

ХАРАКТЕРИСТИКА ВРЕМЕННЫХ ПАРАМЕТРОВ ПРОЯВЛЕНИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИНЪЕКЦИЙ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК НА ФОНЕ ПРЕДОБРАБОТКИ ЦИТОСТАТИКОМ ЦИКЛОФОСФАНОМ

Е.В. Долгова¹, А.С. Проскурина¹, В.П. Николин¹, Н.А. Попова¹, Е.А. Алямкина¹,
К.Е. Орищенко¹, А.Г. Шилов¹, Я.Р. Ефремов¹, Е.Р. Черных², А.А. Останин²,
С.С. Богачев¹, А.В. Прокопенко¹, Е.М. Малкова⁴, О.С. Таранов⁴, Т.С. Гвоздева⁵,
В.А. Рогачев¹, С.Н. Загребельный³, М.А. Шурдов⁶

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: gorbi@bionet.nsc.ru;

² Институт клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия;

³ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

⁴ ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск, Россия;

⁵ Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия;

⁶ ООО «Панаген»

Инъекции экзогенной ДНК в дозе 0,1–1,0 мг на фоне предобработки кросслинквирующим цитостатиком циклофосфаном (ЦФ) в дозе 200 мг/кг приводят к появлению характерного симптомокомплекса и гибели экспериментальных мышшей – эффект «отсроченной смерти». Обнаруженный эффект проявляется при непрерывных с промежутком 1–2 ч инъекциях экзогенной ДНК двумя волнами: в 6-часовой отрезок времени 18–24 ч и следующим за ним добавочным 6-часовым промежутком времени 24–30 или 42–48 ч, «окно смерти», после инъекции ЦФ. Промежуток времени 18–24 ч представляет собой конечную фазу репарации двуцепочечных разрывов (ДЦР) в клетках костного мозга (ККМ), существующих как промежуточный интермедиат репарации межцепочечных сшивок (МЦС), индуцированных ЦФ. Начало инъекций экзогенной ДНК уже через 10 мин после первого введения приводит к исчезновению из пространства ядер ККМ свидетелей ДЦР – модифицированного гистона γ H2AX. Обнаруженная корреляция между фазой репарации ДЦР в ККМ, появлением в ядерном пространстве фрагментов экзогенной ДНК и гибелью опытных мышшей предполагает участие экзогенной ДНК в репаративном процессе при репарации ДЦР. При этом предполагаемое участие осуществляется таким образом, что нарушаются основные принципы гомеостаза определенного типа активно пролиферирующих клеток, что приводит к их полной необратимой элиминации и, как следствие, к разрушению определенной функции организма и летальному исходу.

Ключевые слова: циклофосфан, двуцепочечные разрывы, межцепочечные сшивки, клетки костного мозга, экзогенная ДНК, репарация ДНК.

Введение

Циклофосфан (ЦФ) относится к алкилирующим противоопухолевым препаратам, широко используемым в онкологической клинике. При воздействии ЦФ на живой организм в первую очередь и в наибольшей степени страдают активно пролиферирующие клетки организма: клетки эпителия, клетки волосяных фолликул

и стволовые клетки крови (СКК), входящие в состав клеток костного мозга (ККМ) (Magaña-Schwencke *et al.*, 1982; Mazur, Czyżewska, 2001; Salem *et al.*, 2010). Основным механизмом, обеспечивающим противораковый эффект действия цитостатика, является индукция его метаболитом фосфорамид мустардом в активно делящихся клетках, таких, как раковые клетки, костномозговые предшественники, стволовые

клетки различного генеза межцепочечных сшивок (МЦС). Дефекты в системах, обеспечивающих удаление такого повреждения, приводят к абберрантному митозу клеток, получивших МЦС, и их апоптотической гибели (Fleming, 1997; Magaña-Schwencke *et al.*, 1982).

Существует несколько путей репарации МЦС. Конкретный механизм, выбираемый клеткой, зависит от ее свойств, стадии клеточного цикла, в котором она находилась в момент получения повреждения, наличия тех или иных факторов репарации (Долгова и др., 2010). В рамках настоящего исследования наиболее актуальным является характеристика молекулярных событий репарации МЦС, начинающейся в момент репликации клеток, когда при столкновении репликативной вилки с повреждением возникают двуцепочечные разрывы (ДЦР) как необходимые интермедиаты репарации (Niederhoffer *et al.*, 2004; Akkari *et al.*, 2000).

Существуют факты, свидетельствующие о том, что инъекции экзогенной фрагментированной геномной ДНК связаны с эффектами, при которых затрагивается функциональная целостность СКК. Так, в экспериментах, выполненных в работе А.С. Likhacheva с соавт. (2007а), отмечалось появление селезеночных колоний у смертельно облученных мышей после своевременных инъекций экзогенной ДНК. Это наблюдение свидетельствовало о том, что экзогенная ДНК при внутрибрюшинном введении достигает КKM и воздействует на CD34+, сохраняя их жизнеспособность. Также многократно показано, что инъекции экзогенной ДНК экспериментальным животным стимулируют гемо- и лейкопоэз, что свидетельствует об активации пролиферации покоящихся CD34+ (Николин и др., 2006; Долгова и др., 2009). Эти факты говорят о том, что экзогенная ДНК достигает КKM и в частности СКК и их потомков разной степени зрелости, и становится равноправным участником определенных общеклеточных событий или непосредственно индуцирует эти события в указанном типе клеток. Другой важный вывод из имеющихся экспериментальных фактов заключается в том, что, по-видимому, КKM (СКК) являются первыми и наиболее легкодоступными клетками-мишенями, на которые как химические агенты и радиация,

так и экзогенная ДНК, интродуцированная в организм, действуют в первую очередь.

Исходя из этого, в общей схеме представлений о действии ЦФ и экзогенной ДНК на КKM можно выделить два главных события. Во-первых, это образование ДЦР как основных интермедиатов репарации МЦС. Во-вторых, это присутствие фрагментов экзогенной ДНК во внутриядерном пространстве в момент репарации этих разрывов в клетке.

В настоящем исследовании установлено, что инъекции экзогенной ДНК в промежуток времени 18–30 ч после введения ЦФ приводят к появлению характерного симптомокомплекса и гибели экспериментальных животных. Отрезок времени 18–24 ч после введения цитостатика является завершающим этапом репарации всей массы ДЦР, сформированных к 12 ч после введения ЦФ. Предполагается, что фрагменты экзогенной ДНК достигают КKM и принимают участие в репаративных процессах, индуцированных МЦС, внося деструктивные изменения в молекулярные клеточные системы, что приводит к непоправимым изменениям в организме мышей, сопровождающимся характерным симптомокомплексом и гибелью.

Материалы и методы

Разведение экспериментальных животных

В экспериментах использовали 2–3-месячных мышей линии СВА/Лас разведения вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Животных содержали в пластиковых клетках по 10 особей в каждой со свободным доступом к пище и воде. Мыши получали гранулированный корм ПК120-1 (Лабораторснаб, Москва).

Препарат ДНК человека

Препарат человеческой ДНК получали из плацент здоровых рожениц. Для выделения ДНК использовали бесфенольный метод, 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 300 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».

Введение мышам ЦФ и ДНК человека

ЦФ вводился мышам внутривенно (в/б) из расчета 200 мг/кг веса. Затем через определенные интервалы времени мышам в/б вводили по 0,5–1 мг препарата фрагментированной человеческой ДНК. Схемы введения мышам ЦФ и ДНК человека представлены в Приложении, табл.

