

УДК 615.277.3:577.213:576.376:612.017.1

## ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ, ВОЗНИКАЮЩИЕ В ОРГАНИЗМЕ МЫШЕЙ, ОБРАБОТАННЫХ СОЧЕТАНИЕМ ЦИКЛОФОСФАНА И ЭКЗОГЕННОЙ ДНК

© 2013 г. **Е.В. Долгова<sup>1</sup>, В.П. Николин<sup>1</sup>, Н.А. Попова<sup>1</sup>, А.С. Проскурина<sup>1</sup>,  
К.Е. Орищенко<sup>1</sup>, Е.А. Алямкина<sup>1</sup>, Я.Р. Ефремов<sup>1</sup>, С.И. Байбородин<sup>1</sup>,  
Е.Р. Черных<sup>2</sup>, А.А. Останин<sup>2</sup>, С.С. Богачев<sup>1</sup>, Т.С. Гвоздева<sup>3</sup>, Е.М. Малкова<sup>4</sup>,  
О.С. Таранов<sup>4</sup>, В.А. Рогачев<sup>1</sup>, А.В. Панов<sup>5</sup>, С.Н. Загребельный<sup>6</sup>, М.А. Шурдов<sup>7</sup>**

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,  
Новосибирск, Россия, e-mail: gorbi@bionet.nsc.ru;

<sup>2</sup> Институт клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия;

<sup>3</sup> Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия;

<sup>4</sup> ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск, Россия;

<sup>5</sup> WellsStar College of Health & Human Services, Kennesaw State University Kennesaw,  
Georgia, USA;

<sup>6</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,  
Новосибирск, Россия;

<sup>7</sup> ООО «Панаген», Горно-Алтайск, Россия

Поступила в редакцию 7 сентября 2012 г. Принята к публикации 4 октября 2012 г.

Синергичное действие цитостатика циклофосфана (ЦФ) и фрагментированной ДНК приводит к болезни и гибели экспериментальных мышей (Долгова и др., 2011–2013). Обнаруженный эффект «отсроченной смерти» наиболее ярко проявляется при введении ДНК в период 18–30 ч после инъекции ЦФ (промежуток времени, обозначенный как «окно смерти»).

В настоящем исследовании установлено, что обработка экзогенной ДНК приводит к непрерывному апоптозу клеток костного мозга (ККМ), протекающему в ходе всего времени введения препарата ДНК (18–30 ч). При этом экзогенная ДНК, как аллогенная, так и принадлежащая к различным таксономическим группам, приводит к апоптозу ККМ. Наиболее сильно апоптоз индуцирует ДНК плазмиды.

Анализ динамики гибели и восстановления популяций ККМ животных, находящихся в агонистической фазе развития заболевания, свидетельствует о том, что при общей нормализации количества гематопозитических прогениторных клеток (CD34+) к 15-му дню после инъекции ЦФ количество популяции ККМ размером 12–20 мкм до конца наблюдения (агонистическая фаза заболевания последней отвечающей мышкы) сохраняется на минимальной отметке (3–4 % против 35–40 % в контроле). При этом количество клеток указанной популяции ККМ соответствует времени максимальной лейкопении, индуцированной цитостатиком и наблюдающейся на 3–7-е сут. после инъекции ЦФ. Сравнительный анализ мазков ККМ обеих групп животных предполагает, что в популяции ККМ, выделенных из мышей группы ЦФ+ДНК, отсутствуют молодые формы клеток, формирующих лимфоцитарный росток крови. При этом в мазках периферической крови выявляются бластные формы незрелых предшественников.

Проведенное патоморфологическое исследование показывает, что в сроки эксперимента начиная с 9-х сут. и позднее у мышей, подвергавшихся воздействию ЦФ в сочетании с экзогенной ДНК, происходят выраженные изменения морфологии легких, печени, поджелудочной железы, органов иммунокомпетентной системы и головного мозга. Характер выявленных патологических изменений указывает на преобладание воспалительных реакций в легких, печени, поджелудочной железе и

тканях головного мозга. Подтверждением этому служат структурные эквиваленты функционального истощения лимфоидных органов (тимус, селезенка, лимфатические узлы).

Предположительной причиной гибели животных является полиорганная недостаточность, вызванная акцидентальной инволюцией периферийных лимфоидных органов на фоне системного воспаления. Оба процесса связаны с инъекциями фрагментированной экзогенной ДНК в организм экспериментальных животных в «окно смерти», представляющее собой промежуток времени репарации двуцепочечных разрывов, индуцированных ЦФ.

**Ключевые слова:** циклофосфан, экзогенная ДНК, клетки костного мозга, апоптоз, системное воспаление, акцидентальная инволюция лимфоидных органов.

## ВВЕДЕНИЕ

В предыдущих исследованиях было установлено, что инъекции экзогенной ДНК в промежуток времени 18–30 ч после введения ЦФ приводят к болезни и гибели экспериментальных животных. При этом именно ККМ в первую очередь подвержены деструктивному воздействию синергичного влияния двух препаратов (Долгова и др., 2012, 2013). Отрезок времени 18–24 ч после введения цитостатика является завершающим этапом репарации всей массы двуцепочечных разрывов (ДЦР), сформированных к 12-му ч после введения ЦФ (Долгова и др., 2011). Предполагалось, что фрагменты экзогенной ДНК, достигнув ККМ, принимают участие в процессе репарации ДЦР, индуцированных межцепочечными сшивками (МЦС), внося деструктивные изменения в молекулярные клеточные системы, что приводило к непоправимым изменениям в организме мышей, сопровождающимся болезнью и гибелью животных (Долгова и др., 2013). Таким образом, общая характеристика начала и развития патологического процесса должна складываться из анализа результатов деструктивных процессов, произошедших в костном мозге, и на уровне гистологического анализа срезов органов, затронутых патологическими изменениями.

В настоящей работе были проведены полная характеристика состояния популяций ККМ, а также патологоморфологический анализ тканей и органов мышей, находящихся в агонистической стадии заболевания, что позволило определить причину гибели экспериментальных животных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Анализ распределения ККМ по клеточному циклу

Из трубчатых костей фосфатно-солевым буфером (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 8 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) вымывали красный костный мозг. Около 400 тыс. клеток фиксировали в 60 %-м метаноле при 4 °С в течение 1 ч. Клетки осаждали центрифугированием при 400 g, 4 °С, 5 мин. Осадок ресуспендировали в 400 мкл фосфатно-солевого буфера, обрабатывали панкреатической РНКазой (конечная концентрация 200 мкг/мл) в течение 30 мин при 37 °С. Добавляли 20 мкл пропидиума йодида (5 мг/мл) и окрашивали клетки 10 мин при комнатной температуре (Krishan, 1975).

Распределение клеток по клеточному циклу, а также профиль распределения ККМ по относительному размеру определяли при помощи проточного цитофотометра BD FACSAria (Becton Dickinson, США).

### Анализ количества зрелых предшественников (CD34+) и предшественников лимфоидного ряда в костном мозге мышей

ККМ мышей, которым вводили ЦФ 200 мг/кг, а также мышей, находящихся на разных этапах развития заболевания после совместных инъекций ЦФ 200 мг/кг и ДНК человека (по 0,5 мг каждый час в период времени 18–30 ч после инъекции цитостатика), вымывали по описанной выше методике. После осаждения

центрифугированием клетки ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере с 0,1 %  $\text{NaN}_3$ , 1 % FBS. К 1 млн клеток добавляли 5 мкг антител (FITC Rat anti-Mouse CD34, BD Pharmingen) и, соответственно, 5 мкг изотип-контроля (FITC Rat IgG2a, к Isotype Control, BD Pharmingen) и инкубировали 40 мин при 4 °С. Процент CD34+ клеток определяли при помощи проточного цитофотометра BD FACSAria относительно результатов изотип-контроля в каждом образце. Процент предшественников лимфоидного и эритроидного ряда смотрели относительно всей анализируемой ядродержащей популяции костного мозга.

Количество клеток CD34+ и предшественников лимфоидного ряда считали в пересчете на абсолютное количество ККМ, содержащихся в бедренных и больших берцовых костях интактных мышей, а также в периоды снижения и восстановления клеточности костного мозга на фоне инъекции ЦФ (см. раздел «Результаты»). Для определения клеточности костный мозг полностью вымывался из трубчатых костей большим объемом фосфатно-солевого буфера. Затем при помощи лизирующего буфера (0,15 М  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 мМ Tris-HCl pH 7,5, 0,5 мМ ЭДТА) разрушали эритроциты и считали в камере Горяева количество ядродержащих ККМ.

#### Метод заливки ядер в блоки легкоплавкой агарозы

Вымытые физиологическим раствором ККМ осаждали центрифугированием при 4 °С, 400 g в течение 5 мин. Затем промывали небольшим объемом физиологического раствора и осаждали таким же образом. Осажденные клетки заливали в блоки легкоплавкой агарозы (Low Melt Ultra-Pure DNA Grade Agarose, Bio-Rad) в физрастворе объемом 80 мкл и обрабатывали лизирующим буфером (50 мМ ЭДТА, 1 % N-Lauroylsarcosine (Serva) и 1 мг/мл протеиназы К) два раза по 12 ч при 50 °С (Sambrook *et al.*, 1989). Затем блоки переносили в 0,5 М ЭДТА и хранили при 4 °С. Перед электрофорезом ядра, фиксированные в агарозе, отмывали в ТЕ буфере (10 мМ Tris-HCl, pH 7,6; 1 мМ ЭДТА) в течение 30 мин.

