

Морфофункциональные характеристики стволовых опухолевых клеток до и после криоконсервирования

Morphofunctional Characteristics of Cancer Stem Cells Prior to and After Cryopreservation

Характер воздействия факторов криоконсервирования на биологические объекты приобретает особую значимость, если биообъектом выступают злокачественно трансформированные клетки и ткани. С одной стороны, очевидна необходимость агрессивного криовоздействия для криодеструкции злокачественного новообразования, с другой – „лояльность” для сохранения репулационного потенциала опухолевых клеток при криоконсервировании их в виде суспензионных прививаемых культур. В обоих случаях как мишенью для криодеструкции, так и „опекаемой” структурой являются стволовые элементы клеточно-тканевых субстратов такого рода. К стволовым раковым клеткам (СРК) относят небольшую группу клеток, способных к самоподдержанию, что позволяет их сравнивать с нормальными стволовыми клетками [9-11]. Показано, что в опухолях различной локализации и гистогенеза клетки с такими характеристиками присутствуют среди клеток с фенотипом $CD44^{+}/24^{-}$ и имеют высокую степень экспрессии $CD44$ ($CD44^{high}$) молекул. Для формирования новой опухоли достаточно 10 клеток $CD44^{high}$, что в 10–50 раз превышает канцерогенный потенциал других опухолевых клеток [5-8]. $CD44^{high}$ – не единственный молекулярный маркер СРК, однако его детальное исследование может служить отправной точкой для дальнейшего изучения характеристик СРК.

На сегодняшний день отсутствует четко сформулированный тезис об особенностях обратимости изменений свойств клеток опухолевой популяции после криоконсервирования. Характер и степень выраженности нелетальных повреждений биообъекта после криоконсервирования определяются его исходной морфофункциональной организацией. Установлена модификация морфофункционального статуса стволовых кроветворных клеток (СКК) после низкотемпературного консервирования

The effect character of cryopreservation factors on biological objects have gained the special value, if malignantly transformed cells and tissues act as a bioobject. From one hand, the necessity of aggressive cryoeffect for cryodestruction of malignant neoplasm is evident, from another one, the fidelity for preservation of repopulation potential of tumor cells during their cryopreservation as suspension inoculated cultures is also apparent. In both cases both the target for cryodestruction and “patronized” structure are stem elements of cell-tissue substrates of this type. Small group of cells capable to self-maintaining is referred to cancer stem cells (CSCs), that enables the comparison of them with normal stem cells [9-11]. It has been shown that in tumors of different localization and histogenesis the cells with these parameters are found among the cells with $CD44^{+}/24^{-}$ phenotype and have a high expression rate of molecules $CD44$ ($CD44^{high}$). For the formation of new tumor just 10 cells of $CD44^{high}$ are sufficient, that in 10-50 times exceeds cancerogenous potential of other tumor cells [5-8]. $CD44^{high}$ is not single molecular marker of CSCs, however its detailed studying may serve as a starting point for further investigation of CSCs characteristics.

Today there is no distinctly specified notion on the peculiarities of reversible changes of tumor population cell properties after cryopreservation. The character and manifestation rate of non-lethal damages of bioobject after cryopreservation are determined with its initial morphofunctional organization. Modification of morphofunctional status of hemopoietic stem cells (HSCs) after low temperature preservation, accompanying with the reduction of their proliferative activity and change of the differentiation lineage has been established. There was also noted that in some hemopoietic cells the ability to recognize hemopoietic microenvironment and to be settled in it is temporarily reduced. The coordination of these functions depends on receptor-membrane structures of HSCs, altering

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

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

* 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

ния, сопровождающаяся снижением их пролиферативной активности и изменением направленности дифференцировки. Отмечено, что у части кроветворных клеток временно снижается способность распознавать кроветворное микроокружение и “расселяться” в нем. Координация этих функций зависит от рецепторно-мембранных структур СКК, которые изменяются под действием факторов криоконсервирования в виде их сегрегации, агрегации или схождения (шеддинг) [2].

Для исследования воздействия низких температур на опухолевые клетки предпочтительными являются экспериментальные модели опухолевых процессов в виде асцитных форм. Одной из таких моделей является асцитическая форма аденокарциномы Эрлиха (АКЭ).