Приготовление препаратов из ККМ мышей и иммунофлуоресцентный анализ фокусов репарации ДЦР

Из трубчатых костей фосфатно-солевым буфером (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 8 мМ Na_2HPO_4 , 1,5 мМ KH_2PO_4) вымывали красный костный мозг. Клетки центрифугировали 5 мин (настольная центрифуга Eppendorf 5414), осадок клеток ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере. Каплю полученной взвеси клеток наносили на предметное стекло, препарат высушивали и фиксировали 2%-м параформальдегидом в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4, в течение 15 мин. Проницаемость мембран нарушали 0,1% Triton X-100 в этом же буфере. Затем препараты обрабатывали кроличьими антителами к модифицированному гистону (anti-phospho-histone Sigma, США) γH2AX в разведении 1 : 1000 в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4, с 0,15%-ным глицином (Sigma, США) и 0,5%-ным бычьим сывороточным альбумином (BSA) в течение часа при комнатной температуре (100 мкл на препарат). Обработка проводилась во влажной камере в темноте. Препарат промывался фосфатно-солевым буфером с 0,5%-ным BSA и обрабатывался мечеными FITC козьими антителами против IgG кролика (goat anti rabbit IgG FITC-conjugate Sigma, США) в течение часа при комнатной температуре в разведении 1 : 500 в таком же растворе, что и предыдущие антитела, условия обработки аналогичные. Затем препарат

еще раз промывался фосфатно-солевым буфером с 0,5%-ным BSA. После отмывки на препарат наносили ~10 мкл Antifade DABCO, покрывали покровным стеклом. Препараты хранили в холодильнике в плотно закрывающихся коробках.

Анализ распределения ККМ по клеточному циклу

Из трубчатых костей фосфатно-солевым буфером вымывали красный костный мозг. ~400 тыс. клеток фиксировали в 60%-ном метаноле при 4°C в течение часа. Клетки осаждали центрифугированием при 4°C , 400 g (центрифуга Eppendorf 5810 R, США), 5 мин. Осадок ресуспендировали в 400 мкл фосфатно-солевого буфера, обрабатывали РНКазой 200 мкг/мл, 30 мин, 37°C . Добавляли 20 мкл пропидиума йодида (5 мг/мл) и окрашивали клетки 10 мин при комнатной температуре.

Распределение клеток по клеточному циклу определяли при помощи проточного цитофлуориметра BD FACSAria (Becton Dickinson, США) в центре коллективного пользования проточной цитофлуориметрии ИЦиГ СО РАН.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных по выживаемости мышей в проведенных экспериментах по совместному введению ЦФ и экзогенной ДНК, выявляющая достоверные различия между группами мышей, проводилась при помощи однофакторного дисперсионного анализа с использованием критерия Фишера.

Доверительные интервалы в графике, показывающем процент ККМ мышей с ДЦР и процент клеток, находящихся под воздействием ЦФ в каждый момент времени, подсчитаны для $P = 0,95$.

Результаты

Временные параметры проявления эффекта «отсроченной смерти» в группе экспериментальных мышей

При исследовании лейкостимулирующей активности инъекций препаратов экзогенной ДНК в группе экспериментальных животных

неожиданно была отмечена массовая гибель мышей, достигавшая 80% (Likhacheva *et al.*, 2007b). Основные симптомы заболевания были следующие: общее угнетение двигательной активности, обильное потение, лихорадка, отек морды, выпадение волос на затылке и морде, неоткрывание глаз, редко судороги, параличи. Иногда мыши погибали сразу, без наличия видимых признаков заболевания. В редких случаях мыши выздоравливали после характерных симптомов.

Эффект был обнаружен как следствие трехкратного введения экзогенной ДНК в дозе 0,5 мг на инъекцию на мышью на фоне действия цитостатика ЦФ. Первая инъекция была проведена непосредственно перед введением ЦФ, вторая через сутки и третья инъекция через двое суток после введения ЦФ (рис. 1, группа 4). Мыши погибали на протяжении длительного промежутка времени, порядка 45 суток, начиная с 6-х суток после введения ЦФ. Было проведено несколь-

ко повторов аналогичных обработок, однако ожидаемого эффекта получено не было. Мы предположили, что эффект «отсроченной смерти» связан с неким состоянием определенных систем клеток, возникшим после инъекции ЦФ, при котором появление в организме животного больших количеств экзогенной ДНК приводит к гибели этих клеток. Причем это состояние восприимчивости к действию препаратов экзогенной ДНК растянуто во времени. Если клетки составляют функциональную систему(ы) организма, то их гибель приводит к разрушению этой (этих) системы и, как следствие, к летальному исходу. В связи с этим мы провели серию экспериментов, необходимых для определения временного отрезка «окна смерти», когда проявляется эффект гибели мышей. Для того чтобы с большей долей вероятности попасть во временную точку после введения ЦФ, когда экзогенная ДНК действует на соответствующие клеточные системы, мы выбрали подход массированного

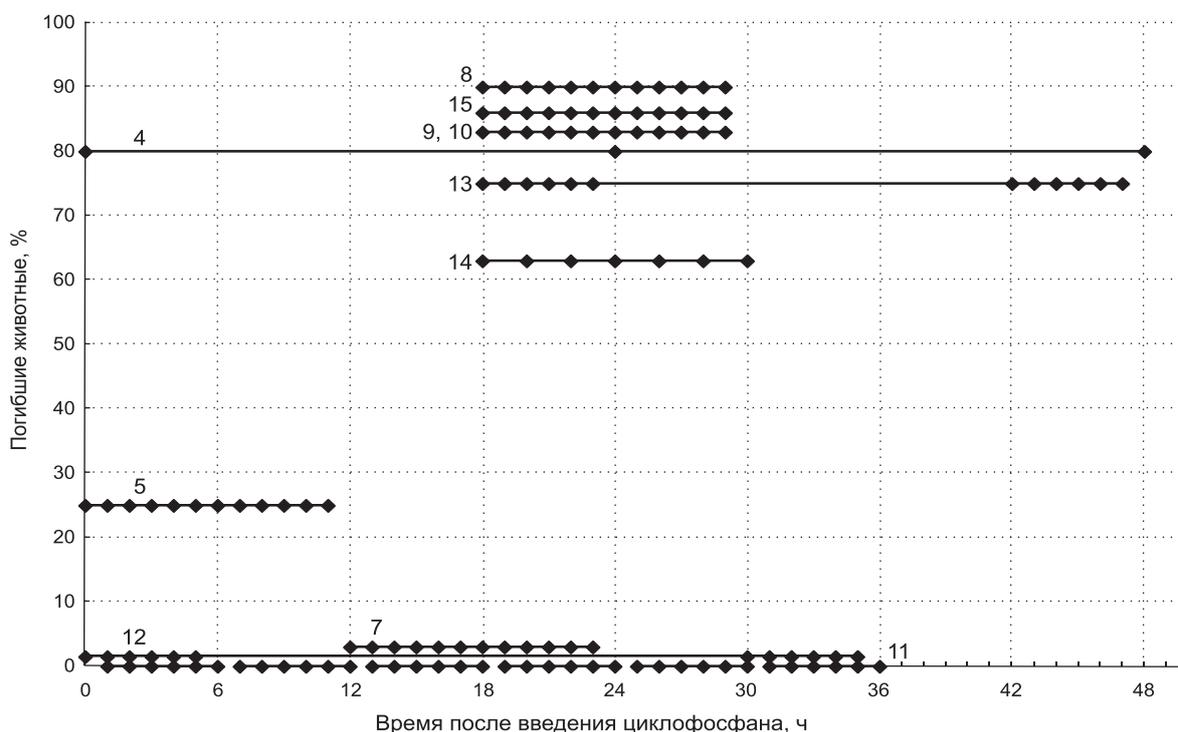


Рис. 1. Гибель мышей при различных схемах введения экзогенной ДНК после ЦФ.

Прямые отрезки обозначают различные группы мышей, числа рядом — условные номера групп. Точками на отрезках обозначено введение мышам ДНК. Нулевая точка — момент введения ЦФ. Проекция на ось Y показывает процент смертности мышей в каждой группе. Группы 9 и 10 получали инъекции ДНК мышей линии СВА и ДНК спермы лосося. Все остальные группы получали инъекции ДНК человека. Группа 11 представляет собой совокупность 6 групп, каждая из которых каждый час получала инъекции ДНК человека в разные периоды времени, а именно: 1–6, 7–12, 13–18, 19–24, 25–30 и 31–36 ч после ЦФ.

