УДК 576.385.5:612.017:618.19-006.6

А.М. Гольцев, М.О. Бондарович*, А.В. Кузняков,
М.В. Останков, Л.В. Останкова, О.В. Челомбітько

Визначення стану Т-клітинної ланки імунітету і вмісту стовбурових ракових клітин як критерій оцінки ефективності превентивної терапії раку молочної залози кріоконсервованими клітинами фетальної печінки

UDC 576.385.5:612.017:618.19-006.6

A.N. Goltsev, N.A. Bondarovich*, A.V. Kuznyakov,
M.V. Ostankov, L.V. Ostankova, O.V. Chelombit'ko

Determination of Immunity T-cell Link State and Content of Cancer Stem Cells as Criterion to Estimate Efficiency of Preventive Breast Cancer Therapy with Cryopreserved Fetal Liver Cells

Реферат: Доцільність застосування кріоконсервованих клітин фетальної печінки (кКФП) для превентивного лікування раку молочної залози (РМЗ) обгрунтована широким спектром продукованих ними біологічно активних речовин із імуномодулюючою й антибластомною активністю. Методами ранньої діагностики та оцінки ефективності превентивної терапії РМЗ можуть бути виявлення стовбурових ракових клітин (СРК) у молочній залозі (МЗ) та визначення стану імунної системи (ІС). Експерименти виконано на 16-місячних мишах лінії С3Н/Не, яким у 6 місяців вводили кріоконсервовані або нативні КФП 14 діб гестації в дозі 1×10^6 або 5×10^6 клітин. Контролем були миші ліній СВА/Н і С3Н/Не без і з введенням клітин печінки дорослих тварин. Вміст СРК у МЗ та пухлині, стан Т-клітинної ланки імунітету в селезінці визначали методом проточної цитометрії. У період до візуального прояву пухлини встановлено зменшення в селезінці кількості $CD3^+$, $CD4^+$ і збільшення $CD4^+CD25^+$-клітин. У МЗ мишей із даною патологією без візуальної наявності пухлини з'являлися $CD44^{hi}$-клітини, збільшувалася концентрація $CD44^+CD24^-$, $CD133^+$-клітин. Після появи пухлини спостерігали пряму кореляцію між її розмірами й концентрацією $CD4^+$ $CD25^+$-клітин у селезінці тварин. У МЗ при збільшенні розмірів пухлини відзначено зменшення кількості $CD44^{hi}$, $CD44^+CD24^-$-клітин, а в самій пухлині – збільшення кількості $CD44^{hi}$-клітин. Превентивне лікування КФП мишей лінії С3Н знижувало вміст СРК у МЗ, відновлювало функціонування Т-клітинної ланки ІС.

Ключові слова: рак молочної залози, стовбурові ракові клітини, імунна система, клітини фетальної печінки, клітинна терапія.

Реферат: Целесообразность применения криоконсервированных клеток фетальной печени (кКФП) для превентивного лечения рака молочной железы (РМЖ) обоснована широким спектром продуцируемых ими биологически активных веществ с иммуномодулирующей и антибластомной активностью. Методом ранней диагностики и оценки эффективности превентивной терапии РМЖ могут быть выявление стволовых раковых клеток (СРК) в молочной железе (МЖ) и определение состояния иммунной системы (ИС). Эксперименты выполнены на 16-месячных мышах линии С3Н/Не, которым в 6 месяцев вводили криоконсервированные или нативные КФП 14 суток гестации в дозе 1×10^6 или 5×10^6 клеток. Контролем были мыши линий СВА/Н и С3Н/Не без и с введением клеток печени взрослых животных. Содержание СРК в МЖ и опухоли, состояние Т-клеточного звена иммунитета в селезенке определяли методом проточной цитометрии. В период до визуального проявления опухоли установлено уменьшение в селезенке количества $CD3^+$, $CD4^+$ и увеличение $CD4^+CD25^+$-клеток. В МЖ мышей с данной патологией появлялись $CD44^{hi}$-клетки, увеличивалась концентрация $CD44^+CD24^-$, $CD133^+$-клеток. После появления опухоли наблюдали прямую корреляцию между ее размерами и концентрацией $CD4^+CD25^+$-клеток в селезенке животных. В МЖ при увеличении размеров опухоли отмечено уменьшение количества $CD44^{hi}$, $CD44^+CD24^-$-клеток, а в самой опухоли – увеличение количества $CD44^{hi}$-клеток. Превентивное лечение КФП мышей линии С3Н снижало содержание СРК в МЖ, восстанавливало функцию Т-клеточного звена ИС.

Ключевые слова: рак молочной железы, стволовые раковые клетки, иммунная система, клетки фетальной печени, клеточная терапия.

Abstract: The expediency to use cryopreserved fetal liver cells (cFLCs) for preventive treatment of breast cancer (BC) is proved by a wide range of produced by them biologically active substances with immunomodulatory and antineoplastic activity. Revealing cancer stem cells (CSCs) in the mammary gland (MG) and determination of the immune system (IS) status are the methods of early diagnosis and evaluation of preventive treatment efficiency of breast cancer. The experiments were performed in 16-month-old C3H/He mice which in 6 months were injected by cryopreserved or native FLCs of 14 gestation days at a dose of 1×10^6 or 5×10^6 cells.

Відділ кріопатофізіології та імунології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015;
тел.: (+38 057) 373--, факс: (+38 057) 373-30-84,
електронна пошта: bondarovnikolay@mail.ru

Надійшла 21.01.2014
Прийнята до друку 08.04.2014

Проблеми кріобіології і кріомедицини. – 2014. – Т. 24, №3. – С. 238–248.
© 2014 Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Department of Cryopathophysiology and Immunology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

***To whom correspondence should be addressed:**
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.:+380 57 373, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: bondarovnikolay@mail.ru

Received January, 21, 2014
Accepted April, 08, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014. 24(3): 238–248.
© 2014 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

CBA/H and C3H/He mice without and with the introduction of liver cells of adult animals were the control. The content of CSCs in MG and tumor, the state of T-cell immunity in spleen were found by flow cytometry. Prior to a visual manifestation of tumor there was revealed a decrease of $CD3^+$, $CD4^+$ number in spleen, and an increase of $CD4^+CD25^+$ number of cells. In MG of mice with this pathology $CD44^{hi}$ cells appeared, concentration of $CD44^+CD24^-$, $CD133^+$-cells increased. After tumor appearance there was observed a direct correlation between tumor dimensions and concentration of $CD4^+CD25^+$ cells in animal's spleen. In MG with increased tumor sizes there was observed a decrease in the number of $CD44^{hi}$, $CD44^+CD24^-$ cells and in the tumor itself there was found an increased number of $CD44^{hi}$ cells. Preventive treatment with FLCs of C3H mice decreased the content of CSCs in MG and restored T-cell link of IS.

Key words: cryopreservation, fetal liver, bone marrow cells, hematopoietic stem cells.

Рання діагностика раку молочної залози (РМЗ) є однією з основних задач сучасної онкології [35]. За допомогою діагностичних методів дослідження (цитологічні, гістологічні, визначення гормонального статусу й ін.) не завжди можна визначити доклінічний прояв пухлинного процесу [13]. Відомо, що РМЗ, як й інші онкологічні захворювання, може бути наслідком розбалансування імунної системи (ІС). У зв'язку з цим для діагностики й аналізу ефективності превентивного лікування необхідно використовувати методи визначення стану ІС, а також наявності в організмі реципієнта стовбурових ракових клітин (СРК). Із цією метою в експериментальній практиці використовують мишей лінії С3Н/Не з генетично детермінованим розвитком РМЗ, який індукується вірусом ММТV (*mouse mammary tumour virus* – вірус пухлини молочних залоз), що передається з молоком матері [23].

