



УДК 616-006.68:615.014.41:57.085.1

© 2012

Академік НАН України А. М. Гольцев, О. В. Сафранчук,
М. О. Бондарович, М. В. Останков, Н. М. Бабенко,
Ю. О. Гаєвська, О. В. Челомбітько

Методичні підходи до стабілізації структурного і функціонального станів кріоконсервованих клітин аденокарциноми Ерліха

Запропоновано схему і відпрацьовано методичний підхід щодо отримання стабілізованої культури пухлинних клітин аденокарциноми Ерліха (АКЕ) in vivo після кріоконсервування з певними структурними та функціональними характеристиками. На підставі оцінки репертуару мембранних структур та потенціалу самопідтримки доведено, що процедура стабілізації клітин АКЕ повинна складатися як мінімум з трьох етапів їх культивування по 7 діб. Збільшення кількості етапів культивування АКЕ не змінює ні фенотипічних, ні структурних характеристик стовбурових пухлинних клітин різного ступеня диференціювання.

На сьогодні онкологічні захворювання посідають друге місце після серцево-судинних зі смертності населення у світі. Класичними і найпоширенішими в клінічній практиці методами лікування злоякісних новоутворень є хіміо- і променева терапія як самостійні підходи або в комплексі з хірургічними втручаннями [1]. Залежно від ряду умов (стадія захворювання, локалізація пухлини та ін.) кожний з обраних методів має різний ступінь ефективності. Значними проблемами при проведенні протипухлинної терапії є дифузний, а не “локалізований” розподіл протипухлинних агентів та неадекватні концентрації лікарських засобів, які досягають пухлини.

Розробка різних терапевтичних заходів лікування онкопатології вимагає апробації їхньої дії в адекватних експериментальних умовах. У випадку онкозахворювань такою моделлю є аденокарцинома Ерліха (АКЕ) — лінія недиференційованих клітин раку молочної залози мишей, що перевивається *in vivo* [2]. Розвиток асцитної форми АКЕ носить стадійний характер, що включає фази високої та низької проліферативної активності клітин із накопиченням їх у перитонеальній порожнині (ПП) експериментальних тварин.

Для підтримки клітин АКЕ як постійної лінії можна використовувати періодичне перевивання культури *in vivo*. Однак у цьому випадку не виключене порушення генетичного

профілю лінії клітин, що перевивається. Так, на мезенхімальних стовбурових клітинах показано, що інтенсивне (екстенсивне) культивування пошкоджує їхню функціональну активність і надає їм виражені ознаки старіння і/або апоптозу [3].

Ефективним методом зберігання клітин АКЕ є кріоконсервування [4]. Проте на багатьох біологічних об'єктах показано, що після кріоконсервування в клітинах розвиваються нелетальні ушкодження, що викликає тимчасове порушення їхнього функціонального стану. Це супроводжується зміною мембранного рецепторного репертуару клітин, спрямованості їхнього диференціювання, інгібіцією проліферації, зниженням здатності розпізнавати мікрооточення і розселятися в ньому тощо [5].

Особливої уваги заслуговує вплив факторів кріоконсервування на стовбурові пухлинні клітини (СПК), які є нечисленною популяцією малодиференційованих клітин з потенціалом необмеженої самопідтримки [6]. СПК є головними структурними одиницями онкопроцесу та здатні не тільки формувати первинні злоякісні сайти, але й відповідати за підтримку росту та метастазування пухлини при злоякісних новоутвореннях мозку, молочної залози, простати, підшлункової залози, гемопоетичної системи тощо [7, 8]. Агресивність цих клітин обумовлена їхньою здатністю продукувати ауто- і паракринні цитокіни, хемокіни й ангіогенні фактори. Саме СПК є стійкими до хіміо- і променевої терапії, що і викликає рецидиви захворювання після їхнього проведення [9, 10].

