

УДК 616-006:612.017.1:57.086.13

А.Н. Гольцев<sup>1\*</sup>, Н.А. Бондарович<sup>1</sup>, Т.Г. Дубрава<sup>1</sup>,  
Н.Н. Бабенко<sup>1</sup>, Ю.А. Гаевская<sup>1</sup>, М.В. Останков<sup>1</sup>, И.А. Буряк<sup>2</sup>

## Иммунологические особенности криоабляции при комплексном лечении онкологических заболеваний

UDC 616-006:612.017.1:57.086.13

A.M. Goltsev<sup>1\*</sup>, M.O. Bondarovich<sup>1</sup>, T.G. Dubrava<sup>1</sup>,  
N.M. Babenko<sup>1</sup>, Yu.O. Gaevska<sup>1</sup>, M.V. Ostankov<sup>1</sup>, I.A. Buriak<sup>2</sup>

## Immunological Traits of Cryoablation in Combination Therapy of Cancer

**Реферат:** Криоабляция является методом выбора при лечении солидных опухолей разной локализации. Помимо деструкции патологической ткани, криоабляция вызывает комплексные изменения в иммунной системе. В работе кратко рассматриваются механизмы развития абскопального эффекта после криохирургии опухолей, а также сопровождающие его возможные изменения в иммунной системе. Абскопальный эффект достигается за счет высвобождения антигенов из разрушенных клеток, которые запускают каскад иммунных реакций. В настоящей статье обобщены результаты сочетанного применения криоабляции и иммунотерапевтических методов, в частности адоптивной терапии. Введение дендритных клеток в сочетании с проведением криоабляции позволяет существенно усилить противоопухолевый иммунитет и снизить риск возникновения рецидива.

**Ключевые слова:** криоабляция, раковые стволовые клетки, иммунная система, антиген, дендритные клетки.

**Реферат:** Криоабляція є методом вибору при лікуванні солідних пухлин різної локалізації. Крім деструкції патологічної тканини, криоабляція викликає комплексні зміни в імунній системі. У роботі коротко розглядаються механізми розвитку абскопального ефекту після криохірургії пухлин та можливі зміни в імунній системі, які його супроводжують. Абскопальний ефект досягається за рахунок вивільнення антигенів із зруйнованих клітин, які запускають каскад імунних реакцій. У цій статті узагальнено результати поєднаного застосування криоабляції та імунотерапевтичних методів, зокрема адоптивної терапії. Введення дендритних клітин у поєднанні з проведенням криоабляції дозволяє істотно посилити протипухлинний імунітет та знизити ризик виникнення рецидиву.

**Ключові слова:** криоабляція, ракові стовбурові клітини, імунна система, антиген, дендритні клітини.

**Abstract:** Cryoablation is a method of choice in treatment of solid tumors of different localization. In addition to the destruction of pathological tissue, the cryoablation causes to complex changes in the immune system. This paper briefly discusses the implementation of the abscopic effect after cryosurgery of tumors, as well as possible changes in the immune system that accompany it. The abscopic effect is achieved with a release of antigens from the destroyed cells, which trigger a cascade of immune reactions. This article summarizes the results of the combined use of cryoablation and immunotherapeutic methods, in particular adoptive therapy. The introduction of dendritic cells in combination with cryoablation can significantly enhance antitumor immunity and reduces the risk of relapse.

**Key words:** cryoablation, cancer stem cells, immune system, antigen, dendritic cells.

В последнее время криоабляция широко применяется в клинической практике в качестве альтернативного метода лечения различных видов онкологических заболеваний. Основными задачами криоабляции являются деструкция опухолевой ткани, инактивация опухоль-индуцирующих раковых стволовых клеток (РСК) и блокирование их миграции (метастазирования) из первичного опухолевого очага [1]. К основным факторам, детерминирующим успех криоабляции, относятся скорость охлаждения ткани; минимальная температура в фокальной (центральной) части опухоли

