

Определение содержания CD44⁺CD24⁻ клеток как дополнительный критерий оценки эффективности превентивной терапии онкопатологии в эксперименте

UDC 576.385.5.085.23:616.006

N.A. BONDAROVICH*, K.A. GOLTSEV

Estimation of Content of CD44⁺CD24⁻ Cells as Additional Criterion of Efficiency of Preventive Therapies in Experiment at Oncological Pathology

Одна из основных задач современной онкологии – разработка методов ранней диагностики развития патологического процесса [10]. К сожалению, используемые такие диагностические критерии их клинической манифестации, как гистологические характеристики, гормональный фон организма опухоленосителя [6] приемлемы только при очевидном проявлении опухоли и не применимы при раннем протекании онкологического процесса.

В последние годы было установлено [8], что развитие опухоли связано со стволовыми раковыми клетками (СРК). Эти клетки представлены CD44⁺CD24⁻ клетками с гиперэкспрессией по CD44 молекуле (CD44^{high}). Выявление этих клеток может иметь важное диагностическое значение, а также помочь в выборе методов лечения онкопатологии [10]. Один из таких методов – введение в организм опухоленосителя клеток фетальной печени (КФП) до клинической манифестации опухоли. Предпосылкой этому является установленная способность КФП синтезировать вещества с иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью [1, 3, 9]. Так как необходимо создать запасы КФП, их применяют в основном после криоконсервирования, которое, как известно, может в различной степени модифицировать состояние КФП. Поэтому большое значение при онкопатологии имеет оценка терапевтического эффекта криоконсервированных КФП.

Цель данной работы – идентификация CD44⁺CD24⁻ и CD44^{high} клеток в молочных железах (МЖ) мышей линии С3Н с генетически детерминированным развитием рака молочной железы, которых не лечили или превентивно лечили криоконсервированными КФП.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38
(057) 373-57-89, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

One of the main tasks of contemporary oncology is development of the methods of early diagnosis of pathological process development [10]. Unfortunately, such diagnostic criteria of their clinical manifestation as histological characteristics, hormonal background of an organism of tumor-carrier are acceptable only at evident manifestation of tumor and not applicable at early course of oncological process.

Recently it has been found [8] that the development of tumor is related to stem cancer cells (SCSs). These cells are represented by CD44⁺CD24⁻ cells with hyperexpression on CD44 molecule (CD44^{high}). Revealing of these cells may be of important diagnostic value, as well as be helpful during the choice of treatment methods in oncopathology [10]. One of these methods is introduction into tumor carrier organism of fetal liver cells (FLCs) prior to clinical manifestation of tumor. The precondition for this is the established ability of FLCs to synthesize the substances with immune modulating and anti-tumor activity [1, 3, 9]. For creation of the stocks the FLCs are mainly applied after cryopreservation, which is known to differently modify the FLCs state. Therefore the estimation of therapeutic effect of cryopreserved FLCs is of a great value at oncopathology.

The research aim is to identify the CD44⁺CD24⁻ and CD44^{high} cells in mammary glands (MGs) of C3H mice with genetically determined breast cancer, not treated or preventively treated with FLCs.

Materials and methods

Research was carried out in 16 months' C3H and CBA (control) female mice. C3H mice of the control group have been distributed into 3 groups: 1 – with no visible manifestation of breast cancer; 2 – with one tumor; 3 – with two and more tumors; 4 – after

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 5789, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Материалы и методы

Исследование проводили на 16-месячных мышках-самках линии СЗН и СВА (контроль). Мыши СЗН были распределены на 6 групп: 1 – без видимых проявлений рака молочной железы; 2 – с одной опухолью; 3 – с двумя и более опухолями; 4 – после введения клеток взрослой печени, взятой в качестве дополнительной контрольной группы; 5 – превентивно лечили криоконсервированными КФП; 6 – аналогично лечили нативными КФП. КФП 15 суток гестации были получены у мышей линии С57В1.

Клетки фетальной печени криоконсервировали под защитой 10%-го ДМСО на установке ОП-06 ИПКиК НАНУ, используя режим замораживания 1°C/мин до –25°C с последующим погружением в жидкий азот. Отогревали на водяной бане при 40°C. Сохранность клеток определяли по методу суправитального окрашивания трипановым синим [2] и бромистым этидием [7].