#### Получение срезов ядер на конфокальном микроскопе

Вымытые физиологическим раствором ККМ осаждали центрифугированием при 4 °С, 400 g в течение 5 мин. Затем фиксировали в фиксаторе метанол : ледяная уксусная кислота (3 : 1) в течение часа (Макгрегор, Варли, 1986). Суспензию клеток наносили на влажное обезжиренное стекло, препарат высушивали на воздухе, наносили каплю Antifade DABCO, содержащего 0,4 мкг/мл DAPI, и анализировали на конфокальном микроскопе LSM 510 META (Zeiss).

#### Приготовление препаратов метафазных пластинок

Мышам внутрибрюшинно вводили ЦФ 200 мг/кг и через 18 ч ККМ вымывали средой для культивирования клеток RPMI-1640. Затем клетки один раз промывали этой же средой и осаждали центрифугированием при 400 g, 5 мин, 4 °С. По 30 млн клеток инкубировали с 10 мкг ДНК человека в 500 мкл среды в течение 4 ч. За полтора часа до окончания инкубации в среду добавляли колхицин до конечной концентрации 0,4 мкг/мл. По окончании инкубации из клеток готовили препараты метафазных пластинок в точности по стандартной методике (Макгрегор, Варли, 1986). Препараты окрашивали красителем Гимза и анализировали на микроскопе Axioskop 2 Plus (Zeiss), используя объектив Ч 100 и программу AxioVision.

#### Патологоанатомический анализ тканей и органов погибших мышей

Для гистологического анализа забирали следующие органы: головной мозг (кора полушарий, ствол и мозжечок), тимус, трахея, легкое, сердце, лимфоузлы, селезенка, печень, поджелудочная железа, кишка тонкая и кишка толстая, почки, надпочечники, органы репродуктивной системы (матка, яичники, яйцеводы).

Кусочки органов фиксировали в 4 %-м параформальдегиде, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли ксилолом, заливали в парафин. Парафиновые срезы тол-

щиной до 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (Волкова, Елецкий, 1971). Просмотр препаратов и микрофотосъемка проводились на световом микроскопе AxioImager Z1 (Zeiss, Германия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Характеристика динамики апоптоза ККМ в группах мышей, получавших ЦФ и ЦФ+ДНК

В предыдущих исследованиях было показано, что инъекции экзогенной ДНК в определенное время после введения цитостатика ЦФ приводят к заболеванию и гибели мышей (Долгова и др., 2011). Также было определено, что именно ККМ в первую очередь подвергаются совместному воздействию двух препаратов (Долгова и др., 2012, 2013).

Постоянные трудности в выделении высокомолекулярной геномной ДНК из ККМ мышей, находящихся под воздействием ЦФ и экзогенной ДНК, вероятно, указывали на то, что материал ядер этих клеток находится в дезинтегрированном состоянии. Поскольку известно, что ЦФ сам по себе приводит к апоптозу популяций предшественников костного мозга, то предполагалось, что именно апоптотическая дезинтеграция хроматина является причиной деградации ДНК, которая обнаруживается при выделении ее геномной фракции.

Была проведена серия экспериментов по оценке степени апоптотической деградации ККМ и продолжительности апоптотического процесса в двух группах животных, получавших ЦФ как монопрепарат и ЦФ в сочетании с экзогенной ДНК, инъекционной в «окно смерти». Оказалось, что если инъекционировать экзогенную ДНК в указанный промежуток времени, то индуцированный к 16 ч апоптоз не прекращается и продолжается вплоть до последней инъекции ДНК. Для контрольной группы, получавшей только ЦФ, апоптотическое возбуждение нормализуется через 24 ч после введения ЦФ (рис. 1).

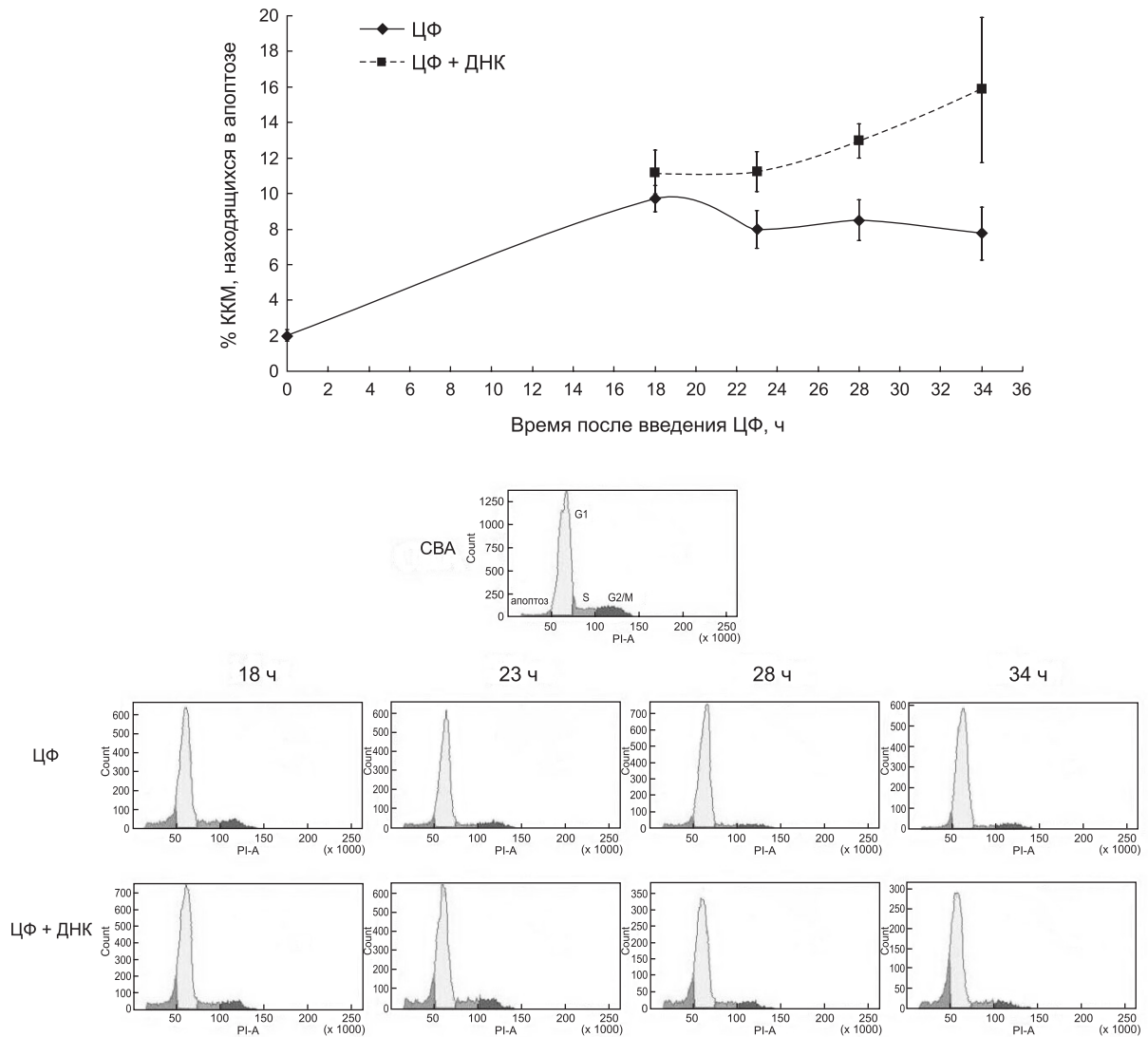
Проведенный анализ геномной ДНК селезенки свидетельствовал о том, что клетки этого иммунокомпетентного органа также находятся в стадии апоптотической деградации (рис. 2).

Наличие апоптоза в ККМ экспериментальных мышей было подтверждено дополнительно при помощи срезов ядер, сделанных на конфокальном сканирующем лазерном микроскопе (рис.3).

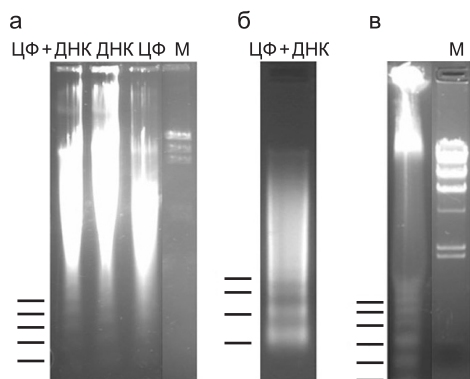
Чтобы определить, каким образом ДНК, относящаяся к различным таксономическим группам, воздействует на ККМ, три группы мышей обрабатывали ЦФ, ЦФ+ДНК человека и ЦФ+плазмидная ДНК (pEGFP-N1). Результаты такой обработки представлены на рис. 4. Оказалось, что ДНК плазмиды приводит к индукции апоптоза в 98 % ККМ, в то время как ЦФ+ДНК человека и ЦФ в виде монопрепарата соответственно в 58 и 43 %.

