

Оценка эффективности эрадикации стволовых иницирующих раковых клеток на примере первичных культур глиобластомы человека

Е.В. Долгова¹✉, А.С. Проскурина¹, Е.А. Поттер¹, Т.В. Тыринова², О.С. Таранов³, Я.Р. Ефремов^{1,4}, К.Е. Орищенко¹,
С.В. Мишинов⁵, В.В. Ступак⁵, А.А. Останин², Е.Р. Черных², С.С. Богачев¹

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

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

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁵ Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

Из фрагмента ткани опухоли, взятого во время хирургической операции у больных К. (жен., 61 г., диагноз: рецидив глиобластомы) и Ж. (жен., 60 лет, диагноз: рецидив глиобластомы), были получены первичные культуры клеток глиобластомы человека. На основе новой стратегии синхронизации стволовых иницирующих раковых клеток и при использовании разработанного режима их эрадикации «3+1» была оценена эффективность нового терапевтического подхода, направленного на разрушение ракового клеточного сообщества, на первичных клеточных линиях глиобластомы человека. Ключевыми элементами стратегии служили следующие индикаторные результаты:

1) оценка присутствия в анализируемых культурах стволовых иницирующих раковых клеток по их способности поглощать двуцепочечную ДНК, меченную красителем (TAMRA+ клетки); 2) определение реперных временных точек цикла репарации межцепочечных шивков ДНК, индуцированных кросс-линкирующим цитостатиком митомицином С; 3) оценка синхронизации клеток в фазах клеточного цикла; 4) определение дня после начала терапии, на который TAMRA+ клетки синхронно присутствуют в G1/S-фазе клеточного цикла, чувствительной для обработок; 5) определение режима эрадикации TAMRA+ клеток (стволовых иницирующих раковых клеток). Обработка культур проводилась кросслинкирующим цитостатиком митомицином С и сложнокombозиционным препаратом ДНК. Показано, что после проведенных обработок клетки перестают делиться и культуры деградируют. Клеточная линия К. к 30-м суткам наблюдения полностью деградировала. Количество клеток культуры Ж. к 15-м суткам наблюдения упало от исходного практически в три раза. Этот показатель по отношению к контролю на 15-й день измерения составил 1/7.45 для митомицина С и 1/10.28 для митомицина С и ДНК. Основное действие комбинация препаратов митомицин С и ДНК оказывает на TAMRA+ стволовые иницирующие раковые клетки клеточных популяций глиобластом. Использование митомицина С как в изолированном виде, так и в комбинации с ДНК демонстрирует эффективное элиминирующее действие как на TAMRA+ стволовые иницирующие клетки, так и на первичные культуры глиобластом человека в целом.

Ключевые слова: глиобластома; первичная культура; митомицин С; стволовые иницирующие раковые клетки; TAMRA-флуорохром.

Evaluation of a strategy for tumor-initiating stem cell eradication in primary human glioblastoma cultures as a model

E.V. Dolgova¹✉, A.S. Proskurina¹, E.A. Potter¹,
T.V. Tyrinova², O.S. Taranov³, Ya.R. Efremov^{1,4},
K.E. Orishchenko¹, S.V. Mishinov⁵, V.V. Stupak⁵,
A.A. Ostanin², E.R. Chernykh², S.S. Bogachev¹

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

² Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

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

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁵ First Department of Neurosurgery, Y.L. Tsivian Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics, Novosibirsk, Russia

Primary cultures of human glioblastoma were obtained from the surgical material of patients K. (female, 61 years, Ds: relapse of glioblastoma) and Zh. (female, 60 years, Ds: relapse of glioblastoma). The effectiveness of a new therapeutic approach aimed at destroying the cancer cell community was evaluated on the primary cell lines of human glioblastoma culture by employing a new strategy of tumor-initiating stem cell synchronization and a domestic strategy of their eradication "3+1". The key elements of the strategy were the following indicator results: (1) evaluation of the presence of tumor-initiating stem cells in a population of cells from analyzed cultures by their ability to internalize double-stranded labeled DNA (TAMRA+ cells); (2) determination of the reference time points of the repair cycle of DNA interstrand cross-links induced by cross-linking cytostatic mitomycin C; (3) evaluation of cell cycle synchronization; (4) determination of the time (day after therapy initiation) when TAMRA+ cells were synchronously present in phase G1/S of the cell cycle, sensitive to the therapy; and (5) establishment of the TAMRA+ (tumor-initiating stem cells) eradication schedule. The cultures were treated with cross-linking cytostatic mitomycin C and a compositional DNA preparation. After the treatments, cell division slows down, and the cultures degrade. The K cell line completely degraded within 30 days of observation. The cell number of the Zh culture fell to nearly one-third of

the starting value by day 15 of observation. On day 15, this indicator constituted 1/7.45 for mitomycin C and 1/10.28 for mitomycin C + DNA with reference to the control. The main target of the mitomycin C + DNA regimen was TAMRA+ tumor-initiating stem cells of the glioblastoma cell populations. The action of mitomycin C alone or in the combination with DNA demonstrated effective elimination of TAMRA+ tumor-initiating stem cells and the whole primary cultures of human glioblastomas.

Key words: glioblastoma; primary cell line; mitomycin C; tumor-initiating stem cells; TAMRA-fluorochrom.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Долгова Е.В., Проскурина А.С., Поттер Е.А., Тыринова Т.В., Таранов О.С., Ефремов Я.Р., Орищенко К.Е., Мишинов С.В., Ступак В.В., Останин А.А., Черных Е.Р., Богачев С.С. Оценка эффективности эрадикации стволовых иницирующих раковых клеток на примере первичных культур глиобластомы человека. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(7):825-836. DOI 10.18699/VJ18.31-o

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Dolgova E.V., Proskurina A.S., Potter E.A., Tyrinova T.V., Taranov O.S., Efremov Ya.R., Orishchenko K.E., Mishinov S.V., Stupak V.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Evaluation of a strategy for tumor-initiating stem cell eradication in primary human glioblastoma cultures as a model. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):825-836. DOI 10.18699/VJ18.31-o (in Russian)

Глиобластома – наиболее распространенный и злокачественный тип первичной опухоли мозга. Эта разновидность опухоли имеет инвазивный характер и располагается в жизненно важных областях головного мозга, что делает ее удаление чрезвычайно сложным для хирургического вмешательства (Omuro, DeAngelis, 2013). Глиомы составляют в среднем 24 % всех опухолей головного мозга и являются вторыми по частоте встречаемости у взрослого населения (McNeill, 2016). Средняя продолжительность жизни пациентов с анапластической астроцитомой и глиобластомой составляет 15.2 и 6.9 мес. соответственно (Gilbert, Ross, 2011).

Высокая степень злокачественности глиобластомы обуславливается наличием самообновляющихся стволовых (иницирующих) раковых клеток (СИРК), которые способствуют инициации опухоли и терапевтической устойчивости (O'Brien et al., 2010). Так, СИРК глиом способны самовозобновляться в ряду поколений, формировать нейросферы, имеют способность к дифференцировке, высокую подвижность и определенное микроокружение (Gilbert, Ross, 2011; Brescia et al., 2012). Считается, что именно СИРК глиом устойчивы к действию цитостатиков и гамма-облучения (Carruthers et al., 2015). Указанные клетки обладают повышенной экспрессией эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF). Установлено, что СИРК глиом обладают высокой пролиферативной активностью и лекарственной резистентностью благодаря активной работе таких сигнальных путей, как Notch, Hedgehog-Gli, Wnt/ β -катенин, TGF- β /SMAD, PI3K/Akt/mTOR (Beier et al., 2007; Qiang et al., 2009; Schreck et al., 2010; Takezaki et al., 2011; Никифорова и др., 2016). Этот тип клеток отличается также иммунорезистентностью (Bao et al., 2006; Kase et al., 2013).

К сожалению, до настоящего времени нет унифицированной информации относительно маркеров СИРК глиом, что служит причиной отсутствия целевых способов лечения рака головного мозга (Zhang et al., 2008; Chen et al., 2010; Brescia et al., 2012; Kase et al., 2013; Dahlrot et al., 2014). Таким образом, обнаружение универсального специфического маркера СИРК глиом – приоритетная задача.

В Институте цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН, лаборатория индуцированных клеточных процессов) обнаружено ранее неизвестное свойство низкодифференцированных клеток различного генеза, включая стволовые клетки и стволовые иницирующие раковые клетки, захватывать экстраклеточные фрагменты двуцепочечной ДНК имманентным (свойственным только этим клеткам) механизмом.

