нейрохирургического удаления интрацеребрального ксенотрансплантата глиобластомы человека U87, растущего на мышцах линии SCID. **А)** Предоперационный снимок в режиме T2-ВИ (левая панель). Послеоперационный снимок в режиме T2-ВИ. Визуализируется остаточный объем опухоли (правая панель). **Б)** Последовательность оперативных шагов. **1.** Демонстрация процедуры подкожного введения 1 % раствора новокаина; **2.** Этап блефарорафии. Наложены одиночные узловые швы на веки. Кожа обрабатывалась спиртовым раствором хлоргексидина; **3.** Линейный кожный разрез; **4.** Фиксация скальпа швами держалками, произведен линейный разрез, в левой теменной области визуализируется перевитый графт белого цвета (отмечен стрелкой); **5.** Этап краниотомии. Диаметр головки бура 2 мм; **6.** После осуществления доступа, операционная рана обкладывалась стерильными салфетками, смоченными физиологическим раствором; **7.** Этап удаления опухоли. Кортикотомия проводилась при помощи инсулинового шприца, далее, опухоль фрагментировалась и удалялась при помощи пинцетов или присасывающего действия иглы, в момент оттягивания поршня; **8.** Общий вид операционной раны после удаления опухолевой массы; **9.** Рана ушита непрерывным обвивным швом с использованием викрила 6/0. Швы и кожа в области хирургического вмешательства обработана спиртовым раствором хлоргексидина; **10.** Швы, наложенные на этапе блефарорафии, сняты.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Таблица 1. Список генов карциномы мыши Кребс-2, отобранных в ходе анализа RNAseq TAMRA+ и TAMRA– клеток.

Ген	Номер GenBank	RNAseq (количество нормализованных уникальных ридов)		qPCR	Сетевой анализ регуляции генов (Ingenuity Pathway Analysis. IPA)	
		TAMRA– клетки	TAMRA+ клетки	Отношение уровня экспрессии в TAMRA+ против TAMRA– клеток, Mean	Тип	Локализация в клетке
<i>A3galt2</i>	NM_001009819	0	22		фермент	другое
<i>Abca1</i>	NM_013454	19	350	2.88	транспортер	цитоплазматическая мембрана
<i>Abca13</i>	NM_178259	1	15	3.23	транспортер	внеклеточное пространство
<i>Abca9</i>	NM_147220	2	14	3	транспортер	цитоплазма
<i>Acpp</i>	NM_207668	6	40	2.06	фосфатаза	внеклеточное пространство
<i>Adamts2</i>	NM_175643	0	9	2.4	пептидаза	внеклеточное пространство
<i>Adrb3</i>	NM_013462	2	60	1.6	рецептор, связанный с G-белком	цитоплазматическая мембрана
<i>Alas2</i>	NM_009653	2	20		фермент	цитоплазма
<i>Aldh1a1</i>	NM_013467	0	12	2.75	фермент	цитоплазма
<i>Aldh1l1</i>	NM_027406	10	138	4.07	фермент	цитоплазма
<i>Alox15</i>	NM_009660	2	215		фермент	цитоплазма
<i>Amac1</i>	NM_019871	0	5			

<i>Amy1</i>	NM_001110505	3	52		фермент	внеклеточное пространство
<i>Ankrd22</i>	NM_024204	1	32			
<i>Ap1m2</i>	NM_001110300	0	2		транспортер	цитоплазма
<i>Apoc1</i>	NM_001110009	2	14	1.64	другое	внеклеточное пространство
<i>Arg2</i>	NM_009705	20	234		фермент	цитоплазма
<i>Asb4</i>	NM_023048	0	7	7.35		
<i>Atp6v0d2</i>	NM_175406	5	131		транспортер	цитоплазма
<i>Blnk</i>	NM_008528	2	18		другое	цитоплазма
<i>Bmper</i>	NM_028472	1	8	3.17	другое	внеклеточное пространство
<i>Cacna1d</i>	NM_028981	8	28		ионный канал	цитоплазматическая мембрана
<i>Catsperg2</i>	NM_029714	17	239			
<i>Ccdc8</i>	NM_001101535	0	9			
<i>Ccr3</i>	NM_009914	0	3		рецептор, связанный с G-белком	цитоплазматическая мембрана
<i>Cd200</i>	NM_010818	0	9		другое	цитоплазматическая мембрана
<i>Cd55</i>	NM_010016	4	14		другое	цитоплазматическая мембрана
<i>Cd5l</i>	NM_009690	3	364	2.18	трансмембранный рецептор	цитоплазматическая мембрана
<i>Chrm1</i>	NM_007698	2	10	1.73	рецептор, связанный с G-белком	цитоплазматическая мембрана
<i>Cldn1</i>	NM_016674	3	181	2.55	другое	цитоплазматическая мембрана
<i>Clec11a</i>	NM_009131	1	4		фактор роста	внеклеточное пространство

<i>Cobl</i>	NM_172496	3	29	3.24		
<i>Col3a1</i>	NM_009930	13	143	1.6	другое	внеклеточное пространство
<i>Col6a2</i>	NM_146007	8	33	2.1	другое	внеклеточное пространство
<i>Comp</i>	NM_016685	1	38	2.09	другое	внеклеточное пространство
<i>Cp</i>	NM_007752	0	15	3.48	фермент	внеклеточное пространство
<i>Cplx1</i>	NM_007756	1	11		транспортер	цитоплазматическая мембрана
<i>Crabp2</i>	NM_007759	6	39		транспортер	цитоплазма
<i>Cyp26a1</i>	NM_007811	1	11	4.95	фермент	цитоплазма
<i>Cyp2d26</i>	NM_029562	0	11	5.33	фермент	цитоплазма
<i>Cyp7a1</i>	NM_007824	0	3	2.85	фермент	цитоплазма
<i>Ddx3y</i>	NM_012008	0	175		фермент	другое
<i>Dnaja4</i>	NM_021422	1	8	2.88	другое	ядро
<i>Dock10</i>	NM_175291	0	10	1.83		
<i>Dsc2</i>	NM_013505	0	6	2.71	другое	цитоплазматическая мембрана
<i>Dusp13</i>	NM_013849	0	7			
<i>Dusp23</i>	NM_026725	3	8	2.45	фосфатаза	цитоплазма
<i>Eef1a2</i>	NM_007906	1	3	1.81	регулятор транскрипции	цитоплазма
<i>Eif2s3y</i>	NM_012011	0	68	1.11	другое	другое
<i>Fam107a</i>	NM_183187	5	13		другое	ядро
<i>Fblim1</i>	NM_001163256	5	150	1.3	другое	цитоплазматическая мембрана
<i>Fcna</i>	NM_007995	0	116	2.79	другое	внеклеточное пространство

<i>Fgfr1</i>	NM_010206	6	145		киназа	цитоплазматическая мембрана
<i>Fmnl2</i>	NM_172409	26	406		другое	cytoplasm
<i>Gas6</i>	NM_019521	3	21	2.61	фактор роста	внеклеточное пространство
<i>Gata6</i>	NM_010258	0	11	2.87	регулятор транскрипции	ядро
<i>Gdf6</i>	NM_013526	0	3		фактор роста	внеклеточное пространство
<i>Ggt7</i>	NM_144786	1	21		фермент	цитоплазматическая мембрана
<i>Gng11</i>	NM_025331	1	18		фермент	цитоплазматическая мембрана
<i>Gpha2</i>	NM_130453	3	107	1.92	другое	внеклеточное пространство
<i>Gpr128</i>	NM_172825	0	15			
<i>Gpr97</i>	NM_173036	5	90			
<i>Grb10</i>	NM_010345	2	17	2.56	другое	цитоплазма
<i>Gstm3</i>	NM_010359	1	4	2.98	фермент	цитоплазма
<i>Gtf2a1l</i>	NM_023630	0	12	1.54		
<i>Gtpbp10</i>	NM_153116	6	28			
<i>Hepacam</i>	NM_175189	0	6	1.71		
<i>Hpn</i>	NM_001276269	1	12		пептидаза	цитоплазматическая мембрана
<i>Ifi2712b</i>	NM_145449	0	6	1.48	другое	другое
<i>Igf1</i>	NM_010512	0	10	8.05	фактор роста	внеклеточное пространство
<i>Igf2</i>	NM_010514	0	21	5.41	фактор роста	внеклеточное пространство
<i>Iglon5</i>	NM_001164518	0	5			

<i>Igsf3</i>	NM_207205	0	5	1.86		
<i>Il10</i>	NM_010548	0	5		цитокин	внеклеточное пространство
<i>Il17rb</i>	NM_019583	0	2			
<i>Inca1</i>	NM_001252484	7	79	2.71	другое	ядро
<i>Inhbe</i>	NM_008382	4	20		фактор роста	внеклеточное пространство
<i>Itga9</i>	NM_133721	2	24	2.22	другое	цитоплазматическая мембрана
<i>Itln1</i>	NM_010584	0	19	2.36	другое	цитоплазматическая мембрана
<i>Itm2a</i>	NM_008409	0	6		другое	цитоплазматическая мембрана
<i>Jsrp1</i>	NM_028001	1	5		другое	цитоплазма
<i>Kcnq2</i>	NM_010611	0	3		ионный канал	цитоплазматическая мембрана
<i>Lass4/Cers4</i>	NM_026058	0	6		регулятор транскрипции	цитоплазма
<i>Lhx4</i>	NM_010712	0	15	1.51	регулятор транскрипции	ядро
<i>Lpcat2b</i>	NM_027599	0	11			
<i>Ltbp1</i>	NM_019919	1	13	3.64	другое	внеклеточное пространство
<i>Lyve1</i>	NM_053247	0	23	1.92	трансмембранный рецептор	цитоплазматическая мембрана
<i>Maged2</i>	NM_030700	0	2		трансмембранный рецептор	цитоплазматическая мембрана
<i>Marco</i>	NM_010766	3	35		трансмембранный рецептор	цитоплазматическая мембрана
<i>Mmp2</i>	NM_008610	0	9	2.68	пептидаза	внеклеточное пространство

<i>Mreg</i>	NM_001005423	10	287	1.35	другое	цитоплазма
<i>Mst1</i>	NM_008243	1	23		фактор роста	внеклеточное пространство
<i>Myobpap</i>	NM_170671	0	19			
<i>Myo1b</i>	NM_001161817	0	8	2.84	другое	цитоплазма
<i>Nfatc2</i>	NM_010899	18	267	4.45	регулятор транскрипции	ядро
<i>Nppa</i>	NM_008725	0	10		другое	внеклеточное пространство
<i>Nrcam</i>	NM_176930	13	61	2.63	другое	цитоплазматическая мембрана
<i>Nt5e</i>	NM_011851	3	117	1.84	фосфатаза	цитоплазматическая мембрана
<i>Nts</i>	NM_024435	0	10		другое	внеклеточное пространство
<i>Oit3</i>	NM_010959	1	32	3.24		
<i>Pde4d</i>	NM_011056	6	131	2.26	фермент	цитоплазма
<i>Pde7b</i>	NM_013875	7	74	3.25	фермент	цитоплазма
<i>Pdk4</i>	NM_013743	123	556	1.98	киназа	цитоплазма
<i>Pdlim3</i>	NM_016798	0	4		другое	цитоплазматическая мембрана
<i>Pdlim4</i>	NM_019417	3	22	2.01	другое	цитоплазматическая мембрана
<i>Pdzd3</i>	NM_133226	0	24	3.23		
<i>Per2</i>	NM_011066	40	334	1.55	регулятор транскрипции	ядро
<i>Perp</i>	NM_022032	0	2		другое	цитоплазматическая мембрана
<i>Pf4</i>	NM_019932	11	409	1.72	цитокин	внеклеточное пространство

<i>Pik3ip1</i>	NM_178149	15	116	6.99	другое	цитоплазма
<i>Pon1</i>	NM_011134	0	3		фосфатаза	внеклеточное пространство
<i>Ppap2b</i>	NM_080555	3	23	4.07	фосфатаза	цитоплазматическая мембрана
<i>Ppfia4</i>	NM_001144855	11	96			
<i>Prg4</i>	NM_021400	69	550	1.94	другое	внеклеточное пространство
<i>Prok2</i>	NM_015768	2	91		другое	внеклеточное пространство
<i>Psd2</i>	NM_028707	2	11		другое	цитоплазматическая мембрана
<i>Pvrl1</i>	NM_021424	5	16	1.82	другое	цитоплазматическая мембрана
<i>Pydc4</i>	NM_001177350	0	5			
<i>Pyroxd2</i>	NM_029011	7	137			
<i>Rab15</i>	NM_134050	0	99			
<i>Rab37</i>	NM_021411	3	78	2.19	фермент	цитоплазма
<i>Rasgrp3</i>	NM_001166493	1	6	3.2	другое	цитоплазма
<i>Rbp7</i>	NM_022020	0	12	5.52	другое	цитоплазма
<i>Riiad1</i>	NM_025506	1	15			
<i>Rragd</i>	NM_027491	4	70	3.28	фермент	цитоплазма
<i>Rrh</i>	NM_009102	0	20	7.04		
<i>S100a14</i>	NM_025393	2	12	1.87		
<i>Sash1</i>	NM_175155	33	104	2.23	другое	внеклеточное пространство
<i>Sec14l4</i>	NM_146013	0	5			
<i>Sec31b</i>	NM_001033343	1	13			
<i>Sel1l3</i>	NM_172710	0	3			

<i>Selp</i>	NM_011347	7	173	3	трансмембранный рецептор	цитоплазматическая мембрана
<i>Serpinb1a</i>	NM_025429	2	53		другое	цитоплазма
<i>Serpinb2</i>	NM_001174170	12	204		другое	внеклеточное пространство
<i>Slc2a4</i>	NM_009204	0	5	2.23	транспортер	цитоплазматическая мембрана
<i>Slc40a1</i>	NM_016917	12	174		транспортер	цитоплазматическая мембрана
<i>Slc43a3</i>	NM_021398	5	89	2.22		
<i>Slc44a3</i>	NM_145394	4	49			
<i>Slco4a1</i>	NM_148933	0	28		транспортер	цитоплазматическая мембрана
<i>Sox9</i>	NM_011448			2.08	регулятор транскрипции	
<i>Srms</i>	NM_011481	1	19		киназа	цитоплазма
<i>Srpk3</i>	NM_019684	0	9	1.79	киназа	цитоплазма
<i>Tal1</i>	NM_011527	0	9	2.45	регулятор транскрипции	ядро
<i>Tbata</i>	NM_001017419	1	37	2.74	другое	цитоплазма
<i>Tcf7l2</i>	NM_001142922	12	45	3.62	регулятор транскрипции	ядро
<i>Tdo2</i>	NM_019911	0	10		фермент	цитоплазма
<i>Thpo</i>	NM_001173505	0	16	2.49	цитокин	внеклеточное пространство
<i>Timp3</i>	NM_011595	5	24		другое	внеклеточное пространство
<i>Tmem59l</i>	NM_182991	0	9			
<i>Tmem82</i>	NM_145987	375	571			

<i>Tnfrsf13c</i>	NM_028075	1	26	2.43	трансмембранный рецептор	цитоплазматическая мембрана
<i>Tnn</i>	NM_177839	1	16		другое	цитоплазматическая мембрана
<i>Tnxb</i>	NM_031176	4	28	1.91	другое	внеклеточное пространство
<i>Trim40</i>	NM_001033235	0	2	2.61	другое	цитоплазматическая мембрана
<i>Trpv4</i>	NM_022017	5	34	7.26	ионный канал	цитоплазматическая мембрана
<i>Ttll2</i>	NM_001098267	0	23	1.42		
<i>Tubb1</i>	NM_001080971	0	6	1.3	другое	цитоплазма
<i>Upk1b</i>	NM_178924	0	27	2.94	другое	цитоплазматическая мембрана
<i>Upk3b</i>	NM_175309	0	8		другое	цитоплазматическая мембрана
<i>Uty</i>	NM_009484	0	17	5.34	другое	ядро
<i>Vpreb3</i>	NM_009514	0	15	1.75	другое	цитоплазма
<i>Vsig4</i>	NM_177789	0	13	3.57	другое	цитоплазматическая мембрана
<i>Vsig8</i>	NM_177723	0	16		другое	другое
<i>Wnk2</i>	NM_001290311	0	21	1.89		
<i>Wnt5a</i>	NM_001256224	0	11	3.39	цитокин	внеклеточное пространство
<i>Xlr3a</i>	NM_001110784	0	8		другое	другое
<i>Zfp39</i>	NM_011758	1	10	2.54		
<i>Zfr2</i>	NM_001034895	2	41	2.34		

Таблица 2. Сравнение генов с повышенной экспрессией в ОСК (TAMRA+) карциномы мыши Кребс-2 с генами, которые сверхэкспрессируются в ОСК по литературным данным. Совпадающие гены выделены зеленым цветом.

