DOI: 10.21870/0131-3878-2017-26-3-100-115

Радиосенсибилизирующее действие мезенхимальных стволовых клеток человека при локальном воздействии γ -излучения на саркому М-1 крыс

Севаньяева Л.Е., Южаков В.В., Коноплянников А.Г., Романко Ю.С., Бандурко Л.Н.,
Фомина Н.К., Ингель И.Э., Коноплянников М.А.¹, Яковлева Н.Д., Цыганова М.Г.

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск;

¹ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, Москва

В доступной литературе практически отсутствуют сведения о влиянии мезенхимальных стволовых клеток (МСК) на злокачественные новообразования в условиях радиотерапии. Целью настоящей работы являлось изучение действия системной трансплантации МСК человека и последующего однократного облучения саркомы М-1 крыс γ -квантами ^{60}Co в дозе 30 Гр на выживаемость животных, рост и морфологию опухолей. Методы исследования реакции опухолей на введение МСК и облучение включали иммуноокрашивание на PCNA, CD31 и пимонидазол, а также компьютерный анализ микроскопических изображений. Полученные результаты показали, что после введения МСК в зонах роста саркомы М-1 активировался ангиогенез, в паренхиме новообразований повышалось содержание пролиферирующих опухолевых клеток, а доля гипоксических клеток снижалась более чем в 2 раза. Согласно количественным показателям на фоне введения МСК был зарегистрирован более выраженный эффект лучевой инактивации опухолевых клеток. При этом в пострadiационном периоде коэффициент роста облученных опухолей снизился в 1,8 раза, а кумулятивная выживаемость опухоленосителей увеличилась на 31% относительно группы особей, опухоли которых подвергались воздействию только γ -излучения. Проведённые исследования позволили впервые зарегистрировать радиосенсибилизирующее действие превентивного введения МСК при экспериментальной лучевой терапии перевиваемой соединительнотканной опухоли. Есть основание полагать, что усиление радиочувствительности саркомы М-1 обусловлено уменьшением фракции наиболее резистентных гипоксических клеток в области радиационного воздействия на опухоли.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, γ -излучение, саркома М-1, гипоксия, радиосенсибилизация, ангиогенез, иммуногистохимия, PCNA, CD31, пимонидазол.

Введение

Лучевая терапия является важным компонентом лечения для 50% всех онкологических больных с эффективностью радикального воздействия на злокачественные новообразования около 40% [1, 2]. По сравнению с другими методами радиотерапия имеет преимущества, включая пространственно-временную гибкость в таргетировании опухолей, неинвазивность и возможность сохранения органов. Однако, несмотря на недавние достижения в области лучевой терапии, у многих пациентов возникают рецидивы опухолевого роста, в основном за счёт невозможности контролировать первичную опухоль.

Предполагается, что одним из лимитирующих факторов для полной эрадикации опухолей с помощью конвенциональной лучевой терапии является наличие в солидных новообразованиях радиорезистентных гипоксических клеток [3-5]. Кроме того, опухолевое микроокружение и гипоксия способствуют злокачественной прогрессии и метастазированию неоплазий путём селекции и клональной эволюции более агрессивных фенотипов клеток с активацией экспрессии ге-

Севаньяева Л.Е. – ст. научн. сотр.; Южаков В.В.* – зав. лаб., к.м.н.; Коноплянников А.Г. – зав. отд., д.б.н., проф.; Романко Ю.С. – зав. отд., д.м.н., проф.; Бандурко Л.Н. – вед. научн. сотр., к.м.н.; Фомина Н.К. – ст. научн. сотр., к.б.н.; Ингель И.Э. – ст. научн. сотр., к.б.н.; Яковлева Н.Д. – вед. научн. сотр., к.б.н.; Цыганова М.Г. – научн. сотр. МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. Коноплянников М.А. – зав. лаб., к.б.н., ФНКЦ ФМБА России.

*Контакты: 249036, Калужская обл., Обнинск, ул. Королева, 4. Тел.: +7 (903) 635 79 71; e-mail: yuzh_vad@mail.ru.

нов, вовлечённых в метастатические процессы, а также приобретённой резистентности опухолей к различным методам лечения [6-8].

Согласно результатам радиобиологических исследований гипоксические стимулы вызывают изменения как в путях репарации повреждений ДНК, так и в сигнальных путях гибели/выживания клеток, что приводит к увеличению доли клеток, обладающих радиорезистентным фенотипом [9]. Для преодоления гипоксической радиорезистентности опухолевых клеток и повышения эффективности радиотерапии опухолей в клинической практике разрабатывают подходы, включающие увеличение доставки кислорода к местнораспространённым солидным опухолям, изменение режимов фракционированного облучения и гипертермию, использование плотноионизирующих излучений и биоредуктивных соединений, действующих как гипоксические цитотоксины [3-5, 10]. В последние годы особое внимание уделяют биологическим модификаторам, поскольку некоторые из них могут нормализовать сосудистую сеть опухоли, что приводит к увеличению кровотока и оксигенации, тем самым потенциально увеличивая радиочувствительность опухолевых клеток [11].

Учитывая, что для уничтожения гипоксических опухолевых клеток в количестве, эквивалентном уровню гибели нормоксических клеток, необходима в 2-3 раза более высокая доза ионизирующего излучения, наиболее очевидным подходом к решению проблемы гипоксии считают увеличение доставки кислорода к опухоли [3-5]. Есть основания полагать, что разные пути повышения оксигенации солидных опухолей до облучения могут повысить их чувствительность к радиационному воздействию. В этой связи обращают на себя внимание эффекты мезенхимальных стволовых клеток (МСК) на перевиваемые опухоли, связанные с усилением неоангиогенеза и повышением доли пролиферирующих неопластических клеток [12, 13]. Однако сведения о влиянии МСК на злокачественные новообразования в условиях радиотерапии немногочисленны [14].

Целью данного исследования являлось изучение влияния системной трансплантации МСК человека и последующего однократного облучения саркомы М-1 крыс γ -квантами ^{60}Co на выживаемость животных, рост и морфологию опухолей.