Враховуючи успіхи з ідентифікації СПК за фенотиповими і деякими іншими характеристиками, робляться спроби керування станом СПК до і після проведення тих або інших видів терапії. СПК як пухлиноіндукуючим попередникам притаманна експресія широкого спектра імунофенотипічних маркерів. Для СПК солідних пухлин характерними є, наприклад, маркери CD44, CD133, CD24, ESA (epithelial surface antigen) та ін., що дають можливість виявляти їх у загальній популяції клітин [11]. Крім суто маркерної фенотипічної одиниці, кожна з цих структур реалізує важливе навантаження як рецептор комунікаційного і метаболічного потенціалу СПК, а також дозволяє оцінити ступінь їхнього диференціювання [10]. Оцінка рівня кількісної експресії молекули додає клітині визначений функціональний статус [12]. Наприклад, тільки клітини з високою щільністю CD44 молекул ідентифікуються як CD44^{hi}, мають усі ознаки СПК [11, 13]. Висока канцерогенність CD44^{hi} клітин підтверджується формуванням нової пухлини усього десятима такими клітинами, що в 10–50 разів перевищує канцерогенність пухлинних попередників іншого рівня диференціювання [14].

Використання технологій фенотипічного маркування пухлинних клітин-попередників, їхнього потенціалу самопідтримки і диференціювання, дає змогу не тільки ідентифікувати стадії, динаміку розвитку та інвазивність процесу, але й оцінити ступінь ревертації структурно-функціональних показників цих клітин після кріоконсервування [15].

Метою дослідження було стабілізувати в системі *in vivo* культуру клітин АКЕ після зберігання в низькотемпературному банку при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, тобто довести їхні структурні і функціональні показники до рівня, який притаманний пухлинним клітинам цієї форми до кріоконсервування.

Матеріали і методи. Експерименти проводили на 8-місячних самках мишей лінії BALB/c масою 16–18 г, що утримувалися в стандартних умовах віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Харків). Принципи проведення експериментів відповідали схваленим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) та положенням “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних і інших наукових цілей” (Страсбург, 1986).

Зберігання суспензії клітин АКЕ. Як первинну культуру використовували кріоконсервовані клітини АКЕ, що зберігалися в низькотемпературному банку Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Кріоконсервування суспензії клітин АКЕ здійснювали в пластикових ампулах (“Nunc”, США) без застосування класичних кріопротекторів у асцитичній рідині [4] в концентрації $1 \cdot 10^7$ клітин/мл об’ємом 1,8 мл на заморожувачі УОП-06 (СКТБ з ОВ ІПКіК НАН України). Умови кріоконсервування: швидкість охолодження $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, від -80 до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ зі швидкістю $300\text{--}400\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. Зразки відігрівали на водяній бані при $40\text{--}41\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом $45\text{--}50$ с при постійному шутелюванні ампул до зникнення твердої фази [2].

Стабілізація АКЕ. Відігріті клітини АКЕ “стабілізували” шляхом перевивання *in vivo* по 7 діб декілька разів, доки вони не набували структурно-функціональних ознак нативної культури [15]. Перед кожним перевиванням проводили атестацію клітин, що були культивовані: визначали об’єм накопиченої в ПП рідини (мл), підраховували абсолютну кількість ядровмісних клітин АКЕ у ній, оцінювали їхні імунофенотипічні характеристики та аналізували функціональний стан, тобто потенціал самопідтримки СПК різного рівня диференціювання.

Культивування клітин АКЕ в системі in vivo. Суспензію клітин АКЕ вводили внутрішньоочеревинно в дозі $3 \cdot 10^6$ /мишу в об’ємі 0,3 мл і культивували протягом 7 діб в ПП. До необхідної концентрації асцитичну рідину доводили фізіологічним розчином (“Черкаси-фарма”, Україна). Асцит із ПП одержували шприцом через голку № 10, попередньо вводячи мишей у легкий ефірний наркоз.

Оцінка імунофенотипічних характеристик клітин АКЕ. Для проведення такої атестації були використані моноклональні антитіла (“BD Pharmingen”, США) до CD44 (кон’юговані з FITC, № 553 133 за каталогом), а також CD24 (кон’юговані з PE, за каталогом № 553 262). За допомогою цих моноклональних антитіл були ідентифіковані: загальна фракція клітин з фенотипом $\text{CD44}^+/\text{CD24}^-$, а також CD44^{hi} — клітини, які входять до її складу і характеризуються найбільшою флуоресценцією за логарифмічною шкалою, з інтенсивністю сигналу 10^4 .

