

А.М. Гольцев, О.В. Сафранчук, М.О. Бондарович, М.В. Останков

Зміна кріолабільності стовбурових пухлинних клітин залежно від фази росту аденокарциноми Ерліха *in vivo*

*Проведено порівняльне вивчення змін функціональної активності стовбурових пухлинних клітин двох рівнів диференціювання на різних стадіях росту аденокарциноми Ерліха (АКЕ) *in vivo*. Відзначено різний характер зміни функціонального статусу пухлиноіндукуючих попередників після кріовпливу залежно від ступеня їх диференціювання і діб культивування. У відношенні стовбурових попередників “старіючої” культури АКЕ фактори кріоконсервування реалізують “ревіталізуючий” ефект. Отримані результати акцентують увагу на необхідності коректного вибору термінів кріоірадикації злякисних новоутворень у загальних схемах лікування. Ключові слова: стовбурові пухлинні клітини, кріоконсервування, аденокарцинома Ерліха.*

ВСТУП

Практика використання ультранизьких температур для кріодеструкції злякисних новоутворень [4, 17] визначила необхідність інтенсифікації експериментальних робіт для оцінки впливу цього фактора на стовбурові пухлинні клітини – СПК. Останні є головною структурною одиницею ініціації, підтримки росту *in situ*, а також метастазування пухлини при злякисних новоутвореннях мозку, молочної залози, простати, підшлункової залози, гемопоетичної системи тощо [13, 27, 28]. Ці клітини здатні продукувати цитокіни, хемокіни й ангіогенні фактори [22], їм властиві надрегуляторні сигнальні каскади [29]. Хіміо- і радіорезистентність СПК [15, 18] переводить їх у категорію потенційних клітин-мішеней для факторів кріовпливу при ірадикації пухлини. Незважаючи на достатнє число праць з оцінки впливу кріоконсервування на стовбурові кровотворні, нервові та клітини з інших джерел [1–3], існують лише поодинокі відомості про такий вплив на СПК [16]. Основна увага цих досліджень сфокусована на доказах можливості обраних умов кріоконсервування забезпечувати вихідну збе-

реженість якісно-кількісних характеристик таких клітин, що нині активно використовуються в технологіях клітинної терапії раку [7, 30]. Однак у ракурсі розглянутої проблеми кріоірадикації злякисних новоутворень викликає інтерес оцінка стану цих клітин після жорсткого “пресингу” факторів кріоконсервування, тобто без захисту якими-небудь протективними субстанціями. Важливо також знати про характер дії саме таких умов кріовпливу на СПК, що знаходяться на різних етапах росту пухлини *in vivo*.

Показники структурно-функціонального стану СПК мають низку загальних характеристик, незважаючи на те, що вони варіюють у пухлинах різної локалізації та різного його генезу [28]. Як і для стовбурових кровотворних клітин потенціал СПК визначається їхньою унікальною здатністю до самопідтримки та продукції більш диференційованих попередників [20, 24, 27, 28]. СПК експресують широкий спектр фенотипових маркерів, що, власне, і визначають їх структуру [13]. Для СПК солідних пухлин характерними є маркери CD44, CD133, ESA (від англ. epithelial surface antigen), CD24-молекул, що дають змогу

© А.М. Гольцев, О.В. Сафранчук, М.О. Бондарович, М.В. Останков

виявляти їх у загальній популяції [19]. Зокрема, клітини раку товстого кишечника, молочної залози, простати та підшлункової залози експресують CD44-молекулу [13, 25]. Однак тільки клітини з високим рівнем експресії цього маркера, які ідентифікують як CD44^{hi}, мають усі ознаки СПК [12, 19, 23]. Висока туморогенність CD44^{hi}-клітин підтверджується формуванням нової пухлини всього з 10 таких клітин, що в 10–50 разів перевищує туморогенність інших [23].

Пухлиноіндукуючі CD44^{hi}-клітини не експресують молекулу CD24, вони виявляються при подвійному маркуванні разом з попередниками CD44⁺/CD24⁻, що відносяться до наступного ступеня їхнього диференціювання [25]. У цих клітинах визначено високий рівень експресії проінвазивних генів, які також здатні формувати в організмі реципієнтів пухлини, але CD44^{hi} при введенні вже в дозі $1 \cdot 10^2$, а з фенотипом CD44⁺/CD24⁻ – в значно більшій. Найбільш диференційовані клітини з фенотипом CD44⁻/CD24⁺ навіть при уведенні в дозі $1 \cdot 10^4$ не виявляли такої активності [13]. Тобто за цими маркерами можна відтворити лінійний ряд потентності СПК.