Материалы и методы

Работа выполнена на самцах белых беспородных крыс с имплантированными под кожу голени кусочками ткани саркомы М-1 [15]. Животные с развившимися опухолями методом рандомизации были распределены на 3 группы – контрольную ($n=40$) и 2 опытные по 45 особей в каждой. В опытные группы вошли животные, опухоли которых в последующем подвергали локальному воздействию γ -излучения на установке «Луч» в дозе 30 Гр при мощности дозы 410 сГр/мин. Облучение начинали на 16 сут после имплантации саркомы при достижении опухолевыми узлами объёмов 0,6-1,8 см³. Крысам 2-й опытной группы за 4 сут до облучения однократно в хвостовую вену вводили размноженные в культуре МСК костного мозга человека [16] третьего пассажа из расчёта 10⁶ клеток на 100 г массы тела. По результатам проточной цитофлуориметрии МСК имели фенотип CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺ и CD34⁻.

Критерием эффективности экспериментальных воздействий являлось изменение коэффициента роста опухолей (КРО):

$$КРО = (V_{it} - V_0)/V_0,$$

где V_{ti} – объём опухоли (см^3) на i сутки от прививки саркомы М-1, а V_0 – объём опухоли в день облучения.

На 3 и 12 сут после облучения (19 и 28 сут роста опухолей соответственно) по 7-10 крыс из каждой группы были выведены из эксперимента для изучения морфологии саркомы М-1. Остальных животных наблюдали на протяжении 4 мес., изучая их выживаемость.

Опухолевые узлы выделяли под тиопенталовым наркозом. Ткань опухоли фиксировали 24 ч в кислой жидкости Буэна, обезживали и заливали в «Гистомикс». Общую гистологию саркомы М-1 изучали на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Иммуногистохимические (ИГХ) исследования на серийных срезах проводили методом биотин-экстравидин-пероксидазного комплекса с использованием мышиных антител к ядерному антигену пролиферирующих клеток – PCNA (клон PC10, «Thermo Fisher scientific», 1:200), конъюгированных с биотином, и кроличьих антител к маркеру эндотелия – CD31 (M-20-R, «Santa Cruz», 1:20) согласно ранее описанным нами методам [17].

Для визуализации гипоксических клеток в опухолевой ткани использовали коммерческий набор Нурохупробе™-1 Omni Kit («Нурохупробе, Inc.; Burlington, США»), включающий гидрохлорид пимонидазола и кроличьи антитела PAb2627AP к белковым аддуктам пимонидазола. На 16 сут роста саркомы 5 крысам из каждой опытной группы за 30 мин до выделения опухолевых узлов вводили пимонидазол внутривенно из расчёта 60 мг/кг массы тела.

Иммуноокрашивание пимонидазола выполнено с помощью биотинилированных козьих антител к кроличьим IgG («Sigma», 1:800) и экстравидин-пероксидазного комплекса («Sigma», 1:250). До нанесения антител к пимонидазолу депарафинированные срезы, погружённые в таргетный восстанавливающий раствор (DAKO, S1699), прогревали в микроволновой печи (15 мин, 180 Вт). В растворе первых антител препараты инкубировали в течение 90 мин при комнатной температуре. На всех этапах ИГХ в промывочный буфер добавляли 0,2% Brij 35.

Субстратную пероксидазу выявляли с использованием диаминобензидина (Liquid DAB+, «DAKO») или аминотилкарбазола (AEC+, «DAKO»). При необходимости ядра клеток докрашивали гематоксилином. Препараты с аминотилкарбазолом заключали в водорастворимую среду (Faramount, «DAKO»).

Количественную плотность опухолевых клеток по числу сечений их ядер на 1 мм^2 площади среза (N_{OK} , клеточность), индекс PCNA (I_{PCNA}), митотический индекс (I_{MIT}) и индекс апоптоза ($I_{\text{АП}}$) в зонах роста опухолевых узлов определяли по стандартной методике при иммерсионном увеличении микроскопа при подсчёте не менее 3000 ядер клеток [15]. Интегральные показатели, включающие объёмную долю паренхимы с реакцией ядер опухолевых клеток на PCNA (ρ_{PCNA} , отн. ед.), фракцию гипоксических клеток в паренхиме ($\Phi_{\text{ГК}}$, %) и зон некроза (%), рассчитывали с помощью системы компьютерного анализа микроскопических изображений с применением программы AnalySIS 5.0 («Soft Imaging System GmbH», Германия). Фракцию пролиферирующих клеток в опухолевых узлах рассчитывали по формуле $\Phi_{\text{PCNA}} = \rho_{\text{PCNA}} \times I_{\text{PCNA}} \times K_N$, где $K_N = N_{\text{OK}}$ в опыте/ N_{OK} в контроле.

Для оценки уровня значимости межгрупповых различий полученных показателей использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Расчёт выживаемости животных выполнен по методу Каплана-Мейера. Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Как видно из рис. 1, в контрольной группе рост саркомы М-1 носил экспоненциальный характер. Темп роста опухолевых узлов у животных 1-й опытной группы начинал снижаться уже в ранние сроки после облучения. У особей 2-й опытной группы на фоне введения МСК отмечалось кратковременное ускорение роста новообразований. После облучения первоначальное торможение роста саркомы М-1 выглядело аналогичным. Однако в последующий период кривая роста саркомы располагалась ниже линии роста опухолей, подвергнутых воздействию только ионизирующего излучения.

Рис. 1. Рост саркомы М-1 в контроле (1), после воздействия γ -излучения в дозе 30 Гр (2) и на фоне введения мезенхимальных стволовых клеток человека за 4 сут до облучения (3).

По данным сравнительного анализа (рис. 2), в интервале от 16 до 28 сут после перевивки саркомы М-1 КРО в контроле составил $3,83 \pm 0,46$, после воздействия γ -излучения статистически значимо снизился до $1,99 \pm 0,28$, а при комбинированном применении МСК и ионизирующего излучения – до $1,08 \pm 0,17$ ($p < 0,05$ относительно 1-й опытной группы).

Рис. 2. Коэффициенты роста саркомы М-1 ($M \pm m$) в контроле, после воздействия γ -излучения в дозе 30 Гр и при комбинированном применении МСК человека и облучения в интервале от 16 до 28 сут после перевивки.

* $p < 0,05$ относительно контроля; ** $p < 0,05$ относительно действия только γ -излучения.

