

УДК 616-006.6-091.811:615.832.9

А.Н. Гольцев\*, О.А. Дябина, М.В. Останков, Н.А. Бондарович, Е.Е. Ямпольская

## Стволовые раковые клетки в патогенезе опухолевого процесса после криодеструкции

UDC 616-006.6-091.811:615.832.9

A.N. Goltsev\*, O.A. Diabina, M.V. Ostankov, N.A. Bondarovich, E.Ye. Yampolskaya  
**Cancer Stem Cells in Tumor Pathogenesis after Cryoablation**

**Реферат:** В обзоре освещены некоторые направления терапии злокачественных новообразований, в частности, криодеструкция солидных опухолей. Обсуждается возможность использования метода криоабляции как инструмента направленного воздействия и инактивации стволовых раковых клеток, являющихся главной структурной единицей инициации, поддержания роста и метастазирования опухолей. Проведен анализ данных литературы относительно фенотипических и функциональных особенностей опухоль-индуцирующих клеток, в том числе как более потенциальных СКК, так и продвинутых в дифференцировке их потомков, характера влияния на них холодových факторов. Рассмотрены основные пути оптимизации применения метода криоабляции в клинической практике.

**Ключевые слова:** злокачественные новообразования, стволовые раковые клетки, криоабляция.

**Реферат:** В обзорі висвітлено деякі напрямки терапії злоякісних новоутворень, зокрема, криодеструкція солідних пухлин. Обговорюється можливість використання методу криоабляції як інструмента спрямованої дії та інактивації стовбурових ракових клітин, які є головною структурною одиницею ініціації, підтримки росту та метастазування пухлин. Проведено аналіз даних літератури щодо фенотипових і функціональних особливостей пухлинно-індукуючих клітин, у тому числі як більш потентних СКК, так і просунутих у диференціюванні їхніх нащадків, характеру впливу на них холодových факторів. Розглянуто основні шляхи оптимізації застосування методу криоабляції у клінічній практиці.

**Ключові слова:** злоякісні новоутворення, стовбурові ракові клітини, криоабляція.

**Abstract:** The review highlights some areas of malignant tumor treatment, particularly the cryosurgery of solid tumors. There is discussed the possibility of using the method of cryoablation as a tool for targeting and inactivation of cancer stem cells, being the main structural unit, initiating, maintaining growth and tumor metastasis. The publications regarding the phenotypic and functional characteristics of tumor-inducing cells, including both more potent CSCs and advanced in the differentiation of their descendants, the nature of cold factor impact on them were analyzed. The main ways to optimize the use of cryoablation technique in clinical practice are under consideration.

**Key words:** malignancy, cancer stem cells, cryoablation.

Актуальность решения проблемы лечения злокачественных новообразований определяется постоянным увеличением показателей заболеваемости раком, сложностью своевременной диагностики и лечения, высоким уровнем инвалидизации и летальности.

В настоящее время для лечения онкозаболеваний применяют хирургическую резекцию, химио-, радио-, гормоно-, иммунотерапию или их комбинацию. Тем не менее ни один из указанных методов не является совершенным, поэтому важен поиск альтернативных способов лечения данной патологии [33]. Особого внимания заслуживает такой метод криохирургии, как криоабляция опухоли, который впервые был апробирован в середине 60-х годов XX столетия [32]. Сегодня он считается минимально инвазивным и позволяющим контролируемо разрушать ткани-мишени и, в частности,

The relevance of solving the problem of treating the malignant tumors is determined by a constant increase in the cancer incidence, the complexity of well-timed diagnosis and treatment, high morbidity and mortality.

Current treatment of oncology diseases involves surgical resection, chemo-, radio-, hormonal, and immune therapy, or their combination. Nevertheless, none of these methods is perfect, so it is important to find alternative ways of this disease treatment [33]. Of particular attention is a method of cryosurgery, a tumor cryoablation, which was first tested in the mid-60s of the twentieth century [32]. Today, it is considered as minimally invasive and allowing a controlled destruction of the target tissues and, in particular, tumors. Due to novel technologies allowing the visualization of the freezing zone isotherm spreading the scope of this method has significantly expanded

Отдел криопатофизиологии и иммунологии, 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: cryopato@gmail.com

Поступила 23.06.2015  
Принята в печать 27.08.2015

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №3. – С. 205–218.  
© 2015 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Cryopathophysiology and Immunology, 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: cryopato@gmail.com

Received June, 23, 2015  
Accepted August, 27, 2015

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25 (3): 205–218.  
© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

опухоли. Благодаря появлению современных технологий визуализации динамики изотермы зоны замораживания значительно расширилась область применения этого метода [15]. Криоабляция может проводиться лапароскопически, перкутанно под контролем УЗИ или КТ, а также открытым способом [43]. По сравнению с другими методами лечения онкологических заболеваний она обладает многими преимуществами: высокой эффективностью, безболезненностью, отсутствием кровотечений, быстрой органотипической регенерацией, отсутствием значительной общей реакции и более короткой продолжительностью госпитализации [48]. Криоабляция наиболее эффективна в тех случаях, когда невозможно провести экстирпацию опухоли стандартным хирургическим путем [8, 49]. Однако данные клинической статистики свидетельствуют о том, что при использовании указанного метода недостаточно промораживается опухоль, особенно если она имеет большой объем или неправильную форму [50, 70]. Более того, было показано, что после местной криодеструкции опухоли наблюдалась стимуляция опухолевого процесса [60, 68]. Возможно, что подобный феномен может быть отчасти обусловлен «особым» ответом на криовоздействие присутствующей в неоплазиях субпопуляции стволовых раковых клеток (СРК), которые способны не только формировать первичные злокачественные сайты, но и отвечать за поддержание роста и метастазирование опухолей [6, 21, 40]. Так, для формирования новой опухоли достаточно присутствие всего 10 клеток с фенотипическими характеристиками СРК, которые в 10–50 раз превышают канцерогенность других клеток опухоли [10].

### Теория СРК и ее значение в онкологии

Концепция существования СРК не нова и ее становление как теории имеет длительную историю [23]. Так, в 1963 г. W.B. Bruce и H.A. Van Der Gaag [17] обнаружили небольшую популяцию клеток лимфомы мышей, которые были способны пролиферировать *in vivo*. Подобные наблюдения были сделаны и в отношении клеток миеломы мышей [14]. Позже С.Н. Park и соавт. [54] показали, что около 0,1% лейкоэмических клеток способны формировать колонии в агаре. Данные исследования позволили сделать предположение о гетерогенности раковых клеток. Наиболее убедительные данные, свидетельствующие о существовании СРК, были получены в 1994 г. группой ученых под руководством J.E. Dick. Эксперименты проводили на линиях мышей SCID (*severe combined immunodeficiency*) или NOD-SCID (*non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency*), у которых отсутствует иммунная реакция на ксенотрансплантацию

[8]. Cryoablation can be performed laparoscopically, percutaneously under ultrasound or CT control, and using open method as well [43]. If compared with other methods of cancer treatment, it has many advantages: high efficiency, painlessness, absence of bleeding, fast organotypic regeneration, lack of a significant systemic response and shorter duration of hospitalization [48]. Cryoablation is most effective when it is impossible to carry out standard surgical tumor extirpation [1, 49]. However, the clinical statistic data indicate the incomplete freezing of the tumor following the application of this method, especially if it has a large volume or irregular shape [50, 70]. Moreover, a stimulation of tumor was shown after tumor local cryoablation [60, 68]. This phenomenon likely may be partially stipulated by an individual response to cryoeffect observed in cancer stem cells (CSCs) subpopulation present in neoplasia, which are capable of not only generating primary malignant sites, but also responsible for maintaining the growth and metastasis of tumors [15, 30, 40]. In particular, the presence of only 10 cells with phenotypic characteristics of CSCs is enough to form a new tumor, and their cancerogenic potential is 10–50 times higher than other tumor cells [3].

### CSC theory and its significance in oncology

The concept of CSC existing is not new and its establishing as a theory has a long history [17]. In 1963, W.B. Bruce and H.A. Van Der Gaag found a small population of mice lymphoma cells, which were able of *in vivo* proliferation [11]. Similar observations were made also in mice myeloma cells [7]. Later, C.H. Park *et al.* [54] showed that about 0.1% of leukemic cells could form colonies in agar. These studies led to the assumption of the heterogeneity of cancer cells. The most convincing evidence of the existence of CSCs were obtained in 1994 by the team of scientists headed by Dr. J.E. Dick. The experiments were carried out in SCID (severe combined immunodeficiency) or NOD-SCID (nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency) mice, which had no immune response to xenotransplantation of human cells. In this study, the authors have identified a subpopulation of CSCs of acute myeloid leukemia (AML) with specific surface markers CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>, which being transplanted to SCID mice were able of generating a large number of colony-forming progenitor cells, whereas the cells with phenotype CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> and CD34<sup>-</sup> did not possess these properties [44]. However, for a long time the researchers were not sure if this theory could be extrapolated to solid tumors. Recent reports have confirmed the existence of CSCs in numerous solid tumors of brain, colon, breast, pancreas, prostate, liver, lungs, as well as mesenchymal tumors and ovarian carcinomas [3, 18, 40].