Використання технологій фенотипового маркування клітин-попередників різного рівня диференціювання в пухлинному вогнищі дає змогу не тільки ідентифікувати стадії, динаміку розвитку та інвазивність процесу, але і його чутливість до проведеної в тій або іншій формі терапії, включаючи кріовплив. Хоча треба визнати й існування деяких труднощів у цій роботі, зумовлених ізоляцією з клінічного матеріалу мізерної кількості СПК, необхідності стандартизації первинного органно-тканинного субстрату тощо [17]. В експериментальних дослідженнях абсолютно реальне уявлення про характер кріовпливу на СПК може бути отримане при використанні аденокарциноми Ерліха (АКЕ), що являє собою лінію недиференційованих клітин раку молочної залози мишей, що перевивається *in vivo* [11].

Розвиток асцитної форми АКЕ носить стадійний характер, включаючи фази високої та низької проліферативної активності клітин у процесі накопичення в перитонеальній порожнині (ПП) експериментальних тварин [11]. Ці показники залежать від кількості введених клітин, перебування в різному початковому функціональному (проліферативному) статусі, від фази розвитку процесу тощо [11]. Є поодинокі відомості про характер росту загальної популяції АКЕ після кріоконсервування з акцентом уваги на інгібіцію їхнього накопичення в ПП [8]. Однак не описано особливості змін популяційного складу і проліферативної активності СПК в АКЕ після кріовпливу, залежності цих характеристик від фази розвитку АКЕ.

Мета нашої роботи – ідентифікація СПК в АКЕ в динаміці її розвитку *in vivo* і оцінка характеру змін їхніх структурно-функціональних показників після кріоконсервування.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на клітинах АКЕ, отриманих на 7-му і 14-ту добу (АКЕ-7, АКЕ-14), які вирощували *in vivo*. Як первинну культуру в експеримент було взято кріоконсервовані клітини АКЕ-7 (кАКЕ-7), що зберігалися в низькотемпературному банку Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, при -196 °С. Кріоконсервовані клітини АКЕ “стабілізували” трикратним перевиванням *in vivo* протягом 7 діб, після чого вони набували структурно-функціональних ознак нативних АКЕ-7 (нАКЕ-7). Далі клітини АКЕ знову вирощували протягом 7 і 14 діб, проводячи атестацію їхнього морфофункціонального стану до і після кріоконсервування на 7-му та 14-ту добу вирощування.

Вирощування клітин АКЕ в системі *in vivo*. Клітини вводили внутрішньоочеревинно в дозі $3 \cdot 10^6$ /мишу об’ємом 0,3 мл

і культивували в ПП 7-місячних самиць лінії VALB/c, що утримуються в стандартних умовах віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків). Вихідна суспензія клітин в асцитичній рідині була доведена до необхідної концентрації фізіологічним розчином (“Черкаси-фарма”, Україна”). Асцит із ПП одержували шприцем через голку № 10, попередньо вводячи мишей у легкий ефірний наркоз. Для оцінки абсолютної кількості клітин у ПП визначали об’єм накопиченої в ній асцитичної рідини (мілілітри) з урахуванням концентрації ядровмісних клітин у суспензії АКЕ, що підраховували в камері Горяєва [6].

Проведені роботи не суперечать загальним принципам експериментів на тваринах, що схвалені Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) та положенням “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, використовуваних для експериментальних і інших наукових цілей” (Страсбург, 1986).

Кріоконсервування суспензії клітин АКЕ. Процедуру здійснювали в пластикових ампулах (“Nunc”, США), без застосування класичних кріопротекторів в асцитичній рідині в концентрації $1 \cdot 10^7$ клітин/мл об’ємом 1,8 мл на заморозувачі УОП-06, виробництва СКТБ з ОВ Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Умови кріоконсервування були такими: швидкість охолодження $1^\circ\text{C}/\text{хв}$ до -80°C , від -80°C до -196°C зі швидкістю $300\text{--}400^\circ\text{C}/\text{хв}$. Зразки відігрівали на водяній бані при $40\text{--}41^\circ\text{C}$ протягом $45\text{--}50$ с, при постійному шутелюванні ампул до зникнення твердої фази [9].

Оцінка життєздатності клітин АКЕ. Життєздатність клітин АКЕ оцінювали до та після кріоконсервування за допомогою методу суправітального фарбування йодидом пропідіуму. Процедуру здійснювали додаванням до 100 мкл ($1 \cdot 10^7$ клітин/мл) досліджуваної суспензії клітин 5 мкл йодиду

пропідіуму (10 мг/моль), перемішували й інкубували в темряві протягом 30 хв при кімнатній температурі, після чого додавали 400 мкл фізіологічного розчину. З подальшою оцінкою результатів на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (“Becton Dickinson”, США).