Криоконсервированные или нативные КФП, а также клетки взрослой печени (контроль) вводили внутривенно в дозе 1×10^6 и 5×10^6 6-месячным мышам линии СЗН, т. е. до проявления каких-либо внешних признаков развития патологии. Мышей умерщвляли путем дислокации шейных позвонков. Эксперименты выполняли в соответствии с “Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

Объектом исследования служили ткани молочных желез (МЖ) и, при наличии, опухоли, локализованные в них. При определении содержания $CD44^+CD24^-$, $CD44^+CD24^+$ и $CD44^{high}$ (СРК) клеток в исследуемом материале на проточном цитометре FACS Calibur (BD, США) использовали анти-мышинные $CD44$ и $CD24$ МАТ (BD, PharminGen). Для анализа полученных результатов применяли программу WinMdi 2.8. Статистическую обработку данных проводили по методу Стьюдента с применением компьютерной программы Excel.

Результаты и обсуждение

Установлено, что у 16-месячных мышей линии СЗН содержание $CD44^+CD24^-$ и СРК в МЖ варьировало в зависимости от характера выраженности опухолевого процесса. Так, даже у мышей без визуальной видимой и пальпаторно не определяемой опухоли (группа 1) отмечали достоверное увеличение по сравнению с контролем $CD44^+CD24^-$ клеток и появление СРК в МЖ (рис. 1).

Переход на следующую стадию развития опухолевого процесса, отражением которого служила клиническая его манифестация в МЖ, приводил к изменениям в содержании каждой из определяемых субпопуляций клеток по сравнению с

introduced adult liver cells, used as additional control group; 5 – preventively treated with cryopreserved FLCs, 6 – the same, treated with native FLCs. Fetal liver cells of the 15th gestation day were obtained from С57В1 mice.

The cells of fetal liver were cryopreserved under protection of 10% DMSO using the device UOP-06 of the Experimental Production Unit of the IPC&C with freezing regimen of 1°C/min down to –25°C with following submerging into liquid nitrogen. They were thawed on water bath at 40°C. The cell integrity was found on the method of supravital staining with trypan blue [2] and ethidium bromide [7].

Cryopreserved or native FLCs as well as adult liver cells (control) were intravenously injected in a dose of 1×10^6 and 5×10^6 to 6-months' СЗН mice, *i.e.* up to the appearance of any external features of pathology development. The mice were devitalized by means of dislocation of cervical vertebrae. The experiments were performed according to the “European Convention about protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes” (Strasbourg, 1985).

The research object were the tissues of mammary glands (MGs) and those with tumors, if there are any. When determining the content of $CD44^+CD24^-$, $CD44^+CD24^+$ and $CD44^{high}$ (SCSs) in the studied material with flow cytometer FACS caliber (BD, USA) there were used anti-murine $CD44$ and $CD24$ MAB (BD, PharminGen). For analysis of the obtained results the WinMdi 2.8 software 2.8 was applied. The data were statistically processed using Student method with Excel software.

Results and discussion

It has been established that in 16 months' СЗН mice the content of $CD44^+CD24^-$ and SCSs in MGs varied depending on the character of tumor process manifestation. So, even in mice with no visual and palpatory non-found tumor (Group 1) there was revealed statistically significant rise if compared with the control of $CD44^+CD24^-$ cells and appearance of SCSs in MGs (Fig. 1).

Transition to other development stage of tumor process, which was reflected by its clinical manifestation in MGs, resulted in the changes of the content of each of the found cell sub-populations, if compared, with the control indices. The character of these changes was much dependent on the number of developed tumors in MGs.

During manifestation of one tumor (Group 2) the number of SCSs and $CD44^+CD24^-$ cells in MGs was the same as in mice with no tumor. In the tumor itself their content was significantly reduced (Fig. 1). The cause of these changes may be modification of the spectrum of growth factors, produced by appeared

показателями контроля. Характер таких изменений во многом зависел от количества развившихся опухолей в МЖ.