Цель исследования – определить количественное содержание CD44⁺/24⁻ клеток с различной интенсивностью свечения как клеток, относящихся к стволовым опухолевым клеткам, в цельной популяции клеток АКЭ, а также оценить характер влияния криоконсервирования на функциональный статус определяемой популяции.

Материалы и методы

Объектом исследования были клетки АКЭ, полученные при культивировании *in vivo*. Эксперименты выполнены на 7-месячных самках мышей BALB/c, которым клетки АКЭ вводили внутрибрюшинно в дозе 3×10^6 клеток в 0,3 мл физиологического раствора. Клетки АКЭ получали на 7-е сутки культивирования, криоконсервировали в асцитической жидкости без применения криопротекторов по двухэтапной программе. После чего их отмывали добавлением раствора Хенкса с последующим центрифугированием (400g, 10 мин).

Содержание клеток с фенотипом CD44⁺/24⁻ и CD44^{high} в общей популяции клеток АКЭ определяли на 7-е и 14-е сутки культивирования нативных и криоконсервированных АКЭ-7 с помощью моноклональных антител CD44 (FITC), CD24 (PE) (BD Pharmingen) на проточном цитофлуориметре (FACS Calibur, Becton Dickinson, США). Учет и анализ данных проводили с помощью программы WinMDI 2.9.

Результаты и обсуждение

Согласно [5] уровень экспрессии CD44 маркера либо как самостоятельного свидетеля, либо в сочетании с другими мембранными структурами характеризует уровень функционального потенциала СКК. Степень экспрессии CD44 маркера на клетках культуры АКЭ-7 варьировала от слабой (low) до интенсивной (high). Так в нативной культуре (рис.1) АКЭ-7 количество CD44⁺/24⁻ клеток составило 2,35%, при этом CD44^{high} клеток –

under cryopreservation effect as their segregation, aggregation or shedding [2].

To study the effect of low temperatures on tumor cells the experimental models of tumor processes as ascitic forms are more preferable. One of these models is ascitic form of Ehrlich's adenocarcinoma (EAC).

The research aim is to investigate the quantitative content of CD44⁺/24⁻ cells with various intensities of luminescence as the cells referring to stem tumor cells in the solid population of cells of EAC as well as to evaluate the character of cryopreservation effect on functional status of the population under study.

Materials and methods

The research object were the EAC cells procured during culturing *in vivo*. The experiments were made in 7-months' female BALB/c mice, intraperitoneally introduced with EAC cells in the dose of 3×10^6 cells in 0.3 ml of physiological solution. EAC cells were obtained to the 7th culturing day, then cryopreserved in ascitic fluid with no cryoprotectants according to two-stage program. Afterwards they were washed-out with adding Hanks' solution and following centrifugation (440g, 10 min).

Content of cells with CD44⁺/24⁻ and CD44^{high} phenotype in total cell population of EAC was examined to the 7th and 14th days of culturing of native and cryopreserved EAC-7 using monoclonal antibodies CD44 (FITC), CD24 (PE) (BD Pharmingen) with flow cytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson, USA). The data were processed and analyzed using WinMDI 2.9.

Results and discussion

As it was reported [5] the expression level of CD44 marker either as independent witness or in combination with other membrane structures characterized the level of functional potential of CSCs. The expression rate of CD44 marker on EAC-7 culture cells varied from a weak (low) to intensive (high). So, in native EAC-7 culture (Fig. 1) the number of CD44⁺/24⁻ cells made 2.35%, herewith 0.08% for CD44^{high}. After cryopreservation of EAC-7 culture there was found arise in the number of CD44⁺/24⁻ cells up to 6.35%. These changes of the parameters conform with the literature data that the effect of low temperatures are capable of initiating the expression of receptor structures of membrane as a cell response to stress. Along with this the cells of the subpopulation may manifest a high cryoresistance, since the cells referring to stem compartment have in the membrane composition quite low amount of cholesterol [3], that increases elasticity (or fluidity) of membrane and provides the resistance to damages as a result of phase transition at cooling-warming stages [1]. Almost 2.5-fold increase of the content of CD44⁺/24⁻ cells after cryopreservation can be hardly

