



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)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Новосибирск – 2026

Работа выполнена в лаборатории индуцированных клеточных процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), г. Новосибирск, Россия.

Научный консультант: **Богачев Сергей Станиславович**, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН.

Официальные оппоненты:

Гришанова Алевтина Юрьевна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией биохимии чужеродных соединений ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ), НИИ молекулярной биологии и биофизики (г. Новосибирск);

Васильев Станислав Анатольевич, доктор биологических наук, заместитель директора по развитию Томского НИМЦ, рук. лаборатории инструментальной геномики НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (НИМЦ РАН) (г. Томск);

Миронова Надежда Львовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот ФГБНУ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН) (г. Новосибирск).

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2026г. на утреннем заседании Диссертационного совета 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН» в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 10, тел. (383) 363-49-06, факс (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: www.icgbio.ru

Автореферат разослан «___» _____ 20 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В Российской Федерации онкологические заболевания занимают второе место в структуре смертности, составляя 12 % от общего числа летальных исходов. По прогнозам Всемирной организации здравоохранения, число онкологических заболеваний к 2030 году увеличится на 18–20 %.

В последнее время все более актуальной становится теория гетерогенного строения опухоли, заключающаяся в наличии опухолевых стволовых клеток (ОСК) (Clarke et al., 2006). Считается, что высокий процент рецидивов, возникающих после лечения онкологических заболеваний (30–50 %), связан с невозможностью элиминировать 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, 2011; Rysaj, Tang, 2014).

Отсутствие универсального маркера ОСК – основная проблема, препятствующая разработке стандартизированных 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.

Одним из перспективных направлений в этой области становится молекулярная терапия опухолей с использованием нуклеиновых кислот. В ней широко используются антисмысловые олигонуклеотиды, малые интерферирующие РНК (Watts, Corey, 2012). Неожиданно эффективным оказалось 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 естественным путем была показана в предшествующих исследованиях (Schubbert et al., 1997; Yakubov et al., 1999; Filaci et al., 2004). Под термином **интернализация** подразумевается попадание во внутриклеточные компартменты без обозначения механизма процесса. Несмотря на очевидную фундаментальную и прикладную значимость изучения взаимодействия экстраклеточной ДНК с клетками организма, до сих пор отсутствовало детальное

понимание механизмов этого процесса, реализуемого в естественных условиях. Не были идентифицированы специфические поверхностные белки, участвующие в акте естественной интернализации экстраклеточных нуклеиновых кислот в клетки, не был установлен механизм данного явления.

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. Также было показано, что фрагменты дцДНК, интернализирующиеся в ККМ мышей на фоне процесса репарации ДЦР, вызванных действием кросслинкующего цитостатика, интерферировали указанный процесс (Dolgova et al., 2012). В настоящей работе термин **«кросслинкующий цитостатик»** используется для обозначения противоопухолевого препарата, который создает прочные химические связи, называемые межцепочечными сшивками (МЦС), между нитями ДНК или внутри одной нити. **Интерференция** подразумевает вовлечение в репаративный процесс и отклонение от его канонического течения.

В ККМ мышей интерференция проявлялась таким образом, что клетки не могли корректно завершить процесс репарации, в результате чего погибали путем апоптоза (Dolgova et al., 2012). Возможность синергичного 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, что позволит детектировать ОСК в общей массе опухолевых клеток.

На основе свойства интернализации экстраклеточной дцДНК ОСК впервые был разработан режим воздействия на злокачественные опухоли, получивший название «Каранахан» («убивающий причину», санскрит). Режим воздействия «Каранахан» включает в себя трехкратные малодозовые хронометрические обработки клеток опухоли кросслинкирующим цитостатиком (циклофосфамид (ЦФ), митомицин С), зависящие от продолжительности цикла репарации ДЦР ДНК 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 состоит из нативной ДНК человека, нативной и модифицированной ДНК спермы лосося в соотношении 7:5:2 (или 50 %, 36 % и 14 %) (далее **препарат ДНК-микс**). При этом первая составная часть препарата ДНК-микс интерферирует процесс NER, а оставшиеся – HR. Также частью режима является четвертая 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 противоопухолевого 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 ДНК, описан механизм указанного явления. На основе этого свойства ОСК 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 асцитной, так и в солидной формах.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в описании нового биологического свойства ОСК – способности интернализировать естественным природным механизмом фрагменты экстраклеточной дцДНК. 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.

Описанное в настоящем исследовании 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 служить 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 и апробация 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 кросслинквирующего цитостатика. На основании этого свойства разработан новый противоопухолевый режим воздействия «Каранахан».

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены 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.

По тематике диссертации получено шесть патентов на изобретение. Также 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 кросслинквирующих цитостатиков.

Публикации

Всего автором по теме диссертации опубликовано 42 статьи, из которых 41 входит в базы данных Web of Science и/или Scopus. Из них 18 статей – Q1-Q2.

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. Основные положения диссертации и ее содержание базируются на персональном вкладе автора, отраженном в опубликованных работах. У автора отсутствует конфликт интересов с соавторами публикаций.

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 и 56 рисунков.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность всем сотрудникам лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН. Автор глубоко признателен научному консультанту д.б.н. Богачеву С. С., а также к.б.н. Ефремову Я. Р., д.м.н. Останину А. А., члену-корр. РАН Черных Е. Р., академику РАН Колчанову Н. А. Автор благодарен к.б.н. Байбородину С. И., к.б.н. Таранову О. С., к.б.н. Завьялову Е. Л., к.б.н. Ромащенко А. В., Андрушкевичу О. М., к.б.н. Николину В. П., к.б.н. Поповой Н. А., к.б.н. Каледину В. И.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** описана актуальность работы, сформулированы цели и задачи, изложены научная новизна, теоретическая и практическая значимость и апробация работы, обозначены личный вклад автора и благодарности.

Глава 1 посвящена обзору литературы. В **разделе 1.1** дается характеристика причин возникновения опухолевой клетки, описываются особенности опухоли как ткани, отличающие указанную структуру от здоровых органов и тканей организма. **Раздел 1.2** посвящен проблематике наличия ОСК, описанию их особенностей, а также молекулярных сигнальных каскадов, обеспечивающих основные характеристики указанных клеток (сохранение плюрипотентности, асимметричное деление, эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), метастазирование, аноикис, множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) и особенности метаболизма). Перечисленные свойства свидетельствуют об огромном потенциале выживаемости ОСК. **Раздел 1.3** посвящен характеристике источников экстраклеточной дцДНК в организме, ее функциональной роли и известным механизмам ее интернализации клетками. В **разделах 1.4 и 1.5** описываются современные подходы лечения злокачественных образований, делается акцент на существующие таргетные методы, направленные

на удаление ОСК. **Раздел 1.6** представляет собой заключение к литературному обзору, в котором суммируется представление о важнейших особенностях опухолевой ткани, свидетельствующих о ее крайней пластичности по всем возможным молекулярным механизмам функционирования. На вершине иерархической пирамиды опухоли находятся практически неубиваемые ОСК. Эрадикация ОСК из очага опухолевого роста является приоритетной задачей практической онкологии. В **Разделе 1.7** более подробно описаны некоторые ранее полученные результаты касательно интернализации экстраклеточной ДНК в ККМ мышей. Раздел представляет собой краткое предисловие к настоящей работе.

Глава 2 посвящена описанию материалов и методов, используемых в работе.

В **Главе 3** описываются результаты работы. В **разделе 3.1** акцент делается на две основные задачи: (1) определить тип клеток в популяции ККМ, которые интернализуют фрагменты экстраклеточной дцДНК естественным природным механизмом; (2) подтвердить наблюдаемое явление интерференции идущего репаративного процесса находящимися в клетке фрагментами экстраклеточной дцДНК (в качестве модели проанализирован репаративный процессинг фрагментов линейризованной плазмидной ДНК, находящейся внутри клетки).

Для анализа взаимодействия экстраклеточной дцДНК с клетками был синтезирован и стандартизован специфический дцДНК зонд размером 500 п.н., меченый флуоресцентной меткой и представляющий собой последовательность *Alu*-повтора человека (TAMRA-ДНК зонд), являющийся удобной экспериментальной тест-молекулой. Клетки, которые интернализуют такой дцДНК зонд, далее называются «TAMRA+ клетками».

Было показано, что 39.9 ± 2.1 % (Mean $\pm$ SD, $n = 20$) популяции CD34+ ККМ обладают способностью интернализировать экстраклеточную ДНК. Из общей фракции ККМ, не содержащей CD34+ клетки (CD34-), экстраклеточная ДНК обнаруживалась в 0.5 ± 0.3 % ($n = 3$) клеток. 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 (**Рисунок 1 А**). Фрагменты экстраклеточной дцДНК в основном попадают в клетки популяции CD34+ гемопоэтических предшественников ($p < 0.001$, тест Манна-Уитни).

Далее была проведена оценка совместной локализации маркеров примитивных ГСК мышей c-Kit и Sca-1 и одновременно способности этих клеток интернализировать TAMRA-ДНК зонд. Было установлено, что количество клеток, несущих маркер c-Kit, преобладает и составляет 9.4 %. Клеток, положительных по маркеру «TAMRA» – 5.4 %, Sca-1+ клеток – 1.7 %. Встречаются клетки с двойным окрашиванием TAMRA+/c-Kit+ – 1.3 %. Обнаружены единичные клетки с фенотипом TAMRA+/Sca-1+ и Sca-1+/c-Kit+ (по 0.39 %), и несколько клеток с

тройным фенотипом TAMRA+/Sca-1+/c-Kit+ (0.35 %). С вероятностью $p < 0.001$ (критерий χ^2) наличие одного или обоих маркеров ГСК является определяющим фактором, что клетка обладает способностью интернализировать экстраклеточную ДНК.