С использованием найденного свойства этого типа клеток, а также другого, впервые описанного их свойства – несанкционированного участия захваченных экстраклеточных фрагментов ДНК в репаративном процессе, искусственно индуцированном в стволовых клетках, удалось решить две задачи: эрадикаровать СИРК, лишив опухоль туморогенного начала, и вылечить экспериментальных мышей от в высшей степени злокачественной асцитной формы карциномы Кребс-2 и ее солидного варианта. Суть подхода базируется на применении двух найденных свойств и впервые разработанном режиме синхронизации СИРК в чувствительной для терапии фазе клеточного цикла, что необходимо для эрадикации СИРК. При указанном подходе разрушается хроматиновый остов («хребет») клетки, что приводит к ее гибели. Необходимым условием применения разработанной стратегии является использование сложноконпозиционного препарата, составные части которого дифференцированно интерферируют стадию эксцизионной репарации нуклеотидов (NER – nucleotide excision repair) и стадию гомологичной рекомбинации в СИРК. Такой принцип полностью лишает возможности СИРК преодолеть терапевтическую обработку, что сопровождается их разрушением и вылечиванием животных от рака (Dolgova et al., 2014; Potter et al., 2016).

Принцип синхронизации СИРК в чувствительной G1/S-фазе клеточного цикла описан в работе (Поттер и др., 2016). После ориентированного на фазы репаративного цикла трехкратного введения циклофосфана происходит масштабное апоптотическое разрушение раковых клеток в определенный, зависящий от типа рака, день после начала обработок (для опухоли Кребс-2 это были 8–12-е сутки от первой инъекции циклофосфана). При этом все со-

хранившие морфологическую целостность асцитные раковые клетки, проанализированные в указанный день (выделенные на фиколл-верографиневом градиенте), находятся в G1/S-фазе клеточного цикла, а количество TAMRA+ клеток достигает ~13 % (1–3 % в исходном асците), что подразумевает концентрацию выживших после терапии СИРК.

В клеточном сообществе асцитных раковых клеток существует две дискриминируемые по признаку интернализации TAMRA-меченной ДНК популяции клеток, которые захватывают ДНК-зонд (TAMRA+ клетки) и не захватывают его (TAMRA– клетки). Известно, что TAMRA+ клетки обладают свойствами СИРК (Dolgova et al., 2014; Potter et al., 2016, 2017). Было сделано предположение, что эти две популяции клеток по-разному завершают остановку клеточного цикла в поздней S/G2/M-фазе клеточного цикла. Коммитированные (TAMRA–) раковые клетки разрушаются апоптозом с последующим вторичным некрозом (Alyamkina et al., 2015). Часть эпигенетически экстремально пластичных TAMRA+ СИРК выдерживает терапию. После завершения ареста в поздней S/G2/M клетки выходят из репаративного процесса и стремятся завершить деление. Происходит полная синхронизация всех выживших после проведенной терапии СИРК, и они одновременно входят в первую после ареста G1/S-фазу (как это следует из анализа состояния клеточного цикла и процентного содержания TAMRA+ клеток на 8–9-е сутки от начала обработки).

Было сделано важнейшее заключение, что именно эта точка может позволить нанести завершающий удар по всем оставшимся причинным СИРК Кребс-2. Без финальной обработки через несколько суток происходит естественное расхождение оставшихся раковых клеток, в том числе и СИРК, по фазам клеточного цикла, и СИРК становятся недостижимыми для дополнительной однократной обработки по схеме разрабатываемого терапевтического режима.

В настоящем исследовании предпринята попытка применить найденную стратегию на двух модельных культурах клеток глиобластомы человека. Основная задача состояла в поиске режима обработок, когда совместное действие двух препаратов – кросслинкующего цитостатика и сложного композиционного препарата ДНК – приводило бы к полной элиминации СИРК из популяции клеток первичных культур и, как следствие, к разрушению туморогенного потенциала указанных культур клеток.

Материалы и методы

Приготовление суспензии клеток глиобластомы, а также первичных культур из операционного материала. Забор операционного материала и все последующие исследования проводили после получения письменного информированного согласия пациентов. Суспензию клеток глиобластомы получали из фрагмента ткани опухоли, взятого во время хирургической операции у больных К. (жен., 61 г., диагноз: рецидив глиобластомы, теменная и затылочная доли левого полушария) и Ж. (жен., 60 лет, диагноз: рецидив глиобластомы, лобная и теменная доли левого полушария). Ткань опухоли механически измельчали с помощью скальпеля, затем дважды отмывали в

фосфатном буфере (PBS). Далее опухолевый материал инкубировали в течение 30 мин в 0.1 % растворе коллагеназы (тип IA, Sigma-Aldrich) при 37 °С. Через 30 мин добавляли среду DMEM (Gibco) с 10 % эмбриональной бычьей сывороткой (HyClone) и затем промывали этой же средой один раз. Клетки помещали в культуральный флакон. Через 5–7 сут неприкрепленные к пластику клетки переносили в свежий флакон и культивировали еще 3–5 дней в DMEM, дополненной 10 % эмбриональной бычьей сыворотки. Затем окончательно неприкрепленные к пластику клетки удаляли. Фракцию адгезивных клеток во всех флаконах продолжали вести до покрытия клетками 70–80 % площади флакона с полной заменой культуральной среды один-два раза в неделю.

Получение меченого TAMRA-dUTP-5'-ДНК зонда. Мечение *Alu*-повтора человека флуорофором проводили при помощи ПЦР, как описано в работе (Dolgova et al., 2014). В качестве матрицы использовали клонированную в плазмиде pUC19 последовательность *Alu*-повтора человека (AC002400.1, 53494-53767), которая состоит из конечной и начальной частей двух tandemно расположенных повторов: *AluJ* и *AluY*. В качестве праймеров использовали стандартные M13-праймеры. От невключившихся нуклеотидов избавлялись переосаждением ДНК.

Сложнокомпозиционный препарат двуцепочечной ДНК. Подробная информация о составе и способе приготовления композиционного препарата ДНК представлена в разделе «Материалы и методы» в работе (Alyamkina et al., 2015).

Анализ TAMRA+ клеток в первичных культурах клеток глиобластомы. Клетки рассаживали в чашки Петри (диаметр 3.5 см). Прикрепленные клетки промывали PBS, в чашку Петри добавляли среду без сыворотки, *Alu*-ДНК, в количестве 0.5 мкг/мл, инкубировали 20 мин, затем – ядерный краситель Hoechst (Termo Fisher Scientific) и инкубировали еще 15 мин. Клетки анализировали при помощи инвентированного флуоресцентного микроскопа AxioObserver Z1 (Zeiss) и программы ZEN. В каждой точке проанализировано 2000–4000 клеток.

Анализ репарации двуцепочечных разрывов. Культуру клеток глиобластомы человека в 24-луночном планшете инкубировали с 10–20 мкг/мл митомицина С (ММС) (Sigma-Aldrich) в среде DMEM без сыворотки при 37 °С в течение одного часа. После инкубирования с цитостатиком клетки промывали средой с сывороткой, добавляли свежую среду DMEM, дополненную 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, и инкубировали в CO₂-инкубаторе. Каждые 6 ч клетки отбирали и заливали в блоки с легкоплавкой агарозой. Блоки застывали при 4 °С, затем их переносили в 0.5 М ЭДТА. Перед нанесением на электрофорез блоки отмывали в TE-буфере, переносили в лизирующий буфер (1 % лаурилсаркозил, 50 мМ ЭДТА, протеиназа К 1 мг/мл), лизировали блоки при 50 °С в течение 15 мин. Электрофорез блоков проводили в течение 30 мин, 0.75 В/см в трис-ацетатном буфере с добавлением бромистого этидия. Затем блоки высушивали и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа AxioImager (Zeiss) и программы ISIS. Анализ содержания двуцепочечных разрывов (ДЦР) проводили с использованием параметра «хвостовой момент» (tail moment, TM) (TM = дли-

на хвоста кометы × процентное содержание ДНК в кометном хвосте) в программе CASP (Wang et al., 2013).

Анализ синхронизации клеток после обработки цитостатиком. Культуры клеток человеческой глиобластомы обрабатывали цитостатиком MMC 20 мкг/мл трехкратно через каждые 36 ч. Для этого культуру клеток глиобластомы человека инкубировали с 20 мкг/мл MMC в среде DMEM без сыворотки при 37 °C в течение одного часа. После инкубирования с цитостатиком клетки промывали средой с сывороткой, добавляли свежую среду DMEM, дополненную 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, и инкубировали в CO₂-инкубаторе. До обработки цитостатиком и на 4–7-е сутки с момента первой обработки клетки отбирали на анализ TAMRA+ клеток.