Через 3 мес. после имплантации опухолей в контрольной группе погибли 96% крыс, в 1-й опытной группе выжило 25% особей, в то время как при введении МСК до облучения выживаемость животных увеличилась до 56% (рис. 3). В период наблюдения до 4 мес. медиана выживаемости крыс, получавших МСК, статистически значимо выросла на 23%.

Рис. 3. Выживаемость крыс-опухоленосителей в контроле (1), после воздействия γ -излучения в дозе 30 Гр (2) и на фоне введения мезенхимальных стволовых клеток человека за 4 сут до облучения (3).

В экспоненциальной фазе роста саркома М-1 имела солидный тип строения. Паренхима отчётливо контурировалась за счёт положительной реакции ядер опухолевых клеток на PCNA (рис. 4а).

Пролиферирующие клетки располагались в основном по периферии опухолей, концентрируясь вокруг сосудов. В центральных и периферических отделах опухолевых узлов были видны многочисленные оксифильные участки спонтанного некроза, представленные клеточным детритом.

ИГХ-окрашивание на пимонидазол носило зональный характер (рис. 4б). Судя по интенсивности положительной реакции, опухолевые клетки в состоянии глубокой гипоксии располагались на границе с некрозом в виде узких ободков шириной 40-50 мкм. Реакция на маркер гипоксии не определялась в зонах некроза и практически отсутствовала в участках высокой пролиферативной активности опухолевых клеток. Необходимо отметить, что согласно имеющимся данным, пимонидазол селективно связывается с внутриклеточными макромолекулами в зонах гипоксии при pO_2 менее 10 мм рт. ст. При этом количество образованных белковых аддуктов пропорционально уровню гипоксии [18].

Характерной чертой ангиоархитектоники саркомы М-1 являлась выраженная гетерогенность распределения в паренхиме кровеносных сосудов. Так, относительно васкуляризованы периферические зоны опухолей, прилегающие к подкожной клетчатке. В перитуморальной зоне от венул в здоровой ткани ответвлялись капиллярные петли, врастающие в паренхиму опухолей (рис. 4в). Однако в отдельных участках солидных зон микрососуды практически не просматривались.

Рис. 4. Морфофункциональные характеристики саркомы М-1 в экспоненциальной фазе роста в контроле (а-в) и через 4 сут после введения мезенхимальных стволовых клеток человека (г-е). а, г – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA; б, д – иммуноокрашивание на пимонидазол; в, е – иммуногистохимическая реакция эндотелия сосудов с антителами к CD31. Ядра клеток докрашены гематоксилином. Звездочками отмечены зоны спонтанного некроза. а, б, г, д $\times 20$, в, е $\times 125$.

Согласно результатам морфометрии (табл. 1), на 16 сут после перевивки в опухолях крыс до облучения Φ_{PCNA} , $\Phi_{ГК}$ и объёмное содержание зон некроза составили $54,4 \pm 9,0\%$, $35,5 \pm 5,5\%$ и $21,2 \pm 4,6\%$ соответственно. В периферической зоне, определяющей рост опухолей, I_{MIT} опухолевых клеток был равен $1,83 \pm 0,10\%$, а $I_{АП}$ – $0,26 \pm 0,03\%$.

Таблица 1

**Количественные характеристики исследованных показателей саркомы М-1
в экспоненциальной фазе роста в контроле и через 4 сут после введения
мезенхимальных стволовых клеток человека (M±m)**

Показатель	Контроль (n=5)	Группа с МСК (n=5)
Объём опухолей, см ³	1,21±0,09	1,32±0,10
Объёмная доля паренхимы при иммуноокрашивании на PCNA, отн. ед.	0,66±0,11	0,81±0,05
Клеточность в зоне роста опухолей на 1 мм ² площади среза	4954±141	4674±82
Индекс PCNA, %	83,3±2,1	85,8±1,9
Фракция PCNA положительных опухолевых клеток, %	54,4±9,0	65,7±5,1
Митотический индекс, %	1,83±0,10	2,19±0,21
Индекс апоптоза, %	0,26±0,03	0,17±0,02*
Объёмное содержание зон некроза, %	21,2±4,6	11,2±2,0*
Фракция гипоксических клеток в паренхиме при иммуноокрашивании на пимонидазол, %	35,5±5,5	16,3±3,6*

* p<0,05 относительно контроля.

На 4 сут после введения МСК зоны солидного строения опухолей занимали значительную часть опухолевых узлов. При микроскопическом исследовании обращали на себя внимание локальные участки разрастания соединительной ткани по периферии опухолевых узлов с отчётливым врастанием капилляров в паренхиму опухолей. При окрашивании срезов на PCNA в перитуморальной зоне отмечалась интенсивная пролиферация фибробластов и эндотелия сосудов, что характерно для усиления ангиогенеза и стромообразования, а в краевой зоне опухолевых узлов выявлялись очаги повышения пролиферативной активности опухолевых клеток (рис. 4г). Визуально снижалось содержание зон некроза и пимонидазол-положительных гипоксических клеток (рис. 4д), а в краевой зоне опухолевых узлов при окрашивании на CD31 регистрировалось усиление ангиогенеза (рис. 4е).

По данным морфометрии (табл. 1), на фоне введения МСК отмечалась тенденция к увеличению объёма опухолевых узлов и паренхимы с репопулирующими опухолевыми клетками, в то время как объёмное содержание зон некроза и гипоксических клеток снизилось почти в 2 раза. Полученные нами данные об активации роста опухолей в этот период за счёт неоваскуляризации паренхимы и повышения пролиферативной активности клеток саркомы соответствуют результатам Suzuki et al. [12], согласно которым сингенные МСК усиливали пролиферацию клеток B16-LacZ и карциномы лёгких Льюис *in vitro* и стимулировали рост опухолей *in vivo*. Авторы также считают, что опосредованная МСК промоция роста опухолей была обусловлена усилением неоангиогенеза.