Опухолевые стволовые клетки					ЭМП	
Настоящее исследование	(Ho et al., 2012)	(Vathipadietal et al., 2012)	(Birnie et al., 2008)	(Rainusso et al., 2011)	(Venkov et al., 2011)	(Gröger et al., 2012)
<i>A3galt2</i>	<i>A1BG</i>	<i>ACN9</i>	<i>ABI1</i>	<i>ADK</i>	<i>0610031JC</i>	<i>ABCA1</i>
<i>Abca1</i>	<i>ABCC5</i>	<i>ACRC</i>	<i>BTG1</i>	<i>AGPS</i>	<i>2610005L07Rik</i>	<i>ADAM12</i>
<i>Abca13</i>	<i>ADAMTS1</i>	<i>ACVR2A</i>	<i>C17orf27</i>	<i>AIF1</i>	<i>Abi1</i>	<i>C5orf13</i>
<i>Abca9</i>	<i>AMBP</i>	<i>ADAM19</i>	<i>CFLAR</i>	<i>ATP6V0D2</i>	<i>Acta2</i>	<i>CDH11</i>
<i>Acpp</i>	<i>ANKS1A</i>	<i>ADCK2</i>	<i>COL5A1</i>	<i>BASP1</i>	<i>Actr2</i>	<i>CDH2</i>
<i>Adamts2</i>	<i>APOC1</i>	<i>AGGF1</i>	<i>CSF2</i>	<i>BRWD2</i>	<i>Adam8</i>	<i>CDK14</i>
<i>Adrb3</i>	<i>APOE</i>	<i>AKAP13</i>	<i>CtBP</i>	<i>C10ORF57</i>	<i>Adamts1</i>	<i>CDKN2C</i>
<i>Alas2</i>	<i>BIRC3</i>	<i>ALG14</i>	<i>IFNGR</i>	<i>C14ORF126</i>	<i>Adamts5</i>	<i>COL1A1</i>
<i>Aldh1a1</i>	<i>BMPER</i>	<i>AMPD3</i>	<i>IFNGR1</i>	<i>C14ORF48</i>	<i>Adamtsl4</i>	<i>COL3A1</i>
<i>Aldh1l1</i>	<i>BTNL9</i>	<i>ANKRD12</i>	<i>IFNK</i>	<i>CAMK2B</i>	<i>Aebp1</i>	<i>COL5A1</i>
<i>Alox15</i>	<i>C4BPB</i>	<i>ARHGAP17</i>	<i>IL6</i>	<i>CARD11</i>	<i>Ak1</i>	<i>COL6A1</i>
<i>Amac1</i>	<i>COL4A1</i>	<i>ARHGAP23</i>	<i>ITGAV</i>	<i>CD300C</i>	<i>Anapc4</i>	<i>COL6A3</i>
<i>Amy1</i>	<i>CRY61</i>	<i>ARHGAP27</i>	<i>LAMA1</i>	<i>CDC42</i>	<i>Angptl2</i>	<i>CTGF</i>
<i>Ankrd22</i>	<i>CSRNP1</i>	<i>ARID5B</i>	<i>LAMC1</i>	<i>CEP70</i>	<i>Ankib1</i>	<i>CYP1B1</i>
<i>Ap1m2</i>	<i>CTGF</i>	<i>ARL1</i>	<i>NFKB1</i>	<i>CMTM4</i>	<i>Anln</i>	<i>DCN</i>
<i>Apoc1</i>	<i>CXCL2</i>	<i>ARL13B</i>	<i>PAPPA</i>	<i>COPS6</i>	<i>Antxr2</i>	<i>DLC1</i>
<i>Arg2</i>	<i>CXCR4</i>	<i>ARL5B</i>	<i>PPA2</i>	<i>CORO1A</i>	<i>Anxa1</i>	<i>EML1</i>
<i>Asb4</i>	<i>DUSP10</i>	<i>ASB1</i>	<i>RASEF</i>	<i>COX6A1</i>	<i>Anxa8</i>	<i>EMP3</i>
<i>Atp6v0d2</i>	<i>EDN1</i>	<i>ASCC3</i>	<i>S100A3</i>	<i>CUL4A</i>	<i>Aqp1</i>	<i>FBLN1</i>
<i>Blnk</i>	<i>ESM1</i>	<i>ASPHD1</i>	<i>SMU1</i>	<i>CXCL14</i>	<i>Aqp5</i>	<i>FBLN5</i>
<i>Bmper</i>	<i>FGL1</i>	<i>ASXL2</i>	<i>STAT1</i>	<i>DDX3X</i>	<i>Areg</i>	<i>FBN1</i>
<i>Cacna1d</i>	<i>FMNL3</i>	<i>ATF7</i>	<i>TJP2</i>	<i>DNAJA5</i>	<i>Atf1</i>	<i>FGF2</i>
<i>Catsperg2</i>	<i>FOSL1</i>	<i>ATRX</i>	<i>WNT5A</i>	<i>DNM3A</i>	<i>Atf2</i>	<i>FGFR1</i>
<i>Ccdc8</i>	<i>GSTA1</i>	<i>AXUD1</i>		<i>FAM20C</i>	<i>Atf5</i>	<i>FN1</i>
<i>Ccr3</i>	<i>H19</i>	<i>B3GALT6</i>		<i>FEZF2</i>	<i>B230120H23F</i>	<i>FSTL1</i>
<i>Cd200</i>	<i>HIGD1B</i>	<i>BACH1</i>		<i>FLJ22222</i>	<i>Bcar1</i>	<i>GALNT10</i>
<i>Cd55</i>	<i>HRG</i>	<i>BAMBI</i>		<i>FUT6</i>	<i>Bclaf1</i>	<i>HAS2</i>
<i>Cd5l</i>	<i>IER3</i>	<i>BCHE</i>		<i>FYB</i>	<i>Bdnf</i>	<i>IGFBP3</i>
<i>Chrm1</i>	<i>IGFBP5</i>	<i>BCL2L11</i>		<i>G3BP2</i>	<i>Bhlhb2</i>	<i>IL1R1</i>
<i>Cldn1</i>	<i>IL-6</i>	<i>BCL6</i>		<i>GART</i>	<i>Bhlhe40</i>	<i>LOX</i>
<i>Clec11a</i>	<i>ITAG6</i>	<i>BGLAP</i>		<i>GNAS</i>	<i>Bub1</i>	<i>LTBP1</i>
<i>Cobl</i>	<i>ITIH1</i>	<i>BNC1</i>		<i>HIBCH</i>	<i>Bysl</i>	<i>LTBP2</i>
<i>Col3a1</i>	<i>LAMB1</i>	<i>BRCC3</i>		<i>HIGD1A</i>	<i>Bzbp</i>	<i>LUM</i>
<i>Col6a2</i>	<i>MAST4</i>	<i>BRI3BP</i>		<i>HRC</i>	<i>C1r</i>	<i>MAP1B</i>
<i>Comp</i>	<i>MGP</i>	<i>BTF3L4</i>		<i>IGF1</i>	<i>C1s</i>	<i>MME</i>
<i>Cp</i>	<i>MT1B</i>	<i>C10orf35</i>		<i>IHH</i>	<i>C3</i>	<i>MMP2</i>

<i>Cplx1</i>	<i>PLK2</i>	<i>C14orf118</i>		<i>IMMP1L</i>	<i>Camk2d</i>	<i>MYL9</i>
<i>Crabp2</i>	<i>PLVAP</i>	<i>C14orf147</i>		<i>ITSN1</i>	<i>CBF-A</i>	<i>NID2</i>
<i>Cyp26a1</i>	<i>PTGR1</i>	<i>C16orf72</i>		<i>JMJD3</i>	<i>Ccl2</i>	<i>NR2F1</i>
<i>Cyp2d26</i>	<i>PTGS1</i>	<i>C18orf37</i>		<i>LARP4</i>	<i>Ccl5</i>	<i>NRP1</i>
<i>Cyp7a1</i>	<i>RAP2A</i>	<i>C1orf25</i>		<i>LOC201175</i>	<i>Ccl7</i>	<i>PLAT</i>
<i>Ddx3y</i>	<i>RBP1</i>	<i>C1orf43</i>		<i>LOC401397</i>	<i>Ccnb2</i>	<i>PMP22</i>
<i>Dnaja4</i>	<i>RBP7</i>	<i>C1orf63</i>		<i>LOC650465</i>	<i>Ccnd1</i>	<i>PPAP2B</i>
<i>Dock10</i>	<i>RCAN1</i>	<i>C1QTNF5</i>		<i>LOC652147</i>	<i>Ccne2</i>	<i>PRKCA</i>
<i>Dsc2</i>	<i>RND1</i>	<i>C21orf66</i>		<i>LOC729852</i>	<i>Ccng1</i>	<i>PTGER2</i>
<i>Dusp13</i>	<i>RPL23AP32</i>	<i>C3orf59</i>		<i>MBNL2</i>	<i>CCng2</i>	<i>PTX3</i>
<i>Dusp23</i>	<i>SIPA1L2</i>	<i>C6orf141</i>		<i>MCM8</i>	<i>Cd14</i>	<i>RECK</i>
<i>Eef1a2</i>	<i>TCEAL2</i>	<i>C6orf153</i>		<i>MED23</i>	<i>Cd164</i>	<i>RGS4</i>
<i>Eif2s3y</i>	<i>TFF3</i>	<i>C6orf203</i>		<i>MMP14</i>	<i>Cd34</i>	<i>SERPINE1</i>
<i>107a</i>	<i>TIMP1</i>	<i>C6orf89</i>		<i>MRP119</i>	<i>Cd44</i>	<i>SERPINE2</i>
<i>Fblim1</i>	<i>TP53INP1</i>	<i>C9orf105</i>		<i>MTRF1</i>	<i>Cda</i>	<i>SLC22A4</i>
<i>Fcna</i>	<i>TRIB1</i>	<i>C9orf72</i>		<i>NFIX</i>	<i>Cdc42ep</i>	<i>SPOCK1</i>
<i>Fgfr1</i>	<i>TSPAN13</i>	<i>CA12</i>		<i>NFYB</i>	<i>Cdh16</i>	<i>SRGN</i>
<i>Fmnl2</i>	<i>TSPAN15</i>	<i>CALM3</i>		<i>NIPBL</i>	<i>Cdipt</i>	<i>SULF1</i>
<i>Gas6</i>	<i>VCAM1</i>	<i>CAP2</i>		<i>NUDT21</i>	<i>Cdk8</i>	<i>SYNE1</i>
<i>Gata6</i>	<i>ZNF783</i>	<i>CBR1</i>		<i>NUP160</i>	<i>Cdkn1a</i>	<i>SYT11</i>
<i>Gdf6</i>		<i>CBX4</i>		<i>NUPL1</i>	<i>Cdkn2b</i>	<i>TAGLN</i>
<i>Ggt7</i>		<i>CCDC131</i>		<i>OR10A3</i>	<i>Cebpd</i>	<i>TFPI</i>
<i>Gng11</i>		<i>CCM2</i>		<i>PDHA1</i>	<i>Cebpz</i>	<i>TGM2</i>
<i>Gpha2</i>		<i>CCNYL1</i>		<i>PNKD</i>	<i>Cfl2</i>	<i>TMEM158</i>
<i>Gpr128</i>		<i>CD44</i>		<i>PNO1</i>	<i>Chrnbl</i>	<i>TNFAIP6</i>
<i>Gpr97</i>		<i>CD83</i>		<i>PRG2</i>	<i>Cited2</i>	<i>TPM1</i>
<i>Grb10</i>		<i>CDC42EP3</i>		<i>PRKCB1</i>	<i>Cmkor1</i>	<i>TUBA1A</i>
<i>Gstm3</i>		<i>CDC42EP3</i>		<i>QKI</i>	<i>Cnbp1</i>	<i>VCAN</i>
<i>Gtf2a1l</i>		<i>CDK5</i>		<i>RAB11B</i>	<i>Col18a1</i>	<i>VIM</i>
<i>Gtpbp10</i>		<i>CDKN2AIP</i>		<i>RBM17</i>	<i>Col4a1</i>	<i>WNT5A</i>
<i>Hepacam</i>		<i>CEP76</i>		<i>RECQL</i>	<i>Col4a2</i>	<i>ZEB1</i>
<i>Hpn</i>		<i>CHD1</i>		<i>RNF5</i>	<i>Col4a5</i>	
<i>Ifi27l2b</i>		<i>CHMP4C</i>		<i>RPL37A</i>	<i>Col5a1</i>	
<i>Igf1</i>		<i>CIDEA</i>		<i>RTN4IP1</i>	<i>Col5a2</i>	
<i>Igf2</i>		<i>CLDN1</i>		<i>SET</i>	<i>Col6a1</i>	
<i>Iglon5</i>		<i>COBLL1</i>		<i>SF3B1</i>	<i>Col6a2</i>	
<i>Igsf3</i>		<i>COMMD6</i>		<i>SMC5</i>	<i>Crim1</i>	
<i>Il10</i>		<i>COX18</i>		<i>SNRPN</i>	<i>Crlf1</i>	
<i>Il17rb</i>		<i>CPD</i>		<i>SPI1</i>	<i>Csde1</i>	
<i>Inca1</i>		<i>CPEB2</i>		<i>SRPK2</i>	<i>Cspg6</i>	
<i>Inhbe</i>		<i>CRISPLD1</i>		<i>SRRM2</i>	<i>Cst3</i>	
<i>Itga9</i>		<i>CRISPLD2</i>		<i>STXBP5</i>	<i>Ctbp2</i>	
<i>Itln1</i>		<i>CROT</i>		<i>TEX9</i>	<i>Ctsf</i>	

<i>Itm2a</i>		<i>CRTAP</i>		<i>TFDP1</i>	<i>Ctsw</i>	
<i>Jsrp1</i>		<i>CSNK1A1</i>		<i>THBS4</i>	<i>Cuedc2</i>	
<i>Kcnq2</i>		<i>CSRP2</i>		<i>THOC7</i>	<i>Cul1</i>	
<i>Lass4/Cers4</i>		<i>CSTA</i>		<i>THRA</i>	<i>Cxcl1</i>	
<i>Lhx4</i>		<i>CTNNAL1</i>		<i>TIA1</i>	<i>Cxcl10</i>	
<i>Lpcat2b</i>		<i>CXCL1</i>		<i>TIMM17A</i>	<i>Cxcl11</i>	
<i>Ltbp1</i>		<i>CXCL2</i>		<i>TMIE</i>	<i>Cyp51</i>	
<i>Lyve1</i>		<i>CXCL3</i>		<i>TNPO1</i>	<i>D6Wsu176</i>	
<i>Maged2</i>		<i>CXorf15</i>		<i>TRIM3</i>	<i>Dbf4</i>	
<i>Marco</i>		<i>CXorf15</i>		<i>UCP2</i>	<i>Ddx54</i>	
<i>Mmp2</i>		<i>CYLD</i>		<i>USP2</i>	<i>Dhcr24</i>	
<i>Mreg</i>		<i>DAB2</i>		<i>USP45</i>	<i>Dhcr7</i>	
<i>Mst1</i>		<i>DAGLB</i>		<i>VPS45</i>	<i>Dkk3</i>	
<i>Mycbpap</i>		<i>DCLK1</i>		<i>WDR32</i>	<i>Dnajb6</i>	
<i>Myo1b</i>		<i>DCP2</i>		<i>WDTC1</i>	<i>Dpp7</i>	
<i>Nfatc2</i>		<i>DDEF2</i>		<i>WFDC9</i>	<i>Dr1</i>	
<i>Nppa</i>		<i>DENR</i>		<i>WNK1</i>	<i>Dstn</i>	
<i>Nrcam</i>		<i>DHX32</i>		<i>ZDHHHC20</i>	<i>Dusp1</i>	
<i>Nt5e</i>		<i>DLG3</i>		<i>ZFAND5</i>	<i>Egr2</i>	
<i>Nts</i>		<i>DNAJB9</i>			<i>Elk3</i>	
<i>Oit3</i>		<i>DNM3</i>			<i>Epb4.1l2</i>	
<i>Pde4d</i>		<i>DOK1</i>			<i>Ephx1</i>	
<i>Pde7b</i>		<i>DRAM</i>			<i>Eps15</i>	
<i>Pdk4</i>		<i>DSE</i>			<i>Errfi1</i>	
<i>Pdlim3</i>		<i>E2F3</i>			<i>Ets</i>	
<i>Pdlim4</i>		<i>EDG3</i>			<i>Ets1</i>	
<i>Pdzd3</i>		<i>EEA1</i>			<i>Ets2</i>	
<i>Per2</i>		<i>EFEMP1</i>			<i>Etv4</i>	
<i>Perp</i>		<i>EFNB2</i>			<i>Ext1</i>	
<i>Pf4</i>		<i>EGFR</i>			<i>Ezh2</i>	
<i>Pik3ip1</i>		<i>EGFR</i>			<i>F2r</i>	
<i>Pon1</i>		<i>EIF5B</i>			<i>F2rl1</i>	
<i>Ppap2b</i>		<i>ELAVL2</i>			<i>Fbln2</i>	
<i>Ppfia4</i>		<i>ELF4</i>			<i>Fdft1</i>	
<i>Prq4</i>		<i>EPAS1</i>			<i>Fert2</i>	
<i>Prok2</i>		<i>EPHB2</i>			<i>Fgfr1</i>	
<i>Psd2</i>		<i>EPHB2</i>			<i>Fkbp8</i>	
<i>Pvr1l</i>		<i>EPHB4</i>			<i>Fkbp9</i>	
<i>Pydc4</i>		<i>EPM2AIP1</i>			<i>Flnb</i>	
<i>Pyroxd2</i>		<i>EPSTI1</i>			<i>Fn1</i>	
<i>Rab15</i>		<i>FAM110B</i>			<i>Fosl1</i>	
<i>Rab37</i>		<i>FAM110C</i>			<i>Foxc2</i>	
<i>Rasgrp3</i>		<i>FAM53A</i>			<i>Foxd1</i>	

<i>Rbp7</i>		<i>FAM83D</i>			<i>Foxn2</i>	
<i>Riid1</i>		<i>FANCF</i>			<i>Frmd6</i>	
<i>Rragd</i>		<i>FAS</i>			<i>FSP1</i>	
<i>Rrh</i>		<i>FEM1C</i>			<i>Fstl1</i>	
<i>S100a14</i>		<i>FIGN</i>			<i>Fut8</i>	
<i>Sash1</i>		<i>FKBP11</i>			<i>Fxyd5</i>	
<i>Sec14l4</i>		<i>FLJ10038</i>			<i>Fzd2</i>	
<i>Sec31b</i>		<i>FLJ36874</i>			<i>Gabpa</i>	
<i>Sel1l3</i>		<i>FLJ38984</i>			<i>Gadd45a</i>	
<i>Selp</i>		<i>FLNA</i>			<i>Galnt1</i>	
<i>Serpinb1a</i>		<i>FNBP1</i>			<i>Gas6</i>	
<i>Serpinb2</i>		<i>FNIP1</i>			<i>Gatad1</i>	
<i>Slc2a4</i>		<i>FOXN3</i>			<i>Gba</i>	
<i>Slc40a1</i>		<i>FOXO3</i>			<i>Gdf15</i>	
<i>Slc43a3</i>		<i>FPGT</i>			<i>Ghr</i>	
<i>Slc44a3</i>		<i>FZD5</i>			<i>Gkap1</i>	
<i>Slco4a1</i>		<i>FZD7</i>			<i>Gnl3</i>	
<i>Sox9</i>		<i>FZD8</i>			<i>Gppbp1</i>	
<i>Srms</i>		<i>FZD8</i>			<i>Gpc1</i>	
<i>Srpk3</i>		<i>GALNT12</i>			<i>Gpr177</i>	
<i>Tal1</i>		<i>GCH1</i>			<i>Grb10</i>	
<i>Tbata</i>		<i>GEM</i>			<i>Grb14</i>	
<i>Tcf7l2</i>		<i>GEMIN6</i>			<i>Grb7</i>	
<i>Tdo2</i>		<i>GFPT2</i>			<i>Grina</i>	
<i>Thpo</i>		<i>GGCX</i>			<i>Grn</i>	
<i>Timp3</i>		<i>GKAP1</i>			<i>Gsn</i>	
<i>Tmem59l</i>		<i>GNAI2</i>			<i>Gspt1</i>	
<i>Tmem82</i>		<i>GOLGA2</i>			<i>Gusb</i>	
<i>Tnfrsf13c</i>		<i>GPR177</i>			<i>Hbegf</i>	
<i>Tnn</i>		<i>GULP1</i>			<i>Herpud1</i>	
<i>Tnxb</i>		<i>HBEGF</i>			<i>Hivep1</i>	
<i>Trim40</i>		<i>HCG12</i>			<i>Hmga1</i>	
<i>Trpv4</i>		<i>HDAC9</i>			<i>Hmga2</i>	
<i>Ttll2</i>		<i>HEBP2</i>			<i>Hmgb1</i>	
<i>Tubb1</i>		<i>HIPK2</i>			<i>Hmgb3</i>	
<i>Upk1b</i>		<i>HIVEP2</i>			<i>Hoxb13</i>	
<i>Upk3b</i>		<i>HIVEP2</i>			<i>Hsp90b1</i>	
<i>Uty</i>		<i>HNRPDL</i>			<i>Hspa5</i>	
<i>Vpreb3</i>		<i>HRH1</i>			<i>Htra1</i>	
<i>Vsig4</i>		<i>HSPA14</i>			<i>Ifi30</i>	
<i>Vsig8</i>		<i>HSPB8</i>			<i>Ifi47</i>	
<i>Wnk2</i>		<i>HSPC268</i>			<i>Ifngr1</i>	
<i>Wnt5a</i>		<i>HTATIP2</i>			<i>Igfbp2</i>	