Recently, cryoablation is widely used in clinical practice as an alternative method of treating various types of cancer. The main tasks of cryoablation are the destruction of tumor tissue, inactivation of tumor-inducing cancer stem cells (CSCs) and the blocking of their migration (metastasis) from the primary tumor focus [1]. The main factors determining the success of cryoablation include tissue cooling rate; minimal temperature in the focal (central) part of the tumor; heating rate; exposure time and the number of freeze-warm-up cycles [7]. It is crucial that in the central zone of cryoab-

<sup>1</sup>Відділ кріопатофізіології та імунології,

<sup>2</sup>Відділ кріомікробіології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

<sup>1</sup>Department of Cryopathophysiology and Immunology,

<sup>2</sup>Department of Cryomicrobiology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: cryopato@gmail.com

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: cryopato@gmail.com

Надійшла 20.10.2019

Прийнята до друку 14.11.2019

Received October, 20, 2019

Accepted November, 14, 2019

© 2019 A.N. Goltsev, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

левого очага; скорость отогрева; время экспозиции и число циклов замораживания-отогрева [8]. Существенно, что в центральной зоне криоабляции при температуре ниже  $-50^{\circ}\text{C}$  реализуются механизмы, которые обуславливают повреждение и гибель опухолевых клеток путем некроза, тогда как в периферической зоне при температуре выше  $-50^{\circ}\text{C}$  гибель клеток происходит преимущественно в результате апоптотических процессов [19].

Принципиально, что противоопухолевый эффект криоабляции сфокусирован не только на клетках первичной опухоли. В 1970-х годах была достигнута ремиссия метастазов после криоабляции рака предстательной железы [23]. Этот эффект был назван абскопальным (тормозящим или эффектом «свидетеля»), его реализация ассоциировалась с клетками иммунной системы (ИС). Возможным механизмом абскопального эффекта авторы считали выход после криодеструкции в кровотока опухолевых антигенов (АГ) первичного очага, в ответ на которые формировались антитела, взаимодействующие с АГ метастатических узлов. С позиций современного представления о структурно-функциональной организации опухолевой ткани логично предположить, что к таким АГ относятся и АГ РСК после действия ультранизких температур. Это обстоятельство подтверждено результатами наших работ [10–12], которые свидетельствуют об изменении структурных и функциональных особенностей РСК. При этом установлено, что их характер определяется режимом замораживания-отогрева, а также размерами опухоли [2].

Одним из механизмов реализации абскопального эффекта может быть так называемый «эпитопный спридинг», возникающий в результате криомодификации опухолевых протеинов и повышения иммуногенности опухолевой ткани в целом [13]. В этом аспекте привлекательным может быть приобретение иммуногенности «чек-пойнтами», которые экспрессируются на опухолевых клетках и препятствуют развитию иммунных реакций на опухолевые АГ [16]. Криоденатурация, предположительно, приводит и к образованию конгломератов растворимых опухолевых АГ, что, в свою очередь, способствует стимуляции их поглощения и презентации макрофагами. В ответ на криовоздействие повышается уровень белков теплового шока, способных проявлять свойства адьюванта [26]. Интересна такая концепция относительно возможности экспрессии на поверхности оставшихся после криоабляции РСК рецепторов Natural killer group 2D (NKG2D) в условиях низкотемпературного стресса, что повышает вероятность их элиминации клетками ИС [18]. После крио-

lation at temperatures below  $-50^{\circ}\text{C}$  there are implemented the mechanisms, which stipulate a damage and death of tumor cells by necrosis, while in the peripheral zone at temperatures above  $-50^{\circ}\text{C}$  the cell death occurs mainly as a result of apoptotic processes [19].

Fundamentally, the antitumor effect of cryoablation is focused not only to the cells of the primary tumor. In the 1970s, the remission of metastases was achieved after cryoablation of prostate cancer [23]. This effect was called abscopic (inhibitory or ‘witness’ effect), its implementation was associated with the immune system (IS) cells. The authors considered the possible mechanism of the abscopic effect to be the release of tumor antigens (AG) of the primary focus into the bloodstream after cryodestruction, in response to which antibodies were formed, which subsequently interacted with the AG of metastatic nodes. From the point of view of the modern idea of structural and functional organization of tumor tissue, it is logical to assume that among these there may be CSCs AG. This circumstance is confirmed by the results of our works [9–11], which indicate a change in the structural and functional characteristics of CSCs after effect of ultralow temperatures. At the same time, it was found that their character was determined by the mode of freezing-warming, as well the tumor size [12].