Через 3 сут после радиационного воздействия в паренхиме опухолей наблюдали однотипные изменения. Отмечалось повреждение эндотелия и сдувание его в просвет сосудов. Появлялись «лучевые гиганты» и клетки с микроядрами, усиливался интерстициальный и внутриклеточный отёк. У особой 1-й опытной группы клеточность в зоне роста опухолевых узлов уменьшилась на 40%, а Φ_{PCNA} снизилась почти в 2,5 раза (табл. 2). Визуализировались многочисленные патологические митозы в виде «мостов», рассеивания хромосом, многополюсных и асимметричных митотических фигур. Известно, что такие формы патологических митозов являются летальными для клетки и приводят её к гибели. В паренхиме опухолей определялись многочисленные клетки, гибнущие путём апоптоза. В периферической зоне опухолей индекс апоптоза составил 2,1±0,5%, что в 7,8 раза выше, чем в контроле.

При введении МСК до облучения наблюдаемые изменения носили более выраженный характер. Так, клеточность и фракция PCNA положительных опухолевых клеток в зонах роста саркомы достоверно снизились относительно действия только γ -излучения в 1,8 и 2,2 раза соответственно, а объёмное содержание зон некроза увеличилось статистически значимо относительно контроля до $67,0 \pm 5,2\%$.

Таблица 2

Количественные характеристики исследованных показателей саркомы М-1 в контроле, через 3 сут после воздействия γ -излучения в дозе 30 Гр и на фоне введения мезенхимальных стволовых клеток человека за 4 сут до облучения ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	Действие γ -излучения	Действие МСК человека и γ -излучения
Объём опухолей, см ³	1,98 $\pm$ 0,15	1,57 $\pm$ 0,19	1,67 $\pm$ 0,18
Объёмная доля паренхимы при иммуноокрашивании на PCNA	0,51 $\pm$ 0,06	0,42 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,08
Клеточность в зоне роста опухолей на 1 мм ² площади среза	5093 $\pm$ 140	3080 $\pm$ 112*	1740 $\pm$ 1156**
Индекс PCNA, %	84,9 $\pm$ 1,1	86,2 $\pm$ 3,1	85,4 $\pm$ 1,3
Фракция PCNA положительных опухолевых клеток, %	43,3 $\pm$ 3,1	18,1 $\pm$ 4,1*	8,4 $\pm$ 2,3**
Митотический индекс, %	2,01 $\pm$ 0,15	3,00 $\pm$ 0,48*	5,8 $\pm$ 0,7*
Индекс апоптоза, %	0,27 $\pm$ 0,02	2,1 $\pm$ 0,5*	1,6 $\pm$ 0,3*
Объёмное содержание зон некроза, %	43,4 $\pm$ 5,2	54,6 $\pm$ 8,4	67,0 $\pm$ 5,2*

* большинство митозов представлено патологическими формами, * $p < 0,05$ относительно контроля, ** $p < 0,05$ относительно действия γ -излучения.

На 12 сут после облучения, несмотря на повреждение и гибель значительной части паренхимы, у особей 1-й опытной группы отмечалось возобновление роста саркомы, в основном, за счёт клеток её периферических отделов (рис. 5а). Отчётливо выражен лучевой патоморфоз саркомы М-1. Большинство ядер опухолевых клеток увеличены в размерах, ядрышки гипертрофированы. В паренхиме рассеяны погибающие клетки как на ранних стадиях апоптоза, так и на поздних, характеризующихся разделением клеток на «гроздь» в виде апоптотических телец с утилизацией последних макрофагами. В отдельных участках опухолевых узлов наблюдалось разрастание соединительной ткани. По данным морфометрии (табл. 3), N_{OK} была на 20% ниже, а ρ_{PCNA} снизилась относительно контроля более чем в 2 раза. В то же время сохранялась высокая интенсивность иммуноокрашивания ядер на PCNA (рис. 5б).

При гистологическом изучении опухолей крыс, подвергнутых воздействию γ -излучения с превентивным введением МСК, обращали на себя внимание обширные поля разрастания соединительной ткани с проникновением её тяжей в паренхиму опухоли (рис. 5в) и инфильтрацией стромы круглоклеточными элементами. Среди клеток, инфильтрирующих строму, повышалось содержание макрофагов, что, по-видимому, приводило к интенсивной элиминации погибших опухолевых клеток. На фоне более интенсивного разрастания соединительной ткани снижалось содержание зон некроза. При иммуноокрашивании серийных срезов на PCNA в участках сохранившейся паренхимы наблюдалось снижение пролиферативной активности опухолевых клеток (рис. 5в).

При введении МСК человека до радиационного воздействия клеточность паренхимы, ρ_{PCNA} , Φ_{PCNA} и некроз статистически значимо снизились относительно 1-й опытной группы, в то время как разрастание соединительной ткани в опухолевых узлах увеличилось почти на 50%. Митотическая активность опухолевых клеток практически не изменилась, однако их гибель путём апоптоза достоверно выросла до $0,48 \pm 0,03$ (табл. 3).

Рис. 5. Гистологический рисунок опухолевых узлов и пролиферативная активность клеток саркомы М-1 на серийных срезах через 12 сут после воздействия γ -излучения в дозе 30 Гр (а, б) и на фоне введения мезенхимальных стволовых клеток человека за 4 сут до облучения (в, г). по – паренхима опухоли, ст – соединительная ткань. а, в – окрашивание гематоксилином и эозином; б, г – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA.

Таблица 3

Количественные характеристики исследованных показателей саркомы М-1 в контроле, через 12 сут после воздействия γ -излучения в дозе 30 Гр и на фоне введения мезенхимальных стволовых клеток человека за 4 сут до облучения ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	Действие γ -излучения	Действие МСК человека и γ -излучения
Объём опухолей, см ³	5,58±0,55	3,16±0,25*	2,78±0,29*
Объёмная доля паренхимы при иммуноокрашивании на PCNA, отн. ед.	0,45±0,06	0,21±0,03*	0,11±0,02**
Клеточность в зоне роста опухолей на 1 мм ² площади среза	4200±140	3450±120*	2394±106**
Индекс PCNA, %	79,1±2,4	84,2±3,1	85,4±1,3
Фракция PCNA положительных опухолевых клеток, %	35,6±3,1	14,5±2,1*	5,4±1,9**
Митотический индекс, %	2,01±0,15	1,91±0,04	2,3±0,1
Индекс апоптоза, %	0,27±0,02	0,31±0,01*	0,48±0,03**
Объёмное содержание соединительной ткани, %	17,8±5,2	46,9±5,2*	79,3±5,2**
Объёмное содержание зон некроза, %	37,2±4,2	32,1±8,4	9,7±2,2**

* $p < 0,05$ относительно контроля, ** $p < 0,05$ относительно действия γ -излучения.