<i>Xlr3a</i>		<i>IBRDC2</i>			<i>Igfbp4</i>	
<i>Zfp39</i>		<i>ID2</i>			<i>Igfbp6</i>	
<i>Zfr2</i>		<i>ID4</i>			<i>Igsf4a</i>	
		<i>IDI1</i>			<i>Il17rc</i>	
		<i>IDI1</i>			<i>Il1rl1</i>	
		<i>IER5</i>			<i>Il6st</i>	
		<i>IL1RL1</i>			<i>Irf7</i>	
		<i>IL6</i>			<i>Irf8</i>	
		<i>IL6ST</i>			<i>Irgm</i>	
		<i>IL6ST</i>			<i>Irs1</i>	
		<i>ING3</i>			<i>Itga6</i>	
		<i>IRAK2</i>			<i>Itgb1bp1</i>	
		<i>IRS2</i>			<i>Jun</i>	
		<i>ISG20L1</i>			<i>Junb</i>	
		<i>ISOC1</i>			<i>KAP-1</i>	
		<i>JUN</i>			<i>Klf10</i>	
		<i>JUNB</i>			<i>Klf6</i>	
		<i>KBTBD9</i>			<i>Klhl2</i>	
		<i>KCNJ2</i>			<i>Ktn1</i>	
		<i>KCTD12</i>			<i>L1cam</i>	
		<i>KIAA0247</i>			<i>Lamb3</i>	
		<i>KIAA0286</i>			<i>Lbp</i>	
		<i>KIAA0355</i>			<i>Lman1</i>	
		<i>KIAA0888</i>			<i>LOC672274</i>	
		<i>KIAA0907</i>			<i>Loxl1</i>	
		<i>KIAA1217</i>			<i>Lpgat1</i>	
		<i>KIAA1344</i>			<i>Lrig1</i>	
		<i>KIAA1377</i>			<i>Lrp1</i>	
		<i>KIAA1632</i>			<i>Ltbp1</i>	
		<i>KIAA2013</i>			<i>Macf1</i>	
		<i>KITLG</i>			<i>Mapk12</i>	
		<i>KLF9</i>			<i>Mapk6</i>	
		<i>KLF9</i>			<i>Mdm2</i>	
		<i>KLHL15</i>			<i>Med28</i>	
		<i>KLHL21</i>			<i>Metrn</i>	
		<i>KRT10</i>			<i>Mical1</i>	
		<i>KRTHB5</i>			<i>Mid1ip1</i>	
		<i>KSR1</i>			<i>Mmp14</i>	
		<i>LATS2</i>			<i>Msln</i>	
		<i>LDLR</i>			<i>Msn</i>	
		<i>LHFP</i>			<i>Mtdh</i>	
		<i>LIF</i>			<i>Mxi1</i>	
		<i>LLGL1</i>			<i>Mybbp1a</i>	

		<i>LMCD1</i>			<i>Myc</i>	
		<i>LOC116143</i>			<i>Narg1</i>	
		<i>LOC153222</i>			<i>Ncor2</i>	
		<i>LOC26010</i>			<i>Ndufb8</i>	
		<i>LOC286109</i>			<i>Nfe2l2</i>	
		<i>LOC387647</i>			<i>Nfkbiz</i>	
		<i>LOC401074</i>			<i>Notch1</i>	
		<i>LOC401504</i>			<i>Nr1d2</i>	
		<i>LOC554203</i>			<i>Nr2f6</i>	
		<i>LOC727858</i>			<i>Ntn1</i>	
		<i>LOC728190</i>			<i>Oxct1</i>	
		<i>LOC729436</i>			<i>P4ha1</i>	
		<i>LOC731149</i>			<i>Pa2g4</i>	
		<i>LRRC49</i>			<i>Pard6b</i>	
		<i>LTBP1</i>			<i>Pcnp</i>	
		<i>LTV1</i>			<i>Pcolce2</i>	
		<i>LUC7L</i>			<i>Pcole</i>	
		<i>MAGEH1</i>			<i>Pdap1</i>	
		<i>MAN2A1</i>			<i>PDGF</i>	
		<i>MAP3K8</i>			<i>Pdgfa</i>	
		<i>MAST4</i>			<i>Pdgfa</i>	
		<i>MAST4</i>			<i>Pdgfc</i>	
		<i>MCAM</i>			<i>Pdha1</i>	
		<i>MCL1</i>			<i>Pdia3</i>	
		<i>MEIS1</i>			<i>Pdk1</i>	
		<i>MGC5370</i>			<i>Pdlim1</i>	
		<i>MLLT4</i>			<i>Pdlim7</i>	
		<i>MORC2</i>			<i>Pdzk1ip1</i>	
		<i>MRPL14</i>			<i>Perp</i>	
		<i>MRPL16</i>			<i>Pigf</i>	
		<i>MRPL41</i>			<i>Pkhd1</i>	
		<i>MRPL43</i>			<i>Pkp4</i>	
		<i>MRPS16</i>			<i>Pla1a</i>	
		<i>MSL3L1</i>			<i>Plek2</i>	
		<i>MTERFD2</i>			<i>Plod2</i>	
		<i>MYCT1</i>			<i>Pltp</i>	
		<i>MYH10</i>			<i>Por</i>	
		<i>MYLIP</i>			<i>Por1aip2</i>	
		<i>NAPE-PLD</i>			<i>Ppp1r8</i>	
		<i>NDUFA5</i>			<i>Pprc1</i>	
		<i>NFAT5</i>			<i>Prc1</i>	
		<i>NFE2L2</i>			<i>Pros1</i>	
		<i>NFIL3</i>			<i>Prss23</i>	

		<i>NFKB1</i>			<i>Pscd2</i>	
		<i>NFKBIZ</i>			<i>Ptgs1</i>	
		<i>NFKBIZ</i>			<i>Ptgs2</i>	
		<i>NKX3-1</i>			<i>Ptpn12</i>	
		<i>NQO1</i>			<i>Ptpn2</i>	
		<i>NQO2</i>			<i>Rab1</i>	
		<i>NR4A2</i>			<i>Rab18</i>	
		<i>NRG1</i>			<i>Rai14</i>	
		<i>NRP2</i>			<i>Rassf2</i>	
		<i>NUAK2</i>			<i>Rb1</i>	
		<i>NUFIP2</i>			<i>Rbpsuh</i>	
		<i>NUP50</i>			<i>Rcn1</i>	
		<i>OBFC2A</i>			<i>Rcn2</i>	
		<i>OGFR</i>			<i>Reep6</i>	
		<i>OSBPL3</i>			<i>Rgs2</i>	
		<i>P18SRP</i>			<i>Rhob</i>	
		<i>P18SRP</i>			<i>Rhou</i>	
		<i>PACSLN2</i>			<i>Rin1</i>	
		<i>PARD6B</i>			<i>Rnd3</i>	
		<i>PAWR</i>			<i>Rrbp1</i>	
		<i>PCM1</i>			<i>Rtp4</i>	
		<i>PDLIM5</i>			<i>S100a4</i>	
		<i>PFDN4</i>			<i>Sac3d1</i>	
		<i>PFN2</i>			<i>Sc4mol</i>	
		<i>PGM2</i>			<i>Scd1</i>	
		<i>PHF23</i>			<i>Scye1</i>	
		<i>PIGC</i>			<i>Sec23a</i>	
		<i>PIK3CD</i>			<i>Sep10</i>	
		<i>PINX1</i>			<i>Sep2</i>	
		<i>PLAGL2</i>			<i>Sep7</i>	
		<i>PLSCR1</i>			<i>Sep9</i>	
		<i>PMAIP1</i>			<i>Sepp1</i>	
		<i>PNPO</i>			<i>Serinc1</i>	
		<i>PNRC2</i>			<i>Serinc3</i>	
		<i>POGK</i>			<i>Serpine1</i>	
		<i>POLI</i>			<i>Sertad2</i>	
		<i>PPM1D</i>			<i>Sesn1</i>	
		<i>PPP3CC</i>			<i>Set</i>	
		<i>PRDM2</i>			<i>Sfpq</i>	
		<i>PRPF38A</i>			<i>Sirt1</i>	
		<i>PRRX1</i>			<i>Skp2</i>	
		<i>PTAR1</i>			<i>Slc20a1</i>	
		<i>PTGER4</i>			<i>Slc20a2</i>	

		<i>PTPN1</i>			<i>Slpi</i>	
		<i>PTTG3</i>			<i>Smc2l1</i>	
		<i>R3HCC1</i>			<i>Smpdl3b</i>	
		<i>RAB27A</i>			<i>Snail1</i>	
		<i>RAB31</i>			<i>Snail2</i>	
		<i>RANBP5</i>			<i>Snta1</i>	
		<i>RAPGEF1</i>			<i>Soat1</i>	
		<i>RAPH1</i>			<i>Sox11</i>	
		<i>RBAK</i>			<i>Sp1</i>	
		<i>RBM15B</i>			<i>Sparc</i>	
		<i>RBM24</i>			<i>Spcs3</i>	
		<i>RCOR1</i>			<i>Spg20</i>	
		<i>RGNEF</i>			<i>Spint2</i>	
		<i>RP5-1022P6.2</i>			<i>Spnb2</i>	
		<i>RPL35A</i>			<i>Spp1</i>	
		<i>RPL35A</i>			<i>Sqle</i>	
		<i>RPL37</i>			<i>Src</i>	
		<i>RUNX1</i>			<i>St6galnac</i>	
		<i>RUNX2</i>			<i>Stag2</i>	
		<i>RYBP</i>			<i>Strbp</i>	
		<i>SASH1</i>			<i>Stst1</i>	
		<i>SCARA3</i>			<i>Stst2</i>	
		<i>SCYL1BP1</i>			<i>Taf6l</i>	
		<i>SEC11C</i>			<i>Tapbp</i>	
		<i>SEC31A</i>			<i>Tcea1</i>	
		<i>SEPHS1</i>			<i>Tcf12</i>	
		<i>SERF2</i>			<i>Tcf2</i>	
		<i>SGMS2</i>			<i>Tfrc</i>	
		<i>SIPA1L1</i>			<i>Tgif</i>	
		<i>SIPA1L3</i>			<i>Tgif1</i>	
		<i>SIRT1</i>			<i>Tgm2</i>	
		<i>SLC22A1</i>			<i>Timp1</i>	
		<i>SLC25A20</i>			<i>Tloc1</i>	
		<i>SLC25A27</i>			<i>Tlr4</i>	
		<i>SLC25A33</i>			<i>Tm7sf2</i>	
		<i>SLC25A37</i>			<i>Tmed5</i>	
		<i>SLC25A37</i>			<i>Tmem97</i>	
		<i>SLC25A37</i>			<i>Tmod3</i>	
		<i>SLC2A3</i>			<i>Tmsb4x</i>	
		<i>SLC2A3</i>			<i>Tnc</i>	
		<i>SLC35D2</i>			<i>Tnfrf12a</i>	
		<i>SLC39A14</i>			<i>Tnfrst12a</i>	
		<i>SLFN11</i>			<i>Tnfrst21</i>	

		<i>SNRPE</i>			<i>Tor2a</i>	
		<i>SNRPF</i>			<i>Tpd52</i>	
		<i>SNX19</i>			<i>Tpm1</i>	
		<i>SOCS3</i>			<i>Tpm2</i>	
		<i>SPAG9</i>			<i>Tpm4</i>	
		<i>SPAG9</i>			<i>Tpp1</i>	
		<i>SPNS1</i>			<i>Tpst2</i>	
		<i>SPRY2</i>			<i>Traf3</i>	
		<i>SSBP2</i>			<i>Trim30</i>	
		<i>SSR3</i>			<i>Trio</i>	
		<i>ST3GAL6</i>			<i>Triobp</i>	
		<i>STK3</i>			<i>Trpv4</i>	
		<i>STOML2</i>			<i>Tsc22d1</i>	
		<i>STX12</i>			<i>Ttrap</i>	
		<i>SUHW2</i>			<i>Tubb3</i>	
		<i>SVEP1</i>			<i>Twist 1</i>	
		<i>TBC1D23</i>			<i>Txndc1</i>	
		<i>TCEAL8</i>			<i>Ube1c</i>	
		<i>THRAP4</i>			<i>Utp11l</i>	
		<i>TIPARP</i>			<i>Vcl</i>	
		<i>TJAP1</i>			<i>Vegfa</i>	
		<i>TK2</i>			<i>Vegfb</i>	
		<i>TLE1</i>			<i>Vegfc</i>	
		<i>TLE4</i>			<i>Vim</i>	
		<i>TMEM1</i>			<i>Wisp1</i>	
		<i>TMEM17</i>			<i>Wnt7b</i>	
		<i>TMEM182</i>			<i>Wwtr1</i>	
		<i>TMEM57</i>			<i>Xbp1</i>	
		<i>TNFAIP3</i>			<i>Xpot</i>	
		<i>TNFAIP8</i>			<i>Yes1</i>	
		<i>TNFRSF1A</i>			<i>Zfp451</i>	
		<i>TNIK</i>			<i>Zfp91</i>	
		<i>TNPO1</i>			<i>Zipro1</i>	
		<i>TNPO1</i>				
		<i>TNRC6B</i>				
		<i>TOR1AIP1</i>				
		<i>TP53I3</i>				
		<i>TPCN1</i>				
		<i>TPP1</i>				
		<i>TRAF4</i>				
		<i>TRAM2</i>				
		<i>TRIM36</i>				
		<i>TUBB2B</i>				

		<i>TUFT1</i>				
		<i>UBE3B</i>				
		<i>UBTD2</i>				
		<i>USP38</i>				
		<i>USP46</i>				
		<i>USP54</i>				
		<i>VANGL1</i>				
		<i>VGLL3</i>				
		<i>VPS4A</i>				
		<i>WDR20</i>				
		<i>WSB1</i>				
		<i>XRRA1</i>				
		<i>YIPF5</i>				
		<i>YOD1</i>				
		<i>YPEL2</i>				
		<i>ZBTB10</i>				
		<i>ZBTB5</i>				
		<i>ZC3H12C</i>				
		<i>ZFP28</i>				
		<i>ZNF138</i>				
		<i>ZNF20</i>				
		<i>ZNF275</i>				
		<i>ZNF295</i>				
		<i>ZNF30</i>				
		<i>ZNF627</i>				
		<i>ZNF655</i>				
		<i>ZNF670</i>				
		<i>ZNF764</i>				
		<i>ZNF79</i>				
		<i>ZNF92</i>				
		<i>ZNRD1</i>				

Таблица 2, список литературы:

1. Birnie R. et al. Gene expression profiling of human prostate cancer stem cells reveals a pro-inflammatory phenotype and the importance of extracellular matrix interactions // *Genome Biol.* – 2008. – Vol. 9, N 5. doi.org/10.1186/gb-2008-9-5-r83.
2. Gröger C.J. et al. Meta-analysis of gene expression signatures defining the epithelial to mesenchymal transition during cancer progression // *PLoS One* – 2012. – Vol. 7, N 12. – e51136. doi: 10.1371/journal.pone.0051136.

1. Ho D.W.Y. et al. Gene expression profiling of liver cancer stem cells by RNA-sequencing // PLoS One – 2012. – Vol. 7, N 5. – e37159. doi: 10.1371/journal.pone.0037159.
2. Rainusso N. et al. Identification and gene expression profiling of tumor-initiating cells isolated from human osteosarcoma cell lines in an orthotopic mouse model // Cancer Biol. Ther. – 2011. – Vol. 12, N 4. – P. 278–287.
3. Vathipadiekal V. et al. Identification of a potential ovarian cancer stem cell gene expression profile from advanced stage papillary serous ovarian cancer // PLoS One – 2012. – Vol. 7, N 1. – e29079. doi: 10.1371/journal.pone.0029079.
4. Venkov C. et al. Transcriptional networks in epithelial-mesenchymal transition // PLoS One – 2011. – Vol. 6, N 9. – e25354. doi: 10.1371/journal.pone.0025354.

Таблица 3. Анализ относительной экспрессии основных генов в TAMRA+ и TAMRA– клетках ВЭБ-индуцированной В-лимфомы, ответственных за функциональные свойства ОСК, по данным RNAseq и qPCR.

Ген	Данные RNAseq		Краткая характеристика функций	qPCR	Биологический процесс
	TAMRA+ *	Соотношение уникальных ридов для TAMRA+/TAMRA–		Соотношение экспрессии для TAMRA+/TAMRA–	
<i>CDK5R2</i>	8.6	**	Циклин-зависимая киназа-3 (CDK3), регуляторная субъединица-5 циклин-зависимой киназы 5 (CDK2). Обеспечивают активность активатора циклинзависимой протеин-серин/треониновой киназы.		Wnt-сигнальный путь (асимметричное деление, сохранение низкодифференцированного статуса)
<i>CDK3</i>	98.9	**			
<i>CDK2</i>	932.9	1.5	Циклин-зависимая киназа-2 . Участвует в положительной регуляции процесса пролиферации клеток.		
<i>DLGAP1-AS5</i>	51.59	2.15	Длинная некодирующая РНК (lncRNA). Напрямую взаимодействует с транскрипционным репрессором SIX3, что препятствует связыванию последнего с промоторными областями гена <i>WNT1</i> , тем самым приводя к транскрипционной активации указанного гена.		
<i>ESRRB</i>	36.54	**	Ядерный рецептор стероидных гормонов. Игрет роль в поддержании самообновления и плюрипотентности эмбриональных и трофобластных стволовых клеток через различные сигнальные пути, включая сигнальный путь FGF и сигнальные пути Wnt.	0.7	

<i>FZD2</i>	25.79	**	Рецептор для белков Wnt-сигнального пути. Играет роль в активации канонического пути Wnt. Посредством связывания с лигандами ингибирует киназу GSK-3, что приводит к накоплению β -catenin в ядре и активации целевых генов Wnt.	
<i>FZD5</i>	8.6	0.1	Рецептор для лиганда WNT5A, участвующий в активации канонического пути Wnt-сигнального каскада. Участвует в процессах пролиферации, ЭМП, апоптоза.	10.2 ± 3.3
<i>FZD7</i>	83.8	0.9	Рецептор для активации канонического пути Wnt.	5.2 ± 3.0
<i>HES1</i>	77.4	2.4	Транскрипционный фактор , который активируется сигнальным путем Wnt и усиливается TCF3. Играет важную роль в поддержании ОСК, метастазировании и индукции ЭМП, а также устойчивости к химиотерапии. Активирует фосфорилирование STAT3. Является одним из целевых генов Notch.	0.9 ± 0.1
<i>KLF4</i>	156.9	0.6	Транскрипционный фактор . Участвует в активации эффекторных генов Wnt-сигнального пути. Участвует в активации TERT.	2.8 ± 1.6
<i>WNT1</i>	2.1	**	Ген <i>WNT1</i> кодирует многофункциональный сигнальный гликопротеин , который на высоком уровне экспрессируется во многих злокачественных опухолях. Активирует репортерный ген <i>TCF</i> . Участвует в накоплении β -catenin в цитоплазме.	