0,08%. После криоконсервирования культуры АКЭ-7 было отмечено увеличение количества CD44⁺/24⁻ клеток до 6,35%. Такого рода изменения показателей согласуются с данными литературы о том, что воздействие низких температур способно инициировать экспрессию рецепторных структур мембран как ответ клетки на стресс. Наряду с этим клетки данной субпопуляции могут проявлять высокую степень криоустойчивости, так как клетки, относящиеся к стволовому компартменту, в составе мембран содержат крайне низкое количество холестерина [3], что увеличивает эластичность (или текучесть) мембраны и придает устойчивость к повреждениям в результате фазового перехода на этапах охлаждения-отогрева [1]. Почти 2,5-кратное увеличение после криоконсервирования содержания CD44⁺/24⁻ клеток вряд ли можно объяснить только переходом в эту субпопуляцию CD44^{high} клеток после шеддинга этого рецептора. Наблюдаемое снижение субпопуляции CD44^{high} с 0,08 до 0,05% несоизмеримо с увеличением количества CD44⁺/24⁻ клеток.

Было показано [4], что степень повреждения клеток АКЭ существенно зависит от способа их криоконсервирования, влияя на сохранность и пролиферативную активность и, как следствие, прививаемость. Учитывая значимость мембранных структур в проявлении функционального потенциала СПК, была проведена сравнительная оценка динамики накопления клеток АКЭ в перитонеальной полости (ПП) после перевивки нативных и криоконсервированных АКЭ-7. Скорость накопления клеток в ПП после криоконсервирования существенно уступает нативному образцу. Только к 14-м суткам количество клеток приближается к данному показателю в нативном варианте на 7-е сутки (рис. 2). Вполне вероятно, что такая феноменология может быть связана с темпом самонакопления (самоподдержания) пересаженных СПК. На рис. 3 показано, что темп самонакопления (самоподдержания) CD44^{high} (СПК) в криоконсервированном материале повторяет темп накопления общего количества клеток АКЭ. На 7-е сутки он был в 2–2,5 раза меньше, чем в нативе, и только к 14-м суткам приблизился к этой величине. Вероятно, что снижение темпа накопления CD44^{high} после криоконсервирования может быть обусловлено уменьшением интенсивности экспрессии этого маркера на СПК, вызывая при этом изменение их способности воспринимать регуляторные сигналы для расселения и дальнейшей пролиферации.

Выводы

Установлена прямая корреляция между функциональной активностью СПК и экспрессией на

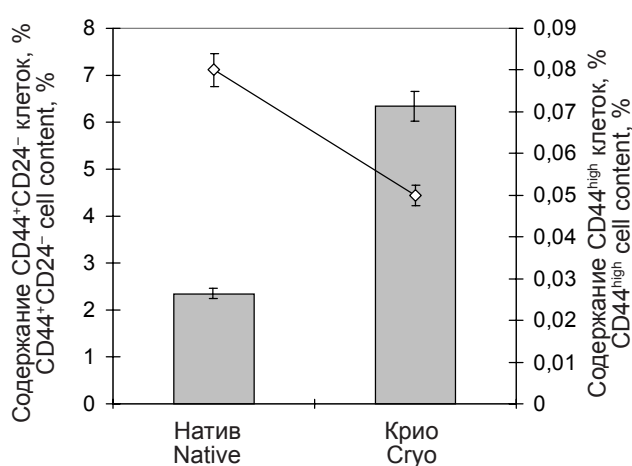


Рис. 1. Оценка фенотипических характеристик клеток АКЭ-7 до и после криоконсервирования: ■ – CD44⁺/24⁻; ◇ – CD44^{high}.

Fig. 1. Evaluation of phenotypic characteristics of EAC-7 cells prior to and after cryopreservation: ■ – CD44⁺/24⁻; ◇ – CD44^{high}.

explained only with the transition into this subpopulation of CD44^{high} cells after this receptor shedding. Observed reduction of CD44^{high} subpopulation from 0.08 down to 0.05% is not comparable with a rise of the amount of CD44⁺/24⁻ cells.