Обработка культур клеток человеческой глиобластомы К. и Ж. цитостатиком и препаратом ДНК, подсчет абсолютного количества TAMRA+ клеток. Клетки рассадили в чашки Петри (3.5 см) по 185 тыс. для культуры К. и 200 тыс. для Ж. В прикрепленном виде клетки обрабатывали MMC и препаратом ДНК. Клетки промывали PBS, помещали в среду без сыворотки с добавлением либо цитостатика MMC (20 или 10 мкг/мл), либо препарата ДНК (0.5 мкг/мл). Обработку проводили в течение одного часа. Затем клетки промывали PBS и помещали в среду DMEM с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки. В контрольные точки из каждой группы забирали по чашке Петри и считали в ней процентное содержание TAMRA+ клеток, как это описано выше. Затем клетки снимали трипсином/ЭДТА и считали их количество (*N*) в камере Горяева. Абсолютное количество TAMRA+ клеток (*X*) считали по формуле $X = N \times (\% \text{ TAMRA+ клеток}) / 100$.

Статистический анализ. Статистический анализ проводили при помощи программы Statistica 10. На графиках приведены стандартные отклонения, а также доверительные интервалы ($p < 0.01$). Достоверность полученных результатов в случае сравнения доли TAMRA+ клеток оценивали при помощи критерия χ^2 с учетом поправки Йетса. При сравнении значений хвостового момента (ТМ) достоверность оценивали при помощи критерия Манна–Уитни.

Результаты

Базовые индикаторы разрабатываемой стратегии и экспериментальный дизайн для их оценки на модели первичных культур глиобластомы человека. Исходя из основных положений новой стратегии синхронизации и эрадикации стволовых инициирующих раковых клеток «3+1», был разработан экспериментальный дизайн, состоящий из следующих стадий:

- 1) обнаружение и демонстрация TAMRA+ клеток в анализируемых культурах;
- 2) анализ цикла репарации межцепочечных сшивок (МЦС) при однократном введении цитостатика MMC. Поскольку работающий в экспериментах *in vivo* кросслинкирующий цитостатик циклофосфан в случае культур клеток был не пригоден (циклофосфан индуцирует МЦС за счет действия метаболита, фосфорамид мустарда, образующегося в печени), в экспериментах на культурах клеток мы предложили использовать MMC, который непосредственно индуцирует МЦС в ДНК клеток;

- 3) разработка схемы терапии цитостатиком и препаратом двуцепочечной ДНК на основании анализа фаз репаративного цикла;
- 4) анализ клеточного цикла в культурах, прошедших терапию цитостатиком по разработанной схеме. Оценка количества TAMRA+ клеток на протяжении 12 сут после трехкратной обработки цитостатиком, что необходимо для выявления точки финального применения терапии MMC+ДНК;
- 5) терапевтическая обработка на основании режима «3+1». Анализ на протяжении последующих 30 сут общего количества раковых клеток и количества TAMRA+ клеток, переживших обработку.

Характеристика клеточных культур глиобластом человека и оценка наличия в них TAMRA+ СИРК. Первичные культуры глиобластомы человека пациентов Ж. и К. представлены хорошо прикрепленными к поверхности культуральной посуды клетками, которые никогда в экспериментальных условиях не образуют нейросферы (рис. 1, а). Нам не удалось получить опухоли при трансплантации клеток обеих культур в желудочки мозга иммунодефицитным мышам NOD/SCID (данные не представлены), поэтому все эксперименты с этими культурами проводились *ex vivo*.

Первоначально было необходимо продемонстрировать наличие СИРК в культурах глиобластом человека. Процентное содержание СИРК в культурах оценивали как долю клеток, способных поглощать двуцепочечную ДНК, меченную красителем (см. рис. 1, а). Для культуры Ж. процентное содержание TAMRA+ клеток составило $0.64 \pm 0.22 \%$, для культуры К. – $2.46 \pm 0.61 \%$ (см. рис. 1, б). Таким образом, мы подтвердили наличие в культурах глиобластомы человека СИРК, способных к поглощению двуцепочечной ДНК, которые, по нашему мнению, должны являться основной мишенью противораковой терапии (Dolgova et al., 2018).

Анализ временных параметров репарации двуцепочечных разрывов ДНК в культурах клеток человеческой глиобластомы К. и Ж. после воздействия цитостатика. Ранее в экспериментах *in vivo* использовался кросслинкирующий цитостатик циклофосфан. В результате метаболизма циклофосфана в клетках паренхимы печени образуется метаболит фосфорамид мустард, молекулы которого интеркалируют между цепей ДНК хромосом и формируют МЦС. Клетка немедленно приступает к репарации индуцированного повреждения. Репарация МЦС протекает в две стадии. В первой фазе репарации происходит остановка репликации и удаление кросслинка (фаза NER), во второй фазе – восстановление репликативной вилки в результате гомологичной рекомбинации. Первая фаза характеризуется накоплением ДЦР, вторая – их удалением (Niedernhofer et al., 2004). По этому признаку, хорошо детектируемому или методом комет, или антителами к гистону $\gamma\text{H}_2\text{AX}$, определяется граница двух фаз репаративного процесса. Поскольку работа проводилась на культуре клеток, в качестве кросслинкирующего агента был выбран MMC, который часто используется в стандартных циторедуктивных терапиях и так же, как циклофосфан, индуцирует формирование МЦС, но, однако, не требует активации метаболитами

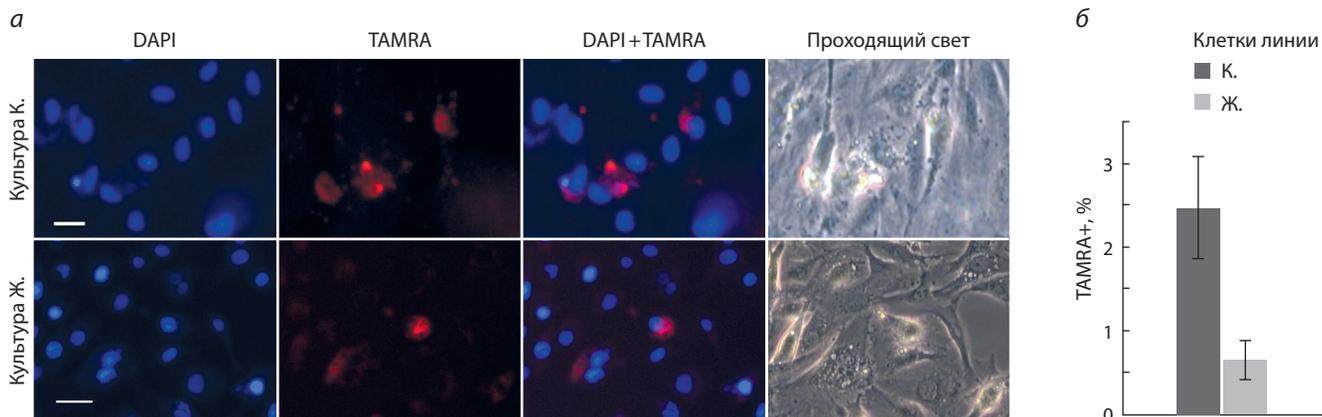


Рис. 1. Анализ присутствия TAMRA+ клеток в первичных культурах клеток человеческой глиобластомы К. и Ж., полученных из операционного материала.

а – цитологические фотографии. DAPI – окраска хроматина; TAMRA – сигнал экзогенной ДНК. Отрезок соответствует 20 мкм; б – графики, демонстрирующие процентное содержание TAMRA+ клеток в культурах. Приведено стандартное отклонение.

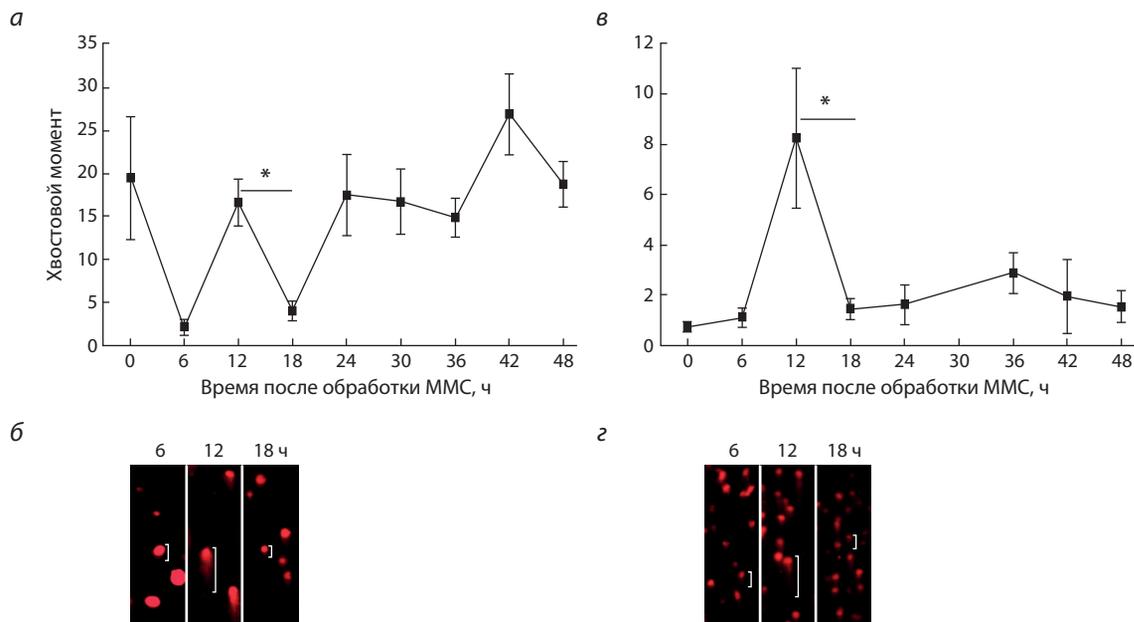


Рис. 2. Анализ цикла репарации ДЦР, вызванных действием цитостатика MMC, первичных культур клеток глиобластомы человека Ж. (а, б) и К. (в, з). Количество ДЦР в клетках оценивали с использованием показателя «хвостовой момент» кометных хвостов.