человеческих клеток. В данном исследовании авторами была идентифицирована субпопуляция СРК острой миелоидной лейкемии (ОМЛ) со специфическими поверхностными маркерами CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>, которые при их трансплантации мышам линии SCID были способны формировать большое количество колониеобразующих прогениторных клеток, в то время как клетки с фенотипами CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> и CD34<sup>-</sup> не обладали данными свойствами [44]. Однако исследователи долгое время не были уверены в возможности экстраполяции такой теории на солидные опухоли. В последние годы получены данные, подтверждающие существование СРК в многочисленных солидных опухолях головного мозга, толстой кишки, молочной, поджелудочной, предстательной железы, печени, легких, а также в мезенхимальных опухолях и опухолях яичника [10, 24, 40].

В настоящее время широко обсуждается концепция элиминации СРК, которая лежит в основе нового направления онкологии – «тераностики», т. е. сочетания диагностики и специфического лечения, проводимого с учетом индивидуальных показателей больного.

В 2011 г. на конгрессе Европейской Ассоциации гематологов были рассмотрены некоторые потенциальные пути успешной элиминации СРК. Во-первых, это отказ от терапии злокачественного роста ингибиторами тирозин киназ (ИТК) и, во-вторых, разработка новых способов элиминации остаточных СРК. Была доказана неэффективность лечения ИТК, поскольку СРК, как и большинство стволовых клеток, находятся в состоянии покоя, и, следовательно, они устойчивы к такого рода препаратам. В частности описаны случаи появления рецидивов у больных с хроническим миелолейкозом, лечившихся иматинибом [38, 66].

Отсутствие чувствительности к ИТК лейкемических стволовых клеток и ее появление у прогениторных клеток можно объяснить влиянием таких препаратов на находящиеся на этапе деления клетки, т. е. на более дифференцированные, а не на покоящиеся (СРК) [20]. Учитывая данный факт, некоторые исследователи считают, что необходима разработка подходов, способных элиминировать «спящие» СРК или заставить их дифференцироваться [11]. Альтернативой может быть и другой путь, который обеспечивает безрецидивное течение заболевания: необходимо «заставить» СРК как можно дольше пребывать в состоянии покоя. Правомерность данного тезиса подтверждается наличием «вялотекущих» и «пролиферирующих» форм острой миелоидной лейкемии, и, соответственно, разной продолжительности ремиссии у больных [53].

Nowadays there is a wide discussion on the concept of the CSCs elimination, which underlies the new direction of oncology, 'theranostics', *i. e.* a combination of diagnosis and specific treatment, carried out taking into account the patient's individual parameters.

In 2011, the Congress of the European Hematology Association considered some of the potential ways of successful elimination of CSCs. Firstly, this is avoiding the treatment of malignancies with tyrosine kinase inhibitor (TKI), and, secondly, the development of new ways to eliminate remaining CSCs. There has been shown an inefficiency of TKI treatment since the CSCs as most stem cells are quiescent, so they are resistant to such drugs. In particular there were described the relapses in the imatinib-treated CML patients [38, 66].

The absence of sensitivity in leukemic stem cells to the TKI, and its appearance in the progenitor cells can be explained by the difference of the effect of these drugs on cells, being in mitosis stage, *i. e.* more differentiated, but not quiescent ones [14]. Considering this fact, some researchers suppose the need of developing the approaches enabling the elimination of the quiescent CSCs or their differentiation [4]. An alternative may be another way that provides recurrence-free course of the disease: it is necessary to 'force' the CSCs to stay dormant as long as possible. The validity of this thesis is confirmed by the presence of 'low-intensity' and 'proliferating' forms of acute myeloid leukemia, and, accordingly, different duration of remission in patients [53].

It is known that the stem and cancer stem cells have similar phenotypic and functional properties [58, 65], but when searching the effective treatments of oncology diseases, it is important to find out possible fundamental differences between them.

*Phenotypic characteristics of CSCs.* Numerous experimental and clinical data allowed the revealing of specific markers for CSCs, including immunophenotypic ones (Table). The CSCs in tumors of various histogenesis and localization are phenotypically different, although some of the markers (*e. g.*, CD133 and CD44) are common for CSCs of many tumor types. The prominin-1 (CD133) was identified firstly in rat neuroepithelial stem cells [67], later the monoclonal antibodies to AC133<sup>+</sup> were derived for identification of hematopoietic stem cells from bone marrow, cord blood, and fetal liver. This antigen was later identified as a homologue of prominin-1 in humans [69]. Prominin-1 is a marker for many CSCs including those of glioma, colon, lung, liver and prostate cancer [2, 41, 46, 74, 75]. It is present on the cells of tumor-initiating population in many solid tumors, but apparently does not affect the properties of the CSCs. Knockout of



Известно, что стволовые и стволовые раковые клетки обладают схожими фенотипическими и функциональными свойствами [58, 65], однако для поиска эффективных методов лечения онкозаболеваний важно установить возможные принципиальные различия между ними.

**Фенотипические характеристики СРК.** На основании многочисленных экспериментальных и клинических данных установлено, что для СРК существуют «специфические» маркеры, в том числе иммунофенотипические (таблица). При этом СРК опухолей различного гистогенеза и локализации фенотипически отличаются, хотя некоторые маркеры (например, CD133 и CD44) являются общими для СРК многих типов опухолей. Первым был идентифицирован на крысиных нейроэпителиальных стволовых клетках проминин-1 (CD133) [67], позже были получены моноклональные антитела к антигену AC133 для идентификации гемопоэтических стволовых клеток костного мозга, кордовой крови и эмбриональной печени. Данный антиген в дальнейшем был идентифицирован как гомолог проминина-1 у человека [69]. Проминин-1 является маркером для многих СРК, в том числе СРК глиом, рака кишечника, легких, печени и простаты [9, 41, 46, 74, 75]. Он присутствует на опухоль-иницирующей популяции клеток во многих солидных опухолях, но, видимо, не влияет на свойства СРК. Нокаут гена проминина-1 в изолированных у пациентов колоректальных опухолевых клетках значительно не снижал их опухоль-индуцирующую способность.

Для более точной идентификации СРК в этих опухолях предлагается не только оценивать экспрессию CD133, но и использовать дополнительные маркеры: для рака печени – CD24, мочевого пузыря – 67LR, щитовидной и молочной железы – CD44 [25, 40].

В отличие от проминина-1 снижение степени экспрессии CD44-молекулы и ее изоформ в опухолевых клетках метастатических линий может блокировать метастазирование [52], а у асцитических опухолевых клеток снижать опухоль-индуцирующую способность [31]. Так, после введения фракции CD44<sup>+</sup>-клеток аденокарциномы Эрлиха (АКЭ) в перитонеальную полость их абсолютное количество на 7-е сутки культивирования *in vivo* было в 2,3 раза выше, чем после введения общей суспензии клеток АКЭ, и в 4,2 раза больше, чем после введения фракции CD44<sup>-</sup>. При этом различие экспрессии клеток по CD44 молекуле определяло не только их опухоль-индуцирующую способность, но и гетерогенность в формируемом ими пуле клеток. В опухоли, сформированной CD44<sup>+</sup>-фракцией, было отмечено увеличение экспрессии гена *sox2*, что

prominin-1 gene in colorectal tumor cells isolated from the patients did not significantly reduce their tumor-inducing ability.

For more accurate identification of CSCs in these tumors it is proposed not only to assess the expression of CD133, but to use the additional markers: CD24 for liver cancer, 67LR for bladder, CD44 for thyroid and breast cancer [19, 40].

Unlike prominin-1 the reduced expression rate of CD44-molecule and its isoforms in tumor cells of metastatic lines can block metastasis [52], decrease a tumor-inducing ability in ascitic tumor cells [28]. For instance, the introduction of CD44<sup>+</sup> cell fraction of Ehrlich's carcinoma (EC) into peritoneal cavity resulted in 2.3 fold increase of their absolute number to day 7 of culturing *in vivo* if compared with introduction of total suspension of EC cells, and 4.2 fold if compared with administration of CD44<sup>-</sup> fraction. Herewith the variable expression of CD44 molecule determined not only cell tumor-inducing ability, but heterogeneity in the pool of descending cells. The tumor formed by CD44<sup>+</sup> fraction had an increased *sox2* gene expression,

Клеточно-поверхностные маркеры (фенотип) стволовых раковых клеток

Cell surface markers (phenotype) of cancer stem cells

Тип опухоли/локализация Type of tumor/localization	Фенотип Phenotype	Содержание клеток с данным фенотипом, % Content of cells with stated phenotype, %
Молочная железа Mammary gland	CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-</sup>	11–35
Головной мозг Brain	CD133 <sup>+</sup>	5–30
Простата Prostate	CD44 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup> α2β1-hi CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-</sup>	0,1–3 0,1–3
Поджелудочная железа Pancreas	CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-</sup> ESA <sup>+</sup>	0,2–0,8
Печень Liver	CD133 <sup>+</sup> CD24 <sup>-</sup>	1–3
Кишечник Intestine	CD133 <sup>+</sup> или/or ESA <sup>hi</sup> CD44 <sup>+</sup>	1,8–24,5
Голова и шея Head and neck	CD44 <sup>+</sup>	<10
Легкие Lungs	CD133 <sup>+</sup>	0,3–22
ОМЛ Acute myeloid leukemia	CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup>	0,2–1
Множественная миелома Multiple melanoma	CD138 <sup>+</sup>	2–5
Меланома Melanoma	CD20 <sup>+</sup>	~20