Нет сомнений в том, что природная радиочувствительность опухолевых клеток является одним из основных факторов, определяющих ответ опухоли на облучение. Например, исследования, проведённые Ogawa K. et al. [19], продемонстрировали, что присутствие в опухолевых клетках гена, кодирующего каталитическую субъединицу ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PKcs), участвующую в репарации двунитевых разрывов ДНК, делает опухоли более радиорезистентными, чем в отсутствие этого гена.

Тем не менее, появляется всё больше оснований полагать, что микроокружение и стромальные компоненты также могут способствовать ответу опухолей на радиотерапию [20]. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что биологические моди-

факторы, способные нормализовать сосудистую сеть, улучшить перфузию и степень оксигенации солидных опухолей, потенциально увеличивают радиочувствительность неопластических клеток [11]. Задача по-прежнему состоит в том, чтобы получить данные, показывающие, что модуляция факторов микроокружения опухолей является важным механизмом, с помощью которого биологические агенты могут повышать чувствительность неоплазий к облучению, а затем использовать эту информацию для оптимизации схем лучевой терапии.

В последние годы особое внимание придаётся способности МСК мигрировать в опухолевые ткани, изучению их действия на клеточное микроокружение и рост опухолей, а также возможному применению в терапии злокачественных заболеваний [13]. Тем не менее, механизмы действия МСК на опухолевый рост изучены явно недостаточно. Во-первых, полученные результаты зачастую противоречивы; во-вторых, эффекты МСК *in vivo* и *in vitro* бывают противоположными, что затрудняет интерпретацию данных в целом [21].

По данным литературы, тропность МСК к опухолям может быть опосредована многими растворимыми факторами, включая фактор-1 стромальных клеток, фактор альфа некроза опухолей, интерлейкины и пока не идентифицированные медиаторы воспаления [22]. Полагают, что опухолевый хоуминг МСК представляет собой сложный, многоступенчатый процесс, который вовлекает передачу множества разнообразных вне- и внутриклеточных сигналов, в том числе цитокинов и хемокинов воспаления. Стимулирующие эффекты МСК на развитие опухолей объясняются, по крайней мере, отчасти, их иммуносупрессорными и проангиогенными свойствами [21], а также их возможной дифференцировкой/трансформацией в опухолеассоциированные фибробласты, которые играют важную роль в росте солидных новообразований [23]. Конечно, особый интерес представляют механизмы действия клеточной терапии на неоплазии. Есть данные, что в опухолевом микроокружении МСК проявляют свойства, которые способствуют росту опухоли. Эти особенности включают формирование матрикса, продуцирование факторов роста, стимуляцию формирования сосудов опухолевого ложа и поддержку ниш стволовых клеток опухоли [21, 23, 24]. Именно по этой причине полагают, что клиническое использование МСК в условиях развития онкологического заболевания должно проводиться с чрезвычайными предосторожностями [13].

В других работах показано ингибирующее действие МСК на опухолевый рост. Например, торможение роста опухолей после трансплантации МСК человека было показано на экспериментальной модели саркомы Капоши [25]. В литературе есть сведения об ингибирующем действии МСК на рост опухолевых клеток гепатомы H22, лимфомы (YAC-1 и EL-4) и инсулиномы INS-1 мышей *in vitro* и *in vivo* без иммуносупрессии организма хозяина, путём индукции апоптотической гибели клеток и задержки клеточного цикла опухолевых клеток в фазе G₀/G₁ [26]. На экспериментальной модели карциномы молочной железы обнаружен выраженный противоопухолевый эффект МСК по критерию регрессии новообразований и снижению их метастазирования и/или рецидивирования, вплоть до полного исчезновения этих процессов [27].

Анализ данных литературы о влиянии МСК на процессы злокачественного роста свидетельствует, что до настоящего времени эта проблема остается спорной и не вполне понятной. Одно из противоречий заключается в их способности оказывать противоположные эффекты на пролиферативную активность опухолевых клеток. По-видимому, сложные взаимоотношения между МСК, микроокружением опухолей и неопластическими клетками являются определяющими для конечного результата развития онкологического процесса.

Ранее нами было показано, что однократное внутривенное введение аллогенных МСК опухоленосителям оказывало онкомодулирующее действие на перевиваемую соединительнотканную опухоль [13]. При этом морфологическим эквивалентом непродолжительного стимулирующего действия МСК на рост саркомы М-1 являлась активация ангиогенеза и пролиферативной активности опухолевых клеток. Тенденция к торможению роста саркомы М-1 в более поздние сроки коррелировала с усилением апоптотической гибели опухолевых клеток.

Есть все основания полагать, что зарегистрированное в данной работе радиосенсибилизирующее действие МСК человека при экспериментальной лучевой терапии саркомы М-1 обусловлено стимуляцией ангиогенеза, повышением уровня оксигенации паренхимы и, соответственно, снижением содержания гипоксических клеток в зоне радиационного воздействия. Не исключено, что регистрируемые эффекты могут быть также обусловлены и проявлением пока мало изученной активности МСК в условиях радиотерапии. В этом плане заслуживают особого внимания данные, представленные в обзоре [28], о том, что МСК относительно устойчивы к действию ионизирующего излучения и сохраняют характеристики стволовых клеток даже после облучения в высоких дозах. Основные механизмы наблюдаемой радиорезистентности МСК включают в себя эффективное распознавание повреждений ДНК, репарацию двойных разрывов и устойчивость к апоптозу. Авторы охарактеризовали участие различных путей устранения повреждений ДНК в МСК, а также суммировали роль старения и аутофагии в развитии их радиорезистентности. Согласно результатам исследования Farias et al. [14], МСК человека, полученные из стромы пуповины, при их активации облучением в низкой дозе становились источником противоопухолевых цитокинов, которые *in vitro* снижали пролиферативную активность опухолевых клеток линий A375 и G361. Введение *in vivo* необлучённых МСК и воздействие ионизирующим излучением приводило к повышению эффективности лучевой терапии с синергическим цитотоксическим действием на ксенотрансплантаты меланомы человека, привитые мышам.