Оцінка імунофенотипових характеристик клітин АКЕ. У роботі були використані моноклональні антитіла (“BD Pharmingen”, США) до CD44 (кон’юговані з FITC (від англ. Fluorescein isothiocyanate; за каталогом № 553133, клон IM7)), а також CD24 (кон’юговані з PE (від англ. Phycoerythrin; за каталогом № 553262, клон M1/69)). За допомогою цих моноклональних антитіл були ідентифіковані клітини з фенотипом CD44^{hi}, що являють собою субпопуляцію недиференційованих, а також просунутих у диференціюванні – CD44⁺/CD24⁻ СПК [24, 26]. Імуноглобуліни тих самих ізотипів (за каталогом № 553988, клон A95-1 і № 553989, клон A95-1; “BD Pharmingen”, США) були використані як контроль. Визначення концентрації досліджуваних субпопуляцій клітин у зразках АКЕ здійснювали на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (“Becton Dickinson”, США). CD44^{hi}-клітини входять до складу CD44⁺/CD24⁻-популяції і характеризуються найбільшою флуорисценцією за логарифмічною шкалою з інтенсивністю сигналу 10^4 .

Для мінімізації помилок у пробах аналізували 10000 подій. Облік і аналіз результатів здійснювали за допомогою програми WinMDI 2.9.

Оцінка функціонального стану (проліферативного статусу) клітин АКЕ. При оцінці проліферативного потенціалу загальної популяції АКЕ, а також реплікативної активності різного рівня диференціювання СПК обчислювали час подвоєння кількості цих клітин (від англ. Time doubling – Td) за формулою $Td = T / \log N_f \cdot \log N_0$. 3,3219, де T – час культивування клітин (години), 3,3219 – коефіцієнт переведення log в ln, N

– кількість клітин, кінцева (f) і початкова (0), кратність збільшення абсолютного їхнього числа за 0–7-му та 7–14-ту добу вирощування й абсолютну кратність збільшення за весь період росту (0–14-та доба) у ПП у вигляді умовних коефіцієнтів. Такий підрахунок був проведений в чотирьох групах тварин: 1-ша група, яким вводили нативні АКЕ-7 (нАКЕ-7); 2-га – кріоконсервовані АКЕ-7 (кАКЕ-7); 3-тя – нативні АКЕ-14 (нАКЕ-14); 4-та – кріоконсервовані АКЕ-14 (кАКЕ-14).

Отримані результати статистично обробляли за методом Стьюдента в модифікації Фішера з застосуванням комп'ютерної програми MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У технологіях підтримки росту клітин АКЕ в системі *in vivo* як “первинну” культуру, зазвичай, використовують клітини, отримані на 7-му добу їхнього культивування (АКЕ-7) [8]. Стадія експонентного росту пухлини (0–7-ма доба) характеризується максимальним темпом накопичення клітин у ПП, тоді як для наступної стаціонарної стадії (7–14-та доба) характерний баланс процесів проліферації та загибелі клітин [5, 11]. Така феноменологія поведінки загальної популяції клітин у ПП на кожному з етапів зумовлена проявом функціонального (проліферативного) статусу пухлиноіндукуючих клітин-попередників [21]. Як видно з табл. 1, у загальній популяції АКЕ-7 концентрація клітин-попередників, експресуючих у високому ступені мембранний маркер CD44 (CD44^{hi} СПК) становила близько 0,4 %, а більш диференційованих CD44⁺24⁻ – близько 5 %.

Протягом перших 7 діб вирощування Td нАКЕ-7 був відносно коротким (23 год), зумовлюючи більш ніж 150-кратне збільшення загальної кількості клітин у ПП без зміни концентрації обох субпопуляцій СПК.

У фазі стаціонарного росту (7–14-та доба) проліферативна активність загальної

популяції і CD44⁺24⁻ СПК істотно знижувалася, а CD44^{hi} цілком припинялася (див. табл. 1). Важливим є те, що при ретрансплантації в ПП нативних АКЕ-14 (нАКЕ-14) які, на думку деяких дослідників, є “старіючою” формою АКЕ [5, 10], функціональна активність усіх форм оцінених клітин істотно підвищувалася, хоча за перші 7 діб росту все-таки поступалася нАКЕ-7. Цей факт говорить про збереження їхнього потенціалу росту та виходу насамперед CD44^{hi} СПК із функціонального “спокою”, що, вочевидь, зумовлено до 14-ї доби інгібувальним впливом умов їхнього мікрооточення [21]. Такого роду модифікації стану клітин АКЕ в міру пролонгації їхніх термінів культивування по-різному змінювали їхню чутливість до факторів кріоконсервування.

З рисунка видно, що після кріовпливу кількість ядерних клітин у кАКЕ-7 і кАКЕ-14 істотно не мінялася, а їх життєздатність знижувалася приблизно однаково. Що ж стосується проліферативного потенціалу, то кАКЕ-7 формували до 7-ї доби в ПП у 4,5 раза менше загального пулу клітин, ніж нАКЕ-7. Дійсно, Td загального числа клітин у перші 7 діб культивування збільшувався з 23 год у нАКЕ-7 до 32 год в кАКЕ-7 (табл. 2). Однак у наступні 7 діб росту, Td кАКЕ-7 підвищувався і вже удвічі був вищим, ніж у нАКЕ-7.