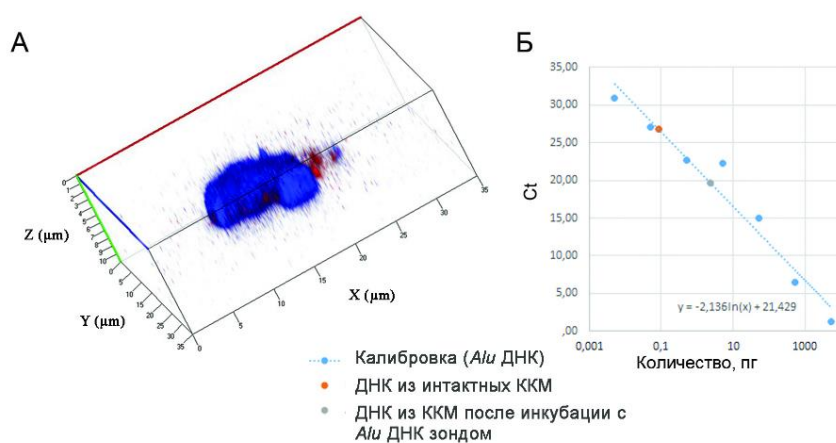


Рис. 1. Интернализация экстраклеточной ДНК в ККМ мышей.

А) Цитологический анализ интернализации TAMRA-ДНК зонда в CD34+ ККМ мышей после совместного культивирования *ex vivo*. Ядро клетки представлено в виде

3D-проекции. **Б)** Определение количества копий интернализированного в ГСК мышей дцДНК зонда по данным qPCR.

С помощью метода qPCR была проведена количественная оценка интернализации экстраклеточной ДНК в ГСК. Расчет свидетельствует, что при выбранном соотношении дцДНК зонд/количество клеток (точка выхода на плато интернализации) в клетку доставляется ~14 000 копий фрагмента размером 500 п.н., что составляет $\sim 6.5 \times 10^6$ п.н. или 0.2 % от гаплоидного генома (**Рисунок 1 Б**).

Также показано, что при интернализации линейаризованной плазмиды (pUC19) в ККМ мышей в промежуток времени, когда идет репарация ДЦР, происходит процессинг свободных двуцепочечных концов экстраклеточной ДНК (частичное экзонуклеазное расщепление, лигирование в кольцо, формирование конкатемеров).

Совокупность полученных результатов доказывает факт интернализации фрагментов экстраклеточной дцДНК в низкодифференцированные ККМ мышей (CD34+, c-Kit+, Sca-1+), а также подтверждает возможность влияния этих фрагментов на молекулярные события, протекающие в данный момент в клетке (репаративный процесс).

Раздел 3.2 описывает формирование основной идеи исследования. 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., 2012), 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 этой связи для дальнейшего исследования были выбраны две модельные системы: карцинома мыши Кребс-2 и индуцированная вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ) В-лимфома.

Раздел 3.3 посвящен доказательству наличия в культурах Кребс-2 и ВЭБ-индуцированной В-лимфомы клеток, интернализирующих экстраклеточную дцДНК, и доказательству положения, что указанные клетки являются ОСК.

В подразделе **3.3.1** проводится исследование интернализации экстраклеточной ДНК в клетки карциномы Кребс-2. Показано, что в культуре Кребс-2 присутствуют клетки, способные интернализировать TAMRA-ДНК зонд (**Рисунок 2 А**), а также линейные фрагменты различных последовательностей, например, суммарную геномную ДНК, выделенную из плаценты человека (200–6 000 п.н.). При этом меченый предшественник dUTP-5'-TAMRA, используемый для синтеза флуоресцентной ДНК, не интернализуется и не детектируется в клетках. При помощи FACS-анализа установлено, что $2.8 \pm 2.1 \%$ ($n = 12$) асцитных клеток Кребс-2 способны интернализировать TAMRA-ДНК зонд.

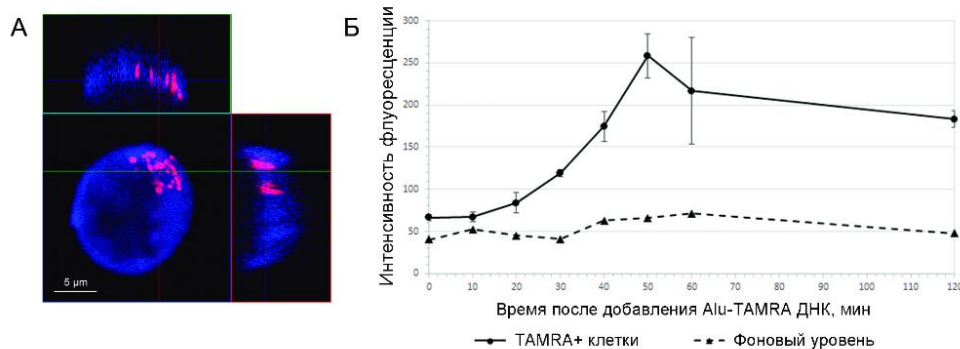


Рис. 2.

Интернализация экстраклеточной ДНК в клетки асцита Кребс-2.

А) Трехмерное изображение клетки, содержащей TAMRA-ДНК

зонд (красный цвет), полученное с помощью лазерного конфокального микроскопа. **Б)** Динамика интернализации TAMRA-ДНК зонда. В каждой точке указано среднее значение интенсивности «TAMRA-сигнала» в векторе, проведенном сквозь клетку ($n = 4$). Приведено Mean $\pm$ SD.

Предел насыщаемости экстраклеточной ДНК достигается при соотношении 0.5 мкг/1 млн клеток Кребс-2. Показано, что насыщение клетки фрагментами экстраклеточной ДНК происходит в течение первого часа инкубирования (50–60 мин). При этом клеточный состав остается постоянным, а усиливается только интенсивность свечения (**Рисунок 2 Б**). Увеличение времени экспозиции с меченым субстратом от 30 мин до 4 ч приводило к незначительному увеличению количества клеток, захватывающих дцДНК (15–20 %).

Чтобы исключить возможность появления неспецифического меченого материала, связанного с предполагаемой внутриклеточной деградацией меченого зонда до мономеров и последующего ресинтеза, была проведена серия Саузерн-блот анализов (**Рисунок 3**). Эти эксперименты подтвердили нахождение в клетке фрагментов ДНК исходно экстраклеточной локализации. 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 3, «ЦФ+ДНК», «ДНК»), оба типа клеток способны к интернализации экстраклеточных фрагментов ДНК.

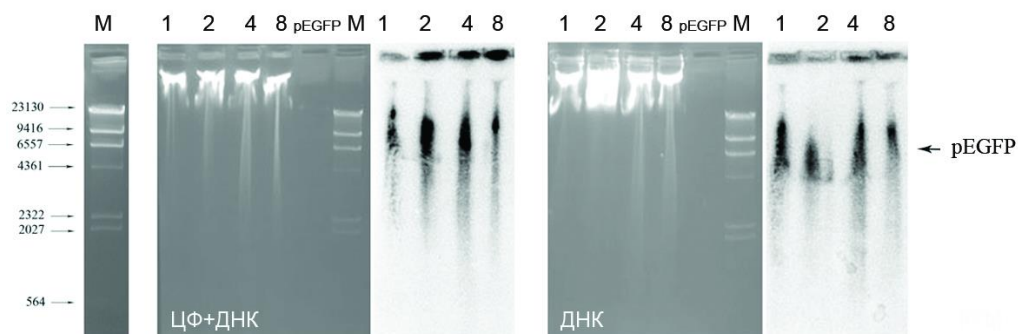


Рис. 3. Анализ интернализации экстраклеточной дцДНК в клетки Кребс-2. Фракционированная в агарозном геле ДНК (слева), выделенная из клеток Кребс-2 после их инкубирования с линеаризованной плазмидой рEGFP-N1, и Саузерн-блот анализ (справа) с αP^{32} -меченым зондом (ген GFP). М – маркер; «ЦФ+ДНК» – клетки асцита, выделенные через 18 часов после инъекции мышам ЦФ (200 мг/кг); «ДНК» – клетки асцита интактной мыши, инкубированные с ДНК. Цифры обозначают время инкубирования с экстраклеточной ДНК. Стрелкой указан гибридизационный сигнал.

С использованием метода qPCR была оценена копияность *Alu* фрагментов (аналог TAMRA-ДНК зонда, не содержащий флуоресцентной метки) и молекул плазмид (pUC19), интернализирующихся в клетки Кребс-2 в условиях полного насыщения экстраклеточной ДНК. Показано, что $\sim 3.097 \pm 0.044$ млн копий плазмидной ДНК может локализоваться во внутреннем пространстве асцитных клеток Кребс-2. Для *Alu*-повтора это количество составляет 425.268 ± 11.499 тыс. молекул на клетку.

В подразделах 3.3.1.2–3.3.1.5 приводится доказательство того, что клетки Кребс-2, обладающие свойством интернализировать экстраклеточные фрагменты дцДНК, обладают характеристиками ОСК.

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 CD34-маркер. Результаты проточной цитометрии показали, что 3.2 ± 2.5 % ($n = 7$) асцитных клеток экспрессируют CD34.