а – график репарации ДЦР для линии клеток Ж.; кометные хвосты в 6, 12 и 18 ч после обработки цитостатиком MMC для линии клеток Ж. (б) и линии клеток К. (з); в – график репарации ДЦР для линии клеток К. * Отличия между точками достоверны с вероятностью $p < 0.001$ (критерий Манна-Уитни), на графике приведены доверительные интервалы для $p < 0.01$. Белыми скобками (б и з) показан средний размер клетки с кометным хвостом, оцененный в программе CASP.

системами организма. Поскольку МЦС, индуцированные любым агентом, удаляются одной и той же репаративной системой, считалось, что результаты по временным параметрам репарации МЦС, вызванных циклофосфаном, будут аналогичными для любого другого цитостатика (например, MMC) в применении к данной клеточной модели в условиях, адекватных специфическому действию цитостатика. Таким образом, проведен анализ временных параметров репаративного цикла первичных культур клеток человеческой глиобластомы К. и Ж. после воздействия цитостатика MMC (рис. 2). Оказалось, что максимум

образования ДЦР у обеих клеточных линий приходится на 12 ч с момента обработки MMC ($p < 0.001$). Для культуры К. были проанализированы дополнительные точки и отмечен второй пик, приходящийся на 36 ч ($p < 0.001$ относительно нулевой точки).

Анализ распределения клеток первичной линии глиобластомы К. по клеточному циклу после воздействия цитостатика митомицина С. Анализ синхронизации клеток в определенной фазе клеточного цикла оказался малоинформативным и сложно интерпретируемым (данные не приводятся). Сложность оценки полученных

результатов состояла в следующем. Клетки обеих культур после обработки цитостатиком ММС плохо делились, что затрудняло наработку достаточного количества клеток, необходимого для полномасштабной оценки. В результате апоптотической деструкции в G2/M-фазе остатки деградированных клеток по уровню интенсивности флуоресценции пропидия йодида распределяются по всем фазам клеточного цикла, искажая реальную картину событий. Кроме этого, при масштабном апоптозе, индуцированном обработками, возникают технические проблемы в оценке клеточного цикла в связи с минимальным остаточным количеством клеток.

Поскольку главным событием, необходимым для успешной терапии, является определение момента синхронизации TAMRA+ клеток в чувствительной фазе клеточного цикла (G1/S), было решено для определения точки финальной обработки использовать именно этот признак.

Анализ синхронизации TAMRA+ клеток в культурах К. и Ж. при обработке цитостатиком митомицином С. Для успешной элиминации всех СИРК из опухолевой массы недостаточно обработок цитостатиком или цитостатиком совместно с экзогенной ДНК, перекрывающих цикл репарации СИРК. Оставшиеся после базовой терапии цитостатиком и препаратом двуцепочечной ДНК СИРК, которые в силу нахождения в нечувствительной к действию препаратов G2/M-фазе клеточного цикла не попали под воздействие препаратов, впоследствии станут причиной развития рецидива (Potter et al., 2016). Для того чтобы удалить эти клетки, необходимо найти момент, когда СИРК будут синхронизованы в G1/S-фазе клеточного цикла, чтобы в эту терапевтическую временную точку провести дополнительную обработку препаратами.

Анализ распределения всей массы клеток по фазам клеточного цикла не в полной мере подходит для определения степени синхронизации СИРК, поскольку, как показали ранние исследования (Potter et al., 2016), пик количества (аккумуляция) СИРК после базовой терапии определяется на один-два дня раньше, чем полная синхронизация всех оставшихся после базовой терапии клеток в G1/S-чувствительной фазе клеточного цикла. Определение в одном эксперименте для перевиваемых культур глиобластом К. и Ж. динамики клеточного цикла и аккумуляции TAMRA+ клеток оказалось технически невозможным. В связи с этим было решено принять за финальную точку терапии день максимальной аккумуляции TAMRA+ клеток.

С использованием стандартизованного во многих наших публикациях меченого ДНК-зонда (*Alu*-фрагмент человека) (Dolgova et al., 2014; Potter et al., 2016) было оценено время аккумуляции TAMRA-позитивных клеток, или TAMRA+ клеток (очевидно, СИРК), в образцах культур человеческой глиобластомы К. и Ж. на фоне обработки цитостатиком. Для этого клетки были обработаны ММС и в определенных точках проведен анализ содержания TAMRA+ клеток.

Исходя из двух пиков образования и репарации ДЦР (см. рис. 2), был подобран следующий режим обработки ММС: обработка цитостатиком в 0 и 18 ч (20 мкг/мл) и 27, 36, 54 и 63 ч (10 мкг/мл) с момента первой обработки (рис. 3, а). При таком режиме, во-первых, в точках 0, 18, 36, 54 перекрываются фазы репаративного процесса для

всех основных популяций клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла; во-вторых, в точках 27 и 63 блокируются клетки, формирующие неожиданный второй пик (результаты дополнительных экспериментов, данные не приводятся). Так как, по нашему мнению, для успешной терапии было необходимо добавить две дополнительные обработки цитостатиком (в 27 и 63 ч), то в близлежащих точках обработки цитостатиком (36 и 54 ч соответственно) концентрация митомицина С была снижена вдвое (10 мкг/мл), в сумме набиралась исходно используемая доза 20 мкг/мл. Анализ содержания TAMRA+ клеток проводился на 3–8-е сут с момента обработки цитостатиком.

Был найден момент синхронизации TAMRA+ клеток, когда их количество значительно возрастает (см. рис. 3, б). Для культуры К. синхронизация приходится на 5-е сут, когда количество TAMRA+ клеток увеличивается в два раза (с 1.41 до 2.89 %). Для культуры клеток Ж. была обнаружена следующая картина изменения количества позитивных клеток: на 5-е сут количество TAMRA+ клеток возрастает в четыре раза (с 1.47 до 5.88 %); На 7-е сут количество TAMRA+ клеток повышается до 9.55 % (в 6.5 раз от исходного). Такой результат мог быть объяснен двумя предположениями. Во-первых, изменение числа позитивных клеток соответствует реальной картине синхронизации этого типа клеток на 7-е сут наблюдения. Второе объяснение эффекта следующее: TAMRA+ клетки достигли максимальной синхронизации на 5-е сут эксперимента. На 6-е сут их количество сохранилось, поскольку они были арестованы в одной фазе клеточного цикла. На 7-е сут произошла массовая апоптотическая деградация этих клеток (СИРК). Образованные апоптотические везикулы первой волны апоптотического распада еще сохранили на своей поверхности факторы интернализации, а внутреннего свободного объема везикулы еще достаточно для интернализации экстраклеточного ДНК-зонда. Это явление и вызвало возрастание детектируемого позитивного материала. По нашим многочисленным наблюдениям, апоптотические частицы первой волны разрушения клетки по размеру нечетко отличаются от целых раковых клеток и при условии захвата ДНК-зонда могут определяться как целые клетки, содержащие маркер. Этот механизм будет приводить к искажению результатов подсчета.

Таким образом, были проведены все подготовительные эксперименты для разработки режима терапии клеток глиобластомы человека цитостатиком ММС и препаратом экстраклеточной двуцепочечной ДНК. Проанализирован цикл репарации ДЦР в клетках. Показано, что клетки синхронизируются в определенной фазе клеточного цикла при обработке цитостатиком. Определено время, когда происходит аккумуляция TAMRA+ клеток. Полученные данные позволили провести оценку эффективности найденного терапевтического режима на клетках глиобластомы человека.