Заключение

Впервые зарегистрировано радиосенсибилизирующее действие введения МСК человека до экспериментальной лучевой терапии перевиваемой соединительнотканной опухоли с более выраженным эффектом лучевой инактивации неопластических клеток. При комбинированном применении МСК и ионизирующего излучения в пострadiационном периоде коэффициент роста облучённых опухолей снизился в 1,8 раза, а выживаемость опухоленосителей увеличилась на 31% относительно группы особей, опухоли которых подвергались воздействию только γ -излучения. Анализ полученных результатов свидетельствует, что усиление радиочувствительности саркомы М-1 при трансплантации мезенхимальных стволовых клеток до облучения обусловлено стимуляцией ангиогенеза, снижением содержания гипоксических клеток и повышением общей фракции репопулирующих опухолевых клеток в зоне лучевого воздействия.

Литература

1. **Baskar R., Lee K.A., Yeo R., Yeoh K.W.** Cancer and radiation therapy: current advances and future directions //Int. J. Med. Sci. 2012. V. 9, N 3. P. 193-199.
2. **Maier P., Hartmann L., Wenz F., Herskind C.** Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization //Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17, N 1. pii: E102. doi: 10.3390/ijms17010102.
3. **Kim B.M., Hong Y., Lee S., Liu P., Lim J.H., Lee Y.H., Lee T.H., Chang K.T., Hong Y.** Therapeutic implications for overcoming radiation resistance in cancer therapy //Int. J. Mol. Sci. 2015. V. 16, N 11. P. 26880-26913.
4. **Hong B.J., Kim J., Jeong H., Bok S., Kim Y.E., Ahn G.O.** Tumor hypoxia and reoxygenation: the yin and yang for radiotherapy //Radiat. Oncol. J. 2016. V. 34, N 4. P. 239-249.
5. **Horsman M.R., Overgaard J.** The impact of hypoxia and its modification of the outcome of radiotherapy //J. Radiat. Res. 2016. V. 57, Suppl. 1. P. i90-i98.
6. **Horsman M.R., Vaupel P.** Pathophysiological basis for the formation of the tumor microenvironment //Front. Oncol. 2016. V. 6. P. 1-11.
7. **Wigerup C., Pahlman S., Bexell D.** Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer //Pharmac. Ther. 2016. V. 164. P. 152-169.
8. **Son B., Lee S., Youn H., Kim E., Kim W., Youn B.** The role of tumor microenvironment in therapeutic resistance //Oncotarget. 2017. V. 8, N 3. P. 3933-3945.
9. **Harada H.** How can we overcome tumor hypoxia in radiation therapy? //J. Radiat. Res. 2011. V. 52, N 5. P. 545-556.
10. **Phillips R.M.** Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia-activated prodrugs //Cancer Chemother. Pharmacol. 2016. V. 77, N 3. P. 441-457.
11. **Shinohara E.T., Maity A.** Increasing sensitivity to radiotherapy and chemotherapy by using novel biological agents that alter the tumor microenvironment //Curr. Mol. Med. 2009. V. 9, N 9. P. 1034-1045.
12. **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. V. 17, N 7-8. P. 579-587.
13. **Южаков В.В., Севаньяева Л.Е., Коноплянников А.Г., Бандурко Л.Н., Коноплянников М.А., Ингель И.Э., Фомина Н.К., Цыганова М.Г., Кальсина С.Ш.** Морфофункциональное изучение действия мезенхимальных стволовых клеток на саркому М-1 //Молекулярная медицина. 2015. № 1. С. 39-45.
14. **Farias V. de A., O'Valle F., Lerma B.A., Ruiz de Almodóvar C., López-Peñalver J.J., Nieto A., Santos A., Fernández B.I., Guerra-Librero A., Ruiz-Ruiz M.C., Guirado D., Schmidt T., Oliver F.J., Ruiz de Almodóvar J.M.** Human mesenchymal stem cells enhance the systemic effects of radiotherapy //Oncotarget. 2015. V. 6, N 31. P. 31164-31180.
15. **Южаков В.В., Севаньяева Л.Е., Ульяненко С.Е., Яковлева Н.Д., Кузнецова М.Н., Цыганова М.Г., Фомина Н.К., Ингель И.Э., Лычагин А.А.** Эффективность фракционированного воздействия γ -излучения и быстрых нейтронов на саркому М-1 //Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53, № 3. С. 267-279.
16. **Цыб А.Ф., Коноплянников А.Г., Колесникова А.И., Павлов В.В.** Получение и использование в медицине клеточных культур из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека //Вестник РАМН. 2004. Т. 59, № 9. С. 71-76.
17. **Южаков В.В., Бурмистрова Н.В., Фомина Н.К., Бандурко Л.Н., Севаньяева Л.Е., Старовойтова А.В., Яковлева Н.Д., Цыганова М.Г., Ингель И.Э., Островерхов П.В., Каплан М.А., Грин М.А., Ма-**