Для лікування онкологічних захворювань застосовують хірургічні, радіологічні, хіміотерапевтичні методи, гормоно- та імунотерапію, клітинну терапію й, зокрема, введення продуктів ембріофетоплацентарного комплексу [13, 14, 16]. На теперішній час є досвід успішного застосування при лікуванні онкологічних захворювань препаратів плаценти [40], суспензії стовбурових ембріональних клітин [25], фетальних клітин тимуса [21], головного мозку [10] та печінки [8, 20, 22]. Разом із протипухлинною дією клітини фетальної печінки (КФП) здатні коригувати стан ІС при лікуванні низки захворювань, а саме: ад'ювантного артриту, аутоімунної гемолітичної анемії, реакції «трансплантат проти хазяїна», РМЗ [5, 11, 17, 28]. Можливо, даний ефект від введення КФП обумовлений наявністю в їхньому складі кровотвірних, мезенхімальних стовбурових клітин, а також активністю різних цитокинів і ростових факторів (альфа-фетопротеїну, онкостатину, фетуїну й еритропоетину). Незважаючи на певні успіхи застосування такої терапії, є випадки формування тератом після застосування ембріональних стовбурових клітин ранніх строків гестації [19, 29]. Даних про розвиток тератом при введені КФП із метою лікування у сучасній літературі немає, при цьому відомі випадки успішного їхнього використання при лікуванні онкозахворювань у клініці [1, 12, 22]. Однак існує необхідність ретельного експериментального обґрунтування застосу-

Early diagnosis of breast cancer (BC) is one of the main problems of modern oncology [29]. Using diagnostic methods (cytological, histological, determination of hormonal status, *etc*.) it is not always possible to reveal tumor preclinical onset [32]. It is known that BC, like other cancers, may be result from deregulation of immune system (IS). Thereby for diagnosis and analysis of the efficiency of preventive treatment it is necessary to use the methods for determining IS status and the occurrence of cancer stem cells (CSCs) in recipient's organism. For this purpose in experimental practice there are used C3H/He mice with genetically determined development of BC, induced by the virus MMTV (mouse mammary tumor virus), which is transferred with a mother's milk [7].

For cancer treatment in clinical practice there are used the methods such as surgery, radiology, chemotherapy, hormone and immunotherapy, cell therapy and, particularly, the introduction of embryo fetoplacental complex products [11, 32, 33]. Nowadays there have been achieved the results of successful cancer treatment with placental drugs [39], a suspension of embryonic stem cells [12], fetal thymus cells [4], brain [40] and liver [3, 8, 16]. Along with antineoplastic activity fetal liver cells (FLCs) are capable of correcting IS status during treatment of various diseases such as: adjuvant arthritis, autoimmune hemolytic anemia, graft-versus-host reaction [16, 18, 27, 36]. Probably the effect of FLCs introduction occurs due to hematopoietic, mesenchymal stem cells, as well as various cytokines and growth factors (alpha-fetoprotein, oncostatin, fetuin and erythropoietin) activity. Despite the progress achieved in this field, there is an information on teratomas formation cases when introducing embryonic stem cells at early gestation periods [1, 21]. It should be noted that the data on the development of fetal teratomas when introducing FLCs for the treatment are not available in literature, but there are the reports of their successful use in cancer treatment in clinic [2, 6, 30]. However there is a necessity of a careful experimental substantiation of FLCs use in cancer. The use of FLCs in experimental and clinical practice is impossible without certification of this biomaterial and long-term storage at –196°C. Cryopreservation prevents autolysis and other unfavorable processes in cells. Along with this physical and chemical factors of cryopreservation may affect structural and functional

вання КФП при онкологічних захворюваннях. Використання КФП у експериментальній і клінічній практиках неможливе без сертифікації даного біоматеріалу та тривалого його зберігання за температури –196°С. Консервування за низьких температур дозволяє запобігти аутолізу та іншим несприятливим процесам у клітинах. Поряд із цим структурно-функціональні властивості біооб'єкта можуть змінюватися під впливом фізико-хімічних факторів кріоконсервування, що може модулювати терапевтичні властивості КФП.

Мета роботи – оцінити ефективність превентивної терапії раку молочної залози кріоконсервованими клітинами фетальної печінки (порівняно з нативними) з визначенням показників Т-клітинної ланки ІС, концентрації СРК, частоти розвитку пухлини й виживаності тварин.

Матеріали та методи

Експериментальне дослідження проводили на мишах-самках лінії С3Н/Не, СВА/Н відповідно до «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей» (м. Страсбург, 1985).

Тварин забивали шляхом декапітації під ефірним наркозом. Клітини фетальної печінки 14 доби гестації й клітини печінки дорослих тварин (КПДТ) одержували у мишей лінії С57Bl/6J. Суспензію КФП отримували методом механічної дисоціації у середовищі 199 («ПанЕко», Росія) із 3%-ю ембріональною телячою сироваткою («БіолоТ», Росія) і 2%-м цитратом натрію (робочий розчин) [6], з печінки дорослих донорів – методом M.N. Berry [20]. Клітини кріоконсервували під захистом 10%-го розчину ДМСО на програмному заморожувачі УОП-06 (СКТБ з ДВ ІПКіК НАН України), розморожували на водяній бані при 40°С. Для відмивання клітин від кріопротектора одноразово повільно додавали рівний до об'єму суспензії робочий розчин Хенкса із подальшим центрифугуванням протягом 10 хв при 300g. Кількість життєздатних клітин до та після кріоконсервування визначали шляхом фарбування флуоресцентним барвником пропідія йодідом [26].

Тварин було розділено на 10 груп: 1 – без лікування й клінічних проявів РМЗ (n = 6); 2 – без лікування, з пухлиною розміром 1 см (n = 6); 3 – із пухлиною розміром 3 см (n = 6); 4 – із попередньо введеними кріоконсервованими КФП (кКФП), 1×10^6 кл/мишу (n = 7); 5 – кКФП, 5×10^6 кл/мишу (n = 7); 6 – нативними КФП (нКФП), 1×10^6 кл/мишу (n = 7); 7 – нКФП, 5×10^6 кл/мишу (n = 6); 8 – нативними КПДТ (нКПДТ), 1×10^6 кл/мишу (n = 7), 9 – нКПДТ, 5×10^6 кл/мишу (n = 6); 10 – здорові миші лінії СВА/Н (контроль, n = 12). Клітини

properties of biological object, resulting in the change of therapeutic properties of FLCs.

The research aim was to assess the efficiency of preventive treatment of breast cancer by cryopreserved fetal liver cells (if compared with native cells) together with estimation of T cell immune system link, CSCs concentration, tumor development frequency and animal survival.

Materials and methods

The experiment was performed in C3H/He, CBA/H female mice according to European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1985).

The animals were decapitated under ether anaesthesia. Fetal liver cells of 14 gestation days and mature animal liver cells (MALCs) were obtained in C57B1/6J mice. FLCs suspension was obtained by mechanical dissociation in medium 199 (PanEko, Russia) with 3% fetal bovine serum (Biolot, Russia) and 2% sodium citrate (handling solution) [18], it was obtained from liver of mature animals by the method of M.N. Berry [3]. The cells were cryopreserved under 10% DMSO (Galychfarm, Ukraine) protection with a programmable freezer UOP-6 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine) and thawed in water bath at 40°C. To wash the cells of cryoprotective agent an equal to the suspension volume Hanks' solution was slowly added, then centrifuged for 10 min at 300g. A number of viable cells was determined prior to and after cryopreservation using propidium iodide fluorescent dye [15].

The animals were divided into 10 groups: 1 – without treatment and clinical manifestations of BC (n = 6); 2 – without treatment, 1 cm tumor size (n = 6); 3 – without treatment, with 3 cm tumor size (n = 6); 4 – with previously introduced cryopreserved FLCs (cFLCs) 1×10^6 cells/mouse (n=7); 5 – cFLCs, 5×10^6 cells/mouse (n = 7); 6 – native FLCs (nFLCs), 1×10^6 cells/mouse (n = 7); 7 – nFLCs, 5×10^6 cells/mouse (n = 6); 8 – native MALCs (nMALCs) 1×10^6 cells/mouse (n=7), 9 – nMALCs, 5×10^6 cells/mouse (n = 6); 10 – healthy CBA/H mice (control, n = 12). Fetal liver cells (groups 4–7) or MALCs (groups 8, 9) were preventively administered (0.2 ml) into the tail vein of 6-month-old C3H/He mice. When selecting doses of FLCs the data of the experimental research, where this biomateral was used [22, 37] were taken into account. The animals were randomly distributed into either two or three groups at an early stage of tumor visual manifestation. Indices of IS status and CSCs content in tissues of mice with tumor was evaluated during the experiment at the time of achieving required

фетальної печінки (групи 4–7) або КПДТ (групи 8, 9) вводили (по 0,2 мл) у хвостову вену превентивно, тобто мишам лінії С3Н/Не у віці 6 місяців. При виборі доз КФП враховували дані експериментальних робіт, у яких використовували цей біоматерал [8, 18]. Тварин довільно розподіляли на 2 і 3 групи на початковому етапі візуального прояву пухлини. Показники стану ІС і вмісту СРК у тканинах мишей із пухлиною оцінювали в ході експерименту на момент досягнення пухлиною необхідного розміру. Середній розмір пухлин (*S*) у мишей С3Н обчислювали за формулою: $S = (a + b + h)/3$, де a – максимальна довжина, b – максимальна ширина, h – середня висота.