Імуноглобуліни тих самих ізотипів (за каталогом № 553988 і № 553989, “BD Pharmingen”, США) були використані як контроль. Концентрацію досліджуваних субпопуляцій клітин у зразках АКЕ визначали на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (“Becton Dickinson”, США). Для мінімізації помилок у пробах аналізували 10000 подій. Облік і аналіз результатів здійснювали за допомогою програми WinMDI 2.9.

Оцінка середньої інтенсивності флуоресценції (СІФ) є важливим компонентом аналізу стану трансформованих клітин при діагностиці онкозахворювань [12]. СІФ виміряли за логарифмічною шкалою інтенсивності сигналу в діапазоні від 64 до 1024 каналу і виражали в умовних одиницях, що відповідали середньому каналу максимального випромінювання маркера. Ступінь експресії CD44^{hi} маркера за СІФ визначали на вказаному проточному цитофлуориметрі.

Оцінка функціонального стану (проліферативного потенціалу) клітин АКЕ. Для оцінки проліферативного потенціалу загальної популяції АКЕ, а також реплікативної активності різного рівня диференціювання СПК обчислювали час подвоєння кількості цих клітин Td (від англ. Time doubling) за формулою $Td = T(\log N_f - \log N_0) \cdot 3,3219$, де T — час культивування клітин (год); 3,3219 — коефіцієнт переведення \log в \ln ; N_0 — початкова кількість клітин; N_f — кінцева кількість клітин.

Статистичний аналіз. Отримані результати статистично обробляли за методом Стьюдента в модифікації Фішера із застосуванням комп'ютерної програми MS Excel.

Результати та їх обговорення. Відомо, що після повернення клітин АКЕ в умови нормотермії зі стану глибокого і помірного холододового анабіозу в них розвиваються нелетальні ушкодження у вигляді зворотної інгібіції проліферативної активності пухлинних клітин і їхнього метаболізму [4]. Однак характер впливу факторів кріоконсервування на стан СПК у складі гетерогенної популяції клітин пухлини залишається маловивченим. Показники структурно-функціонального стану СПК мають низку притаманних їм характеристик, незважаючи на те, що вони варіюють у пухлинах різної локалізації та різного генезу [8].

Основні біомаркери СПК представлені як фенотипічні поверхневі (мембранні) молекули. Найбільшої уваги заслуговує CD44 молекула (CD-44 — насамперед рецептор до гіалуронової кислоти), яку експресують клітини багатьох типів пухлин, зокрема раку товстого кишечника, молочної залози, простати [6, 10]. При цьому тільки частина цих клітин, поряд з відсутністю експресії молекули CD24, гіперекспресує CD44-маркер і ідентифікується як CD44^{hi}, виявляючи всі ознаки СПК: здатність до самопідтримки, швидкого формування пухлин [6]. Проте в CD44⁺/24⁻ клітинах визначено високий рівень експресії проінвазивних генів Sox-2, Oct-4, Nanog, Vmi-1. Саме ці клітини також здатні формувати в організмі реципієнтів пухлини, але якщо CD44^{hi} — при введенні в дозі $1 \cdot 10^2$, то CD44⁺/24⁻ — у значно більшій дозі. Іншими словами, для кожної з цих популяцій пухлинних попередників існує різна “критична” маса щодо індукції пухлинного росту.

Встановлено (табл. 1), що нативні клітини АКЕ (контроль) формують в ПП об'єм асцитичної рідини не менш 3 мл із загальним вмістом клітин $3,5 \cdot 10^8$. При аналізі в загальному пулі АКЕ клітин з фенотипічними маркерами СПК показано, що концентрація CD44⁺/24⁻ клітин становить $(4,80 \pm 0,33)\%$, CD44^{hi} — $(0,38 \pm 0,017)\%$. При цьому час подвоєння зазначених клітинних популяцій повинен досягати таких значень: для CD44⁺/24⁻ клітин — $(2,8 \pm 0,16)$ год, а для CD44^{hi} — $(2,9 \pm 0,17)$ год [15].