Проведенный сравнительный FACS-анализ и анализ цитологических препаратов клеток Кребс-2 после инкубации с TAMRA-ДНК зондом и типированием клеток антителами к поверхностному маркеру CD34

свидетельствовал, что более 90 % CD34+ клеток обладают способностью интернализировать экстраклеточную ДНК. Из популяции TAMRA+ клеток ~57 % составляют CD34+ клетки (**Рисунок 4 А**).

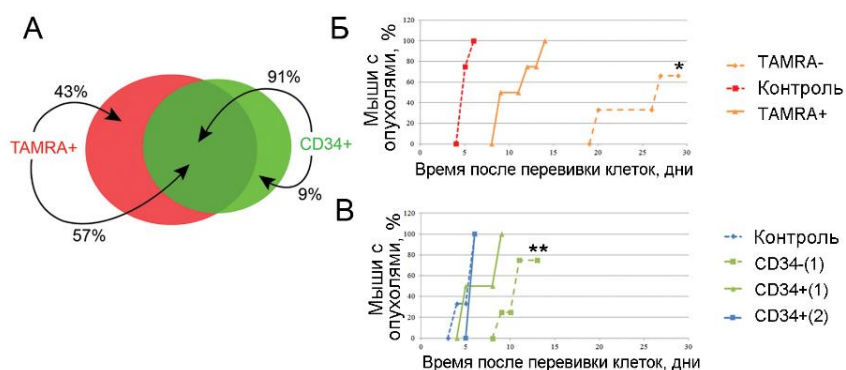


Рис. 4. Характеристика опухолевых свойств TAMRA+ клеток Кребс-2. **А)** Схема перекрытия двух популяций клеток (CD34+ и TAMRA+). **Б)** Характеристика перевивочного потенциала TAMRA+, TAMRA- и суммарной

фракции (контроль) клеток Кребс-2 (n = 4); **В)** Характеристика перевивочного потенциала CD34+, CD34- и суммарной фракции (контроль) клеток Кребс-2 (n = 4). *p<0.05, **p<0.01 по сравнению с «+» популяцией.

В последующих тестах на экспериментальных животных был проанализирован опухолевый потенциал TAMRA+ и CD34+ асцитных клеток. 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, 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 (**Рисунок 4 Б**).

Анализ перевивочного потенциала CD34+ и CD34- асцитных клеток показал, что CD34- клетки растут с запозданием на 4–5 суток по сравнению с CD34+ клетками (p<0.01). При этом CD34+ клетки инициировали рост опухоли в те же сроки, что и контрольный асцит (достоверного отличия нет) (**Рисунок 4 В**). Можно полагать, что в популяции CD34+ клеток именно клетки, способные захватывать ДНК (составляющие 91 % CD34+ клеток для данной серии экспериментов), обуславливают опухолевый потенциал.

Полученный результат свидетельствовал, что клетки Кребс-2, обладающие способностью интернализировать TAMRA-ДНК зонд, обладают признаком, характерным для ОСК, – высоким опухолевым потенциалом.

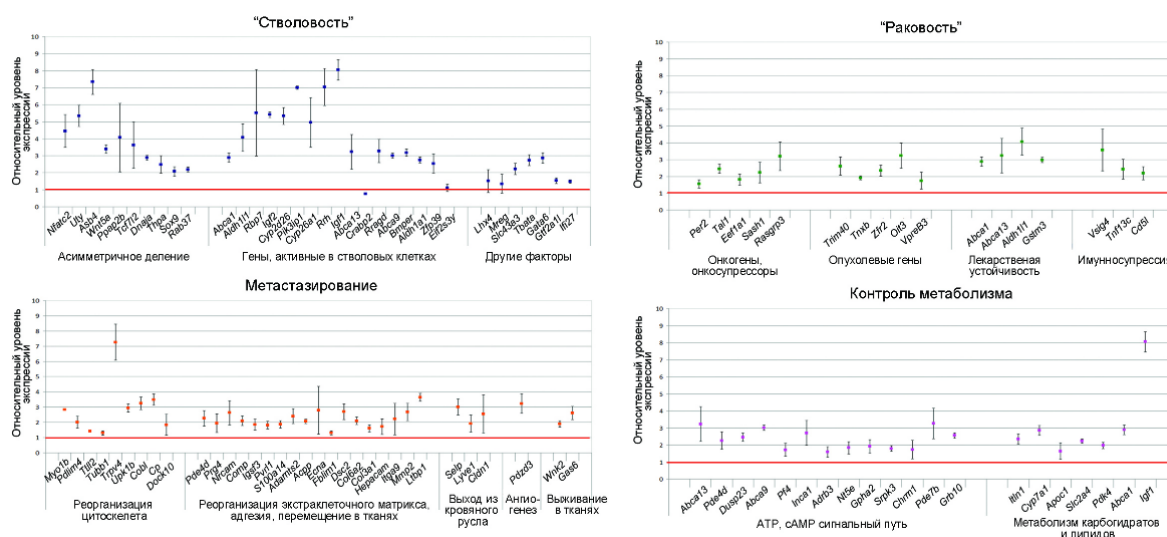
В подразделе 3.3.1.3 описывается еще одна важная закономерность процесса интернализации в клетки Кребс-2. Обнаружено, что по прошествии 3–4 ч после начала инкубации при повторном добавлении экстраклеточной ДНК в культуральную среду происходит достоверное увеличение клеток,

интернализующих ДНК (на ~20 %). Проведенное сравнение процента клеток, находящихся в фазе деления, которая в среднем составляет порядка 4 ч (Соорег, 2000), и процента увеличения TAMRA+ клеток через 4 ч после начала эксперимента, указывало на то, что увеличение доли TAMRA+ клеток является следствием появления дополнительной популяции клеток, способных к интернализации, которые ранее находились в процессе деления (G2/M-фаза клеточного цикла) и не обладали этим свойством. При выходе из M-фазы в G1 они становятся «готовыми» к этому процессу.

В подразделе 3.3.1.4 проведен сравнительный RNAseq двух популяций клеток Кребс-2: интернализирующих TAMRA-ДНК зонд, и TAMRA-. Используя указанный признак, клетки были препаративно изолированы в несколько приемов процедурой сортировки на проточном цитометре. Для получения и анализа РНК транскриптов была применена технология RNAseq. Всего было отобрано 168 генов, экспрессирующихся в TAMRA+ клетках и не экспрессирующихся в TAMRA- клетках.

Далее из указанных генов были отобраны гены-кандидаты, которые принимают участие в интересующих сигнальных каскадах, представленных двумя выделенными нами категориями. А именно, отвечающие за «стволовые» (симметричное/асимметричное деление, формирование и поддержание низкодифференцированного статуса) и «раковые» (МЛУ, устойчивость к апоптозу, ЭМП, особенности клеточного метаболизма) свойства ОСК.

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, чему посвящен подраздел 3.3.1.5 (Рисунок 5).



В проведенных экспериментах были охарактеризованы основные гены выделенных групп обеих категорий (**Рисунок 5**). Полученные результаты представлены как кратное увеличение экспрессии генов в TAMRA+ клетках относительно TAMRA– клеток (принято за 1).

Верифицирующий анализ экспрессии генов методом qPCR подтвердил результаты RNAseq и показал, что в TAMRA+ клетках Кребс-2 по сравнению с TAMRA– клетками, повышена экспрессия генов, отвечающих за стволовые свойства, а также других генов, характерных для ОСК.

Подраздел 3.3.2 посвящен анализу интернализации экстраклеточной ДНК в клетки культуры ВЭБ-индуцированной В-лимфомы. Указанная культура была получена из аспирата костного мозга больного множественной миеломой.

В **подразделе 3.3.2.1** 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 ч после диспергирования. Проведенный ПЦР со специфическими праймерами подтвердил заражение исследуемой клеточной линии ВЭБ, изначально присутствующим в организме пациента. Это предполагало, что полученная клеточная линия, скорее всего, относится к лимфобластоидным клеткам, индуцированным указанным вирусом. Также был проведен ряд FISH-анализов, направленных на выявление хромосомных aberrаций, специфичных для множественной миеломы (*TP53*, перестройки *IGH*, делеции 13-й хромосомы или ее локусов, а также aberrации первой хромосомы). Полученные результаты свидетельствовали об отсутствии хромосомных аномалий, связанных с множественной миеломой.

Для окончательного определения принадлежности полученной культуры к В-лимфоме, необходимо было доказать наличие клонотипической В-клетки. Для этого была использована незначительно модифицированная методика, разработанная для выявления остаточной болезни множественной миеломы у пациентов («глубокое секвенирование» (Martinez-Lopez et al., 2014)).

С использованием праймеров на константные области VDJ-локуса (JH/FR3c) был получен специфический фрагмент ~500 п.н. (далее в тексте обозначен «500»). Фрагмент был клонирован и несколько из полученных клонов секвенированы. За исключением нескольких одиночных замен эти структуры оказались идентичными. Полученный мажорный ПЦР-продукт и результаты секвенирования свидетельствовали о том, что в выделенной из материала сфер ДНК присутствует множество фрагментов с одинаковой ДНК-последовательностью. Далее 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». Было показано, что в 100 нг ДНК, выделенной из сфер

исследуемой культуры, содержится 0.01 пг ДНК В-клона. Расчет количества клеток, несущих реорганизованный VDJ-локус, показал, что в составе сфер исследуемой культуры присутствует около 80 % клонотипических В-клеток.

В подразделе 3.3.2.2 методами флуоресцентной микроскопии на цитологических препаратах и лазерной конфокальной микроскопии в системе *in vitro* был проанализирован процент TAMRA+ клеток в сферах В-лимфомы (Рисунок 6).