<i>WNT2</i>	174.1	12.4	Лиганд для членов семейства Frizzled. Экспрессия <i>WNT2</i> связана с повышенной выживаемостью клеток вне зависимости от прикрепления клетки к матриксу, инвазией и метастазированием. <i>WNT2</i> участвует в активации и стабилизации β -catenin, тем самым активируя канонический путь каскада Wnt.	0.8 ± 0.4
<i>WNT5a</i>	23.60	2.36	Белок (лиганд), продуцируемый геном <i>WNT5a</i> , является частью химических сигнальных путей, которые контролируют перемещение клеток (миграция) и прикрепление клеток друг к другу (адгезия) на ранних стадиях развития. Также может усиливать пролиферацию клеток при некоторых типах онкологии. Преимущественно активирует β -catenin независимую сигнализацию посредством индукции клатрин-зависимого рецептор-опосредованного эндоцитоза.	8.6 ± 3.7
<i>WNT5b</i>	343.92	5.21	Член семейства белков WNT, лиганд , тесно связанный с <i>WNT5a</i> , необходим для миграции, пролиферации или дифференцировки клеток.	
<i>WNT9B</i>	4.30	**	Лиганды сигнального пути Wnt. Участвуют в регуляции дифференцировки и пролиферации стволовых клеток.	
<i>WNT10A</i>	292.33	3.05		
<i>LEF1</i>	111.77	2.66	Фактор транскрипции , принадлежащий к семейству белков, которые имеют гомологию с группой белков с высокой подвижностью-1 (High Mobility Group protein-1). Белок, кодируемый этим геном, может связываться с промоторной областью целевых генов сигнального каскада Wnt, участвуя в программах ЭМП, сохранения плюрипотентности, пролиферации.	5.0 ± 1.4

<i>LRP3</i>	8.6	3.2	Рецептор липопротеинов низкой плотности (Low-density lipoprotein receptor-related protein 1, также известный как CD91). Участвует в процессах возникновения и прогрессирования опухоли. Способствует миграции и инвазии опухолевых клеток, регулируя экспрессию и функции матриксных металлопротеиназ MMP-2 и MMP-9. Ингибирует апоптоз клеток, регулируя рецептор инсулина, сигнальный путь серин/треониновой протеинкиназы (ATR) и экспрессию каспазы-3.	
<i>NLK</i>	223,5	1,7	Эффе́ктор , участвующий в активации неканонического пути Wnt.	
<i>TERT</i>	70.9	1.2	Кодирует фермент теломеразу , достраивающую концы теломерных повторов, что является одной из отличительных черт стволовых клеток. Экспрессия <i>TERT</i> напрямую усиливается путем связывания β -catenin с его промоторной областью. Таким образом уровень экспрессии <i>TERT</i> напрямую связан с сигнализацией Wnt.	0.9
<i>TCF3</i>	2979.2	1.5	Фактор транскрипции , регулирующий экспрессию эффекторных генов Wnt-сигнального пути.	1.5 ± 0.3
<i>SPATS1</i>	4.3	0.2	Играет роль в негативной регуляции канонического пути активации Wnt.	1.0
<i>ALDH1A3</i>	4.3	0.4	Фермент ретинальдегид дегидрогеназа, метаболизирует ретинальдегид в ретиновую кислоту. Экспрессия снижена в некоторых типах рака.	10.8 ± 5.8
				Сигнальный каскад ретиновой

<i>CYP26A1</i>	107.5	10.7	Фермент , участвующий в деградации ретиноевой кислоты. Экспрессия указанного гена повышена во многих типах опухолей.	5.6 ± 2.6	кислоты (сохранение низкодифферен- цированного состояния)
<i>LRAT</i>	2.1	0.1	Фермент катализирует реакцию этерификации транс-ретинола. Его экспрессия зачастую снижена в опухолевых клетках.	13.5 ± 5.0	
<i>RARA</i>	309.5	0.5	Рецептор ретиноевой кислоты. Снижение экспрессии связано с развитием злокачественных новообразований. Активирует транскрипцию таргетных генов.	3.1 ± 0.4	
<i>RXRA</i>	464.3	0.6	Рецептор ретиноевой кислоты. В комплексе с RARA активирует транскрипцию таргетных генов.	5.8 ± 1.9	
<i>RDH10</i>	40.8	0.5	Фермент ретинолдегидрогеназа, метаболизирует ретинол в ретинальдегид.	11.9 ± 1.6	
<i>RBP1</i>	27.9	1.7	Ретинол-связывающий белок типа 1. Обеспечивает активность транс-ретинола и жирных кислот.		
<i>AFAP1L2</i>	328.87	54.81	Actin filament-associated protein 1-like 2. Белок , ассоциированный с актиновыми филаментами. Может играть роль в каскаде сигналов, усиливая активность киназы SRC. Способствует активации транскрипции, регулируемой SRC.		Дополнительные факторы стволовых клеток (сохранение основных свойств ОСК)
<i>CLEC11A</i>	19.3	**	C-type lectin domain family 11 member A. Цитоплазматический белок , экспрессия которого повышена во многих типах опухолей и связана с плохим прогнозом лечения. Участвует в процессе ангиогенеза.		

<i>CDK3</i>	98.88	3.53	Белок семейства циклинзависимых протеинкиназ (CDK). Способствует вступлению в S-фазу, отчасти активируя факторы транскрипции семейства E2F. Этот белок также связывается с циклином С и фосфорилирует белок ретинобластомы 1, способствуя выходу из фазы G0. Сверхэкспрессируется в ряде линий раковых клеток и может играть важную роль в пролиферации клеток и злокачественной трансформации.	
<i>IGF1</i>	51.59	2.58	Является лигандом для IGF1R. Связывается с альфа-субъединицей IGF1R, что приводит к активации тирозинкиназной активности, которая аутофосфорилирует остатки тирозина в бета-субъединице рецептора, тем самым инициируя каскад нисходящих сигнальных событий, приводящих к активации PI3K-AKT/PKB и Ras-MAPK-сигнальных путей.	
<i>FGF1R</i>	141.9	1.8	Insulin-like growth factor (IGF)/IGF-1 receptor (IGF-1R). Рецептор. Участвует в контроле роста, выживания клеток, сохранения плюрипотентного статуса. IGF1R имеет решающее значение для трансформации опухолей и выживания злокачественных клеток. Связывание лиганда активирует рецепторную киназу, что приводит к аутофосфорилированию рецептора и фосфорилированию тирозинов множества субстратов.	
<i>IFI27</i>	23.6	**	Interferon alpha-inducible protein 27. Участвует в процессах ЭМП, инвазии и метастазирования клеток.	

<i>IFI27L2</i>	337.47	2.38	Лиганд IFI27. Расположен в митохондриальной мембране. Участвует в процессе апоптоза.	
<i>KLF4</i>	156.9	0.6	Транскрипционный фактор. Участвует в активации эффекторных генов Wnt-сигнального пути. Участвует в активации <i>TERT</i> .	2.8 ± 1.6
<i>LTBP1</i>	10.75	**	Latent transforming growth factor beta binding protein 1. Белок , принадлежит к семейству латентных связывающих белков TGF- β (LTBP). Активирует TGF- β , который, в свою очередь, контролирует процессы пролиферации и дифференцировки.	
<i>NANOG</i>	2.1	0.2	Ключевые транскрипционные факторы , участвующие в поддержании низкодифференцированного состояния как нормальных стволовых клеток, так и ОСК. Сопряжен с увеличением роста и метастазирования опухолевых клеток, участвует в запуске устойчивости к химио- и радиотерапии.	4.8 ± 2.2
<i>SOX2</i>	0			5.1 ± 1.8
<i>OCT3/4</i>	0	**		3.0 ± 1.5
<i>PIK3R3</i>	221.4	2.4	Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). Киназа , фосфорилирует фосфатидилинозитол и подобные соединения, которые далее участвуют в цепочке активации сигнальных путей роста. PI3K состоит из каталитической и регуляторной субъединицы. Белок, кодируемый <i>PIK3R3</i> , представляет собой регуляторную субъединицу PI3K .	
<i>RASGRP2</i>	262.24	4.37	Белок , активирует малые ГТФазы, включая RAS и RAP1/RAS3.	

<i>SRPK3</i>	19.35	2.42	Serine-Arginine Protein Kinase 1. Киназа , регулирует процессы в ОСК, взаимодействуя с Wnt/ β -catenin, β -catenin/TCF, а также GSK3- β -сигнальными путями. Способствует росту клеток, миграции и инвазии, в то время как его ингибирование подавляет метастазирование и вызывает апоптоз клеток.	
<i>S100A13</i>	40.84	2.55	Член семейства белков S100 . Локализуется в цитоплазме и/или ядре и участвуют в регуляции ряда клеточных процессов, таких как прогрессирование клеточного цикла и дифференцировка.	

<i>CD274 (PDL1)</i>	212.8	0.2	Ингибирует противоопухолевые Т-лимфоциты.		Иммунорезистентность (устойчивость к воздействию иммунной системы)
<i>CD200</i>	851.2	1.4	Поверхностный маркер . Присутствует в эмбриональных и раковых стволовых клетках. Индуцирует регуляторные Т-лимфоциты и дендритные клетки, препятствует активации эффекторных Т-лимфоцитов.		
<i>GPR15</i>	128.97	2.15	Орфанный рецептор класса А, связанный с G-белком (heterotrimeric guanine nucleotide-binding protein, GPCR). Дефицит GPR15 подавляет инфильтрацию T _{reg} при колоректальном раке.		
<i>HLA-G</i>	251.5	3.2	Иммуносупрессивные молекулы класса МНС класса Ib.		
<i>HLA-A</i>	23081.3	0.7	Иммуногенные молекулы МНС класса Ia.		

<i>IDO1</i>	8.6	0.3	Ингибирует пролиферацию Т-лимфоцитов за счет катаболизма триптофана.	
<i>IL-10</i>	23.6	0.7	Цитокин (лиганд). Напрямую ингибируют эффекторные Т-лимфоциты и дендритные клетки. Могут индуцировать регуляторные Т-лимфоциты и регуляторные дендритные клетки.	
<i>IL-6</i>	0	0	Цитокин (лиганд). Напрямую ингибируют эффекторные Т-лимфоциты и дендритные клетки.	
<i>TGFB1</i>	1031.8	0.9	Напрямую ингибирует эффекторные Т-лимфоциты и дендритные клетки. Может индуцировать регуляторные Т-лимфоциты и регуляторные дендритные клетки	
<i>TNFRSF25</i>	98.88	2.75	Рецептор , относится к суперсемейству рецепторов TNF. Экспрессируется преимущественно в тканях, богатых лимфоцитами, может играть роль в регуляции гомеостаза лимфоцитов. Стимулирует активность NF- κ B и регулирует апоптоз клеток. Показана роль этого гена в удалении аутореактивных Т-клеток из тимуса.	
<i>VEGFA</i>	206.4	0.2	Напрямую ингибирует эффекторные Т-лимфоциты и дендритные клетки.	

<i>BMI1</i>	481.5	1.7	Транскрипционный фактор , участвует в запуске процесса ЭМП и способствует метастазированию клеток опухоли. Играет роль в функционировании и самообновлении ОСК. Напрямую связывается с опухолевым супрессором PTEN, ингибируя его активность. Снижение или полное отсутствие функциональной активности PTEN поддерживает неконтролируемую пролиферацию неотрансформированных клеток.	0.03	Эпителиально мезенхимальный переход (инвазия и метастазирование)
<i>CDH1</i>	591.1	0.7	Кодирует белок Е-кадгерин , экспрессирующийся на высоком уровне в эпителиальных клетках. Он участвует в формировании адгезивных контактов с базальной мембраной и микроокружением.	0.8 ± 0.3	
<i>LEF1</i>	111.8	2.7	Фактор транскрипции , принадлежащий к семейству белков, которые имеют гомологию с группой белков с высокой подвижностью-1 (High Mobility Group protein-1). Связывается с промоторной областью целевых генов сигнального каскада Wnt, участвует в программах ЭМП, сохранения плюрипотентности, пролиферации.	5.0 ± 1.4	
<i>ITGA10</i>	12.90	**	Кодирует цепь интегрина-$\alpha 10$. Участвует в клеточной адгезии и сигнализации. Связывается с коллагеном. Высокая экспрессия связана с риском метастазирования и снижением выживаемости.		

<i>ITGB7</i>	1567	1.2	Ген, кодирующий интегрин-β7 . Высоко экспрессируется в опухолевых клетках, циркулирующих в кровяном русле. Благодаря указанному белку происходит связывание со специфическими лигандами на поверхности клеток эндотелия сосудов и закрепление опухолевой клетки в новом сайте	1.2 ± 0.2
<i>MAP7</i>	17.20	**	Энсконсин, белок , стабилизирующий микротрубочки, который может играть важную роль в реорганизации микротрубочек во время поляризации и дифференцировки эпителиальных клеток. Играет роль в формировании межклеточных контактов.	
<i>MMP19</i>	38.69	2.15	Матриксные металлопротеиназы. Участвуют в расщеплении внеклеточного матрикса в нормальных физиологических процессах, таких как эмбриональное развитие, воспроизводство и ремоделирование тканей, а также в процессах заболеваний, таких как артрит и метастазирование.	
<i>MMP2</i>	0	0		4.6 ± 2.4
<i>MYO10</i>	10.75	**	Кодирует член суперсемейства миозинов Миозин X . Играет роль в интеграции F-актина и микротрубочек во время мейоза. Нокдаун/сверхэкспрессия <i>MYO10</i> значительно ингибирует/усиливает возможности пролиферации, инвазии и миграции опухолевых клеток.	
<i>OCLN</i>	126.8	0.6	Мембранно-интегральный белок — основной компонент плотных контактов, регулирующий их проницаемость и образующий барьер между эпителиальными и эндотелиальными клетками.	

<i>PERP</i>	189.16	2.20	Белок , локализуется в плазматической мембране. Активен в межклеточных соединениях. Участвует в сохранении целостности многослойного эпителия и межклеточной адгезии, способствуя сборке десмосом. Играет роль эффектора в TP53-зависимом пути апоптоза.	
<i>ZEB1</i>	296	0.5	Фактор транскрипции , играет ключевую роль в процессах дифференцировки клеток и ЭМП.	0.2
<i>TEKT4</i>	139.72	9.98	Tektin-4, структурный компонент микротрубочек ресничек и жгутиков. Участвует в сборке и движении ресничек, что обуславливает подвижность клеток. Снижение экспрессии <i>TEKT4</i> подавляет процессы пролиферации, образования колоний, миграции и инвазия клеток. Опухолесупрессивная роль нокдауна <i>TEKT4</i> связана с подавлением сигнального пути PI3K/Akt.	
<i>TTLL9</i>	27.94	4.66	Фермент, являющийся ключевым компонентом комплекса белков, который необходим для регуляции функционирования и стабильности микротрубочек.	
<i>TWIST</i>	0	0	Транскрипционный фактор, участвует в процессах дифференцировки и миграции клеток, а также в регуляции других генов, таких как <i>FGFR2</i> и <i>RUNX2</i> . Способствует прогрессированию опухоли, являясь одним из ключевых факторов процесса ЭМП.	

<i>BAD</i>	552.4	1	Кодирует проапоптотический белок , участвующий в процессе апоптоза, связываясь с антиапоптотическими белками, такими как Bcl-2 и Bcl-xL, и инактивируя их.		Антиапоптотические свойства (клеточное выживание)
<i>BAK</i>	378.3	1.1	Белок , локализуется в митохондриях и индуцирует апоптоз. Он взаимодействует с потенциал-зависимым анионным каналом митохондрий и ускоряет его открытие, что приводит к снижению мембранного потенциала и высвобождению цитохрома C.		
<i>BAX</i>	1182.2	0.5	Вместе с белком Bак участвуют в пермеабилзации митохондриальной мембраны, образовании пор и выходе цитохрома C в цитоплазму.		
<i>BCL2</i>	973.7	0.4	Кодирует интегральный белок внешней митохондриальной мембраны, является антиапоптотическим регулятором . Блокирует апоптотическую гибель некоторых клеток, таких как лимфоциты.		
<i>BOK</i>	4.3	0.7	Кодирует белок , связанный с регуляцией апоптоза является проапоптотическим членом семейства Bcl-2. Он участвует в проницаемости наружной мембраны митохондрий и может выступать ключевым эффектором внутреннего пути апоптоза.		
<i>BIRC5</i>	690	1.4	Белок Survivin , участвует в двух основных функциях: ингибировании апоптоза и регуляции клеточного цикла. Является представителем семейства IAP (группа белков-ингибиторов апоптоза). Ингибирует каспазу-9 и Smac/DIABLO.		

<i>CASP8</i>	451.4	0.7	Каспаза 8 является сигнальной каспазой и активирует эффекторные каспазы в ходе апоптоза.	
<i>CASP9</i>	161.2	0.6	Эффекторные каспазы , активируются в разных типах апоптоза.	
<i>CASP3</i>	386.9	0.9		
<i>CASP7</i>	152.6	0.5		
<i>DIABLO</i>	131.1	0.6	Белок Smac/DIABLO взаимодействует с IAP (группа белков-ингибиторов апоптоза) и устраняет ингибирование IAP как инициаторных, так и эффекторных каспаз.	
<i>ERBB2</i>	138	0.5	Онкопротеин , негативно регулирует экспрессию PERP.	
<i>FADD</i>	210.7	1.9	Адаптерная молекула , которая взаимодействует со многими клеточными рецепторами и опосредует сигналы, приводящие к клеточному апоптозу.	
<i>FAS</i>	524.5	0.3	Рецептор клеточной смерти . Играет центральную роль в регуляции апоптоза и участвует в патогенезе различных злокачественных новообразований и заболеваний иммунной системы.	
<i>IGF1R</i>	199.9	25	Рецептор , связывает инсулиноподобный фактор роста с высокой степенью сродства, действует как антиапоптотический регулятор, повышая выживаемость клеток.	
<i>GPR160</i>	25.79	**	Орфанный рецептор класса А. Связан с процессами апоптоза и остановки клеточного цикла.	

<i>IFI27</i>	23.64	**	Interferon alpha-inducible protein 27. Белок , участвует в процессе гибели клеток. Опосредует IFN- α индуцированный апоптоз, характеризующийся быстрым и мощным высвобождением цитохрома С из митохондрий и активацией Вах и каспаз 2, 3, 6, 8 и 9.	
<i>IFI27L2</i>	337.5	2.4	Является молекулярный адаптером, помогающим другим белкам собираться в комплексы. В первую очередь участвует в процессе апоптоза, способствуя гибели клеток	
<i>PEA15</i>	2992.1	1.5	Комплекс PED/PEA-15 блокирует связывание каспазы-8 с DISC, тем самым предотвращая образование сигнального комплекса, индуцирующего гибель, и подавляя активацию каскада каспаз. Оказывает антиапоптотический эффект на различных уровнях, например, ингибируя активацию p38 и JNK.	
<i>PERP</i>	189.2	2.2	Входит в семейство мембранных белков RMP22/GAS3/EMP. Первоначально идентифицирован как мишень для p53, специфически активируемая во время апоптоза (но не во время остановки клеточного цикла). Обсуждается роль PERP в апоптозе и межклеточной адгезии, а также его роль в ЭМП и взаимодействии с сигнальными путями воспаления.	
<i>PTEN</i>	1543.3	0.6	Один из основных опухолевых супрессоров . Участвует в торможении PI3K/Akt-сигнального каскада, приводящего к процессам пролиферации, выживания, адгезии и метастазирования.	

<i>SMAD1</i>	227.85	10.36	Транскрипционный модулятор , активируемый рецепторной киназой BMP1. Центральный медиатор в передаче сигналов TGF- β , участвует в широком спектре биологических функций, включая рост клеток, апоптоз, развитие и иммунный ответ.	
<i>TP53</i>	971.6	0.8	Один из основных опухолевых супрессоров . Участвует в процессах предотвращения неконтролируемого деления клеток, регулирования клеточного цикла, инициирования восстановления ДНК и запуска апоптоза в ответ на клеточный стресс (повреждения ДНК, вызванные радиацией или токсичными химическими веществами).	
<i>TNFRSF25</i>	98.9	2.7	Белок рецептора смерти 3 (DR3), иммуномодулятор, регулирующий иммунный ответ посредством связывания со своим лигандом TL1A. Его функции включают стимуляцию пролиферации Т-клеток, влияние на реакцию Т-хелперов, стимуляцию дифференцировки Th17 и регуляцию функции других иммунных клеток, таких как врожденные лимфоидные клетки и естественные клетки-киллеры.	
<i>TRADD</i>	417	2.2	Белок , действующий в качестве адаптера в сигнальных путях. Играет двойную роль в регуляции как выживания клеток, так и апоптоза, необходим для активации пути NF- κ B и воспалительных реакций.	
<i>XIAP</i>	328.9	0.7	Белок , связывается с факторами TRAF1 и TRAF2, ассоциированными с рецепторами TNF, и ингибирует апоптоз. Этот белок также ингибирует по меньшей мере два представителя семейства каспаз (протеаз клеточной гибели): каспазу-3 и каспазу-7.	