При появлении одной опухоли (группа 2) количество СРК и CD44⁺CD24⁻ клеток в МЖ было таким же, как и у мышей без опухоли. В самой же опухоли их содержание было существенно снижено (рис. 1). Причиной этих изменений может быть модификация спектра ростовых факторов, продуцируемых проявившейся опухолью. В основе данного феномена может также лежать дифференцировка СРК в более зрелые формы, что подтверждалось повышенным содержанием более зрелых CD44⁺CD24⁺ клеток, или же миграция их в другие органы. Последнее основывается на важной роли CD44 молекул в обеспечении способности СРК к диссеминации (адгезии), которая утрачивается при экспрессии на их поверхности CD24 молекул [10].

При формировании нескольких опухолей (группа 3) наблюдалось более чем 6–7-кратное увеличение в МЖ клеток CD44⁺CD24⁻, отмечалось высокое содержание клеток с максимальным уровнем экспрессии CD44^{high}. В 3 раза по сравнению с контролем повышалось и содержание CD44⁺CD24⁺ клеток. Увеличение CD44⁺CD24⁻ клеток в опухолях было менее выраженным, а клетки с маркером CD44^{high} обнаруживались крайне редко.

Учитывая важную патогенетическую роль в развитии первично множественных опухолей в МЖ эстрогенов яичников [5], можно предположить, что столь высокий уровень СРК в МЖ мышей данной группы является следствием проявления, наряду с действием вируса ММТВ, трансформирующего влияния эстрогенов.

После проведения превентивного лечения криоконсервированными или нативными КФП развития пальпируемых опухолей в области МЖ мышей, выживших к 16 месяцам, не наблюдалось. Применение клеток взрослой печени (группа 4) не оказывало достоверного влияния на частоту развития опухоли, как и на содержание CD44⁺CD24⁻ клеток и СРК. Несмотря на то, что снижение CD44⁺CD24⁻ клеток в МЖ отмечали во всех группах животных, которых лечили КФП, максимальное приближение данного показателя к контрольным значениям было достигнуто при использовании криоконсервированных КФП в дозе 5×10⁶ (5 группа) и нативных – в дозе 1×10⁶ (6 группа). Клетки с фенотипом CD44^{high} имели сходную зависимость от вида и дозы вводимых клеток (рис. 2).

Эффект снижения СРК в МЖ может быть связан с альфа-фетопротееином, который вырабатывается введенными КФП. Было показано [12], что

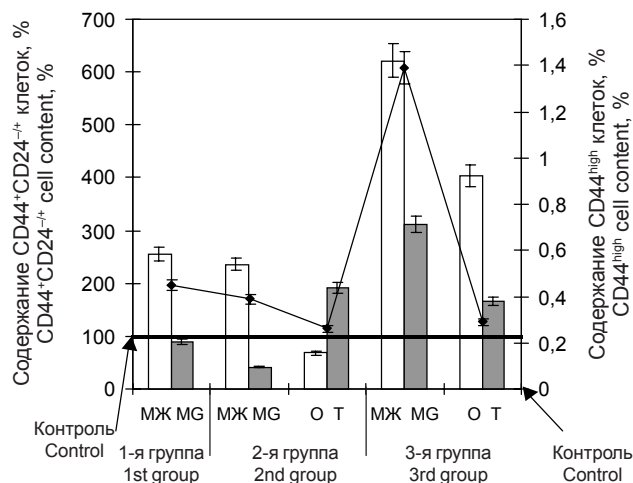


Рис. 1. Содержание CD44⁺CD24⁻ (□), CD44⁺CD24⁺ (■) и CD44^{high} (◆) клеток в МЖ; О – опухоли у мышей линии С3Н без лечения; 1 группа – без визуального проявления патологического процесса; 2 группа – с развитием единичной опухоли; 3 группа – с развитием нескольких опухолей; за 100% приняты значения содержания CD44⁺CD24⁻, CD44⁺CD24⁺ клеток у мышей линии СВА.

Fig. 1. Content of CD44⁺CD24⁻ cells (□); CD44⁺CD24⁺ (■) and CD44^{high} (◆) cells in MG; T – tumors in C3H mice with no treatment; 1st group with no visual manifestation of pathological process; 2nd group with development of single tumors; 3rd group: with development of some tumors; the values of content of CD44⁺CD24⁻, CD44⁺CD24⁺ cells in CBA mice are assumed as 100%.

tumor. In the base of this phenomenon may lay the differentiation of SCSs into more mature forms, that was confirmed with increased content of more mature CD44⁺CD24⁻ cells, or their migration into other organs, the latter was based on an important role of CD44 molecules in providing the ability of SCSs to dissemination (adhesion), which was lost during expression on their surface of CD24 molecules [10].

