

Винахід належить до експериментальної медицини, зокрема до онкології, і може бути використаний для створення моделей пухлинного росту з різними проліферативними властивостями з метою вивчення закономірностей їхнього поведінки і реакцій на проведені способи лікування.

На сьогоднішній день існує нестача експериментальних досліджень по вивченню загальної біології ракових клітин, а особливо стовбурових ракових клітин (СРК) як структур, що беруть участь в ініціації і підтримці росту пухлини і її метастазуванні. Відсутність цих знань є причиною пізнього діагностування і проведення лікування захворювання лише на етапах стаціонарної і термінальної стадій, хоча не виключається алогічна відповідь пухлинної тканини цього терміну розвитку на деякі терапевтичні заходи. З урахуванням цього, найбільш актуальним є вивчення особливостей поведінки трансформованих клітин, зокрема СРК, на пізніх стадіях пухлинного росту.

З доступних джерел інформації нами виявлений лише спосіб стимуляції проліферативної активності СРК молодшої популяції [1]. Відповідно до цього способу культуру клітин аденокарциноми Ерліха (АКЭ) культивують *in vivo*, потім суспензію клітин АКЭ виділяють і *in vitro* здійснюють стимуляцію проліферативної активності низькими концентраціями вільних радикалів. Вільнорадикальний вплив на клітини АКЭ індукують додаванням у середовище інкубації гідропероксида третинного бутіла і 2,2'-азо-бис(2-амідинопропана). Стимуляцію проліферації визначають по включенню міченого радіонуклідами попередника синтезу нуклеїнових кислот [H^3]-тимідина в ДНК.

Однак цей спосіб не може використовуватися для старіючої популяції пухлинних клітин. Це пояснюється тим, що клітини на різних стадіях розвитку мають розходження в протіканні біохімічних процесів [2], і з цієї причини клітини молодшої і старіючої популяцій по різному реагують на ідентичні фактори стимуляції [1], тобто для різних стадій розвитку пухлинних клітин необхідні різні умови активації проліферативної активності.

Задачею винаходу є створення способу, що забезпечує можливість стимуляції проліферативної активності СРК саме старіючої популяції пухлини.

Ця задача вирішується тим, що в способі стимуляції проліферативної активності СРК, що включає культивування клітин в умовах *in vivo*, виділення суспензії клітин і наступний вплив стимулюючим фактором *in vitro*, відповідно до винаходу, після виділення суспензію клітин АКЭ доводять до концентрації 1×10^6 клітин/мл, а як стимулюючий фактор використовують кріовплив. Кріовплив здійснюють за однією з наступних програм: охолодження зі швидкістю 1°C /хв до -80°C з наступним прямим зануренням у рідкий азот (програма I) [2]; охолодження зі швидкістю 3°C /хв до -28°C , стабілізація протягом 20 хв, далі зі швидкістю 10°C /хв до -100°C з наступним прямим зануренням у рідкий азот (програма II) [3]; охолодження зі швидкістю 4°C /хв до -28°C , стабілізація протягом 15 хв і пряме занурення у рідкий азот (програма III) [3].

Програми кріовпливу були обрані з числа відомих програм кріоконсервування клітин, виходячи з того, що дані режими забезпечують найбільшу схоронність стовбурових елементів різних клітинних культур. Зазначені режими кріовпливу раніше не використовувалися з метою стимуляції проліферативної активності якого-небудь виду клітин.

Використання вказаної концентрації клітин виключає необхідність після кріовпливу зменшувати чи збільшувати концентрацію (розведення чи центрифугування, відповідно), що дозволяє отримувати істинний ефект кріовпливу на клітини.

Стимуляція низькими температурами дає можливість підвищувати проліферативну активність старіючої популяції СРК (CD44^{hi}) [4] у 1,89-3,66 рази (у порівнянні з нативом). Крім того, стимульовані клітини можуть зберігатися тривалий час і використовуватися в міру необхідності.

Спосіб пояснюється наступними прикладами.

Приклад 1.