Обработка культур клеток человеческой глиобластомы К. и Ж. цитостатиком митомицином С и препаратом ДНК в режиме, направленном на эрадикацию СИРК (TAMRA+ клеток). Для оценки эффективности воздействия терапевтического режима на клетки культуры глиобластомы К. и Ж. были выбраны два параметра: количество прикрепленных клеток (влияние на жизнеспособность)

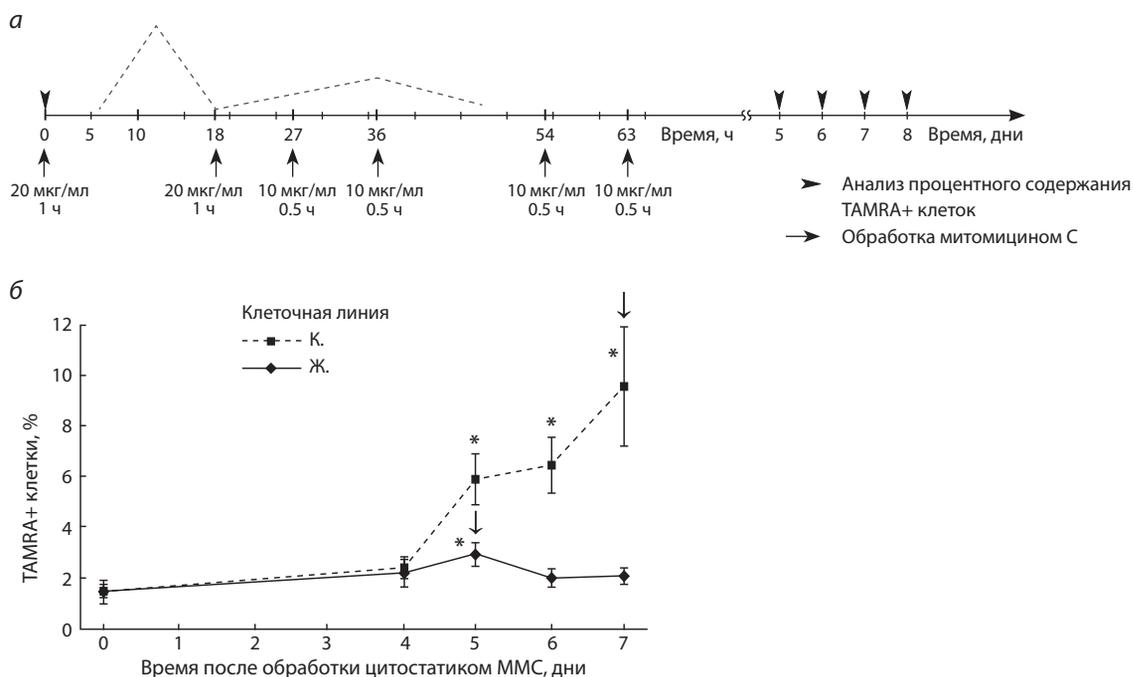


Рис. 3. Анализ содержания TAMRA+ СИРК в культурах клеток человеческой глии К. и Ж. в процессе терапии цитостатиком ММС.

а – схема обработки клеток ММС, а также точек анализа TAMRA+ клеток. Штриховой линией схематично показан график образования и репарации ДЦР после воздействия ММС; *б* – график количества TAMRA+ клеток в культурах К. (сплошная линия) и Ж. (штриховая линия) после терапии ММС. На графике приведены стандартные отклонения. * $p < 0.001$ по сравнению с нулевой точкой (критерий χ^2).

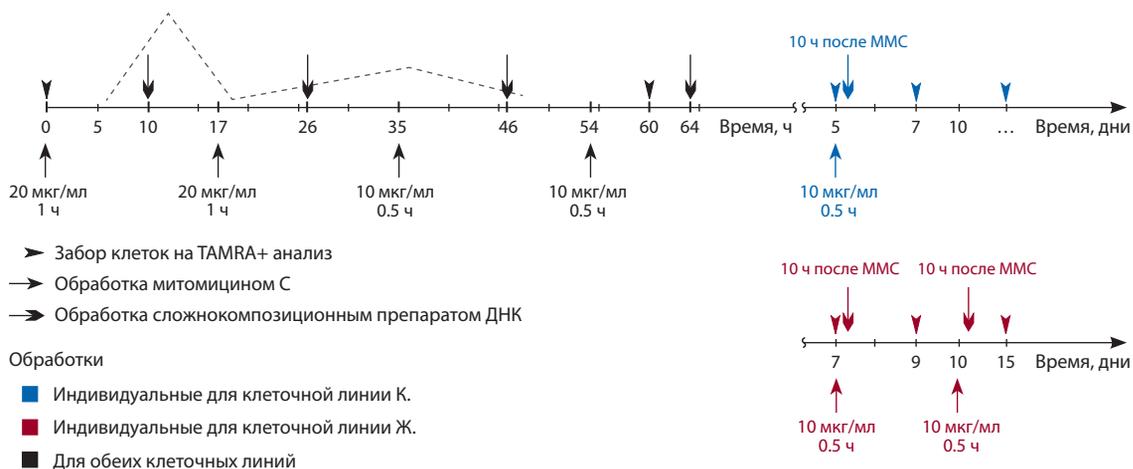


Рис. 4. Схема обработки культур клеток человеческой глии К. и Ж. цитостатиком ММС и композиционным препаратом ДНК.

Обработку клеток проводили *in vitro*. Синие стрелки – индивидуальная обработка для культуры К., красные – для культуры Ж.

способность) и количество TAMRA+ клеток (оценка воздействия на СИРК).

На основании результатов анализа репаративного и клеточного цикла для культуры клеток К. был разработан следующий график обработок цитостатиком ММС и композиционным препаратом двуцепочечной ДНК (рис. 4).

Обработку цитостатиком проводили в 0 и 17 ч (20 мкг/мл в течение одного часа) и в 35, 54 ч и на 5-е сут с момента

начала терапии (10 мкг/мл в течение 30 мин). Препаратом двуцепочечной ДНК обрабатывали в количестве 0.5 мкг в течение 40 мин в 10, 26, 46 и 64 ч с момента первой обработки цитостатиком и на 5-е сут через 10 ч после обработки ММС. Как видно из схемы обработки препаратами на рис. 4, точкой для последней обработки ММС+ДНК являлась обработка на 5-е сут в момент аккумуляции TAMRA+ СИРК, необходимая для полной элиминации указанных клеток.

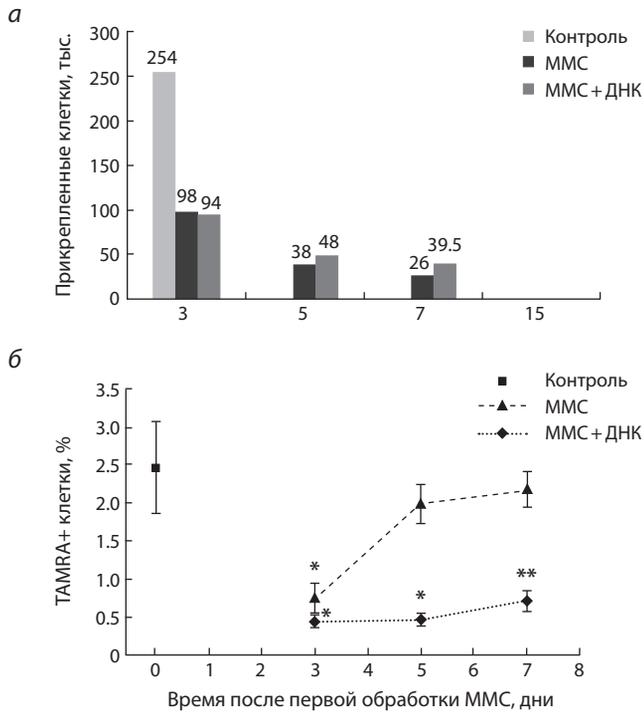


Рис. 5. Анализ количества прикрепленных клеток, а также TAMRA+ клеток культуры человеческой глиобластомы К. после обработки цитостатиком ММС и композиционным препаратом ДНК.

а – график количества прикрепленных клеток на 3, 5, 7 и 15-е сут с момента первой обработки ММС; б – график процентного содержания TAMRA+ клеток. Приведены стандартные отклонения; достоверность результатов оценена относительно контрольного значения при помощи критерия χ^2 . ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$.

В процессе проведения эксперимента проанализировано три группы: контроль – интактные клетки, которые не подвергались обработке; ММС – группу, которую обрабатывали только цитостатиком по схеме, указанной на рис. 4; ММС + ДНК – группу, которую обрабатывали цитостатиком ММС совместно с композиционным препаратом ДНК. Клетки были рассажены в чашки Петри (3.5 см в диаметре) в количестве 185 тыс./чашку; все чашки в группах обрабатывали параллельно. На 3, 5, 7-е сут с момента первой обработки ММС по одной чашке Петри из каждой группы брали для анализа TAMRA+ и общего количества жизнеспособных клеток.