During the formation of several tumors (Group 3) there was observed more than 6–7 times rise of CD44⁺CD24⁻ cells in MGs, a high content of cells with maximum level of CD44^{high} expression was noted. In 3 times, if compared with the control the content of CD44⁺CD24⁻ cells increased. The rise of CD44⁺CD24⁻ cells in tumors was less manifested and the cells with CD44^{high} markers was found very seldom.

Taking into account the pathogenetic role of ovarian estrogens in development of primarily multiple tumors in MGs [5], it may be supposed that quite a high level of SCSs in MGs of mice of this group is the consequence of manifestation along with the MMTV virus influence transforming effect of estrogens.

After preventive treatment with cryopreserved or native FLCs no development of palpated tumors in MGs of mice survived to the 16 months was observed. Application of adult liver cells (group 4) did not cause the statistically significant effect on the frequency of tumor development as well as the content of

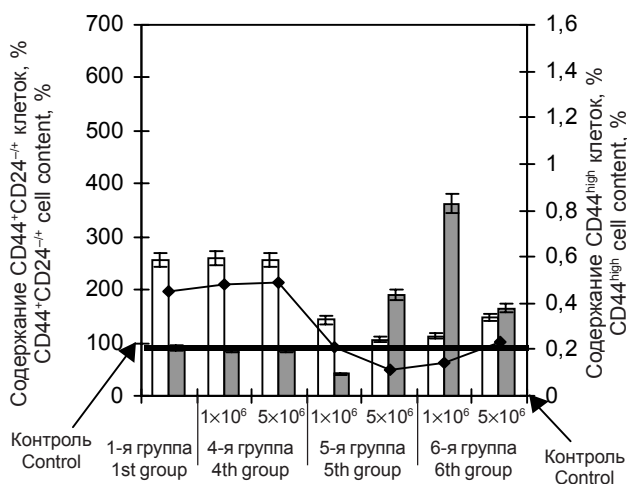


Рис. 2. Содержание CD44⁺CD24⁻ (□), CD44⁺CD24⁺ (■) и CD44^{high} (◆) клеток в МЖ мышей линии С3Н после лечения КФП: 4 группа – с введением клеток взрослой печени; 5 группа – с введением криоконсервированных КФП; 6 группа – с введением нативных КФП; за 100% приняты значения содержания CD44⁺CD24⁻, CD44⁺CD24⁺ клеток у мышей линии СВА; (1×10⁶) – доза введенного биоматериала.

Fig. 2. Content of CD44⁺CD24⁻ cells (□) and CD44⁺CD24⁺ (■) and CD44^{high} (◆) cells in MG: T – tumors in C3H mice after treatment with FLCs; 4 group with introduction of adult liver cells; 5 group with cryopreserved FLCs; 6 group with native FLCs; the values of content of CD44⁺CD24⁻, CD44⁺CD24⁺ cells in CBA mice are assumed as 100%; (1×10⁶) – dose of introduced biomaterial.

данный цитокин обладает свойством связывать эстрогены, тем самым предотвращая трансформирующее их действие на клетки МЖ. Другим свойством альфа-фетопротейна является его апоптоз индуцирующее действие [9].

Известно [3, 4], что КФП обладают иммуномодулирующими свойствами, способными восстанавливать функцию клеток иммунной системы (ИС), участвуя в противоопухолевой защите. В связи с этим по снижению уровня СРК можно судить о степени восстановления функционального статуса ИС животного. Среди синтезируемых КФП биологически активных веществ следует выделить интерферон [11], который не только реализует каскад межклеточных взаимодействий, наделяющих ИС противоопухолевой резистентностью, но и обеспечивает противовирусную защиту, снижая степень заражения клеток вирусом ММТВ.

Разное влияние нативных и криоконсервированных КФП на содержание СРК, очевидно, обусловлено тем, что криоконсервирование способствует модификации синтетической активности клеток под действием факторов замораживания-отогрева, которое приводит к снижению синтеза одних и усилению других цитокинов, что влияет на их терапевтический эффект.