Як видно з табл. 1, динаміка показників, що вивчалися протягом усього строку культивування АКЕ, мала свої особливості. Якщо об'єм асцитичної рідини в ПП та вміст найбільш інвазивної популяції CD44^{hi} серед клітин АКЕ мав тенденцію збільшуватися протягом усього строку спостереження, то загальний вміст клітин АКЕ в ПП досягав максимальних значень, істотно перевищуючи контрольні показники, після других 7 днів культивування зі значним зменшенням та стабілізацією їхньої кількості до рівня нативної культури на треті 7 днів культивування. Дуже важливо, що подібна динаміка була відзначена і для популяції більш диференційованих CD44⁺/24⁻ клітин.

Таблиця 1. Зміна структурно-функціональних характеристик АКЕ протягом стабілізації ($M \pm m$, $n = 5$)

| Показник | Строки стабілізації культури | | | Нативна культура (контроль) |
|--|------------------------------|--------------------|-----------------|-----------------------------|
| | перші 7 днів | другі 7 днів | треті 7 днів | |
| Об'єм асцитичної рідини, мл | $1,5 \pm 0,11^*$ | $3,1 \pm 0,22$ | $3,5 \pm 0,25$ | $3,5 \pm 0,24$ |
| Загальний вміст клітин в ПП, $n \cdot 10^8$ | $1,2 \pm 0,08^*$ | $7,65 \pm 0,05^*$ | $3,5 \pm 0,65$ | $3,5 \pm 0,71$ |
| Вміст CD44 ⁺ /24 ⁻ клітин, % | $5,02 \pm 0,35^*$ | $7,07 \pm 0,4^*$ | $4,10 \pm 0,33$ | $4,80 \pm 0,33$ |
| Вміст CD44 ^{hi} клітин, % | $0,03 \pm 0,002^*$ | $0,07 \pm 0,005^*$ | $0,36 \pm 0,02$ | $0,38 \pm 0,017$ |
| СІФ CD44 ^{hi} клітин, у. о. | $7465 \pm 525^*$ | $8036 \pm 562^*$ | 9096 ± 637 | 9110 ± 637 |
| Час подвоєння CD44 ⁺ /24 ⁻ клітин, год | $7,0 \pm 0,98^*$ | $3,9 \pm 0,27^*$ | $3,1 \pm 0,23$ | $2,8 \pm 0,16$ |
| Час подвоєння CD44 ^{hi} клітин, год | $10,8 \pm 0,76^*$ | $6,1 \pm 0,43^*$ | $3,2 \pm 0,22$ | $2,9 \pm 0,17$ |

* Результати мають достовірні відмінності зі стабілізованою культурою, $p < 0,05$.