Не був “байдужим” кріовплив і до наявних у АКЕ субпопуляцій СПК. По-перше, після кріоконсервування концентрація в АКЕ-7 CD44^{hi} у 3,5 раза знижувалася, тоді як CD44⁺24⁻ у 1,5 раза підвищувалася порівняно з нАКЕ-7 (див. табл. 2). Проте у перші 7 діб у кАКЕ-7 спостерігалось зниження Td CD44⁺24⁻ і, тим більше, CD44^{hi}-клітин порівняно з нАКЕ-7, причому більш виражене, ніж зниження Td загальної популяції АКЕ. Однак у наступні 7 діб росту функціональний потенціал кріоконсервованих СПК істотно перевищував нативні, причому посилення потенціалу

Таблиця 1. Структурно-функціональні характеристики нативних клітин аденокарциноми Ерліха (наАКЕ), (M±m, n=5)

Схема досліджу	Вихідні значення		7-ма доба				14-га доба					
	Абсолютна кількість	%	Кількість клітин у перитонеальній порожнині		Кратність збільшення кількості клітин	Час подвоєння кількості клітин	Кількість клітин у перитонеальній порожнині		Кратність збільшення кількості клітин	Час подвоєння кількості клітин		
			Абсолютна кількість	%			Абсолютна кількість	%				
наКЕ-7												
загальна популяція	$3,3 \cdot 10^6$	-	$5,2 \pm 0,36 \cdot 10^8$	-	$157,0 \pm 10,99$	$2,1 \pm 0,14$	$1,15 \pm 0,08 \cdot 10^9$	-	$2,1 \pm 0,14$	$152,0 \pm 10,64$		
CD44 ⁺ /24 ⁻	$1,6 \pm 0,11 \cdot 10^5$	$4,80 \pm 0,33$	$2,2 \pm 0,15 \cdot 10^7$	$4,2 \pm 0,29$	$137,0 \pm 9,59$	$2,4 \pm 0,16$	$2,8 \pm 0,19 \cdot 10^7$	$2,47 \pm 0,17$	$1,3 \pm 0,09$	$258,0 \pm 18,06$		
CD44 ^{hi}	$1,26 \pm 0,08 \cdot 10^4$	$0,38 \pm 0,02$	$1,7 \pm 0,11 \cdot 10^6$	$0,32 \pm 0,02$	$135,0 \pm 9,45$	$2,5 \pm 0,17$	$1,7 \pm 0,11 \cdot 10^6$	$0,15 \pm 0,01$	-	-		
наКЕ-14												
загальна популяція	$3,3 \cdot 10^6$	-	$2,1 \pm 0,14 \cdot 10^8$	-	$63,0 \pm 4,41$	$5,3 \pm 0,37$	$5,3 \pm 0,37 \cdot 10^8$	-	$2,5 \pm 0,17$	$134,0 \pm 9,38$		
CD44 ⁺ /24 ⁻	$9 \pm 0,63 \cdot 10^4$	$2,68 \pm 0,18$	$3,3 \pm 0,23 \cdot 10^6$	$1,64 \pm 0,11$	$36,0 \pm 2,52$	$9,0 \pm 0,63$	$9,8 \pm 0,68 \cdot 10^6$	$1,85 \pm 0,12$	$2,9 \pm 0,21$	$116,0 \pm 8,12$		
CD44 ^{hi}	$3,6 \pm 0,25 \cdot 10^3$	$0,11 \pm 0,007$	$6,3 \pm 0,44 \cdot 10^4$	$0,03 \pm 0,002$	$17,5 \pm 1,22$	$19,2 \pm 1,34$	$1,6 \pm 0,11 \cdot 10^5$	$0,03 \pm 0,002$	$2,5 \pm 0,17$	$134,0 \pm 9,38$		

Таблиця 2. Структурно-функціональні характеристики кріоконсервованих клітин аденокарциноми Ерліха (каКЕ), (M±m, n=5)