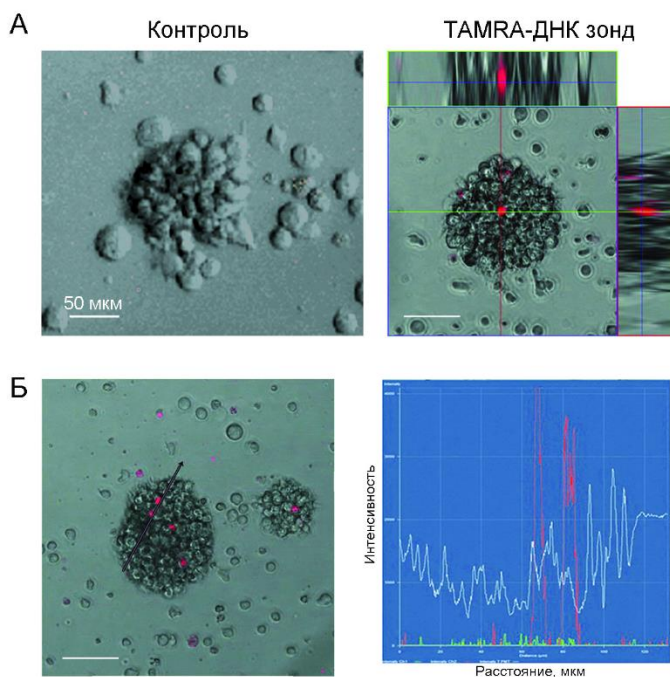


Рис. 6. Интернализация TAMRA-ДНК зонда в сферы ВЭБ-индуцированной В-лимфомы. **А)** Общий вид сферы без добавления экстраклеточной ДНК (контроль) и ортогональные проекции сферы через 20 мин после инкубирования с TAMRA-ДНК зондом, конфокальная микроскопия. Клетка, содержащая TAMRA-ДНК, находится в центре 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).

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 3 клетки на сферу.

Подразделы 3.3.2.3–3.3.2.4 посвящены доказательству того, что клетки В-лимфомы, интернализирующие экстраклеточную ДНК, обладают характеристиками ОСК (клоногенность, туморогенность). 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.

Был проведен анализ принадлежности TAMRA+ клеток ВЭБ-индуцированной В-лимфомы к указанным типам клеток. Полученные результаты свидетельствовали, 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.

Клоногенные свойства TAMRA+ клеток В-лимфомы также были подтверждены оценкой способности формировать микроокружение (сферы).

Сферы были ресуспендированы до отдельных клеток и проинкубированы с TAMRA-ДНК зондом. Было отмечено, 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.

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 с исходными характеристиками. Эксперимент выполнен в двух независимых повторах. Установлено, что в популяции TAMRA+ клеток 6 из 96 образовывали сферу из единичной клетки, при этом две из них дали начало культуре с исходными свойствами. Во втором эксперименте клонообразование наблюдали для 2 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).

На следующем этапе работы была проведена оценка продукции цитокинов клетками сфер. Показано, что удаление из общей популяции фракции TAMRA+ клеток приводит к выраженному изменению профиля секретируемых цитокинов. В частности, регистрируется 6–8-кратное увеличение уровня продукции TNF- α и IL-1 α , 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).

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 ч и отсортированы на проточном цитометре. Ни при внутривенном введении сортированных TAMRA+ и TAMRA– клеток, ни при подкожной трансплантации развития графта у экспериментальных животных детектировано не было.

Известно, что в случае лимфопролиферативных заболеваний стромальная поддержка является необходимым условием как пролиферации опухолевых клеток, так и их успешной перевивки (Hofenkova et al., 2024, Bogun et al., 2024). Это подтверждается обнаруженным выраженным цитокиновым взаимодействием между клетками сфер. В связи с этим 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 стромальную нагрузку. В третьем эксперименте была проведена подкожная трансплантация целых сфер и свободноплавающих TAMRA– единичных клеток. Было перевито суммарно 1 000 000 клеток, из которых TAMRA+ клетки составляли ~1–2 % (15 000–30 000

TAMRA+ клеток). Через 49 суток у одной из 4-х мышей, которым прививали сферы, развился полноценный графт. Ни у одной из мышей с перевитыми свободноплавающими TAMRA– клетками графт не развился (n = 4).

Материал выросшего графта был проверен на наличие клонотипической В-клетки, которая была выявлена в перевиваемой культуре ВЭБ-индуцированной В-лимфомы человека. Были проведены аналогичные для культуры клеток эксперименты по секвенированию перестроенного VDJ-локуса. Количественная оценка показала, что в материале ДНК, выделенной из опухолевого трансплантата, присутствует 38.1 ± 14 % ДНК человека и 61.9 ± 14 % ДНК мыши (Mean $\pm$ SD, n = 6). Определено, что в 100 нг ДНК, выделенной из ксенографта, содержится 0.009 пг ДНК В-клона, или что клонотипические В-клетки составляют ~71 % от общего количества клеток. Проведенная комплексная оценка предполагает, что человеческий материал ксенографта представлен исключительно клонотипической В-клеткой. Секвенирование показало, что последовательность VDJ-локуса гомологична клонотипической клетке перевиваемой культуры В-лимфомы, а значит, графт действительно является солидным трансплантатом В-лимфомы человека.

Суммарно полученные результаты свидетельствовали о наличии клоногенных и туморогенных свойств у TAMRA+ клеток свободноплавающих сфер ВЭБ-индуцированной В-лимфомы человека.

Для подтверждения иерархической принадлежности TAMRA+ клеток ВЭБ-индуцированной В-лимфомы к ОСК на молекулярном уровне была оценена экспрессия мРНК генов, активных в TAMRA+/- клетках, характеризующих сигнальные пути, свойственные ОСК.

Как и в случае модели Кребс-2, гены были разделены на функциональные группы, отвечающие за различные характеристики ОСК. Указанные функциональные группы также 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, характеризующим «стволовые» свойства опухолевых клеток, была независимо и достоверно подтверждена биоинформационным анализом в базе данных STRING.

По данным RNAseq из трех функциональных групп были выбраны гены, для которых, как для наиболее основополагающих в формировании свойств ОСК, были проведены валидирующие qPCR (n = 3–6).

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 эффекторов. 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 7 А**).

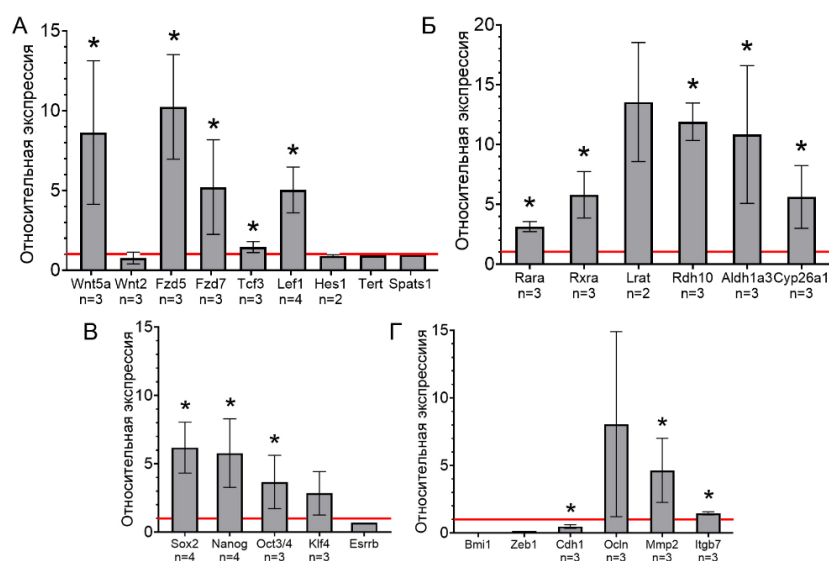


Рис. 7. Анализ экспрессии генов в TAMRA+ клетках В-лимфомы. **А)** Wnt-сигнальный путь. **Б)** Каскад ретиноевой кислоты. **В)** Транскрипционные факторы, связанные с поддержанием низкодифференцированного состояния. **Г)** ЭМП. * $p < 0.05$, критерий Манна-Уитни.

Во-вторых, это сигнальные пути и гены, отвечающие за поддержание низкодифференцированного состояния. В первую очередь, это набор генов, связанных с циклом метаболизма ретиноевой кислоты. Результаты RNAseq показали, что в TAMRA+, по сравнению с TAMRA– клетками, 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. 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 7 Б**).

Также методом qPCR были проанализированы уровни синтеза мРНК генов нескольких транскрипционных факторов, активных в стволовых клетках, таких как SOX2, NANOG, OCT-3/4 и KLF4. Результаты qPCR показали, что в TAMRA+

клетках повышена экспрессия генов *SOX2*, *NANOG*, *OCT-3/4* ($p < 0.05$) и наблюдается тенденция к повышению *KLF4* (**Рисунок 7 В**).

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 апикально-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 интегрина- $\beta 7$ (**Рисунок 7 Г**).

Суммарно полученные данные дают возможность сделать заключение о том, что TAMRA+ клетки ВЭБ-индуцированной В-лимфомы обладают полным набором характеристик ОСК.

Раздел 3.4 посвящен определению механизма взаимодействия и интернализации экстраклеточной ДНК в клетки двух описываемых моделей опухолей. При цитологическом анализе сборки сфер ВЭБ-индуцированной В-лимфомы не было замечено возможности механического передвижения клеток (образование псевдоподий). Было сделано предположение, что ОСК обладают биологической особенностью, отличающей их от других типов клеток, позволяющей взаимодействовать с отрицательно заряженной молекулой ДНК, а именно, положительным зарядом клеточной поверхности (гликокаликса).