сопровождалось формированием преимущественно клеток с фенотипом CD44<sup>hi</sup> и CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>. В то же время фракция CD44<sup>-</sup> инициировала культуру с высокой экспрессией гена *oct4* и высоким содержанием субпопуляций CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>, CD44<sup>-</sup>CD24<sup>+</sup>. Известно, что гликопротеид CD44 представляет собой рецептор для гиалуроновой кислоты (ГК), являющейся главным компонентом внеклеточного матрикса. Во многих типах опухолей в результате связывания ГК с CD44 активируются рецепторные тирозинкиназы, включая EGFR и ERBB2. Это приводит к повышенной пролиферации клеток и их устойчивости к проводимой химиотерапии опосредованно через активацию MAPK и PI3K/AKT путей соответственно. Гликопротеид CD44 сам по себе или в комбинации с другими поверхностными маркерами используется для выделения СПК из множества опухолевых клеток, в том числе и раковых клеток молочной, поджелудочной железы, простаты, кишечника и сквамозно-клеточных карцином головы и шеи. В результате исследования функциональной гетерогенности CD44<sup>-</sup>-клеток установлено, что наибольшей опухолевой активностью обладают СПК с высоким уровнем экспрессии маркера (CD44<sup>hi</sup>) [29, 37]. При ортотопической имплантации 5×10<sup>5</sup> RAS-трансформированных CD44<sup>hi</sup>- и CD44<sup>lo</sup>-клеток NOD/SCID мышам суб-популяция CD44<sup>lo</sup> обладала низкой опухолевой активностью (опухоль формировалась в 30% случаев), в то время как CD44<sup>hi</sup>-клетки были способны формировать опухоли в 100% случаев [19].

Следует отметить, что на разных этапах формирования опухоли СПК экспрессируют маркеры, свойственные клеткам других гистогенетических линий в условиях физиологического развития организма. Так, CD138-маркер терминально дифференцированных В-клеток также экспрессируется на СПК множественной миеломы (плазмацитарная злокачественность). Общим для идентификации СПК острого миелогенного лейкоза и нормальных ранних гемопоэтических прогениторных клеток является фенотип CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> [65]. В клетках светлоклеточного рака почки и недифференцированных клетках карциномы идентифицированы опухоль-инициирующие клетки, экспрессирующие маркер мезенхимальных стволовых клеток CD105 [58].

*Криоабляция и пути ее оптимизации.* Наличие СПК в опухоли является основной причиной рецидивов после проведения оперативного вмешательства. При хирургическом иссечении опухолевой ткани СПК могут попадать в кровяное русло с последующей их диссеминацией [47]. Криоабляция способна «фиксировать» СПК в опухолевом сайте,

accompanied by the predominance of CD44<sup>hi</sup> and CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> phenotype among the progeny. At the same time the CD44<sup>-</sup> fraction initiated the culture with high expression of *oct4* gene and high content of CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>, and CD44<sup>-</sup>CD24<sup>+</sup> subpopulations. It is known that the CD44 glycoprotein is a receptor for hyaluronic acid (HA) being the main component of extracellular matrix. Binding of HA with CD44 results in activation of receptor tyrosine kinases, including EGFR and ERBB2, in many types of tumors. This led to an increased cell proliferation and resistance to chemotherapy indirectly through activation of MAPK and PI3K/AKT path-ways, respectively. Glycoprotein CD44 *per se* or together with other surface markers is used for selection of CSCs from various tumor cells, including breast, pancreatic, prostate, colon, and intestine cancer cells, squamous cell carcinomas of the head and neck. The study of functional heterogeneity of CD44<sup>+</sup> cells demonstrated that the highest tumorigenic activity was inherent to the CSCs with a high expression rate of the marker (CD44<sup>hi</sup>) [29, 37]. Following orthotopic implantation of 5×10<sup>5</sup> of RAS-transformed CD44<sup>hi</sup> and CD44<sup>lo</sup> cells to NOD/SCID mice the CD44<sup>lo</sup> subpopulation possessed a low tumorigenicity (tumor was formed in 30% of cases), while CD44<sup>hi</sup> cells were capable of forming tumors in 100% of cases [13].

It should be noted that at the various stages of tumor formation the CSC express the markers characteristic for cells of other histogenetic lines under physiological development of an organism. For instance, the CD138-marker of terminally differentiated B-cells, is also expressed on multiple myeloma CSCs (plasmacyte malignancy). Uniform phenotype identifying CSCs of acute myelogenous leukemia and normal early hematopoietic progenitor cells is CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> [65]. Among the cells of clear cell renal carcinoma and undifferentiated carcinoma cells the tumor-initiating cells were identified, which expressed the CD105 marker of mesenchymal stem cells [58].

*Cryoablation and ways of its optimization.* The presence of CSCs in tumors is a major cause of relapse after surgery. Surgical excision of the tumor tissue could be followed by entering of CSCs to the bloodstream and their following dissemination [47]. Cryoablation is capable of 'fixing' the CSCs in the tumor site, preventing their migration and thereby reducing the risk of metastasis [39, 59]. It was also found that cryoexposure led to a two-fold reduction of tumor-inducing potential in fraction of young EC culture enriched with the CSCs of phenotype CD44<sup>+</sup> [28]. This may be due to the fact that the use of the method activates the cold-inducible molecular stress cascades which can trigger the CSCs death in tumor [6].



предотвращая их миграцию и тем самым снижая риск возникновения метастазов [39, 59]. Более того, после криовоздействия у фракции молодой культуры АКЭ, обогащенной СРК с фенотипом CD44<sup>+</sup>, в 2 раза снижался их опухоль-индуцирующий потенциал [31]. Это может быть обусловлено тем, что использование данного метода активирует холод-индуцируемые молекулярные стрессорные каскады, которые могут запускать гибель СРК в опухоли [13].

Метод криоабляции получил наибольшее распространение при лечении опухолей молочной железы, почек, простаты и печени. Как было отмечено выше, его преимуществами по сравнению с другими малоинвазивными методами являются отсутствие серьезных внутриоперационных осложнений и низкая вероятность развития нарушений функции органа, пораженного опухолью. Например, при криоабляции опухоли почки почечная функция снижается на 6%, при радиочастотной абляции – на 13%, а открытой резекции – на 26%. Существенно повысилась эффективность данного метода с момента внедрения новых методик: например, применение в криохирургии газопроводных термодатчиков с трансперитонеальным размещением [16] или использование зондов с циркулирующим жидким азотом или аргоном [42, 51].

Внутри области криохирургического воздействия выделяют центральную зону коагуляционного некроза и периферическую, в которой степень повреждения клеток может варьировать. В центральной зоне формируются кристаллы льда, что приводит к механической травме и дегидратации клеток с последующим их осмотическим повреждением, в периферической зоне внутриклеточное кристаллообразование отсутствует, и гибель опухолевых клеток происходит преимущественно по типу апоптоза [12, 56]. С целью полной эрадикации опухолевых клеток область криовоздействия должна распространяться не только на саму опухоль, но и на окружающую ее здоровую ткань.

Учитывая анатомические особенности внутренних органов, необходимо максимально адаптировать технологию криовоздействия, в частности, правильно подобрать скорость охлаждения и оттаивания ткани-мишени. Образование внутриклеточного льда происходит более интенсивно при высоких скоростях охлаждения, что приводит к более выраженному повреждению клеток [12, 27, 64]. При этом для проведения криодеструкции важно подобрать оптимальную температуру замораживания опухолевой ткани. Для деструкции опухолевой ткани недостаточно снизить температуру в области введения зонда до  $-20^{\circ}\text{C}$ , поскольку в области криодеструкции могут остаться выжившие опухолевые

The cryoablation has become widely applicable in the therapy of breast, kidney, prostate and liver tumors. As above mentioned, its advantages over other low invasive methods are the absence of severe intraoperative complications and low probability of developing dysfunctions in organ with tumor. For example, cryoablation of kidney tumor was accompanied with a renal function reduction by 6%, radiofrequency ablation resulted in 13% decrease, and an open-type resection did 26%. Efficiency of the method has been significantly improved since implementing the new techniques: *e. g.* application of gas-driven temperature gauges with transperitoneal localization [10]; or using of probes with circulating liquid nitrogen or argon [42, 51].

The cryosurgical impact area could be divided to a central zone of coagulatory necrosis and a peripheral one, where the cell damage extent can vary. Central zone is a place where ice crystals are formed, that results in mechanical damage and dehydration of cells and their following osmotic injury. Peripheral zone has no intracellular crystal formation, and tumor cell destruction occurs primarily due to apoptosis [5, 56]. In order to complete the eradication of tumor cells a cryotherapy area should cover not only the tumor, but also the adjacent healthy tissues.