Уже к 3-м сут эксперимента количество клеток в контрольной группе возросло до 254 тыс. (в 1.4 раза). В группах ММС и ММС + ДНК количество клеток постепенно снижалось. Так, к 7-м сут в образцах детектировалось 26 тыс. (ММС) и 39.5 тыс. (ММС + ДНК) клеток, что соответствует падению количества клеток от исходного в 7.1 и 5 раз соответственно. К 31-м сут клетки практически не детектируются. В чашках Петри можно «уловить» только единичные клетки, многие из которых находились в открепленном состоянии. Определить значимое детектируемое количество прикрепленных жизнеспособных клеток оказалось невозможным (рис. 5, а).

Проведена сравнительная количественная оценка TAMRA+ клеток (см. рис. 5, б). Изначально в культуре клеток процентное содержание TAMRA+ клеток состав-

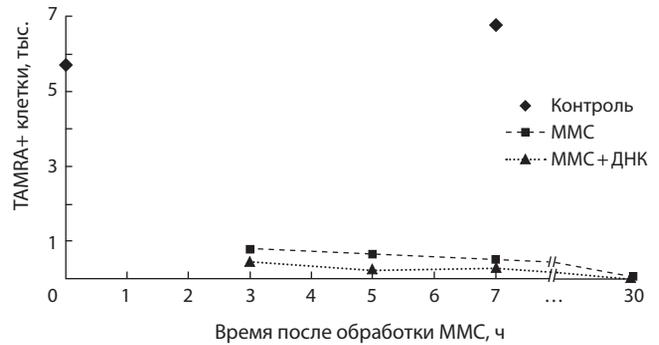


Рис. 6. Абсолютное количество TAMRA+ клеток в культуре клеток человеческой глиобластомы К. на фоне терапии цитостатиком ММС и ММС в комбинации со сложнокоспозитивным препаратом ДНК. К 30-м сут клетки не удалось детектировать, очевидно, содержание TAMRA+ клеток снижается до нуля.

ляло 2.46 ± 0.61 %, и это количество с течением времени оставалось в пределах ошибки. После начала обработок (на 3-и сут) процентное содержание TAMRA+ клеток достоверно ($p < 0.001$) снижается в обеих группах: до 0.75 ± 0.19 % в группе ММС и до 0.44 ± 0.08 % в группе ММС + ДНК. Затем количество TAMRA+ клеток начинает возрастать. На 5-е сут процентное содержание TAMRA+ клеток в группе ММС составляет 1.98 ± 0.25 % и на 7-е сут 2.17 ± 0.23 %, что достоверно не отличается от контроля. В группе ММС + ДНК количество TAMRA+ клеток составляет 0.47 ± 0.08 % на 5-е сут и 0.71 ± 0.14 % на 7-е сут, такие значения достоверно ($p < 0.001$ и $p < 0.01$ соответственно) ниже, чем в контроле.

Мы проанализировали динамику абсолютного количества позитивных клеток и выяснили следующую закономерность. По ходу проведенной терапии абсолютное количество СИРК (TAMRA+) неуклонно падает. К 7-м сут наблюдается их минимальное количество, хотя в процентном отношении произошло увеличение относительного количества TAMRA+ клеток. Такая картина может свидетельствовать об их аккумуляции. Динамика абсолютного количества TAMRA+ клеток приведена на рис. 6. Полученные данные свидетельствуют, что используемая терапия снижает абсолютное количество TAMRA+ клеток как в случае обработки одним ММС, так и при синергичном действии ММС и ДНК. Следует отметить, что эффективность синергичного действия в два раза выше, чем обработка цитостатиком в режиме монотерапии. При начальном количестве СИРК, равном ~5000 клеток, на 7-е сут наблюдения абсолютное количество + СИРК при обработке ММС падает до ~500 (в 10 раз), а при синергичной обработке ММС и ДНК до 250 (в 20 раз). Сравнивая снижение количества СИРК с уменьшением общего количества клеток в образце, можно заключить, что добавление в терапию сложнокоспозитивного препарата ДНК существенно увеличивает эффективность элиминации СИРК ($K_{\text{выж}} = 0.71$ для ММС, $K_{\text{выж}} = 0.25$ для ММС + ДНК). Учитывая тот факт, что к 30-м сут наблюдения популяция глиобластомных клеток К. полностью элиминируется, можно заключить, что примененный режим полностью соответствует всем ранее определенным

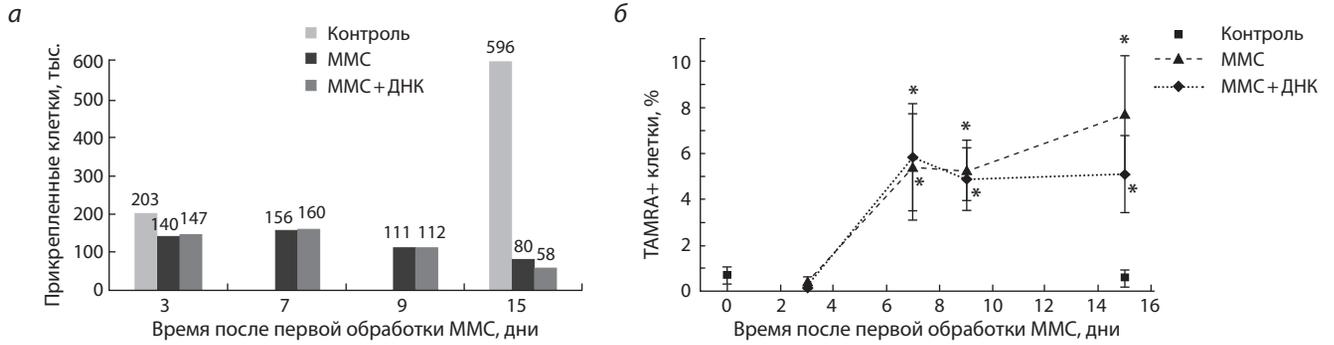


Рис. 7. Анализ количества прикрепленных клеток, а также TAMRA+ клеток культуры человеческой глиобластомы Ж. после обработки цитостатиком ММС и композиционным препаратом ДНК.

а – график количества прикрепленных клеток на 3, 7, 9 и 15-е сут с момента первой обработки ММС; б – график изменения процентного содержания TAMRA+ клеток. На графике приведены стандартные отклонения, достоверность результатов оценена относительно контрольного значения при помощи критерия χ^2 , * $p < 0.001$.

реперным параметрам и демонстрирует высокий уровень эффективности.

Непрямолинейные изменения процентного отношения TAMRA+ клеток связаны с тем, что при проведенном анализе накладываются два взаимоисключающих друг друга процесса, определяющих относительное количество TAMRA+ СИРК, а именно элиминация указанных клеток и процесс увеличения их процентного отношения к уменьшающемуся числу клеток.

В связи с тем, что графики репарации ДЦР культур клеток глиобластомы К. и Ж. были аналогичны, для культуры клеток Ж. была использована такая же схема обработок цитостатиком ММС и композиционным препаратом экзогенной двуцепочечной ДНК, за исключением последних обработок, которые производились в момент аккумуляции TAMRA+ клеток на 7-е и 10-е сут (см. рис. 4). Дополнительная обработка на 10-е сут была добавлена на случай, если при оценке синхронизации TAMRA+ клеток (см. рис. 3), мы не захватили максимум TAMRA+ клеток на 7-е сут.

В процессе проведения эксперимента, как и в случае культуры К., было проанализировано три группы (контроль; ММС и ММС+ДНК) по схеме, показанной на рис. 4). Клетки рассадили по чашкам Петри (3.5 см в диаметре) в количестве 200 тыс./чашку, все чашки в группах обрабатывали параллельно. На 3, 5, 7 и 15-е сут с момента первой обработки ММС по одной чашке Петри из каждой группы брали для анализа TAMRA+ клеток и общего количества жизнеспособных клеток (рис. 7, а, б).