### Оценка степени вырожденности некоторых популяций ККМ после обработки мышей одним ЦФ и в сочетании с препаратом экзогенной ДНК

Предполагалось, что гибель мышей в первую очередь связана с нарушениями гомеостаза костномозговых предшественников. Проведенные молекулярные исследования, характеризующие поведение экзогенного материала в цитоплазме и во внутриядерном пространстве ККМ, свидетельствовали о том, что фрагменты экзогенной ДНК могут активировать аварийные лигазные системы (Derbyshire *et al.*, 1994; Lees-Miller, Meek, 2003; Lee *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Долгова и др., 2011). Такая активация должна приводить к несанкционированному объединению двуцепочечных концов хромосом, находящихся в этот промежуток времени в ожидании репарации по механизму деликатной гомологичной рекомбинации. При анализе метафазных пластинок, выделенных из костного мозга мышей после введения ЦФ и ЦФ в сочетании с инъекциями ДНК человека в «окно смерти», было установлено, что в группе мышей, получавших два препарата, не менее 65 % метафаз демонстрируют эффект пульверизации хромом. В группе мышей, получавших один ЦФ, количество метафаз в таком состоянии оценено как 42 % от общего числа проанализированных пластинок. В частном случае такое аварийное лигирование может приводить к интеграции экзогенного материала в состав реципиентной хромосомы. На такую возможность указывают

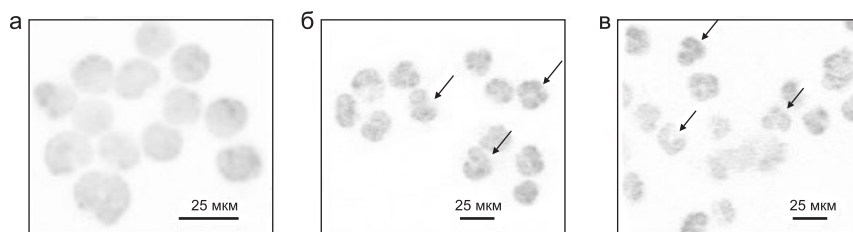


**Рис. 1.** Анализ апоптоза ККМ, выделенных из мышей после инъекции ЦФ (200 мг/кг) в виде монопрепарата и в сочетании с инъекциями ДНК человека каждый час в промежуток времени 18–30 ч по 0,5 мг.



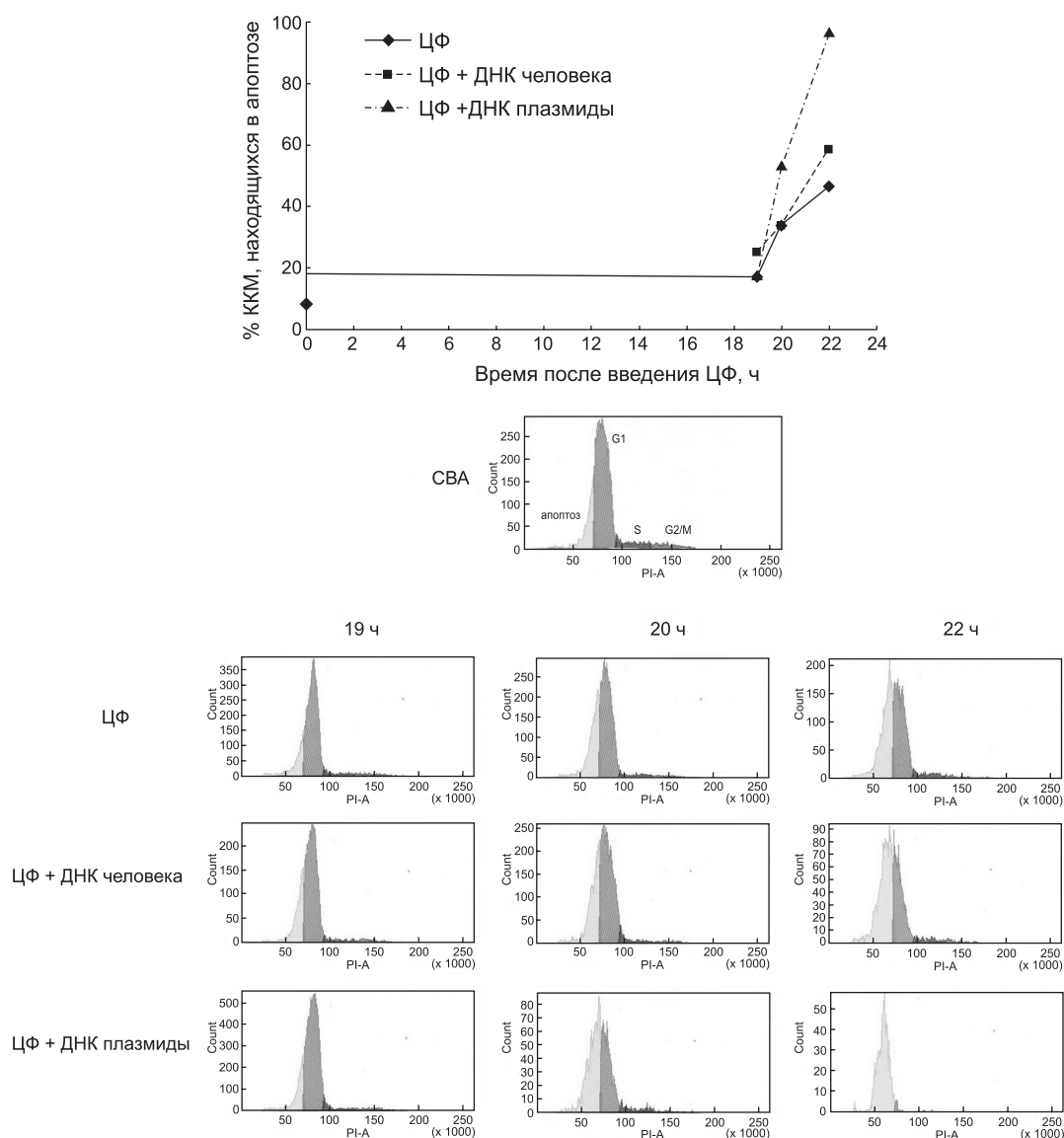
**Рис. 2.** Апоптотическая фрагментация геномной ДНК, выделенной из клеток селезенки (а) и ККМ (б), залитых в блоки легкоплавкой агарозы, после инъекций мышам ЦФ (200 мг/кг) в сочетании с инъекциями ДНК человека каждый час в промежуток времени 18–30 ч по 0,5 мг (ЦФ+ДНК), при 12-кратных инъекциях ДНК по 0,5 мг в виде монопрепарата (ДНК) и через 30 ч после инъекции ЦФ в виде монопрепарата (ЦФ); (в) – электрофорез геномной ДНК, выделенной из ККМ мыши, залитых в блоки легкоплавкой агарозы, сгенерированных экстракорпорально через 18 ч после инъекции ЦФ (200 мг/кг) и инкубированных в течение 2 ч с 2,5 мкг ДНК *Alu* повтора, синтезированного в ПЦР.

М – маркер молекулярного веса  $\lambda$ HindIII. Поперечные черты показывают олигонуклеосомное расщепление хроматина, происходящее в процессе апоптоза.



**Рис. 3.** Срезы ядер ККМ intactных мышей (а), мышей через 30 ч после инъекции ЦФ 200 мг/кг (б) и сразу после инъекций ЦФ и ДНК человека каждый час в промежуток времени 18–30 ч по 0,5 мг (в), выполненные на конфокальном микроскопе LSM 510 META (Zeiss).

Окраска по DAPI, стрелками указаны ядра, находящиеся на начальной стадии апоптотической дезинтеграции.



**Рис. 4.** Анализ апоптоза ККМ, выделенных из мышей после инъекции ЦФ (200 мг/кг) в виде монопрепарата и в сочетании с инъекциями ДНК человека и ДНК плазмиды rEGFP-N1 начиная с 18 ч каждый час по 0,5 мг и 0,1 мг соответственно.

результаты экспериментов, проведенных в ранних исследованиях (Долгова и др., 2011).

Полученные данные предполагали, что непрекращающийся апоптоз в ККМ связан с постоянным присутствием фрагментов экзогенной ДНК в ядре клеток, принадлежащих костному мозгу. Такое присутствие нарушает корректный ход репарации и приводит к аберрантному митозу и гибели клеток вследствие нарушения целостности хромом (рис. 5).

Продолжительная опустошительная гибель ККМ должна была приводить к явным изменениям в соотношении популяций костномозговых предшественников. В связи с этим был проведен анализ состава CD34+ прогениторных клеток и общий анализ изменения состава популяции ККМ в ходе развития заболевания. Результаты исследования представлены на рис. 6, 7. Оказалось, что популяция CD34+ клеток восстанавливается и сохраняется у больных мышей в такой же динамике, как и в группе мышей, получавших только ЦФ (рис. 6).

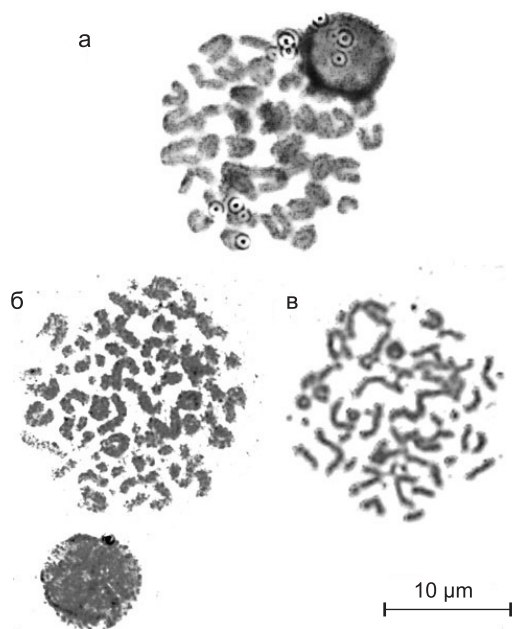
Обнаружено, что основной характеристикой со стороны костномозговых предшественников

болеющих мышей является исчезновение популяции клеток размером 12–20 мкм (рис. 7).