<i>MYC</i>	417.0	0.4	Семейство онкопротеинов MYC является главным регулятором метаболического перепрограммирования. Основные эффекторы MYC участвуют в биогенезе рибосом, биогенезе митохондрий, трансляции белков, прогрессии клеточного цикла и метаболизме.		Общеклеточный метаболизм (эффект Варбурга)
<i>HIF1α</i>	1126.3	0.5	HIF1 α играет важную роль в переключении метаболического режима в опухолевых клетках в ответ на гипоксию. Является транскрипционным фактором, запускающим клеточные адаптивные механизмы в ответ на среду с низким содержанием кислорода. Огромное количество генов содержат специфические элементы реагирования на гипоксию (HRE), которые связываются с HIF, что приводит к развитию адаптивного ответа, прогрессированию опухоли и метастазированию.		
<i>SLC2A1</i>	642.7	0.7	Играют ключевую роль в процессах регуляции энергетического метаболизма опухоли, что является адаптацией клеток к гипоксичной среде и приводит к быстрой пролиферации опухоли.		
<i>SLC2A3</i>	221.4	0.1			
<i>ABCA1</i>		0.1	Белки семейства АВС-транспортеров , участвуют в формировании МЛУ.		Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ)
<i>ABCB1</i>		0.4	Р-гликопротеин, белок семейства АВС-транспортеров , участвует в транспорте различных препаратов и приобретении множественной лекарственной устойчивости.		

<i>ABCC1</i>		1	Белки семейства АВС-транспортёров , участвуют в формировании МЛУ.	
<i>BARD1</i>		0.8	Участвует в репарации ДНК.	
<i>CLDN23</i>	64.49	3.22	Белок , входящий в состав плотных контактов эпителиальных клеток и регулирующий межклеточный барьер. Меняет структуру этих контактов, укрепляя эпителиальный барьер и ограничивая прохождение ионов и макромолекул.	
<i>CCDC73</i>	174.11	9.67	Белок , участвует в регуляции экспрессии генов, связанных с процессами деления клеток и устойчивости к лекарственным препаратам	
<i>GSTK1</i>		0.7	Глутатион-S-трансфераза участвует в инактивации лекарственных препаратов.	
<i>MAPK8</i>		0.6	Сниженная экспрессия препятствует запуску апоптоза посредством MAP-сигнального пути	
<i>SMO</i>		0.8	Снижение экспрессии этого рецептора препятствует проникновению некоторых препаратов	

*Нормализованное количество уникальных ридов для указанного гена.

** В TAMRA– клетках нет уникальных ридов для указанного гена.

Таблица 4. Анализ относительной экспрессии генов, потенциально участвующих в процессах связывания и/или интернализации экстраклеточных фрагментов дцДНК, в TAMRA+ и TAMRA– клетках карциномы мыши Кребс-2 по данным RNAseq и qPCR.

Ген	Данные RNAseq		qPCR	Функциональная группа
	TAMRA+ *	Соотношение уникальных ридов для TAMRA+/TAMRA–	Соотношение экспрессии для TAMRA+/TAMRA–	
<i>Apos1</i>	14	7	1.64 ± 0.48	Протеогликаны/ Гликопротеины
<i>Catsperg2</i>	237	14.06		
<i>CD200</i>	200	**		
<i>Col3a1</i>	143	11		
<i>Col6a2</i>	13	4.13	2.10 ± 0.26	
<i>Cldn1</i>	181	60.33	2.55 ± 1.24	
<i>Dcs2</i>	6	**	2.71 ± 0.52	
<i>Dnaja4</i>	8	8	2.88 ± 0.15	
<i>Fcna</i>	116	**	2.79 ± 1.57	
<i>Hepacam</i>	6	**	1.71 ± 0.51	
<i>Itm2a</i>	6	**		
<i>Itga9</i>	24	12	2.22	
<i>Itln1</i>	19	**	2.3 ± 0.39	
<i>Jsrp1</i>	5	5		
<i>Lyve1</i>	23	**	1.92 ± 0.57	
<i>Mreg</i>	287	28.7	1.36 ± 0.55	
<i>Nrcam</i>	61	4.69	2.63 ± 0.80	
<i>Psd2</i>	11	5.5		
<i>Prg4</i>	550	7.97	1.94 ± 0.62	

<i>Rab15</i>	99	**	
<i>Tnfrsf13c</i>	26	26	2.43 ± 0.59

<i>Marco</i>	35	11.67		Скавенджер-рецепторы

<i>Cd55</i>	14	3.5		Гликозилфосфати дилинозитол-заякоренные белки
<i>Fgfr1</i>	145	24.17		

*Нормализованное количество уникальных ридов для указанного гена.

** В TAMRA– клетках нет уникальных ридов для указанного гена.

Таблица 5. Анализ относительной экспрессии генов, потенциально участвующих в процессах связывания и/или интернализации экстраклеточных фрагментов дцДНК, в TAMRA+ и TAMRA– клетках ВЭБ-индуцированной В-лимфомы по данным RNAseq и qPCR.

Ген	Данные RNAseq		qPCR	Функциональная группа
	TAMRA+ *	Соотношение уникальных ридов для TAMRA+/TAMRA–	Соотношение экспрессии для TAMRA+/TAMRA–	
<i>ACVR1</i>	15.05	**		Протеогликаны/ Гликопротеины
<i>CDH11</i>	68.78	34.39	7.11 ± 3.79	
<i>CAV1</i>	47.29	11.82		
<i>CD200R1</i>	12.90	6.45		
<i>CDH17</i>	245.04	61.26	0.67 ± 0.40	
<i>CHODL</i>	10.75	**		
<i>COL122A1</i>	47.29	11.82		
<i>COL4A5</i>	150.47	12.54	12.05 ± 3.62	
<i>COL4A6</i>	161.21	8.06		
<i>COL5A2</i>	111.77	11.18		

<i>COL5A3</i>	251.49	**	
<i>COL6A1</i>	58.04	**	
<i>COL7A1</i>	88.13	2.45	
<i>COL9A3</i>	27.94	6.99	
<i>DENND1 B</i>	34.39	5.73	
<i>CTHRC1</i>	8.6	1.3	
<i>FCRL3</i>	260.09	11.82	
<i>FGFRL1</i>	73.08	3.05	
<i>GPC1</i>	40.8	2	
<i>GPC2</i>	17.2	2.87	
<i>IGF1R</i>	199.90	24.99	
<i>ITGA10</i>	12.90	**	
<i>ITGA5</i>	621.21	5.55	
<i>KCNIP3</i>	10.75	**	
<i>KEL1</i>	15.05	**	
<i>NCAM2</i>	4.30	**	
<i>NRP2</i>	223.55	11.18	
<i>NSG1</i>	24.10		
<i>SATB1</i>	21.5	**	
<i>SELL</i>	1973.24	7.89	1.59 ± 1.21
<i>PCDH15</i>	45.14	**	
<i>PODXL</i>	40.84	10.21	
<i>PTPRM</i>	40.84	10.21	

<i>RAB3A</i>	19.35	**	
<i>TENM4</i>	49.44	24.72	
<i>TCPAN15</i>	221.40	5.53	
<i>TREML4</i>	2.1	**	
<i>VCAM1</i>	184.86	7.70	6.6 5± 4.39

<i>MEGF6</i>	62.34	2.6		Скавенджер-рецепторы
<i>SCARF2</i>	10.75	**		
<i>SCART1</i>	62.34	2.60		

<i>CD14</i>	4.3	**		Гликозилфосфатидилинозитол-заякоренные белки
<i>GDPD5</i>	51.59	2.34		
<i>PLAUR</i>	105.33	3.29		
<i>HIP1R</i>	861.95	2.68		

*Нормализованное количество уникальных ридов для указанного гена.

** В TAMRA– клетках нет уникальных ридов для указанного гена.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Основными участниками анализируемых событий являются TAMRA-дцДНК зонд и взаимодействующие с ним опухолевые стволовые клетки (ОСК) карциномы мыши Кребс-2 и ВЭБ-индуцированной В-лимфомы (система детекции). Последовательная экспериментальная логика представлена на **Рисунке 1** и сопровождается необходимыми комментариями.

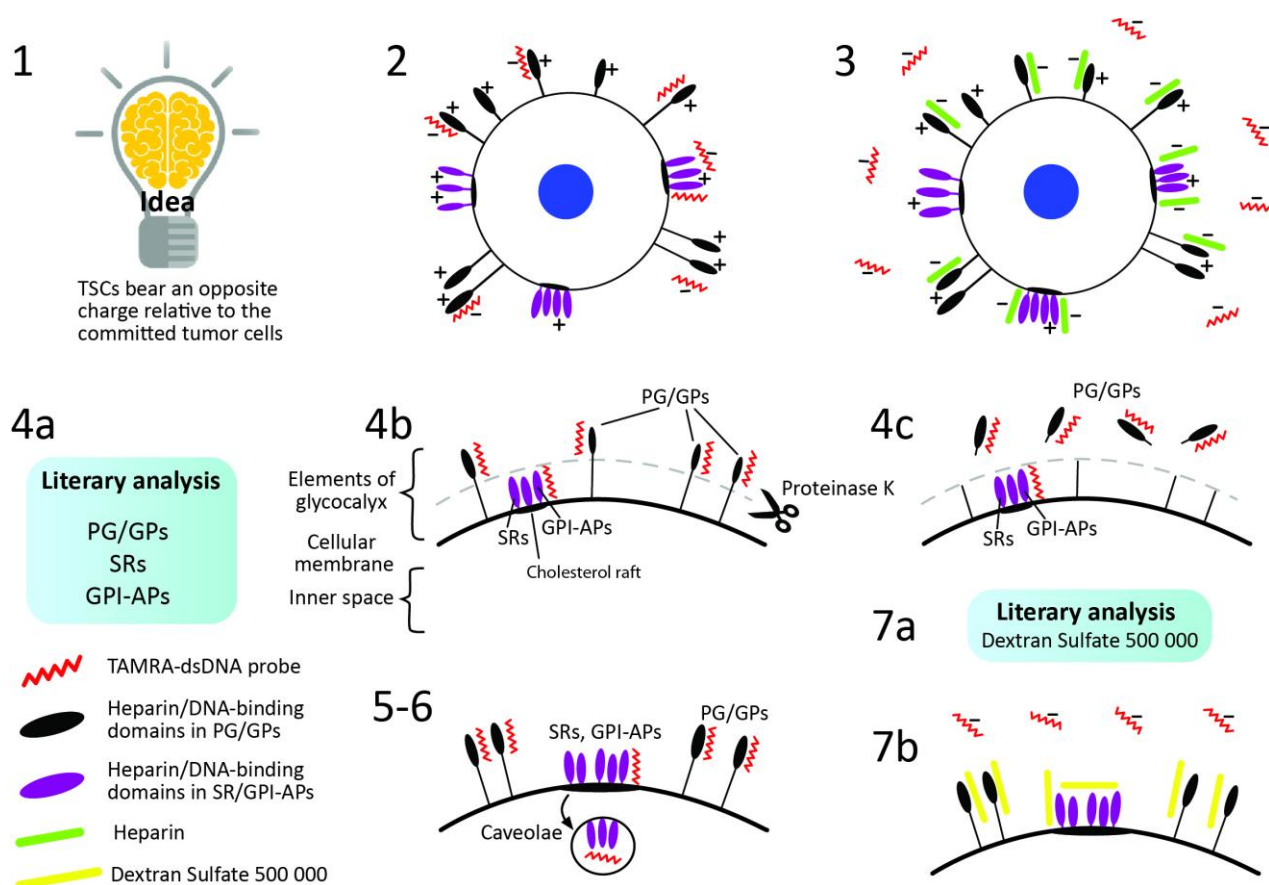


Рис. 1. Схема, отражающая логику экспериментальных процедур и связь результатов с выводами исследования. Подробное описание каждого пункта приведено ниже в тексте.

1. Рождение идеи различающегося заряда цитоплазматических мембран ОСК и их коммитированных потомков. Предположение основано на анализе поведения TAMRA+ клеток ВЭБ-индуцированной В-лимфомы на начальных этапах формирования сфер и принципа формирования «розеток» вокруг TAMRA+ гемопоэтических стволовых клеток.

2. Доказательство предположения, что ОСК обладают отличающимся от коммитированных потомков зарядом клеточной мембраны. Был разработан экспериментальный дизайн и отработаны процедуры электрофореза в свободном объеме и микродель-электрофореза. Определено, что к отрицательному полюсу всегда движется большее

количество клеток, взаимодействующих с TAMRA-ДНК зондом. Далее проведен анализ влияния блокировки отрицательного заряда клеток положительно заряженным красителем на их способность взаимодействовать с TAMRA-ДНК зондом. Показано, что обработка красителем не влияет или незначительно влияет на взаимодействие экстраклеточной дцДНК и клетки. **Как следствие: доказательство общего положительного заряда ОСК.**

3. Определение элементов клеточной мембраны, обеспечивающих «положительный» заряд ОСК. Установив, что TAMRA-ДНК зонд взаимодействует с положительно заряженными клетками, и связав этот факт с ранее полученными результатами, где было показано, что гепарин блокирует взаимодействие TAMRA-ДНК и клетки, были повторены аналогичные эксперименты на исследуемых моделях клеток. Показано, что гепарин блокирует взаимодействие клетки и TAMRA-ДНК. Это означало, что: (1) гепарин и экстраклеточная дцДНК конкурируют за один и тот же фактор клеточной мембраны; (2) гепарин-связывающие домены мембранных белков ОСК обеспечивают общий положительный заряд клеточной поверхности.

4а. На плазматической мембране имеется несколько групп факторов, связывающих гепарин. Описаны **три экспериментально подтвержденных сайта связывания гепарина, присутствующих на протеогликанах/гликопротеинах (PG/GP), скавенджер-рецепторах (SR), гликозилфосфатидилинозитол-заякоренных белках (GPI-AP),** расположенных на поверхности клеток и составляющих три различных функциональных группы элементов клеточной мембраны. Указанные белки имеют существенно отличающиеся линейные размеры. PG/GP могут достигать 1.5 МДа, и именно эти белки составляют основу гликокаликса, который хорошо развит в ОСК (Pries et al., 2000; Reitsma et al., 2007; Becker et al., 2010). Белки SR и GPI-AP в 10–30 раз меньше протеогликанов по своим линейным размерам.

Далее был сформулирован ряд принципиальных вопросов: является ли взаимодействие экстраклеточной дцДНК с факторами клеточной поверхности обязательным условием интернализации? Всегда ли связывание приводит к интернализации, или, возможно, это два независимых процесса? Происходят ли эти два процесса с участием одних и тех же, или разных факторов?

Для ответов на поставленные вопросы были проведены эксперименты с «подстрижкой» элементов клеточной поверхности (гликокаликса) протеолитическими ферментами: протеиназой К (PrK), трипсином, коллагеназой и декстрансульфатом 500 000 с последующим анализом связывания TAMRA-ДНК зонда с поверхностью клеток и его интернализации внутрь клетки.

4b-с. Было установлено, что после обработки PrK, дальнейшей конкуренции гепарина и ДНК за сайты связывания не происходит. При этом TAMRA-ДНК зонд продолжает интернализироваться в клетки.

5. При помощи использования набора блокаторов различных типов эндоцитоза было установлено, что **в акте интернализации принимают участие кавеолы и макропиноцитоз.** Кавеолы характеризуются кластеризацией в них SR, GPI-AP. PG/GP и могут располагаться в различных местах на цитоплазматической мембране. При этом молекулы PG/GP по своим линейным размерам в 10–100 раз больше размеров SR и GPI-AP.

6. Сравнивая результаты, полученные в пунктах 5 и 6, было сделано заключение, что PrK гидролизует белковые компоненты гликокаликса, не достигая непосредственно цитоплазматической мембраны, а останавливаясь на определенной «высоте» от нее из-за стерических затруднений, создаваемых структурами гликокаликса (разветвленностью сиаловых кислот), что ограничивает глубину гидролиза. В то же время интенсивность флуоресценции меченого материала внутри клетки имеет, по-видимому, определенные ограничения, выйти за которые невозможно даже при избыточном поверхностном связывании.

И наконец, результаты, полученные в пунктах 5 и 6, позволили однозначно различить факторы, ответственные за связывание TAMRA-ДНК зонда и его интернализацию. Воздействие PrK приводит к «отрезанию» участков связывания гепарина/дцДНК, находящихся в составе PG/GP, в то время как участки связывания ДНК на SR и/или GPI-AP остаются вне досягаемости протеазы. Получается, что участки связывания гепарина/дцДНК на PG/GP в первую очередь ответственны за связывание молекул дцДНК с поверхностью клетки и, как следствие, интенсивную флуоресценцию ОСК (что позволяет отличать их от основной массы опухолевых клеток). Участки связывания дцДНК на SR и/или GPI-AP ответственны за интернализацию дцДНК внутрь клетки.

7a. Проведенный анализ литературы показал, что декстрансульфат 500 000 должен блокировать все доступные сайты связывания гепарина и дцДНК, в первую очередь на SR (Basu et al., 1979; Harris and Weigel, 2008; Nishinaka et al., 2020).

7b. Оказалось, что декстрансульфат 500 000 фактически полностью блокирует как связывание (интенсивная флуоресценция ОСК), так и интернализацию TAMRA-ДНК (qPCR-анализ), что подтверждает участие положительно заряженных доменов во взаимодействии ОСК с экстраклеточной дцДНК.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Разработка режима воздействия «Каранахан»

На протяжении 12 лет проводились исследования, направленные на понимание принципов комбинированного воздействия на прогрессирующую опухоль кросслинкирующего цитостатика циклофосфана (ЦФ) и препаратов двуцепочечной ДНК (дцДНК). Работа знаменовалась несколькими следующими один за другим прорывами в понимании ключевых деталей такого воздействия. В настоящем приложении приводится последовательность осмысления принципов и механизмов нового терапевтического режима. В конечном итоге новый режим получил название «Каранахан», что в переводе с санскрита означает «убивающий причину». Это название было выбрано, исходя из принципа: «как назовешь корабль, так он и поплывет».

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

1. Вводная информация

В настоящее время считается доказанным существование опухолевых стволовых клеток (ОСК), обуславливающих прогрессию опухоли и ее устойчивость ко многим химиотерапевтическим цитостатикам (раздел 1.2). Разработка терапевтического режима «Каранахан» представляет собой полномасштабное исследование, направленное на обоснование стратегии противораковой терапии, основанной на эрадикации ОСК.

Доказательные экспериментальные работы проводили с использованием модели карциномы мыши Кребс-2. На первом этапе исследования было охарактеризовано циторедуцирующее действие инъекций ЦФ, дцДНК и их сочетания на популяцию ОСК асцита Кребс-2 мыши. Для этого оценивали перевивочный потенциал опухолевых клеток Кребс-2, обрабатываемых *in vivo* в мышцах-асцитоносах линии СВА/Лас, с последующей перевивкой обработанных клеток в форме солидного графта реципиентным мышам той же линии. Данные по перевивке обработанного ЦФ и дцДНК асцита Кребс-2 позволили предположить, что ОСК можно полностью эрадицировать из развитого асцита.

Для клеток Кребс-2 установлено, что 18 ч после введения ЦФ является переломной точкой процесса репарации межцепочечных сшивок (МЦС), разделяющей его на два временных отрезка: эксцизионную репарацию нуклеотидов (NER, nucleotide excision repair), сопровождающуюся процессингом МЦС и формированием двуцепочечных разрывов (ДЦР), и

гомологичную рекомбинацию (HR, homologous recombination) (подробности в разделе 3.7.1.1). Оба временных интервала могут быть эффективно использованы для разрушения опухолевого потенциала трансплантата. ЦФ в виде монопрепарата оказывает наиболее эффективное редуцирующее действие на развитие асцитного трансплантата в режиме нескольких инъекций. Для достижения максимальной эффективности время повторного введения цитостатика должно накладываться на время достижения опухолевыми клетками, находящимися при первой инъекции ЦФ в фазе G2/M, фазы G1/S.