Considering the anatomical features of internal organs, it is necessary to maximally adapt the technology of cryotherapy, in particular, to choose correctly the cooling and freeze-thawing rates for a target tissue. Intracellular ice formation occurs more rapidly at higher cooling rates, resulting in a greater damage of cells [5, 21, 64]. Herewith it is important to select the optimum temperature for freezing the tumor tissue. It is not sufficient to reduce the temperature within the range of probe introduction down to  $-20^{\circ}\text{C}$  for a tumor tissue destruction, because the tumor cells in the cryoablation area can still survive. In case of using the temperatures from  $-40$  to  $-60^{\circ}\text{C}$  it is possible to reach the total necrosis of tumor cells. However, using lower temperatures could lead to the damage of healthy tissues surrounding the tumor. For instance, cooling the prostate tumor below  $-40^{\circ}\text{C}$  may cause the complications [12].

Duration of tissue thawing is also the factor determining the efficiency of cell destruction during tumor cryoablation. It was noted that slow thawing of tumor tissue resulted in a significantly higher percentage of cell death if compared with rapid thawing, that was probably due to the ‘solution effects’, recrystallization and prolonged oxidative stress [71].

Year by year the cryoablation method is modified and improved, nevertheless a positive result of performed therapy could not be achieved in 10–40% of cases [34]. Perhaps this is associated both with the conditions



клетки. При использовании температур от  $-40$  до  $-60^{\circ}\text{C}$  достигается тотальный некроз опухолевых клеток. Однако при использовании данных температур существует вероятность повреждения прилежащих к опухоли здоровых тканей. Так, при охлаждении ниже  $-40^{\circ}\text{C}$  опухоли простаты возможно возникновение осложнений [18].

Фактором, определяющим эффективность деструкции клеток при проведении криоабляции опухоли, является время оттаивания замороженной ткани. Было отмечено, что при медленном оттаивании опухолевой ткани процент гибели клеток существенно выше, чем при использовании быстрого размораживания, что, вероятно, обусловлено «эффектами раствора», рекристаллизацией и длительным окислительным стрессом [71].

С каждым годом метод криоабляции модифицируется и совершенствуется, однако положительный результат после проведенной терапии не удается достичь в 10–40% случаев [34]. Возможно, это связано как с условиями применения метода, так и с особенностями организма пациента, стадией заболевания и т. д. Поэтому при любой форме рака наряду с криохирургией проводят дополнительную антибластомную терапию, целью которой является более интенсивное воздействие на клетки опухолевой ткани и ее периферическую область. Было показано, что использование противоопухолевых химиотерапевтических агентов в сочетании с криоабляцией усиливает повреждающее действие замораживания на клетки опухоли [22, 62, 72]. Считается, что терапия, приводящая к гибели клеток в результате апоптоза, потенцирует иммунный ответ организма и способствует дополнительной деструкции клеток опухоли [61]. Одним из альтернативных способов сочетанного использования криоабляции и дополнительных видов терапии является метод локального введения препарата в ткань, подвергшуюся криовоздействию [28].

В настоящее время интенсивно развивается нанокриохирургия, основным принципом которой является введение суспензии наночастиц с заданными физическими или химическими характеристиками в опухолевую ткань [63]. При использовании данного метода увеличивается количество некротизированных опухолевых клеток и улучшается визуализация границ опухоли во время проведения криоабляции [49]. Перспективным в этом плане может быть использование наночастиц ортованадата в сочетании с другими наносистемами, которые способны как визуализировать СРК, так и уменьшать их количество, ингибируя интенсивность опухолевого роста. При использовании данных наночастиц на фоне проведения криоабляции минимизируется вероятность возникновения рецидивов и метастазов [2, 3, 7].

of method application and peculiarities of patient's organism, stage of disease development *etc.* Therefore, independently of cancer type, cryosurgery is usually accompanied with an additional antineoplastic therapy, the aim of which is more intensive impact on the tumor tissue cells and its peripheral area. It has been shown that the use of chemotherapeutic antineoplastic agents combined with cryoablation increased the damaging effect of freezing on tumor cells [16, 62, 72]. It is believed that treatment, resulting in a cell death due to apoptosis, potentiates an immune response of a body and contributes to further destruction of tumor cells [61]. Another alternative method to combine cryoablation and additional therapies is a local introduction of a drug into the tissue exposed to cryotherapy [22].

Nowadays nanocryosurgery is intensively developing, the basic principle of which is introduction of a suspension of nanoparticles with specified physical or chemical characteristics into a tumor tissue [63]. This method allows to increase the number of necrotic tumor cells and to improve the visualization of tumor area during cryoablation [49]. The use of orthovanadate nanoparticles in combination with other nanosystems, which can both visualize CSCs and reduce their number, inhibiting the intensity of tumor growth, may be perspective in this regard. Application of these nanoparticles together with cryoablation allowed to minimize the occurrence of regression and metastasis [24, 25, 31].

Radiotherapy could be a method of complementary therapy following cryoablation of tumor tissue. The *in vitro* experiments showed that the tumor cells subjected to freezing became more sensitive to the damaging effect of radiation [45]. The experimental and clinical studies have confirmed the tumor's susceptibility not only to irradiation, but anti-tumor drugs, local hypothermia, photodynamic therapy, and immunotherapeutic agents as well. In addition, it is important to take into account the fact, that the long-term results of the therapy and the expression rate of various tumor markers with a diagnostic value, depend on the CSCs state [57]. The sensitivity of these cells to the therapy applied, cryoexposure in particular, is determined by their phenotypic characteristics. Thus, the EC cells with  $\text{CD44}^+/\text{24}^-$  phenotype are more resistant to cryoexposure than  $\text{CD44}^{\text{hi}}$  [30]. It should be noted that the methods applied jointly with the cryoablation have also a weak toxic effect on CSCs, survived after cryosurgery, that may further cause the relapses. This fact is suggested in findings of W. Rao *et al.* [55], who showed incomplete death of CSCs population with  $\text{CD44}^+\text{CD133}^+$  phenotype following cryoablation in biomimetic 3D-mammosphere model. This is largely due to the presence of molecular mechanisms in CSCs, mediating their cryolability. In particular, the cold-induced RNA-binding RBM3 protein, which is



Методом вспомогательной терапии после проведенной криоабляции опухолевой ткани является радиотерапия. В экспериментах *in vitro* было показано, что подвергшиеся замораживанию клетки опухоли становятся более чувствительными к повреждающему действию радиации [45]. Данные экспериментальных и клинических исследований подтвердили эффект воздействия на опухоль не только облучения, но и противоопухолевых препаратов, локальной гипотермии, фотодинамической терапии и иммунотерапевтических средств. Кроме того, важно учитывать, что отдаленные результаты лечения и степень экспрессии различных опухолевых маркеров, имеющих диагностическое значение, зависят от состояния СРК [57]. При этом чувствительность этих клеток к проводимой терапии и, в частности, к криводействию определяется их фенотипическими характеристиками. Так, клетки АКЭ с фенотипом CD44<sup>+</sup>/24<sup>-</sup> более устойчивы к криовоздействию, чем CD44<sup>hi</sup> [6]. Следует отметить, что методы, которые используются сочетанно с криоабляцией, также оказывают слабое токсическое действие на СРК, выжившие после криохирургической операции, что может в дальнейшем вызвать рецидивы. На это указывают данные W. Rao и соавт. [55], которые на биомиметической 3D-маммосферной модели показали, что криоабляция не приводит к полной гибели популяции СРК с фенотипом CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>. Во многом это вызвано наличием у СРК молекулярных механизмов, которые опосредуют их криолабильность. Так, индуцируемый холодом РНК-связывающий протеин RBM3, который повышенно экспрессируется в СРК простаты, защищает клетки от апоптоза [73]. Этим фактом обусловлена необходимость применения в качестве вспомогательной терапии при криоабляции агентов, селективно вызывающих инактивацию данной субпопуляции клеток, в частности, противодиабетического препарата «Метформин» («Bristol-Myers Squibb», США), рекомбинантного ИЛ-15, клеток фетальной печени и др. [1, 4, 11, 30, 35].

Высокая вероятность выживания СРК после криовоздействия определила необходимость разработки путей оптимизации метода криоабляции. Внимание многих исследователей было направлено на изучение возможности использования многократных циклов замораживания-оттаивания. Целесообразность применения этого приема подтверждается тем, что после каждого цикла замораживания-оттаивания размер зоны некроза, как и цитотоксического эффекта, оказываемого криовоздействием на опухолевую ткань, существенно увеличивается, что, в свою очередь, приводит к более эффективной деструкции опухолевой ткани. Следует отметить, если суммарное время криовоздействия при

increasingly expressed in prostate CSCs, protects the cells from apoptosis [73]. This fact stipulates a need to apply assisted therapies during cryoablation utilizing the agents, selectively causing the inactivation of this cell subpopulation, *e.g.* an antidiabetic drug Metformin (Bristol-Myers Squibb, USA), recombinant IL-15, fetal liver cells *etc.* [4, 9, 26, 27, 35].

High probability of CSCs survival after cryoexposure determined a need in designing the cryoablation method optimization. Many researchers have focused their attention to studying the possibility of using multiple freeze-thawing cycles. The expediency of this method was confirmed by the fact that each cycle of freeze-thawing resulted in a significant increase of both the size of necrosis area and cytotoxic effect, caused by cryoexposure on tumor tissue, that in its turn leads to more efficient destruction of a tumor tissue. Of note is the fact, that if the total time of cryoexposure during several freeze-thawing cycles was less than at a single freezing, the effect of multiple freezing was significantly increased [36]. Probably, this was due to the fact that single cryoexposure potentiates an inflammatory response of tissues, which might lead to the CSCs stimulation, and multiple procedure resulted in the death of these cells [20]. Model experiments with the *in vivo* recultured EC demonstrated a need in a multiple cryoexposure on tumor cells to complete the inactivation of tumor-inducing potential of CSCs, especially in case of 'aged' tumor. This fact should be taken into account in clinical oncology when using surgical methods [29, 30].