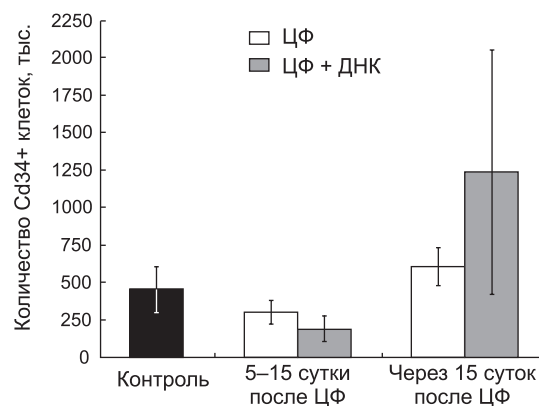
Проведенный анализ форменных элементов в отпечатках костного мозга, полученных из грудины болеющих животных, свидетельствует о том, что в популяции ККМ отсутствуют молодые формы клеток, из которых формируется лимфоцитарный росток крови (табл. 1, рис. 8). Анализ мазков периферической крови больных животных выявил в них присутствие незрелых форм клеток-предшественников (рис. 8, б).

### Патологоанатомический анализ тканей и органов погибших мышей

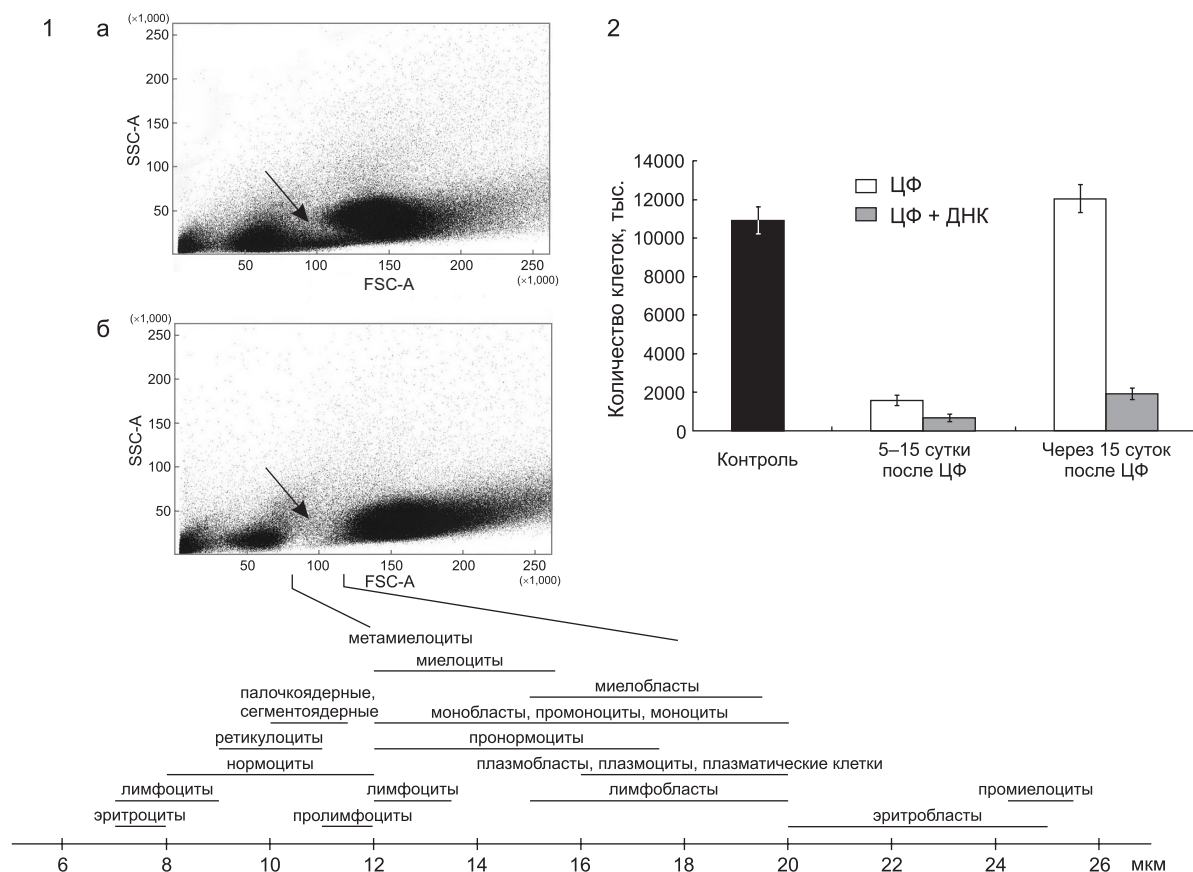
Как показали проведенные эксперименты, феномен «отсроченной смерти» имеет выраженный дозозависимый эффект (Долгова и др., 2011). Основными симптомами болезни были следующие: общее угнетение двигательной активности, обильное потение, лихорадка, отек морды; выпадение волос на затылке и мордочке; неоткрывание глаз, судороги, параличи. Иногда мыши погибали сразу без видимых симптомов болезни. Иногда мыши выздоравливали после характерных симптомов болезни. Проведенный патоморфологический анализ выявил деструктивные изменения в органах и тканях экспериментальных мышей.



**Рис. 5.** Метафазные пластинки intactных мышей (а), мышей после инъекций ЦФ и ДНК человека в «окно смерти» (б) и мышей после инъекции ЦФ (в). Отчетливо виден эффект pulverизации хромосом в случае ЦФ и ЦФ+ДНК.

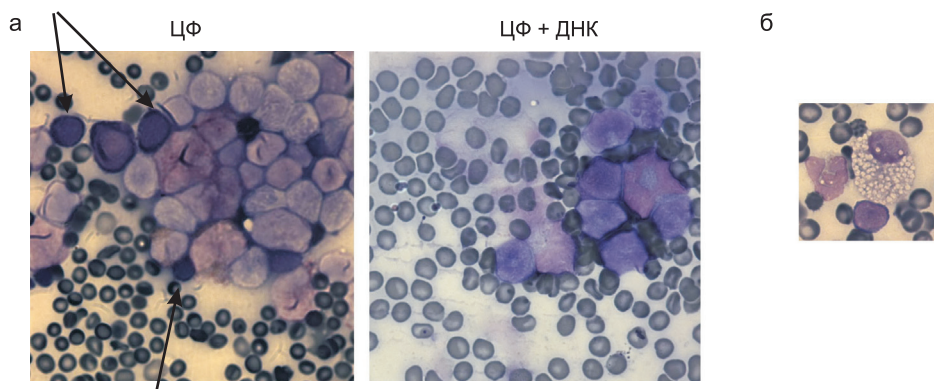


**Рис. 6.** Абсолютное количество зрелых CD34+ предшественников в костном мозге intactных мышей, мышей после инъекции ЦФ и ЦФ в сочетании с ДНК человека в период снижения клеточности костного мозга на 5–15-е сут на фоне инъекции цитостатика и в период восстановления состава костного мозга до исходного состояния по прошествии 15 сут с момента инъекции ЦФ.



**Рис. 7.** Изменение популяционного состава ККМ после инъекций ЦФ и цитостатика в сочетании с экзогенной ДНК.

1 – профиль распределения ККМ мышей по их относительному размеру, полученный при помощи проточного цитофотометра BD FACSAria (Bio-Rad). Стрелками показано облако клеток, представляющее собой негранулированное предшественники лимфоидного ряда, которые в нормальном количестве восстанавливаются начиная с 15 суток в костном мозге мышей после инъекции ЦФ (а) и не восстанавливаются в костном мозге мышей после инъекций ЦФ и ДНК человека (б). Внизу приведена схема распределения всех форм ККМ мышей по размеру в нм. Линиями обозначен размер популяции клеток (12–20 мкм), отсутствующей в костном мозге больных мышей; 2 – абсолютное количество клеток предшественников лимфоидного ряда в костном мозге интактных мышей (контроль), мышей после инъекции ЦФ и ЦФ в сочетании с ДНК человека в период снижения клеточности костного мозга на 5–15-е сут на фоне инъекции цитостатика и в период восстановления состава костного мозга до исходного состояния по прошествии 15 сут с момента инъекции ЦФ.



**Рис. 8.** Анализ мазков периферической крови экспериментальных мышей.

а – клетки костного мозга мышей после воздействия ЦФ в виде монопрепарата и в комбинации с препаратом экзогенной ДНК человека. Стрелки указывают на клетки лимфоцитарного ряда; б – незрелые формы клеток-предшественников в крови больных мышей.