One of the mechanisms of implementation of the abscopic effect can be so-called ‘epitope spreading’, which arises as a result of cryomodification of tumor protein and an increase in the immunogenicity of tumor tissue in whole [13]. In this aspect, the acquisition of immunogenicity by ‘check-points’ that are expressed on tumor cells and inhibiting the development of immune responses to tumor AGs, may be attractive [16]. Cryodenaturation, presumably, can lead to the formation of conglomerates of soluble tumor AGs, which, in turn, contributes to stimulation of their absorption and presentation by macrophages. In response to cryotherapy, the level of heat shock proteins, that can exhibit adjuvant properties, increases [26].

As well an interesting concept is the possibility of expression on the surface of the remaining after cryoablation CSCs of the natural killer group 2D (NKG2D) receptors under conditions of low temperature stress, which will enhance the possibility of their elimination by IS cells [18]. After cryosurgical treatment, immunocompetent cells (ICCs) located on the tumor periphery, the so-called tumor-infiltrating ICC (TI ICC), will also change their structural and functional potential. This fact is con-



хирургического воздействия находящиеся на периферии опухоли иммунокомпетентные клетки (ИКК), так называемые опухоль-инфильтрирующие ИКК, так же будут изменять свой структурно-функциональный потенциал. Данный факт подтверждают D.N. Campbell и соавт. [6], показавшие снижение экспрессии рецептора PD-1 (CD279) на поверхности лимфоцитов после криоконсервирования. Поскольку PD-1, связываясь со своим лигандом, подавляет противоопухолевую активность Т-клеток, можно считать, что антибластомная активность лимфоцитов, подвергшихся низкотемпературному воздействию, усиливается. В ответ на стимуляцию клеток форбол 12-миристат 13-ацетатом криоконсервированные лимфоциты отвечали более интенсивной продукцией интерферона- $\gamma$ , обладающего противоопухолевыми свойствами, чем нативные клетки [15]. Таким образом, есть все основания считать, что криоабляция позволяет создать противоопухолевую вакцину внутри организма самого пациента и повысить функциональную активность ИКК. Заметим, что на сегодняшний день использование вакцин на основе РСК – перспективное направление в экспериментальной и клинической онкологии [17].

В клинической практике отмечены существенные изменения в ИС пациентов после криохирургического вмешательства. Так, T.G. Si и соавт. [21] через 4 недели после криоабляции в опухоли предстательной железы пациента отмечали снижение количества Т-регуляторных клеток, проявляющих иммуносупрессорные свойства, причем этот эффект пролонгировался вплоть до 8-й недели. Важно, что супрессирующий эффект этих клеток был более выраженным, чем до проведения процедуры криовоздействия. Иммуотропное влияние криоабляции было описано еще в 90-е годы прошлого столетия P. Bayjoo и соавт. [4], которые сообщали об усилении цитотоксичности натуральных киллеров (NK) после криохирургического воздействия на имплантированную опухоль печени крысы. G.G. Namad и соавт. [14] так же указывали на активацию иммунного ответа после криоабляции фибросаркомы мышей. В более поздних работах на модели глиомы у мышей было показано, что после криоабляции опухоли был индуцирован противоопухолевый клеточный иммунный ответ – в виде увеличения количества CD3<sup>+</sup>- и CD4<sup>+</sup> Т-клеток, а также NK-клеток в крови [27]. С этим согласуются и данные X. Yang и соавт. [29], которые подтверждают, что после криоабляции увеличивается число CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, соотношение Th1/Th2 и усиливается цитолитическая активность цитотоксических Т-лимфоцитов и NK-клеток.

confirmed by D.N. Campbell *et al.* [5], which showed a decrease in the expression of PD-1 receptor (CD279) on the surface of lymphocytes after cryopreservation. Since PD-1, binding to its ligand, suppresses the antitumor activity of T cells, it can be considered that the anti-blastoma activity of lymphocytes exposed to low-temperature exposure is enhanced. In response to cell stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate, cryopreserved lymphocytes responded with more intensive production of interferon- $\gamma$ , which has antitumor properties, than native cells [15]. Thus, there are the reasons to believe that cryoablation allows the creation of an antitumor vaccine inside the patient's body and a rise in functional activity of the ICCs. It should be noted that today the use of vaccines based on CSCs is a promising direction in experimental and clinical oncology [17].