воздействия препаратом экзогенной ДНК в фиксированные промежутки времени после введения ЦФ. При использовании варьирования 6- и 12-часовыми промежутками времени введения экзогенной ДНК после инъекции ЦФ у разных групп мышей (Приложение, табл.), был определен период времени, когда гибель мышей достигала 60–90% (рис. 1).

В ходе проведенных экспериментов было обнаружено, что введение мышам экзогенной ДНК в промежуток времени 18–30 ч (каждые 1–2 ч) после введения ЦФ приводит к быстрой гибели мышей в течение недели после инъекции ЦФ (группы 8, 9, 10, 14 и 15). Если вводить ДНК в два разнесенных во времени промежутка, как для групп 4 и 13, также наблюдается гибель мышей, но растянутая во времени – гибель мышей начиналась только с 9-х суток после инъекции ЦФ и продолжалась до 45 суток. При введении ДНК в период 0–11 ч после введения ЦФ (группа 5) наблюдалась гибель 25% животных.

Введение ЦФ (200 мг/кг) в виде монопрепарата мышам, а также введение ЦФ в сочетании с ДНК человека в другие временные промежутки (группы 7, 11, 12) не оказывало никакого видимого эффекта на животных.

Исходя из экспериментальных данных следует, что наблюдаемый эффект не является случайным, не связан с токсичностью ЦФ, которую данный препарат проявляет при метаболизме в организме животного, не связан с присутствием в организме препарата экзогенной ДНК, а зависит от совместного действия ЦФ и препарата ДНК. Причинными параметрами такого действия являются время введения препарата ДНК после инъекции ЦФ и определенная повторяемость введения препарата ДНК. «Окно смерти» представляет собой два 6-часовых промежутка времени после введения ЦФ. Отрезок 18–24 ч является обязательным для возникновения эффекта гибели. После него должен в обязательном порядке следовать второй 6-часовой промежуток времени, в который проводятся инъекции экзогенной ДНК. Этот 6-часовой промежуток времени или следует непосредственно за первым (24–30 ч), или отнесен к концу вторых суток (42–48 ч).

Следует отметить некоторые особенности проявления эффекта «отсроченной смерти». Во-первых, такое действие оказывает как ксе-

ногенная, так и аллогенная ДНК. Во-вторых, на положение «окна смерти» относительно момента инъекции цитостатика оказывает время года в регионе, где проводились исследования (г. Новосибирск, Россия). В летний промежуток времени (высокая температура, продолжительный световой день) нам в результате 3 повторов не удалось повторить обнаруженный эффект. При этом проведение экспериментов в любое другое время года (сентябрь–апрель) всегда приводило к проявлению эффекта. Ввиду длительности каждого эксперимента, а также по этико-гуманным соображениям, поскольку каждый эксперимент требует обязательного присутствия большого количества контрольных групп, мы не стали исследовать эффект смещения «окна смерти» в летний период. Все эксперименты, описанные в настоящей работе, проводились в адекватное эмпирически выбранное время года, и применялась максимально эффективная схема введения препарата экзогенной ДНК в промежуток времени 18–30 ч после инъекции ЦФ.

Анализ динамики возникновения и репарации ДЦР

Инъекции как ЦФ, так и экзогенной ДНК в виде монопрепаратов не приводят к видимым изменениям в физиологии мышей. Феномен появления характерного симптомокомплекса и гибели экспериментальных животных наблюдался только при совместном использовании двух препаратов в строго определенные промежутки времени.

Как уже было сказано, систему ККМ можно рассматривать как модельную систему клеток, с которой можно сравнивать все другие системы клеток организма, находящиеся в непрерывном делении. В таком случае возникшие нарушения в клетках этой клеточной системы можно корректно экстраполировать на любые другие активно пролиферирующие клетки организма. Это предполагает, что если ККМ погибают под синергичным воздействием ЦФ и экзогенной ДНК, то вероятность гибели других активно делящихся клеток высока, и что если разрушается система ККМ, то разрушаются любые другие системы пролиферирующих клеток, создающих функциональную целостность организма.

На основе общеизвестного факта, что ЦФ воздействует на ККМ, а фрагменты экзогенной ДНК интернализируются во внутриядерном пространстве данных клеток (Likhacheva *et al.*, 2007a; Долгова и др., 2011a), нами были выявлены определенные закономерности в молекулярных событиях, протекающих в ККМ при воздействии ЦФ и экзогенной ДНК.

Для того чтобы привязать установленные промежутки времени, когда наблюдается видимый эффект воздействия экзогенной ДНК на мышинный организм, к молекулярным процессам, происходящим в выбранной к рассмотрению системе клеток, были проведены эксперименты, в которых при помощи антител к фосфорилированному гистону γ H2AX анализировалось количество ДЦР в ядрах данных клеток. Гистон γ H2AX фосфорилируется на участке в несколько миллионов пар нуклеотидов по разные стороны от ДЦР, возникающего после столкновения репликативной вилки с МЦС в молекуле ДНК хромосомы. При этом формируется фокус репарации, который выявляется специфическими к модифицированному гистону антителами, и, следовательно, количество фокусов репарации коррелирует с количеством ДЦР (рис. 2) (Niedernhofer *et al.*, 2004; Rothfus, Grompe, 2004).

В процессе приготовления цитологических препаратов ККМ использовался метод вымывания ККМ из бедренных костей опытных живот-

ных, поэтому при анализе полученных данных рассматривался весь ряд клеток (гемопоэтических элементов, из которых происходит развитие эритроцитов, зернистых лейкоцитов, кровяных пластинок, а также костномозговых лимфоцитов), входящих в состав данной структуры. В результате проведенного анализа количества ДЦР в ККМ, находящихся под действием ЦФ, был получен следующий график (рис. 3).

Как известно, в норме ДЦР могут спонтанно образовываться в клетке в процессе репликации, где они быстро репарируются без включения в клетку ареста клеточного цикла и остановки цикла деления (Rothfus, Grompe, 2004). Поэтому в нулевой (контрольной) точке кривая не находится строго в нуле. Данные, полученные в проведенных экспериментах, свидетельствуют о том, что $3,7 \pm 0,9\%$ клеток имеют спонтанные ДЦР, и среднее количество таких ДЦР на клетку составляет $7,4 \pm 1,7$. Интересен тот факт, что количество клеток, на которые происходит воздействие цитостатика, имеет два пика: в 12 и в 36 ч. При этом на 12 ч приходится максимум клеток с ДЦР (48,9%), которые возникли в результате репарации МЦС, а в 36 ч пик составляют всего 10% клеток.

Закономерность появления ДЦР мы связываем с клеточным циклом ККМ, которые в силу своей гетерогенности доходят до S-фазы и определяют повреждение не в одно время, а как две разные популяции. Согласно такому механизму

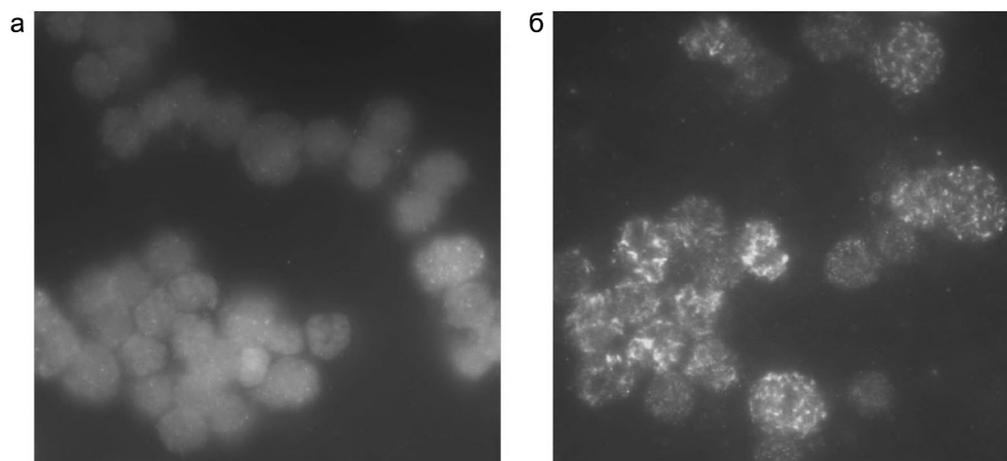


Рис. 2. Окрашенные FITC-мечеными антителами к гистону γ H2AX ядра ККМ интактной мыши (а) и экспериментальной мыши после воздействия ЦФ (б).