Таблица 1

Клеточный состав крови и костного мозга мышей  
после введения ЦФ и ЦФ+ДНК после восстановления (21 сут и более)

Тип клеток	Костный мозг		Кровь	
	ЦФ+ДНК	ЦФ	ЦФ+ДНК	ЦФ
Гранулоцитарный ряд (зрелые клетки + предшественники)	69	58		
Сегментоядерные нейтрофилы			39	28
Палочкоядерные нейтрофилы			3	1
Эозинофилы			4	1
Моноцитарный ряд	23	27	49	31
Лимфоцитарный ряд	Полное отсутствие молодых форм	17 (Зрелые клетки + предшественники)		
Лимфоциты	5		27	40

В органах мышей, исследованных в сроки от 2 до 6 сут, не обнаружено визуально заметных морфологических отклонений от контрольных животных. Начиная с 9 сут и далее определяются достаточно яркие признаки нарушения структуры со стороны легких, печени, иммунокомпетентных органов и головного мозга. В *легких* наблюдается интенсивная воспалительная реакция, проявляющаяся отеком межальвеолярных перегородок, кровоизлияниями, массивной воспалительно-клеточной инфильтрацией перибронхиальных и периваскулярных пространств с переходом на респираторный отдел легкого (рис. 9, 1). В *печени* на первый план выступают многочисленные мелкоочаговые лимфоидноклеточные инфильтраты внутри долек, а также по ходу желчных протоков и сосудов портальной системы (рис. 9, 2). Местами внутридольковые инфильтраты сопровождаются деструкцией отдельных гепатоцитов. Дольчато-балочная структура органа в целом остается интактной. Признаков репаративной активности соединительной ткани не наблюдается. У одной из мышей описанные поражения легких и печени сопровождаются крупноочаговым некрозом *поджелудочной железы* (рис. 9, 3). Практически все мыши данной группы демонстрируют признаки ответной реакции со стороны иммунокомпетентной системы. Так, со стороны *тимуса* отмечается снижение плотности коркового вещества, что находит отражение в визуальном стирании его

границы с областью мозгового слоя (рис. 9, 4). *Селезенка* многих животных характеризуется заметным сокращением как числа фолликулов в целом, так и уменьшением их размеров до масштаба периартериальной зоны (рис. 9, 5). *Лимфатические узлы* в унисон с изменением морфологии тимуса и селезенки также показывают сокращение количества фолликулов в пределах корковой зоны (рис. 9, 6). Кроме того, во многих случаях отмечается заметный отек ретикулярной ткани мозгового вещества. В *головном мозге* как у животных из группы ЦФ+ДНК, так и у контрольных животных (получавших инъекцию ЦФ) наблюдаются очаговые лимфоидноклеточные инфильтраты в коре полушарий мозга либо изолированно, либо в сочетании с аналогичными клеточными скоплениями в перивентрикулярных и других отделах головного мозга (данные не приведены).

Со стороны других органов патологических изменений структуры не выявлено.

Характер выявленных патологических изменений указывает на преобладание воспалительных реакций в легких, печени, поджелудочной железе и тканях головного мозга. Подтверждением этому служат структурные эквиваленты функционального истощения лимфоидных органов (тимус, селезенка, лимфатические узлы).

В отношении наличия воспалительных изменений головного мозга можно предполагать, что скорее всего, они связаны не с условиями экспе-

римента, а с наличием у мышей такой широко распространенной патологии, как хронический лимфоцитарный хориоменингит. Вместе с тем более яркое проявление данной патологии у животных, подвергавшихся сочетанному воздействию препаратов (ЦФ+ДНК), возможно, указывает на значительно большее угнетение иммунной системы (рис. 7, 9).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Массированные инъекции экзогенной ДНК сами по себе и на фоне репаративных процессов при репарации МЦС в активно пролиферирующих клетках организма индуцируют несколько деструктивных процессов, связанных с гуморальной интервенцией и появлением многочисленных генетических дефектов в клетках, образующих функциональные системы организма, которые затем объединяются в один патологический процесс, идущий сразу по нескольким направлениям и затрагивающий одновременно несколько систем организма.

Общая картина начала и развития патологического процесса складывается из анализа результатов деструктивных процессов, произошедших в костном мозге, и на уровне гистологического анализа срезов органов, затронутых патологическими изменениями. В течение всего времени введения экзогенной ДНК (18–30 ч) наблюдается ярко выраженный непрекращающийся апоптоз. В контроле у мышей, обработанных ЦФ, пик погибших клеток отмечается в 12–14 ч после инъекции ЦФ. Процесс гибели клеток завершается к 24 ч и совпадает по времени с концом репарации ДЦР. Инъекции экзогенной ДНК начиная с 18 ч приводят к непрекращающемуся апоптозу, продолжающемуся до последней анализируемой точки – 32 ч после введения цитостатика. Показано, что интенсивность апоптоза зависит от таксономической близости экзогенной ДНК (рис. 4).

Состояние различных популяций костномозговых предшественников в ходе развития патологического процесса было оценено одновременно с патологоанатомическим анализом дегенеративных изменений в органах экспериментальных мышей, находящихся в агонистической фазе развития заболевания и затронутых патологическим процессом.

Общее количество ККМ в обеих группах снижается до минимального значения на 3-и сут после введения цитостатика и составляет около 20 млн клеток. Через 15 сут происходит полное восстановление популяции костномозговых предшественников до исходного уровня 35 млн клеток.

Динамика изменения количества плюрипотентных предшественников CD34+ в обеих группах до 25-х сут от начала эксперимента практически идентична, а процент предшественников не отличается от нормы и составляет 1,2–1,4 %.

При сравнении цитометрических облаков различных популяций ККМ с использованием бокового светорассеивания (SSC) было обнаружено, что в процессе развития патологического процесса из костного мозга исчезает и больше не появляется популяция клеток с размером 12–20 мкм. Анализ содержания форменных элементов в мазках костного мозга животных свидетельствует о том, что в популяции ККМ мышей, обработанных ЦФ и экзогенной ДНК и находящихся в агонистической фазе развития болезни, отсутствуют молодые формы предшественников лимфоидного ряда. Отмечено, что у болеющих животных в крови появляются незрелые бластные формы клеток, чего никогда не наблюдается у здоровых мышей и мышей, находящихся под воздействием ЦФ как монопрепарата, и что является индикатором патологических изменений процесса кроветворения.

Одновременно с указанными изменениями в костном мозге в тканях нескольких органов экспериментальных мышей обнаруживаются явные дегенеративные изменения. У всех подопытных животных в агонистической фазе развития болезни наблюдаются воспалительные инфильтраты в легких, печени, головном мозге. В поджелудочной железе одного животного был обнаружен обширный некроз. Периферические лимфоидные органы практически полностью опустошены. Инволюция тимуса, селезенки и лимфатических узлов характеризуется стиранием границы кортикального и мозгового слоев и исчезновением лимфоцитов из зон депонирования.

Таким образом, можно увидеть три ярко выраженных деструктивных изменения на клеточном и органном уровнях: 1) исчезает популяция

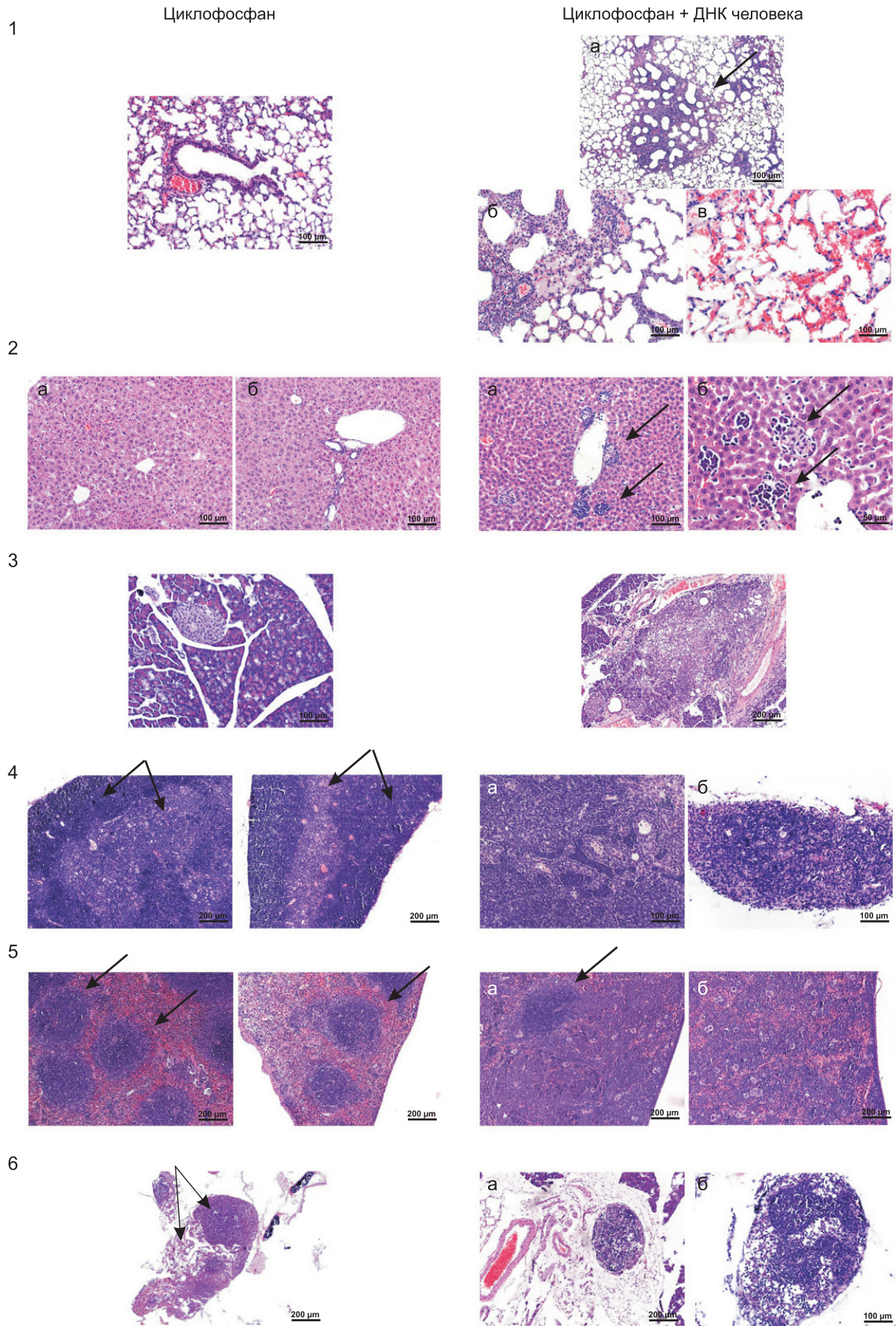


Рис. 9. Патологоанатомический анализ тканей и органов экспериментальных мышей.