Thus, despite the fact that the method of tumor cryodestruction has undoubted advantages over surgical removal of transformed tissues, it should be used repeatedly in combination with drugs capable of eliminating the CSCs.

## Conclusions

Investigations in fundamental oncology are focused to studying the unique population of CSCs, being the main structural unit of initiation and responsible for maintaining the growth and metastasis of tumors. Chemo- and radioresistances inherent to CSCs turn them to potential targets for cryoexposure during cryoablation of tumors. The interest of clinicians to use the cryosurgical treatment of malignant tumors is caused by both the possibility of mechanical destruction of the tumor site and fixing of the CSCs in it. Cryoablation is effective, minimally invasive treatment which may be used both in primary tumor and in the case of its relapse after other treatments. This method is an alternative to surgical treatment when the tumor removal is either difficult or impossible. To enhance the effect of cryoablation the multiple cycles of freezing and thawing are also used, allowing the





проведении нескольких циклов замораживания-оттаивания будет меньше, чем при однократном замораживании, то эффект от многократного замораживания значительно увеличится [36]. Возможно, это обусловлено тем, что при однократном криовоздействии потенцируется воспалительный ответ тканей, который может приводить к стимуляции СРК, а при многократном – к гибели этих клеток [26]. В модельных экспериментах с перевиваемой *in vivo* АКЭ продемонстрирована необходимость многократного криовоздействия на опухолевые клетки с целью полной инактивации опухоль-индуцирующего потенциала СРК, особенно при «старении» опухоли. Данный факт должен учитываться в клинической онкологии при использовании хирургических методов [5, 6].

Таким образом, несмотря на то, что метод криодеструкции опухолей имеет несомненное преимущество перед хирургическим удалением переродившихся тканей, его целесообразно использовать повторно в комбинации с препаратами, способными элиминировать СРК.

### Выводы

Исследования в области фундаментальной онкологии сосредоточены на изучении уникальной популяции СРК, которые являются главной структурной единицей инициации и отвечают за поддержание роста и метастазирование опухолей. Химио- и радиорезистентность делает СРК потенциальными клетками-мишенями для факторов криовоздействия при криоиррадации опухолей. Интерес клиницистов к применению криохирургического метода лечения злокачественных новообразований обусловлен не только возможностью механической деструкции опухолевого сайта, но и фиксацией в нем СРК. Криоабляция является эффективным минимально-инвазивным методом лечения, который может применяться как при первичной опухоли, так и в случае ее рецидива после других видов терапии. Данный метод представляет собой альтернативу хирургическому лечению в тех случаях, когда удаление опухоли затруднено или невозможно. Для усиления эффекта криоабляции также используются многократные циклы замораживания-оттаивания, что позволяет увеличить размер зоны некроза и усилить деструкцию опухолевой ткани. Тем не менее, не всегда удается достичь гибели всех опухолевых клеток и, в частности СРК, не повредив «здоровые» ткани. Сочетание криоабляции и введения цитотоксических по отношению к СРК препаратов увеличивает повреждающее действие замораживания на клетки опухоли. Также перспективным в лечении онкологических заболеваний является метод нанокриохирургии, обеспечи-

increase of necrotic area size and enhancing the destruction of tumor tissue. However, the destruction of all tumor cells is not always achieved, in particular CSCs, without damage of the ‘healthy’ tissues. A combination of cryoablation and administration of cytotoxic drugs in respect to CSCs increases the damaging effects of freezing on tumor cells. Nanocryosurgery is also a promising tool when treating cancer, ensuring the destruction of a large number of CSCs, that reduces the risk of relapses. Despite the fact that cryoablation is a promising and rapidly developing method of treating tumors, there are still some unsolved issues remained: to minimize the damage of adjacent healthy tissues; to determine a sufficient rate of tumor peripheral areas freezing; to study thoroughly *in vivo* and *in vitro* the processes occurring in the tissues subjected to freezing. The solution to these problems is important to improve and increase the accuracy of cryoablation.

### References

1. Aghayev A., Tatli S. The use of cryoablation in treating liver tumors. *Expert Rev Med Devices* 2014; 11 (1): 41–52.
2. Ajani J.A., Song S., Hochster H.S., Steinberg I.B. Cancer stem cells: the promise and the potential. *Semin Oncol* 2015; 42 (1): S3–S17.
3. 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 (7): 3983–3989.
4. Azzi S., Bruno S., Giron-Michel J., et al. Differentiation therapy: targeting human renal cancer stem cells with interleukin 15. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103 (24): 1884–1898.
5. Baust J.G., Gage A.A. Progress toward optimization of cryosurgery. *Techn Cancer Res Treat* 2004; 3 (2): 95–101.
6. Baust J.G., Gage A.A., Bjerklund Johansen T.E., Baust J.M. Mechanisms of cryoablation: clinical consequences on malignant tumors. *Cryobiology* 2014; 68 (1): 1–11.
7. Bergsagel D.E., Valeriote F.A. Growth characteristics of a mouse plasma cell tumor. *Cancer Res* 1968; 28 (11): 2187–2196.
8. Bomers J.G., Yakar D., Overduin C.G., Sedelaar J.P. et al. MR imaging-guided focal cryoablation in patients with recurrent prostate cancer. *Radiology* 2013; 268 (2): 451–460.
9. Bondarovich N.A., Ostankova L.V., Sirous M.A. et al. Using fetal liver cells to correct the immune system of C3H line mice. *Svit Meditsyny i Biologii* 2007; (1): 40–46.
10. Breda A., Lam J.S., Riggs S. et al. In vivo efficacy of laparoscopic assisted percutaneous renal cryotherapy: evidence based guidelines for the practicing urologist. *J Urol* 2008; 79 (1): 333–337.
11. Bruce W.R., Van Der Gaag H. A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature* 1963; 199: 79–80.
12. Caso J.R., Tsivian M., Mouraviev V. et al. Complications and postoperative events after cryosurgery for prostate cancer. *Br J Urol Int* 2012; 109 (6): 840–845.
13. Chaffer C.L., Brueckmann I., Scheel C. et al. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108 (19): 7950–7955.
14. Chen Y., Li S. Molecular signatures of chronic myeloid leukemia stem cells. *Biomarker Research* 2013; 1 (1): 21–27.
15. Clarke M.F., Dick J.E., Dirks P.B. et al. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR



вающий разрушение большого количества СРК, что снижает риск развития рецидивов. Несмотря на то, что криоабляция является перспективным и активно развивающимся методом лечения новообразований, не решенными остаются некоторые вопросы: минимизация повреждения окружающих здоровых тканей; определение достаточной степени промораживания периферических зон опухоли; детальное исследование *in vivo* и *in vitro* процессов, происходящих в подвергшихся замораживанию тканях. Решение этих задач важно для улучшения и повышения точности криоабляции.