Суспензію старіючої популяції клітин АКЭ вводили внутрішньочеревне в дозі 3×10^6 клітин /мишу в об'ємі 0,3 мл, культивували *in vivo* в перитоніальній порожнині (ПП) 7-місячних самок мишей лінії BALB/c, що утримуються в стандартних умовах віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м.Харків). Вихідну суспензію клітин, що знаходилися в асцитичній рідині, доводили до концентрації 1×10^7 клітин/мл фізіологічним розчином («Черкаси-ФАРМА», Україна). Мишей вводили в легкий ефірний наркоз і за допомогою шприца через голку № 10 виділяли з ПП. Концентрацію ядровмісних клітин у суспензії АКЭ підраховували в камері Горяєва [5]. Для оцінки абсолютної кількості клітин у ПП проводили облік об'єму накопиченої в ній асцитичної рідини. Далі за допомогою моноклональних антитіл (BD Pharmingen, USA) ідентифікували СРК із фенотипом CD44^{hi} (кон'юговані з FITC), що являють собою популяцію недиференційованих СРК. Визначення концентрації досліджуваної субпопуляції клітин в АКЭ здійснювали на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (Becton Dickinson, USA). [6] Для мінімізації помилок у пробах аналізували 10000 подій. Облік і аналіз даних здійснювали за допомогою програми WinMDI 2.9. Виділені клітини АКЭ в об'ємі 1,8 мл поміщали в пластикові ампули (Nunc; USA) і *in vitro* піддавали кріовпливу без застосування кріопротекторів в асцитичній рідині на заморожувачі УОП-06 виробництва СКБ з ОП Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Умови кріовпливу: охолодження зі швидкістю 1°C /хв до -80°C з наступним прямим зануренням у рідкий азот (програма I). Відігрівання зразків проводили на водяній бані, при температурі $40-41^\circ\text{C}$ протягом 45-50 сек, при постійному шутеліруванні ампул до зникнення твердої фази [3]. Для оцінки проліферативної активності клітин АКЭ зразки після кріовпливу культивували *in vivo* зазначеним вище способом. Для оцінки стимуляції проліферативної активності робили обчислення абсолютної кратності збільшення (у вигляді умовних коефіцієнтів) CD44^{hi} клітин за весь термін росту в ПП (0-14 доби). Результати наведені в Табл.1, з якої видно, що проліферативна активність СРК старіючої популяції збільшилася в 3,66 разів.

Приклад 2. Спосіб здійснювали аналогічно Прикладу 1, за винятком умов кріовпливу: охолодження зі швидкістю 3°C /хв до -28°C , стабілізація протягом 20 хв, далі зі швидкістю 10°C /хв до -100°C з наступним прямим зануренням у рідкий азот (програма II). Результати наведені в Табл.1, з якої видно, що проліферативна активність СРК старіючої популяції збільшилася в 2,24 рази.

Приклад 3. Спосіб здійснювали аналогічно Прикладу 1, за винятком умов кріовпливу: охолодження зі

швидкістю 4°C/хв до -28°C, стабілізація протягом 15 хв і наступне пряме занурення у рідкий азот (програма III). Результати, наведені в Табл.1, показують, що проліферативна активність старіючої популяції СРК збільшилася в 1,89 разів.

Приклади 1-3 демонструють те, що кріовплив виявляє стимулюючий ефект на СРК.

Приклад 4. Спосіб здійснювали аналогічно Прикладу 1, за винятком того, що кріовпливу піддавали клітини молодшої популяції АКЭ, що знаходяться на логарифмічній стадії росту.

Результати наведені в Табл.2, з якої видно, що проліферативна активність СРК молодшої популяції АКЭ, на відміну від старіючої, після кріовпливу піддавалася виразному інгібуванню. Це свідчить про різноманіття клітинних реакцій на подібні по природі стимули і про різноспрямованість відповідей, аж до протилежних, на стимули одного походження.

Табл.1

Оцінка дії різних програм кріовпливу на проліферативну активність старіючої популяції СРК.

Показники		абсолютна кратність зміни кількості СРК (CD44 ^{hi}) с 0 до 14 ^т доби		спрямованість кріовпливу (коефіцієнт зміни)	
програми кріовпливу		натив	кріо	інгіб	стим
	I	43,7±3,05	160±11,2	-	3,66±0,25
	II	43,7±3,05	98±6,86	-	2,24±0,17
	III	43,7±3,05	83±5,81	-	1,89±0,13

Табл.2

Порівняльна оцінка спрямованості кріовпливу на проліферативну активність молодшої і старіючої популяцій СРК.

показники	абсолютна кратність зміни кількості СРК (CD44 ^{hi}) с 0 до 14 ^т доби		спрямованість кріовпливу (коефіцієнт зміни)	
	натив	кріо	інгіб	стим
молода популяція клітин (програма I)	135±9,45	97±6,79	1,39±0,09	-
старіюча популяція клітин (програма I)	43,7±3,05	160±11,2	-	3,66±0,25

Джерела інформації:

1. Кондаков И.В. Регуляция пролиферации и апоптоза опухолевых клеток свободными радикалами // Сибирский онкологический журнал. — 2005. - Т. 13, №1.-С.58-61.
2. Федец О.И. Биоэнергетика и пролиферативная активность криоконсервированных клеток аденокарциномы Эрлиха: дис. канд.биол.наук.: -Харьков, 1987-С. 14, 94.
3. Криоконсервирование клеточных суспензий / под.ред. Цуцаевой А.А. - К: Наук, думка, 1983. - С. 121, 175, 240.
4. Park SY. Cellular and genetic diversity in the progression of in situ human breast carcinomas to an invasive phenotype // J Clin. Invest. - 2010. - Vol.1, №120 (2). -P. 636-44.
5. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / под ред. В.В.Меньшикова.- М.: Медицина, 1987. - С. 368.
6. Шторх В., Эмрах И. Определение клеточных маркеров методом мембранной иммуофлюоресценции // Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля.- М.: Медицина, 1987.- С. 254-268