In clinical practice, significant changes in the IS of patients after cryosurgical intervention were noted. So T.G. Si *et al.* [21] 4 weeks after cryoablation in a patient's prostate tumor, a decrease in the number of T-regulatory cells exhibiting immunosuppressive properties was noted, and this effect lasted up to the 8<sup>th</sup> week. It is important that the suppressive effect of these cells was more pronounced than before the cryotherapy. The immunotropic effect of cryoablation was described back in the 90s of the last century by P. Bayjoo *et al.* [4], who reported an increased cytotoxicity of natural killer (NK) cells after cryosurgical treatment of an implanted rat liver tumor. G.G. Hamad *et al.* [14] also indicated an immune response activation after cryoablation of murine fibrosarcoma. Later studies in a model of glioma in mice showed that after cryoablation of the tumor, an antitumor cellular immune response was induced in the form of an increase in the number of CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells, as well as NK cells in blood [27]. The data of X. Yang *et al.* are consistent with this [29], confirming that after cryoablation, the number of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and the ratio of Th1/Th2 are increased, and the cytolytic activity of cytotoxic T lymphocytes and NK cells enhances.

It is significant that the nature of the antitumor immune response is determined by the type of cell death after cryoablation. As noted above, the cell death after cryodestruction is realized by the development of necrosis or apoptosis in cells. Necrosis leads to a rapid and massive release of DAMP (damage associated molecular patterns – DNA, RNA, heat shock protein-70 and uric acid), activating the dendritic cells (DCs) and, in general, a tumor-specific response [20]. In apoptotic



Существенно, что характер противоопухолевого иммунного ответа определяется типом гибели клеток после криоабляции. Как было отмечено выше, гибель клеток после криодеструкции реализуется путем развития в клетках некроза либо апоптоза. Некроз приводит к быстрому и массивному выделению DAMP (damage associated molecular patterns – ДНК, РНК, белок теплового шока-70 и мочевая кислота), активирующих дендритные клетки (ДК) и в целом опухоль-специфический ответ [20]. При апоптотической гибели клеток ДК, напротив, в большей мере индуцируют и поддерживают иммуносупрессивное состояние [20, 22]. Соотношение некротических и апоптотических клеток будет определять эффективность криоабляции, реализуемую через вектор иммунного ответа организма.

В последнее время большое внимание уделяется сочетанному применению криоабляции и методов иммунотерапии. Например, показана высокая эффективность комбинирования криоабляции и ингибиторов «чек поинтов» [3]. Особое внимание заслуживает адоптивная противоопухолевая иммунотерапия на основе использования ДК, которые впервые были идентифицированы Р.М. Штейнманом и соавт. [24], за что в 2011 году он был удостоен Нобелевской премии. На собственном примере он впервые добился определенного положительного результата применения ДК для лечения онкологического заболевания. Для использования ДК в клинике необходимо создать их запасы и условия для длительного хранения. В качестве криопротектора при замораживании клеток преимущественно используют ДМСО, однако для снижения токсических свойств предусмотрено его использование с другими криопротекторами [5]. В качестве такого соединения рассматривается метформин, уникальность которого состоит также в противоопухолевых свойствах: ингибирование РСК, иммуномодуляция с целью повышения противоопухолевой резистентности онкобольных [7, 25]. Р. Ху и соавт. [28] отмечали, что метформин может ингибировать накопление и иммуносупрессорные свойства миелоидных супрессорных клеток (G-MDSCs), тем самым сдерживая прогрессирование опухоли у мышей с перевиваемым раком молочной железы CT-26. Действие метформина направлено на усиление фосфорилирования 5'аденозин-монофосфат активируемой протеинкиназы, снижение уровня фосфорилирования STAT3, что подавляет ингибирующую функцию G-MDSCs *in vitro*. Кроме того, данное вещество обладает модифицирующим действием на функциональную активность самих ДК. При этом характер оказывае-

cell death, DCs, on the contrary, to a greater extent induce and maintain an immunosuppressive state [20, 22]. The ratio of necrotic and apoptotic cells will determine the effectiveness of cryoablation, realized via the body's immune response vector.