Стан Т-клітинної ланки ІС оцінювали у селезінці мишей дослідної та контрольної груп за експресією поверхневих антигенів (АГ) імунокомпетентних клітин із використанням моноклональних антитіл (МАТ) («BD», США) до CD3, CD4, CD8 (FITC), а також МАТ до CD25 (PE) на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» («BD») за методом, описаним у роботі G. Frimel [15]. За співвідношенням кількості Т-лімфоцитів $CD4^+$ до $CD8^+$ обчислювали імунорегуляторний індекс (IPI). Для визначення вмісту СРК у молочній залозі (МЗ) і пухлинах мишей використовували МАТ до CD44 (FITC), CD24 і CD133 (PE). Підраховані клітини, які мали CD44-маркер із високим рівнем інтенсивності флуоресценції (більше 10^3 за логарифмічною шкалою), відносили до популяції $CD44^{hi}$ [7]. Для мінімізації помилок у пробах аналізували 10000 подій. Обробку і аналіз результатів цитофлуориметрії аналізу здійснювали за допомогою програми «WinMDi 2.9» (Joseph Trotter, La Jolla, США).

Для статистичної обробки даних використовували t-критерій Стьюдента та комп'ютерну програму «Excel» («Microsoft», США), після встановлення нормальності розподілу. Дані представлено як $M \pm m$. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Миші лінії С3Н – зручна модель для вивчення причин та особливостей розвитку РМЗ, який індукується онкогенним вірусом MMTV [23]. Цей вірус, крім онкогенних властивостей, що проявляються розвитком пухлини у 12–13-місячних тварин, має здатність активно втручатися в фізіологічні процеси на рівні ІС. У нашому дослідженні показано, що у мишей лінії С3Н/Не ще до візуального прояву пухлини (група 1) існує дисбаланс у субпопуляційному складі лімфоцитів, який виражається зменшенням кількості клітин $CD3^+$ (загальної популяції Т-лімфоцитів), $CD4^+$ (Т-хелперів) і

tumor size. Average tumor size (S) in C3H mice was calculated with the following formula: $S = (a + b + h)/3$, where a is maximum length, b is maximum width, h is average height.

State of IS T-cell link in spleen of mice of experimental and control groups was assessed by expression of surface antigens (AGs) of immunocompetent cells using monoclonal antibodies (MAB) (Becton Dickinson, USA) to CD3, CD4, CD8 (FITC) and MAB to CD25 (PE) using FACS Calibur (Becton Dickinson) flow cytometer according to the method described [14]. We calculated immunoregulatory index (IRI) according to the ratio of CD4 to CD8 T-lymphocytes. To identify cancer stem cells in mammary gland and tumors in mice there were used MAB to CD44 (FITC), CD24 and CD133 (PE). The calculated cells having CD44 marker with a high fluorescence intensity (more than 10^3 according to a log scale) were referred to $CD44^{hi}$ population [19]. To minimize errors in the samples there were analyzed 10,000 cases. The results of cytofluorometric analysis were processed with Win MDi 2.9 software (Joseph Trotter, La Jolla, CA, USA).

There was used Student's t-test and Excel software (MS, USA) for statistical processing the data, after establishing the normal distribution. The data are presented as $M \pm m$. The differences were statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

C3H mice are a convenient model to study the causes and characteristics of BC, induced by oncogenic virus MMTV [7]. The virus, in addition to oncogenic properties manifested during the development of tumors in 12-13-month-old animals, is able of active interfering physiological processes at IS level. Our study shows that in C3H/He mice prior to visual manifestation of tumor (group 1) there is an imbalance in the subpoplation composition of lymphocytes, expressed with a decrease of $CD3^+$ cell number (of T-lymphocytes total number), $CD4^+$ (T-helper cells) and an increase of $CD4^+CD25^+$ number (T-regulatory cells (T-reg)) compared with the control (Fig.1). A significant increase in total number of T-lymphocytes, T-helper cells and $CD8^+$ (T-suppressor/cytotoxic), and IRI was observed in the animals of group 2, which might indicate an organism response to appearance of tumor AG. Increasing tumor size was accompanied by a decrease in total number of T-lymphocytes, T-helper cells, T-suppressor/cytotoxic and IRI (Fig. 1). These changes of IS T-cell link can be caused by suppressor effect of T-reg on them, which number increased in all the groups, probably under the influence of transforming growth factor-β (TGF-β), ones of the producers of which are tumor cells [25].

збільшенням кількості $CD4^+CD25^+$ (Т-регуляторних клітин (Т-рег)) у порівнянні з контролем (рис. 1). Значне збільшення загальної популяції Т-лімфоцитів, Т-хелперів і $CD8^+$ (Т-супресорів/цитотоксичних) та IPI спостерігалося у тварин групи 2, що може свідчити про реакцію організму на появу пухлинних АГ. Збільшення розміру пухлини супроводжувалося зменшенням кількості загальної популяції Т-лімфоцитів, Т-хелперів, Т-супресорів/цитотоксичних та IPI (рис.1). Такі зміни показників Т-клітинної ланки ІС можуть бути викликані супресорним впливом на них Т-рег, кількість яких збільшувалася, можливо, під впливом трансформуючого фактора росту-β (ТФР-β), одним із продуцентів якого є пухлинні клітини [32].

Раніше встановлено унікальну здатність клітин ІС проявляти цитотоксичну активність по відношенню як до загального пула пухлинних клітин, так і до СРК у вогнищі малігнізації [30, 37]. Тому за вмістом СРК у вогнищі малігнізації може бути оцінено участь ІС у протипухлинного захисті організму. Показано, що експансія пухлини пов'язана із гіперекспресією молекули CD44 ($CD44^{hi}$) у СРК і є необхідною умовою росту, інвазії й метастазування пухлини. Подібні функціональні характеристики притаманні й більш диференційованим СРК із фенотипом $CD44^+CD24^-$ і $CD133^+$ [38]. Ці дані узгоджуються з результатами наших досліджень, у яких було показано, що в МЗ у тварин групи 1 без клінічних ознак РМЗ вже збільшувалася кількість $CD44^+CD24^-$-клітин (2,5 рази) і $CD133^+$ (4 рази), а також спостерігалася експансія $CD44^{hi}$-клітин (рис. 2). Можливо, це пов'язано зі здатністю вірусу MMTV активувати шлях сигналювання Wnt. Як було показано J. Zeilstra і співавт., ступінь експресії CD44-молекули прямо залежить від вмісту транскрипційного фактора Wnt [39]. Певну роль у цьому процесі так само може грати й CD133-молекула, збільшення експресії якої у клітинах приводить до пригнічення експресії деяких генів-інгібіторів Wnt. Вірогідно, ще до візуального прояву РМЗ у клітинах МЗ відбуваються зміни, які є передумовою утворення пухлини. Поява пухлини у мишей групи 2 супроводжувалася підвищенням кількості $CD44^+$ $CD24^-$-клітин і значущим зниженням вмісту $CD133^+$-клітин. При цьому концентрація $CD44^{hi}$-клітин залишалася на рівні групи 1. Можливо, такий перерозподіл може бути пов'язаний із модифікацією спектра ростових факторів, які здатні продукувати клітини пухлини. Відомо, що епідермальний та інсуліноподібний фактори росту можуть індукувати експресію CD44-гена в клітинах, а, отже, сприяти збільшенню вмісту $CD44^+CD24^-$-клітин [24, 33]. У той самий час, збільшення кількості $CD133^+$-клітин у МЗ мишей групи 1 та зниження в