Для определения заряда клеток, интернализирующих дцДНК зонд, был применен метод с использованием электрофореза 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 Кребс-2 показано, что доля TAMRA+ клеток в катодной области «-» всегда была выше, чем в анодной «+» (13.5 % против 1.65 %, $p < 0.05$) (**Рисунок 8 А**). Этот факт означал, что клетки, способные связывать TAMRA-ДНК зонд, в ходе электрофореза мигрируют в направлении катода, а значит, они имеют общий положительный заряд.

Аналогично были проведены эксперименты по оценке распределения TAMRA+ клеток В-лимфомы после электрофореза в свободном объеме (3.27 % против 2.99 %, достоверной разницы в значениях нет) (**Рисунок 8 Б**). Тем не менее полученные результаты свидетельствовали, что определенная часть TAMRA+ клеток В-лимфомы также имеют общий положительный заряд клеточной мембраны и мигрирует к аноду.

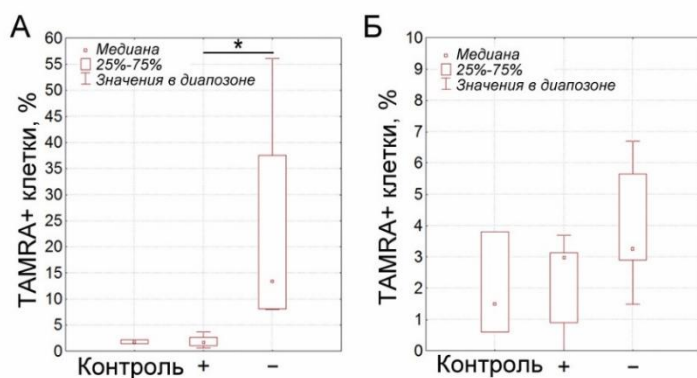


Рис. 8. Определение суммарного заряда клеток, интернализирующих TAMRA-ДНК зонд. **А)** Карцинома Кребс-2 (n = 9). **Б)** ВЭБ-индуцированная В-лимфома (n = 4). Графики отображают процент TAMRA+ клеток в «+» и «-» полюсах электрофоретической камеры после электрофореза.

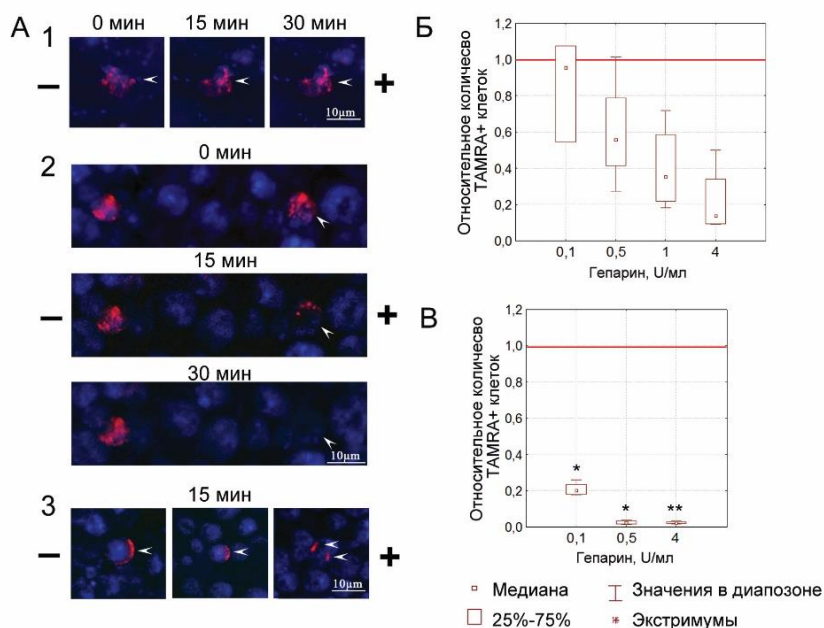
Предположение о том, что ОСК, интернализирующие дцДНК зонд, имеют общий положительный заряд клеточной мембраны, также было проверено с помощью оценки связывания TAMRA-ДНК зонда с пред- или постобработкой клеток специфическим положительно заряженным красителем Basic Blue GRL 41 (BB41). В данной серии экспериментов с использованием FACS-анализа было подтверждено, что взаимодействие дцДНК зонда происходит с клетками, имеющими «+» заряд поверхности, которые не окрашиваются BB41. Таким образом, *первым этапом взаимодействия экстраклеточной ДНК с ОСК является электростатическое притяжение.*

Для понимания, происходит ли дальнейшее прочное (ковалентное) связывание фрагментов дцДНК с элементами клеточной мембраны ОСК, был проведен микрогель-электрофорез. В зависимости от способа фиксации TAMRA-ДНК зонда на мембране клеток в ходе электрофореза можно было визуализировать изменение положения фрагментов ДНК, связанных с поверхностью клетки. Были получены следующие варианты взаимодействия TAMRA-ДНК зонда с клеткой: дцДНК зонд не менял своего пространственного положения; полное «сдувание» TAMRA-меченого материала с клеточной поверхности, происходящее последовательно; 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 9 А**).

Полученный результат определил *второй этап взаимодействия TAMRA-ДНК зонда и клетки. Им является химическое/молекулярное взаимодействие с элементами клеточной мембраны.*

Для молекулярной характеристики элементов клеточной мембраны TAMRA+ клеток Кребс-2 и В-лимфомы, определяющих взаимодействие с экстраклеточной ДНК, была проведена оценка взаимодействия TAMRA-ДНК зонда с клетками после обработки их гепарином. Известно, что гепарин-связывающие сайты белков представляют собой кластеры положительно заряженных аминокислот, в том числе представленные в коллаген-подобном

домене или консенсусной последовательности аминокислот C1q белка (Delacoux et al., 2000; Doi et al., 1993; Garlatti et al., 2010).



Оказалось, что гепарин в количестве 4 ед. предотвращает связывание TAMRA-ДНК зонда с клетками Krebs-2 ($p < 0.05$) и при использовании на порядок меньшей концентрации – с клетками В-лимфоциты (**Рисунок 9 Б, В**). Таким образом, для обеих выбранных моделей взаимодействие дцДНК зонда и гепарина с клеткой определяют одни и те же элементы клеточной поверхности.

Для определения механизма интернализации экстраклеточной ДНК в клетку был использован подход, при котором химически блокировался один из известных путей эндоцитоза и далее оценивалось процентное содержание TAMRA+ клеток. Было проанализировано влияние восьми ингибиторов различных путей эндоцитоза. В исследованиях использовали диназор как ингибитор динаминзависимых путей эндоцитоза, хлорпромазин как ингибитор клатринзависимого пути, нистатин и метил- β -циклодекстрин (M β CD) для ингибирования путей эндоцитоза, опосредованных липидными рафтами, в том числе кавеолин-зависимого пути эндоцитоза. Цитохалазин Д и 5-(N-этил-N-изопропил)-амилорид (EIPA) использовали как ингибиторы макропиноцитоза, вортманнин – как ингибитор клеточных фосфоинозитид-3'-киназ, а также азид натрия как ингибитор синтеза АТФ.

Показано, что для клеток Krebs-2 нистатин, блокатор кавеолин-зависимого пути интернализации, статистически достоверно и дозозависимо снижает долю

TAMRA+ клеток ($p < 0.05$). Блокатор динамин-зависимого эндоцитоза – диназор в большей из выбранных концентраций также достоверно снижает процент TAMRA+ клеток (125 мкг/мл, $p < 0.05$) (Рисунок 10 А).

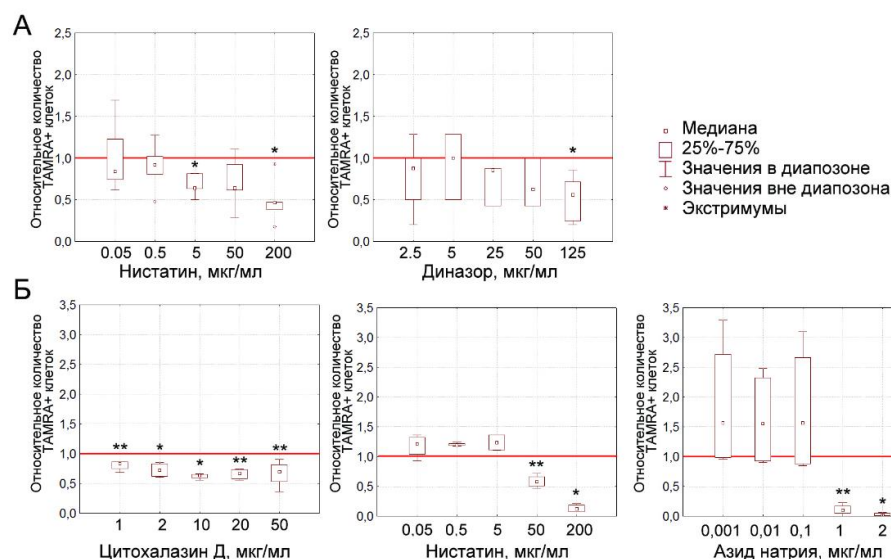


Рис. 10. Влияние ингибиторов эндоцитоза на связывание TAMRA-ДНК зонда с клетками. **А)** Кребс-2 ($n = 3-6$). **Б)** В-лимфома ($n = 4$). На графиках представлена доля TAMRA+ клеток после обработки различными концентрациями соответствующих ингибиторов (FACS-анализ). Красной линией обозначено процентное содержание TAMRA+ клеток среди клеток Кребс-2 без использования ингибиторов, принятое за 1 ($n = 3-6$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, one-way ANOVA, критерий Краскела-Уоллиса.