Recently, much attention has been paid to the combined use of cryoablation and immunotherapy methods. For example, the high efficiency of combining cryoablation and 'check point' inhibitors has been shown [2]. Adoptive anti-tumor immune therapy based on the use of DCs, which were first identified by Ralph M. Steinman *et al.*, deserves a special attention. [24], for this discovery in 2011 he was awarded with the Nobel Prize. For the first time by his own experience he managed to positively exemplify the application of DCs to treat the oncology disease.

To use DCs in clinic, it is necessary to create their stocks and conditions for long-term storage. DMSO is predominantly used as a cryoprotectant when freezing cells, but its use with other cryoprotectants is foreseen for reducing the toxic properties [4]. Metformin is considered as such a compound, the uniqueness of which also consists in its antitumor properties: inhibition of CSCs, immunomodulation in order to increase the anti-tumor resistance of cancer patients [6, 25]. P. Xu *et al.* [28] noted that metformin can inhibit the accumulation and immunosuppressive properties of myeloid suppressor cells (G-MDSCs), thereby an inhibiting tumor progression in mice with transplanted breast cancer CT-26. The action of metformin is aimed at enhancing the phosphorylation of 5'adenosine monophosphate activated protein kinase, reducing the level of phosphorylation of STAT3, which slows down an inhibitory function of G-MDSCs *in vitro*. In addition, this substance has a modifying effect on a functional activity of DCs themselves. Moreover, the nature of the effect is determined by the DCs belonging to one or another subpopulation [8]. Due to such an activity, metformin can be used as a cryoprotectant for freezing DCs and subsequent application in immune correction protocols for oncology patients after cryoablation.

It should be noted that research in the field of cryoimmunology should be based not only on the use of substances with immune modulatory and antitumor effects as well as the above-mentioned cryosurgical approaches, but should also be aimed at developing new methods and approaches, enabling the creation of new drugs and technologies (nanostructures, nanotechnologies) to enhance the effectiveness of cryovaccines.



мого эффекта определяется принадлежностью ДК к той или иной субпопуляции [9]. Благодаря такой активности метформин может применяться как криопротектор при замораживании ДК и их последующем применении онкобольным в программах иммунокоррекции после криоабляции.

Следует заметить, что исследования в области криоиммунологии должны основываться не только на использовании веществ с иммуномодулирующим и противоопухолевым действием и выше упомянутых криохирургических подходов, но и быть нацелены на разработку новых методологий и методик, которые позволят создать новые препараты и технологии (наноструктуры, нанотехнологии) для усиления эффективности криовакцин.

### Выводы

Повышение противоопухолевой активности организма после криоабляции опухолевого сайта обусловлено усилением иммунного ответа за счет криомодификации опухолевых антигенов. Одним из вариантов повышения антибластомной активности ИС онкологических больных являются сочетанное использование криоабляции и разных форм иммунотерапии, в частности, ингибиторов «чек поинтов», а также введение разных форм ДК, которые открывают новые перспективы в безрецидивном лечении рака.

