

## Влияние криоконсервирования на структурно-функциональные характеристики клеток аденокарциномы Эрлиха

О.А. Дябина, М.В. Останков, Н.А. Бондарович, А.Н. Гольцев

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Cryopreservation Effect on Structural-Functional Characteristics of Ehrlich Carcinoma Cells

O.A. Diabina, M.V. Ostankov, N.A. Bondarovich, A.N. Goltsev

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

Для использования метода криодеструкции при лечении онкологических заболеваний необходимо изучение влияния холода на структурно-функциональные характеристики стволовых раковых клеток (СРК), активность которых определяет инициацию и метастазирование опухолей. В связи с этим целью данной работы было исследование влияния криоконсервирования на структурно-функциональные свойства СРК в динамике развития аденокарциномы Эрлиха (АКЭ).

Клетки АКЭ получали на 7-й (АКЭ-7) и 14-й (АКЭ-14) день культивирования *in vivo* в перитонеальной полости (ПП) мышей линии BALB/c. Клетки АКЭ-7 и АКЭ-14 криоконсервировали в асцитической жидкости без использования криопротекторов. Аттестация функционального потенциала отогретых образцов была проведена методом культивирования *in vivo* с учетом интенсивности роста клеток АКЭ в ПП. Концентрацию клеток с маркерами СРК (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> и CD44<sup>high</sup>) определяли на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («BD», США) с использованием моноклональных антител к CD44 и CD24 антигену. Пролиферативный статус СРК оценивали по времени удвоения (*doubling time*) клеток АКЭ в ПП.

Установлено, что криоконсервирование по-разному изменяет функциональный статус СРК с фенотипом CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> и CD44<sup>high</sup> в гетерогенной популяции АКЭ в зависимости от этапа развития опухолевого процесса. Указанные отличия были выражены в наработке отдельных субпопуляций АКЭ, темпе их удвоения и кратности увеличения абсолютного количества в ПП.

На основании полученных результатов можно заключить, что каждая из популяций СРК отвечает на факторы криоконсервирования. Существенным фактором, определяющим характер ответа каждой из них, является модификация структурно-функционального статуса СРК по мере развития опухолевого процесса *in vivo*. Под действием факторов в процессе криоконсервирования происходит селекция стволовых предшественников в зависимости от стадии развития АКЭ, о чем свидетельствует более высокий пролиферативный потенциал криоконсервированных АКЭ-14 по сравнению с криоконсервированными АКЭ-7. Полученные данные подтверждают необходимость корректного выбора сроков криоиррадикации злокачественных новообразований.

The use of cryodestruction for treating oncological diseases necessitates the studying of cold effect on structural and functional characteristics of cancer stem cells (CSCs), the activity of which determines the tumor initiation and metastasizing. In this connection, the research aim was to investigate the effect of cryopreservation on structural and functional properties of CSCs in developmental dynamics of Ehrlich carcinoma (EC).

Ehrlich carcinoma cells were procured to the 7<sup>th</sup> (EC-7) and 14<sup>th</sup> (EC-14) days of *in vivo* culturing from peritoneal cavity (PC) of BALB/c mice. The EC-7 and EC-14 cells were cryopreserved in ascitic fluid without cryoprotectants. Functional potential of thawed samples was attested *in vivo* with taking into account the EC cells proliferation rate in PC. Concentration of CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> and CD44<sup>high</sup> cells was assessed with flow cytometer (BD FACS Calibur, USA) using monoclonal antibodies to CD44 and CD24 antigen. Proliferative status of CSCs was estimated by doubling time of EC cells in PC.

Cryopreservation have been established to change in different way the functional status of CSCs with CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> and CD44<sup>high</sup> phenotype in EC depending on the stage of tumor development. These differences were manifested in the rise of some EC subpopulations, the rate of their doubling and ratio of rise of absolute number of the cells in PC.

According to our findings we can conclude that each population of CSCs revealed a response to cryopreservation. An essential factor determining the character of response of each of them was the modification of CSC structure and functional status during development of *in vivo* tumor process. Cryopreservation resulted in the selection of stem progenitors depending on the stage of EC development, that was confirmed by higher proliferation potential of cryopreserved EC-14 cells if compared to cryopreserved EC-7. The findings emphasize the need in a correct selection of cryodestruction terms of malignant neofoms.