**Левый блок:** контрольные мыши, получившие инъекцию ЦФ 200 мг/кг.

1 – интактная легочная паренхима; 2 – центральные вены печеночных долек, сохранено дольчато-балочное строение (а), область печеночных триад, в междольковой соединительной ткани определяются профили кровеносных сосудов и выводных протоков (б); 3 – паренхима поджелудочной железы, островок Лангерганса среди внешнесекреторных ацинусов; 4 – обзорная микрофотография паренхимы тимуса, демонстрирующая топографическое взаимоотношение коркового и мозгового слоя паренхимы (указаны стрелками); 5 – паренхима селезенки отчетливо дифференцирована на красную и белую пульпу, крупные лимфоидные фолликулы белой пульпы селезенки указаны стрелками; 6 – региональный лимфоузел, стрелками указаны корковая (более светлая) и мозговая зоны (более темная), которые имеют отчетливое разграничение.

**Правый блок:** мыши, которые находились на конечных стадиях заболевания, получившие совместные инъекции ЦФ 200 мг/кг и ДНК человека по 0,5 мг каждый час в промежутки времени 18–30 ч после инъекции ЦФ.

1 – плотный очаг воспалительной клеточной инфильтрации в паренхиме легкого (а), очаг воспаления с выраженной гиперемией сосудов и интенсивной экссудацией в альвеолы легкого (б), массивные кровоизлияния в паренхиму легкого (в); 2 – стрелками указаны множественные лимфоидноклеточные инфильтраты в паренхиме печени (а), очаги – инфильтраты в паренхиме печени крупным планом (б); 3 – крупный очаг некроза поджелудочной железы; 4 – снижение плотности заселения лимфоцитами корковой зоны тимуса на фоне обилия их в синусоидах мозгового слоя (а), резкое стирание границы между корковым и мозговым отделами паренхим тимуса (б); 5 – умеренно выраженная редукция фолликулов белой пульпы селезенки, стрелкой указан единственный имеющийся на срезе фолликул (а), резко выраженная редукция фолликулов белой пульпы селезенки, на срезе нет ни одного фолликула (б); 6 – региональный лимфоузел с уменьшенной плотностью коркового вещества, фолликулы слабо дифференцированы, синусы мозгового слоя умеренно расширены (а), синусы мозгового отдела резко расширены, фолликулы корковой зоны редуцированы (б).

клеток, формирующая лимфоидный росток крови, и в периферической крови появляются бластные формы, которые в норме никогда не покидают костномозговой отдел; 2) происходит акцидентальная инволюция периферийных лимфоидных органов; 3) индуцируется системный воспалительный процесс.

Мы полагаем, что все три процесса начинают развиваться одновременно, интегрируют между собой и формируют петлю событий, приводящих к иммунодефициту, связанному с акцидентальной инволюцией периферийных лимфоидных органов на фоне системного воспаления и невозможности восполнить опустошенные селезенку, тимус и лимфоузлы новыми иммунными Т- и В-лимфоцитами вследствие нарушения способности функции плюрипотентных CD34+ клеток развиваться в направлении белого ростка крови.

Полученные результаты позволяют провести анализ возможных механизмов, вызывающих: а) исчезновение из костного мозга популяции клеток, составляющих белый росток крови; б) акцидентальную инволюцию периферийных лимфоидных органов; в) системный воспалительный процесс.

**Исчезновение популяции клеток, формирующей белый росток крови, из костного мозга больных мышей** может быть связано с нарушениями в механизмах, определяющих плюрипотентность CD34+ СКК. Поскольку популяция CD34+ СКК восстанавливается и в полном объеме присутствует в костном мозге

обеих групп мышей независимо от стадии заболевания животных, обработанных двумя препаратами, можно предположить, что CD34+ клетки перестают продуцировать потомков, определяющих развитие лимфоидного ростка крови. Известно, что СКК могут развиваться в два независимых ростка крови – миелоидный и лейкоцитарный (Афанасьева и др., 2004; Orkin, Zon, 2008). Вследствие воздействия экзогенной ДНК в период «окно смерти» происходит утрата функциональной возможности этих клеток развиваться в направлении белого ростка. При этом при обработке ЦФ в виде монопрепарата не происходит редукции функциональной потенции СКК. Непонятным остается механизм, определяющий восстановление анализируемой популяции клеток CD34+ через 15 сут до исходного уровня в обеих группах животных, и одновременную потерю ими своих функций в группе мышей, обработанных ЦФ+ДНК. Плюрипотентная стволовая клетка обладает максимальной из всех известных типов клеток генетической пластичностью (Кругляков и др., 2008; Rossi *et al.*, 2008; Silva, Smith, 2008; Yu, Thomson, 2008). Возможно, это ее свойство сохраняет ей жизнеспособность при одновременном нарушении ее способности развиваться в клетки белого ростка крови.

Одним из вариантов исчезновения цитометрического облака является следующее. Одновременно с функциональной дегенерацией СКК погибают все коммитированные потомки, которые в перспективе могли развиваться в Т- и

В-лимфоциты. Гибель индуцируется экзогенной ДНК и связана с ее участием в процессе репарации ДЦР в этом типе клеток-предшественниц. Предполагается, что появление фрагментов экзогенной ДНК в клетках, находящихся под воздействием ЦФ в стадии репарации ДЦР, активирует агрессивные аварийные лигазные системы (Derbyshire *et al.*, 1994; Lees-Miller, Meek, 2003; Lee *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005), что приводит к хромосомным аномалиям и аберрантному митозу, сопровождающимся гибелью клетки. При длительном постоянном притоке фрагментированной экзогенной ДНК происходит, во-первых, ужесточение процесса некорректной репарации (о чем свидетельствует высокий процент пульверизированных метафаз в группе экспериментальных мышей) и, во-вторых, индуцируется перманентный апоптоз ККМ. Такие жесткие условия, по-видимому, приводят к полной элиминации популяции клеток лейкоцитарного кроветворного ростка. Возможно, что эти условия могут быть дополнительно усилены нарушениями в происходящей RAG рекомбинации в клетках-предшественниках В-лимфоцитов, которая также может быть раскоординирована присутствием в клетках фрагментов экзогенной ДНК. Следовательно, к указанным деструктивным процессам может присоединиться еще один. Присутствие фрагментов экзогенной ДНК в этот момент времени в предшественниках В-лимфоцитов может повлиять на формирование репертуара генов иммуноглобулинов, полностью купируя их разнообразие вследствие нарушения корректного воссоединения кодирующих их генов при RAG рекомбинации (реорганизация V-, D-, J-сегментов генов иммуноглобулинов, осуществляемая RAG-рекомбиназой) (Fugmann, 2001; Cook *et al.*, 2007; Kotnis *et al.*, 2009).

Принципиально возможен еще один вариант исчезновения популяции молодых форм. Предположим, что нарушилась функция СКК продуцировать формы клеток, формирующих белый росток. Молодые формы, уже присутствующие в костном мозге к этому времени, не погибают, а продолжают дифференцировку, превращаясь в зрелые формы. При этом область их первоначального присутствия опустеет и не сможет быть заполнена в связи с дефектами в СКК, возникших в результате воздействия ЦФ и ДНК.

**Акцидентальная инволюция** периферийных лимфоидных органов связана с петлей акселерации иммунной недостаточности, которая начинается с массового апоптоза активно пролиферирующих клеток, вызванного действием цитостатика и доведенного до предела инъекциями экзогенной ДНК, что хорошо видно на примере апоптоза лимфоцитов селезенки и костного мозга (рис. 2). Вследствие апоптотической деградации хроматина в крови опытных животных появляется огромное количество нуклеосомных мономеров разной степени гидролиза. Нуклеосомы в свою очередь индуцируют уже некроз лимфоцитов (Decker *et al.*, 2003, 2005; Проскураков и др., 2005), что приводит к нарастающей иммунной недостаточности. Поскольку происходит гибель как В-, так и Т-лимфоцитов, формируется комбинированный иммунодефицит гуморального и клеточного типа. Следствием возникшего иммунодефицита является увеличение инфекционной нагрузки, связанной с активацией в условиях недостаточности иммунной системы оппортунистических инфекций (Rosen *et al.*, 1995; Buckley, 2000; Harty *et al.*, 2000; Leksstrom-Himes, Gallin, 2000; De Gregorio, Merrell, Falkow, 2004; Monack *et al.*, 2004; Rappuoli, 2004; Kaufmann, Schaible, 2005). **Возникшие очаговые** или захватывающие весь орган воспалительные процессы, вызванные или активностью сапрофитов, или активизацией бактериально-вирусной палитры комменсалов (Medzhitov, 2007), приводят к оттоку из лимфоидных органов остатков лимфоцитов, сохранившихся после атаки сначала ЦФ и экзогенной ДНК, и затем собственными нуклеосомами. Одновременно с этим погибшие от некроза лимфоциты также представляют собой очаги, индуцирующие воспалительные реакции, что в еще большей степени усиливает акселеративную петлю и способствует формированию системного воспалительного процесса (Andrews, 2005). **В результате произошедших** событий периферийные лимфоидные органы полностью опустошаются и больше не содержат иммунокомпетентных клеток. Одновременно с этим исчезает возможность повторного заселения иммунными клетками соответствующих зон иммунных органов вследствие разрушения ростков кроветворения.