### Литература

1. Ахмедов СМ, Рахими ФК, Ахмедов СШ, и др. Применение сверхнизких температур в хирургии печени. Доклады академии наук республики Таджикистан. 2016; 59(11–12): 524–33.
2. Гольцев АМ, Сафранчук ОВ, Бондарович МО, Останков МВ. Зміна криолабільності стовбурових пухлинних клітин залежно від фази росту аденокарциноми Ерліха *in vivo*. Фізіологічний журнал. 2011; 57(4): 68–74.
3. Benzon B, Glavaris SA, Simons BW, et al. Combining immune check-point blockade and cryoablation in an immunocompetent hormone sensitive murine model of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2018; 21(1): 126–36.
4. Bayjoo P, Rees RC, Goepel JR, Jacob G. Natural killer cell activity following cryosurgery of normal and tumour bearing liver in an animal model. *J Clin Lab Immunol.* 1991; 35(3): 129–32.
5. Buriak I, Fleck R, Fuller B, Stacey G. The cryoprotectant DMSO. Identifying problems and developing its safe and effective use. In: Abstracts of the 55th SLTB Scientific Conference, Oct. 2–4, 2019, Spain, Seville. 2019. P. 46.
6. Campbell DE, Tustin NB, Riedel E, et al. Cryopreservation decreases receptor PD-1 and ligand PD-L1 coinhibitory expression on peripheral blood mononuclear cell-derived T cells and monocytes. *Clin Vaccine Immunol.* 2009; 16(11): 1648–53.
7. Cha JH, Yang WH, Xia W, et al. Metformin promotes antitumor immunity via endoplasmic-reticulum-associated degradation of PD-L1. *Mol Cell.* 2018; 71(4): 606–20.
8. El-Ashmawy NE, El-Zamarany EA, Salem ML, et al. A new strategy for enhancing antitumor immune response using dendritic cells loaded with chemo-resistant cancer stem-like cells in experimental mice model. *Mol Immunol.* 2019; 111: 106–17.

### Conclusions

Increase of anti-tumor activity of a body after cryoablation of tumor site is stipulated by anti-tumor immune response due to cryomodification of tumor antigens.

One of the options for increasing the anti-blasmoma activity of the tumor carrier IS is the combined use of cryoablation and different forms of immunotherapy, in particular, ‘check point’ inhibitors, the introduction of various forms of DCS *etc.*, that opens up new perspectives in cancer-free treatment.

### References

1. Ahmedov SM, Rahimi FK, Ahmedov SSh, et al. [Application of cryogenic temperatures in liver surgery]. Reports of the Academician of Sciences of the Republic of Tajikistan. 2016, 59 (11-12): 524–33. Russian.
2. Benzon B, Glavaris SA, Simons BW, et al. Combining immune check-point blockade and cryoablation in an immunocompetent hormone sensitive murine model of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2018; 21(1): 126–36.
3. Bayjoo P, Rees RC, Goepel JR, Jacob G. Natural killer cell activity following cryosurgery of normal and tumour bearing liver in an animal model. *J Clin Lab Immunol.* 1991; 35(3): 129–32.
4. Buriak I, Fleck R, Fuller B, Stacey G. The cryoprotectant DMSO. Identifying problems and developing its safe and effective use. In: Abstracts of the 55th SLTB Scientific Conference, Oct. 2–4, 2019, Seville, Spain. Seville; 2019. p. 46.
5. Campbell DE, Tustin NB, Riedel E, et al. Cryopreservation decreases receptor PD-1 and ligand PD-L1 coinhibitory expression on peripheral blood mononuclear cell-derived T cells and monocytes. *Clin Vaccine Immunol.* 2009; 16(11): 1648–53.
6. Cha JH, Yang WH, Xia W, et al. Metformin promotes antitumor immunity via endoplasmic-reticulum-associated degradation of PD-L1. *Mol Cell.* 2018; 71(4): 606–20.
7. El-Ashmawy NE, El-Zamarany EA, Salem ML, et al. A new strategy for enhancing antitumor immune response using dendritic cells loaded with chemo-resistant cancer stem-like cells in experimental mice model. *Mol Immunol.* 2019; 111: 106–17.
8. Gallucci S, Chakhtoura M, Lee MH, Qiu CC. The metabolic modulator metformin affects the activation and survival of murine dendritic cell subsets. *J Immunol [Internet]* . 2019 [Cited 18.01.2019]; 202(1 Suppl): 180.17 Available from: [https://www.jimmunol.org/content/202/1\\_Supplement/180.17](https://www.jimmunol.org/content/202/1_Supplement/180.17)
9. Goltsev A, Bondarovich N, Babenko N, Gaevska Yu. Freezing conditions determine the integrity of antigenic characteristics of cancer cells. *Experimental Oncology.* 2018; 40 (2): 159.
10. Goltsev AN, Bondarovich NA, Babenko NN, et al. Freezing conditions determine functional potential of tumor cells. *Cryobiology.* 2018; 85: 168.
11. Goltsev AM, Bondarovich MO, Babenko NM, et al. Effect of different cryopreservation regimens on Ehrlich carcinoma growth. *Cell Tissue Bank.* 2019; 20(3): 411–21.
12. Goltsev AN, Safranchuk OV, Bondarovich NA, et al. [Change in cryolability of cancer stem cells during *in vivo* culture of Ehrlich adenocarcinoma]. *Fiziol Zh.* 2011; 57(4): 68–76. Ukrainian.
13. Gulley JL, Madan RA, Pachynski R et al. Role of antigen spread and distinctive characteristics of immunotherapy in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst [Internet]*. 2017 [cited 19.11.2019]; 109(4): djw261. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5441294/pdf/djw261.pdf>