Для ВЭБ-индуцированной В-лимфомы процент TAMRA+ клеток также достоверно снижается при обработке клеток ингибитором кавеолин-зависимого пути интернализации – нистатином ($p < 0.01$ и $p < 0.05$ для концентраций 50 и 200 мкг/мл соответственно) (Рисунок 10 Б). Азид натрия практически полностью дозозависимо блокирует взаимодействие TAMRA-ДНК зонда и клеток В-лимфомы ($p < 0.01$ и $p < 0.05$ для концентраций 1 и 2 мкг/мл соответственно), что свидетельствует о необходимости АТФ для связывания экстраклеточной ДНК и факторов мембраны клеток. Цитохалазин Д, блокатор полимеризации актина, во всех концентрациях подавляет взаимодействие TAMRA-ДНК зонда с клеткой.

Для обеих моделей были проведены эксперименты по оценке влияния ингибиторов на интернализацию TAMRA-ДНК зонда с использованием qPCR. Показано, что полученные с использованием FACS-анализа данные не противоречат результатам qPCR.

Таким образом, *третьим этапом взаимодействия* экстраклеточной ДНК с ОСК является непосредственно *интернализация внутрь клетки*. Для Кребс-2 TAMRA-ДНК зонд проникает во внутриклеточные компартменты кавеоларным механизмом эндоцитоза (нистатин, диназор) или макропиноцитозом

(цитохалазин D). В случае В-лимфомы дцДНК зонд может интернализироваться как кавеоларным, так и клатрин-зависимым механизмом, и также макропиноцитозом.

Подраздел 3.4.4 посвящен анализу факторов, характеризующих молекулярный портрет ОСК. Был проведен биоинформационный анализ результатов RNAseq и литературный функциональный анализ факторов, отвечающих характеристикам, необходимым для возможности участия в интернализации экстраклеточной ДНК в клетку. Результаты оценки механизма связывания и интернализации TAMRA-ДНК зонда в клетки свидетельствовали, 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 комплемента (**Таблица 1**).

Полученные данные свидетельствуют, что белки, удовлетворяющие отмеченным характеристикам, относятся к трем функциональным группам факторов клеточной мембраны. Это *протеогликаны* (PG) или *кавеоло-ассоциированные гликопротеины* (GP), *скавенджер-рецепторы* (SR) и *гликозилфосфатидилинозитол-заякоренные белки* (GPI-AP). Однако следует отметить, что сайты связывания полианионов в составе PG, SR, GPI-AP не ограничиваются последовательностями, приведенными в **Таблице 1**.

Таблица 1. Аминокислотная последовательность трех специфических полианион/гепарин/дцДНК-связывающих сайтов, определенных на основании литературного поиска в базах данных.

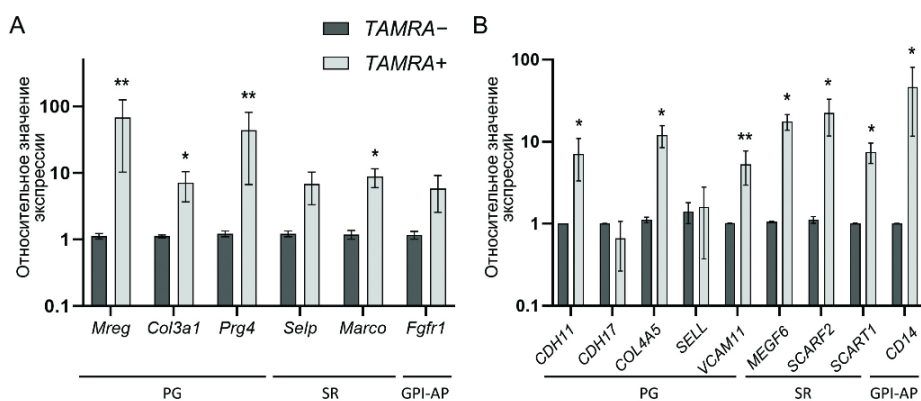
Функц. группа (связывающий сайт)	Аминокислотная последовательность	Краткая характеристика
SR (коллаген-подобный домен)	GRGNPGAPGKPG RS GSPG PKGQ KGEK GSV	Гепарин-связывающий домен выделен синим цветом*
C1q белок (C1q-подобный домен)	VFTV TRQTHQPPAONSLIRF NAV LTNPQGDYDTSTG KFTCKVPGL YYFVYHASHTANLCVLLYRSGV KVVTF CGHTSKTNQVNSGGVLL RLQVGEEVWLAV	Гепарин-связывающий сайт выделен синим цветом; ДНК-связывающий сайт – красным**
PG/GP, GPI-AP (кластер положит. заряженных аминокислот)	IFLLVTLVTVCACW KPSKRKQK KLEK QNSLEYMDQNDD	Кластер положительно заряженных аминокислот выделен зеленым цветом***

* (Doi et al., 1993); ** (Garlatti et al., 2010); *** (Ori, Wilkinson, Ferning, 2008).

Был сформирован принцип организации факторов клеточной мембраны ОСК. Молекулы-представители белков всех трех функциональных групп в доминирующем количестве обязательно должны быть представлены в ОСК любого происхождения. 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)-связывающего домена, представленного или коллаген-подобным доменом, описанным для SR-A класса, формирующим положительно заряженную бороздку, или кластерами положительно заряженных аминокислот, или консенсусным сайтом связывания гепарина или дцДНК (но не РНК молекулы) (**Таблица 1**).

Для доказательства принципа организации белков клеточной мембраны ОСК были проанализированы транскриптомы TAMRA+ клеток Кребс-2 и В-лимфомы. Проведено сравнение генов, принадлежащих к функциональным группам факторов (PG/GP, SR, GPI-AP), трех списков: генов обобщенного портрета ОСК, полученного в результате литературного функционального анализа, сверхэкспрессирующихся генов транскриптомов Кребс-2 и В-лимфомы (по результатам RNAseq). Далее 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*, *COL4A5*, *VCAM1*, *MEGF6*, *SCARF2*, *SCART1* и *CD14* генов в клетках В-лимфомы (**Рисунок 11**). Суммируя данные, можно сделать вывод, что характер экспрессии специфических генов указывает на правильность предложенного принципа.



предположительно участвующих в процессе интернализации дцДНК методом qPCR. **А)** Карцинома Кребс-2. **Б)** В-лимфома. Приведено Mean $\pm$ SD; n = 3–5; *p<0.05, **p<0.01 (тест Манна-Уитни).

На основании проведенного анализа молекулярных механизмов интернализации ДНК складывается новое представление о том, что несмотря на кажущуюся гетерогенность поверхностного фенотипа ОСК, существует общий принцип. Есть три функциональные группы, но в каждом конкретном типе ОСК в процессе интернализации экстраклеточных фрагментов дцДНК задействованы разные представители одной и той же функциональной группы. 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.

Раздел 3.5 посвящен основным этапам создания и описанию принципов работы режима воздействия на злокачественные новообразования «Каранахан».

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 период репарации повреждений, вызванных воздействием цитостатика, и в чувствительный для ОСК промежуток времени, экстраклеточная дцДНК будет таргетно воздействовать на опухолевые клетки, приводя к их эрадикации.

Режим воздействия «Каранахан» основан на хронометрическом малодозовом введении кросслинкующего цитостатика с добавлением препарата на основе дцДНК в определенные временные промежутки после обработки цитостатиком, зависящие от продолжительности репаративного цикла конкретных опухолевых клеток. Под термином «репаративный цикл» мы понимаем время, необходимое конкретному типу опухолевых клеток для завершения репарации основных повреждений ДНК. Мы разделили репаративный цикл на два этапа: фаза NER (когда количество ДЦР возрастает), фаза HR (количество ДЦР снижается). Таким образом, промежуток времени между началом появления ДЦР и моментом, когда количество ДЦР снижается до базового уровня (свойственного необработанным клеткам), и есть время полного цикла репарации для клеток данной конкретной опухоли. А время, когда детектируется максимальное количество ДЦР – переход первой фазы репарации во вторую.

Препарат дцДНК состоит 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 %) (препарат ДНК-микс). Препарат ДНК-микс вводится после каждой инъекции ЦФ в момент перехода NER в HR и составлен так, что немодифицированная дцДНК человека не дает возможность ОСК, находящимся в фазе NER, завершить указанную фазу процесса репарации МЦС, а смесь кроссликированной и нативной дцДНК спермы лосося не дает начаться процессу HR в клетках, «избежавших» воздействия немодифицированной дцДНК человека в фазе NER.

Таким образом, режим воздействия «Каранахан» представляет собой последовательную трехкратную обработку опухолевых клеток, находящихся в процессе репарации МЦС ДНК, по следующей схеме: первая и две последующие обработки цитостатиком за 0–2 ч до окончания каждого предыдущего репаративного цикла и введения в терапию инъекций препарата ДНК-микс в точку перехода NER в HR (**Рисунок 12**).

При этом ОСК лишаются возможности завершить репаративный цикл. После такой обработки происходит индукция масштабного апоптоза

коммитированных опухолевых клеток и опухоль значительно уменьшается в объеме. Остаточные опухолевые клетки синхронизируются в G2/M-фазе клеточного цикла. При одновременном переходе остаточных опухолевых клеток из G2/M-фазы в чувствительную для интернализации экстраклеточной ДНК G1-фазу, процент TAMRA+ ОСК резко возрастает (увеличение количества TAMRA+ ОСК связано с тем, что часть клеток этого типа переживает проведенную обработку на фоне снижения количества коммитированных опухолевых клеток).

