

# Изменение молекулярно-генетических характеристик клеток аденокарциномы Эрлиха под воздействием факторов криоконсервирования

О.В. Челомбитко, О.В. Сафранчук, Н.А. Бондарович, М.В. Останков, А.Ю. Димитров  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Change of Molecular and Genetic Characteristics of Ehrlich Carcinoma Cells Due to Cryopreservation

O.V. Chelombitko, O.V. Safranchuk, N.A. Bondarovich, M.V. Ostankov, A.Yu. Dimitrov  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В современных подходах лечения онкологических заболеваний большое внимание уделяется применению стволовых раковых клеток (СРК) как индукторов роста опухоли. Использование в медицинской практике метода криодеструкции при лечении некоторых онкологических заболеваний не исключает изменения свойств СРК, которые могут оставаться в месте извлечения опухоли. Изучение влияния холода на поведение генов плюрипотентности в СРК на такой экспериментальной модели, как аденокарцинома Эрлиха (АКЭ), поможет раскрыть механизмы возникновения возможных рецидивов после данной процедуры.

Целью работы было изучение влияния процессов замораживания-отогрева на молекулярно-генетические свойства клеток АКЭ 7-х и 14-х суток развития, а также выделенной из них фракции CD44<sup>+</sup>.

**Материалы и методы.** Клетки АКЭ вводили внутрибрюшинно ( $3 \times 10^6$  клеток) самкам мышей BALB/c и культивировали *in vivo*. На 7-е и 14-е сутки получали культуру клеток АКЭ (АКЭ-7 и АКЭ-14), криоконсервировали в асцитической жидкости без использования криопротекторов по двухэтапной программе (скорость 1 град/мин до  $-80^\circ\text{C}$ , 300–400 град/мин от  $-80$  до  $-196^\circ\text{C}$ ). Популяцию клеток с маркером CD44 выделяли методом магнитной сепарации на магнитном сортере «BD Imagnet» (США). Анализ процентного содержания субпопуляций с маркерами CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> и CD44<sup>high</sup> проводили на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью пропидий йодида. Уровень экспрессии генов *sox-2*, *nanog*, *oct-4* в общей популяции клеток АКЭ-7 и АКЭ-14 в выделенной фракции CD44<sup>+</sup> и фракции без CD44<sup>+</sup> определяли методом ОТ-ПЦР.

**Результаты.** Содержание клеток-предшественников (CD44<sup>high</sup>) и более дифференцированных (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>) в популяции клеток АКЭ 7-х суток культивирования было достоверно выше по сравнению с культурой АКЭ-14. Процессы замораживания-отогрева оказывали ингибирующее действие на экспрессию поверхностных фенотипических маркеров CD44<sup>high</sup> в культуре клеток обоих сроков развития, а содержание клеток CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> особенно повышалось в культуре 14-х суток развития. Активация экспрессии генов *sox-2*, *nanog* и *oct-4* после воздействия холода на общую популяцию клеток АКЭ и выделенную фракцию CD44<sup>+</sup> свидетельствует об их ключевой роли в увеличении численности популяции клеток опухоли.

An emphasis is paid currently to cancer stem cells (CSCs) as inducers of tumor growth during treatment of malignancies. Application of cryodestruction in medical practice during treatment of some malignancies does not exclude the change of CSC properties, which may remain in the site of tumor ablation. The investigation of cold effect on pluripotency gene behavior in SCCs in such experimental model as Ehrlich adenocarcinoma (EAC) would help to reveal the mechanisms of appearance after this procedure.

The research aim was to study the effect of freeze-thawing on molecular and genetic properties of EAC cells of 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day of development as well as isolated CD44<sup>+</sup> fraction.

**Materials and methods.** EAC cells were intraperitoneally introduced ( $3 \times 10^6$  cells) to BALB/c female mice and cultured *in vivo*. To the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day the EAC cell cultures (EAC-7 and EAC-14) were isolated, cryopreserved in ascitic fluid without cryoprotectants by two-stage program (1 deg/min rate down to  $-80^\circ\text{C}$ , 300–400 deg/min from  $-80$  down to  $-196^\circ\text{C}$ ). Cell population with CD44 marker was isolated by magnetic separation using magnetic sorter BD Imagnet (USA). Percentage of subpopulations with CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> and CD44<sup>high</sup> markers was assessed with flow cytometer FACS Calibur (Becton Dickinson, USA). Cell viability was assessed by propidium iodide (PI) staining. Expression level of *sox-2*, *nanog*, *oct-4* genes in total population of EAC-7 and EAC-14 cells in isolated CD44<sup>+</sup> fraction and in left CD34<sup>-</sup> fraction was determined by RT-PCR.

**Results.** The content of CD44<sup>high</sup> precursors and more differentiated CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> cells in population of EAC cells of 7<sup>th</sup> culture day was significantly higher if compared with the EAC-14 cells. Freeze-thawing had an inhibiting effect on expression of surface phenotypic markers CD44<sup>high</sup> in cell culture of both terms. Content of CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> cells increased especially in the 14<sup>th</sup> day culture. Activation of *sox-2*, *nanog* and *oct-4* genes expression after cold exposure in EAC cells total population and CD44<sup>+</sup> isolated fraction testified to their key role in increasing number of tumor cells population.