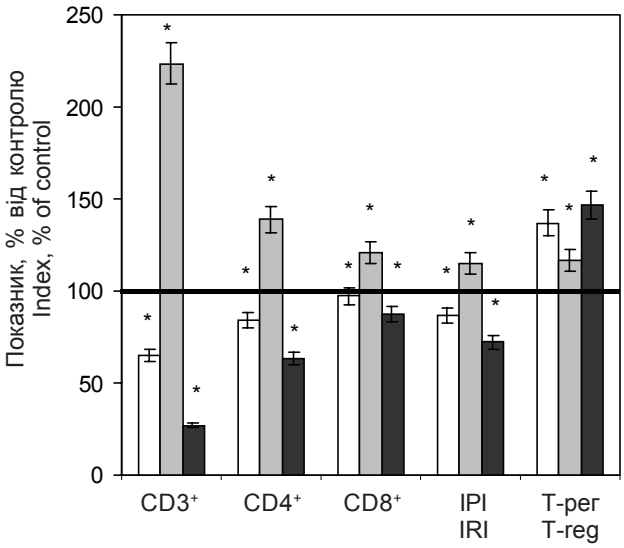

Рис. 1. Показники Т-клітинної ланки ІС мишей лінії C3H/He без лікування: □ – група 1, ▒ – група 2, ■ – група 3 (за 100% прийнято показники мишей лінії CBA; * – вірогідно значущі розходження порівняно з контролем, $p < 0{,}005$).

Fig. 1. Indices of T-cell link of C3H/He mice IS without treatment: □ – 1st group, ▒ – 2nd group, ■ – 3rd group (CBA mice indices are assumed as 100%) * – statistically significant differences compared with the control, $p < 0.005$).

An unique ability of IS cells to manifest cytotoxic activity in respect to both total pool of tumor cells and to CSCs in locus of malignancy was shown recently [23, 34]. Thus, assessment of the content of CSCs in malignant locus may be the criterion, demonstrating antitumor potential of IS. It has been shown that the expansion of tumor is associated with hyperexpression of molecule CD44 ($CD44^{hi}$) in CSCs and is a requirement for tumor growth, invasion and metastasis. Similar functional characteristics have more differentiated CSCs with $CD44^+CD24^-$ and $CD133^+$ phenotypes [35]. These data are consistent with the results of our studies, which have shown that in MG in the animals of the Group 1 without BC signs the number of $CD44^+$ $CD24^-$ cells (in 2.5 times) and $CD133^+$ (in 4 times) increased and the expansion of $CD44^{hi}$ cells occurred as well (Fig. 2). Probably this is due to the ability of MMTV virus to activate Wnt signaling way. As J. Zeilstra *et al.* presented, the expression degree of CD44 molecules depends on the content of Wnt transcription factor [38]. CD133-molecule can also play a certain role in this process, increasing the level of which in cells leads to a decrease in gene expression of some inhibitors of Wnt. Likely even prior to visual manifestation of BC, in MG cells the changes leading to a tumor formation occur. The appearance of tumor in mice of the Group 2 stipulated higher increase of $CD44^+CD24^-$ number and a significant reduction of $CD133^+$ cells content. Herewith the concentration of

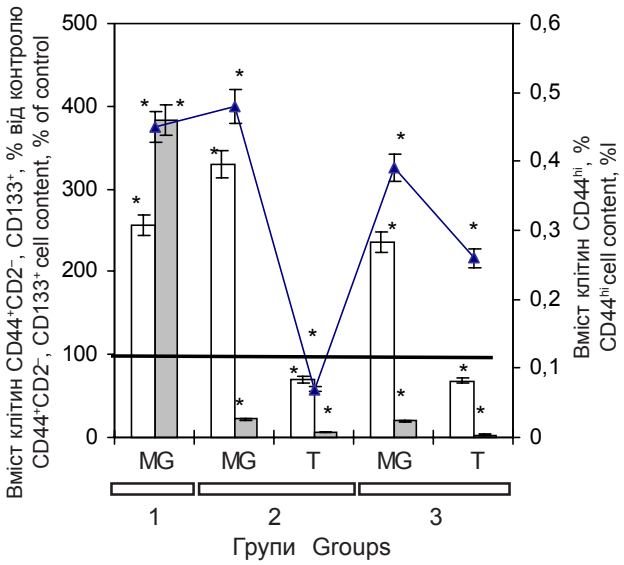

Рис. 2. Показники вмісту СРК у МЗ (MG) і пухлині (Т) у мишей лінії С3Н/Не без лікування: ▲ – $CD44^{hi}$-клітини; □ –$CD44^{+}$ $CD24^{-}$-клітини; ■ – $CD133^{+}$-клітини (за 100% прийнято вміст $CD44^{+}CD24^{-}$, $CD133^{+}$-клітин у мишей лінії СВА; вміст $CD44^{hi}$-клітин представлено відсотком від загальної кількості клітин у суспензії (у мишей лінії СВА вони відсутні); * – вірогідно значущі розходження порівняно з контролем, $p < 0{,}005$).

Fig. 2. Content of CSCs in MG and tumor (T) in C3H/He mice without treatment: ▲ – $CD44^{hi}$-cells; □ – $CD44^{+}CD24^{-}$ cells; ■ – $CD133^{+}$ cells (content of $CD44^{+}CD24^{-}$, $CD133^{+}$ cells in CBA mice is assumed as 100%; content of $CD44^{hi}$ cells is presented as percentage from total number of cells in suspension (there are no cells in CBA mice); * – statistically significant differences compared with the control, $p < 0.005$).

МЗ і пухлині у тварин групи 2 свідчать про неоднозначний вплив цієї субпопуляції на розвиток пухлини. Це погоджується з даними R. Pallini та співавт., які засвідчили гетерогенність у $CD133^{+}$-субпопуляції клітин, частина з яких може виявляти антиканцерогенний ефект, гальмуючи ріст пухлини [34]. При дослідженні вмісту СРК у тварин групи 3 було показано, що відносна кількість клітин $CD44^{+}$ $CD24^{-}$ у МЗ знижувалася в порівнянні з групою 2, а з групою 1 значущих розходжень не виявлено. У той же час кількість $CD133^{+}$-клітин залишалася на рівні значень групи 2, а вміст $CD44^{hi}$-клітин був вірогідно нижче, ніж у групах 1 і 2. Це може бути наслідком накопичення ТФР-β, який здатний сприяти відщепленню з поверхні пухлинних клітин CD44 молекули [31].

У мишей груп 2 і 3 у пухлині відзначено вірогідно нижчий вміст клітин із фенотипом $CD44^{+}CD24^{-}$, $CD133^{+}$, ніж у МЗ. При цьому вірогідної кореляції між розміром пухлини і вмістом цих клітин не виявлено. Відносна кількість найбільш канцерогенних $CD44^{hi}$-клітин у пухлині збільшувалася по мірі її росту і була в 3 рази вищою у мишей групи 3 порівняно з групою 2. Це може бути пов'язано зі збільшенням вмісту індукованого гіпоксією фактора (HIF-1) в тканинах. Цей фактор є потужним індуктором самопідтримки й проліферативної активності СРК [36].

Клітини фетальної печінки можуть бути продуцентами широкого спектра біологічно активних сполук із імуномодулюючою і протипухлинною активністю. Продемонстрована здатність КФП знижувати частоту розвитку РМЗ у мишей лінії С3Н/Не [3, 4]. Одним із механізмів протипухлинного ефекту можуть бути імуномодулюючі властивості КФП. Дійсно, після превентивного введення

$CD44^{hi}$ cells remained at the level of the Group 1. Probably such a redistribution may be associated with modification of the spectrum of growth factors which are able to produce tumor cells. It has been known that epidermal and insulin-like growth factors can induce the expression of CD4 gene in cells, and therefore lead to increasing the content of $CD44^{+}$ $CD24^{-}$ cells [10, 26]. At the same time the increasing of $CD133^{+}$ cells number in MG of mice of the Group 1 and their reduction in MG and tumor in the animals of the Group 2 testify to a complex impact of this population on tumor development. This agrees with the data of Pallini R. *et al.*, who confirmed a heterogeneity in $CD133^{+}$ population of cells, some of which can exhibit anti-carcinogenic effect, inhibiting a tumor growth [28]. When studying the content of CSCs in the animals of the Group 3, it was shown that relative number of $CD44^{+}$ $CD24^{-}$ cells in MG decreased if compared with the Group 2 and no significant differences with the Group 1 were found. At the same time the number of $CD133^{+}$ cells remained at the level of the Group 2 values, and the content of $CD44^{hi}$ cells in MG was significantly lower than in the Groups 1 and 2. This may be a result of accumulation of TGF-β, capable to detach CD44 molecule from the surface of tumor cells [24].