### Литература

1. Бондарович Н.А., Останкова Л.В., Сироус М.А. и др. Использование клеток фетальной печени для коррекции иммунной системы мышей линии СЗН // Світ медицини та біології. – 2007. – №1. – С. 40–46.
2. Гольцев А.Н., Бабенко Н.Н., Гаевская Ю.А. и др. Способность наночастиц на основе ортованадатов к идентификации *in vitro* и ингибции *in vivo* стволовых раковых клеток // Материалы IV Международ. науч. конф. «Наноразмерные системы: строение, свойства, технологии» (Киев, 19–22 ноября, 2013 г.). В сб.: Наносистемы, наноматериалы, нанотехнології. – К., 2013. – С. 15.
3. Гольцев А.Н., Бабенко Н.Н., Гаевская Ю.А. и др. Инактивация роста аденокарциномы Эрлиха после обработки наночастицами на основе ортованадатов: Сб. тезисов IV Международ. науч. конф. «Наноструктурные материалы – 2014: Беларусь-Россия-Украина» (Минск, 7–10 октября 2014). – Минск, 2014. – С. 394–395.
4. Гольцев А.М., Бондарович М.О., Кузнецов А.В. та ін. Визначення стану Т-клітинної ланки імунітету і вмісту стовбурових ракових клітин як критерій оцінки ефективності превентивної терапії раку молочної залози кріоконсервованими клітинами фетальної печінки // Проблеми кріобіології і кріомедицини. – 2014. – Т. 24, №3. – С. 238–248.
5. Гольцев А.Н., Дябина О.А., Ямпольская Е.Е. и др. Особенности ответа раковых стволовых клеток аденокарциномы Эрлиха на криводействие: Материалы Междунар. заоч. науч.-практ. конф. «Теоретические и практические аспекты современной кріобіології». – Сыктывкар, 2014. – С. 335–340.
6. Гольцев А.М., Сафранчук О.В., Бондарович М.О. та ін. Зміна кріолабільності стовбурових ракових клітин у процесі культивування аденокарциноми Ерліха *in vivo* // Фізіолог. журнал. – 2011. – №4. – С. 68–76.
7. Гольцев А.М., Сафранчук О.В., Челомбитко О.В. та ін. Оцінка функціональної активності стовбурових пухлинних клітин аденокарциноми Ерліха після взаємодії з наночастками на основі ортованадатів: IV міждисциплін. конф. «Биологические активные вещества и материалы: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» (27 мая – 1 июня 2013 г.). Новый свет, 2013. – С. 385–386.
8. Aghayev A., Tatli S. The use of cryoablation in treating liver tumors // Expert. Rev. Med. Devices. – 2014. – Vol. 11, №1. – P. 41–52.
9. Ajani J.A., Song S., Hochster H.S., Steinberg I.B. Cancer stem cells: the promise and the potential // Semin. Oncol. – 2015. – Vol. 42. – Suppl 1. – P. S3–S17.
- workshop on cancer stem cells. Cancer Res 2006; 66 (19): 9339–9344.
16. Clarke D.M., Hollister W.R., Baust J.G., Van Buskirk R.G. Cryosurgical modeling sequence of freezing and cytotoxic agent application affects cell death. Mol Urol 1999; 3 (1): 25–31.
17. Cohnheim J. Ueber Entzündung und Eiterung. Path Anat Physiol Klin Med 1867; 40: 1–79.
18. Condiotti R., Guo W., Ben-Porath I. Evolving views of breast cancer stem cells and their differentiation states. Crit Rev Oncog 2014; 19 (5): 337–348.
19. Croker A.K., Goodale D., Chu J. et al. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. J Cell Mol Med 2009; 13 (8B): 2236–2252.
20. Diabina O.A., Ostankov M.V., Bondarovich N.A., Goltsev A.N. Freeze-thawing-cycle-dependent cryoability of Ehrlich carcinoma stem-like cells. Proceedings of 50<sup>th</sup> anniversary celebration annual scientific conference & AGM "Freezing biological time". London, UK; 2014, p. 73.
21. Erinjeri J.P., Clark T.W. Cryoablation: mechanism of action and devices. J Vasc Interv Radiol 2010; 21 (8): S187–191.
22. Gaitanis G, Bassukas I. Intralesional bevacizumab as in-add adjuvant to immunocryosurgery for locally advanced basal cell carcinoma. J Eur Acad Dermatol Venerol 2014; 28 (8): 1117–1121.
23. Ghebeh H., Sleiman G.M., Manogaran P.S. et al. Profiling of normal and malignant breast tissue show CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> phenotype as a predominant stem/progenitor marker when used in combination with Ep-CAM/CD49f markers. BMC Cancer 2013; 13: 289–303.
24. Goltsev A.N., Babenko N.N., Gaevskaya Yu. A. et al. The ability of orthovanadates-based nanoparticles to identify *in vitro* and *in vivo* inhibition of cancer stem cells // Proceedings of IV International conference 'Nanoscale systems: structure, properties, technology'; Kyiv: NANSIS, 2013, 15 p.
25. Goltsev A.N., Babenko N.N., Gaevskaya Yu. A. et al. Inactivation of Ehrlich adenocarcinoma growth after treatment with orthovanadates-based nanoparticles. Proceedings of the IV International Scientific Conference 'Nanostructured Materials'; Minsk; 2014, p. 394–395.
26. Goltsev A.M., Bondarovich M.O., Kuznyakov A.V. et al. Determination of immunity T-cell link state and content of cancer stem cells as a criterion to estimate efficiency of preventive breast cancer therapy with cryopreserved fetal liver cells. Problems of Cryobiology and Cryomedicine 2014; 24 (3): 238–248.
27. Goltsev A.N., Bondarovich N.A., Kuznyakov A.V. et al. State of immune status and cell pool with cancer stem cells features in C3H mice with determined breast cancer development after administering cryopreserved fetal liver cells. Proceedings of 50<sup>th</sup> Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM 'Freezing biological time'; London, UK; 2014, P. 68.
28. Goltsev A.N., Chelombitko O.V., Bondarovich N.A. et al. Cryopreservation effect on pluripotency gene expression in Ehrlich carcinoma cells Proceedings of 50<sup>th</sup> Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM 'Freezing biological time'; London, UK; 2014, p. 84.
29. Goltsev A.N., Dyabina O.A., Yampolskaya E.E. et al. Features of response of Ehrlich adenocarcinoma cancer stem cells on cryotherapy. Proceedings of the International Conference 'Theoretical and practical aspects of modern cryobiology'; Syktyvkar; 2014, p. 335–340.
30. Goltsev A.M., Safranchuk O.V., Bondarovich M.O. et al. Change of cancer stem cells cryolability in the process of Ehrlich adenocarcinoma cultivating *in vivo*. Fiziologichny Zhurnal 2011; (4): 68–76.
31. Goltsev A.M., Safranchuk O.V., Chelombitko O.V. et al. Assessment of functional activity of Ehrlich adenocarcinoma tumor



10. 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, №7. – P. 3983–3989.
11. Azzi S., Bruno S., Giron-Michel J. et al. Differentiation therapy: targeting human renal cancer stem cells with interleukin 15 // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2011. – Vol. 103, №24. – P. 1884–1898.
12. Baust J.G., Gage A.A. Progress toward optimization of cryosurgery // *Techn. Cancer Res. Treat.* – 2004. – Vol. 3, №2. – P. 95–101.
13. Baust J.G., Gage A.A., Bjerklund Johansen T.E., Baust J.M. Mechanisms of cryoablation: clinical consequences on malignant tumors // *Cryobiology*. – 2014. – Vol. 68, №1. – P. 1–11.
14. Bergsagel D.E., Valeriote F.A. Growth characteristics of a mouse plasma cell tumor // *Cancer Res.* – 1968. – Vol. 28, №11. – P. 2187–2196.
15. Bomers J.G., Yakar D., Overduin C.G. et al. MR imaging-guided focal cryoablation in patients with recurrent prostate cancer // *Radiology*. – 2013. – Vol. 268, №2. – P. 451–460.
16. Breda A., Lam J.S., Riggs S. et al. In vivo efficacy of laparoscopic assisted percutaneous renal cryotherapy: evidence based guidelines for the practicing urologist // *J. Urol.* – 2008. – Vol. 179, №1. – P. 333–337.
17. Bruce W.R., Van Der Gaag H. A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo // *Nature*. – 1963. – Vol. 199. – P. 79–80.
18. Caso J.R., Tsivian M., Mouraviev V. et al. Complications and postoperative events after cryosurgery for prostate cancer // *Br. J. Urol. Int.* – 2012. – Vol. 109, №6. – P. 840–845.
19. Chaffer C.L., Brueckmann I., Scheel C. et al. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2011. – Vol. 108, №19. – P. 7950–7955.
20. Chen Y., Li S. Molecular signatures of chronic myeloid leukemia stem cells // *Biomarker Research*. – 2013. – Vol. 1, №1. – P. 21–27.
21. Clarke M.F., Dick J.E., Dirks P.B. et al. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66, №19. – P. 9339–9344.
22. Clarke D.M., Hollister W.R., Baust J.G., Van Buskirk R.G. Cryosurgical modeling sequence of freezing and cytotoxic agent application affects cell death // *Mol. Urol.* – 1999. – Vol. 3, №1. – P. 25–31.
23. Cohnheim J. Ueber Entzündung und Eiterung // *Path. Anat. Physiol. Klin. Med.* – 1867. – Vol. 40. – P. 1–79.
24. Condiotti R., Guo W., Ben-Porath I. Evolving views of breast cancer stem cells and their differentiation States // *Crit. Rev. Oncog.* – 2014. – Vol. 19, №5. – P. 337–348.
25. Croker A.K., Goodale D., Chu J. et al. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability // *J. Cell. Mol. Med.* – 2009. – Vol. 13, №8B. – P. 2236–2252.
26. Diabina O.A., Ostankov M.V., Bondarovich N.A., Goltsev A.N. Freeze-thawing-cycle-dependent cryoability of Ehrlich carcinoma stemness-like cells // Abstracts of 50<sup>th</sup> Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM 'Freezing biological time'. – 2014, London, UK. – P. 73.
27. Erinjeri J.P., Clark T.W. Cryoablation: mechanism of action and devices // *J. Vasc. Interv. Radiol.* – 2010. – Vol. 21, №8. – P. S187–S191.
28. Gaitanis G., Bassukas I. Intralesional bevacizumab as in-add adjuvant to immunocryosurgery for locally advanced basal cell carcinoma // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* – 2014. – Vol. 28, №8. – P. 1117–1121.
29. Ghebeh H., Sleiman G.M., Manogaran P.S. et al. Profiling of normal and malignant breast tissue show CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> phenotype as a predominant stem/progenitor marker when used in combination with Ep-CAM/CD49f markers // *B.M.C. Cancer*. – 2013. – Vol. 13. – P. 289–303.
- stem cells after interaction with orthovanadate-based nanoparticles. Proceedings of the 4<sup>th</sup> Interdisciplinary Conference 'Biologically active materials: fundamentals and applied problems of production and application'; Novyi Svet, Crimea; 2013, p. 385–386.
32. Gonder M.J., Soanes W.A., Smith V. Experimental prostate cryosurgery. *Invest Urol* 1964; (1): 610–619.
33. Green H.N., Crockett S.D., Martyshkin D.V. et al. A histological evaluation and in vivo assessment of intratumoral near infrared photothermal nanotherapy-induced tumor regression. *Int J Nanomedicine* 2014; 9 (1): 5093–5102.
34. Guo Z. Pay attention to the problems in cryoablation therapy for prostate cancer *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (National Medical Journal of China)* 2010; 90 (42): 2959–2961.
35. Gupta P.B., Onder T.T., Jiang G. et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 2009; 138 (4): 645–659.
36. Hinshaw J.L., Littrup P.J., Durick N. et al. Optimizing the protocol for pulmonary cryoablation: a comparison of a dual- and triple-freeze protocol. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2010; 33(6): 1180–1185.
37. Jaggupilli A., Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012: 1–11.
38. Jeha S., Coustan-Smith E., Pei D. et al. Impact of tyrosine kinase inhibitors on minimal residual disease and outcome in childhood Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2014; 120 (10): 1514–1519.
39. Joosten J.J., Muijen G.N., Wobbes T., Ruers T.J. In vivo destruction of tumor tissue by cryoablation can induce inhibition of secondary tumor growth: an experimental study. *Cryobiology* 2001; 42 (1): 49–58.
40. Kapoor A., Kumar S. Cancer stem cell: A rogue responsible for tumor development and metastasis. *Indian J Cancer* 2014; 51 (3): 282–289.
41. Kashiwara H., Shimada M., Kurita N. et al. CD133 expression is correlated with poor prognosis in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2014; 61 (134): 1563–1567.
42. Kim F.J., Cerqueira M.A., Almeida J.C. et al. Initial Brazilian experience in the treatment of localized prostate cancer using a new generation cryotechnology: feasibility study. *Int Braz J Urol* 2012; 38 (5): 620–626.
43. Kinoshita S., Harada J., Kanetsuna Y. et al. Initial experience of percutaneous cryoablation to treat small cancer of the breast. *Low temp Med* 2014; 40 (1): 4–10.
44. Lapidot T., Sirard C., Vormoor J. et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367 (6464): 645–648.
45. Li Y.H., Elshafei A., Agarwal G. et al. Salvage focal prostate cryoablation for locally recurrent prostate cancer after radiotherapy: Initial results from the cryo on-line data registry. *Prostate* 2015; 75 (1): 1–7.
46. Lim S.H., Jang J., Park J.O. CD133-positive tumor cell content is a predictor of early recurrence in colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol* 2014; 5 (6): 47–56.
47. Lim S.H., Spring K.J., de Souza P., MacKenzie S., Bokey L. Circulating tumour cells and circulating nucleic acids as a measure of tumour dissemination in non-metastatic colorectal cancer surgery. *Eur J Surg Oncol* 2015; 41 (3): 309–314.
48. Lindgren G., Larko O. Cryosurgery of eyelid basal cell carcinomas including 781 cases treated over 30 years. *Acta Ophthalmol* 2014; 92 (8): 787–792.
49. Liu J., Deng Z.S. Nano-cryosurgery: advances and challenges. *J Nanosci Nanotechnol* 2009; 9 (8): 4521–4542.
50. Long J.P., Bahn D., Lee F. et al. Five-year retrospective multi-institutional pooled analysis of cancer-related outcomes after cryosurgical ablation of the prostate. *Urology* 2001; 57 (3): 518–523.
51. Manenti G., Perretta T., Gaspari E. et al. Percutaneous local ablation of unifocal subclinical breast cancer: clinical expe-