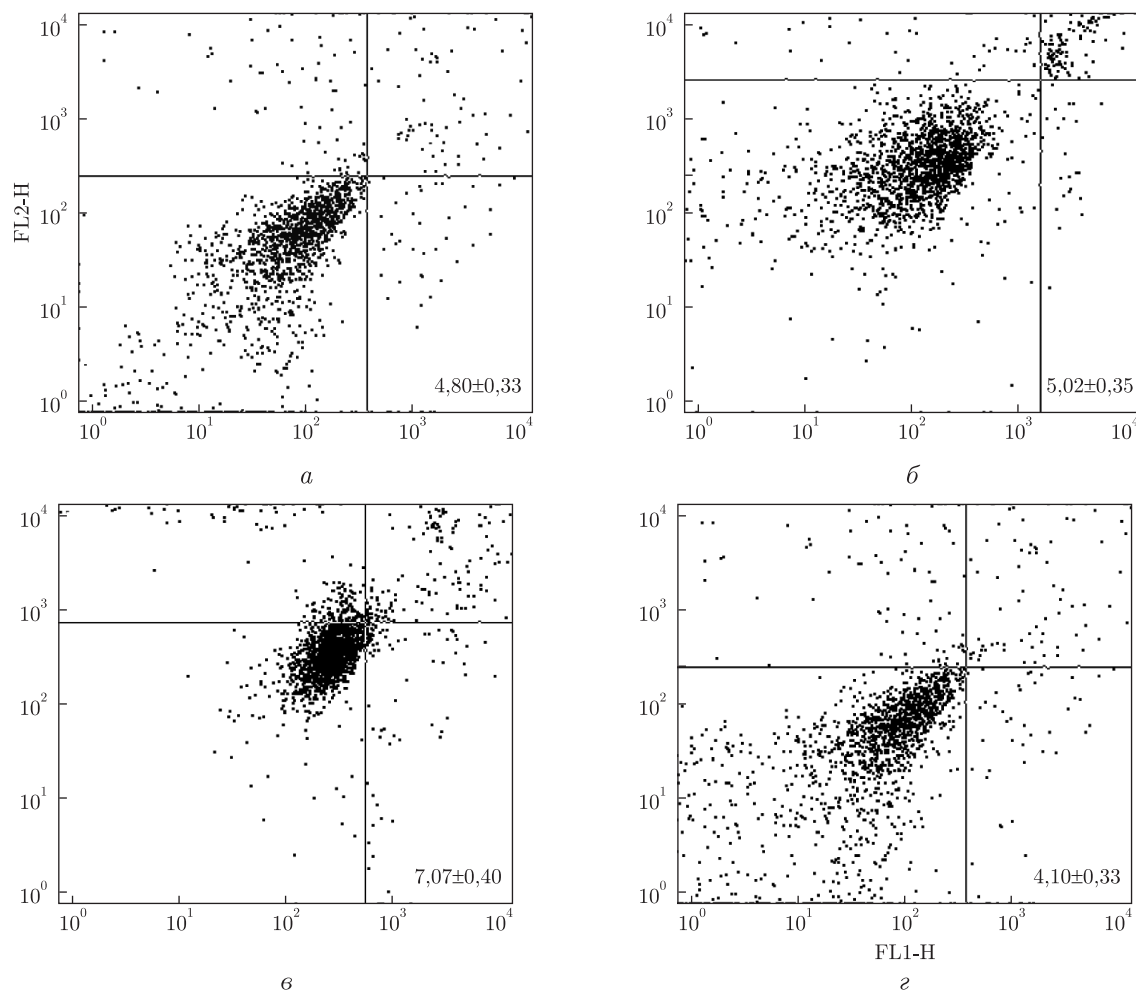


Рис. 1. Результати цитофлуориметричної оцінки вмісту $CD44^+/24^-$ клітин: *a* — нативної культури; *б* — після перших 7 діб; *в* — після других 7 діб; *г* — після третіх 7 діб стабілізації АКЕ

Після перших 7 діб стабілізації АКЕ загальний вміст клітин у ПП тварин становив тільки $(1,2 \pm 0,08) \cdot 10^8$ клітин в об'ємі 1,5 мл (див. табл. 1). При цьому в загальній популяції АКЕ концентрація більш диференційованих клітин-попередників з фенотипом $CD44^+/24^-$ становила $(5,02 \pm 0,35)\%$ (рис. 1, *б*), а менш диференційованих — $CD44^{hi}$ — $(0,03 \pm 0,002)\%$ (рис. 2, *б*). Протягом перших 7 діб культивування АКЕ показник Td був досить подовженим відносно показників нативної культури, а саме для $CD44^+/24^-$ клітин він становив $(7,0 \pm 0,98)$ год (див. табл. 1), а для $CD44^{hi}$ — $(10,8 \pm 0,76)$ год. Саме різниця в цих показниках є важливою для подальшого культивування протягом других 7 діб.

Після других 7 діб культивування практично всі показники АКЕ значно змінювалися і мали такі характеристики: загальний вміст клітин у ПП — $(7,65 \pm 0,05) \cdot 10^8$ клітин в об'ємі 3,1 мл, концентрація клітин з фенотипом $CD44^+/24^-$ — $(7,07 \pm 0,4)\%$ (див. рис. 1, *в*), $CD44^{hi}$ — $(0,07 \pm 0,005)\%$ (див. рис. 2, *в*). Час подвоєння для обох популяцій скоротився до $(3,9 \pm 0,27)$ і $(6,1 \pm 0,43)$ год відповідно (табл. 2). Треба зауважити, що різниця значень Td між субпопуляціями СПК не змінюється і становить 3 год, як на перші, так і на другі 7 діб культивування.