Яркие светящиеся точки в ядрах представляют собой фокусы репарации ДЦР.

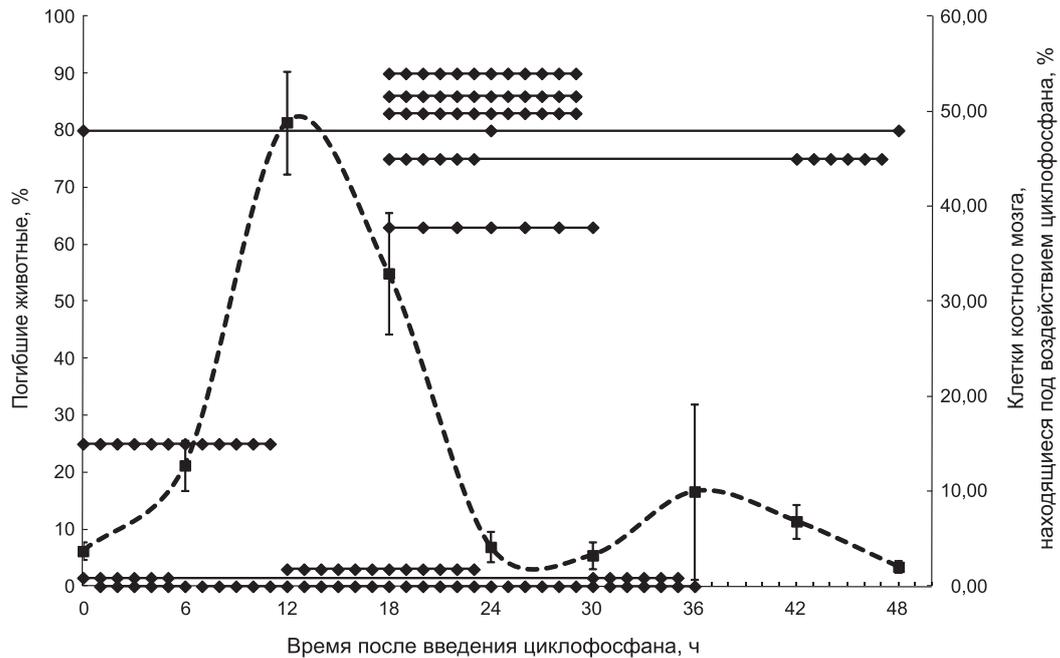


Рис. 3. Прерывистая кривая показывает процент ККМ, в которых количество ДЦР выше фона (> 10 ДЦР на клетку) – среднего количества ДЦР на клетку в контроле, т. е. процент клеток, которые достоверно находятся под воздействием цитостатика ЦФ. Горизонтальные сплошные линии отображают процент погибших животных в различных сериях экспериментов.

образования ДЦР, мы должны обнаружить два пика: первый отражает начало репаративного процесса в клетках, получивших ЦФ в поздней G1- и S-фазах клеточного цикла; второй пик отражает начало репаративного процесса в клетках, которые в момент получения сшивки находились в G2-фазе и прошли клеточный цикл до S-фазы, прежде чем у них активировалась репарационная система. Небольшой процент клеток, составляющих второй пик, сопоставим с тем, что доля клеток, находящихся в G2-фазе в каждый данный момент времени в гетерогенной популяции, пропорциональна длине данной фазы клеточного цикла. Самыми длинными являются G1- и S-фазы, а G2 непродолжительна. Время клеточного цикла у таких популяций быстро делящихся клеток, как ККМ, составляет около 24 ч (Молекулярная биология клетки, 1994; Mondal *et al.*, 2001).

В проведенных экспериментах по анализу распределения ККМ по клеточному циклу показано, что 73,9% клеток находятся в G1-фазе, 9,2% клеток находятся в S-фазе, 11,5% клеток находятся в G2/M-фазе клеточного цикла (рис. 4). Процент клеток, находящихся в G2-фазе кле-

точного цикла, сопоставим с процентом ККМ, которые составляют второй пик репарации ДЦР (10%).

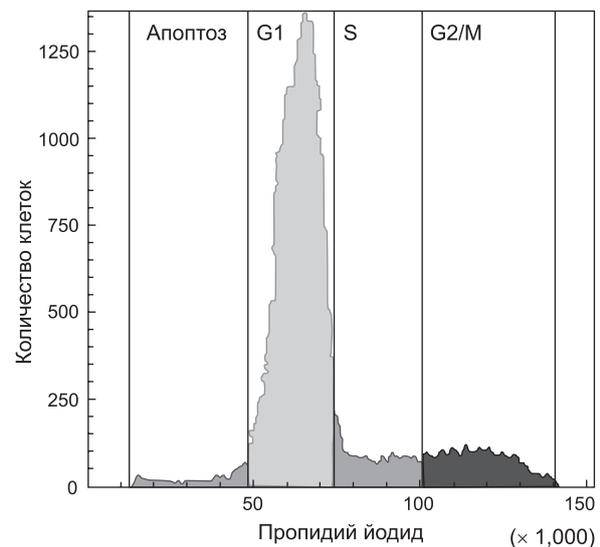


Рис. 4. Распределение популяции ККМ интактной мыши по клеточному циклу.

Анализ проводился с использованием красителя пропидий йодида (PI) и проточного цитофлюориметра BD FACSAria (Becton Dickinson, США).

**Сопоставление гибели
экспериментальных животных
при введении экзогенной ДНК
в определенные интервалы времени
после воздействия ЦФ
с количеством ДЦР в ККМ**

Из сопоставления графиков гибели мышей и количества ДЦР (рис. 3) можно сделать заключение о том, что мыши заболевают и гибнут только в том случае если введение ДНК затрагивает процесс репарации ДЦР основного количества ККМ, происходящий в промежутке времени 18–24 (12–26) ч после инъекции ЦФ.

Если же введение экзогенной ДНК захватывает любой другой промежуток времени, то мыши выживают. Инъекции экзогенной ДНК мышам и доставка фрагментов экзогенной ДНК в ККМ в момент, когда в клетке активирована репаративная система в связи с переходом клетки в S-фазу и обнаружением клеткой МЦС, индуцируют некие события, приводящие к гибели экспериментальных животных. При этом ни нахождение экзогенной ДНК в ККМ, не находящейся под воздействием ЦФ, ни цитостатик как монопрепарат не приводят к каким-либо нарушениям в организме мышей. Повторные промежутки времени инъекций экзогенной ДНК необходимы для воздействия на клетки, находившиеся в критический промежуток времени 18–24 ч в G2/M-фазе.

