

УДК 602.9:611.018:616-006:636.028

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КЛІТИН ПЕРВИННОЇ ПУХЛИНИ МИШЕЙ C57BL/6 З ПЕРЕЩЕПЛЕНОЮ КАРЦИНОМОЮ ЛЕГЕНЬ ЛЬЮІС ЗА ВПЛИВУ АЛОГЕННИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

Л. В. Кладницька¹, А. Й. Мазуркевич¹, Л. В. Гарманчук², С. В. Величко¹, В. В. Нікуліна^{2, 4},
Т. В. Ніколаєнко², В. В. Ковпак¹, О. І. Дасюкевич³, О. В. Скачкова², А. О. Павлюкова¹
kladlarisa@ukr.net

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041, Україна

²Національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології»,
проспект академіка Глушкова, 2, Київ, 03022, Україна

³Інститут експериментальної патології, онкології та радіології ім. Р. Е. Кавецького,
вул. Васильківська, 45, Київ-22, 03022, Україна

⁴Національний інститут раку, МОЗ України, вул. Ломоносова, 33/43, м. Київ,
03022, Україна

*Мета дослідження — вивчення біологічних властивостей клітин первинної пухлини мишей C57BL/6 з перещепленою карциномою легень Льюїс за впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин (МСК). Досліди проводили на самцях мишей C57BL/6 2–3-місячного віку, масою 20–22 г. Алогенні мезенхімальні стовбурові клітини отримували культивуванням первинного матеріалу, що був виділений з кісткового мозку мишей C57BL/6. Культивування клітин проводили за 37°C, 100 % вологості і 5 % CO₂ у середовищі DMEM із додаванням 20 % фетальної сироватки телят та 1 % антибіотика-антимікотика. Мишам внутрішньом'язово інокулювали клітинну суспензію метастатичної карциноми легень Льюїс (LLC) у концентрації $1 \times 10^6 / 0,1$ мл розчину Хенкса. Після інокуляції пухлинних клітин миші були розділені на контрольну і дослідну групи по 8 тварин у кожній. Мишам дослідної групи на 8-й день після інокуляції пухлинних клітин вводили внутрішньовенно алогенні МСК 4-го пасажу в кількості $1,25 \times 10^4$. На 20-ту добу від початку дослідження визначали рівень анеуплоїдії та розподіл клітин первинної пухлини за фазами клітинного циклу методом проточної цитофлуориметрії. Встановлено, що застосування алогенних МСК на 8-му добу після перещеплення метастатичної карциноми легень Льюїс призводить до збільшення вмісту анеуплоїдних клітин в 1,3 рази в первинній пухлині і становить у мишей дослідної групи $76,68 \pm 1,99^{***}$ при $p < 0,001$, тоді як у мишей, яким не вводили МСК — $59,20 \pm 0,80$ %. Вплив МСК на збільшення показника анеуплоїдії клітин пухлинної тканини підтверджує дисперсійний аналіз — $\eta^2_x = 0,86$ при $p < 0,001$. За впливу алогенних МСК змінюється розподіл пухлинних клітин за фазами клітинного циклу. Зокрема, за впливу алогенних МСК підтверджено вірогідне зростання кількості анеуплоїдних клітин проліферативного пулу ($S+G_2/M$) первинної пухлинної тканини до $68,02 \pm 3,42^*$ проти цього показника тварин контрольної групи $56,17 \pm 2,90$ % ($p < 0,05$). Рівень апоптозу пухлинних клітин за впливу МСК вірогідно знижується і становить $41,82 \pm 1,37$ % ($p < 0,001$), проти $56,59 \pm 0,92$ % тварин контрольної групи, що підтверджено дисперсійним аналізом — $\eta^2_x = 0,88$ при $p < 0,001$.*

Ключові слова: АЛОГЕННІ МЕЗЕНХІМАЛЬНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ, ФАЗИ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ, АПОПТОЗ, АНЕУПЛОІДІЯ, ПРОТОЧНА ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЯ, КАРЦИНОМА ЛЕГЕНЬ ЛЬЮІС

THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF TUMOR CELLS IN C57BL/6 MICE WITH TRANSPLANTABLE LEWIS LUNG CARCINOMA WITH INFLUENCE OF ALLOGENEIC MESENCHYMAL STEM CELLS

L. V. Kladnytska¹, A. Y. Mazurkevych¹, L. V. Garmanchuk², S. V. Velychko¹, V. V. Nikulina^{2, 4},
T. V. Nikolaienko², V. V. Kovpak¹, O. I. Dasyukevich³, J. V. Skachrova², A. O. Pavlukova¹
kladlarisa@ukr.net

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Heroyiv Oborony str., 15, Kyiv, 03041, Ukraine

²Taras Shevchenko National University of Kyiv, ESC «Institute of Biology», Ave. Glushkov, 2, Kyiv, 03022, Ukraine

³RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Vasylykivska str., 45 Kyiv, 03022, Ukraine

⁴National Institute of Cancer State Institution, Lomonosova str., 33/43, Kyiv, 03022, Ukraine

*The purpose of the research — to study the biological properties tumor cells in mice C57BL/6 with transplant Lewis lung carcinoma by the influence of allogeneic mesenchymal stem cells. Experiments were performed on male mice C57BL/6 2–3 months of age, weighing 20–22 g. Allogeneic mesenchymal stem cells were obtained by cultivation of primary material that was isolated from the bone marrow of mice C57BL/6. Cell culture was cultivated at 37 °C, 100 % humidity and 5 % CO₂ in DMEM with addition of 20 % fetal bovine serum and 1 % antibiotic-antimycotic. Mice were intramuscularly inoculated cell suspension metastatic Lewis lung carcinoma (LLC) in concentrations 1x10⁶/0.1 ml Hanks solution. After tumor cell inoculation mice were divided into control and experimental groups of 8 animals each. It were injected intravenously allogeneic MSCs 4-th passage in the number 1.25x10⁴ to experimental group mice on day 8 after tumor cells inoculation. On the 20-th day from the beginning of the experiment determined the level of aneuploidy and primary tumor cell division according to the cell cycle phases by flow cytometry. It was established that the use of allogeneic MSCs increased aneuploid cells quantity in 1.3 times in primary tumors and in experimental group mice it was 76.68±1.99*** at p<0.001, whereas in mice not injected MSCs — 59.20±0.80 %. Effect of MSCs on the increase in tumor cell aneuploidy confirms by analysis of variance — $\eta^2_x=0.86$ at p<0.001. Under the influence of allogeneic MSCs we so changing distribution of tumor cells in cell cycle phases. In particular, the influence of allogeneic MSCs confirmed probable increase the number of aneuploidy pool proliferative cells (S+G₂/M) of the primary tumor to 68.02±3.42* against this indicator control group animals 56.17±2.90 % (p<0.05). The apoptosis level of tumor cells under the influence of MSCs significantly reduced to 41.82±1.37 % (p<0.001), compared with 56.59±0.92 % in the control group animals, which was confirmed by analysis of variance — $\eta^2_x=0.88$ at p<0.001.*

Keywords: ALLOGENEIC MESENCHYMAL STEM CELLS, CELL CYCLE PHASES, ANEUPLOIDIYA, FLOW CITOMETRY, LEWIS LUNG CARCINOMA

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ МЫШЕЙ C57BL/6 С ПЕРЕВИТОЙ КАРЦИНОМОЙ ЛЕГКИХ ЛЬЮИС ПРИ ВЛИЯНИИ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

Л. В. Кладницкая¹, А. Й. Мазуркевич¹, Л. В. Гарманчук², С. В. Величко¹, В. В. Никулина^{2, 4},
Т. В. Николаенко², В. В. Ковпак¹, О. И. Дасюкевич³, О. В. Скачкова², А. О. Павлюкова¹
kladlarisa@ukr.net

¹Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, ул. Героев Обороны, 15, Киев, 03041, Украина

²Национальный университет имени Тараса Шевченко, ННЦ «Институт биологии», ул. Владимирская, 64, Киев, 01601, Украина

³Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиологии им. Р. Е. Кавецкого, ул. Васильковская, 45, Киев, 03022, Украина

⁴Национальный институт рака, МОЗ Украины, ул. Ломоносова, 33/43, Киев, 03022, Украина

Цель исследования — изучение биологических свойств клеток первичной опухоли мышей C57BL/6 с трансплантированной карциномой легких Льюис при влиянии аллогенных мезенхимальных клеток. Опыты проводили на самцах мышей C57BL/6 2–3-месячного возраста, массой 20–22 г. Алогенные мезенхимальные стволовые клетки получали культивированием первичного материала, который был выделен из костного мозга мышей C57BL/6. Культивирование клеток проводили с 37 °C, 100% влажности и 5 % CO₂ в среде DMEM с добавлением 20 % фетальной сыворотки телят и 1 % антибиотика-антимикотика. Мышам внутримышечно вводили клеточную суспензию метастатической карциномы легких Льюис (LLC) в концентрации $1 \times 10^6 / 0,1$ мл раствора Хенкса. После инокуляции опухолевых клеток мыши были разделены на контрольную и опытную группы по 8 животных в каждой. Мышам опытной группы на 8-й день после инокуляции опухолевых клеток вводили внутривенно аллогенные МСК 4-го пассажа в количестве $1,25 \times 10^4$. На 20-е сутки от начала опыта определяли уровень анеуплоидии и распределение клеток первичной опухоли по фазам клеточного цикла методом проточной цитофлуориметрии. Установлено, что применение аллогенных МСК приводит к увеличению содержания анеуплоидных клеток в 1,3 раза в первичной опухоли и составляет у мышей опытной группы $76,68 \pm 1,99^{***}$ $p < 0,001$, тогда как у мышей, которым не вводили МСК — $59,20 \pm 0,80$ %. Влияние МСК на увеличение показателя анеуплоидии клеток опухолевой ткани подтверждает дисперсионный анализ — $\eta^2 x = 0,86$ при $p < 0,001$. При влиянии аллогенных МСК изменяется распределение клеток первичной опухоли по фазам клеточного цикла. В частности, при воздействии аллогенных МСК зарегистрировано увеличение количества анеуплоидных клеток пролиферативного пула ($S+G_2/M$) первичной опухолевой ткани к $68,02 \pm 3,42^*$ против этого показателя животных контрольной группы $56,17 \pm 2,90$ % ($p < 0,05$). Уровень апоптоза клеток первичной опухоли при воздействии МСК достоверно снижается и составляет $41,82 \pm 1,37^{***}$ ($p < 0,001$), против $56,59 \pm 0,92$ % животных контрольной группы, что подтверждается дисперсионным анализом — $\eta^2 x = 0,88$ при $p < 0,001$.

Ключевые слова: АЛОГЕННЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ФАЗЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА, АПОПТОЗ, АНЕУПЛОИДИЯ, ПРОТОЧНАЯ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЯ, КАРЦИНОМА ЛЕГКИХ ЛЬЮИС

Багатьма дослідниками вивчаються біологічні властивості мезенхімальних стовбурових клітин та їх вплив на клітини, тканини і цілісний організм за різних патологічних процесів. Не є виключенням і онкологічні захворювання.

Відомо, що пухлинні клітини секретують і виділяють у мікрооточення фактори, подібні до тих, які виділяються при запальних реакціях [1–3], що є пусковим механізмом для міграції МСК в пухлинну тканину і включенням у її строму [4, 5]. Ці дані привели до збільшення інтересу до вивчення впливу МСК на біологічні властивості клітин первинної пухлини. *In vitro* було досліджено, що МСК здійснюють транзитну затримку пухлинних клітин у G(1) фазі клітинного циклу, що супроводжувалося зниженням рівня апоптозу [6].