It has been demonstrated [4] that damage rate for EAC cells strongly depends in the way of their cryopreservation, affecting the survival and proliferative activity and as the consequence, grafting. Taking into account the value of membrane structures in manifesting of functional potential of CSCs the dynamics of accumulation of EAC cells in peritoneal cavity (PC) was compared after inoculation of native and cryopreserved EAC-7. The accumulation rate of cells in PC after cryopreservation is significantly inferior to native sample. Only to the 14th days the number of cells approaches this index in native variant to the 7th day (Fig. 2). It is quite probable that this phenomenology may be related to the self-accumulation rate (self-maintaining) of grafted CSCs. Fig. 3 shows that the rate of self-accumulation (self-maintaining) of CD44^{high}(CSCs) in cryopreserved material repeats the accumulation character of the total number of EAC native cells. To the 7th day it was 2-2.5 times less than in the native state and only to the 14th day it approached this value. The reduction of accumulation rate of CD44^{high} after cryopreservation may be stipulated with the decrease of intensity of this marker expression on CSCs herewith causing the change of the ability to perceive regulatory signals for settling and further proliferation.

Conclusions

Direct correlation between functional activity of CSCs and expression on them of CD44^{high} marker as

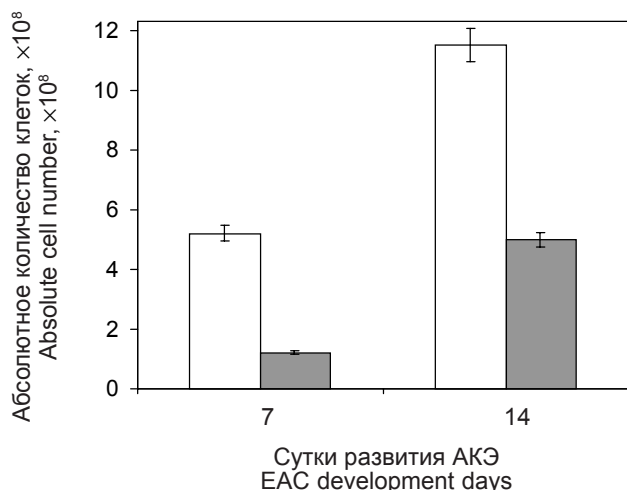


Рис. 2. Динамика изменения абсолютного количества клеток в ПП после индукции АКЭ нативным (□) и криоконсервированным (■) материалом.

Fig. 2. Dynamics of changes of absolute number of cells in PC after induction of EAC with native (□) and cryopreserved (■) material.

них CD44^{high} маркера как маркера, определяющего пролиферативный потенциал популяции.

После криоконсервирования степень экспрессии CD44^{high} на СРК снижалась.

При культивировании криоконсервированных клеток АКЭ *in vivo* наблюдалось снижение пролиферативной активности и как следствие уменьшение темпа накопления клеток, при этом к 14-м суткам исследуемые показатели достигали уровня нативных значений, что свидетельствует об обратимости изменений морфофункциональных характеристик СРК, вызванных влиянием низких температур.

Литература

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология.– Киев: Наук. думка, 1994. – 161с.
2. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Бабенко Н.Н. Модификация структурно-функциональной организации стволовых кроветворных клеток костного мозга после действия факторов низкотемпературного консервирования // Кробиология.– 2005.– №3.– С. 362-366.
3. Лопухин Ю.М., Арчаков А.И., Владимиров Ю.А., Коган Э.М. Холестериноз: холестерин биомембран. Теоретические и клинические аспекты.– М.: Медицина, 1983.– 352 с.
4. Федец О.И. Биоэнергетика и пролиферативная активность криоконсервированных клеток аденокарциномы Эрлиха: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1987.– 15 с.
5. 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. 3983–3988.
6. Collins A.T., Berry P.A., Hyde C. et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells // Cancer Res.– 2005.– Vol. 65, N23.– P. 10946–10951.
7. Li C., Heidt D.G., Dalerba P. et al. Identification of pancreatic cancer stem cells // Cancer Res.– 2007.– Vol. 67, N3.– P. 1030–1037.