Схема досліджу	Вихідні значення		7-ма доба				14-га доба					
	Абсолютна кількість	%	Кількість клітин у перитонеальній порожнині		Кратність збільшення кількості клітин	Час подвоєння кількості клітин	Кількість клітин у перитонеальній порожнині		Кратність збільшення кількості клітин	Час подвоєння кількості клітин		
			Абсолютна кількість	%			Абсолютна кількість	%				
наКЕ-7												
загальна популяція	$3,3 \cdot 10^6$	-	$1,2 \pm 0,08 \cdot 10^8$	-	$36,0 \pm 2,52$	$9,3 \pm 0,65$	$5,0 \pm 0,35 \cdot 10^8$	-	$4,2 \pm 0,29$	$80,0 \pm 5,6$		
CD44 ⁺ /24 ⁻	$2,5 \pm 0,17 \cdot 10^5$	$7,41 \pm 0,51$	$6,0 \pm 0,42 \cdot 10^6$	$5,02 \pm 0,35$	$24,0 \pm 1,68$	$14,0 \pm 0,98$	$1,7 \pm 0,11 \cdot 10^7$	$3,41 \pm 0,23$	$2,8 \pm 0,19$	$120,0 \pm 8,4$		
CD44 ^{hi}	$3,6 \pm 0,25 \cdot 10^3$	$0,11 \pm 0,007$	$3,6 \pm 0,25 \cdot 10^4$	$0,03 \pm 0,002$	$10,0 \pm 0,70$	$34,0 \pm 2,38$	$3,5 \pm 0,24 \cdot 10^5$	$0,07 \pm 0,008$	$9,7 \pm 0,67$	$34,6 \pm 2,42$		
каКЕ-14												
загальна популяція	$3,3 \cdot 10^6$	-	$2,9 \pm 0,21 \cdot 10^7$	-	$8,8 \pm 0,61$	$38,2 \pm 2,67$	$8,74 \pm 0,61 \cdot 10^8$	-	$30,0 \pm 2,10$	$11,2 \pm 0,78$		
CD44 ⁺ /24 ⁻	$5,8 \pm 0,41 \cdot 10^5$	$17,50 \pm 1,25$	$7,1 \pm 0,49 \cdot 10^6$	$24,57 \pm 1,71$	$12,2 \pm 0,85$	$27,5 \pm 1,92$	$4,89 \pm 0,34 \cdot 10^7$	$5,56 \pm 0,38$	$6,9 \pm 0,48$	$48,7 \pm 3,40$		
CD44 ^{hi}	$1,67 \pm 0,12 \cdot 10^3$	$0,05 \pm 0,003$	$3,2 \pm 0,22 \cdot 10^4$	$0,11 \pm 0,007$	$19,0 \pm 1,33$	$18,0 \pm 1,26$	$1,8 \pm 0,12 \cdot 10^5$	$0,03 \pm 0,002$	$8,0 \pm 0,56$	$42,0 \pm 2,94$		

самопідтримки СПК знову відрізнялося від загальної популяції клітин.

Значимість вихідного стану клітин АКЕ у дослідженні їх кріочутливості підтверджують також результати оцінки статусу “старіючої” культури АКЕ-14. Як видно з табл. 2, у кАКЕ-14 ще більше, ніж у кАКЕ-7 знижувався вміст CD44^{hi} і ще істотніше підвищувався вміст CD44^{+/24}-клітин. Тобто кріовплив з тією самою спрямованістю, але в більш вираженій формі змінював субпопуляційний склад СПК в АКЕ-14.

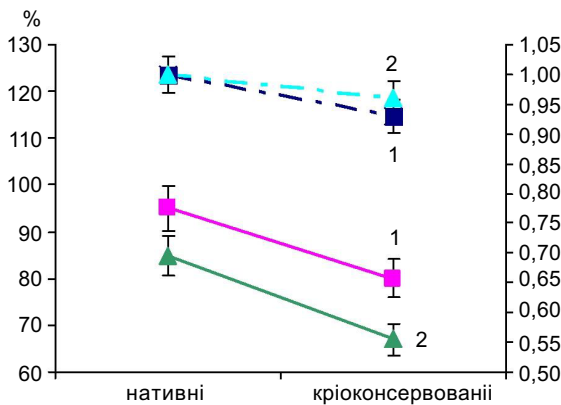
Проліферативний потенціал кАКЕ-14, із зазначеними фенотиповими характеристиками СПК, судячи з кратності збільшення загального числа клітин у ПП, був у перші 7 діб інгібований сильніше, ніж кАКЕ-7 (див. табл. 2). Це цілком логічно з огляду на те, що кріоконсервування модифікує контроль проліферації клітин за участі окисного та гліколітичного фосфорилування, у яких при старінні клітин спостерігаються зміни їхньої інтенсивності та налагодженості [8, 10]. Однак на наступному тижні Td кАКЕ-14 більш ніж у 4 рази перевершував такий у нАКЕ-14 і був навіть удвічі вищим порівняно з кАКЕ-7. Кратність збільшення загального числа клітин кАКЕ-14 у цей період наближалася до нАКЕ-7 у період 0–7-ї доби, характеризуючи саме цей етап як фазу експонен-

ційного росту кАКЕ-14.

Потенціал самопідтримки СПК із фенотипом CD44^{hi} у кАКЕ-14 на першому тижні був у 1,5 раза нижчим, ніж у кАКЕ-7. А на наступному етапі росту, цей показник у CD44^{hi}-клітин був таким, як у кАКЕ-7 і удвічі перевершував нАКЕ-14. Іншими словами, кріоконсервування виявляло “ревіталізуючий” ефект відносно CD44^{hi}-клітин в АКЕ-14.