Можно полагать, что массивные инъекции экзогенной ДНК на фоне действия ЦФ и

следующая за этим индукция некроза лимфоцитов имеет сходство с описанными в литературе раздражителями (Афанасьева и др., 2004), приводящими к инволюции тимуса и представляющими собой обширные травмы, интоксикацию, инфекцию. При указанных типах поражения организма возникают стресс-реакции, при которых происходит массивный выброс лимфоцитов в кровь и наблюдается массовая гибель клеток в самом органе, особенно в корковом веществе. В дополнение к этому в таких условиях наблюдается фагоцитоз макрофагами внешне неизмененных лимфоцитов. В связи с указанными процессами становится менее заметной граница коркового и мозгового вещества. Именно такая гистологическая картина наблюдается при анализе срезов как тимуса, так и селезенки и лимфатических узлов у мышей экспериментальной группы ЦФ+ДНК. Одновременно с этим массовый апоптоз в костном мозге и селезенке показан экспериментально и представлен на электрофореграммах (рис. 2). Известно, что генетические дефекты в генах иммуноглобулинов или физическое отсутствие Т- и В- клеток приводят к возникновению восприимчивости к пиогенным инфекциям, развитие которых проявляется в пневмониях (Мейл и др., 2007), которые выявляются в разной степени у всех экспериментальных мышей в агонистической фазе развития болезни. В анализируемой ситуации возможно двойное деструктивное воздействие на В- и Т-клетки. В первом случае происходит физическая элиминация всех групп указанных типов клеток из костного мозга и периферических лимфоидных органов. Во втором случае происходят нарушения в конечной организации множественности генов иммуноглобулинов и **Т-клеточных рецепторов** вследствие участия фрагментов экзогенной ДНК в репаративном процессе при репарации ДЦР как интермедиатов репарации МЦС. В этом случае RAG соматическая рекомбинация не происходит и репертуар иммунногенных молекул не формируется. Такая возможность показана в работе Е.В. Долговой с соавт. (2013), где приводятся экспериментальные доказательства нарушения репаративного процесса при репарации ДЦР в районах хромосом, содержащих умеренные повторяющиеся последовательности, присутствием фрагментов экзогенной ДНК.

**Системный воспалительный процесс**, обнаруживаемый при гистологическом анализе органов экспериментальных мышей, может иметь несколько путей возникновения. Как уже было сказано, при акселерации иммунодефицита происходит активизация оппортунистической и аукоотрофной инфекции, присутствующей в организме мышей. У иммунокомпрометированных мышей процесс может диссеминировать почти во все ткани организма. Нейтрофилы и макрофаги инфильтруются в области инфекции, фагоцитируют патоген и секретируют в кровь противовоспалительные цитокины. Если инфекция распространена по всему организму, то наблюдается цитокиновая интервенция, приводящая к повреждению тканей сосудов и образованию петли акселерации воспаления. Синдромами такого повышения количества цитокинов в крови животных может являться лихорадка (что постоянно наблюдается у животных в агонистической фазе развития болезни), диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови и тромбоз с нарушением сосудистой проницаемости, выходом плазмы в ткань, циркуляторным коллапсом и геморрагическим некрозом ткани сосудов. Механизм повреждения связан, в первую очередь, с присутствием в крови ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1. Эти цитокины активируют клетки эндотелия сосудов в направлении экспрессии молекул межклеточной адгезии и тканевого тромбопластина, что приводит к повышению адгезии циркулирующих клеток, отложению фибрина и развитию тромбозов. Новые очаги некрозов приводят к образованию очередной петли акселерации воспаления, заканчивающейся полиорганной недостаточностью и летальным исходом. Усиление эффекта воспаления может происходить в результате некроза лимфоцитов, которые в этом случае представляют собой мишень для иммунокомпетентных клеток, секретирующих противовоспалительные цитокины. В данном случае воспалительный процесс связан с активностью нейтрофилов и макрофагов, привлекаемых к очагу поражения (Warren *et al.*, 1989; Merrell, Falkow, 2004; Monack *et al.*, 2004; Rouse, Sivas, 2004). Похожая картина разрушения тканей наблюдается у мышей, подвергнутых воздействию цитостатика ЦФ и экзогенной ДНК. Обнаруженный обширный некроз в поджелудочной

железе одного из подопытных животных, а также инфильтрации вокруг кровеносных сосудов в печени всех заболевших животных, инфильтрации в легких и головном мозге опытных мышей в агонистической стадии развития болезни могут косвенно свидетельствовать о развитии описанного процесса.

Одновременно с цитокиновой интервенцией, связанной с ослаблением иммунитета, которое произошло в результате инволюции периферических иммунных органов, развития системного воспаления и массовой инфильтрации в некротических очагах иммунокомпетентных клеток при появлении в организме большого количества фрагментированной двуцепочечной экзогенной ДНК, описано явление сверхэкспрессии интерферонов первого типа всеми клетками организма, включая иммунокомпетентные клетки (Ishii, Akira, 2006; Martin, Elkon, 2006; Shirota *et al.*, 2006; Coban *et al.*, 2008; Takeshita, Ishii, 2008). Также показано, что препараты экзогенной ДНК, в том числе и препарат, используемый в настоящем исследовании, вызывает сверхпродукцию всей палитры цитокинов, включая ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 в клетках мононуклеарной фракции периферической крови человека (Рыкова и др., 2001). Можно полагать, что два направления цитокиновой интервенции будут накладываться друг на друга, приводя к максимальному деструктивному эффекту.

Существует еще одна принципиальная возможность акселерации воспаления, связанная с аутоиммунными проявлениями, возникающими при одновременном появлении в организме большого количества антигенов, как это происходит в указанных экспериментах. При этом формируются комплексы связывающие иммунные комплексы. Если формируется большое количество таких комплексов, а системы, ответственные за их удаление (мононуклеарные фагоциты, эритроциты, комплемент), перегружены, как это представляется в проведенных экспериментах, то комплексы откладываются в тканях, включая головной мозг и стенки кровеносных сосудов (гиперчувствительность III типа). Крупные иммунные комплексы могут формироваться в легких и удаляются из кровотока в печени, селезенке и способны запускать механизмы воспалительных процессов. При непосредственном взаимодействии с базофилами и тромбоцитами (через FC-рецептор) они инду-

цируют высвобождение вазоактивных аминов и параллельно стимулируют макрофаги, вызывая выделение цитокинов ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1, играющих важную роль в развитии воспаления. Вместе с тем иммунные комплексы активируют систему комплемента с образованием анафилоксинов C3a и C5a. Эти фрагменты стимулируют выброс вазоактивных аминов и секрецию хемотаксических факторов тучными клетками и базофилами. Компонент C5a также служит хемоаттрактантом для базофилов, эозинофилов и нейтрофилов. Активация комплемента носит неадекватный характер и возникает порочный круг, влекущий дальнейшее повреждение тканей и усиление воспалительной реакции (Whaley, 1987; Napirei *et al.*, 2000; Ravetch, 2002). Данные, полученные при патологоанатомическом исследовании органов больных мышей, предполагают и такую возможность возникновения и прогрессии воспалительного процесса.

В заключение к проделанной работе можно сказать следующее. Индуктором всего многообразия возможных патологических явлений в организме экспериментальных мышей является фрагментированная экзогенная ДНК. Будучи вовлеченной в репаративный процесс при репарации ДЦР, индуцированных действием ЦФ, экзогенная ДНК нарушает правильный ход репаративного процесса, в частности в ККМ, что приводит к абберрантному митозу и гибели всей популяции костномозговых предшественников, ответственных за развитие иммунной системы мыши. Одновременно с исчезновением популяции уже существующих предшественников белого ростка кроветворения происходит разрушение функции CD34+ СКК производить потомков, формирующих этот росток. В организме перестают образовываться новые иммунные клетки. В таких условиях на фоне развивающегося системного сепсиса происходит иммунологический коллапс. Возникает полиорганная недостаточность, приводящая к растянутой во времени гибели экспериментальных животных.