9. Gallucci S, Chakhtoura M, Lee MH, Qiu CC. The metabolic modulator metformin affects the activation and survival of murine dendritic cell subsets. *J Immunol*. [Internet]. 2019 [Cited 18.01.2019]; 202(1): 180.17 Available from: [https://www.jimmunol.org/content/202/1\\_Supplement/180.17](https://www.jimmunol.org/content/202/1_Supplement/180.17)
10. Goltsev A, Bondarovich N, Babenko N, Gaevskaya Yu. Freezing conditions determine the integrity of antigenic characteristics of cancer cells. *Experimental Oncology*. 2018; 40 (2): 159.
11. Goltsev AN, Bondarovich NA, Babenko NN, et al. Freezing conditions determine functional potential of tumor cells. *Cryobiology*. 2018; 85: 168.
12. Goltsev AM, Bondarovich MO, Babenko NM, et al. Effect of different cryopreservation regimens on Ehrlich carcinoma growth. *Cell Tissue Bank*. 2019; 20(3): 411–21.
13. Gulley JL, Madan RA, Pachynski R, et al. Role of Antigen Spread and Distinctive Characteristics of Immunotherapy in Cancer Treatment. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2017 [Cited 19.11.2019]; 109(4): djw261. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5441294/pdf/djw261.pdf>.
14. Hamad GG, Neifeld JP. Biochemical, hematologic, and immunologic alterations following hepatic cryotherapy. *Semin Surg Oncol*. 1998; 14(2): 122–8.
15. Li X, Zhong Z, Liang S, et al. Effect of cryopreservation on IL-4, IFN $\gamma$  and IL-6 production of porcine peripheral blood lymphocytes. *Cryobiology*. 2009; 59(3):322–6.
16. Lleo A, Rimassa L, Colombo M. Hepatotoxicity of immune check point inhibitors: Approach and management. *Dig Liver Dis*. 2019; 51(8):1074–8.
17. Mahmoodi S, Nezafat N, Negahdaripour M, Ghasemi Y. A new approach for cancer immunotherapy based on the cancer stem cell antigens properties. *Curr Mol Med*. 2019; 19(1): 2–11.
18. Paczulla AM, Rothfelder K, Raffel S, et al. Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion. *Nature*. 2019; 572(7768): 254–9.
19. Robilotto AT, Baust JM, Van Buskirk RG, et al. Temperature-dependent activation of differential apoptotic pathways during cryoablation in a human prostate cancer model. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2013; 16(1): 41–9.
20. Sabel MS. Cryo-immunology: a review of the literature and proposed mechanisms for stimulatory versus suppressive immune responses. *Cryobiology*. 2009; 58(1): 1–11.
21. Si TG, Wang JP, Guo Z. Analysis of circulating regulatory T cells (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) after cryosurgery in prostate cancer. *Asian J Androl*. 2013;15(4):461–5.
22. Sidana A. Cancer immunotherapy using tumor cryoablation. *Immunotherapy*. 2014; 6(1): 85–93.
23. Soanes WA, Ablin RJ, Gonder MJ. Remission of metastatic lesions following cryosurgery in prostatic cancer: immunologic considerations. *J Urol*. 1970; 104(1): 154–9.
24. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973; 137(5): 1142–62.
25. Tan W, Tang H, Jiang X, et al. Metformin mediates induction of miR-708 to inhibit self-renewal and chemoresistance of breast cancer stem cells through targeting CD47. *J Cell Mol Med*. 2019; 23(9): 5994–6004.
26. Vermaelen K. Vaccine strategies to improve anti-cancer cellular immune responses. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [Cited 19.11.2019]; 10:8. Available from: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6349827/pdf/fimmu-10-00008.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6349827/pdf/fimmu-10-00008.pdf)