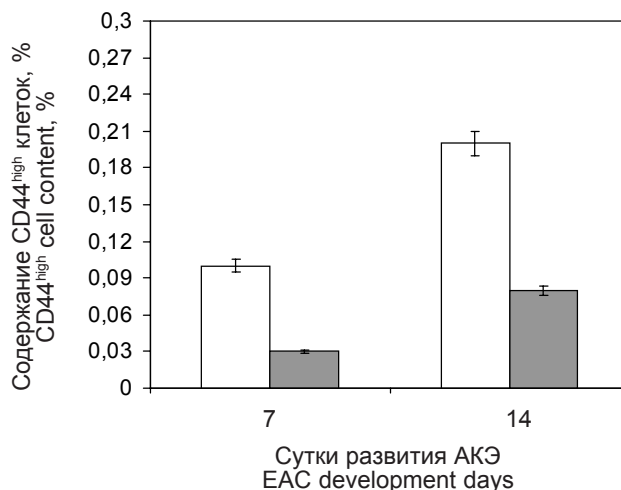


Рис. 3. Динамика изменения содержания CD44^{high} клеток после пересева нативных (□) и криоконсервированных (■) АКЭ-7.

Fig. 3. Dynamics of changes of CD44^{high} cells' content after inoculation of native (□) and cryopreserved (■) EAC-7.

the one, determining proliferative potential of population, has been established.

After cryopreservation the expression rate of CD44^{high} on CSCs reduced;

During culturing of cryopreserved cells of EAC *in vivo* there was observed the decrease of proliferative activity and as a consequence the reduction of the accumulation rate of cells, herewith to the 14th day the studied indices achieved the level of native values that testified to the reversibility of the changes of morphofunctional characteristics of CSCs affected by low temperatures.

References

1. Belous A.M., Grischenko V.I. Cryobiology.– Kiev: Naukova dumka, 1994.– 161 p.
2. Goltsev A.N., Dubrava T.G., Babenko N.N. Modification of structural and functional organization of hemopoietic stem cells of bone marrow after effect of low temperature preservation // Problems of Cryobiology.– 2005.– N3.– P. 362–366.
3. Lopukhin Yu.M., Archakov A.I., Vladimirov Yu.A., Kogan E.M. Cholesterinosis: cholesterol of biomembranes. Theoretical and clinical aspect.– Moscow: Meditsina, 1983.– 352 p.
4. Fedets O.I. Bioenergetics and proliferative activity of cryopreserved cells of Ehrlich adenocarcinoma: Author's abstract of the thesis for obtaining the degree of the candidate of biological sciences.– Kharkov, 1987.– 15 p.
5. 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. 3983–3988.
6. Collins A.T., Berry P.A., Hyde C. et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells // Cancer Res.– 2005.– Vol. 65, N23.– P. 10946–10951.
7. Li C., Heidt D.G., Dalerba P. et al. Identification of pancreatic cancer stem cells // Cancer Res.– 2007.– Vol. 67, N3.– P. 1030–1037.
8. O'Brien C.A., Pollet A., Gallinger S., Dick J.E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immuno-

8. O'Brien C.A., Pollet A., Gallinger S., Dick J.E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice // *Nature*.– 2007.– Vol. 445, N7123.– P. 106–110.
9. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells // *Nature*.– 2001.– Vol. 414, N6859.– P. 105–111.
10. Sell S. Cellular origin of cancer: dedifferentiation or stem cell maturation arrest? // *Environ. Health Perspect.*– 1993.– Vol. 101, N5.– P. 15–26.
11. Till J.E. Stem cells in differentiation and neoplasia // *J. Cell. Physiol.*– 1982.– Vol. 1, N1.– P. 3–11.
- deficient mice // *Nature*.– 2007.– Vol. 445, N7123.– P. 106–110.
9. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells // *Nature*.– 2001.– Vol. 414, N6859.– P. 105–111.
10. Sell S. Cellular origin of cancer: dedifferentiation or stem cell maturation arrest? // *Environ. Health Perspect.*– 1993.– Vol. 101, N5.– P. 15–26.
11. Till J.E. Stem cells in differentiation and neoplasia // *J. Cell. Physiol.*– 1982.– Vol. 1, N1.– P. 3–11.

Accepted in 20.05.2008

Поступила 20.05.2008