**Анализ количества ДЦР в ККМ мышей
после воздействия только ЦФ
и ЦФ в комбинации с экзогенной ДНК**

Наиболее интригующим из вопросов, возникших в процессе работы, был вопрос о возможных вариантах завершения репарации ДЦР хромосом при интернализации фрагментов экзогенной ДНК в ядерном пространстве клетки. Одним из рассматриваемых вариантов предполагалась возможность появления аномального интермедиата репаративной гомологичной рекомбинации: процессированного двуцепочечного конца хромосомы, при котором одноцепочечный хвост инвазирует во внешнюю матрицу, представляющую собой эписомоподобную структуру, сформированную ковалентным объединением экзогенных фраг-

ментов, доставленных в ядерное пространство из окружающей среды (Branzei, Foiani, 2007, Hashizume, Shimizu, 2007). Сохранение такой структуры длительное время без завершения процесса рекомбинации могло бы индуцировать активацию апоптотического каскада. Стабильное длительное присутствие в ядре таких структур можно было бы визуализировать, поскольку при этом предполагалось, что ДЦР сохраняются в нерепарированной форме, и, следовательно, в клетках присутствует фосфорилированная форма гистона γ H2AX.

Для проверки этого предположения был дополнительно снят профиль ДЦР в ККМ мышей после совместного воздействия цитостатика ЦФ и экзогенной ДНК человека (рис. 5). Мыши получали инъекции 0,5 мг экзогенной ДНК каждый час в период 18–28 ч после введения ЦФ.

Известно, что экзогенная ДНК достигает ККМ и интернализируется в клеточных компартментах уже через несколько минут после интраперитонеальной инъекции (Долгова и др., 2011а). Результаты проведенного анализа демонстрируют, что в точке 18 ч сразу же после первой инъекции экзогенной ДНК мышам наблюдается резкое снижение количества ККМ с ДЦР, т. е. происходит практически мгновенная репарация ДЦР. И следовательно, предполагаемое длительное существование незавершенного интермедиата репарации, по-видимому, маловероятно. Результаты проведенного анализа демонстрируют, что в обеих группах мышей основная масса ДЦР репарируется к 28 ч после введения ЦФ.

Обсуждение

**Возможные события при репарации МЦС
в присутствии фрагментов
экзогенной ДНК**

В работе A.S. Likhacheva с соавт. (2007b) впервые было описано явление, связанное с совместным введением в организм экспериментальных мышей кросслинквирующего цитостатика ЦФ и фрагментированной двуцепочечной экзогенной ДНК. При такой обработке наблюдались появление характерного симптомокомплекса и гибель экспериментальных животных. Результаты работы свидетельствовали

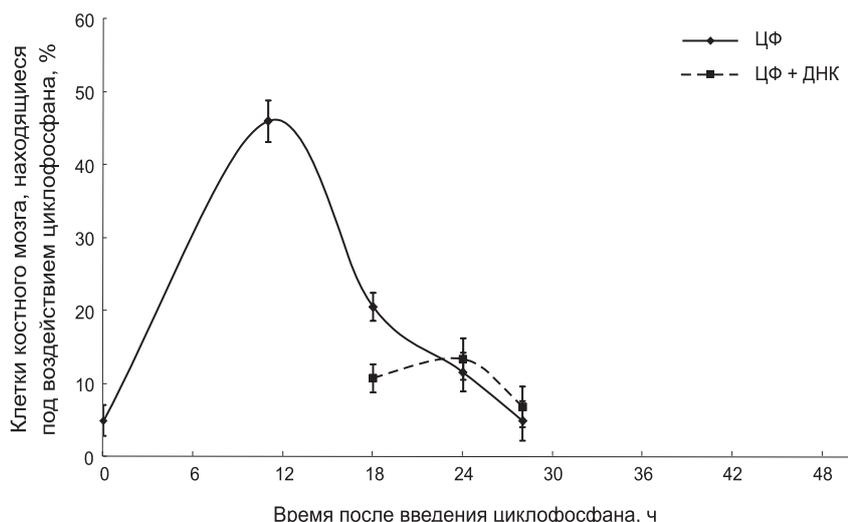


Рис. 5. Процент клеток ККМ, находящихся под воздействием цитостатика ЦФ, у мышей после введения только цитостатика ЦФ и в комбинации с экзогенной ДНК человека.

В точке 18 ч наблюдается схождение до базового уровня количества клеток с ДЦР в группе мышей, получавших инъекции экзогенной ДНК.

о том, что в геномной фракции ДНК клеток соматических тканей заболевших и погибших животных присутствуют последовательности ДНК, гомологичные человеческому *Alu* повтору, в виде стабильно существующих структурно-функциональных единиц. Совокупность фактов говорила о том, что произошел соматический трансгенез, и что чужеродный генетический материал, определяемый в геномной фракции ДНК клеток соматических тканей мышей, токсичен для подопытных животных. В проведенных исследованиях настоящей работы мы попытались охарактеризовать данное явление, используя различные подходы.

На первом этапе были проанализированы временные параметры введения экзогенной ДНК после инъекции ЦФ, приводящего к заболеванию и последующей гибели экспериментальных животных. Предполагается, что обнаруженное токсическое действие связано с нарушением молекулярных процессов в ККМ (СКК), вызванным присутствием в этих клетках чужеродной ДНК (Долгова и др., 2012а). В результате происходит гибель трансгенных клеток и, как следствие, разрушение кроветворной и иммунной систем организма. При этом были определены промежутки времени после инъекции ЦФ, когда введение ДНК приводит к гибели мышей, достигающей 60–90%.

Действие ЦФ в первую очередь затрагивает активно пролиферирующие клетки организма, к которым относятся ККМ. При воздействии ЦФ в дозе 200 мг/кг индуцируются множественные МЦС в молекулах ДНК (2000–2500 МЦС на ядро) и активируются репарационно-рекомбинационные процессы (Akkari *et al.*, 2000; Niedernhofer *et al.*, 2004; Rothfus, Grompe, 2004; Лихачева и др., 2008; Bhagwat *et al.*, 2009). В этих условиях в ядре клеток формируются ДЦР, представляющие собой наиболее рекомбиногенные интермедиаты репарации МЦС. Если одновременно с ДЦР во внехромосомном пространстве ядра появляются фрагменты экзогенной ДНК, доставленные из окружающей клетку среды, то такие фрагменты ДНК становятся равноправными участниками репарационно-рекомбинационного процесса, связанного с репарацией индуцированных ДЦР (Лихачева и др., 2008). Предполагается, что в результате этого процесса либо могут формироваться стабильно присутствующие в ряду клеточных делений эписомоподобные молекулы внехромосомной локализации, либо чужеродная генетическая информация может проявляться в реципиентном геноме, либо происходит истинная интеграция фрагментов чужеродной ДНК в геном реципиентной клетки. Такое присутствие чужеродной генетической

информации в реципиентном ядре токсично для клетки и может приводить к ее гибели. Другая возможность действия фрагментов экзогенной ДНК – это индукция хаотичного ковалентного объединения двуцепочечных концов хромосом, локализованных в ядре в этот момент времени. Если в момент появления экзогенных фрагментов в ядре присутствуют двуцепочечные концы, индуцированные процессом репарации МЦС, то они попадают под действие молекулярной машины, которая стремится аварийно удалить экзогенные двуцепочечные концы из пространства ядра, сшивая их друг с другом. В этом случае двуцепочечные концы хромосом могут сшиваться в хаотическом порядке, что с неизбежностью приведет к аберрантному митозу и гибели клетки.

Активация факторов репарации и принципиальная возможность участия экзогенных фрагментов ДНК в репаративном процессе связаны с формированием и залечиванием ДЦР–интермедиатов, образующихся при репарации МЦС. В этой связи мы попытались определить следующий факт: существуют ли в ядре клеток в момент инъекций экзогенной ДНК, когда проявляется эффект ее губительного воздействия на мышинный организм, интермедиаты репарации МЦС, дальнейший процессинг которых может идти с участием фрагментов экзогенной ДНК. Для этого была проанализирована динамика образования ДЦР в ККМ мышей после воздействия ЦФ с использованием специфических антител к гистону γ H2AX, который является основным маркером ДЦР.