In mice of the Groups 1 and 2 a significantly lower content of cells with phenotype of $CD44^{+}CD24^{-}$, $CD133^{+}$ has been revealed if compared with MG. Herewith a significant correlation between tumor size and content of these cells was not found. A relative number of the most oncogenic $CD44^{hi}$ cells in tumor increased due to its growth and was 3 times higher than in the mice of the Group 3 if compared with the Group 2. This may be due to the development of hypoxia in tumor tissue, which increases especially with rising content

КФП у тварин усіх досліджених груп, незалежно від дози біоматеріалу, зменшувалася кількість Т-рег і збільшувалася загальна кількість Т-лімфоцитів. Концентрація Т-хелперів і Т-супресорів/цитотоксичних відновлювалася до контрольних значень, про що свідчила нормалізація ІРІ. Найбільший ефект превентивного лікування спостерігався у тварин груп 5 і 6 після введення кКФП у дозі 5×10^6 і нКФП у дозі 1×10^6 кл/мишу (рис. 3). Також слід зазначити, що імуномоделюючий ефект був властивий тільки клітинам фетального походження, при застосуванні КПДТ у мишей груп 8 та 9 вірогідних розходжень із показниками групи 1 не виявляли.

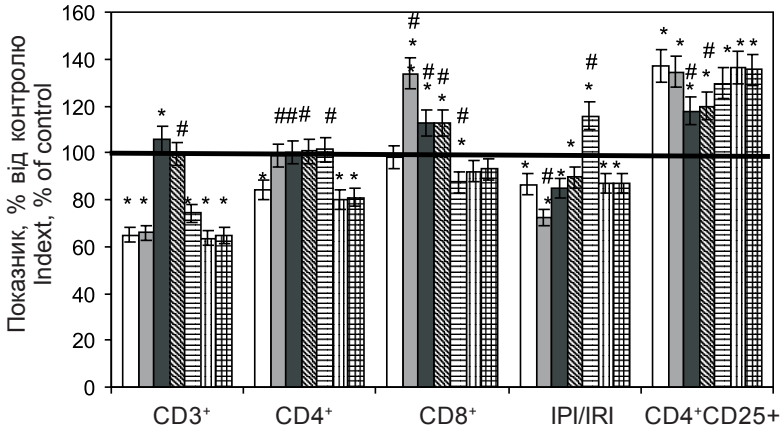

Рис. 3. Показники Т-клітинної ланки ІС у мишей лінії С3Н/Не після превентивного лікування КФП: □ – група 1; ▩ – група 4; ■ – група 5; ▨ – група 6; ⊟ – група 7; ◫ – група 8; ⊞ – група 9 (за 100% прийнято показники мишей лінії СВА; * – значущі відмінності порівняно з контролем; # – порівняно з показниками мишей групи 1, $p < 0{,}005$).

Fig. 3. Indices of T-cell link of C3H/He mice IS after preventive treatment with FLCs: □ – Group 1; ▩ – Group 4; ■ – Group 5; ▨ – Group 6; ⊟ – Group 7; ◫ – Group 8; ⊞ – Group 9 (CBA mice indices were assumed as 100%) * – statistically significant differences if compared with the control; # – if compared with the indices of mice of the Group 1, $p < 0.005$).

Після застосування КФП у МЗ 16-місячних мишей груп 5 і 6 спостерігали більш виражене зниження кількості СРК, ніж в інших групах тварин (рис. 4). Можливо, таке зниження СРК у МЗ пов'язане з продукцією КФП такої кількості α-фетопротеїну, яка зв'язує значну частину естрогенів і тим самим запобігає впливу факторів, що проявляють трансформуючу дію на клітини МЗ. Крім того, Є.І. Дудич та співавт. встановили, що α-фетопротеїн має імуномоделюючий ефект на клітини ІС й апоптозіндукуючий – на пухлинні клітини [9].

Отримані результати дослідження узгоджуються з припущенням Б.Т. Білинського і співавт. про те, що протипухлинна резистентність, яка є одним із факторів розвитку пухлини, знижується ще до клінічної маніфестації РМЗ [2]. Показано, що на початку цього процесу Т-клітинна ланка ІС реагує на появу пухлинних АГ, але потім, у відповідь на збільшення розміру пухлини, гальмується функція ІС. Доведено, що до візуального прояву РМЗ у молочній залозі з'являються $CD44^{hi}$-клітини, збільшується кількість клітин $CD44^+CD24^-$та $CD133^+$. При збільшенні розміру пухлини в ній збільшується кількість $CD44^{hi}$-клітин, а у клітинах МЗ, навпаки, вміст клітин $CD44^{hi}$ й $CD44^+CD24^-$зменшується. Отримані експериментальні результати щодо кількості СРК у МЗ і пухлині, поряд з оцінкою стану ІС у мишей із даною патологією, дають можливість діагностувати й прогнозувати розвиток РМЗ. Крім того, визначення вмісту СРК, оцінка стану ІС після проведення превентивної терапії дозволять судити про її ефективність. У наших дослідженнях встановлено, що попереднє введення тваринам кКФП у дозі 5×10^6 кл/мишу і нКФП у дозі 1×10^6 кл/мишу обумовило максимально виражений терапевтичний

factor induced by hypoxia (HIF-1), which in turn is a high power inducer of self-maintenance and proliferative activity of CSCs [31].

Fetal liver cells can be the producers of a wide range of biologically active compounds with immune modulating and anti-tumor activities. The ability of FLCs to reduce development periodicity of BC in C3H mice was demonstrated [8, 9]. Immune modulatory properties of FLCs may be one of the mechanisms of anti-tumor effect. Actually after preliminar administration of FLCs in all the studied animal groups irrespective of biomaterial dose a number of T-reg decreased and total number of T-lymphocytes increased. The concentration of T-helper cells and T-suppressor/cytotoxic restored to the control values, as evidenced by normalized IRI. The highest effect of preventive treatment was observed in the animals of the 5th and 6th groups after administration of cFLCs in a dose of 5×10^6 and for nFLCs in a dose of 1×10^6 cells/mouse (Fig. 3). It should be also noted that the immunomodulating effect was characteristic only for the cells of fetal origin, when using MALCs in mice of the Groups 8 and 9 no statistically significant differences with those of the Group 1 were revealed.

Application of FLCs resulted in more expressed reduction of CSCs number in mammary glands of 16-month-old mice of the Groups 5 and 6 if compared with other groups (Fig. 4). CSC content indices in C3H mice with the introduction of MALCs had no significant

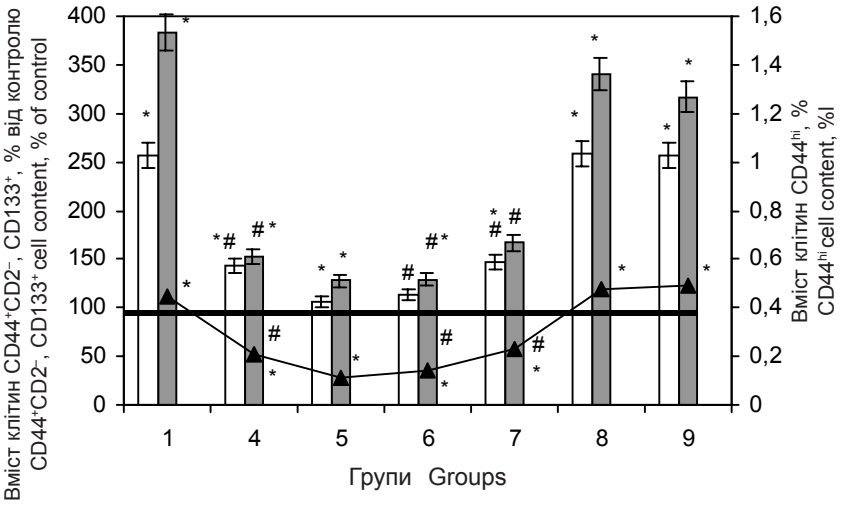

Рис. 4. Кількість СРК у МЗ мишей лінії С3Н/Не після превентивного лікування КФП: ▲ – $CD44^{hi}$-клітини; □ – $CD44^{+}CD24^{-}$-клітини, ▩ – $CD133^{+}$-клітини (за 100% прийнято вміст клітин $CD44^{+}CD24^{-}$, $CD133^{+}$ у мишей лінії СВА; вміст $CD44^{hi}$-клітин представлено відсотком від загальної кількості клітин у суспензії (у мишей лінії СВА вони відсутні); * – вірогідно значущі розходження порівняно з контролем, # – порівняно з показниками мишей групи 1, $p < 0{,}005$).