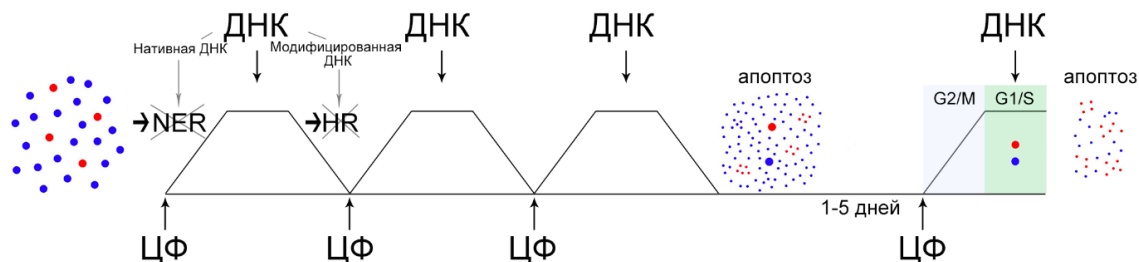


Рис. 12. Концептуальная схема режима воздействия «Каранахан». Крупными синими точками обозначены коммитированные опухолевые клетки, красными – ОСК. Мелкие точки обозначают апоптотические тельца разрушенных опухолевых клеток. Кривые линии отображают накопление и снижение количества ДЦР в опухолевых клетках (схематичное представление репаративного цикла).

Для осуществления воздействия на пережившие начальную терапевтическую обработку выжившие ОСК и коммитированные клетки опухоли, проводится четвертая (финальная) обработка препаратами. Цитостатик вводится в синхронную G2/M-фазу, а в следующую за ней фазу G1 – препарат ДНК-микс. Важным являлся тот факт, что промежуток времени между введением ЦФ и препарата ДНК-микс попадает в необходимую для активации репаративного процесса G1/раннюю S-фазу (**Рисунок 12**).

В **разделе 3.6** пошагово суммированы все технологические процедуры, которые необходимо провести с опухолевыми клетками для разработки схемы обработки цитостатиком и препаратом ДНК-микс согласно режиму воздействия «Каранахан».

Раздел 3.7 посвящен апробации режима «Каранахан». Терапевтический режим показал высокую эффективность на опухолевой модели карциномы мыши Кребс-2 в асцитной и солидной форме. Основываясь на данных экспериментов по анализу биологических параметров клеток Кребс-2 (определение времени репаративного цикла, синхронизации в G2/M-фазе клеточного цикла и выхода в G1-фазу), была определена схема лечения экспериментальных животных в соответствии с режимом «Каранахан» (**Рисунок 13 А**).

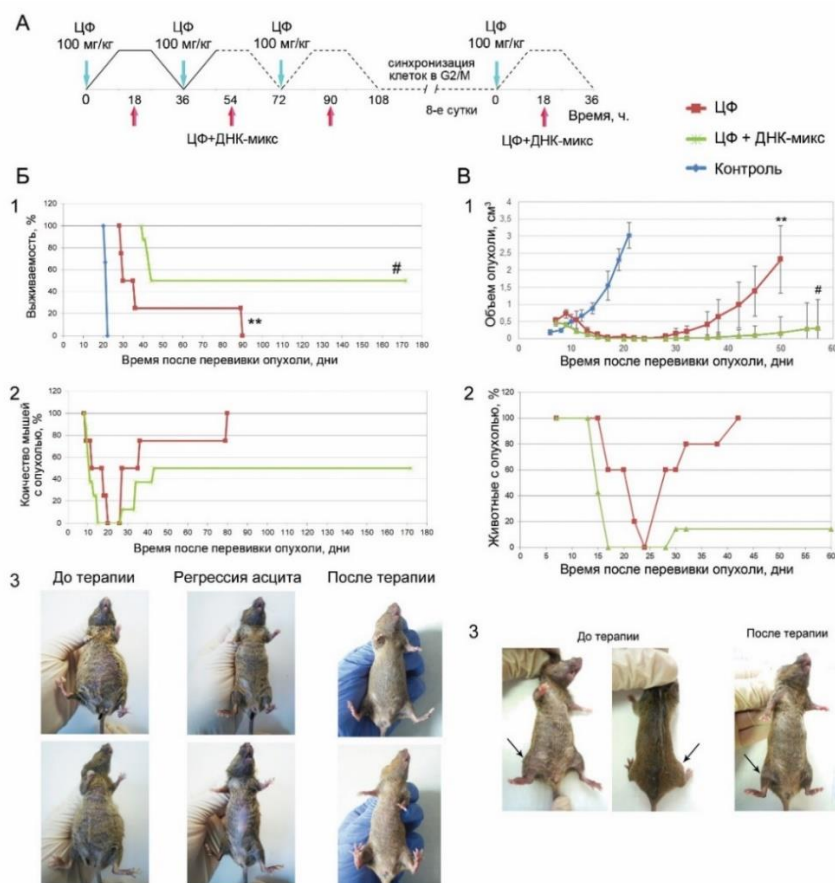


Рис. 13. Анализ лечения мышей с перевитой карциномой Кребс-2 согласно режиму «Каранахан». **А)** Общая схема введения препаратов ЦФ и ДНК-микс. **Б)** Асцитная форма опухоли. **В)** Сольидный трансплантат. 1 – Кривые Каплана-Мейера. 2 – Графики динамики фаз регрессии, ремиссии и рецидива (в случае асцитной опухоли) или количества животных с опухолью (в случае солидного графта). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; # $p < 0.001$, логарифмический ранговый тест, сравнивается выживаемость по сравнению с контролем. **Г)** Снимки животных, отображающие результаты терапии.

Предложенная схема введения препаратов позволила в 50 % случаев полностью вылечить мышей от асцита Кребс-2 ($n = 8$, $p < 0.001$ по сравнению с контролем) (**Рисунок 13 Б-1-3**). ЦФ (в режиме четырех инъекций без введения в терапию препарата ДНК-микс) также демонстрирует ярко выраженный терапевтический эффект ($n = 8$; $p < 0.01$). 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 лечение по схеме ЦФ+ДНК-микс достоверно увеличивает продолжительность жизни экспериментальных животных по сравнению с группой «ЦФ» ($p < 0.01$). 50 % животных в двух повторных экспериментах полностью вылечились от неизлечимой скоротечной асцитной формы карциномы Кребс-2.

Для лечения солидных опухолей была использована та же схема введения ЦФ и препарата ДНК-микс (**Рисунок 13 А**). ЦФ вводили внутривентально,

препарат ДНК-микс непосредственно в очаг опухоли. В группе, получавшей ЦФ в виде монопрепарата, к 17-м суткам опухоль отсутствовала у всех животных в группе (**Рисунок 13 В-1, 2**).

Начиная с 18-х суток стали возникать устойчивые рецидивы ($p < 0.01$ относительно контроля). В группе «ЦФ+ДНК-микс» признаки графта не определялись ни у одного животного до 23 суток. На 24-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 13 В-1**). В группе «ЦФ» у 100 % животных возник рецидив, тогда как в группе «ЦФ+ДНК-микс» на 60-е сутки рецидив наблюдался только у 14 % (**Рисунок 13 В-2, 3**).

Терапевтический режим «Каранахан» также показал эффективность при лечении других опухолевых моделей мышей: гепатокарциноме Г-29; устойчивой к действию ЦФ лимфосаркоме RLS; карциноме Льюис.

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 режима была выбрана модель глиобластомы человека U87.

Было проведено несколько вариантов исследований, позволяющих оценить (1) воздействие на опухолеобразующий потенциал культуры U87; (2) эффективность лечения уже развитого опухолевого очага. В первом случае клетки U87 предварительно обрабатывали препаратами *in vitro*, далее пересаживали интрацеребрально иммунодефицитным мышам и анализировали способность к образованию трансплантата. Во втором случае была протестирована эффективность лечения подкожного трансплантата U87, а также максимально приближенного к реальным условиям ортотопического ксенографта в комбинации с его хирургическим удалением. В последнем случае эксперимент состоял из двух этапов: хирургического удаления опухоли и терапии с использованием ЦФ и препарата ДНК-микс согласно определенным индикаторным параметрам.

По данным МРТ 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. Через один 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 волуметрии показали, что динамика роста опухолей значительно снижена в группе «ЦФ+ДНК» по сравнению с двумя другими (**Рисунок 14 А**). В группах

«ЦФ» и «Контроль» отмечалось увеличение объема опухолей и инфильтративный тип роста.

Применение режима «Каранахан» увеличивало медиану выживаемости мышей в два раза относительно группы контроля и составила 62 дня с момента первого МРТ-сканирования против 35 дней в группе «Контроль» ($p < 0.05$). Медиана выживаемости в группе «ЦФ» составила 40 дней и не продемонстрировала достоверных различий относительно контроля ($p = 0.94$) (Рисунок 14 Б).