Проведя анализ полученных результатов, мы обнаружили следующий факт. Инъекции экзогенной ДНК в промежуток времени 18–24 ч, во время, когда происходит завершающий этап репарации основной массы ДЦР с максимумом формирования к 12 ч после введения ЦФ, и следующие затем инъекции, затрагивающие клетки, первоначально находившиеся в G2 и достигшие S-фазы к 24–40 ч после введения цитостатика, приводят к заболеванию и гибели животных. Из этого наблюдения следовало, что заключительный этап репарации ДЦР и присутствие в этот момент времени в ядре фрагментов экзогенной ДНК индуцируют некие новые репарационно-рекомбинационные отношения между участниками молекулярных

взаимодействий, и что эти новые молекулярные взаимодействия приводят к функциональным нарушениям в клетке, итогом чего становятся деструктивные изменения. Более того, показано (рис. 5, точка 18 ч), что инъекция экзогенной ДНК в момент времени, когда идет завершающий этап репарации ДЦР, практически мгновенно завершает этот процесс.

Известно, что основным событием в клетках мышей, находящихся под воздействием ЦФ в рассматриваемый промежуток времени, является репарация ДЦР. Показано, что существуют два основных пути репарации ДЦР (рис. 6).

Первый путь – это негомологичное объединение концов (Nonhomologous End Joining, NHEJ) (Derbyshire *et al.*, 1994; Lees-Miller, Meek, 2003; Wang *et al.*, 2005). Второй путь – восстановление репликативной вилки, благодаря инвазии процессированного 3'-конца в гомологичный участок сестринской хроматиды (De Silva *et al.*, 2000; Niedernhofer *et al.*, 2004; Branzei, Foiani, 2007; Bhagwat *et al.*, 2009).

Мы предлагаем следующие возможные объяснения полученным экспериментальным результатам.

Известно, что фрагменты экзогенной ДНК, доставленные во внутренние компартменты клетки, активируют надзирающую систему клетки (MacDougall *et al.*, 2007; Zou, 2007; Лихачева и др., 2008). При этом активируются системы «скорой помощи», которые призваны удалить из пространства клетки крайне нежелательную структуру – ДЦР. Известны несколько таких систем высших эукариот, сшивающих в экстренном порядке присутствующие в ядре двуцепочечные концы друг с другом. Это комплекс Ku70/80-лигаза IV, лигаза III, фактор Mentas, NHR лигазная активность (Derbyshire *et al.*, 1994; Lees-Miller, Meek, 2003; Lee *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Для процесса лигирования с участием этих систем специфичность последовательности сшиваемых фрагментов не имеет значения.

При условиях обработки экзогенной ДНК, ведущей к появлению описываемого феномена, через 18 ч после введения ЦФ уже идет активная репарация индуцированных действием цитостатика двуцепочечных концов хромосом. Попавшие в ядра клеток, находящихся под воздействием ЦФ, экзогенные фрагменты могут

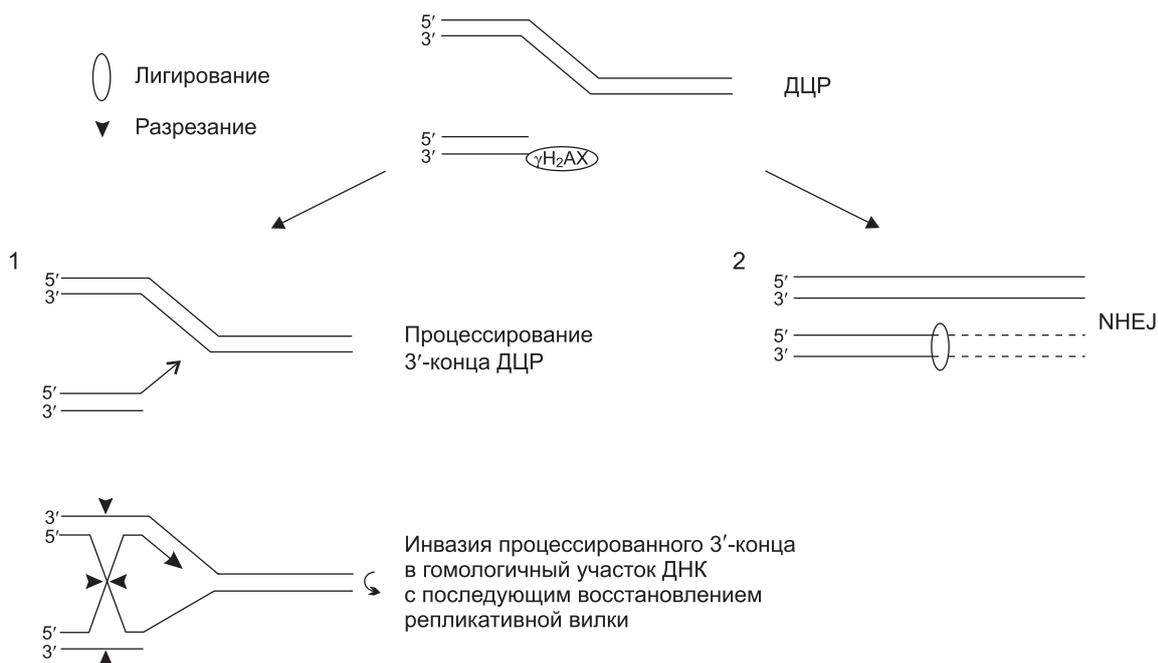


Рис. 6. Два основных пути репарации ДЦР.

1 – гомологическая рекомбинация, при которой происходит процессирование 3'-конца ДЦР с последующей инвазией в гомологичный участок ДНК. В конечном счете происходит восстановление репликативной вилки, при этом лидирующая и отстающая цепи меняются местами; 2 – негомологичное объединение концов (NHEJ). В этом случае происходит сшивание концов двух ДЦР вне зависимости от наличия гомологии.

индуцировать наработку факторов аварийной репарации. Как было отмечено выше, к таким факторам относятся системы экстренного лигирования **Ku70/80-лигаза IV, лигаза III, фактор Mentas, NHR лигазная активность.**

С учетом указанных выше объяснений можно предположить несколько сценариев репарационно-рекомбинационных событий с участием ДЦР хромосом и фрагментов экзогенной ДНК, доставленных в ядро реципиентной клетки.

1. Происходит встройка экзогенных фрагментов в места разрывов между двумя двуцепочечными концами хромосом. Если именно встройка чужеродной ДНК является причиной гибели клетки, то возможно следующее объяснение. Установлено, что для максимального проявления эффекта гибели необходимы частые введения экзогенной ДНК в больших количествах. Мы полагаем, что фрагменты, попав внутрь ядра, вступают в два конкурентных процесса: сшиваются между собой (или замыкаются в кольцо) и вшиваются между двумя ДЦР хромосом. Если равновесие реакции сдвинуто в сторону образования кольца, то произойдет

быстрое объединение основной массы фрагментов в кольцо (Долгова и др., 2011а), и только незначительное количество этих фрагментов может интегрировать в хроматин. Если такая интеграция не деструктивна для клетки (например, встройка произошла в любой блок повторяющихся последовательностей), то потребуются многократные попытки для того, чтобы чужеродный фрагмент интегрировал в причинную (значимую, функциональную) часть хромосомы и клетка вступила в aberrantный митоз.

Второй сценарий предполагает стохастическое объединение различных близко расположенных двуцепочечных концов включая концы хромосом и концы фрагментов. В этом случае сшитые в стохастическом порядке двуцепочечные концы хромосом, во-первых, нарушат функциональный континуум хромосом, а во-вторых, делают репликацию невозможной, так как остановившиеся репликативные вилки уже никогда не будут восстановлены в исходном функциональном виде. Тогда встраивание чужеродной ДНК в реципиентный геном является незначительным и, наверное, редким следстви-

ем появления в ядре агрессивной лигирующей системы. Тот факт, что практически сразу при инъекциях экзогенной ДНК происходит восстановление ДЦР, детектируемых антителами к гистону γ H2AX, может свидетельствовать о такого рода активации ядерных лигаз. Также в пользу этого варианта событий может свидетельствовать обнаруженный нами феномен сохранения количества умеренных повторов генома при инъекциях экзогенной ДНК (Долгова и др., 2012б). В этом случае предполагается, что соседние ДЦР, несущие блоки гомологичных повторов, не успевают осуществить гомологичное спаривание и следующую за этим репарацию, а сшиваются по тупым концам активированной системой.