Fig. 4. Content of CSCs in MG of C3H/He mice after preventive treatment with FLCs: ▲ – $CD44^{hi}$-cells; □ – $CD44^{+}CD24^{-}$ cells; ■ – $CD133^{+}$ cells (content of $CD44^{+}CD24^{-}$, $CD133^{+}$ cells in CBA mice is assumed as 100%; content of $CD44^{hi}$ cells is pre-sented as percentage from total number of cells in suspension (there are no cells in CBA mice); * – statistically significant differences compared with the control; # – if compared with the indices of mice of the Group 1; $p < 0.005$).

та імунокоригуючий ефект, який супроводжувався зменшенням вмісту в МЗ клітин із маркерами СРК. Вочевидь, що такі особливості дії кріоконсервованих КФП можуть бути пов'язані, насамперед, зі змінами під впливом факторів заморожування-відігріву як кількісного складу КФП, так і медіатор-продукуючої активності певних її субпопуляцій. Дійсно, той факт, що кКФП, уведені в дозі 5×10^6 кл/мишу, порівнянно з нКФП виявляли більшу коригуючу активність, може свідчити про збагачення загального пула КФП після кріоконсервування клітинами, які продукують спектр медіаторів із протипухлинною дією [27].

Висновки

Таким чином, у цьому експериментальному дослідженні продемонстровано імуномодулюючий і антибластомний вплив кріоконсервованих клітин фетальної печінки, введених до візуального прояву пухлини.

1. Показано, що превентивне введення клітин фетальної печінки мишам лінії С3Н/Не сприяло відновленню Т-клітинної ланки імунної системи.

2. Визначення вмісту $CD44^{hi}$-клітин у молочній залозі до візуального прояву онкопатології може бути методом ранньої діагностики захворювання.

differences from those of untreated animals with pathology. A significant reduction of CSC number in MG of mice treated with FLCs is likely associated with production of introduced cells of such a concentration of α-fetoprotein, which binds a significant part of estrogens and thereby prevents the effect of factors exhibiting transforming effect on MG cells. Moreover, Ye.I. Dudych *et al.* established that α-fetoprotein had an immune modulating effect on IS cells and apoptosis-inducing one on tumor cells [13].

The obtained results are consistent with those reported by Bilynsky B.T. *et al.* that antitumor resistance, which is a factor of the tumor progress is reduced even prior to BC clinical manifestation [5]. It is shown that at the beginning of this process the T-cell link of IS responds to the appearance of tumor AG, but later, in response to an increasing tumor size IS function inhibits. It has been proved that prior to visual manifestation of BC in mammary gland CD44hi cells appear, the number of $CD44^{+}$ $CD24^{-}$ and $CD133^{+}$ cells increases. When tumor size increased the number of $CD44^{hi}$ cells rises in it and on the contrary the content of $CD44^{hi}$ and $CD44^{+}CD24^{-}$ cells in MG reduces. The obtained experimental data on the number of CSCs in MG and tumor along with evaluation of IS in mice with such a pathology, provide an opportunity to diagnose and predict the progression of BC. In addition, determination of CSCs content, assessment of IS status after preventive therapy enables to estimate its efficiency. In our research it was found that previous administration of cFLCs to the animals in a dose of 5×10^6 of cells/mouse and nFLCs in a dose of 1×10^6 cells/mouse stipulated the most pronounced therapeutic and immune correcting effect accompanied with the decrease of the cells with CSC markers in MG. Obviously, these peculiarities of cFLCs effect may be associated primarily with the changes under effect of freeze-thawing factors on both quantitative composition of FLCs and mediator-producing activity of certain subpopulations. Actually, the fact that cFLCs, introduced in a dose of 5×10^6 of cells/mouse compared to nFLCs revealed higher corrective activity may testify to enrichment of general pool of FLCs after cryopreservation with the cells producing a spectrum for mediators with an antitumor effect [20].

3.Експериментально обґрунтована доцільність превентивного лікування раку молочної залози введенням кріоконсервованих клітин фетальної печінки, ефект якого залежить від дози препарату. Найбільш виражений ефект отримано при використанні кріоконсервованих клітин фетальної печінки в дозі 5×10^6 кл/мишу й нативних клітин фетальної печінки в дозі 1×10^6 кл/мишу.

4. Кріоконсервування може бути модифікатором терапевтичних властивостей клітин фетальної печінки, підсилюючи їхню імуномоделюючу й антибластомну дію.

Література

1. Бендюг Г.Д., Смикодуб О.І., Гриневич Ю.Я. та ін. Вплив трансплантації клітин ембріональної печінки на деякі показники, що характеризують стан імунної системи онкологічних хворих в динаміці протипухлинного лікування // Гематологія і переливання крові. – 1998. – Вип. 29. – С. 214–220.
2. Билынский Б.Т. Володько Н.А., Шпарых Я.В. Иммунологические механизмы естественной противоопухолевой резистентности. – К.: Наук. думка, 1991. – 243 с.
3. Бондарович Н.А., Останков М.В., Сироус М.А. и др. Состояние иммунной системы мышей с генетически детерминированным развитием рака молочной железы после применения криоконсервированных клеток фетальной печени // Вестник ХНУ. Серия: Биология. – 2006. – Т. 4, №748. – С.110–120.
4. Бондарович Н.А., Сафранчук О.В., Останков М.В., Сироус М.А. Применение клеток фетальной печени для коррекции иммунной системы при развитии рака молочной железы // Зб. наук. статей «Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики». – 2009. – Т. 2. – №22. – С. 23–26.
5. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Луценко Е.Д. и др. Проявление иммунокорригирующего эффекта криоконсервированных клеток фетальной печени разных сроков гестации в условиях развития экспериментальной модельной реакции «трансплантат против хозяина» // Клеточ. трансплант. и тканев. инженерия. – 2010. – Т. 5, №3. – С. 82–86.
6. Гольцев А.Н., Попова К.Н, Сироус М.А. Криоконсервирование – фактор оптимизации терапевтического эффекта продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса (ПЭФПК): II. Коррекция состояния лимфогемопоэтического комплекса экспериментальных животных с ИГА клетками фетальной печени // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, №4. – С. 396–407.
7. Гольцев А.М., Сафранчук О.В., Бондарович М.О., Останков М.В. Зміна кріолабільності стовбурових пухлинних клітин залежно від фази росту аденокарциноми Ерліха in vivo // Фізіол. журнал. – 2011. – Т. 57, №4. – С. 68–76.
8. Гриневич Ю.А., Крановская Н.Н., Бендюг Г.Д. Влияние клеток эмбриональной печени на естественную противоопухолевую резистентность организма // Иммунология. – 2003. – №3. – С. 153–157.
9. Дудич Е.И., Семенкова Л.Н., Дудич И.В. и др. Изучение процесса апоптоза раковых клеток индуцированного α–фетопротеином // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2000. – Т. 130, №12. – С. 604–612.
10. Зозуля Ю.І., Лісяний М.І., Олійник Г.М. Визначення протипухлинної активності клітин головного мозку ембріонів // Онкологія. – 2003. – Т. 5, №2. – С.126–127.