## ЛИТЕРАТУРА

- Афанасьева Ю.И., Кузнецова С.Л., Юрина Н.А. Гистология, цитология и эмбриология. М.: Медицина, 2004. 768 с.  
Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии и гистологической техники. М.: Медицина, 1971. 272 с.  
Долгова Е.В., Николин В.П., Попова Н.А. и др. Интерна-

- лизация экзогенной ДНК во внутренние компартменты клеток костного мозга мышей // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. № 2. С. 397–414.
- 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 // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2013. В печати.
- Долгова Е.В., Проскурина А.С., Николин В.П. и др. Характеристика временных параметров проявления эффекта токсического действия инъекций экзогенной ДНК на фоне предобработки цитостатиком циклофосфаном // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15. № 4. С. 674–689.
- Кругляков П.В., Соколова И.Б., Полицев Д.Г. Стволовые клетки дифференцированных тканей взрослого организма // Цитология. 2008. Т. 50. № 7. С. 557–567.
- Макгрегор Г., Варли Дж. Методы работы с хромосомами животных: Пер. с англ. М.: Мир, 1986. С. 31.
- Мейл Д., Бростофф Дж., Рот Д.Б., Ройтт А. Иммунология: Пер. с англ. М.: Логосфера, 2007. 568 с.
- Проскуряков С.Я., Гавай В.П., Конопляников А.Г. Иммунология некроза и апоптоза // Биохимия. 2005. Т. 70. С. 1593–1605.
- Рыкова Е.Ю., Лактионов П.П., Власов В.В. Активирующее влияние ДНК на иммунную систему // Усп. соврем. биологии. 2001. Т. 121. С. 160–171.
- Andrews N.W. Membrane repair and immunological danger // EMBO Rep. 2005. V. 6. No. 9. P. 826–830.
- Buckley R.H. Primary immunodeficiency diseases due to defects in lymphocytes // N. Engl. J. Med. 2000. V. 343. No. 18. P. 1313–1324.
- Coban C., Koyama S., Takeshita F. *et al.* Molecular and cellular mechanisms of DNA vaccines // Hum. Vaccin. 2008. V. 4. P. 453–456.
- Cook R., Wu C.C., Kang Y.J., Han J. The role of the p38 pathway in adaptive immunity // Cell. Mol. Immunol. 2007. V. 4. No. 4. P. 253–259.
- De Gregorio E., Rappuoli R. Inside sensors detecting outside pathogens // Nat. Immunol. 2004. V. 5. No. 11. P. 1099–1100.
- Decker P., Wolburg H., Rammensee H.G. Nucleosomes induce lymphocyte necrosis // Eur. J. Immunol. 2003. V. 33. No. 7. P. 1978–1987.
- Decker P., Singh-Jasuja H., Haager S. *et al.* Nucleosome, the main autoantigen in systemic lupus erythematosus, induces direct dendritic cell activation via a MyD88-independent pathway: consequences on inflammation // J. Immunol. 2005. V. 174. No. 6. P. 3326–3334.
- Derbyshire M.K., Epstein L.H., Young C.S.H. *et al.* Nonhomologous recombination in human cells // Mol. Cell Biol. 1994. V. 14. No. 1. P. 156–169.
- Fugmann S.D. RAG1 and RAG2 in V(D)J recombination and transposition // Immunol. Res. 2001. V. 23. No. 1. P. 23–39.
- Harty J.T., Tvinnereim A.R., White D.W. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection // Annu. Rev. Immunol. 2000. V. 18. P. 275–308.
- Ishii K.J., Akira S. Innate immune recognition of, and regulation by, DNA // Trends Immunol. 2006. V. 27. P. 525–532.
- Kaufmann S.H., Schaible U.E. Antigen presentation and recognition in bacterial infections // Curr. Opin. Immunol. 2005. V. 17. No. 1. P. 79–87.
- Kotnis A., Du L., Liu C. *et al.* Non-homologous end joining in class switch recombination: the beginning of the end // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2009. V. 364. No. 1517. P. 653–665.
- Krishan A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining // J. Cell Biol. 1975. V. 66. No. 1. P. 188–193.
- 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. No. 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. No. 11. P. 1161–1173.
- Lekstrom-Himes J.A., Gallin J.I. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes // N. Engl. J. Med. 2000. V. 343. No. 23. P. 1703–1714.
- Martin D.A., Elkon K.B. Intracellular mammalian DNA stimulates myeloid dendritic cells to produce type I interferons predominantly through a toll-like receptor 9-independent pathway // Arthritis Rheum. 2006. V. 54. P. 951–962.
- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response // Nature. 2007. V. 449. No. 7164. P. 819–826.
- Merrell D.S., Falkow S. Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis // Nature. 2004. V. 430. No. 6996. P. 250–256.
- Monack D.M., Mueller A., Falkow S. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system // Nat. Rev. Microbiol. 2004. V. 2. No. 9. P. 747–765.
- Napirei M., Karsunky H., Zevnik B. *et al.* Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice // Nat. Genet. 2000. V. 25. No. 2. P. 177–181.
- Orkin S.H., Zon L.I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology // Cell. 2008. V. 132. No. 4. P. 631–644.
- Ravetch J.V. A full complement of receptors in immune complex diseases // J. Clin. Invest. 2002. V. 110. No. 12. P. 1759–1761.
- Rosen F.S., Cooper M.D., Wedgwood R.J. The primary immunodeficiencies // N. Engl. J. Med. 1995. V. 333. No. 7. P. 431–440.
- Rossi D.J., Jamieson C.H., Weissman I.L. Stems cells and the pathways to aging and cancer // Cell. 2008. V. 132. No. 4. P. 681–696.
- Rouse B.T., Suvas S. Regulatory cells and infectious agents: detentes cordiale and contraire // J. Immunol. 2004. V. 173. No. 4. P. 2211–2215.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Shirota H., Ishii K.J., Takakuwa H., Klinman D.M. Contribution of interferon-beta to the immune activation induced by double-stranded DNA // Immunology. 2006. V. 118. P. 302–310.



- Silva J., Smith A. Capturing pluripotency // *Cell*. 2008. V. 132. No. 4. P. 532–536.
- Takeshita F., Ishii K.J. Intracellular DNA sensors in immunity // *Curr. Opin. Immunol.* 2008. V. 20. P. 383–388.
- 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. No. 10. P. 4020–4030.
- Warren J.S., Yabroff K.R., Remick D.G. *et al.* Tumor necrosis factor participates in the pathogenesis of acute immune complex alveolitis in the rat // *J. Clin. Invest.* 1989. V. 84. No. 6. P. 1873–1882.
- Whaley K. Complement and immune complex diseases // *Complement in Health and Disease* / Ed. K. Whaley. Lancaster: MTP Press Ltd, 1987.
- Yu J., Thomson J.A. Pluripotent stem cell lines // *Genes Dev.* 2008. V. 22. No. 15. P. 1987–1997.

## PATHOLOGICAL CHANGES IN MICE TREATED WITH CYCLOPHOSPHAMIDE AND EXOGENOUS DNA

**E.V. Dolgova<sup>1</sup>, V.P. Nikolin<sup>1</sup>, N.A. Popova<sup>1</sup>, A.S. Proskurina<sup>1</sup>, K.E. Orishchenko<sup>1</sup>, E.A. Alyamkina<sup>1</sup>, Ya.R. Efremov<sup>1</sup>, S.I. Baiborodin<sup>1</sup>, E.R. Chernykh<sup>2</sup>, A.A. Ostanin<sup>2</sup>, S.S. Bogachev<sup>1</sup>, T.S. Gvozdeva<sup>3</sup>, E.M. Malkova<sup>4</sup>, O.S. Taranov<sup>4</sup>, V.A. Rogachev<sup>1</sup>, A.S. Panov<sup>5</sup>, S.N. Zagrebelnyi<sup>5</sup>, M.A. Shurdov<sup>6</sup>**

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

<sup>2</sup> Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk, Russia;

<sup>3</sup> Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia;

<sup>4</sup> Research Center for Virology and Biotechnology Vector, Koltsovo, Russia;

<sup>5</sup> WellsStar College of Health & Human Services, Kennesaw State University Kennesaw, Georgia, USA;

<sup>6</sup> Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia;

<sup>7</sup> OOO Panagen, Gorno-Altaysk, Russia

### Summary

The synergic action of the cytostatic drug cyclophosphamide (CP) and fragmented exogenous DNA causes illness and death in mice (Dolgova *et al.*, 2011–2013). The observed «delayed death» effect was most clearly pronounced when the DNA preparation was administered 18 to 30 hours after CP treatment. This time span is designated as «death window».

It was found that injections of exogenous DNA result in sustained increase in bone marrow cell (BMC) apoptosis, which occurs throughout the time of DNA administration (18–30 hours). Exogenous DNA, both allogeneic and belonging to various taxa induces BMCs apoptosis. Plasmid DNA has the greatest effect on apoptosis induction.

The analysis of reduction and restoration of BMC subpopulations as the mice progressed to death revealed a virtually complete loss of the 12–20-mkm fraction of the cell population (about 3–4 % vs. 35–40 % in the control), which corresponds to the maximum leukopenia on day 3 after CP treatment. However, the relative amount of CD34+ hematopoietic stem cells (HSCs) from day 15 and till the end of the observation constituted 1,2–1,4 %, which corresponds to the wild-type range. Comparison of BMC smears from the sternal bone marrow of the CP and CP+DNA groups of mice indicates that the BMC populations isolated from CP+DNA animals lack young committed lymphopoiesis progenitor cells. Moreover, the affected mice had immature blast cell types in their blood, which was never observed in healthy or CP-treated mice.

Pathological and morphological analyses show that starting from posttreatment day 9, mice that received CP+DNA preparations displayed pronounced morphological changes in their lungs, liver, pancreas, central and peripheral immune system organs, and brain. Most of the pathological changes observed are consistent with severe inflammatory response. This suggestion is proven by structural equivalents of functional involution of lymphoid organs, such as thymus, spleen, and lymph nodes.

We speculate that the death of treated animals resulted from multiple organ dysfunctions caused by accidental involution of lymphoid organs and the systemic inflammatory response syndrome, both associated with injections of fragmented exogenous DNA into experimental animals within the «death window», which corresponds to the final step in the repair of the majority of CP-induced double-strand breaks.

**Key words:** cyclophosphamide, exogenous DNA, bone marrow cells, apoptosis, systemic inflammation, accidental involution of lymphoid organs.