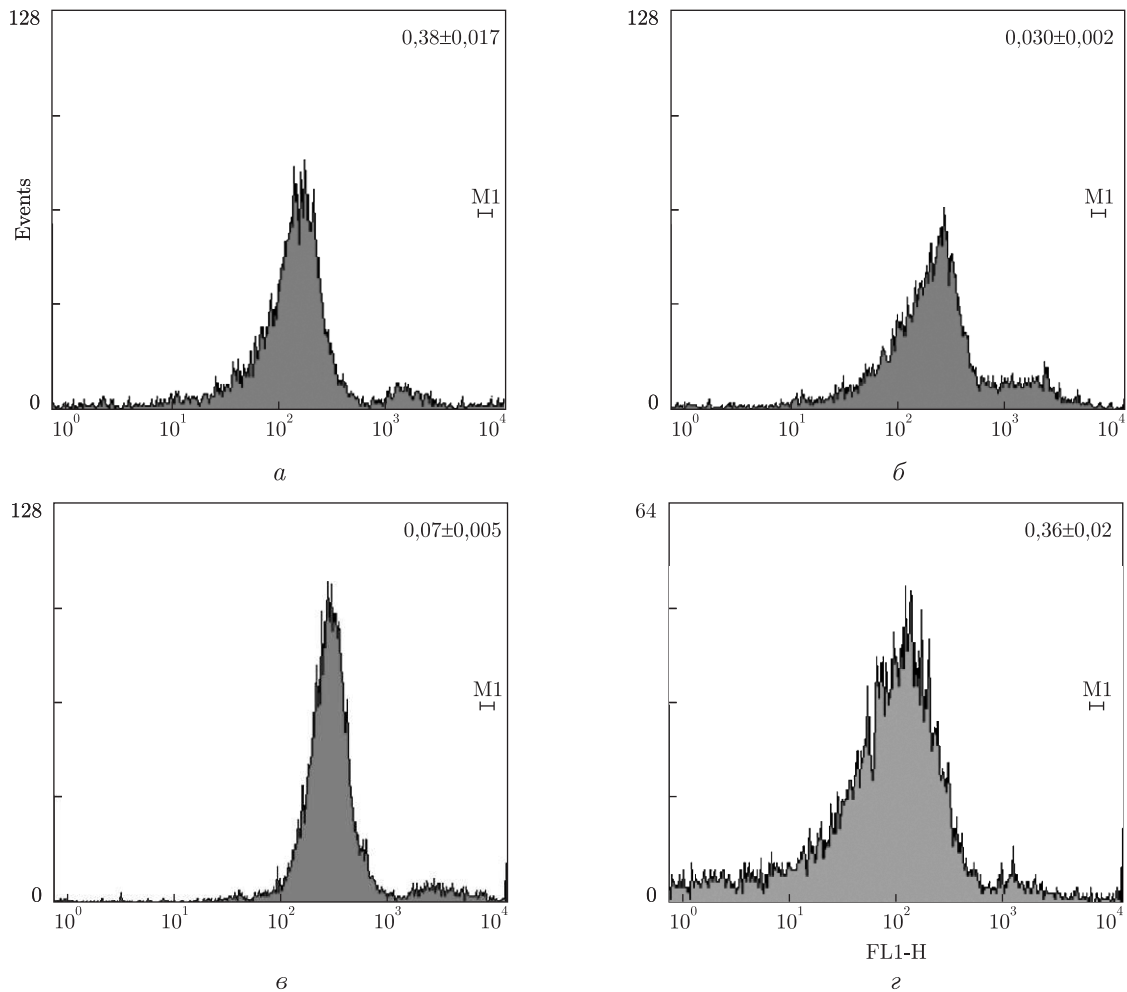


Рис. 2. Результати цитофлуориметричної оцінки вмісту $CD44^{hi}$ клітин: *a* — нативної культури; *б* — після перших 7 діб; *в* — після других 7 діб; *г* — після третіх 7 діб стабілізації АКЕ. M1 — зона високого рівня експресії маркера