- жуга А.Г., Миронов А.Ф., Галкин В.Н., Романко Ю.С. Морфофункциональные характеристики саркомы М-1 крыс после фотодинамической терапии с производным бактериохлорофилла а //Biomedical Photonics. 2016. Т. 5, № 4. С. 4-14.
18. **Harris A.L.** Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth //Nat. Rev. Cancer. 2002. V. 2, № 1. P. 38-47.
19. **Ogawa K., Boucher Y., Kashiwagi S., Fukumura D., Chen D., Gerweck L.E.** Influence of tumor cell and stroma sensitivity on tumor response to radiation //Cancer Res. 2007. V. 67. P. 4016-4021.
20. **Ahn G., Brown J.M.** Influence of bone marrow-derived hematopoietic cells on the tumor response to radiotherapy //Cell Cycle. 2009. V. 8, N 7. P. 970-976.
21. **Lazennec G., Jorgensen C.** Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? //Stem Cells. 2008. V. 26, N 6. P. 1387-1394.
22. **Reagan M.R., Kaplan D.L.** Concise review: mesenchymal stem cell tumor-homing: detection methods in disease model systems //Stem Cells. 2011. V. 29, N 6. P. 920-927.
23. **Spaeth E.L., Dembinski J.L., Sasser A.K., Watson K., Klopp A., Hall B., Andreeff M., Marini F.** Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression //PLoS ONE. 2009. V. 4, N 4. P. e4992. doi: 10.1371/journal.pone.0004992.
24. **Roorda B.D., ter Elst A., Kamps W.A., de Bont E.S.** Bone marrow-derived cells and tumor growth: Contribution of bone marrow-derived cells to tumor micro-environments with special focus on mesenchymal stem cells //Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2009. V. 69, N 3. P. 187-198.
25. **Khakoo A.Y., Pati S., Anderson S.A., Reid W., Elshal M.F., Rovira I.I., Nguyen A.T., Malide D., Combs C.A., Hall G., Zhang J., Raffeld M., Rogers T.B., Stetler-Stevenson W., Frank J.A., Reitz M., Finkel T.** Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma //J. Exp. Med. 2006, V. 203, N 5. P. 1235-1247.
26. **Lu Y.R., Yuan Y., Wang X.J., Wei L.L., Chen Y.N., Cong C., Li S.F., Long D., Tan W.D., Mao Y.Q., Zhang J., Li Y.P., Cheng J.Q.** The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo //Cancer Biol. Ther. 2008. V. 7, N 2. P. 245-251.
27. **Ganta C., Chiyo D., Ayuzawa R., Rachakatla R., Pyle M., Andrews G., Weiss M., Tamura M., Troyer D.** Rat umbilical cord stem cells completely abolish rat mammary carcinomas with no evidence of metastasis or recurrence 100 days post-tumor cell inoculation //Cancer Res. 2009. V. 69, N 5. P. 1815-1820.
28. **Nicolay N.H., Lopez-Perez R., Saffrich R., Huber P.E.** Radio-resistant mesenchymal stem cells: mechanisms of resistance and potential implications for the clinic //Oncotarget. 2015. V. 6, N 23. P. 19366-19380.

Radiosensitising effect of mesenchymal stem cells on sarcoma M-1 under local gamma-irradiation

Sevankaeva L.E., Yuzhakov V.V., Konoplyannikov A.G., Romanko Yu.S., Bandurko L.N., Fomina N.K., Ingel I.E., Konoplyannikov M.A.¹, Yakovleva N.D., Tsyganova M.G.

A. Tsyb MRRC, Obninsk;

¹ FSCC FMBA of Russia, Moscow

Very little information about effects of mesenchymal stem cells on malignant neoplasms radiosensitivity is available. The research aims to study impact of human mesenchymal stem cells (hMSC) on survival of tumor-bearing animals, tumor growth rate and morphology following single local irradiation of sarcoma M-1 by ⁶⁰Co γ-rays with dose of 30 Gy. Immunostaining technique for PCNA, CD31, pimonidazole and computer-assisted analysis of microscopic images are used to detect the effects. The results demonstrate activation of angiogenesis in tumor growth zones, increase in concentration of proliferating tumor cells in the neoplasm parenchyma, twofold reduction of hypoxic cells fraction following hMSCs transplantation. Quantitative analysis of impact of transplanted mesenchymal stem cells and local irradiation of the tumor identifies more pronounced radiation inactivation of tumor cells. In post-radiation period the growth rate of irradiated tumor cells reduces by 1.8 times, and cumulative survival fraction of tumor-bearing rats increases by 31%, as compared with the gamma-irradiated stem cells free animals with M-1 sarcoma. The results of research provide opportunity to identify and document radiosensitizing effect of hMSC administered prior to local irradiation of transplantable connective tissue tumor for the first time. There are reasons to suppose that increased radiosensitivity of sarcoma M-1 is caused by reduction of the most radioresistant hypoxic cells fraction in the irradiated area.

Keywords: *mesenchymal stem cells, γ-radiation, M-1 sarcoma, hypoxia, radiosensitization, angiogenesis, immunohistochemistry, PCNA, CD31, pimonidazole.*

References

1. **Baskar R., Lee K.A., Yeo R., Yeoh K.W.** Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int. J. Med. Sci.*, 2012, vol. 9, no. 3, pp. 193-199.
2. **Maier P., Hartmann L., Wenz F., Herskind C.** Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, vol. 17, no. 1, pii: E102. doi: 10.3390/ijms17010102.
3. **Kim B.M., Hong Y., Lee S., Liu P., Lim J.H., Lee Y.H., Lee T.H., Chang K.T., Hong Y.** Therapeutic implications for overcoming radiation resistance in cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, vol. 16, no. 11, pp. 26880-26913.
4. **Hong B.J., Kim J., Jeong H., Bok S., Kim Y.E., Ahn G.O.** Tumor hypoxia and reoxygenation: the yin and yang for radiotherapy. *Radiat. Oncol. J.*, 2016, vol. 34, no. 4, pp. 239-249.
5. **Horsman M.R., Overgaard J.** The impact of hypoxia and its modification of the outcome of radiotherapy. *J. Radiat. Res.*, 2016, vol. 57, Suppl. 1, pp. i90-i98.
6. **Horsman M.R., Vaupel P.** Pathophysiological basis for the formation of the tumor microenvironment. *Front. Oncol.*, 2016, vol. 6, pp. 1-11.
7. **Wigerup C., Pålman S., Bexell D.** Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmac. Ther.*, 2016, vol. 164, pp. 152-169.
8. **Son B., Lee S., Youn H., Kim E., Kim W., Youn B.** The role of tumor microenvironment in therapeutic resistance. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, no. 3, pp. 3933-3945.

Sevankaeva L.E. – Senior Researcher; Yuzhakov V.V.* – Head of Lab., C.Sc., Med.; Konoplyannikov A.G. – Head of Dep., D.Sc., Biol., Prof.; Romanko Yu.S. – Head of Dep., MD, Prof.; Bandurko L.N. – Lead. Researcher, C.Sc., Med.; Fomina N.K. – Senior Researcher, C.Sc., Biol.; Ingel I.E. – Senior Researcher, C.Sc., Biol.; Yakovleva N.D. – Lead. Researcher, C.Sc., Biol.; Tsyganova M.G. – Researcher. A. Tsyb MRRC. Konoplyannikov M.A. – Head of Lab., C.Sc., Biol. FSCC FMBA of Russia.