Возможны другие объяснения протекающих в ядре событий. При наличии фрагментов экзогенной ДНК в непосредственной близости от процессированного и готового к рекомбинации двуцепочечного конца хромосомы обнаруженная гомология во внешней матрице может оттягивать инвазию 3'-конца на себя (рис. 7). В результате этого происходит переключение репликативной вилки со сменой матриц. Такой процесс описан в работе D. Brnzei, M. Foiani, (2007) и может быть подтвержден результатами работ V.J. Cannistraro, J.S. Taylor (2007), P.J. Hastings с соавт. (2009), где показано, что для спаривания и старта полимеризации достаточно нескольких нуклеотидов. При таком завершении процесса, если предположить, что фрагменты экзогенной ДНК сшиваются в про-

тяженные кольцевые структуры, должна формироваться aberrантная хромосома, объединенная с эписомой своим двуцепочечным концом.

И последней, на наш взгляд, возможностью из экспериментально показанных типов поведения фрагментов экзогенной ДНК, доставленных в ядро, является возможность формирования этими фрагментами кольцевой эписомоподобной структуры (Hashizume, Shimizu, 2007). В таких структурах могут присутствовать многочисленные функциональные и регуляторные последовательности, приводящие к деструктивным проявлениям в функционировании клетки.

Описанные предположительные варианты процессов и возникающие при этом структуры могут приводить к нарушениям в последовательности генетического материала и организации хроматина и, как следствие, к индукции или aberrантного митоза, или других нарушений в метаболизме клетки, следствием чего является гибель большинства ККМ. Если подобная картина событий присуща всем активно пролиферирующим клеткам организма, то будут разрушены многие функциональные системы, и гибель организма станет просто делом времени.

Благодарности

Авторы выражают огромную благодарность за помощь в проделанной работе О.В. Воробьевой и Н.А. Сердюковой за постановку FISH.

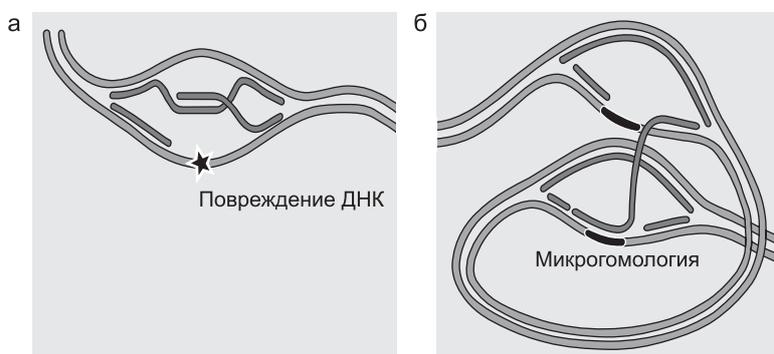


Рис. 7. Схемы восстановления репликативной вилки после обнаружения повреждения в молекуле ДНК.

а – восстановление репликативной вилки с использованием сестринской хроматиды; б – восстановление репликативной вилки со сменой матриц, приводящее к нарушениям в генетическом материале и последующей гибели клетки (Brnzei, Foiani, 2007).

Работа финансировалась при участии федеральной целевой программы «Научные и научно-технические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (государственный контракт № 14.740.11.0922) и ООО «Панаген».

Литература

- Долгова Е.В., Лихачева А.С., Орищенко К.Е. и др. Репарация межцепочечных сшивок молекулы ДНК // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 2. С. 332–356.
- Долгова Е.В., Николин В.П., Попова Н.А. и др. Интернализация экзогенной ДНК во внутренние компартменты клеток костного мозга мышей // 2012а (готовится к изданию).
- Долгова Е.В., Прокопенко А.В., Николин В.П. и др. Характеристика изменения количества умеренных повторов в геноме клеток костного мозга экспериментальных мышей на фоне инъекции циклофосфана и экзогенной ДНК человека // 2012б (готовится к изданию).
- Долгова Е.В., Рогачев В.А., Николин В.П. и др. Лейкостимулирующее действие фрагментов экзогенной ДНК, защищенных протамином, при вызванной циклофосфаном миелосупрессии мышей // Вопр. онкологии. 2009. Т. 55. № 6. С. 761–764.
- Лихачева А.С., Рогачев В.А., Николин В.П. и др. Участие экзогенной ДНК в молекулярных процессах, протекающих в соматической клетке // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 3. С. 426–473.
- Молекулярная биология клетки: В 3 т. / Б. Альберте, Д. Брей, Дж. Льюис. Пер. с англ. М.: Мир, 1994. Т. 3. 506 с.
- Николин В.П., Попова Н.А., Себелева Т.Е. и др. Влияние экзогенной ДНК на восстановление лейкопоза и противоопухолевый эффект циклофосфана // Вопр. онкологии. 2006. Т. 52. № 3. С. 336–340.
- Akkari Y.M., Bateman R.L., Reifsteck C.A. *et al.* DNA replication is required to elicit cellular responses to psoralen-induced DNA interstrand cross-links // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. N 21. P. 8283–8289.
- Bhagwat N., Olsen A.L., Wang A.T. *et al.* XPF-ERCC1 participates in the Fanconi anemia pathway of cross-link repair // Mol. Cell Biol. 2009. V. 29. N 24. P. 6427–6437.
- Branzei D., Foiani M. Template switching: from replication fork repair to genome rearrangements // Cell. 2007. V. 131. N 7. P. 1228–1230.
- Cannistraro V.J., Taylor J.S. Ability of polymerase ϵ and T7 DNA polymerase to bypass bulge structures // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. N 15. P. 11188–11196.
- De Silva I.U., McHugh P.J., Clingen P.H., Hartley J.A. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. N 21. P. 7980–7990.
- Derbyshire M.K., Epstein L.H., Young C.S.H. *et al.* Nonhomologous recombination in human cells // Mol. Cell Biol. 1994. V. 14. N 1. P. 156–169.
- Fleming R.A. An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology // Pharmacotherapy. 1997. V. 17. P. 146–154.
- Hashizume T., Shimizu N. Dissection of mammalian replicators by a novel plasmid stability assay // J. Cell Biochem. 2007. V. 101. N 3. P. 552–565.
- Hastings P.J., Ira G., Lupski J.R. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation // PLoS Genet. 2009. V. 5. N 1. e1000327.
- Lee S., Oshige M., Durant S.T. *et al.* The SET domain protein Metnase mediates foreign DNA integration and links integration to nonhomologous end-joining repair // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. N 50. P. 18075–18080.
- Lees-Miller S.P., Meek K. Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining // Biochimie. 2003. V. 85. N 11. P. 1161–1173.
- Likhacheva A.S., Nikolin V.P., Popova N.A. *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. 2007a. V. 11. P. 305–314.
- Likhacheva A.S., Nikolin V.P., Popova N.A. *et al.* Integration of human DNA fragments into the cell genomes of certain tissues from adult mice treated with cytostatic cyclophosphamide in combination with human DNA // Gene Ther. Mol. Biol. 2007b. V. 11. P. 185–202.
- MacDougall C.A., Byun T.S., Van C. *et al.* The structural determinants of checkpoint activation // Genes Dev. 2007. V. 21. N 8. P. 898–903.
- Magaña-Schwencke N., Henriques J.A., Chanet R., Moustacchi E. The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced crosslinks in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair-deficient strains // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. N 6. P. 1722–1726.
- Mazur L., Czyzewska A. Immunocytochemical analysis of apoptotic bone marrow cells after treatment of mice with WR-2721 and chemotherapeutic drugs // Folia Histochem. Cytobiol. 2001. V. 39. N 2. P. 63–66.
- Mondal T.K., Bhatta D., Ray P.K., Pal P. Synergistic immunopotentiating effects induced by T-cell and B-cell superantigen in mice // Immunol. Invest. 2001. V. 30. N 3. P. 169–180.
- Niedernhofer L.J., Odijk H., Budzowska M. *et al.* The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks // Mol. Cell Biol. 2004. V. 24.