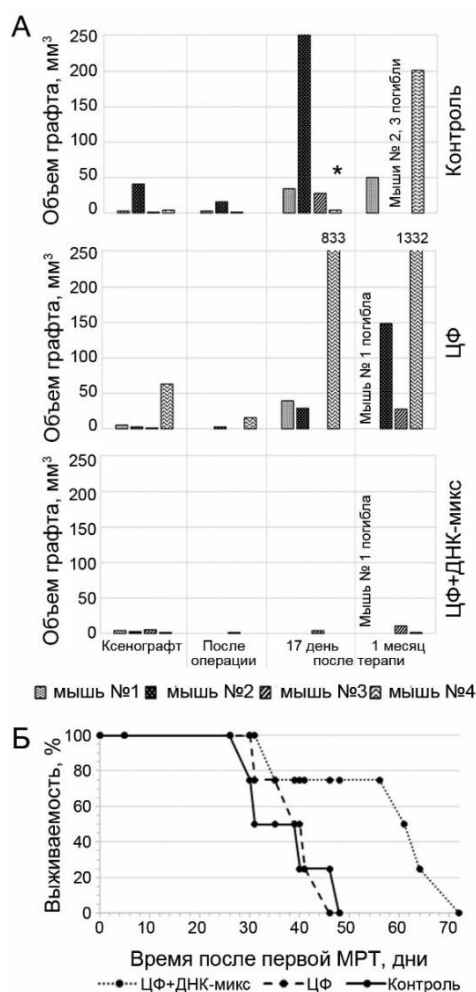


Рис. 14. Лечение ортотопического ксенотрансплантата глиобластомы человека U87 по технологии «Каранахан» с предварительным хирургическим удалением графта. **А)** Гистограммы динамики роста опухолей индивидуально по мышам в группах: «ЦФ+ДНК», «ЦФ», «Контроль». **Б)** График выживаемости мышей в ходе эксперимента (Кривые Каплана-Мейера); * $p < 0.05$, логарифмический ранговый тест. За начало эксперимента принят момент предоперационного МРТ-сканирования.

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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время появились три терапевтических подхода, основанных не на воздействии на целевые индивидуальные молекулы в опухолевой клетке, а запускающие интегральные многофакторные процессы, результатом которых является лизис развитой опухоли. Это *in situ* вакцинация (Sagiv-Barfi et al., 2018), малодозовая метрономная химиотерапия ЦФ (Wu, Jordan, Waxman, 2016), а также разработанный в рамках настоящей работы терапевтический режим «Каранахан».

Все три технологии 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 выживанию экспериментальных животных. Малодозовая метрономная химиотерапия ЦФ направлена на разрушение опухоль-ассоциированной стромы, являющейся основой развития опухоли. При таком подходе также происходит лизис опухолевого очага. Основным ограничением указанных подходов является их применимость исключительно к иммуногенным опухолям.

Терапевтический режим «Каранахан» является универсальным для лечения как иммуногенных, так и неиммуногенных опухолей, основанным на эрадикации ОСК, разрушении опухоль-ассоциированной стромы и активации противоопухолевого иммунного ответа.

В вопросе таргетного воздействия на ОСК режим воздействия «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. Ограничения заключаются в том, что ОСК обычно присутствуют в очень небольших количествах, а их маркеры 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).

В этом разрезе одним из преимуществ режима «Каранахан» является универсальность используемого «индикатора» – способности ОСК интернализировать фрагменты дцДНК. То есть в сравнении с клеточной и пассивной иммунотерапиями формат терапевтического режима «Каранахан» является универсальным и не зависит от общепринятых таргетных маркеров.

Одной из ключевых задач, которые предстоит решить в рамках оптимизации режима «Каранахан», является совершенствование системы доставки препарата дцДНК. В настоящей работе препарат ДНК-микс вводили интратуморально, однако в ряде случаев такой подход технически труднореализуем. В этом смысле ограничения разработанной терапии связаны со сложностью доставки препарата ДНК-микс ко всей массе опухолевых клеток.

Таким образом, режим воздействия «Каранахан» является уникальным терапевтическим подходом, позволяющим оказывать одновременно три причинных терапевтических воздействия на опухоль. Первое и главное, при использовании режима «Каранахан» происходит эрадикация ОСК, в результате чего опухоль лишается туморогенного начала. Во-вторых, инициируется лизис коммитированных клеток. В-третьих, происходит активация противоопухолевого

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 многолетней работы, в которых экспериментально доказываются новые, ранее не известные свойства ОСК. Описываются механизмы, влияющие на протекание репаративных процессов в ОСК, и приводятся результаты апробации терапевтического режима «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 интернализующие 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 ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Dolgova EV**, Efremov YR, Orishchenko KE, Andrushkevich OM, Alyamkina EA, Proskurina AS, Bayborodin SI, et al. Delivery and processing of exogenous double-stranded DNA in mouse CD34+ hematopoietic progenitor cells and their cell cycle changes upon combined treatment with cyclophosphamide and double-stranded DNA // Gene. 2013. 528(2): 74-83. DOI: 10.1016/j.gene.2013.06.058.

2. **Dolgova EV**, Alyamkina EA, Efremov YR, Nikolin VP, Popova NA, Tyrinova TV, Kozel AV, et al. Identification of cancer stem cells and a strategy for their elimination // Cancer Biol Ther. 2014. 15(10): 1378-94. DOI: 10.4161/cbt.29854.

3. Alyamkina EA, Nikolin VP, Popova NA, Minkevich AM, Kozel AV, **Dolgova EV**, Efremov YR, et al. Combination of cyclophosphamide and double-stranded DNA demonstrates synergistic toxicity against established xenografts // Cancer Cell Int. 2015. 15: 32. DOI: 10.1186/s12935-015-0180-6.

4. Proskurina AS, Gvozdeva TS, Alyamkina EA, **Dolgova EV**, Orishchenko KE, Nikolin VP, Popova NA, et al. 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. DOI: 10.1186/s12885-015-1142-z.

5. **Dolgova EV**, Potter EA, Proskurina AS, Minkevich AM, Chernych ER, Ostanin AA, Efremov YR, et al. Properties of internalization factors contributing to the uptake of extracellular DNA into tumor-initiating stem cells of mouse Krebs-2 cell line // Stem Cell Res Ther. 2016. 7(1): 76. DOI: 10.1186/s13287-016-0338-8.

6. Proskurina AS, Gvozdeva TS, Potter EA, **Dolgova EV**, Orishchenko KE, Nikolin VP, Popova NA, et al. 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. DOI: 10.1186/s12885-016-2711-5.

7. Potter EA, **Dolgova EV**, Proskurina AS, Minkevich AM, Efremov YR, Taranov OS, Omigov VV, et al. A strategy to eradicate well-developed Krebs-2 ascites in mice // Oncotarget. 2016. 7(10): 11580-94. DOI: 10.18632/oncotarget.7311.

8. Potter EA*, **Dolgova EV***, Proskurina AS, Efremov YR, Minkevich AM, Rozanov AS, Peltek SE, 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. 8(6): 9425-9441. DOI: 10.18632/oncotarget.14116. * These authors contributed equally to this work.

9. **Dolgova EV**, Mishinov SV, Proskurina AS, Potter EA, Efremov YR, Bayborodin SI, Tyrinova TV, et al. Novel Cancer Stem Marker and Its Applicability for Grading Primary Human Gliomas // Technol Cancer Res Treat. 2018. 17: 1533034617753812. DOI: 10.1177/1533034617753812.

10. Efremov YR, Proskurina AS, Potter EA, **Dolgova EV**, Efremova OV, Taranov OS, Ostanin AA, et al. Cancer Stem Cells: Emergent Nature of Tumor Emergency // Front. Genet. 2018. 9: 544. DOI: 10.3389/fgene.2018.00544.

11. Potter EA, Proskurina AS, Ritter GS, **Dolgova EV**, Nikolin VP, Popova NA, Taranov OS, et al. Efficacy of a new cancer treatment strategy based on eradication of tumor-initiating stem cells in a mouse model of Krebs-2 solid adenocarcinoma // Oncotarget. 2018. 9(47):28486-28499. DOI: 10.18632/oncotarget.25503.

12. **Dolgova EV**, Petrova DD, Proskurina AS, Ritter GS, Kisaretova PE, Potter EA, Efremov YR, et al. 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. DOI: 10.1186/s12935-019-0842-x.

13. **Dolgova EV**, Evdokimov AN, Proskurina AS, Efremov YR, Bayborodin SI, Potter EA, Popov AA, et al. Double-Stranded DNA Fragments Bearing Unrepairable Lesions and Their Internalization into Mouse Krebs-2 Carcinoma Cells // Nucleic Acid Ther. 2019. 29(5): 278-290. DOI: 10.1089/nat.2019.0786.

14. **Dolgova EV**, Andrushkevich OM, Kisaretova PE, Proskurina AS, Ritter GS, Dubatolova TD, Romanenko MV, et al. Efficacy of the new therapeutic approach in curing malignant neoplasms on the model of human glioblastoma // Cancer Biol Med. 2021. 18(3): 910-930. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0511.

15. Ruzanova VS, Proskurina AS, Efremov YR, Kirikovich SS, Ritter GS, Levites EV, **Dolgova EV**, 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. 28: 1610180. DOI: 10.3389/pore.2022.1610180.

16. Ritter GS*, **Dolgova EV***, Petrova DD, Efremov YR, Proskurina AS, Potter EA, Ruzanova VS, et al. 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. DOI: 10.3389/fgene.2022.954395. * These authors contributed equally to this work.

17. Petrova DD*; **Dolgova EV***; Proskurina AS; Ritter GS; Ruzanova VS; Efremov YR; Potter EA, 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. DOI: 10.3390/ijms232415800. * These authors contributed equally to this work.

18. Ruzanova VS, Kirikovich SS, Levites EV, Proskurina AS, **Dolgova EV**, Ritter GS, Efremov YR, et al. The Macrophage Activator GcMAF-RF Enhances the Antitumor Effect of Karanahan Technology through Induction of M2–M1 Macrophage Reprograming // Journal of Immunology Research. 2024. 2024: 7484490. DOI: 10.1155/2024/7484490.