Однією з характерних особливостей пухлинних клітин є анеуплоїдія, в

результаті чого порушується перебіг мітотичного поділу, що пояснює їх генетичну нестабільність [7]. Деякі автори вважають, що в процесі тривалого культивування в клітинах виникають епігенетичні зміни, що можуть призводити до онкогенної трансформації клітинної популяції [8]. В експериментах на тваринах було виявлено, що застосування ксеногенних МСК, отриманих з жирової тканини людини, у щурів з експериментальною моделлю карциноми Герена призвело до значного збільшення відсотку виживаності, а на 21-шу добу експерименту було відмічено на 40 % інгібування росту пухлини [9]. Дані інших дослідників свідчать про те, що алогенні МСК ефективно інгібують ріст саркоми Капоші в людини [10]. Проте, дані досліджень щодо впливу МСК на розвиток пухлин суперечливі. МСК мають здатність утворювати для стовбурових клітин раку

нішу, в якій пухлинні клітини можуть зберігати потенціал проліферації і підтримки злоякісного процесу [11, 12]. Дослідження на мишах з трансплантованою карциномою легенів Льюїс показує, що МСК підвищують проліферацію пухлинних клітин *in vitro* і сприяють зростанню пухлини *in vivo*, і припускають, що прогресування пухлини в природних умовах може бути частково обумовлено підвищенням ангиогенезу, про що також вказують і інші дослідження [13, 14].

Враховуючи такі спірні дані щодо застосування МСК за пухлинного росту, можна говорити про актуальність всебічного вивчення цього питання. Метою нашої роботи було дослідження впливу алогенних МСК на біологічні властивості клітин первинної пухлини.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на самцях мишей C57BL/6 масою 20–22 г віком 2–3 місяці. Всі дослідження на тваринах були

проведені відповідно до Правил належної лабораторної практики щодо використання експериментальних тварин [15].

Мишам внутрішньом'язово інокулювали клітинну суспензію метастатичної карциноми легень Льюїс (LLC) у концентрації $1 \times 10^6 / 0,1$ мл розчину Хенкса. Після інокуляції пухлинних клітин миші були розділені на контрольну і дослідну групи по 8 тварин у кожній. Мишам дослідної групи на 8-й день після інокуляції пухлинних клітин вводили внутрішньовенно алогенні МСК 4-го пасажу в концентрації $1,25 \times 10^4$ на тварин.

Алогенні МСК отримували культивуванням первинного матеріалу, що був виділений з кісткового мозку мишей C57BL/6 [16]. Культивування клітин проводили за стандартних умов у середовищі DMEM, 20 % фетальної сироватки телят (FBS) та 1 % суміші антибіотиків (Sigma, USA) за 37 °C, 100 % вологості і 5 % CO₂ (рис. 1).

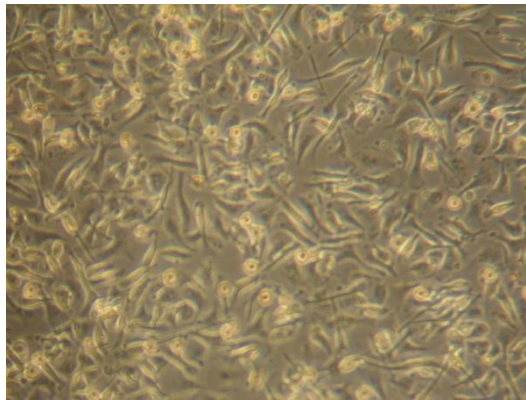


Рис. 1. Мезенхімальні стовбурові клітини миші, x200 збільшення

На 20-ту добу від початку досліду визначали вплив алогенних МСК на біологічні властивості пухлинних клітин. Досліджували розподіл клітин первинної пухлини за фазами клітинного циклу методом проточної цитофлуориметрії [17]. Для цього від евтаназованих тварин обох груп стерильно відбирали тканину первинної пухлини, подрібнювали та 2–3 рази обробляли розчином трипсину з ЕДТА рН 7,0. Отримані ізольовані клітини