К 3-м сут количество клеток в контрольной группе практически не изменялось и составило 203 тыс., что может говорить о низкой скорости пролиферации данной культуры. В группах ММС и ММС+ДНК количество клеток постепенно снижалось. Так, к 7-м сут остается 156 тыс. (ММС) и 160 тыс. (ММС+ДНК) клеток, т.е. от исходного уровня их количество падает в 1.3 и 1.25 раза. На 9-е сут количество клеток составляло 111 тыс. и 112 тыс. (ниже начального уровня в 1.8 раз в обеих группах). На 15-е сут в контроле количество клеток достигает 596 тыс., в группе ММС – 80 тыс., в группе ММС+ДНК – 58 тыс. Происходит явная терапевтическая деградация культуры,

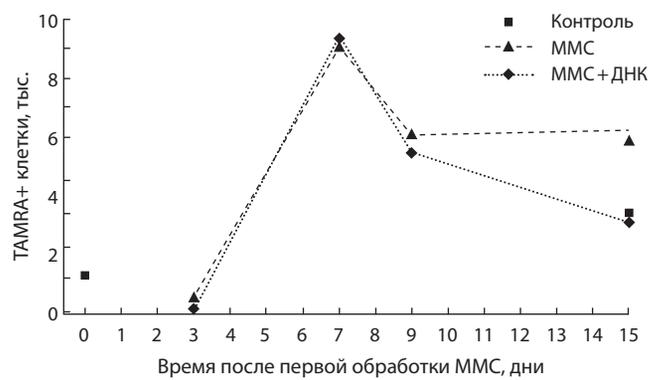


Рис. 8. Абсолютное количество TAMRA+ клеток в культуре клеток человеческой глиобластомы Ж. на фоне терапии цитостатиком ММС и ММС в совокупности со сложнокоспозитивным препаратом ДНК.

свидетельствующая об эффективности проведенных обработок (см. рис. 7, а).

Неожиданным оказался анализ количественной оценки TAMRA+ клеток (см. рис. 7, б). Изначально в культуре клеток процентное содержание TAMRA+ клеток составляло $0.67 \pm 0.37 \%$, это количество с течением времени достоверно не изменялось. На 15-е сут насчитывалось $0.55 \pm 0.36 \%$ указанных клеток. После начала обработок (на 3-и сут) количество TAMRA+ клеток в образцах ММС достоверно не упало и составило $0.40 \pm 0.21 \%$. В группе ММС+ДНК показатель снизился до $0.17 \pm 0.03 \%$. Во всех последующих точках количество TAMRA+ клеток резко возрастает и держится на уровне достоверно выше контроля ($p < 0.001$). Так, на 5-е сут количество TAMRA+ клеток составляет $5.41 \pm 2.34 \%$ (ММС) и $5.82 \pm 2.33 \%$ (ММС+ДНК). Впоследствии уровень TAMRA+ клеток продолжает незначительно повышаться в группе ММС (до $7.68 \pm 2.55 \%$) и незначительно понижаться в группе ММС+ДНК (до $5.09 \pm 1.67 \%$).

Оценка абсолютного количества TAMRA+ клеток на 15-е сут эксперимента показала следующие значения (рис. 8): в группе ММС количество TAMRA+ клеток составило ~6000; для группы ММС+ДНК ~3000 клеток. При

этом в контрольной группе абсолютное количество клеток составило ~3500, хотя исходно абсолютное количество составляло ~1300 клеток. Повышение абсолютного количества TAMRA+ СИРК при увеличении всей популяции раковых клеток и сохранении процентного содержания этих клеток по отношению к увеличившейся массе раковых клеток согласуется с нашими ранними экспериментами (Поттер и др., 2016; Potter et al., 2016). В указанных работах приводится концепция, что TAMRA+ клетки являются «клетками-операторами», формирующими регуляторный цитокиновый профиль, и их физиологическое количество постоянно и находится в пределах 0.5–3 % от общей массы клеток. Таким образом, в контроле произошло естественное увеличение СИРК-операторов до количества, необходимого для организации клеточного сообщества. В исходной популяции процентное содержание TAMRA+ клеток составляло ~0.65 %, в конечной точке измерения ~0.6 %.

Обнаруженное увеличение как процентного содержания, так и абсолютного количества TAMRA+ СИРК можно объяснить несколькими предположениями. Во-первых, мы неправильно определили базовые параметры терапии, что обусловило воздействие, но не эрадикацию этого типа клеток. Восстановившись после не вполне эффективной терапии, клетки начали симметрично делиться, чтобы восстановить потерянную клеточную массу, это сопровождалось увеличением их количества. Второе объяснение заключается в том, что мы детектируем и считаем апоптотические клеточные деграданты, которые ассоциируют с ДНК. На этот факт может указывать как сопоставление цитологической картины клеток (мелкие хроматинсодержащие везикулярные структуры) и локализации TAMRA-меченного материала, так и то, что общее количество клеток как для режима ММС, так и для режима ММС+ДНК значительно падает до 80 и 58 тыс. соответственно, что свидетельствует об элиминирующем воздействии терапии. Третье объяснение феномена заключается в том, что все оставшиеся способные захватывать ДНК-зонд СИРК культуры клеток Ж. продолжают попадать под условия ареста клеточного цикла и накапливаться в деградирующей популяции клеток глиобластомы. При этом четко наблюдается таргетное воздействие на TAMRA+ СИРК двух препаратов, работающих одновременно. В процессе анализа на 3-и сут оказалось, что процентное содержание этих клеток в образцах ММС не упало и составило 0.40 ± 0.21 %, тогда как в группе ММС+ДНК показатель упал до значения 0.16 ± 0.03 %. В количественном выражении это составило 550 для ММС (в 2.4 раза меньше, чем TAMRA+ СИРК в контроле) и 235 клеток для ММС+ДНК (в 5.5 раза меньше исходного). Полученный результат показывает, что преимущественное и первоочередное воздействие терапия оказала на TAMRA+ СИРК. Оценка TAMRA+ материала на 15-е сут эксперимента, несмотря на сложность интерпретации, продемонстрировала, что в образцах ММС+ДНК количество детектируемого TAMRA+ материала в два раза меньше, чем для варианта ММС. Это также свидетельствует о большей эффективности синергичной терапии для культуры Ж. Коэффициенты выживаемости СИРК для используемой терапии составляют: ММС $K_{\text{выж}} = 35.5$, что интерпретируется как

накопление этих клеток; для ММС+ДНК $K_{\text{выж}} = 23.95$, это также свидетельствует об увеличении числа TAMRA+ клеток, но с эффективностью на 30 % меньше.

Обсуждение

В настоящем исследовании проведена оценка эффективности применения терапевтического режима «3+1» (Potter et al., 2016) в адаптированной форме для первичных культур глиобластомы человека К. и Ж., полученных в Новосибирском научно-исследовательском институте травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна и культивируемых в лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН. Дополнительно была оценена эффективность действия кросслинкирующего цитостатика в форме монопрепарата в адаптированном для первичных культур режиме «3+1» или «5+1». Ранее было показано, что обработка кросслинкирующим цитостатиком в режиме «накладывающихся арестов» клеточного цикла приводит к увеличению средней продолжительности жизни экспериментальных животных в шесть-семь раз (Potter et al., 2016). Если такой эффект имеет общебиологическую основу, то парадигма режимов введения циторедуцирующих препаратов может быть скорректирована. Такая коррекция предполагает привязку режимов введения цитостатиков к циклу репарации МЦС популяции клеток-мишеней.

Показано, что адаптированный к культурам режим «3+1» приводит к эффективной терапевтической деградации обеих клеточных популяций. К 30-м сут для культуры К. жизнеспособных клеток, как коммитированных, так и TAMRA+ СИРК, в культуральной среде практически не обнаруживается. Для культуры Ж. анализ был проведен до 15-х сут от начала эксперимента. Для этой культуры также показано существенное снижение общего количества клеток в экспериментальных точках. При этом в контроле клетки успешно размножались. Важно отметить, что, несмотря на общее истощение популяции культур клеток, количество СИРК в обеих культурах меняется непрямолинейно как в образцах, обработанных одним ММС, так и ММС+ДНК. Результаты свидетельствуют о синергичном таргетном действии ММС+ДНК на СИРК (TAMRA+). Тем не менее один ММС в режиме «накладывающихся арестов» клеточного цикла также эффективно действует на раковые клетки в целом, без акцента на СИРК (TAMRA+).

Проведенная оценка свидетельствует о том, что найденный режим и стратегический поход в определении индикаторных точек режима в целом были определены правильно и терапевтически эффективны. Вместе с тем в ходе экспериментов появились неожиданные факты относительно поведения TAMRA+ СИРК, которые требуют дальнейшего анализа и определения истинных причин возникших отклонений от ожидаемого результата.

Неудачные попытки интрацеребральной трансплантации предполагают изменение экспериментального дизайна в случае культур клеток глиобластомы человека и, по-видимому, других культивируемых *ex vivo* клеточных сообществ. Предполагается в случае планирования экспериментов по оценке эффективности проведенных процедур по графтингу обработанных *ex vivo* клеток предварительно анализировать способность этой культуры да-

вать уверенные трансплантаты. Это необходимо для положительного контроля в последующих экспериментах.

Благодарности

Авторы выражают благодарность ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН, ЦКП проточной цитометрии ИЦиГ СО РАН и сектору клеточных технологий ИЦиГ СО РАН, а также В.А. Рогачеву за наработку препарата кросслинкерованной ДНК спермы лосося, входящей в состав сложнопозиционного препарата ДНК.