27. Vijendren A, Yung M, Sanchez J. Occupational health issues amongst UK doctors: a literature review. *Occup Med (Lond)*. 2015; 65 (7): 519–28.
28. Xu P, Yin K, Tang X, et al. Metformin inhibits the function of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019 [Cited 07.11.2019]; 120: 109458. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332219336157>
29. Yang X, Guo Y, Guo Z, et al. Cryoablation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Oncotarget*. 2018; 10(41): 4180–91.
14. Hamad GG, Neifeld JP. Biochemical, hematologic, and immunologic alterations following hepatic cryotherapy. *Semin Surg Oncol*. 1998; 14(2): 122–8.
15. Li X, Zhong Z, Liang S, et al. Effect of cryopreservation on IL-4, IFN $\gamma$  and IL-6 production of porcine peripheral blood lymphocytes. *Cryobiology*. 2009; 59(3):322–6.
16. Lleo A, Rimassa L, Colombo M. Hepatotoxicity of immune check point inhibitors: Approach and management. *Dig Liver Dis*. 2019; 51(8):1074–8.
17. Mahmoodi S, Nezafat N, Negahdaripour M, Ghasemi Y. A new approach for cancer immunotherapy based on the cancer stem cell antigens properties. *Curr Mol Med*. 2019; 19(1): 2–11.
18. Paczulla AM, Rothfelder K, Raffel S, et al. Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion. *Nature*. 2019; 572(7768): 254–9.
19. Robilotto AT, Baust JM, Van Buskirk RG, et al. Temperature-dependent activation of differential apoptotic pathways during cryoablation in a human prostate cancer model. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2013; 16(1): 41–9.
20. Sabel MS. Cryo-immunology: a review of the literature and proposed mechanisms for stimulatory versus suppressive immune responses. *Cryobiology*. 2009; 58(1): 1–11.
21. Si TG, Wang JP, Guo Z. Analysis of circulating regulatory T cells (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) after cryosurgery in prostate cancer. *Asian J Androl*. 2013;15(4):461–5.
22. Sidana A. Cancer immunotherapy using tumor cryoablation. *Immunotherapy*. 2014; 6(1): 85–93.
23. Soanes WA, Ablin RJ, Gonder MJ. Remission of metastatic lesions following cryosurgery in prostatic cancer: immunologic considerations. *J Urol*. 1970; 104(1): 154–9.
24. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973; 137(5): 1142–62.
25. Tan W, Tang H, Jiang X, et al. Metformin mediates induction of miR-708 to inhibit self-renewal and chemoresistance of breast cancer stem cells through targeting CD47. *J Cell Mol Med*. 2019; 23(9): 5994–6004.
26. Vermaelen K. Vaccine strategies to improve anti-cancer cellular immune responses. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [Cited 19.11.2019]; 10:8. Available from: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6349827/pdf/fimmu-10-00008.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6349827/pdf/fimmu-10-00008.pdf)
27. Vijendren A, Yung M, Sanchez J. Occupational health issues amongst UK doctors: a literature review. *Occup Med (Lond)*. 2015; 65 (7): 519–28.
28. Xu P, Yin K, Tang X, et al. Metformin inhibits the function of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019 [Cited 07.11.2019]; 120: 109458. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332219336157>
29. Yang X, Guo Y, Guo Z, et al. Cryoablation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Oncotarget*. 2018; 10(41): 4180–91.