первинної культури інкубували 24 години за стандартних умов в середовищі RPMI, 10 % FBS та 1 % суміші антибіотиків (Sigma, USA) при 37 °C, 100 % вологості і 5 % CO₂. Після 24 годин культивування клітини знімали з культурального посуду, відмивали в 5 мл забуференого фізіологічного розчину за 1000 об/хв протягом 10 хв. До осаду клітин у кількості 1×10^6 на пробу додавали 300 мкл Тритон Х-100, який забезпечує руйнування клітинної

мембрани, 200 мкл фосфатно-сольового буферного розчину, 10 мкл рибонуклеази, яка розділяє нитки ДНК, та 15 мкл PI (пропідій іодід), що вибірково зв'язується з ДНК (усі реагенти фірми «Sigma Chemical Co», USA). Після обережного струшування компоненти нуклеарної суспензії інкубували за 22–25 °С впродовж 30 хв у темряві. Для оцінки дольового вмісту клітин в основних фазах мітотичного циклу (G_0/G_1 , S, G_2/M) гістограми розподілу обробляли за допомогою спеціалізованої математичної програми Mod Fit LT 2.0 (BDIS, США) для комп'ютерів Macintosh. Реєстрацію даних виконували на проточному цитометрі FACS Calibur («Becton Dickinson», США) із застосуванням вузькополосного фільтра 585/42 нм для вимірювання флуоресценції PI. З кожного зразка нуклеарної суспензії аналізу підлягало 10000 подій. Визначали показники: кількість диплоїдних і анеуплоїдних клітин у зразках, розподіл клітин кожної популяції за фазами клітинного циклу G_0/G_1 , G_2/M , S.

Для дослідження кількісних результатів дослідження визначали значення середнього (M) і помилку середнього (m). Для порівняння середніх показників досліджуваних груп визначали параметричний t-критерій Стюдента.

Результати й обговорення

При проведенні аналізу показників проточної цитометрії пухлинних клітин мишей з трансплантованою карциномою легень Льюїс встановлено наявність відмінностей щодо характеристик цих пухлин в залежності від дії МСК.

Встановлено, що за умов дії алогенних МСК відбувалися вірогідні зміни у розподілі популяції клітин первинної пухлинної тканини на диплоїдні та анеуплоїдні, а також за фазами клітинного циклу (табл.).

Згідно з представленими результатами, у тварин дослідної групи відсоток анеуплоїдних клітин в популяції вірогідно збільшувався, та у 1,3 рази перевищував такий у тварин контрольної групи. Така зміна рівня анеуплоїдії є показником нестабільності геному клітин первинної пухлини за впливу МСК. Дисперсійний аналіз щодо визначення сили впливу застосування МСК на рівень анеуплоїдії підтверджує ці результати. За нашими розрахунками сила впливу МСК на рівень анеуплоїдії клітин первинної пухлини становить $\eta^2_x = 86\%$ при $p < 0,001$.

Таблиця

Рівень анеуплоїдії та розподіл клітин тканини первинної пухлини за фазами клітинного циклу, % ($M \pm m$)

Первинна культура		Вміст клітин, %	G_0/G_1	G_2/M	S	$G_2/M \pm S$
LLC (контроль на	Диплоїдні клітини	40,80 \pm 0,80	76,65 \pm 3,45	16,13 \pm 1,28	7,22 \pm 2,23	23,35 \pm 3,45
	Анеуплоїдні клітини	59,20 \pm 0,80	43,82 \pm 2,89	10,58 \pm 0,05	45,59 \pm 2,90	56,17 \pm 2,90
LLC (дослідна, за впливу МСК)	Диплоїдні клітини	23,32 \pm 1,99***	93,18 \pm 2,01**	6,70 \pm 1,95**	0,12 \pm 0,09**	6,86 \pm 2,02***
	Анеуплоїдні клітини	76,68 \pm 1,99***	31,98 \pm 3,42*	13,42 \pm 0,37***	54,59 \pm 3,31	68,02 \pm 3,42*

Примітка: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ відносно показників тварин контрольної групи

При розподілі анеуплоїдних клітин за фазами клітинного циклу, встановлена достовірна різниця у кількості клітин проліферативного пулу $G_2/M \pm S$ між

тваринами двох груп. За впливу МСК кількість клітин проліферативного пулу $G_2/M \pm S$ становить 68,02 \pm 3,42* ($p < 0,05$)

проти $56,17 \pm 2,90$ % тварин контрольної групи.