Работа выполнена в рамках государственного задания по бюджетному проекту № 0324-2018-0019 и поддержана грантом РФФИ № 15-04-03386.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

- Никифорова З.Н., Кудрявцев И.А., Арношкая Н.Е., Брюховецкий И.С., Шевченко В.Е. Опухолевые стволовые клетки мультиформной глиобластомы. Усп. молекуляр. онкологии. 2016;3:26-33. DOI 10.17650/2313-805X-2016-3-2-26-33. [Nikiforova Z.N., Kudryavtsev I.A., Arnotskaya N.E., Bryukhovetskiy I.S., Shevchenko V.E. Tumor stem cells from glioblastoma multiforme. *Uspekhi Molekulyarnoy Onkologii = Advances in Molecular Oncology*. 2016; 3:26-33. DOI 10.17650/2313-805X-2016-3-2-26-33. (in Russian)]
- Поттер Е.А., Долгова Е.В., Проскурина А.С., Ефремов Я.Р., Таранов О.С., Николин В.П., Попова Н.А., Дубатолова Т.Д., Петрова Д.Д., Верещагин Е.И., Минкевич А.М., Андрушкевич О.М., Байбородин С.И., Рогачев В.А., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Богачев С.С. Разработка регламента терапевтического режима, основанного на синергичном действии циклофосфана и препаратов двуцепочечной ДНК, приводящего к полному вылечиванию экспериментальных животных от асцитной формы опухоли мыши Кребс-2. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):723-735. [Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Efremov Y.R., Taranov O.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Dubatolova T.D., Petrova D.D., Vereschagin E.I., Minkevich A.M., Andrushkevich O.M., Baiborodin S.I., Rogachev V.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Development of the therapeutic regimen based on the synergistic activity of cyclophosphamide and double-stranded DNA preparation which results in complete cure of mice engrafted with Krebs-2 ascites. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(5):723-735. DOI 10.18699/VJ16.162. (in Russian)]
- Alyamkina E.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Minkevich A.M., Kozel A.V., Dolgova E.V., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Andrushkevich O.M., Taranov O.S., Omigov V.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Vereschagin E.I., Kiseleva E.V., Zhukova M.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Combination of cyclophosphamide and double-stranded DNA demonstrates synergistic toxicity against established xenografts. *Cancer Cell Int*. 2015;15:32. DOI 10.1186/s12935-015-0180-6.
- Bao S., Wu Q., McLendon R.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B., Dewhirst M.W., Bigner D.D., Rich J.N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756-760. DOI 10.1038/nature05236.
- Beier D., Hau P., Proescholdt M., Lohmeier A., Wischhusen J., Oefner P.J., Aigner L., Brawanski A., Bogdahn U., Beier C.P. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*. 2007;67(9):4010-4015. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-06-4180.
- Brescia P., Richichi C., Pelicci G. Current strategies for identification of glioma stem cells: adequate or unsatisfactory? *J. Oncol*. 2012;2012:376894. DOI 10.1155/2012/376894.
- Carruthers R., Ahmed S.U., Strathdee K., Gomez-Roman N., Amoah-Buahin E., Watts C., Chalmers A.J. Abrogation of radioresistance in glioblastoma stem-like cells by inhibition of ATM kinase. *Mol. Oncol*. 2015;9(1):192-203. DOI 10.1016/j.molonc.2014.08.003.
- Chen R., Nishimura M.C., Bumbaca S.M., Kharbanda S., Forrest W.F., Kasman I.M., Greve J.M., Soriano R.H., Gilmour L.L., Rivers C.S., Modrusan Z., Nacu S., Guerrero S., Edgar K.A., Wallin J.J., Lamszus K., Westphal M., Heim S., James C.D., VandenBerg S.R., Costello J.F., Moorefield S., Cowdrey C.J., Prados M., Phillips H.S. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell*. 2010;17(4):362-375. DOI 10.1016/j.ccr.2009.12.049.
- Dahlrot R.H., Hansen S., Jensen S.S., Schröder H.D., Hjelmberg J., Kristensen B.W. Clinical value of CD133 and nestin in patients with glioma: a population-based study. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 2014; 7(7):3739-3751.
- Dolgova E.V., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Tyrinova T.V., Kozel A.V., Minkevich A.M., Andrushkevich O.M., Zavyalov E.L., Romaschenko A.V., Bayborodin S.I., Taranov O.S., Omigov V.V., Shevela E.Y., Stupak V.V., Mishinov S.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Mayorov V.I., Shurdov M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Identification of cancer stem cells and a strategy for their elimination. *Cancer Biol. Ther*. 2014;15(10):1378-1394. DOI 10.4161/cbt.29854.
- Dolgova E.V., Mishinov S.V., Proskurina A.S., Potter E.A., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Tyrinova T.V., Stupak V.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Novel cancer stem marker and its applicability for grading primary human gliomas. *Technol. Cancer Res. Treat*. 2018;17:1533034617753812. DOI 10.1177/1533034617753812.
- Gilbert C.A., Ross A.H. Glioma stem cells: cell culture, markers and targets for new combination therapies. *Cancer Stem Cells Theories Practice*. 2011. DOI 10.5772/13626.
- Kase M., Minajeva A., Niinepuu K., Kase S., Vardja M., Asser T., Jaal J. Impact of CD133 positive stem cell proportion on survival in patients with glioblastoma multiforme. *Radiol. Oncol*. 2013;47(4):405-410. DOI 10.2478/raon-2013-0055.
- McNeill K.A. Epidemiology of brain tumors. *Neurol. Clin*. 2016; 34(4):981-998. DOI 10.1016/j.ncl.2016.06.014.
- Niedernhofer L.J., Odijk H., Budzowska M., Drunen E., Maas A., Theil A.F., Wit J., Jaspers N.G.J., Beverloo H.B., Hoeijmakers J.H.J., Kanaar R. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol. Cell Biol*. 2004;24(13):5776-5787.
- O'Brien C.A., Kreso A., Jamieson C.H.M. Cancer stem cells and self-renewal. *Clin. Cancer Res*. 2010;16(12):3113-3120. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-09-2824.
- Omuro A., DeAngelis L.M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA*. 2013;310(17):1842-1850. DOI 10.1001/jama.2013.280319.
- Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Efremov Y.R., Minkevich A.M., Rozanov A.S., Peltek S.E., Nikolin V.P., Popova N.A., Seledtsov I.A., Molodtsov V.V., Zavyalov E.L., Taranov O.S., Baiborodin S.I., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. 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.
- Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Minkevich A.M., Efremov Y.R., Taranov O.S., Omigov V.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Bayborodin S.I., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Shurdov M.A., Bogachev S.S. A strategy to eradicate well-developed Krebs-2 ascites in mice. *Oncotarget*. 2016;7(10):11580-11594. DOI 10.18632/oncotarget.7311.

Qiang L., Yang Y., Ma Y., Chen F., Zhang L., Liu W., Qi Q., Lu N., Tao L., Wang X., You Q., Guo Q. Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines. *Cancer Lett.* 2009;279:13-21. DOI 10.1016/j.canlet.2009.01.016.

Schreck K.C., Taylor P., Marchionni L., Gopalakrishnan V., Bar E.E., Gaiano N., Eberhart C.G. The notch target Hes1 directly modulates Gli1 expression and Hedgehog signaling: a potential mechanism of therapeutic resistance. *Clin. Cancer Res.* 2010;16(24):6060-6070. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-10-1624.

Takezaki T., Hide T., Takanaga H., Nakamura H., Kuratsu J., Kondo T. Essential role of the Hedgehog signaling pathway in human

glioma-initiating cells. *Cancer Sci.* 2011;102(7):1306-1312. DOI 10.1111/j.1349-7006.2011.01943.x.

Wang Y., Xu C., Du L.Q., Cao J., Liu J.X., Su X., Zhao H., Fan F., Wang B., Katsube T., Fan S.J., Liu Q. Evaluation of the comet assay for assessing the dose-response relationship of DNA damage induced by ionizing radiation. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14(11):22449-22461. DOI 10.3390/ijms141122449.

Zhang M., Song T., Yang L., Chen R., Wu L., Yang Z., Fang J. Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2008; 27:85. DOI 10.1186/1756-9966-27-85.

ORCID ID

E.V. Dolgova orcid.org/0000-0002-5543-248X

A.S. Proskurina orcid.org/0000-0002-7650-4331

T.V. Tyrinova orcid.org/0000-0002-7987-2017

Ya.R. Efremov orcid.org/0000-0002-0649-7543

K.E. Orishchenko orcid.org/0000-0001-9718-9038

A.A. Ostanin orcid.org/0000-0001-6895-938X

E.R. Chernykh orcid.org/0000-0003-2346-6279

S.S. Bogachev orcid.org/0000-0002-2019-9382