Выводы

1. Проведенные исследования позволили установить, что у мышей без клинической манифестации опухоли содержание CD44⁺CD24⁻ клеток в МЖ выше, чем в контроле, появляются клетки CD44^{high}.

2. Превентивная терапия КФП предотвращала формирование пальпируемых опухолей у 16-месячных животных.

3. Исследования терапевтического действия КФП показали, что предварительно введенные криоконсервированные КФП в дозе 5×10⁶ и натив-

CD44⁺CD24⁺ cells and SCSs. In spite of the fact, that the reduction of CD44⁺CD24⁺ cells in MGs was found in all groups of animals treated with FLCs, the maximum approach of this index to the control values was achieved when cryopreserved FLCs in a dose of 5×10⁶ (5 group) and native ones in a dose of 1×10⁶ (6 group) were used. The cells with phenotype CD44^{high} had similar dependence on the type and dose of the cells to be introduced (Fig. 2).

The reduction effect of SCSs in MGs may be related to alpha-fetoprotein produced by injected FLCs. This cytokine has been shown as having the property to bind estrogens [12], thereby preventing their transforming effect on MGs cells. Other property of alpha-fetoprotein is its apoptosis-inducing effect [9].

It is known [3, 4] that FLCs possess immune modulating properties capable of recovering the function of immune system (IS) cells, being the part of anti-tumor protection. In this connection on the reduction of the SCS level one can judge in the recovery rate of animal's IS functional status. Among the synthesized FLCs of biologically active substances interferon should be emphasized [11], it does not only realize the cascade of intercellular relationships, providing IS with anti-tumour resistance, but also provides anti-viral protection by means of decreasing the extent of cell contamination with MMTV virus.

Different effect of native and cryopreserved FLCs on SCS content is evidently stipulated by the fact that cryopreservation contributes to modification of synthetic activity of cells under freeze-thawing factors, resulting in a reduction of the synthesis of ones and strengthening of others cytokines, affecting their therapeutic influence.

Conclusions

1. Performed studies enabled to establish that in mice with no clinical manifestation of tumor the content of CD44⁺CD24⁻ cells MG is higher, than in the control, CD44^{high} appear.

2. Preventive therapy of FLCs prevented the formation of palpated tumors on 16 months' animals.

ные в дозе 1×10^6 в большей степени, чем остальные разновидности КФП, изменяют содержание СРК в МЖ, приближая к контрольным значениям.

Литература

1. Бельский Ю.П., Данилец М.Г., Бельская Н.В. и др. Роль оксида азота в иммуносупрессорной и противоопухолевой активностях клеток эмбриональной печени // Бюл. СО РАМН.– 2005.– Т. 116, №2.– С. 75–78.
2. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Дубрава Т.Г. и др. Функциональная активность криоконсервированных клеток (КОЕс) в зависимости от компонентного состава миелотрансплантата // Пробл. криобиологии.– 1993.– №4.– С. 34–39.
3. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Дубрава Т.Г. и др. Обоснование возможности использования продуктов фетоплацентарного комплекса (ПФПК) как иммуномодуляторов при алломиелотрансплантации // Материалы 1 Национального Конгресса Украины по иммунологии, аллергологии и иммунореабилитации.– Алушта, 1998.– С.48–49.
4. Дамбаев Г.Ц., Гюнтер В.Э., Хлусов И.А. и др. Новые технологии в лечении онкопатологии // Бюл. СО РАМН.– 2004.– Т. 112, №2.– С. 64–69.
5. Сорокин В.М., Александров А.Л. Гормональная терапия больных раком молочной железы как метод профилактики первично-множественных злокачественных опухолей // Онкология.– 2002.– Т. 4, №4.– С. 34–38.
6. Тарутинов В.И. Вопросы и перспективы гормонотерапии больных раком молочной железы // Онкология.– 2005.– Т. 7, №2.– С. 1–4.
7. Dankberg F., Persidsky M.D. A test of granulocyte integrity and phagocytic function // Cryobiology.– 1976.– Vol. 13, N4.– P. 430–432.
8. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 2003.– Vol. 100, N7.– P. 3983–3989.
9. Dudich E., Semenikova L., Dudich I. et al. α -Fetoprotein causes apoptosis in tumor cells via a pathway independent of CD95, TNFR1 and TNFR2 through activation of caspase-3-like proteases // Eur. J. Biochem.– 1999.– Vol. 266, N3.– P. 750–761.
10. Mylona E., Giannopoulou I., Fasomytakis E. et al. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44⁺/CD24^{-low} and CD44⁺/CD24⁺ tumor cells in invasive breast carcinomas // Human Pathology.– 2008.– Vol. 39, N7.– P. 1096–1102.
11. Sennikov S.V., Krysov S.V., Injelevskaya T.V. et al. Production of cytokines by immature erythroid cells derived from human embryonic liver // European Cytokine Network.– 2001.– Vol. 12, N2.– P. 274–279.
12. Vakharia D., Mizejewski G.J. Human alpha-fetoprotein peptides bind estrogen receptor and estradiol, and suppress breast cancer // Breast Cancer Res. Treat.– 2000.– Vol. 63, N1.– P. 41–52.
13. Wicha M.S. Cancer stem cells and metastasis: lethal seeds // Clin. Cancer Res.– 2006.– Vol. 12, N19.– P. 5606–5607.

