

Модификация экспрессии генов плюрипотентности в клетках аденокарциномы Эрлиха под действием криоконсервирования

О.В. Челомбитко, Н.А. Бондарович,

М.В. Останков, А.Ю. Димитров, А.Н. Гольцев

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Modification of Expression of Pluripotency Genes in Ehrlich's Carcinoma Cells Following Cryopreservation

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

Согласно теории стволовых раковых клеток (СРК), в последнее время получающей все больше доказательств, опухоль содержит субпопуляции раковых клеток, которые обладают характеристиками стволовых или прогениторных клеток. Одним из маркеров, идентифицирующих СРК, является CD44. В связи с применением криодеструкции, как самостоятельного метода и вспомогательного этапа, при лечении онкологических заболеваний влияние низких температур на различные субпопуляции клеток опухоли остается актуальным вопросом.

Целью работы было оценить влияния процессов замораживания-отогрева на способность опухолеобразования клеток, экспрессирующих CD44, выделенных из культуры аденокарциномы Эрлиха (АКЭ) 7 и 14-х суток развития.

Клетки АКЭ вводили внутривентриально (3×10^6 клеток) самкам мышей линии BALB/c и культивировали *in vivo*. На 7 и 14-е сутки получали культуру клеток АКЭ (АКЭ-7 и АКЭ-14). Популяцию клеток с маркером CD44 выделяли из АКЭ-7 (АКЭ-7CD44⁺) и АКЭ-14 (АКЭ-14CD44⁺) методом магнитной сепарации на магнитном сортере «iMagnet» («BD», США), криоконсервировали в асцитической жидкости без использования криопротекторов по двухэтапной программе (скорость охлаждения 1 град/мин до -80°C , 300–400 град/мин от -80 до -196°C) и снова культивировали *in vivo* (3×10^5 клеток на мышшь). Анализ процентного содержания субпопуляций с фенотипом CD44⁺CD24⁻ и CD44^{high} проводили на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («BD», США). Уровень экспрессии генов *nanog*, *oct4*, *sox2* определяли методом ОТ-ПЦР.

Установлено, что в культуре АКЭ, выращенной из нативных клеток АКЭ-7CD44⁺, содержание более дифференцированных клеток (CD44⁺CD24⁻) выше, чем в аналогичных криоконсервированных образцах, а содержание клеток-предшественников (CD44^{high}), наоборот, ниже. В культуре АКЭ, выращенной из АКЭ-14CD44⁺ наблюдались подобные эффекты, однако количество клеток-предшественников в культуре, выращенной из криоконсервированных образцов, было выше по сравнению с таковым в АКЭ-7CD44⁺. После культивирования криоконсервированных АКЭ-14CD44⁺ наблюдалось повышение уровня экспрессии генов *nanog*, *oct4*, *sox2*, а в нативных образцах – его снижение.

Таким образом, действие холода на СРК разных популяций опухолевых клеток изменяет направление их дальнейшей дифференцировки.

According to the theory of cancer stem cells (CSCs) gaining recently more evidence the tumor contains subpopulations of cancer cells with characteristics of stem or progenitor cells. One of the markers identifying CSCs is CD44. Due to the application of cryodestruction as both an independent method and auxiliary stage in the therapy of cancers, the issue about the effect of low temperatures on different subpopulations of tumor cells continues to be relevant.

The objective was to evaluate the effects of freeze-thawing processes on the tumor forming ability of cells expressing CD44, isolated from Ehrlich's carcinoma (EC) cell culture of 7 and 14 days of development.

EC cells were injected intraperitoneally (3×10^6 cells) to female BALB/c mice and cultured *in vivo*. To 7 and 14 days the EC cell culture (EC-7 and EC-14) was obtained. Cell population with CD44 marker was isolated from EC-7 (EC-7CD44⁺) and EC-14 (EC-14CD44⁺) by magnetic separation with magnetic sorter BD iMagnet (USA), then cryopreserved in ascitic fluid without cryoprotectant according two-stage program (1 deg/min cooling rate down to -80°C , 300–400 deg/min from -80 down to -196°C) and then recultured *in vivo* (3×10^5 cells per mouse). Percentage of subpopulations with phenotype CD44⁺CD24⁻ and CD44^{high} was analyzed with flow cytometer (BD FACSCalibur, USA). The expression level of *nanog*, *oct4*, *sox2* genes was determined by RT-PCR.

It was established that in EC culture, grown from native cells of EC-7CD44⁺, the content of more differentiated cells (CD44⁺CD24⁻) was higher than in similar cryopreserved samples but the content of precursor cells (CD44^{high}) *vice versa* was lower. In the EC culture grown from EC-14CD44⁺ we observed the similar effects, but the number of progenitor cells in a culture grown from cryopreserved samples was higher compared with those in the EC-7CD44⁺. After culturing cryopreserved EC-14CD44⁺ we noted an increased expression level of *nanog*, *oct4*, *sox2* genes, whereas in native samples the expression level of these genes was reduced.

Thus, the effect of cold on CSCs from different populations of tumor cells changes the direction of their further differentiation.