Після третіх 7 діб стабілізації показники вже істотно наближалися до контрольних значень [15]. Загальний вміст клітин у ПП ($3,5 \cdot 10^8$ клітин) і об'єм асцитичної рідини (3,5 мл) зовсім не відрізнялися від контролю. Те саме можна сказати і про клітини з $CD44^+/24^-$ ($(4,10 \pm 0,33)\%$) (див. рис. 1, *г*) і $CD44^{hi}$ ($(0,36 \pm 0,02)\%$) маркерами (див. рис. 2, *г*). Найбільш важливим є той факт, що час подвоєння $CD44^+/24^-$ та $CD44^{hi}$ клітин практично збігався не тільки з контрольними значеннями, а і між собою.

Не виключено, що саме розходження в ступені експресії зазначених маркерів СПК на різних стадіях розвитку пухлини і обумовлює їхню резистентність до проведених терапевтичних заходів [12]. Відомо, що після криоконсервування рецепторний репертуар багатьох клітин змінюється за рахунок “шедингу” мембранних структур у відповідь на дію фізико-хімічних факторів кровопливу [5]. Як наслідок, може змінюватися здатність клітин до комунікації з мікрооточенням як у системі *in vivo*, так і *in vitro* [5, 15], тобто їхня функціональна активність. На цій підставі обов'язковим компонентом оцінки стану клітин АКЕ, а саме клітин з $CD44^{hi}$ маркером на етапах стабілізації, були вибрані саме показники СІФ

(див. табл. 1). Як видно, вже після перших 7 діб стабілізації, незважаючи на низький відсоток вмісту CD44^{hi} клітин (у 10 разів менший, ніж у контролі), у загальній популяції ступінь експресії маркера CD44 був досить високим, але достовірно нижчим, ніж у контролі (7465 ± 525 і 9110 ± 637 відповідно, $p < 0,05$). Після других 7 діб цей показник істотно наближався до показників контролю (8036 ± 562 і 9110 ± 637 , $p < 0,05$), продовжуючи зростати до третіх 7 діб стабілізації.

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що після кріоконсервування клітини АКЕ за своїми структурно-функціональними характеристиками значно відрізняються від нативних клітин. Для повернення кріоконсервованих клітин АКЕ до стану нативних (за обраними параметрами) необхідно провести процедуру їхньої стабілізації, яка складається як мінімум з трьох етапів культивування по 7 діб. У стабілізованій таким чином культурі АКЕ кількість клітин з маркерами, які притаманні СПК (CD44⁺/CD24⁻ і CD44^{hi}), не відрізнялась від відповідних значень нативних АКЕ [15]. З метою підтвердження подальшої незмінності показників протягом наступних двох тижнів культивування була проведена додаткова їхня атестація, яка встановила, що увесь спектр показників АКЕ залишався стабільним (дані не наведено). Тільки у цьому випадку можна вважати що після трикратного 7-добового послідовного культивування культура АКЕ є стабілізованою після кріоконсервування і придатною для подальшого використання, в тому числі атестації впливу різних форм протипухлинних агентів.

Отже, на підставі результатів дослідження розроблено схему і відпрацьовано методичний підхід отримання стабілізованої культури клітин АКЕ після кріоконсервування з певними структурно-функціональними характеристиками з урахуванням гетерогенного складу популяції пухлинних клітин.