2. Воздействие обработки циклофосфаном в виде монопрепарата и в комбинации с ДНК на CD34+ клетки асцита Кребс-2

Одним из первостепенных вопросов, касающихся воздействия ЦФ и дцДНК на ОСК, был вопрос эффективности эрадикации ОСК, захватывающих дцДНК и находящихся под воздействием ЦФ, в режиме монопрепаратов и в комбинированном действии. Возможность длительного нахождения (до 14 суток) молекул экстраклеточной ДНК в реципиентной клетке (Dolgova et al., 2012), не позволяла напрямую оценить состояние TAMRA+ клеток в асците у мышей, которым вводили препарат дцДНК. Под термином «TAMRA+ клетки» подразумеваются клетки, интернализирующие экстраклеточную дцДНК (TAMRA-ДНК зонд). В этой связи были проведены эксперименты по оценке воздействия двух препаратов на клетки асцита Кребс-2, способных интернализировать фрагменты дцДНК, с использованием антител к поверхностному маркеру CD34, который, как оказалось, присутствует на ОСК Кребс-2.

Как было показано в работе (раздел 3.3.1.2), популяция клеток, способных интернализировать TAMRA-ДНК зонд, на 40 % перекрывается с популяцией клеток, несущих маркер CD34. При этом ~90 % CD34+ клеток обладают способностью к интернализации экстраклеточной ДНК. Это означало, что обнаружение снижения доли CD34+ при проведенных обработках с определенной вероятностью будет свидетельствовать об эрадикации TAMRA+ ОСК. Однако нельзя исключить возможность воздействия указанных обработок на CD34+ клетки, не способные захватывать TAMRA-ДНК зонд, что подразумевает относительность указанной оценки.

Было проведено несколько экспериментов по оценке изменения процентного содержания CD34+ клеток в обработанном асците (**Рисунок 1**). В данной серии экспериментов использовали 12-кратные ежекратные инъекции суммарной нативной ДНК человека в режиме 1–12 ч (0.5 мг/инъекцию) после обработки ЦФ (200 мг/кг) мышей с развитым асцитом Кребс-2.

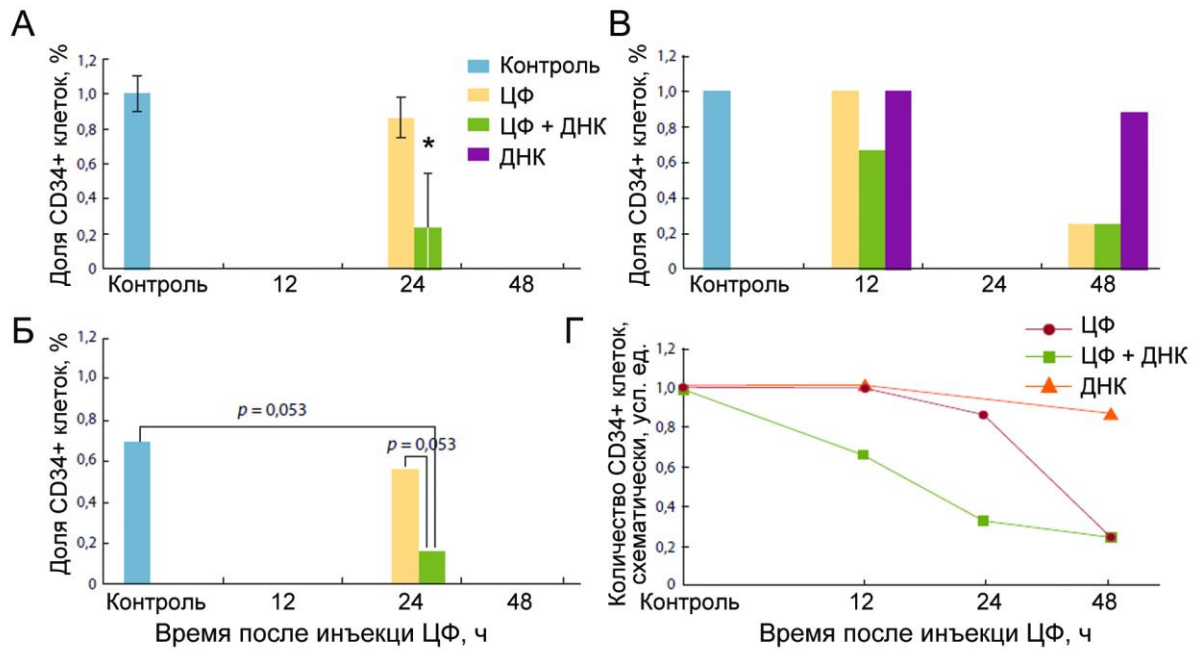


Рис. 1. Анализ динамики процента CD34+ клеток в асците Кребс-2, развивающемся в мышах, после обработки ЦФ и препаратом дцДНК. «ЦФ» – однократная инъекция ЦФ (200 мг/кг); «ЦФ+ДНК» – инъекция ЦФ (200 мг/кг) и 12 инъекций препарата ДНК человека через каждый час после инъекции ЦФ по 0.5 мг на инъекцию; «ДНК» – 12 ежекратных инъекций препарата ДНК человека по 0.5 мг на инъекцию; «Контроль» – интактный асцит до обработок. Точка отсчета (0 ч) – время инъекции ЦФ или первой инъекции ДНК. **А)** FACS-анализ доли CD34+ клеток в контроле (до инъекций) и через 24 ч после инъекций ЦФ или ЦФ+ДНК. Приведено Mean $\pm$ SD, $n = 3$, $*p < 0.05$, one-way ANOVA, критерий Краскела-Уоллиса. **Б)** Аналогичный анализ, выполненный с использованием флуоресцентной микроскопии. **В)** FACS-анализ доли CD34+ клеток в контроле (до инъекций) и через 12 и 48 ч после инъекций ЦФ или ЦФ+ДНК. **Г)** Схематическое изображение изменения доли CD34+ клеток в течение двух суток в асците Кребс-2 на фоне инъекций ЦФ, ЦФ+ДНК и ДНК. График построен с учетом результатов трех независимых экспериментов («А-В»).

При анализе полученных результатов можно сделать следующие выводы. К 48 ч обработка *in vivo* асцита как ЦФ, так и его сочетанием с препаратом дцДНК человека приводит к снижению процента CD34+ клеток в 5 раз по сравнению с контрольным (исходным) значением (0.2 % против 1 %) (**Рисунок 1 В**). Полного исчезновения этого типа клеток не происходит. На отрезке времени 0–48 ч обнаружена разница в динамике изменения доли CD34+ клеток при обработке одним ЦФ и в комбинации с дцДНК человека. В точке 24 ч при обработке асцита ЦФ в сочетании с дцДНК процент CD34 клеток достоверно снижается ($p < 0.05$), в то время как при обработке одним ЦФ с контролем достоверной разницы нет (**Рисунок 1 А-В**). В целом можно отметить более выраженное снижение процента CD34+ клеток в случае обработки ЦФ+ДНК по сравнению с действием одного ЦФ (**Рисунок 1 Г**). Кроме того, из проведенного

анализа следует, что препарат ДНК в форме монопрепарата практически не действует на CD34+ ОСК Кребс-2.

Такая картина могла означать, что более сильное воздействие на данный тип клеток оказывает совместная обработка ЦФ и дцДНК, и что клетки, интернализирующие дцДНК и одновременно позитивные по CD34, более чувствительны к используемому воздействию. Таким образом, обработка асцита Кребс-2 препаратом нативной ДНК человека в режиме 1–12 ч после воздействия ЦФ или удаляет TAMRA+ клетки, или меняет их функциональное состояние, что в обоих случаях сопровождается снижением доли клеток, несущих поверхностный маркер CD34.

3. Влияние синергичного действия циклофосфана и препаратов дцДНК на перевивочный потенциал клеток асцита Кребс-2

Для оценки эффекта комбинированного воздействия ЦФ и ЦФ+ДНК, которое подразумевало эрадикацию TAMRA+ клеток (ОСК, характеризующихся захватом TAMRA-ДНК зонда) или изменение их функционального состояния, были проведены эксперименты по перевивке в форме солидного трансплантата мышам опухолевых клеток, обработанных непосредственно в асците (*in vivo*). Как известно, ОСК ответственны за способность опухолевых клеток при перевивке формировать графт, имеющий гистологические и морфологические характеристики, аналогичные исходной опухоли. В связи с этим подразумевалось, что в случае эрадикации ОСК (TAMRA+ клеток) синергичным воздействием препаратов ЦФ и дцДНК, оставшиеся опухолевые клетки потеряют свой опухолевый потенциал, и солидный графт развиваться не будет.

Асцит Кребс-2 *in vivo* обрабатывали препаратами нативной дцДНК человека в режиме 12-кратных ежекратных инъекций (0.5 мг/инъекцию): ЦФ+ДНК (1–12), ЦФ+ДНК (18–30), или однократной инъекции: ЦФ+ДНК (18). А также дцДНК спермы лосося (salmon sperm ДНК, *ssДНК*) в смеси кросслинкированная ssДНК/нативная ssДНК (2–3/5) в режиме ЦФ+ssДНК (18–30), после чего выделенные асцитные клетки перевивали в виде солидного трансплантата мышам той же линии (**Рисунок 2**).

В проведенных исследованиях удалось полностью элиминировать опухолевый потенциал асцитных клеток, что привело либо к значительному увеличению латентного периода появления графта по сравнению с контролем, либо к его полной неприживаемости.

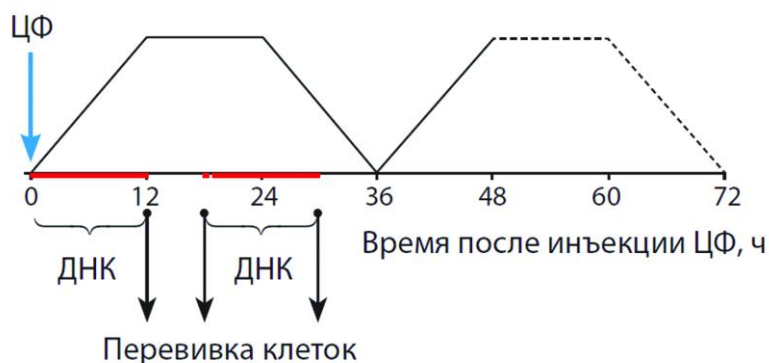


Рис. 2. Обобщенная схема эксперимента по оценке опухогенного потенциала клеток асцита Кребс-2, обрабатываемого *in vivo*. Отображены обработки экспериментальных мышей ЦФ (синяя стрелка), препаратами ДНК (красные отрезки) и точки забора клеток для последующей трансплантации здоровым животным в виде солидных опухолей (черные стрелки). Кривые над осью схематично отображают репаративный цикл клеток Кребс-2 (0–12 ч – накопление ДЦР, 12–24 ч – фаза «ожидания», 24–36 ч – репарация ДЦР и снижение их количества до базового уровня).

В синергизме с ЦФ в фазе репарации NER (1–12 ч после введения ЦФ) при интерференции процесса репарации МЦС препаратом суммарной нативной дцДНК человека, попавшим в ОСК, последние теряют жизнеспособность или изменяют свой функциональный статус. Перевивка 40–50-кратного избытка клеток от количества, необходимого для стабильного формирования графта (30 000 клеток), не приводит к развитию солидного трансплантата (**Рисунок 3 А, Б-1**). Также установлен факт, что единственная инъекция дцДНК человека через 18 ч после введения ЦФ разрушает опухогенный потенциал перевиваемого графта в количестве 300 тыс. клеток. У трех из пяти опытных животных опухоль не появилась после 60 дней наблюдения (**Рисунок 3 А, Б-2**).

В рассматриваемой серии экспериментов было отмечено следующее противоречие. В комбинации с ЦФ в фазе HR (в 18–30 ч после введения ЦФ) при интерференции процесса репарации МЦС фрагментами нативной дцДНК человека, попавшими в ОСК, корректность репаративного процесса сохраняется, и ОСК выживают более эффективно, чем при действии одного ЦФ (**Рисунок 3 А, Б-3**). Происходит стимуляция развития солидного трансплантата, который приживается в 100 % перевивочных экспериментов.

В комбинации с ЦФ в фазе репарации HR (18–30 ч после введения ЦФ) при использовании смеси ssДНК (2/5) происходят события, интерферирующие процесс репарации таким образом, что разрушается опухогенный потенциал опухолевых клеток. Было проведено две серии экспериментов. В обоих случаях клетки асцита обрабатывали ЦФ и смесью ssДНК *in vivo*. Затем в первой серии клетки перевивали для получения солидной опухоли и оценивали

скорость ее роста (Рисунок 3 Б-4). Во второй серии – в виде асцита и анализировали его развитие или ремиссию (Рисунок 3 Б-5).

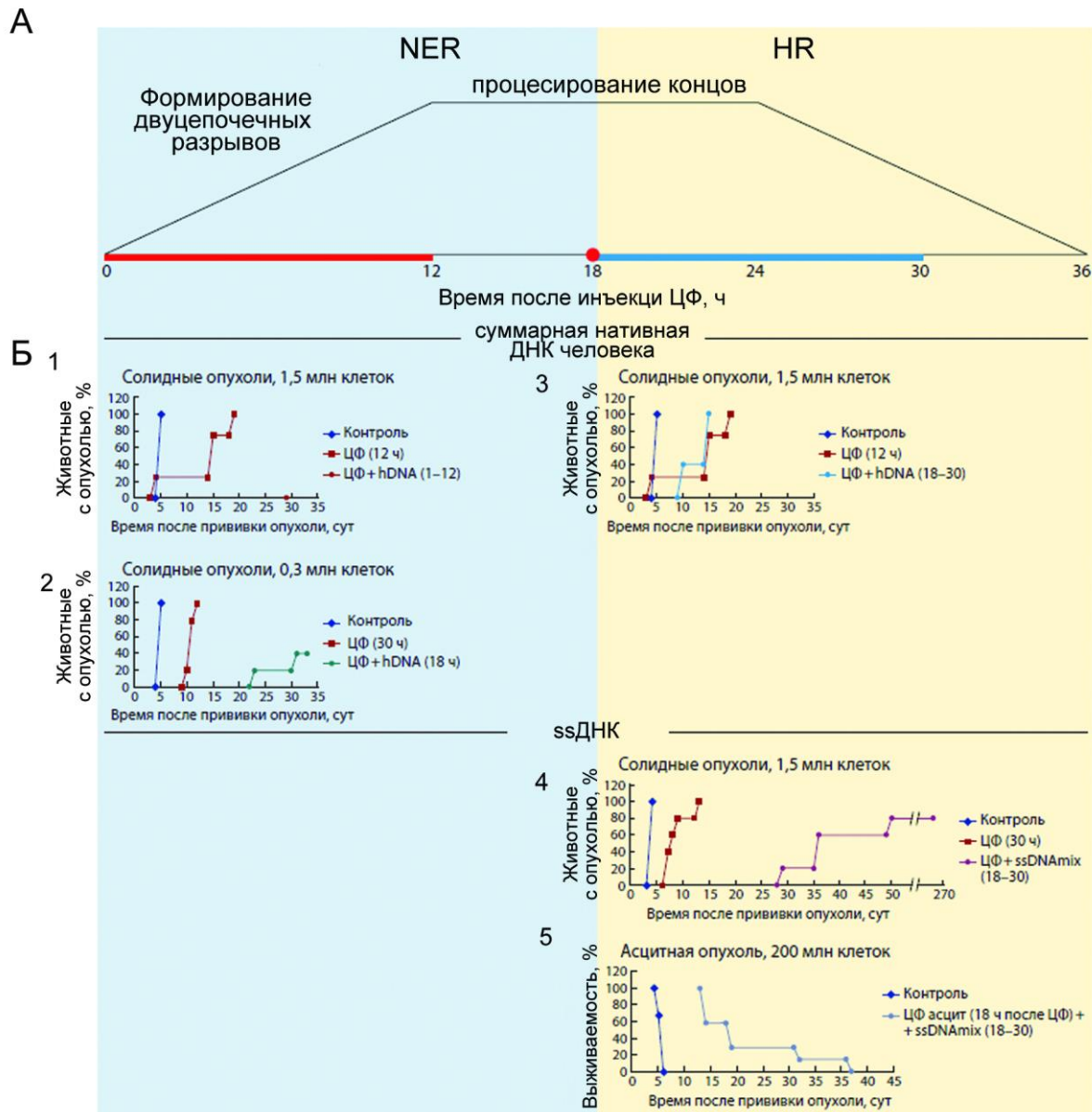


Рис. 3. Результаты противоопухолевого эффекта совместных обработок ЦФ и препаратами ДНК, выполненных в разные фазы репарации межцепочечных сшивок, полученные на клетках асцита Кребс-2. Данные на графиках приведены в сравнении с контролем и действием только ЦФ. **А)** Схематическое изображение фаз репаративного процесса в клетках Кребс-2 (черная кривая) и наложение на него режимов введения препаратов дцДНК (красные и синие отметки); красный цвет – введение нативного препарата ДНК человека, синий – введение смеси кросслинкированной и нативной ДНК лосося в соотношении 3/5 (ssДНК). **Б)** 1–4 – Динамика появления опухолей при перевивке в виде сплошных внутримышечных трансплантатов клеток, обработанных *in vivo* ЦФ и препаратами ДНК. Количество перевиваемых клеток указано над графиком, $n = 5$. 5 – Динамика гибели экспериментальных животных с асцитной формой опухоли Кребс-2 после проведенных обработок; количество исходно перевитых клеток асцита указано над графиком, $n = 5$.

При перевивке солидных опухолей у одной из пяти мышей солидный трансплантат не сформировался к 270-м суткам наблюдения (**Рисунок 3 В-4**). У остальных мышей трансплантат формировался последовательно, в зависимости от степени сохранившегося туморогенного потенциала, на протяжении длительного промежутка времени. В этом случае наблюдается ярко выраженное количественное изменение признака (разрушение способности индуцировать развитие новой опухоли).

В случае перевивки асцитой опухоли также наблюдались события, характеризующие наличие интерференции процесса репарации таким образом, что в значительной степени редуцировался туморогенный потенциал перевиваемого асцитного трансплантата (**Рисунок 3 В-5**). В анализируемом эксперименте количество перевитых клеток составляло 200 млн, что соответствовало четырехсуточному асциту. Средняя продолжительность жизни животных в экспериментальной группе (после обработки ЦФ и смесью ssДНК 18–30 ч) в четыре раза превысила этот показатель по сравнению с контрольной группой, в которой мыши погибли на 4–6-е сутки после перевивки асцита. В экспериментальной группе у 70 % животных асцит развивался последовательно и медленно, и эти мыши погибли к 19-м суткам эксперимента. Одна мышь погибла без каких-либо признаков асцита. У двух мышей вторичный асцит не развивался до 27-х суток. У одного из этих животных к 24-м суткам от начала эксперимента в месте введения иглы сформировался солидный трансплантат в форме нескольких подкожных узлов, повторяющих путь движения иглы. Максимальная продолжительность жизни одной мыши из группы составила 42 дня.

Полученные данные позволили предположить, что обработки разными препаратами дцДНК и при разных режимах введения могут приводить к одному и тому же результату – полной эрадикации в обработанном асците (или полному изменению функционального статуса) всех ОСК, что сопровождается потерей или значительным снижением туморогенного потенциала перевиваемого графта.