Отже, описаний ефект засвідчує підвищення активності поділу анеуплоїдних клітин первинної пухлини у тварин дослідної групи за впливу алогенних МСК. На нашу думку, це можна пояснити наступним. Відомо, що строма пухлини складається з позаклітинного матриксу і різних типів мезенхімальних клітин, включаючи макрофаги, ендотеліальні клітини, лімфоцити, перицити, фібробласти і міофібробласти. Ці клітини строми взаємодіють з пухлинними клітинами і при безпосередньому контакті і через паракринні сигнальні механізми, що опосередковані секрецією розчинних факторів, у тому числі цитокінів, хемокінів і факторів росту. Взаємодія між пухлинними і стромальними клітинами регулює ріст пухлини, метастази, ангиогенез [18]. МСК також мігрують в пухлинну тканину, де вони включаються до пухлинної строми [4] і через вищевказані механізми стимулюють проліферацію

клітин пухлини, що підтверджується нашими даними (табл.).

Що стосується диплоїдних клітин, то тут бачимо зворотну картину. За впливу МСК чисельність популяції диплоїдних клітин у стадії проліферації набагато менша, ніж у дормантному стані.

Водночас встановлено зміну рівня апоптозу клітин первинної пухлини за впливу МСК (рис. 2).

Треба зазначити, що рівень апоптозу клітин первинної пухлини в 1,4 рази знизився у тварин за впливу МСК і становив $41,82 \pm 1,37^{***}$ ($p < 0,001$) та $56,59 \pm 0,92$ % у тварин контрольної групи. При дослідженні сили впливу анеуплоїдії на рівень апоптозу визначили, що $\eta^2_x = 95$ % при $p < 0,001$.

Отримані дані вказують на те, що клітини первинної пухлини за дії алогенних МСК характеризуються підвищеною проліферативною активністю з одночасним зниженням рівня апоптозу. Також у тварин за впливу МСК реєструються більш високий рівень анеуплоїдії клітин первинної пухлини, що є ознакою їх прогресії.

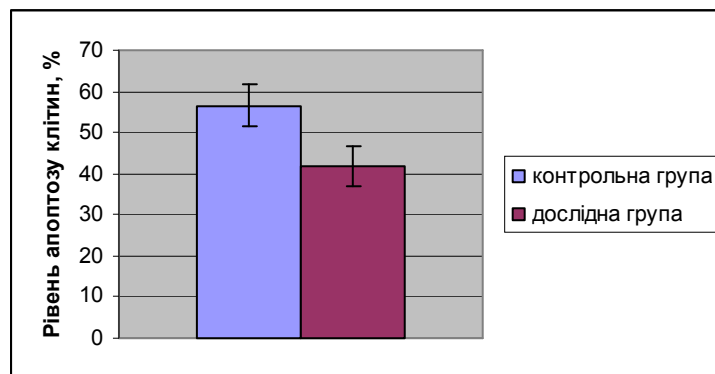


Рис. 2. Рівень апоптозу клітин первинної пухлини за впливу алогенних МСК, %

Висновки

1. У результаті проведених досліджень встановлено, що застосування алогенних МСК змінює біологічні властивості клітин первинної пухлини мишей C57BL/6 з перещепленою метастатичною карциномою легенів Льюїс.

2. Застосування алогенних МСК призводить до вірогідного збільшення

показника рівня анеуплоїдії клітин пухлинної тканини і становить у мишей дослідної групи $76,68 \pm 1,99^{***}$ проти контрольної — $59,20 \pm 0,80$ % ($p < 0,001$) із силою впливу $\eta^2_x = 0,86$, при $p < 0,001$.

3. Встановлено, що вплив алогенних МСК призводить до вірогідного збільшення кількості клітин проліферативного пулу ($G2/M \pm S$)

первинної пухлини в популяції анеуплоїдних клітин і становить $68,02 \pm 3,42^*$ ($p < 0,05$) проти $56,17 \pm 2,90$ % контрольної групи.

