



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94195 (13) C2  
(51) МПК  
C12N 5/09 (2011.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ СТИМУЛЯЦІЇ ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ СТОVBУРОВИХ РАКОВИХ КЛІТИН СТАРІЮЧОЇ ПОПУЛЯЦІЇ

1

(21) а201007001

(22) 07.06.2010

(24) 11.04.2011

(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.

(72) ГОЛЬЦЕВ АНАТОЛІЙ МИКОЛАЙОВИЧ, САФ-  
РАНЧУК ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІВНА, ГРИЩЕНКО  
ВАЛЕНТИН ІВАНОВИЧ, ОСТАНКОВ МАКСИМ ВА-  
ДИМОВИЧ, БОНДАРОВИЧ МИКОЛА ОЛЕКСАНД-  
РОВИЧ, СІРОУС МАРИНА АНАТОЛІЇВНА(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІО-  
МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УК-  
РАЇНИ(56) Park S.Y. 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.Винник Ю.С., Якимов С.В., Карапетян Г.Э., Сычев  
А.Г. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРИОГЕННОЙ СТИМУ-  
ЛЯЦИИ В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКИХ РАН // Вест-  
ник хирургии им. И.И. Грекова. - 2008. - № 1. - С.  
27-28 (реферат).Горохова Н.А. Кріоконсервування культивованих  
фібробластоподібних клітин шляхом повільного  
заморожування і вітрифікації: Автореферат дис...  
канд. біол. наук. - Харків - 2008.Скоробогатова Н.Г. Кріоконсервування фіброблас-  
топодібних клітин-попередників ембріональної  
печінки людини: Автореферат дис... канд. біол.  
наук. - Харків - 2007.Останков М.В. Теоретичне обґрунтування та  
експериментальна перевірка ефективності швид-  
кого двоступінчастого заморожування: Авторефе-  
рат дис... канд. біол. наук. - Харків - 2001.Сакун О.В. Аналіз ефективності кріоконсервування  
клітинних суспензій з постійною та змінною швид-  
кістю охолодження: Автореферат дис... канд. біол.  
наук. - Харків - 2009.

2

Бабенко Н.М. Вплив різних режимів кріоконсерву-  
вання на структурно-функціональні властивості  
ембріональних нервових клітин in vivo та in vitro:  
Автореферат дис... канд. біол. наук. - Харків -  
2003Лозина-Лозинский Л.К. Общие вопросы кробио-  
логии // Кробиология. - 1985. - № 1. - С. 13-19.Федец О.И. Биоэнергетика и пролиферативная  
активность крисконсервированных клеток адено-  
карциномы Эрлиха: дис. канд. биол. наук.: - Харь-  
ков, 1987 - С. 14, 94.Крисконсервирование клеточных суспензий / под.  
ред. Цуцаевой А.А. - К: Наук. думка, 1983. - С. 121,  
175.(57) 1. Спосіб стимуляції проліферативної актив-  
ності старіючої популяції пухлинних клітин, що  
включає культивування клітин в умовах in vivo,  
виділення суспензії клітин і наступний вплив сти-  
мулюючим фактором in vitro, який **відрізняється**  
тим, що після виділення суспензію клітин доводять  
до концентрації  $1 \times 10^7$  клітин/мл, а як стимулюючий  
фактор використовують кровоплив.2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що кріо-  
вплив здійснюють за програмою, відповідно до  
якої клітини охолоджують зі швидкістю  $1^\circ\text{C}/\text{хв.}$  до -  
 $80^\circ\text{C}$  з наступним прямим зануренням у рідкий  
азот.3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що кріо-  
вплив здійснюють за програмою, відповідно до  
якої клітини охолоджують зі швидкістю  $3^\circ\text{C}/\text{хв.}$  до -  
 $28^\circ\text{C}$ , стабілізують протягом 20 хв. і далі охоло-  
джують зі швидкістю  $10^\circ\text{C}/\text{хв.}$  до  $-100^\circ\text{C}$  з наступ-  
ним прямим зануренням у рідкий азот.4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що кріо-  
вплив здійснюють за програмою, відповідно до  
якої клітини охолоджують зі швидкістю  $4^\circ\text{C}/\text{хв.}$  до -  
 $28^\circ\text{C}$ , потім стабілізують протягом 15 хв. з наступ-  
ним прямим зануренням у рідкий азот.

Винахід належить до експериментальної ме-  
дицини, зокрема до онкології, і може бути викорис-  
таний для створення моделей пухлинного росту з  
різними проліферативними властивостями з ме-

тою вивчення закономірностей їхнього поведжен-  
ня і реакцій на проведені способи лікування.

На сьогоднішній день існує нестача експери-  
ментальних досліджень по вивченню загальної

(13) C2  
(11) 94195  
(19) UA

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 мічного радіонуклідом попередника синтезу нуклеїнових кислот [ $^3\text{H}$ ]-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 популяції 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  $1 \times 10^6$  клітин/мл, а як стимулюючий фактор використовують кріовплив. Кріовплив здійснюють за однією з наступних програм: охолодження зі швидкістю  $1^\circ\text{C}/\text{хв}$  до  $-80^\circ\text{C}$  з наступним прямим зануренням у рідкий азот (програма I) [2]; охолодження зі швидкістю  $3^\circ\text{C}/\text{хв}$  до  $-28^\circ\text{C}$ , стабілізація протягом 20 хв, далі зі швидкістю  $10^\circ\text{C}/\text{хв}$  до  $-100^\circ\text{C}$  з наступним прямим зануренням у рідкий азот (програма II) [3]; охолодження зі швидкістю  $4^\circ\text{C}/\text{хв}$  до  $-28^\circ\text{C}$ , 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 ( $\text{CD44}^{\text{hi}}$ ) [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  $3 \times 10^6$  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  $1 \times 10^7$  клітин/мл фізіологічним розчином («Черкаси-ФАРМА», Україна»). Мишей вводили в легкий ефірний наркоз і за допомогою шприца через голку № 10 виділяли з ПП. Концентрацію ядромісних 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  $\text{CD44}^{\text{hi}}$  (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 СКТБ з ОП Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Умови кріовпливу: охолодження зі швидкістю  $1^\circ\text{C}/\text{хв}$  до  $-80^\circ\text{C}$  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)  $\text{CD44}^{\text{hi}}$  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  $3^\circ\text{C}/\text{хв}$  до  $-28^\circ\text{C}$ , стабілізація протягом 20 хв, далі зі швидкістю  $10^\circ\text{C}/\text{хв}$  до  $-100^\circ\text{C}$  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 ІІІ). 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 молоді популяції АКЭ, що знаходяться на логарифмічній стадії росту.

Результати наведені в Табл.2, з якої видно, що проліферативна активність СРК молоді 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 <sup>hi</sup> ) с 0 до 14 <sup>ї</sup> доби |          | спрямованість кріовпливу (коефіцієнт зміни) |           |
|---------------------|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------|---------------------------------------------|-----------|
|                     |     | натив                                                                                     | кріо     | інгіб                                       | стим      |
| програми кріовпливу | 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 молоді і старіючої популяції СРК.

| ПОКАЗНИКИ                              |  | абсолютна кратність зміни кількості СРК (CD44 <sup>hi</sup> ) с 0 до 14 <sup>ї</sup> 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. Биознергетика 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). -Р. 636-44.

5. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / под ред. В.В.Меньшикова.- М.: Медицина, 1987. - С. 368.

6. Шторх В., Эммрах И. Определение клеточных маркеров методом мембранной иммуофлюоресценции // Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. - М.: Медицина, 1987. - С. 254-268.