У порівняльному аспекті важливо також відзначити, що для АКЕ-7 виразність кріосупресії у відношенні їх функціонального статусу на початкових етапах росту зростала від більш диференційованих попередників, що формують загальний пул клітин у ПП, до високопотентних CD44^{hi}. Навпаки, у “старіючих” АКЕ-14, такий ефект знижувався від більш до менш диференційованих клітин, викликаючи в останніх (CD44^{hi}) навіть стимуляцію росту. Більше того, мінімальна проліферативна активність клітин загальної популяції кАКЕ-14 на першому тижні, змінювалася на наступному етапі максимальною її виразністю з усіх видів клітин АКЕ обох термінів культивування. Ці результати ще раз підкреслюють значимість кріолабільності (кріостабільності) біооб’єкта не тільки умов кріоконсервування, але і вихідного його стану [2, 3, 14]. Для клітин АКЕ, як видно, таким є термін культивування і рівень їх диференціювання. Крім розходжень, для кАКЕ-7 і кАКЕ-14 мали деякі і загальні ознаки їхнього функціонування. Так, субпопуляційні клітини, що були найбільше інгібовані кріоконсервуванням у своїй активності на першому етапі росту, максимально виявляли її на наступному.

Істотний внесок у розуміння характеру впливу кріоконсервування на клітини АКЕ зробили результати оцінки їхнього інтегрального функціонального потенціалу за весь період росту (табл. 3). Для нАКЕ-7, наприклад, максимальною була кратність збільшення загальної кількості клітин у ПП,



Зміни кількості ядровмісних і життєздатних клітин в аденокарциномі Ерліха, отриманих на 7-му (1) і 14-ту (2) добу та після кріоконсервування; зверху – ядровмісні, знизу – життєздатні клітини

Таблиця 3. Абсолютна кратність зміни вмісту клітин від 0 до 14-ї доби (M±m, n=5)

Схема дослідження	АКЕ-7		АКЕ-14		Вплив кріоконсервування (коефіцієнт зміни)		Вплив кріоконсервування (коефіцієнт зміни)	
	нативні	кріоконсервовані	нативні	кріоконсервовані	інгібіція	стимуляція	інгібіція	стимуляція
Загальна популяція	329,7±23,07	151±10,57 ²	157,5±11,02 ¹	264±18,48 ^{3,4,5}	2,18±0,15	-	-	1,68±0,11
CD44 ⁺ /24 ⁻	178±12,46	67±4,69 ²	104,4±7,30 ¹	85±5,95 ^{3,4,5}	2,66±0,18	-	1,23±0,08	-
CD44 ^{hi}	135±9,45	97±6,79 ²	43,7±3,05 ¹	160±11,2 ^{3,4,5}	1,39±0,09	-	-	3,66±0,25

*P<0,01 порівняно з групою нативних АКЕ-7.

мінімальною – CD44^{hi} СПК. Для “старіючих” нАКЕ-14 зберігалася та сама закономірність, але з меншою в 2–3 рази виразністю. Після кріоконсервування проліферативний потенціал усіх видів попередників як в АКЕ-7, так і АКЕ-14 значно змінювався. Однак спрямованість цих змін була неоднаковою в різних “вікових” групах АКЕ. Для АКЕ-7 характерною була інгібіція факторами кріоконсервування функцій усіх видів попередників з максимальною супресією CD44⁺/24-субпопуляції. Стан клітин “старіючої” популяції АКЕ-14 непередбачувано змінювався після кріоконсервування. Тільки в клітинах CD44⁺/24 кріоконсервування інгібувало потенціал самопідтримки. По загальній популяції клітин у ПП і CD44^{hi} СПК був отриманий виражений стимулювальний ефект кріоконсервування, причому не тільки порівняно з нАКЕ-14. Так, кратність збільшення загальної популяції клітин майже в 2 рази перевищувала цей показник кАКЕ-7, а найбільш канцерогенних CD44^{hi} СПК навіть у нАКЕ-7.

Таким чином, на підставі результатів виконаних досліджень можна зробити такі висновки: у гетерогенній популяції АКЕ є клітини з ознаками СПК різного рівня диференціювання, а саме з фенотипом CD44^{hi} і CD44⁺/24⁻. СПК із зазначеним фенотипом мають потенціал самопідтримки та формування клітин наступних рівнів диференціювання. У процесі заморожування–відтавання фактори кріоконсервування по-різному змінюють функціональний статус зазначених пухлиноіндукуючих попередників АКЕ на різних етапах розвитку пухлинного процесу *in vivo*. Інгібуючі всі зазначені субпопуляції клітин у кАКЕ-7 у “старіючих” (принаймні у межах 14-ї доби) АКЕ-14, відбувається селективний добір тих стовбурових попередників, відносно яких кріовплив виявляв “ревіталізуючий” ефект. Навіть залишаючись у нАКЕ-14 у меншій, ніж у нАКЕ-7 концентрації, після кріоконсервування вони мають

більш високий, ніж у НАКЕ-7 і тим більше в КАКЕ-7 потенціал самопідтримки. Отримані нами результати вносять значне доповнення у розуміння загальнобіологічних характеристик СПК, розшифровку механізмів їхньої відповіді на дію екстремальних факторів кріоконсервування, які здатні перевести нечисленну клітинну популяцію СПК у новий функціональний статус.