4. За впливу алогенних МСК вірогідно знижується рівень апоптозу клітин первинної пухлинної тканини мишей C57BL/6 з перещепленою метастатичною карциномою легенів Льюїс і становить $41,82 \pm 1,37^{***}$ ($p < 0,001$) проти показника тварин контрольної групи $56,59 \pm 0,92$ % із силою впливу $\eta^2_x = 0,95$ при $p < 0,001$.

Перспективи подальших досліджень. Подальші експериментальні дослідження будуть спрямовані на визначення впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на процеси метастазування первинної пухлини.

1. Sun Z, Wang S, Zhao R. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *J.Hematol Oncol*, 2014, Feb 6;7(1):14. doi: 10.1186/1756-8722-7-14

2. Klopp A H, Spaeth E L., Dembinski J L, Woodward A., Munshi A, Meyn R E. Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2007;67:11687–95.

3. Coffelt S. B. The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009;106:3806–11.

4. Studeny M. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agent. *J Natl Cancer Inst.*, 2004; 96:1593–603.

5. Kidd S. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells*. 2009; 27:2614–23.

6. Ramasamy R., Lam E. W., Soeiro I., Tisato V., Bonnet D., Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia*, 2007; 21(2):304-10.

7. Rasnick D., H. Duesberg P. How aneuploidy affects metabolic control and causes cancer. *Biochem. J.*, 1999, vol. 340, pp. 621–630.

8. Gordeeva O. F., Mitalip Sh. M. Pluripotent stem cells: maintenance of genetic and epigenetic stability and prospects of cell

technologies. *Ontogeny*, November–December 2008, Vol. 39, № 6, pp 405–419 (in Russian).

9. Cherkashyna D. V., Lebedinskii A. S., Buchanan J. A., Shtemenko N. I., Petrenko A. U. Guerin carcinoma growth inhibition in rats after administration of mesenchymal stromal cells of human adipose tissue and bio-regulators of stem and progenitor cells. *J. A.Med.Sc.*, 2010; 16 (3), 492–506.

10. Khakoo A. Y. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med.*, 2006;203:1235–47.

11. Zhang T., Lee Y. W., Rui Y. F., Cheng T. Y., Hua Jiang X., Li G. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of breast and prostate tumors. *Stem Cell Research & Therapy*, 2013, 4:70, doi:10.1186/scrt221.

12. Mandel K., Yang Y., Schambach A., Glage S., Otte A., Hass R. Mesenchymal stem cells directly interact with breast cancer cells and promote tumor cell growth in vitro and in vivo. *Stem Cells Dev*, 2013 Dec 1;22(23):3114-27. doi: 10.1089/scd.2013.0249.

13. Suzuki K., Sun R., Origuchi M., Kanehira M., Takahata T., Itoh J., Umezawa A., Kijima H., Fukuda S., Saijo Y. Mesenchymal Stromal Cells Promote Tumor Growth through the Enhancement of Neovascularization. *Mol Med.*, 2011 Jul-Aug; 17 (7–8): 579–587. doi: 10.2119/molmed.2010.00157

14. Huang W. H., Chang M. C., Tsai K. S., Hung M. C., Chen H. L., Hung S. C. Mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of tumors in mice. *Oncogen*, 2013 Sep 12;32(37):4343-54. doi: 10.1038/onc.2012.458. Epub 2012 Oct 22.

15. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, D. C., National Academy of Press, 1996. 140 p.

16. Mazurkevich A. Y., Kladnytska L. V., Kovpak V. V. Features conditions selection and cultivation mouse bone marrow adhesive fraction mononuclear cells. *Herald of Taras Shevchenko National University of Kyiv*, 2013, Vol. 64 Issue 2, pp. 41–43.

17. Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M. C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 1991;139(2):271-280.

18. Grugan K. D. Fibroblast-secreted hepatocyte growth factor plays a functional role in esophageal squamous cell carcinoma invasion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010;107:11026–30.