Из полученных результатов также следует, что 18 ч после введения ЦФ является «переломным моментом» репаративного процесса, разделяющим его на две фазы. В первой фазе репаративного процесса (NER, формирование ДЦР) обработка препаратом нативной дцДНК человека убивает туморогенную опухолевую клетку или меняет ее статус. Во второй фазе репаративного процесса (HR) этот же препарат сохраняет жизнеспособность ОСК и стимулирует рост опухоли. При этом смесь кросслинкерованной и нативной ssДНК во второй фазе репаративного процесса (HR) приводит к частичной или полной эрадикации ОСК или изменению ими злокачественного статуса и потере графтом туморогенности.

Полученные данные предполагали, что ОСК можно полностью эрадикаровать из асцита Кребс-2.

4. Действие циклофосфана как монопрепарата в режиме нескольких инъекций, привязанных к репаративному циклу, на развитие асцита Кребс-2

Было очевидным, что цитостатик ЦФ обладает циторедуцирующим эффектом при обработке перевитого трансплантата Кребс-2. В этой связи были выполнены эксперименты по оценке действия инъекций ЦФ в качестве монопрепарата на развитый асцитный трансплантат в режиме нескольких инъекций, привязанных к репаративному циклу (Рисунок 4).

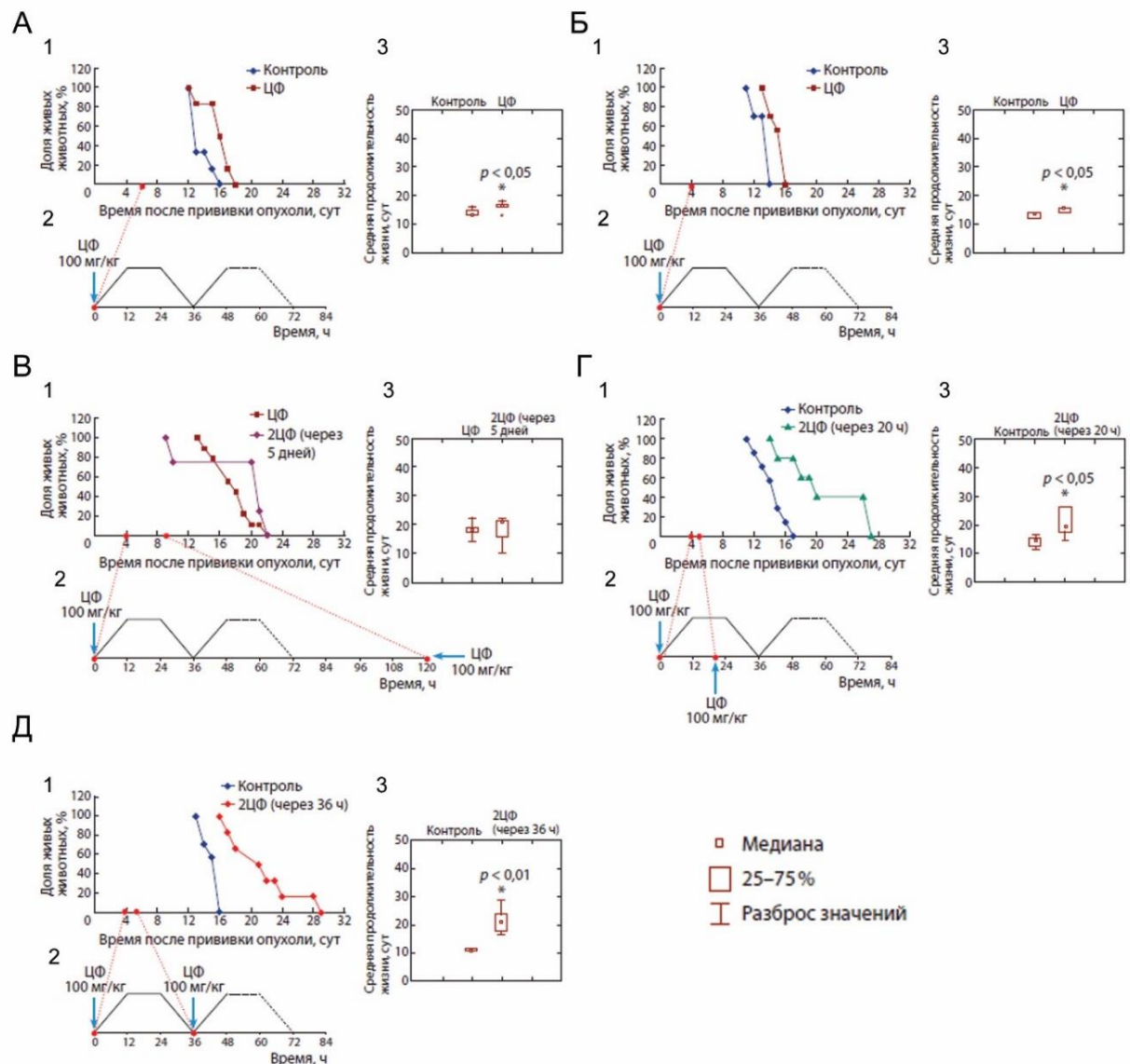


Рис. 4. Анализ терапевтического воздействия различных схем инъекций цитостатика ЦФ на развитый трансплантат асцита карциномы мыши Кребс-2. 1 – Динамика гибели экспериментальных животных с асцитной опухолью; 2 – схема введения препаратов. Линии над осью «время» отображают накопление и снижение количества ДЦР в опухолевых клетках

(схематичное представление репаративного цикла); 3 – средняя продолжительность жизни экспериментальных животных после проведенных обработок (критерий Манна-Уитни). **А)** Обработка шестисуточного асцита, линия мышей СВА/Лас. **Б)** Обработка четырехсуточного асцита, линия мышей С57В1. **В-Д)** Различные режимы обработок четырехсуточного асцита Кребс-2 цитостатиком ЦФ.

ЦФ вводился одно- или двухкратно, что указано в конкретных экспериментах. Одноразовая доза ЦФ составляла 100 мг/кг веса животного. Выбор промежутков времени инъекций ЦФ был связан с экспериментально обнаруженным временем появления и снижения количества индуцированных ЦФ интермедиатов репарации – ДЦР, и был привязан к нему.

В начальных экспериментах на линиях С57В1 и СВА/Лас (**Рисунок 4 А, Б**) было показано, что инъекции ЦФ в монорежиме увеличивают продолжительность жизни последнего животного в группе (max) на двое суток, или на ~13 %. Медианы продолжительности жизни с контролем различались незначительно. Эти два показателя использовались в дальнейшем для характеристики эффективности режимов.

Как следует из описанных выше результатов, молекулы нативной ДНК человека не принимают компенсирующего участия в репаративном процессе в фазе HR (**Рисунок 3 Б-3**). Можно было полагать, что некоторое торможение роста опухоли при инъекциях нативной ДНК человека в режиме 18–30 ч связано с конфликтом между молекулярной машиной (активированная система репарационных белков), запускаемой воздействием цитостатика, и молекулярной машиной, активируемой в ответ на появление экстраклеточных фрагментов ДНК. Это наблюдение подразумевало возможность аналогичного действия двух независимых инъекций ЦФ, проведенных в различные фазы репарации МЦС. Предполагалось, что при второй инъекции ЦФ в фазу HR будут индуцироваться новые повреждения ДНК, которые будут заново активировать механизм формирования ДЦР и NER. Молекулярные машины обеих систем вступят в конфликт, и полученный результат будет подобен действию экстраклеточной ДНК.

Для проверки этой гипотезы была проведена серия экспериментов с использованием двухкратных инъекций ЦФ. Показано, что инъекции двух ЦФ (вторая – на 5-е сутки) действуют так же, как и одна инъекция ЦФ. Последние животные погибают одновременно как в группе ЦФ, так и в группе 2×ЦФ (вторая – на 5-е сутки) (**Рисунок 4 В**). Повторная инъекция ЦФ в 36 ч (обнаружение МЦС популяцией опухолевых клеток, находящихся в момент первой инъекции ЦФ в поздней G2 или М-фазе клеточного цикла), увеличивает продолжительность жизни последнего животного (max) на 10–17 дней, или на 58–141 % по отношению к таковой

последнего животного в контроле (**Рисунок 4 Г** – «2×ЦФ (через 20 ч)»; Д – «2×ЦФ (через 36 ч)»).

Существует одно из мнений касательно репаративного процесса, вызываемого воздействием кросслинкирующих цитостатиков, например, ЦФ, что индуцированные МЦС в клетках, находящихся в G2/M-фазе клеточного цикла, распознаются и начинают репарироваться только при достижении клетками G1/S-фазы. То есть клетка способна завершить митоз, имея МЦС внутри молекул ДНК, только если такая сшивка случайно не образовалась между нитями ДНК разных хромосом, что физически помешает их расхождению при делении (Akkari et al., 2000). Возможность завершать митоз клетками, находящимися под воздействием цитостатика, также подтверждалась наличием второй волны образования ДЦР при анализе репаративного цикла на примере клеток костного мозга мышей (Dolgova et al., 2012a, b).

То есть, как предполагается, благодаря гетерогенности исходной популяции клеток первая волна ДЦР формируется в клетках, находящихся в момент обработки цитостатиком в G1/S-фазе клеточного цикла. Вторая волна, составляющая 15–20 % от первой, образуется в клетках, находящихся в момент обработки в поздней G2 или M-фазах клеточного цикла, и перешедших в чувствительную G1/S-фазу. Кроме того, в настоящей работе показано, что интернализация экстраклеточной ДНК в клетки Кребс-2 имеет два пика, что связано с невозможностью интернализации в G2/M-фазе клеточного цикла (раздел 3.3.1.3).

В сумме данные свидетельствовали о том, что для эффекта «полной интерференции» репарации МЦС, охватывающей всю популяцию ОСК, нужно проводить терапевтическую обработку препаратами ЦФ и дцДНК как минимум дважды. При повторной терапии в промежуток времени 36–48 ч будет оказано воздействие на ОСК, которые при первой инъекции ЦФ были в поздней G2 или M-фазах. Следует помнить, что часть ОСК могут находиться в G0-фазе, и что они в этом случае будут неуязвимы до выхода из покоящегося состояния и прохода по пролиферативному циклу.

Полученные данные предполагают, что в схемах лечения асцита Кребс-2 нужно использовать несколько последовательных инъекций ЦФ, перекрывающих чувствительные к обработке ЦФ и ЦФ в комбинации с ДНК фазы клеточного цикла.

II. Поиск и характеристика режимов терапии асцитной карциномы Кребс-2 циклофосфаном и препаратами двуцепочечной ДНК, обеспечивающих эрадикацию первичного асцита

1. Характеристика токсического синергичного действия циклофосфана и препаратов кросслинкерованной ДНК лосося и человека на развитый асцит Кребс-2

Далее были протестированы многочисленные режимы воздействия ЦФ и препаратов дцДНК на асцитную форму опухоли Кребс-2 *in situ* на мышах линий C57Bl и CBA/Lac.

В работе (Alyamkina et al., 2015) было показано, что многократные инъекции дцДНК в монорежиме и в синергизме с ЦФ смертельно токсичны для экспериментальных животных с опухолью более 3 см³. Также такие обработки приводят к скоротечной синхронной гибели мышей с асцитом старше 7 суток (Alyamkina et al., 2015). Тем не менее, отсутствие развития перевиваемого графта при 12-кратных обработках нативной ДНК человека (**Рисунок 3 Б-1**) предполагало возможность вылечивания мышей от асцитной формы опухоли Кребс-2.

Также оказалось, что ежечасные инъекции кросслинкерованной ssДНК мышам с асцитом в возрасте 4–5 суток в режиме 18–30 часов в суммарной дозе 6 мг после инъекции ЦФ смертельно токсичны для животных (**Рисунок 5 А**).

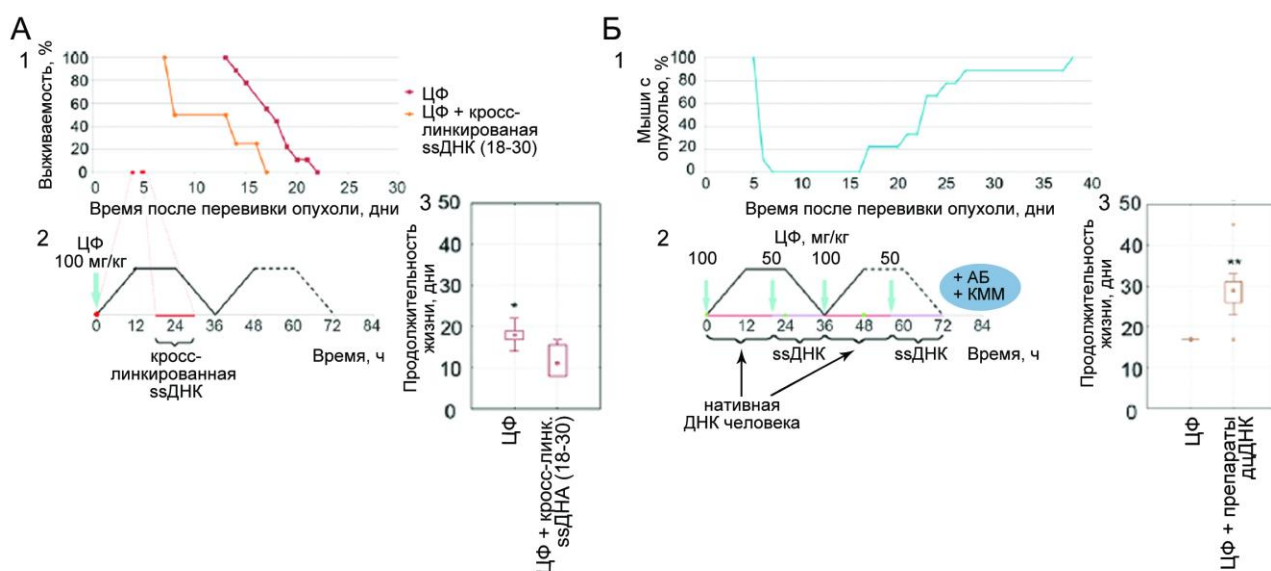


Рис. 5. Анализ терапевтического воздействия инъекций цитостатика ЦФ в сочетании с препаратами дцДНК на мышей с асцитом Кребс-2. **А)** Терапия 4-суточного асцита Кребс-2 ЦФ и препаратом кросслинкерованной ssДНК в режиме 18–30 часов после инъекции ЦФ в сравнении с инъекцией только ЦФ, выполнен на линии CBA. **Б)** Терапия 4-суточного асцита Кребс-2 ЦФ и препаратами суммарной ДНК человека и смесью кросслинкерованной и нативной ssДНК. Схема дополнена трансплантацией клеток костного мозга (ККМ) и введением антибиотика (АБ) гентамицина, направленными на предотвращение развития системной воспалительной реакции. 1 – Динамика гибели экспериментальных животных с асцитной опухолью (А) или график, отображающий ремиссию заболевания (Б); 2 – схема введения препаратов. Линии над осью «время» отображают накопление и снижение количества ДЦР в опухолевых клетках (схематичное представление репаративного цикла); 3 – средняя

продолжительность жизни экспериментальных животных после проведенных обработок * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$, критерий Манна-Уитни.

В то же время использование смеси нативной и кросслинкированной ssДНК приводило к достоверному увеличению средней продолжительности жизни животных ($p < 0.01$). Установлено, что повторные инъекции ЦФ, дополненные обработкой препаратами дцДНК, имеют наиболее выраженный противоопухолевый эффект. Так, последовательные ежекчасные инъекции нативной дцДНК человека мышам с асцитом в возрасте 4–5 суток в режиме 1–12 часов после инъекции ЦФ в суммарной дозе 6 мг и продолжающие их ежекчасные инъекции смеси нативной и кросслинкированной ssДНК в режиме 18–30 часов после инъекции ЦФ в суммарной дозе 6 мг приводили к регрессии асцита у всей группы экспериментальных животных, с последующей ремиссией (до 5 суток) (**Рисунок 5 Б**).

Однако такая терапия всегда сопровождалась рецидивами заболевания, а также режимы с многократным введением препаратов дцДНК были смертельно токсичными для животных. В данной серии экспериментов для спасения животных применялась антибиотиковая терапия, внутривенное введение клеток костного мозга после терапии и дополнительная глюкозная диета (**Рисунок 5 Б**). Также проколы брюшной стенки при многократных терапевтических инъекциях препаратов не позволяли избежать развития вторичной опухоли в асцитной или солидной форме, что, по-видимому, было связано с миграцией клеток асцита в близлежащие ткани или сохранением жизнеспособности ОСК. Проведенные патоморфологические исследования свидетельствовали о том, что, помимо вторичных опухолей, гибель животных определяет развивающаяся системная воспалительная реакция и ее терминальная стадия – полиорганная недостаточность (данные не приведены).

2. Режим однократной инъекции препарата дцДНК

Полученные данные свидетельствовали, что: (1) повторное, привязанное к репаративному циклу, введение препаратов ЦФ и дцДНК воздействует на клетки, находившиеся во время предыдущих обработок в нечувствительной фазе клеточного цикла G2/M; (2) комбинированное введение ЦФ и препаратов нативной ДНК человека и смеси кросслинкированной и нативной ssДНК приводит к полной резорбции первичного асцита у всей экспериментальной группы животных, сопровождающейся 5-суточной стадией ремиссии; (3) все используемые схемы показали смертельную токсичность.

Было сделано предположение, что если взять смесь трех ДНК (суммарной нативной ДНК человека, нативной ssДНК и кросслинкированной ssДНК) в определенных пропорциях и

вводить ее **однократно** в точку демаркации двух фаз репаративного процесса NER и HR (18 часов от инъекции ЦФ), то одна составляющая препарата будет интерферировать завершение репарации в клетках, находящихся в фазе NER, тогда как вторая будет препятствовать активации HR в клетках, к 18 часам уже вышедших из NER. Предполагалось, что таким образом будет возможно сохранить терапевтический эффект и снизить токсичность процедуры.

В этой связи был разработан и экспериментально апробирован оптимальный состав препарата на основе дцДНК, состоящий из трех композиций: нативная дцДНК человека, нативная ssДНК и кросслинкированная ssДНК в соотношении 7:5:2 (или 50 %, 36 % и 14 %) (препарат **ДНК-микс**, предмет собственности ООО «КАРАНАХАН», раздел 2.8 диссертации).

Так как двукратные инъекции ЦФ, привязанные к репаративному циклу опухолевых клеток, показали свою эффективность в повышении средней продолжительности жизни мышей с асцитом Кребс-2 (**Рисунок 4**), был выбран следующий режим обработки цитостатиком. Было принято решение провести трехкратную обработку, когда повторение инъекций ЦФ осуществляется каждый раз в конец репаративного цикла, активированного предыдущей обработкой (0, 36, 54 ч для клеток Кребс-2). Препарат ДНК-микс вводить в момент перехода стадии NER в HR (18 ч после инъекции ЦФ).

Опираясь на теоретические знания и практически полученные данные как ранее, так и в настоящей работе, такая обработка должна будет обладать следующими эффектами.

1) Три инъекции ЦФ, проведенные каждый раз в фазу окончания предыдущего репаративного цикла, воздействуют на все популяции клеток опухоли и последовательно охватят нечувствительные к действию цитостатика фазы репаративного процесса и фазы клеточного цикла, как коммитированных потомков, так и ОСК (при однократной инъекции всегда остается популяция клеток, находившаяся в момент обработки в G2/M нечувствительной фазе клеточного цикла).

2) Смесь трех типов дцДНК, эффект которых по отдельности был показан, будет оптимальным для воздействия на асцитную опухоль в режиме единичной инъекции суммарной дозы препарата в точку демаркации двух фаз процесса репарации МЦС.