Представлені результати є досить важливими для практичної медицини і можуть бути використані для оптимізації методів кріоабляції злоякісних новоутворень, повному їх інтегрувати в комплексне лікування такого роду патологій і краще орієнтуватися у виборі часу проведення кріоманіпуляцій.

**А.Н.Гольцев, О.В.Сафранчук,
М.О.Бондарович, М.В.Останков**

ИЗМЕНЕНИЕ КРИОЛАБИЛЬНОСТИ СТВОЛОВЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФАЗЫ РОСТА АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА IN VIVO

Проведено сравнительное изучение изменений функциональной активности двух уровней дифференцировки стволовых опухолевых клеток различных сроков культивирования аденокарциномы Эрлиха АКЭ. Отмечен различный характер изменения функционального статуса опухолюиндуцирующих предшественников в зависимости от степени их дифференцировки и суток культивирования. В отношении стволовых предшественников “старееющей” культуры АКЭ факторы кріоконсервирования реализуют “ревитализирующий” эффект. Полученные данные акцентируют внимание на необходимости корректного выбора сроков кріоиррадиации злокачественных новообразований в общих схемах их лечения.

Ключевые слова: стволовые опухолевые клетки, кріоконсервирование, аденокарцинома Эрлиха.

**Goltsev A.N., Safranchuk O.V., Bondarovich
N.A., Ostankov M.V.**

CHANGE IN CRYOLABILITY OF CANCER STEM CELLS DURING IN VIVO CULTURE OF ERLICH ADENOCARCINOMA

Cancer stem cells (CSC) are the main structural unit in initiation, support of in situ growth, as well as tumor metastasis during malignant development of various origin. Observed

chemo- and radio-resistance of CSC make them a potential target cell to perform cryoeradication. We have performed a comparative study of changes in functional activity after cryopreservation of CSC of two differentiation levels from Erlich adenocarcinoma (EAC) of various culture terms (EAC-7, EAC-14). It was found that in the case of EAC-7 the expression of cryosuppression in terms of cell functional state at the initial stages of development was bigger in high potency CD44^{hi} cells comparing to more differentiated cells, forming general pool of cells in peritoneal cavity. And *vice versa*, in the “eldering” EAC-14 this effect was bigger in more differentiated cells comparing to less differentiated ones, even causing in latter (CD44^{hi}) the growth stimulation. Moreover, the minimal proliferative activity of general population cells cEAC-14 during the first weeks was alternated at the next stage to its maximal expression among all the studied types of EAC cells of both culture terms. These data confirm again the fact, that during assessment of bioobject cryolability (cryostability) it is significant to determine not only cryopreservation conditions, but the initial state of the bioobject as well.

Key words: cancer stem cells, cryopreservation, Erlich adenocarcinoma.

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of
the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Бабенко Н.Н., Останкова Л.В., Мацевитая И.Ю., Шатнева О.М. Модификация структурно-функциональной организации стволовых кроветворных клеток костного мозга после действия факторов низкотемпературного консервирования // Пробл. кріобиологии. – 2005. – 15, № 3. – С. 362–366.
2. Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Останкова Л.В., Дубрава Т.Г., Опанасенко Е.В. Мембранные структуры, определяющие фенотипические характеристики и функциональное состояние кроветворных клеток; возможная их модификация под действием факторов кріоконсервирования. Часть I // Там же. – 1995. – 5, № 3. – С. 19–30.
3. Гольцев А.Н. Дубрава Т.Г., Останкова Л.В. Особенности влияния кріоконсервирования на функциональный потенциал стволовых кроветворных клеток фетальной печени разных сроков гестации // Там же. – 2009. – 19, №2. – С. 186 – 199.
4. Євтушенко О.І. Саган Д.Л., Кузьменко О.П. Кріохірургічне лікування хворих на рак ободової кишки. – К.: Вістка, 2008. – С.20.
5. Казьмин С.Д. Об изменениях в структуре популяций клеток опухоли Эрлиха // Вопр. онкологии. – 1978. – 24, №10. – С.32–37.
6. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / Под ред. В.В.Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.

