

# Влияние криоконсервирования на экспрессию генов плюрипотентности в клетках аденокарциномы Эрлиха разных сроков развития

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

## Effect of Cryopreservation on Pluripotency Gene Expression in Ehrlich Carcinoma Cells of Different Terms of Development

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

Успех применения метода криодеструкции солидных опухолей в клинике базируется на понимании характера влияния криовоздействия на структурные и функциональные свойства стволовых раковых клеток (СРК) как индукторов злокачественного процесса. Существенным моментом при этом является изучение криочувствительности СРК в опухолях разных сроков развития. Удобная модель для проведения подобных исследований – это асцитная форма аденокарциномы Эрлиха (АКЭ).

Цель работы – оценить влияние криоконсервирования на экспрессию генов *nanog*, *oct4*, *sox2* в различных субпопуляциях клеток АКЭ разных сроков развития и их способность к опухолеобразованию.

Эксперименты проводили на мышах линии Balb/c, в перитонеальной полости (ПП) которых культивировали АКЭ. Асцит получали на 7- и 14-е сутки культивирования АКЭ. Методом магнитной сепарации (сортер «BD IMagnet», США) общая популяция клеток АКЭ была разделена на CD44<sup>+</sup>- и CD44<sup>-</sup>-фракции, которые криоконсервировали в асцитической жидкости по двухэтапной программе: 1 град/мин до –80°C, 300–400 град/мин от –80 до –196°C. Способность криоконсервированных CD44<sup>+</sup>- и CD44<sup>-</sup>-клеток разных сроков развития к опухолеобразованию оценивали через 7 суток культивирования в ПП (3×10<sup>5</sup> кл/мышь). Интенсивность развития АКЭ в каждой группе определяли по объему асцитической жидкости в ПП и концентрации клеток. Содержание субпопуляций АКЭ с маркерами CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> и CD44<sup>hi</sup> оценивали на цитофлуориметре «FACS Calibur» («BD», США); уровень экспрессии генов *nanog*, *oct4*, *sox2* – методом ОТ-ПЦР.

Установлено, что CD44<sup>+</sup>-фракция обладала большим опухоль-индуцирующим потенциалом, чем фракция CD44<sup>-</sup>, независимо от стадии развития АКЭ. В культуре АКЭ, иницированной криоконсервированной фракцией CD44<sup>+</sup>-клеток, выделенных из АКЭ-7, наблюдались стимуляция экспрессии генов *nanog* и *sox2* и ингибирование *oct4*, что проявилось в усилении пролиферации наиболее потенциальной (CD44<sup>hi</sup>-клетки) и дифференцированной (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>-клетки) субпопуляции. В культуре, иницированной криоконсервированной фракцией CD44<sup>+</sup>-клеток, выделенных из АКЭ-14, наблюдалось повышение экспрессии всех исследуемых генов, что сопровождалось усилением пролиферации наиболее потенциальных субпопуляций АКЭ (CD44<sup>hi</sup> и CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>).

Таким образом, в зависимости от срока развития опухоли криоконсервирование может оказывать стимулирующий эффект на экспрессию генов плюрипотентности, что необходимо учитывать при проведении криоиррадиации.

The successful application of cryodestruction for solid tumours in the clinic is based on understanding the nature of cryoexposure impact on structural and functional properties of cancer stem cells (CSCs) as a malignancy initiators. The essential point here is the study of CSCs cryosensitivity in tumours of different terms of development. A convenient model for implementing these studies is ascitic Ehrlich carcinoma (EC).

The research aim was to assess the cryopreservation effect on *nanog*, *oct4*, *sox2* gene expression in different subpopulations of EC cells of different terms of development and their capability to tumor formation.

Experiments were performed in Balb/c mice, in peritoneal cavity (PC) of which the EC was cultured. The ascite was obtained to day 7 and 14 of EC culturing. Using magnetic separation (BD IMagnet sorter, USA) the total population of EC cells was separated into CD44<sup>+</sup> and CD44<sup>-</sup> fractions, cryopreserved in ascitic fluid by two-step program: 1 deg/min down to –80°C, 300–400°C/min from –80 down to –196°C. The capability of cryopreserved CD44<sup>+</sup> and CD44<sup>-</sup> cells of different terms of development to tumour formation was assessed after 7 days of culture in PC (3×10<sup>5</sup> cells/mouse). The intensity of EC development in each group was determined by the volume of ascitic fluid in PC and cell concentration. The content of EC subpopulations with CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> and CD44<sup>hi</sup> markers was assessed with cytofluorimeter FACS Calibur (BD, USA); the level of *nanog*, *oct4*, *sox2* gene expression was done by RT-PCR.

It was found that CD44<sup>+</sup> fraction had a greater tumour-inducing potential than CD44<sup>-</sup> fraction, regardless of the stage of EC development. In EC culture, initiated by cryopreserved fraction of CD44<sup>+</sup> cells, isolated from EC-7, we observed the stimulation of *nanog* and *sox2* gene expression and *oct4* inhibition, that was manifested in an increased proliferation of the most potent (CD44<sup>hi</sup> cells) and differentiated (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> cells) subpopulations. In the culture, initiated by cryopreserved fraction of CD44<sup>+</sup> cells, isolated from EC-14, we noted an increased expression of all the studied genes, that was accompanied by strengthened proliferation of the most potent EC subpopulations (CD44<sup>hi</sup> and CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>).

Thus, depending on the term of tumour development the cryopreservation may cause a stimulating effect on the pluripotency gene expression, that should be taken into account during cryoirradiation.