3) Действие и ЦФ, и препарата ДНК-микс будет приводить к апоптозу еще большего количества опухолевых клеток Кребс-2.

Нативная ДНК человека, введенная через 18 часов после каждого следующего ЦФ, должна будет воздействовать на завершающие этапы NER и интерферировать каждую следующую NER. В свою очередь, кросслинкированная ssДНК будет воздействовать на начальные этапы HR и губительно для ОСК интерферировать каждую следующую HR фазу репарации. При таком действии туморогенный потенциал асцита будет снижаться или

полностью исчезнет. Предполагается, что нативная ssДНК будут купировать токсический эффект кросслинкированной ssДНК, механизм действия которого не определен.

Для проверки предложенной концепции была проведена обработка мышей с развитым 4–5 суточным асцитом с использованием трех инъекций ЦФ в точку «0» и период окончания предыдущего репаративного цикла: «36» и «54» часа, и инъекций сложнокомпозиционного препарата ДНК-микс (6 мг/инъекцию) через 18 ч после каждой обработки ЦФ. Оказалось, что проведенная терапия приводит к полной регрессии асцита и пятисуточной ремиссии у всей группы экспериментальных животных. Однако у всех мышей впоследствии развивается рецидив (Рисунок 6 А).

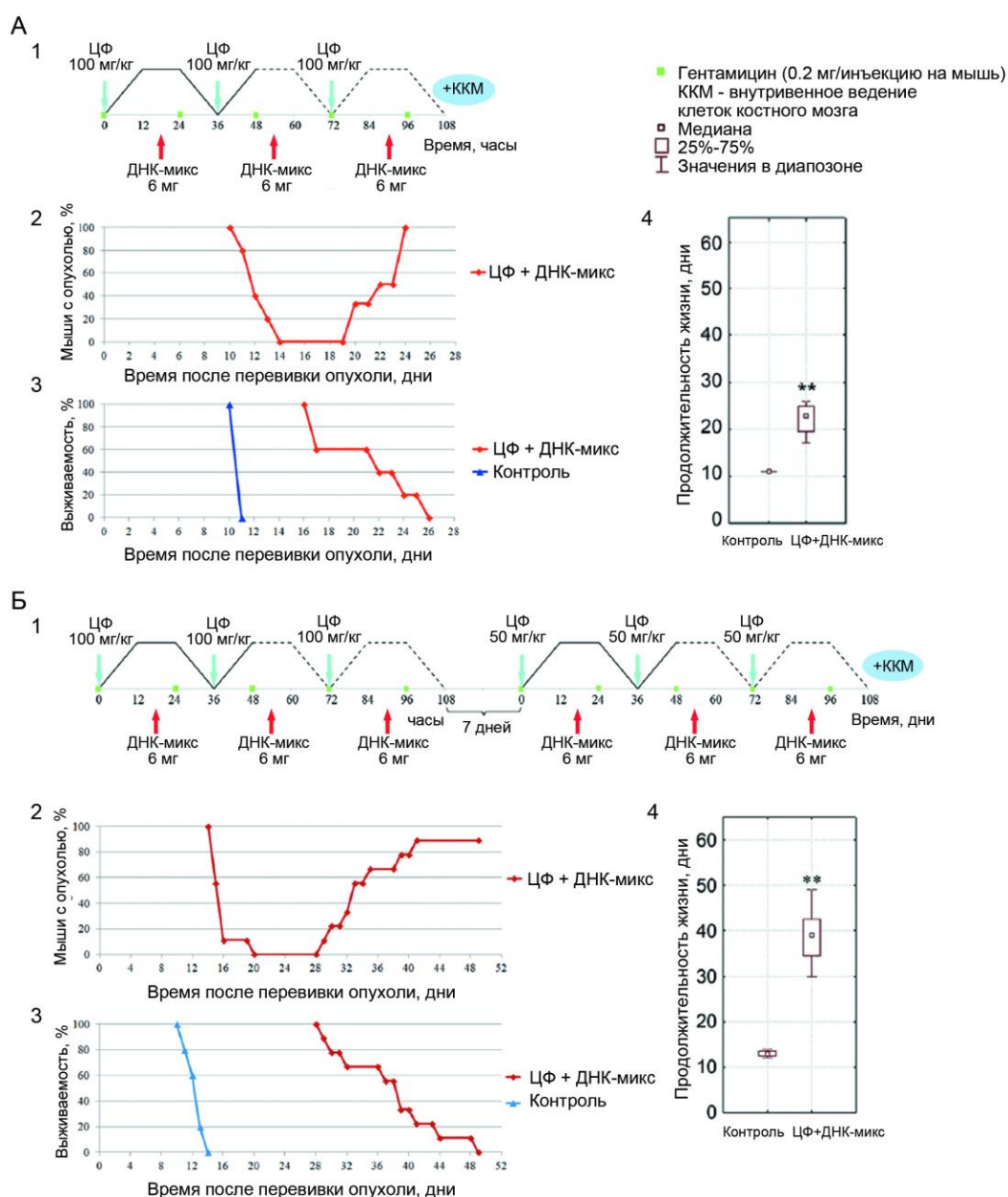


Рис. 6. Анализ синергического действия ЦФ и препарата ДНК-микс на развитый асцит Кребс-2. А) Синергичное действие препаратов в режиме: «три ЦФ (100мг/кг) + ДНК-микс», n = 5.

Б) Синергичное действие препаратов в режиме: «три ЦФ (100 мг/кг) + ДНК-микс» и через 7 суток повтор – «три ЦФ (50 мг/кг) + ДНК-микс» с последующей трансплантацией клеток костного мозга (ККМ), и введением антибиотика гентамицина, направленным на предотвращение развития системной воспалительной реакции, $n = 8$. 1 – Схема терапевтических инъекций. Линии над осью «время» отображают накопление и снижение количества ДЦР в опухолевых клетках (схематичное представление репаративного цикла); 2 – график, отображающий продолжительность ремиссии и возникновение рецидивов; 3 – кривые Каплана-Мейера; 4 – анализ средней продолжительности жизни животных в группах, $**p < 0.01$, критерий Манна-Уитни.

Предположили, что повторная аналогичная обработка в фазу начала ремиссии (определена по первому эксперименту как 11 сутки от прививки асцита и экстраполирована для обсуждаемого эксперимента) приведет к выживанию животных. Для предотвращения возможной передозировки цитостатика повторный цикл терапии проводился с дозой ЦФ 50 мг/кг. У всех мышей в группе наблюдался рецидив. Тем не менее, было установлено, что при втором цикле терапии в указанном режиме период ремиссии продлился (с 19 до 28 суток), что также сопровождалось увеличением средней продолжительности жизни экспериментальных животных (22 дня против 39) (**Рисунок 6 Б**).

Полученный результат означал, что повторная терапия усиливает противоопухолевое действие препаратов. Также была сформулирована концепция использования сложнокомпозиционного препарата на основе дцДНК – ДНК-микс. Если инъекция препарата ДНК-микс проводится в момент перехода NER в HR (18 часов после введения ЦФ), то составляющие препарата одновременно интерферируют конечные этапы NER и на начальные этапы HR. Повторение такой процедуры способствует усилению эффективности лечения. ОСК разрушаются или теряется их опухолевый потенциал, благодаря чему наблюдается длительный (до 28 суток) период ремиссии. Наличие рецидивов заболевания в 100 % случаев свидетельствует о том, что часть ОСК все же способны ускользнуть от терапевтического воздействия.

3. Анализ состояния опухолевых клеток после трехкратной обработки цитостатиком и препаратом ДНК-микс

Экспериментальные данные предполагали, что при всех проведенных процедурах всегда остается опухолевое начало опухоли, представляющее собой для асцита Кребс-2 TAMRA+ ОСК. В этой связи была проведена серия экспериментов, с последовательным ежедневным анализом состояния обработанных опухолевых клеток. Было проанализировано состояние клеточного цикла, и процентное содержание ОСК (TAMRA+ клетки).

При анализе состояния клеток после обработки цитостатиком было установлено, что последовательные 3-кратные инъекции ЦФ в используемые ранее временные точки (**Рисунок 6 А**) приводят к остановке клеточного цикла опухолевых клеток в S-фазе к 18 часам и сдвигу в позднюю S/G2/M на 54-й час эксперимента. На 90-й час эксперимента четкое деление клеток по количеству хроматина исчезает, а клеточный материал уходит в зону апоптотического «мусора» (эксперимент повторен дважды) (раздел 3.7.1.1).

К 7-м суткам от первой инъекции ЦФ происходит масштабное апоптотическое разрушение основной массы асцитных опухолевых клеток, что подтверждается микроскопическим и электрофоретическим анализом (**Рисунок 7 А, Б**).

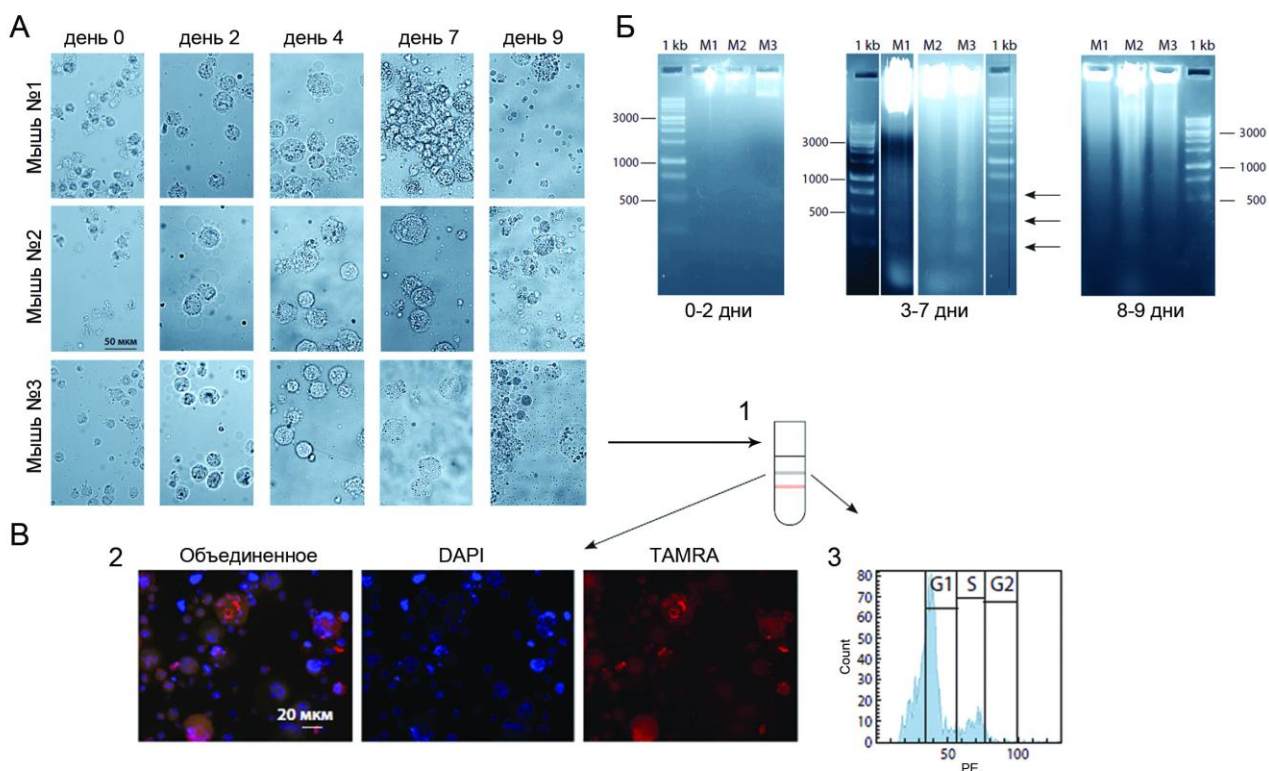


Рис. 7. Анализ состояния клеток асцита Кребс-2 после 3-кратной обработки ЦФ *in vivo*. **А)** Морфология клеток, наблюдаемая в течение 9 суток после обработки ЦФ ($n = 3$). **Б)** Электрофоретический анализ в 1 %-й агарозе ДНК, выделенной из клеток асцита Кребс-2 (панель «А»). **В)** Анализ клеток Кребс-2 на 9-е сутки с момента обработки ЦФ: 1 – схематичное представление фракционирования клеток на фиколл-верографиновом градиенте (верхняя фракция, синяя линия – оставшиеся клетки Кребс-2; нижняя фракция, красная линия – апоптотический «мусор»); 2 – цитологический анализ процентного содержания TAMRA+ клеток в верхней фракции; 3 – распределение верхней фракции клеток Кребс-2 по клеточному циклу, FACS-анализ.

На электрофореграмме видна характерная апоптотическая лестница, свидетельствующая о том, что часть ДНК клеток асцита подверглась нуклеосомной фрагментации (**Рисунок 7 Б**,

средний блок). К 8–12-м суткам «апоптотический дебрис», по-видимому, переходит в состояние вторичного некроза (**Рисунок 7 Б**, правый блок). Флуоресцентный цитологический анализ клеток, сохранивших целостность на 9-е сутки после введения цитостатика (момент апоптотической фрагментации основной массы опухолевых клеток), показал, что доля TAMRA+ клеток в образце, выделенном на градиенте фиколл-верографина, составила 12.9 % (**Рисунок 7 В-1, 2**). Это значение в ~4.6 раза превышает соответствующий показатель для интактного асцита (2.8 ± 2.1 %, раздел 3.3.1.1). Данный результат подразумевал концентрацию избежавших воздействия терапии ОСК. Оценка фазы клеточного цикла этих клеток показала, что все они находятся в G1-фазе (**Рисунок 7 В-3**).

Состояние апоптотического разрушения асцита продолжается примерно 5–7 суток и сопровождается визуально детектируемым и экспериментально подтвержденным уходом асцитной жидкости (фаза ремиссии) (Alyamkina et al., 2015, **Рисунок 6**) и повышением уровня лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (**Рисунок 8**). Повышение уровня ЛДГ свидетельствует о разрушении (апоптоз, некроз) или повреждении клеток. К 15–19-м суткам асцит появляется снова, и доля TAMRA+ клеток возвращается к норме, составляющей ~0.5–3 % (данные не приводятся).

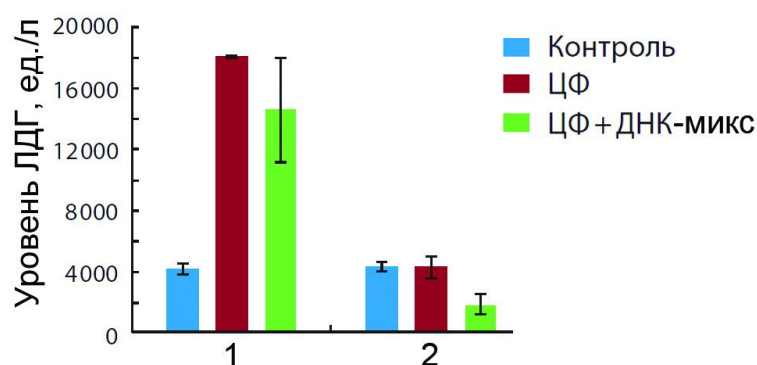


Рис. 8. Анализ уровня ЛДГ в асцитной жидкости экспериментальных животных в момент уменьшения объема асцита (1 – 5–7 сутки) и в момент развития вторичного асцита (2 – 15–19 сутки) ($n = 3–5$), приведено Mean $\pm$ SD.

Важным в логике разрабатываемой стратегии эрадикации асцита Кребс-2 является соединение результатов анализа состояния TAMRA+/CD34+ клеток, обработанных ЦФ в синергизме с препаратом дцДНК (**Рисунок 1**), и результатов терапии экспериментальных животных (**Рисунки 6, 7**). Добавление в терапию ЦФ хронометрического введения препарата дцДНК приводит к элиминации TAMRA+/CD34+ клеток, что коррелирует с разрушением туморогенности перевиваемого, обработанного таким образом Кребс-2 трансплантата. Эти

эксперименты означали, что экстраклеточная дцДНК воздействует на TAMRA+ клетки, лишая их туморогенного потенциала.

В сообществе асцитных опухолевых клеток существуют две дискриминируемые по признаку интернализации TAMRA-ДНК зонда популяции клеток: захватывающие ДНК зонд (TAMRA+ клетки) и не захватывающие его (TAMRA– клетки). Показано, что TAMRA+ клетки обладают свойствами ОСК (разделы 3.3.1.2 и 3.3.2.3). По-видимому, эти две популяции клеток по-разному завершают остановку клеточного цикла в поздней G2/M-фазе. Коммитированные опухолевые клетки разрушаются апоптозом с последующим вторичным некрозом (Alyamkina et al., 2015; **Рисунок 7**). Часть генетически экстремально пластичных TAMRA+ ОСК выдерживают терапию и после завершения остановки в G2/M-фазе выходят из репаративного процесса и стремятся завершить деление. Происходит синхронизация всех выживших после проведенной терапии ОСК, 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 обработок). Теоретическое представление о механизме синхронизации приведено в разделе 3.6 диссертации.

Было сделано заключение, что указанный период может являться ключевым для проведения завершающего воздействия на все остаточные ОСК Кребс-2. Без финальной (четвертой) обработки препаратами ЦФ и ДНК-микс через несколько суток произойдет естественное расхождение опухолевых клеток, в том числе ОСК, по фазам клеточного цикла, и ОСК опять станут недостижимыми для дополнительной однократной обработки по схеме разрабатываемого терапевтического режима.

Было проведено два эксперимента для проверки предложенной гипотезы финальной обработки сохранивших жизнеспособность асцитных клеток Кребс-2 в фазу синхронного выхода в G1/S. Последняя обработка для первого эксперимента была осуществлена на 8-е, для второго – на 12-е сутки от введения ЦФ. Подробные результаты экспериментов представлены в разделе 3.7.1.1. Используя такой подход в нескольких повторах удалось вылечить от асцитной опухоли Кребс-2 до 75 % мышей (25 % мышей были с рецидивами). При этом полностью выздоровевшие самки давали здоровое потомство.

Таким образом, заключающим элементом разрабатываемого терапевтического режима стало понимание, что для полной эрадикации ОСК необходимо проводить определение дня синхронизации опухолевых клеток, включая ОСК, в чувствительной для обработки препаратами ЦФ и ДНК-микс фазе клеточного цикла и проводить финальную (четвертую) терапевтическую обработку.

Обобщенная схема терапевтического режима «Каранахан» подробно описана в разделе 3.5 диссертации и продемонстрирована на **Рисунке 33**. Пошаговые этапы анализа опухолевых клеток, на основе которых разрабатывается схема введения кросслинкующего цитостатика и препарата ДНК-микс на основе режима «Каранахан», представлены в разделе 3.6.

Список цитируемой литературы в приложении 4:

1. Akkari Y.M.N. et al. DNA Replication Is Required To Elicit Cellular Responses to Psoralen-Induced DNA Interstrand Cross-Links // *Mol. Cell. Biol.* – 2000. – Vol. 20, № 21. – P. 8283–8289.
2. Alyamkina E.A. et al. Combination of cyclophosphamide and double-stranded DNA demonstrates synergistic toxicity against established xenografts // *Cancer Cell Int.* – 2015. – Vol. 15, № 32. – P. 35.
3. Dolgova E.V. et al. Internalization of exogenous DNA into internal compartments of murine bone marrow cells // *Russ. J. Genet. Appl. Res.* – 2012a. – Vol. 2, № 6. – P. 440–452.
4. Dolgova E.V. et al. «Delayed death» phenomenon: A synergistic action of cyclophosphamide and exogenous DNA // *Gene* – 2012b. – Vol. 495, № 2. – P. 134–145.