Conclusions

Thus this experimental study demonstrated the immune modulating and antineoplastic effects of cryopreserved fetal liver cells introduced prior to a visual manifestation of tumor.

1. Preventive treatment of C3H mice by introduction of fetal liver cells was shown to contributed into restoration of T-cell link of immune system.

2. Determination of $CD44^{hi}$ cells in mammary gland prior to visual manifestation of cancer may be a method for early diagnosis of the disease.

3. There was experimentally established the expediency of preventive treatment of breast cancer by the introduction of cryopreserved fetal liver cells, the effect of which depended on preparation dose. The most pronounced effect was obtained using cryopreserved fetal liver cells in a dose of 5×10^6 of cells/mouse and native fetal liver cells in a dose of 1×10^6 of cells/mouse.

4. Cryopreservation can be a modifier of therapeutic properties of fetal liver cells, increasing their immune modulating and antineoplastic effect.

References

1. Aldahmash A., Atteya M., Elsafadi M. et al. Teratoma formation in immunocompetent mice after syngeneic and allogeneic implantation of germline capable mouse embryonic stem cells. Asian Pac. J Cancer Prev 2013; 14(10): 5705–5711.
2. Bendyug G.D., Smykodub O.I., Grynevych Yu.A. et al. Effect of fetal liver cells' transplantation on some indices characterizing immune system of cancer patients in dynamic of anticancer treatment. Gematologiya i perelyvannya krovi 1998 (8): 214–220.
3. Berry M.N., Friend D.S. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. J Cell Biol 1969; 43(3): 506–520.
4. Bhattacharya N., Mukherjee K.L., Chettri M.K. et al. Unique experience with human pre-immune (12 weeks) and hypoimmune (16 weeks) fetal thymus transplant in a vascular subcutaneous axillary fold in patients with advanced cancer: a report of two cases. Eur J Gynaecol Oncol 2001; 22(4): 273–277.
5. Bilyns'kyi B.T., Volod'ko N.A., Shparykh Ya.V. Immunological mechanisms of natural antitumor resistance. Kyiv: Naukova Dumka; 1991.
6. Bilyns'kyi B.T., Lohins'kyi V.O., Savchyk O.B., Oshchebs'kyi O.T. The use of cryopreserved hemopoietic cells of the human embryonic liver in stable depressions of hematopoiesis in cancer patients. Lik Sprava; 1996. (10–12): 77–79.
7. Bittner J.J. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. Science 1936; 84(2172): 162.
8. Bondarovich N.A., Ostankov M.V., Sirous M.A. et al. State of immune system of mice with genetically determined development of breast cancer after application of cryopreserved fetal liver cells. Visnyk of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series: Biology 2006; 4(748): 110–120.
9. Bondarovich N.A., Safranchuk O.V., Ostankov M.V., Sirous M.A. Correction of the immune system using fetal liver cells in breast cancer development. Aktualni Pytannya Farmatsevtychnoi ta Medychnoi Nauky ta Praktyky 2009; 2(22): 23–26.

11.Останков М.В., Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г. и др. Применение криоконсервированных клеток фетальной печени для иммунокоррекции состояния реципиентов с РТПХ в эксперименте // Медицина сьогодні і завтра. – 2011. – №1–2. – С. 50–51.
12.Радзієвська Л.В. Покращення якості життя хворих на рак підшлункової залози шляхом трансплантації клітин ембріональної печінки // Трансплантологія. – 2003. – Т. 4, №1. – С.181–183.
13.Тарутинов В.И. Вопросы и перспективы гормонотерапии больных раком молочной железы // Онкология. – 2005. – Т. 7. – №2. – С. 1–4.
14.Тащиев Р.К., Баратели В.Т. Лечения рака молочной железы в условиях специализированных онкологических учреждений и общелечебной сети // Хірургія України. – 2010. – №3. – С. 78–81.
15.Фримель Г. Иммунологические методы. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
16.Чехун В.Ф. Противоопухолевые вакцины // Онкология. – 2008. – Т. 10, №2. – С. 204–205.
17.Ямпольская Е.Е., Гольцев А.Н. Модуляция состояния моноцитарно–фагоцитарной системы животных с аутоиммунной патологией клетками фетальной печени // Патологія. – 2011. – Т. 8, №2. – С. 105–107.
18.Ямпольська К.Є., Кравченко М.О., Дубрава Т.Г., Гольцев А.М. Вплив кріоконсервованих клітин фетальної печінки на активність імунозапального процесу у тварин з ревматоїдним артритом // Вісник ХНУ. Серія: Біологія. – 2012. – Т. 15, №1008. – С. 177–186.
19.Aldahmash A., Atteya M., Elsafadi M. et al. Teratoma formation in immunocompetent mice after syngeneic and allogeneic implantation of germline capable mouse embryonic stem cells // Asian Pac. J. Cancer Prev. – 2013. – Vol. 14, №10. – P. 5705–5711.
20.Berry M.N., Friend D.S. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study // J. Cell. Biol. – 1969. – Vol. 43, №3. – P. 506–520.
21.Bhattacharya N., Mukherjee K.L., Chettri M.K. et al. Unique experience with human pre-immune (12 weeks) and hypoimmune (16 weeks) fetal thymus transplant in a vascular subcutaneous axillary fold in patients with advanced cancer: a report of two cases // Eur. J. Gynaecol. Oncol. – 2001. – Vol. 22, №4. – P. 273–277.
22.Bilyns'kyi B.T., Lohins'kyi V.O., Savchyk O.B., Oshchebs'kyi O.T. The use of cryopreserved hemopoietic cells of the human embryonic liver in stable depressions of hematopoiesis in cancer patients // Lik Sprava. – 1996. – №10–12. – P. 77–79.
23.Bittner J.J. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice // Science. – 1936. – Vol. 84, №2172. – P. 162.
24.Chang W.W., Lin R.J., Yu J. et al. The expression and significance of insulin-like growth factor-1 receptor and its pathway on breast cancer stem/progenitors // Breast Cancer Res. – 2013. – Vol.15, №3. – P. R39.
25. Dong W., Qiu C., Shen H. et al. Antitumor effect of embryonic stem cells in a non-small cell lung cancer model: antitumor factors and immune responses // Int. J. Med. Sci. – 2013. – Vol. 10, №10. – P. 1314–1320.
26. Giraudi P.J., Almada L.L., Mamprin M.E. et al. The assessment of viability in isolated rat hepatocytes subjected to cold or subzero non–freezing preservation protocols using a propidium iodide modified test // CryoLetters. – 2005. – Vol. 26, №3. – P. 169–184.
27. Gonzburg W.H., Salmons B. Factors controlling the expression of mouse mammary tumour virus // Biochem. J. – 1992. – Vol. 283. – P. 625–632.
28.Goltsev A.N. Bondarovich N.A., Safranchuk O.V., Ostankov M.V. Modifying effect of cryopreservation on anti-tumor activity of FLCs // Proceedings of the SLTB Symposium 'Application of cryopreservation from human tissue engineering
10. Chang W.W., Lin R.J., Yu J. et al. The expression and significance of insulin-like growth factor-1 receptor and its pathway on breast cancer stem/progenitors. Breast Cancer Res 2013; 15(3): R39.
11.Chekhun V.F. Antitumor vaccines. Onkologiya 2008; 10(2): 204–205.
12. Dong W., Qiu C., Shen H. et al. Antitumor effect of embryonic stem cells in a non-small cell lung cancer model: antitumor factors and immune responses. Int J Med Sci 2013; 10(10): 1314–1320.
13.Dudich E.I., Semenkova L.N., Dudich I.V. et al. Alpha-fetoprotein-induced apoptosis of cancer cells. Bull Exp Biol Med 2000; 130(12): 1127–1133.
14. Frimel G. Immunological methods. Moscow: Meditsina; 1987: 472 p.
15. Giraudi P.J., Almada L.L., Mamprin M.E. et al. The assessment of viability in isolated rat hepatocytes subjected to cold or subzero non-freezing preservation protocols using a propidium iodide modified test. Cryo Letters 2005; 26(3): 169–184.
16.Goltsev A.N. Bondarovich N.A., Safranchuk O.V., Ostankov M.V. Modifying effect of cryopreservation on anti-tumor activity of FLCs: Proceedings of the conference 'Application of cryopreservation from human tissue engineering to plant genebank integration'; 2009 Sep7–9; Hanover; 2009. p. 39.
17. Goltsev A.N., Dubrava T.G., Lutsenko E.D. et al. Manifestation of immune correcting effect of cryopreserved cells of fetal liver of different gestation terms under development conditions of experimental model of graft versus host reaction. Kletochnaya Transplantologia i Tkanevaya Inzheneriya 2010; 5(3): 82–86.
18. Goltsev A.N., Popova K.N., Sirous M.A. Cryopreservation as optimizing factor in therapeutic effect of products of embryo-fetoplacental complex (PEFPC) Part II. Fetal liver cell correction of lymphohemopoietic complex state in experimental animals with AIHA. Problems of Cryobiology 2006; 16(4): 396–407.
19.Goltsev A.N., Safranchuk O.V., Bondarovich N.A., Ostankov M.V. Change in cryolability of cancer stem cells during in vivo culture of Ehrlich adenocarcinoma. Fiziol Zh 2011; 57(4): 68–76.
20.Gonzburg W.H., Salmons B. Factors controlling the expression of mouse mammary tumour virus. Biochem J 1992; 283: 625–632.
21.Gordeeva O.F., Nikonova T.M. Development of experimental tumors formed by mouse and human embryonic stem and teratocarcinoma cells after subcutaneous and intraperitoneal transplantations into immunodeficient and immunocompetent mice. Cell Transplant 2013; 22(10): 1901–1914.
22.Grinevich Yu.A., Khranovskaya N.N., Bendyug G.D. The influence of embryonic liver cells on natural anti-tumor organism resistence. Immunologiya 2003; (3): 153–157.
23.Huang J., Li C., Wang Y. et al. Cytokine-induced killer (CIK) cells bound with anti-CD3/anti-CD133 bispecific antibodies target CD133 (high) cancer stem cells in vitro and in vivo. Clin Immunol 2013; 149(1): 156–168.
24. Kuo Y.C., Su C.H., Liu C.Y. et al. Transforming growth factor-beta induces CD44 cleavage that promotes migration of MDA-MB-435s cells through the up-regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase. Int J Cancer 2009; 124(11): 2568–2576.
25. Lal A., Chan L., Devries S. et al. FOXP3-positive regulatory T lymphocytes and epithelial FOXP3 expression in synchronous normal, ductal carcinoma in situ, and invasive cancer of the breast. Breast Cancer Res Treat 2013; 139(2): 381–390.
26. Monaghan M., Mulligan K.A., Gillespie H. et al. Epidermal growth factor up-regulates CD44-dependent astrocytoma invasion in vitro. J Pathol 2000; 192(4): 519–525.
27.Ostankov M.V., Goltsev A.N., Dubrava T.G. et al. Application of cryopreserved fetal liver cells for correction of immune status of recipients with GVHD in experiment. Medytsyna Syogodni i Zavtra 2011; (1–2): 50–51.
28. Pallini R., Ricci-Vitiani L., Montano N. et al. Expression of the stem cell marker CD133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis. Cancer 2011; 117(1): 162–174.