Поступила 13.05.2008

3. Examining of therapeutic effect of FLCs have shown that preliminary introduced cryopreserved FLCs in a dose of 5×10^6 and native ones in a dose of 1×10^6 in a greater extent than the rest types of FLCs change the content of SCCs in MG, approaching them to the control.

References

1. Belsky Yu.P., Danilets M.G., Belskaya N.V. et al. Role of nitric oxide in immune suppressive and anti-tumor activities of fetal liver cells // Bul. of ND of Russian Academy of Sciences. – 2005.– Vol. 116, N2.– P. 75–78.
2. Goltsev A.N., Ostankova L.V., Dubrava T.G. et al. Functional activity of cryopreserved cells (CFUs) depending on component composition of myelotransplant// Problems of Cryobiology.– 1993.– N4.– P. 34–39.
3. Goltsev A.N., Ostankova L.V., Dubrava T.G. et al. Stipulation of possible use of products of fetoplacental complex (PFPC) at allomyelotransplantation// Proc. of the 1st National Congress of Ukraine in immunology, allergology and immune rehabilitation.– Alushta, 1998.– P. 48–49.
4. Dambaev G.Ts., Hunter V.E., Khlusov I.A. et al. New technologies in treatment of oncopathology// Bul. ND of Russian Academy of Sciences.– 2004.– Vol. 112, N2.– P. 64–69.
5. Sorokin V.M., Aleksandrov A.L. Hormonal therapy of breast cancer patients as the method of prophylaxis of primary multiple malignant tumors// Oncologiya. – 2002.– Vol. 4, N4.– P. 34–38.
6. Tarutinov V.I. Questions and perspectives of hormone-therapy of breast cancer patients// Oncologiya.– 2005.– Vol. 7, N2.– P. 1–4.
7. Dankberg F., Persidsky M.D. A test of granulocyte integrity and phagocytic function // Cryobiology.– 1976.– Vol. 13, N4.– P. 430–432.
8. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 2003.– Vol. 100, N7.– P. 3983–3989.
9. Dudich E., Semenikova L., Dudich I. et al. α -Fetoprotein causes apoptosis in tumor cells via a pathway independent of CD95, TNFR1 and TNFR2 through activation of caspase-3-like proteases // Eur. J. Biochem.– 1999.– Vol. 266, N3.– P. 750–761.
10. Mylona E., Giannopoulou I., Fasomytakis E. et al. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44⁺/CD24^{-low} and CD44⁺/CD24⁺ tumor cells in invasive breast carcinomas // Human Pathology.– 2008.– Vol. 39, N7.– P. 1096–1102.
11. Sennikov S.V., Krysov S.V., Injelevskaya T.V. et al. Production of cytokines by immature erythroid cells derived from human embryonic liver // European Cytokine Network.– 2001.– Vol. 12, N2.– P. 274–279.
12. Vakharia D., Mizejewski G.J. Human alpha-fetoprotein peptides bind estrogen receptor and estradiol, and suppress breast cancer // Breast Cancer Res. Treat.– 2000.– Vol. 63, N1.– P. 41–52.
13. Wicha M.S. Cancer stem cells and metastasis: lethal seeds // Clin. Cancer Res.– 2006.– Vol. 12, N19.– P. 5606–5607.

Accepted in 13.05.2008