N 13. P. 5776–5787.
 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. V. 24. N 1. P. 123–134.
 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. V. 261. N 2. P. 134–143.
 Wang H., Rosidi B., Perrault R. *et al.* DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining // *Cancer Res.* 2005. V. 65. N 10. P. 4020–4030.
 Zou L. Single- and double-stranded DNA: building a trigger of ATR-mediated DNA damage response // *Genes Dev.* 2007. V. 21. N 8. P. 879–885.

Приложение

Таблица

Схемы введения разным группам мышей ЦФ и экзогенной ДНК

№ группы	Воздействие		Количество мышей		% погибших животных	Дни гибели (забоя) животных
	ЦФ в/б	ДНК в/б	всего	павших		
1	200 мг/кг	–	10	0	0	
2	–	ДНК человека 1 мг, 0,5 мг след. двое суток	10	0	0	
3	–	ДНК мышей СВА 1 мг, 0,5 мг след. двое суток	10	0	0	
4	200 мг/кг	ДНК человека 1 мг за 30 мин до ЦФ, 0,5 мг через 30 мин после ЦФ и след. двое суток	10	8	80	На 6-е сутки пали 2 мыши (№ 7 и 9), на 7-е – 1 (№ 5). На 18-е сутки ввиду болезни забиты 2 мыши (№ 1 и 8). 2 мыши (№ 2 и 10) пали на 24-е и на 45-е сутки. Оставшихся трех мышей (№ 3, 4 и 6) забили на 56-й день. При этом одна из них уже была больна
5	200 мг/кг	ДНК человека через 15 мин после ЦФ вводили по 1 мг с интервалом в 1 ч в течение 11 ч (всего 12 мг)	8	2	25	На 2-е сутки 1 мышь забита в пресмертном состоянии, на 13-е – 1 пала
6	200 мг/кг	ДНК человека каждая мышь получала только одну инъекцию 1 мг ДНК, но в разное время после ЦФ – через 15 мин, через 1 ч, через 2 ч и т. д. в течение 11 ч	12	0	0	
7	200 мг/кг	ДНК человека через 12 ч после ЦФ вводили по 1 мг с интервалом в 1 ч в течение 11 ч (всего 12 мг)	10	0	0	
8	200 мг/кг	ДНК человека через 18 ч после ЦФ вводили по 1 мг с интервалом в 1 ч в течение 11 ч (всего 12 мг)	10	9	90	На 5-е сутки пала 1 мышь (№ 8). На 6-е 1 мышь пала (№ 9) и 5 были забиты (№ 3–7). На 7-е сутки забиты 2 мыши (№ 1 и 2) в плохом состоянии

Окончание таблицы

№ группы	Воздействие		Количество мышей		% погибших животных	Дни гибели (забоя) животных
	ЦФ в/б	ДНК в/б	всего	павших		
9	200 мг/кг	ДНК мышей СВА через 18 ч после ЦФ вводили по 1 мг с интервалом в 1 ч в течение 11 ч (всего 12 мг)	6	5	83	Мыши погибли или были забиты на 8–9-е сутки
10	200 мг/кг	ДНК лосося через 18 ч после ЦФ вводили по 1 мг с интервалом в 1 ч в течение 11 ч (всего 12 мг)	6	5	83	
11	200 мг/кг	ДНК человека в период времени 1–6, 7–12, 13–18, 19–24, 25–30, 31–36 ч после ЦФ по 1 мг каждый час	6 групп по 6 мышей	0	0	
12	200 мг/кг	ДНК человека в период времени 15 мин – 5 ч и 30–35 ч после ЦФ по 0,5 мг каждый час	8	0	0	
13	200 мг/кг	ДНК человека в период времени 18–23 ч и 42–47 ч после ЦФ по 0,5 мг каждый час	8	6	75	На 9-е, 12-е, 14-е и 26-е сутки пало по 1 мыши. На 29-е сутки 2 мыши забиты в плохом состоянии
14	200 мг/кг	ДНК человека через 18 ч после ЦФ вводили по 0,5 мг с интервалом в два часа в течение 12 ч (всего 3,5 мг)	8	5	63	На 6-е сутки 2 мыши пали и 2 забиты в плохом состоянии. На 7-е сутки 1 мышь забита
15	200 мг/кг	ДНК человека через 18 ч после ЦФ вводили по 0,5 мг каждый час в течение 12 ч (всего 6 мг)	14	12	86	Мышей забивали в плохом состоянии: на 6-е сутки – 3 мыши, на 9-е, 15-е, 21-е, 27-е сутки – по одной мыши, на 10-е, 47-е сутки – по 2 мыши. На 36-е сутки одна мышь пала
16	200 мг/кг	ДНК СВА через 18 ч после ЦФ вводили по 10 мкг каждый час в течение 12 ч (всего 120 мкг)	7	0	0	
17	200 мг/кг	ДНК СВА через 18 ч после ЦФ вводили по 100 мкг каждый час в течение 12 ч (всего 120 мкг)	7	2	29	Мыши пали на 8-е и 12-е сутки

TIME-COURSE ANALYSIS OF THE TOXIC ACTION OF EXOGENOUS DNA ADMINISTERED UPON CYCLOPHOSPHAMIDE PRETREATMENT

E.V. Dolgova¹, A.S. Proskurina¹, V.P. Nicolin¹, N.A. Popova¹, E.A. Alyamkina¹,
K.E. Orishchenko¹, A.G. Shilov¹, Y.R. Efremov¹, E.R. Chernykh², A.A. Ostanin²,
S.S. Bogachev¹, A.V. Procopenko¹, E.M. Malkova⁴, O.S. Taranov⁴, T.S. Gvozdeva⁵,
V.A. Rogachev¹, S.N. Zagrebelniy³, M.A. Shurdov⁶

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: gorbi@bionet.nsc.ru;

² Institute of Clinical Immunology, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences,
Novosibirsk, Russia;

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;

⁴ State Research Center for Virology and Biotechnology «Vector», Novosibirsk, Russia;

⁵ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia;

⁶ OOO Panagen

Summary

Mice were observed to get sick and die upon administration of exogenous DNA (0,1–1,0 mg) following their pretreatment with a crosslinking cytostatic cyclophosphamide (CP) at 200 mg/kg. This phenomenon is called delayed death. It was observed when exogenous DNA was administered at 1–2-h intervals in two separate time spans. The first was within the 18–24 h period, and an additional period, called by us the «death window», was recorded within 24–30 or 42–48 h after CP injection. The period from 18 to 24 h after CP injection corresponds to the final step in the repair of majority of interstrand cross-link (ICL)-induced double-stranded breaks (DSBs) in bone marrow cells (BMCs). As early as 10 min after the first administration of exogenous DNA, the modified γ H2AX histone, the indicator of DSBs, disappears from BMC nuclei, as demonstrated by anti-H2AX staining. The facts that fragments of exogenous DNA become internalized to the BMCs nuclei when DSBs are being repaired in such cells and that the experimental mice die upon the treatment, suggests that exogenous DNA participates in ICL-induced DSBs repair. We speculate that such influence results in critical disturbances in a certain type of intensely proliferating cells and their total elimination. This, in turn, causes irreversible pathological changes in mice, resulting in extensive mortality.

Key words: cyclophosphamide, double-stranded breaks, interstrand cross-links, bone marrow cells, exogenous DNA, DNA repair.