7. Новик А.В., Моисеенко В.М. Теоретические предпосылки адьювантной терапии злокачественных опухолей // *Практ. онкология*. – 2007. – **8**, № 3. – С. 109–117.
8. Федец О.И. Биоэнергетика и пролиферативная активность криоконсервированных клеток аденокарциномы Эрлиха: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1987 – 36 с.
9. Цуцаева А.А., Аграненко В.А., Федорова Л.И. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под.ред. А.А. Цуцаевой. – К.: Наук. думка, 1983. – 240 с.
10. Шапот В.С. Биохимические аспекты опухолевого роста. – М.: Медицина, 1975. – 304 с.
11. Эммануэль Н.М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. – М.: Наука, 1977. – 419 с.
12. Abraham B.K., Fritz P., McClellan M., Hauptvogel P., Athellogou M., Brauch H. Prevalence of CD44⁺/CD24^{-low} cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – **11**, №3. – P.1154–1159.
13. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – **100**, №7. – P. 3983–3989.
14. Anderson E.M., Jones D.R.E., Liu D.T.Y., Evans A.A. Gestation age and cell viability determine the effect of frozen storage on human fetal hematopoietic progenitor cell preparations // *Fetal Diagn. Ther.* – 1996. – **11**, №6. – P. 427–432.
15. 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. – P. 756–760.
16. Chong Y.K., Toh T.B., Zaiden N., Poonepalli A., Leong S.H., Ong C.E., Yu Y., Tan P.B., See S.J., Ng W.H., Ng I., Hande M.P., Kon O.L., Ang B.T., Tang C. Cryopreservation of neurospheres derived from human glioblastoma multiforme // *Stem Cells.* – 2009. – **27**, № 1. – P. 29–39.
17. Clark D.M., Robilotto A.T., VanBuskirk R.G., Baust J.G., Gage A.A., Baust J.M. Targeted induction of apoptosis via TRAIL and cryoablation: a novel strategy for the treatment of prostate cancer // *Prostate Cancer Prostatic Dis.* – 2007. – **10**, № 2. – P. 175–184.
18. Eramo A., Ricci-Vitiani L., Zeuner A., Pallini R., Lotti F., Sette G., Pilozzi E., Larocca L.M., Peschle C., De Maria R. Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells // *Cell Death Differ.* – 2006. – **13**, №7. – P. 1238–1241.
19. Fillmore C., Kuperwasser C. Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man? // *Breast Cancer Res.* – 2007. – **9**, №3. – P.303–306.
20. Goltsev A.N., Babenko N.N., Dubrava T.G. Ostankov M.V., Shatneva O.M. Modification of the state of bone marrow hematopoietic cells after cryopreservation // *Intern. J. Refrigeration.* – 2006. – **29**, №3. – P. 358–367.
21. Goltsev A.N., Safranchuk O.V., Bondarovich N.A. Peculiarities of effect of cryopreservation factors on morphofunctional organization of Ehrlich adenocarcinoma at different developmental stages // Possible directions for low temperature biology in the next five years: The 2008 Meeting and AGM, Copenhagen, 11-12 Sept. 2008. – C., 2008. – P.41.
22. Hattori Y., Kato H., Nitta M., Takamoto S. Decrease of L-selectin expression on human CD34-cells on freezing-thawing and rapid recovery with short-term incubation // *Exp. Hematol.* – 2001. – **29**, №1 – P. 114–122.
23. Hermann P.C., Huber S.L., Herrler T., Aicher A., Ellwart J.W., Guba M., Bruns C.J., Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer // *Cell Stem Cell* – 2007. – **1**, №3 – P. 313–323.
24. Liu S., Dontu G., Wicha M.S. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis // *Breast Cancer Res.* – 2005. – **7**, №3. – P.86–95.
25. Nakshatri H. Radiation resistance in breast cancer: are CD44⁺/CD24⁻ proteosome^{low}/PKH26⁺ cells to blame? // *Ibid.* – 2010. – **12**. – № 2. – P. 105.
26. O'Brien C.A., Pollet A., Gallinger S., Dick J.E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice // *Nature.* – 2007. – **445**, №7123. – P.106–110.
27. Prall F., Maletzki C., Linnebacher M. The EpCAM^{high}/CD44^{high} colorectal carcinoma stem cell phenotype is not preferentially expressed in tumor buds // *Histopathology.* – 2010. – **56**. – № 4. – P.553–555.
28. Prince ME., Sivanadan R., Kaczorowski A., Wolf G.T., Kaplan M.J., Dalerba P., Weissman I.L., Clarke M.F., Ailles L.E. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – **104**, №3 – P. 973–978.
29. Sheridan C., Kishimoto H., Fuchs R.K., Mehrotra S., Bhat-Nakshatri P., Turner C.H., Goulet R., Badve S., Nakshatri H. CD44⁺/CD24⁻ breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis // *Breast Cancer Res.* – 2006. – **8**, №5. – P.R59.
30. Zhang M., Rosen J.M. Stem cells in the etiology and treatment of cancer // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2006. – **16**, №1 – P. 60–64.