1. Новик А. В., Моусеєнко В. М. Теоретические предпосылки адьювантной терапии злокачественных опухолей // *Практ. онкология*. – 2007. – 8, № 3. – С. 109–117.
2. Эммануэль Н. М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. – Москва: Наука, 1977. – 419 с.
3. Cognet P. A., Minguell J. J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells // *J. Cell Physiol*. – 1999. – 181. – P. 67–73.
4. Федец О. И. Биоэнергетика и пролиферативная активность кріоконсервированных клеток аденокарциномы Эрлиха: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1987. – 36 с.
5. Goltsev A. N., Babenko N. N., Dubrava T. G. et al. Modification of the state of bone marrow hematopoietic cells after cryopreservation // *Intern. J. Refrigeration*. – 2006. – 29, No 3. – P. 358–367.
6. Al-Hajj M., Wicha M. S., Benito-Hernandez A. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2003. – 100, No 7. – P. 3983–3989.
7. Бондарович Н. А., Гольцев К. А. Определение содержания CD44⁺ CD24⁻ клеток как дополнительный критерий оценки эффективности превентивной терапии онкопатологии в эксперименте // *Пробл. криобиологии*. – 2008. – 18, № 1. – С. 5–9.
8. Prince M. E., Sivanadan R., Kaczorowski A. et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2007. – 104, No 3. – P. 973–978.
9. Erato A., Ricci-Vitiani L., Zeuner A. et al. Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells // *Cell Death Differ*. – 2006. – 13, No 7. – P. 1238–1241.
10. Nakshatri H. Radiation resistance in breast cancer: are CD44⁺/CD24⁻ / proteasome^{low}/PKH26⁺ cells to blame? // *Ibid*. – 2010. – 12, No 2. – P. 105.
11. Fillmore C., Kuperwasser C. Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man? // *Breast Cancer Res*. – 2007. – No 3. – P. 303–306.
12. Гольцев А. Н., Сафранчук О. В., Бондарович Н. А. и др. Влияние факторов кріоконсервирования на уровень экспрессии маркеров стволовых раковых клеток в аденокарциноме Эрлиха // *Биол. вестник*. – 2009. – 13, № 1–2. – С. 13–16.

13. Abraham B. K., Fritz P., McClellan M. et al. Prevalence of CD44⁺/CD24⁻/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favour distant metastasis // Clin. Cancer Res. – 2005. – **11**, No 3. – P. 1154–1159.
14. Hermann P. C., Huber S. L., Herrler T. et al. Distinct populations of cancer stem cells determines tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer // Cell Stem Cell. – 2007. – **1**, No 3. – P. 313–323.
15. Гольцев А. М., Сафранчук О. В., Бондарович М. О. та ін. Зміна кріолабільності стовбурових пухлинних клітин залежно від фази росту аденокарциноми // Фізіол. журн. – 2011. – **57**, № 4. – С. 68–76.

Інститут проблем кріобіології
і кріомедицини НАН України, Харків

Надійшло до редакції 21.02.2012

Академик НАН України **А. Н. Гольцев, О. В. Сафранчук, Н. А. Бондарович, М. В. Останков, Н. Н. Бабенко, Ю. А. Гаевская, О. В. Челомбитко**

Методические подходы стабилизации структурного и функционального состояний криоконсервированных клеток аденокарциномы Эрлиха

Предложена схема и отработан методический подход получения стабилизированной культуры опухолевых клеток аденокарциномы Эрлиха (АКЭ) in vivo после криоконсервирования с определенными структурными и функциональными характеристиками. На основании оценки репертуара мембранных структур и потенциала самоподдержания доказано, что процедура стабилизации клеток АКЭ должна складываться как минимум из трех этапов их культивирования по 7 суток. Увеличение числа этапов культивирования АКЭ не изменяет ни фенотипических, ни структурных характеристик стволовых опухолевых клеток разной степени дифференцировки.

Academician of the NAS of Ukraine **A. N. Goltsev, O. V. Safranchuk, N. A. Bondarovich, M. V. Ostankov, N. N. Babenko, Yu. A. Gaevskaya, O. V. Chelombitko**

Methodological approaches to the stabilization of structural and functional states of Ehrlich adenocarcinoma cryopreserved cells

The scheme is proposed, and a methodological approach to the production of a stabilized culture of Ehrlich adenocarcinoma (EAC) tumor cells in vivo having certain structural and functional characteristics after cryopreservation is worked out. By assessment of the membrane structure repertoire and the self-supporting potential, it is demonstrated that the EAC cell stabilization procedure should consist of at least three stages of their cultivation each of 7 days. An increase in the number of EAC cultivation stages doesn't change phenotypic or structural characteristics of stem tumor cells of different differentiation degrees.