Особенности изменения морфофункциональных свойств клеток аденокарциномы Эрлиха после действия факторов криоконсервирования

О.В. Сафранчук
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Peculiarities of Changes in Morphofunctional Properties of Ehrlich's Carcinoma Cells After Effect of Cryopreservation

O.V. Safranchuk
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Исследования основных принципов поведения стволовых клеток (СК) различного происхождения позволяют понять общебиологические характеристики клеточных популяций в норме и патологии. Установлено, что характерная для СК иерархическая организация имеет место и в популяции раковых клеток, стволовой компартмент которых, проявляя определенные "автономные" признаки, тем не менее находится под строгим контролем своего микроокружения. Воздействуя теми или иными факторами на общий пул клеток с такими гистогенетическими характеристиками, можно проследить особенности изменения состояния каждой из его составляющих. Одним из факторов, способных существенно изменить свойства биообъекта в зависимости от его исходного морфофункционального состояния, является криоконсервирование.

Аденокарцинома Эрлиха (АКЭ) с фиксированными по времени фазами развития и гетерогенным, детерминированным соотношением субпопуляций клеток – удобная модель для изучения изменений, зависящих от различий в исходном состоянии клеток.

Цель работы – изучить морфофункциональные свойства клеток АКЭ на разных фазах ее развития после воздействия факторов криоконсервирования.

Эксперименты выполнены на 7-месячных самках мышей (BALB/c). Клетки АКЭ вводили животным внутрибрюшинно в дозе 3×10^6 в 0,3 мл физиологического раствора, затем их получали у животных на 7 и 14-е сутки развития, криоконсервировали в асцитической жидкости (скорость 1°С/мин до –80°С; 300-400°С/мин – от –80 до –196°С). Жизнеспособность клеток оценивали пропидий йодидом (PI). Методом проточной цитофлуориметрии определяли количество CD-29^+ клеток, в клеточной суспензии – количество апоптотических клеток и профиль клеточного цикла.

Жизнеспособность криоконсервированных клеток, полученных на 7-е сутки развития, составила 80,04 (натив 95,02%), на 14-е – 70,05% (натив 90,10%). После криоконсервирования количество $CD29^+$ клеток в 7-суточной популяции было 95,29 (натив 83,27%), в 14-суточной – 1,08% (натив 3,63%). Таким образом, на логарифмической фазе развития АКЭ (7-е сутки) субпопуляции CD-29^+ клеток присуща значительная криоустойчивость, связанная, очевидно, с их акцессорными функциями.

На 7-е сутки развития АКЭ количество клеток в апоптозе не превышало 4,66%, к 14-м суткам увеличивалось до 6,90%. Криоконсервирование увеличило данный показатель к 7-м суткам до 17,12, а к 14-м – до 21,07%. Существенно изменялся и пролиферативный потенциал опухолевых клеток. Так, после криоконсервирования количество клеток в S-фазе клеточного цикла на 7-е сутки развития составило 13,01 (натив 15,20%), а на 14-е сутки – 4,13 (натив 10,21%).

Криоконсервирование ингибирует функциональный статус клеток АКЭ, при чем в большей степени, в отношении клеток с высоким пролиферативным потенциалом.

The studies of main principles of behavior of stem cells (SCs) of various origins enable the understanding of general biological characteristics of cell populations in the norm and pathology. It has been established that characteristic for SCs hierarchical organization has the place in the population of cancer cells as well. Their stem compartment when manifesting the certain "autonomous" signs nevertheless there is under strict control of its micro-environment. By affecting with some factors on general pool of cells with such histogenetic characteristics one may trace the peculiarities of the state of each of its components. One of the factors able to change the properties of biological object depending on its initial morphofunctional state is cryopreservation.

Ehrlich carcinoma (EC) with fixed in time the developmental stages and heterogenous determined ratio of cell subpopulations is convenient model for investigating the changes dependant on the differences in initial state of the cells.

The research aim is to study morphofunctional properties of EC cells at different phases of EC development after cryopreservation factors' effect.

The experiments are performed in 7 months female mice (BALB/c). EC cells were introduced to the animals intraperitoneally in the dose of 3×10^6 in 0.3 ml of physiological solution, afterwards they were obtained from animals to the 7^{th} and 14^{th} days of development, cryopreserved in ascitic fluid (rate of 1°C/min down to –80°C; 300-400°C/min from –80 down to –196°C). Cell viability was estimated with propidium iodide (PI). The number of $CD29^+$ cells was found with flow cytometry method. In cell suspension the number of apoptotic cells and profile of cell cycle were examined.

Viability of cryopreserved cells derived to the 7^{th} day of development made 80.04% (95.02% for native), to the 14^{th} day it was 70.05% (90.10% for native). After cryopreservation the number of $CD29^+$ cells in the 7^{th}-day population made 95.29% (83.27% for native), in the 14^{th}-day it was 1.08% (3.63% for native). Thus at logarithmic development stage of EC (the 7^{th} day) the subpopulations of $CD29^+$ cells are characterized with significant cryoresistance, likely related to their accessory functions.

To the 7^{th} day of EC development the number of EC cells in apoptosis did not exceed 4.66% to the 14^{th} day it increased up to 6.90. Cryopreservation increased this index to the 7^{th} day up to 17.12% and up to 21.07% to the 14^{th} day. Proliferative potential of tumor cells also significantly altered. So, after cryopreservation the number of cells in S-phase of cell cycle to the 7^{th} day of development made 13.01% (15.20% for native) and to the 14^{th} day it was 4.13 (10.21% for native).

Cryopreservation inhibits the status of EC cells in respect of the ones with a high proliferative potential.