30. Goltsev A.N., Bondarovich N.A., Kuznyakov A.V. et al. State of immune status and cell pool with cancer stem cells features in C3H mice with determined breast cancer development after administering cryopreserved fetal liver cells // Abstracts of 50<sup>th</sup> Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM 'Freezing biological time'. – 2014, London, UK. – P. 68.
31. Goltsev A.N., Chelombitko O.V., Bondarovich N.A. et al. Cryopreservation effect on pluripotency gene expression in Erlich carcinoma cells // Abstracts of 50<sup>th</sup> Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM 'Freezing biological time'. – 2014, London, UK. – P. 84.
32. Gonder M.J., Soanes W.A., Smith V. Experimental prostate cryosurgery // *Invest. Urol.* – 1964. – Vol. 1. – P. 610–619.
33. Green H.N., Crockett S.D., Martyskin D.V. et al. A histological evaluation and in vivo assessment of intratumoral near infrared photothermal nanotherapy-induced tumor regression // *Int. J. Nanomedicine.* – 2014. – Vol. 9, №1. – P. 5093–5102.
34. Guo Z. Pay attention to the problems in cryoablation therapy for prostate cancer // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (National Medical Journal of China)*. – 2010. – Vol. 90, №42. – P. 2959–2961.
35. Gupta P.B., Onder T.T., Jiang G. et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening // *Cell.* – 2009. – Vol. 138, №4. – P. 645–659.
36. Hinshaw J.L., Littrup P.J., Durick N. et al. Optimizing the protocol for pulmonary cryoablation: a comparison of a dual- and triple-freeze protocol // *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* – 2010. – Vol. 33, №6. – P. 1180–1185.
37. Jaggupilli A., Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity // *Clin. Dev. Immunol.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–11.
38. Jeha S., Coustan-Smith E., Pei D. et al. Impact of tyrosine kinase inhibitors on minimal residual disease and outcome in childhood Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia // *Cancer.* – 2014. – Vol. 120, №10. – P. 1514–1519.
39. Joosten J.J., Muijen G.N., Wobbes T., Ruers T.J. In vivo destruction of tumor tissue by cryoablation can induce inhibition of secondary tumor growth: an experimental study // *Cryobiology.* – 2001. – Vol. 42, №1. – P. 49–58.
40. Kapoor A., Kumar S. Cancer stem cell: A rogue responsible for tumor development and metastasis // *Indian J. Cancer.* – 2014. – Vol. 51, №3. – P. 282–289.
41. Kashihara H., Shimada M., Kurita N. et al. CD133 expression is correlated with poor prognosis in colorectal cancer // *Hepato-gastroenterology.* – 2014. – Vol. 61, №134. – P. 1563–1567.
42. Kim F.J., Cerqueira M.A., Almeida J.C. et al. Initial brazilian experience in the treatment of localized prostate cancer using a new generation cryotechnology: feasibility study // *Int. Braz. J. Urol.* – 2012. – Vol. 38, №5. – P. 620–626.
43. Kinoshita S., Harada J., Kanetsuna Y. et al. Initial experience of percutaneous cryoablation to treat small cancer of the breast // *Low Temp. Med.* – 2014. – Vol. 40, №1. – P. 4–10.
44. Lapidot T., Sirard C., Vormoor J. et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice // *Nature.* – 1994. – Vol. 367, №64. – P. 645–648.
45. Li Y.H., Elshafei A., Agarwal G. et al. Salvage focal prostate cryoablation for locally recurrent prostate cancer after radiotherapy: Initial results from the cryo on-line data registry // *Prostate.* – 2015. – Vol. 75, №1. – P. 1–7.
46. Lim S.H., Jang J., Park J.O. et al. CD133-positive tumor cell content is a predictor of early recurrence in colorectal cancer // *J. Gastrointest. Oncol.* – 2014. – Vol. 5, №6. – P. 47–56.
47. Lim S.H., Spring K.J., de Souza P. et al. Circulating tumour cells and circulating nucleic acids as a measure of tumour dissemination in non-metastatic colorectal cancer surgery // *Eur. J. Surg. Oncol.* – 2015. – Vol. 41, №3. – P. 309–314.
48. Lindgren G., Larko O. Cryosurgery of eyelid basal cell carcinomas including 781 cases treated over 30 years // *Acta Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 92, №8. – P. 787–792.
49. Liu J., Deng Z.S. Nano-cryosurgery: advances and challenges // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2009. – Vol. 9, №8. – P. 4521–4542.
50. Goltsev A.N., Bondarovich N.A., Kuznyakov A.V. et al. Experience and preliminary results of cryotherapy. *Eur Radiol* 2011; 21 (11): 2344–2353.
51. Ni J., Cozzi P.J., Hao J.L. et al. CD44 variant 6 is associated with prostate cancer metastasis and chemo-/radioresistance. *Prostate* 2014; 74 (6): 602–617.
52. O'Connor O.A., Tobinai K. Putting the clinical and biological heterogeneity of non-hodgkin lymphoma into context. *Clin Cancer Res* 2014; 20 (20): 5173–5181.
53. Park C.H., Bergsagel D.E., McCulloch E.A. Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. *J Natl Cancer Inst* 1971; 46 (2): 411–422.
54. Rao W., Bellotti A., Littrup P.J. et al. Nanoparticle-encapsulated doxorubicin enhances cryoablation of cancer stem-like cells. *Technology* 2014; 2: 28–35.
55. Robilotto A.T., Baust J.M., Van Buskirk R.G. et al. Temperature-dependent activation of differential apoptotic pathways during cryoablation in a human prostate cancer model. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2013; 16 (1): 41–49.
56. Rosland G.V., Engelsen A.S. Novel points of attack for targeted cancer therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2015; 116 (1): 9–18.
57. Saroufim A., Messai Y., Hasmim M. et al. Tumoral CD105 is a novel independent prognostic marker for prognosis in clear-cell renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2014; 110 (7): 1778–1784.
58. Shah T.T., Ahmed H., Kanthabalan A. et al. Focal cryotherapy of localized prostate cancer: a systematic review of the literature. *Expert Rev Anticancer Ther* 2014; 14 (11): 1337–1347.
59. Shibata T., Yamashita T., Suzuki K. et al. Enhancement of experimental pulmonary metastasis and inhibition of subcutaneously transplanted tumor growth following cryosurgery. *Anticancer Res* 1998; 18 (6A): 4443–4448.
60. Sidana A. Cancer immunotherapy using tumor cryoablation. *Immunotherapy* 2014; 6 (1): 85–93.
61. Sugiyama Y., Saji S., Miya K. Therapeutic effect of multimodal therapy, such as cryosurgery, locoregional immunotherapy and systemic chemotherapy against far advanced breast cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2001; 28 (11): 1616–1619.
62. Sun Z.Q., Yang Y., Liu J. In vivo experiments and numerical investigations on nanocryosurgical freezing of target tissues with large blood vessels. *J Biomed Nanotechnol* 2012; 8 (1): 10–18.
63. Tarkowski R., Rzaca M. Cryosurgery in the treatment of women with breast cancer – a review. *Gland Surgery* 2014; 3 (2): 88–93.
64. Terwijn M., Zeijlemaker W., Kelder A. et al. Leukemic stem cell frequency: a strong biomarker for clinical outcome in acute myeloid leukemia. *PLoS One* 2014; 9 (9): e107587.
65. Wassmann B., Pfeifer H., Goekbuget N. et al. Alternating versus concurrent schedules of imatinib and chemotherapy as front-line therapy for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph<sup>+</sup> ALL). *Blood* 2006; 108 (5): 1469–477.
66. Weigmann A., Corbeil D., Hellwig A., Huttner W.B. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94 (23): 12425–12430.
67. Yamashita T., Hayakawa K., Hosokawa M. et al. Enhanced tumor metastasis in rats following cryosurgery of primary tumor. *Gann* 1982; 73: 222–228.
68. Yin A.H., Miraglia S., Zanjani E.D. et al. AC133, is a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90 (12): 5002–5012.
69. Yu Q., Yi J., Zhao G., Zhang Y. Effect of vascular network and nanoparticles on heat transfer and intracellular ice formation in tumor tissues during cryosurgery. *CryoLetters* 2014; 35 (2): 95–100.
70. Yu H., Burke C.T. Comparison of percutaneous ablation technologies in the treatment of malignant liver tumors. *Semin Intervent Radiol* 2014; 31 (2): 129–137.