*Contacts: 4 Korolev str., Obninsk, Kaluga region, Russia, 249036. Tel.: +7 (903) 635 79 71; e-mail: yuzh_vad@mail.ru.

9. **Harada H.** How can we overcome tumor hypoxia in radiation therapy? *J. Radiat. Res.*, 2011, vol. 52, no. 5, pp. 545-556.
10. **Phillips R.M.** Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia-activated prodrugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2016, vol. 77, no. 3, pp. 441-457.
11. **Shinohara E.T., Maity A.** Increasing sensitivity to radiotherapy and chemotherapy by using novel biological agents that alter the tumor microenvironment. *Curr. Mol. Med.*, 2009, vol. 9, no. 9, pp. 1034-1045.
12. **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, vol. 17, no. 7-8, pp. 579-587.
13. **Yuzhakov V.V., Sevan'kaeva L.E., Konoplyannikov A.G., Bandurko L.N., Konoplyannikov M.A., Ingel I.E., Fomina N.K., Tsyganova M.G., Kal'sina S.Sh.** A morphofunctional study of mesenchymal stem cells' effects on sarcoma M-1. *Molekulyarnaya meditsina – Molecular Medicine*, 2015, no. 1, pp. 39-45. (In Russian).
14. **Farias V. de A., O'Valle F., Lerma B.A., Ruiz de Almodóvar C., López-Peñalver J.J., Nieto A., Santos A., Fernández B.I., Guerra-Librero A., Ruiz-Ruiz M.C., Guirado D., Schmidt T., Oliver F.J., Ruiz de Almodóvar J.M.** Human mesenchymal stem cells enhance the systemic effects of radiotherapy. *Oncotarget*, 2015, vol. 6, no. 31, pp. 31164-31180.
15. **Iuzhakov V.V., Sevan'kaeva L.E., Ul'ianenko S.E., Iakovleva N.D., Kuznetsova M.N., Tsyganova M.G., Fomina N.K., Ingel' I.E., Lychagin A.A.** The effectiveness of fractionated exposure of sarcoma M-1 to gamma-radiation and fast neutrons. *Radiacionnaya biologiya. Radiojehologiya – Radiation Biology. Radioecology*, 2013, vol. 53, no. 3, pp. 267-79. (In Russian).
16. **Tsyb A.F., Konoplyannikov A.G., Kolesnikova A.I., Pavlov V.V.** Production of cell cultures from mesenchymal stem cells of the human bone marrow and their use in medicine. *Vestnik RAMN – Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2004, vol. 59, no. 9, pp. 71-76. (In Russian).
17. **Yuzhakov V.V., Burmistrova N.V., Fomina N.K., Bandurko L.N., Sevankaeva L.E., Starovoytova A.V., Yakovleva N.D., Tsyganova M.G., Ingel I.E., Ostroverhov P.V., Kaplan M.A., Grin M.A., Majouga A.G., Mironov A.F., Galkin V.N., Romanko Yu.S.** Morphofunctional characteristics of rat sarcoma M-1 after photodynamic therapy with the bacteriochlorophyll a derivative. *Biomedical Photonics*, 2016, vol. 5, no. 4, pp. 4-14. (In Russian).
18. **Harris A.L.** Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, vol. 2, no. 1, pp. 38-47.
19. **Ogawa K., Boucher Y., Kashiwagi S., Fukumura D., Chen D., Gerweck L.E.** Influence of tumor cell and stroma sensitivity on tumor response to radiation. *Cancer Res.*, 2007, vol. 67, pp. 4016-4021.
20. **Ahn G., Brown J.M.** Influence of bone marrow-derived hematopoietic cells on the tumor response to radiotherapy. *Cell Cycle*, 2009, vol. 8, no. 7, pp. 970-976.
21. **Lazennec G., Jorgensen C.** Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells*, 2008, vol. 26, no. 6, pp. 1387-1394.
22. **Reagan M.R., Kaplan D.L.** Concise review: mesenchymal stem cell tumor-homing: detection methods in disease model systems. *Stem Cells*, 2011, vol. 29, no. 6, pp. 920-927.
23. **Spaeth E.L., Dembinski J.L., Sasser A.K., Watson K., Klopp A., Hall B., Andreeff M., Marini F.** Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS ONE*, 2009, vol. 4, no. 4, pp. e4992. doi: 10.1371/journal.pone.0004992.

24. **Roorda B.D., ter Elst A., Kamps W.A., de Bont E.S.** Bone marrow-derived cells and tumor growth: Contribution of bone marrow-derived cells to tumor micro-environments with special focus on mesenchymal stem cells. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2009, vol. 69, no. 3, pp. 187-198.
25. **Khakoo A.Y., Pati S., Anderson S.A., Reid W., Elshal M.F., Rovira I.I., Nguyen A.T., Malide D., Combs C.A., Hall G., Zhang J., Raffeld M., Rogers T.B., Stetler-Stevenson W., Frank J.A., Reitz M., Finkel T.** Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J. Exp. Med.*, 2006, vol. 203, no. 5, pp. 1235-1247.
26. **Lu Y.R., Yuan Y., Wang X.J., Wei L.L., Chen Y.N., Cong C., Li S.F., Long D., Tan W.D., Mao Y.Q., Zhang J., Li Y.P., Cheng J.Q.** The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol. Ther.*, 2008, vol. 7, no. 2, pp. 245-251.
27. **Ganta C., Chiyo D., Ayuzawa R., Rachakatla R., Pyle M., Andrews G., Weiss M., Tamura M., Troyer D.** Rat umbilical cord stem cells completely abolish rat mammary carcinomas with no evidence of metastasis or recurrence 100 days post-tumor cell inoculation. *Cancer Res.*, 2009, vol. 69, no. 5, pp. 1815-1820.
28. **Nicolay N.H., Lopez-Perez R., Saffrich R., Huber P.E.** Radio-resistant mesenchymal stem cells: mechanisms of resistance and potential implications for the clinic. *Oncotarget*, 2015, vol. 6, no. 23, pp. 19366-19380.