to plant genebank integration', 7–9 sept. 2009. – Hannover, 2009. – P. 39.
29. Gordeeva O.F., Nikonova T.M. Development of experimental tumors formed by mouse and human embryonic stem and teratocarcinoma cells after subcutaneous and intraperitoneal transplantations into immunodeficient and immunocompetent mice // Cell. Transplant. – 2013. – Vol. 22, №10. – P. 1901–1914.
30. Huang J., Li C., Wang Y. et al. Cytokine-induced killer (CIK) cells bound with anti-CD3/anti-CD133 bispecific antibodies target CD133 (high) cancer stem cells in vitro and in vivo // Clin. Immunol. – 2013. – Vol. 149, №1. – P.156–168.
31. Kuo Y.C., Su C.H., Liu C.Y. et al. Transforming growth factor-beta induces CD44 cleavage that promotes migration of MDA-MB-435s cells through the up-regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase // Int. J. Cancer. – 2009. – Vol. 124, №11. – P. 2568–2576.
32. Lal A., Chan L., Devries S. et al. FOXP3-positive regulatory T lymphocytes and epithelial FOXP3 expression in synchronous normal, ductal carcinoma in situ, and invasive cancer of the breast // Breast Cancer Res. Treat. – 2013. – Vol. 139, №2. – P. 381–390.
33. Monaghan M., Mulligan K.A., Gillespie H. et al. Epidermal growth factor up-regulates CD44-dependent astrocytoma invasion in vitro // J. Pathol. – 2000. – Vol. 192, №4. – P. 519–525.
34. Pallini R., Ricci-Vitiani L., Montano N. et al. Expression of the stem cell marker CD133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis // Cancer. – 2011. – Vol. 117, №1. – P.162–174.
35. Pegram M.D. Treating the HER2 pathway in early and advanced breast cancer // Hematol. Oncol. Clin. North. Am. – 2013. – Vol. 27, №4. – P. 751–765.
36. Soeda A., Park M., Lee D. et al. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha // Oncogene. – 2009. – Vol. 28, №45. – P. 3949–3959.
37. Todaro M., D'Asaro M., Caccamo N. et al. Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes // J. Immunol. – 2009. – Vol.182, №11. – P. 7287–7296.
38. Velasco-Velázquez M.A., Homsi N., De La Fuente M., Pestell R.G. Breast cancer stem cells // Int. J. Biochem. Cell. Biol. – 2012. – Vol. 44, №4 – P. 573–577.
39. Zeilstra J., Joosten S.P.J., Dokter M. et al. Deletion of the WNT target and cancer stem cell marker CD44 in Apc(Min/+) mice attenuates intestinal tumorigenesis // Cancer Res. – 2008. – Vol. 68, №10. – P. 3655–3661.
40. Zhong Z., Kusznieruk K.P., Popov I.A. et al. Induction of antitumor immunity through xenoplacental immunization // J. Transl. Med. – 2006. – Vol. 4. – P. 22–26.

29. Pegram M.D. Treating the HER2 pathway in early and advanced breast cancer. Hematol Oncol Clin North Am 2013; 27(4): 751–765.
30. Radziyevska L.V. Improving of life quality of pancreatic cancer patient by transplantation of embryonic liver cells. Transplantologiya 2003; 4(1): 181–183.
31. Soeda A., Park M., Lee D. et al. Hypoxia promotes expansion of the CD133–positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. Oncogene 2009; 28(45): 3949–3959.
32. Tarutinov V.I. Questions and prospects of hormone therapy of breast cancer patients. Onkologiya 2005; 7(2): 1–4.
33. Tashiev R.K., Barateli V.T. Treatment of breast cancer in condition of specialized oncological medical departments and general health care network. Khir Ukrain 2010; (3): 78–81.
34. Todaro M., D'Asaro M., Caccamo N. et al. Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes. J Immunol 2009; 182(11): 7287–7296.
35. Velasco-Velazquez M.A., Homsi N., De La Fuente M., Pestell R.G. Breast cancer stem cells. Int J Biochem Cell Biol 2012; 44(4): 573–577.
36. Yampolskaya Ye.Ye., Goltsev A.N. Modulation of state of monocyte-phagocyte system cells in animals with autoimmune pathology by fetal liver cells. Patologiya 2011; 8(2): 105–107.
37. Yampolskaya Ye.Ye., Kravchenko M.A., Dubrava T.G., Goltsev A.N. Influence of cryopreserved fetal liver cells on immunoinflammatory process activity in rheumatic arthritis animals. Bulletin of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series: Biology 2012; 15(1008): 177–186.
38. Zeilstra J., Joosten S.P.J., Dokter M. et al. Deletion of the WNT target and cancer stem cell marker CD44 in Apc(Min/+) mice attenuates intestinal tumorigenesis. Cancer Res 2008; 68(10): 3655–3661.
39. Zhong Z., Kusznieruk K.P., Popov I.A. et al. Induction of antitumor immunity through xenoplacental immunization. J Transl Med 2006; 4: 22–26.
40. Zozulya Yu.I., Lisyanyy M.I., Oliynik G.M. Determination of antitumor activity of embryonic brain cells. Onkologiya; 5(2): 126–127.