50. Long J.P., Bahn D., Lee F. et al. Five-year retrospective multi-institutional pooled analysis of cancer-related outcomes after cryosurgical ablation of the prostate // *Urology*. – 2001. – Vol. 57, №3. – P. 518–523.
51. Manenti G., Perretta T., Gaspari E. et al. Percutaneous local ablation of unifocal subclinical breast cancer: clinical experience and preliminary results of cryotherapy // *Eur. Radiol.* – 2011. – Vol. 21, №11. – P. 2344–2353.
52. Ni J., Cozzi P.J., Hao J.L. et al. CD44 variant 6 is associated with prostate cancer metastasis and chemo-/radioresistance // *Prostate*. – 2014. – Vol. 74, №6. – P. 602–617.
53. O'Connor O.A., Tobinai K. Putting the clinical and biological heterogeneity of non-hodgkin lymphoma into context // *Clin. Cancer Res.* – 2014. – Vol. 20, №20. – P. 5173–5181.
54. Park C.H., Bergsagel D.E., McCulloch E.A. Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1971. – Vol. 46, №2. – P. 411–422.
55. Rao W., Bellotti A., Littrup P.J. et al. Nanoparticle-encapsulated doxorubicin enhances cryoablation of cancer stem-like cells // *Technology*. – 2014. – Vol. 2. – P. 28–35.
56. Robilotto A.T., Baust J.M., Van Buskirk R.G. et al. Temperature-dependent activation of differential apoptotic pathways during cryoablation in a human prostate cancer model // *Prostate Cancer Prostatic Dis.* – 2013. – Vol. 16, №1. – P. 41–49.
57. Rosland G.V., Engelsen A.S. Novel points of attack for targeted cancer therapy // *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* – 2015. – Vol. 116, №1. – P. 9–18.
58. Saroufim A., Messai Y., Hasmim M. et al. Tumoral CD105 is a novel independent prognostic marker for prognosis in clear-cell renal cell carcinoma // *Br. J. Cancer*. – 2014. – Vol. 110, №7. – P. 1778–1784.
59. Shah T.T., Ahmed H., Kanthabalan A. et al. Focal cryotherapy of localized prostate cancer: a systematic review of the literature // *Expert Rev. Anticancer Ther.* – 2014. – Vol. 14, №11. – P. 1337–1347.
60. Shibata T., Yamashita T., Suzuki K. et al. Enhancement of experimental pulmonary metastasis and inhibition of subcutaneously transplanted tumor growth following cryosurgery // *Anticancer Res.* – 1998. – Vol. 18, №6A. – P. 4443–4448.
61. Sidana A. Cancer immunotherapy using tumor cryoablation // *Immunotherapy*. – 2014. – Vol. 6, №1. – P. 85–93.
62. Sugiyama Y., Saji S., Miya K. et al. Therapeutic effect of multimodal therapy, such as cryosurgery, locoregional immunotherapy and systemic chemotherapy against far advanced breast cancer // *Gan To Kagaku Ryoho*. – 2001. – Vol. 28, №11. – P. 1616–1619.
63. Sun Z.Q., Yang Y., Liu J. In vivo experiments and numerical investigations on nanocryosurgical freezing of target tissues with large blood vessels // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2012. – Vol. 8, №1. – P. 10–18.
64. Tarkowski R., Rzaca M. Cryosurgery in the treatment of women with breast cancer – a review // *Gland Surgery*. – 2014. – Vol. 3, №2. – P. 88–93.
65. Terwijn M., Zeijlemaker W., Kelder A. et al. Leukemic stem cell frequency: a strong biomarker for clinical outcome in acute myeloid leukemia // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, №9. – e107587.
66. Wassmann B., Pfeifer H., Goekbuget N. et al. Alternating versus concurrent schedules of imatinib and chemotherapy as front-line therapy for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph<sup>+</sup> ALL) // *Blood*. – 2006. – Vol. 108, №5. – P. 1469–1477.
67. Weigmann A., Corbeil D., Hellwig A., Huttner W.B. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1997. – Vol. 94, №23. – P. 12425–12430.
68. Yamashita T., Hayakawa K., Hosokawa M. et al. Enhanced tumor metastasis in rats following cryosurgery of primary tumor // *Gann*. – 1982. – Vol. 73. – P. 222–228.
72. Zakharychev V.D., Samedov V.Kh. Complex treatment of oral mucosa cancer. *Klin Khir* 2013; (9): 13–16.
73. Zeng Y., Wodzinski D., Gao D. et al. Stress-response protein RBM3 attenuates the stem-like properties of prostate cancer cells by interfering with CD44 variant splicing. *Cancer Res.* 2013; 73 (13): 4123–4133.
74. Zhang D.G., Jiang A.G., Lu H.Y. et al. Isolation, cultivation and identification of human lung adenocarcinoma stem cells. *Oncol Lett* 2015; 9 (1): 47–54.
75. Zhang L., Li H., Ge C. et al. Inhibitory effects of transcription factor Ikaros on the expression of liver cancer stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2014; 5 (21): 10621–10635.



69. Yin A.H., Miraglia S., Zanjani E.D. et al. AC133, is a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells // *Blood*. – 1997. – Vol. 90, №12. – P. 5002–5012.
70. Yu Q., Yi J., Zhao G., Zhang Y. Effect of vascular network and nanoparticles on heat transfer and intracellular ice formation in tumor tissues during cryosurgery // *CryoLetters*. – 2014. – Vol. 35, №2. – P. 95–100.
71. Yu H., Burke C.T. Comparison of percutaneous ablation technologies in the treatment of malignant liver tumors // *Semin. Intervent. Radiol.* – 2014. – Vol. 31, №2. – P. 129–37.
72. Zakharychev V.D., Samedov V.Kh. Complex treatment of oral mucosa cancer // *Klin. Khir.* – 2013. – №9. – P. 13–16.
73. Zeng Y., Wodzinski D., Gao D. et al. Stress-response protein RBM3 attenuates the stem-like properties of prostate cancer cells by interfering with CD44 variant splicing // *Cancer Res.* – 2013. – Vol. 73, №13. – P. 4123–4133.
74. Zhang D.G., Jiang A.G., Lu H.Y. et al. Isolation, cultivation and identification of human lung adenocarcinoma stem cells // *Oncol. Lett.* – 2015. – Vol. 9, №1. – P. 47–54.
75. Zhang L., Li H., Ge C. et al. Inhibitory effects of transcription factor Ikaros on the expression of liver cancer stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma // *Oncotarget*. – 2014. – Vol. 5, №21. – P. 10621–10635.

