

PACS numbers: 87.15.-v, 87.19.xj, 87.64.-t, 87.80.-y, 87.85.Rs

Способность наночастиц на основе ортованадатов к идентификации *in vitro* и инактивации *in vivo* стволовых раковых клеток

А. Н. Гольцев, Н. Н. Бабенко, Ю. А. Гаевская, Н. А. Бондарович,
М. В. Останков, О. В. Челомбитько, Т. Г. Дубрава, В. К. Клочков*,
Н. С. Кавок*, Ю. В. Малюкин*

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
ул. Переяславская, 23,
61015 Харьков, Украина*

**Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины,
просп. Ленина, 60,
61001 Харьков, Украина*

Выполнена оценка способности наночастиц на основе ортованадатов редкоземельных металлов связываться и идентифицировать стволовые раковые клетки в экспериментальной модели аденокарциномы Эрлиха методами люминесцентной микроскопии и спектроскопии. Показано, что синтезированные наночастицы разной формы и размера (сферические, веретеноподобные и стержнеподобные) обладали различным потенциалом связывания с опухолевыми клетками-предшественниками *in vitro*. Установлено, что наночастицы только сферической и веретеноподобной форм могут идентифицировать опухолевые клетки, как в общем пуле, так и в выделенной CD44⁺-фракции. Показана способность всех видов наночастиц к торможению роста опухоли *in vivo*, причём, веретеноподобные наночастицы в концентрации 0,87 г/л максимально ингибировали развитие опухолевого процесса.

Виконано оцінку здатності наночастинок на основі ортованадатів рідкоземельних металів зв'язуватися та ідентифікувати стовбурові ракові клітини в експериментальній моделі Ерліхової аденокарциноми методами люмінесцентної мікроскопії та спектроскопії. Показано, що синтезовані наночастинок різної форми і розміру (сферичні, веретеноподібні та стрижнеподібні) відзначаються різним потенціалом зв'язування з пухлинними клітинами-попередниками *in vitro*. Встановлено, що наночастинок тільки сферичної і веретеноподібної форми можуть ідентифікувати пухлинні клітини, як у загальному пулі, так і у виділеній CD44⁺-фракції. Показано здатність всіх видів наночастинок до гальмування росту пухлини *in vivo*,

причому, веретеноподібні наночастинки в концентрації 0,87 г/л максимально інгібували розвиток пухлинного процесу.

The ability of orthovanadate-based nanoparticles of rare-earth metals to bind and identify the cancer stem cells in experimental model of the Ehrlich carcinoma by luminescent microscopy and spectroscopy is estimated. As shown, the synthesized nanoparticles of different size and shape (spherical, spindle-like and rod-shaped) have various potentials to be bound with tumour progenitor cells *in vitro*. As established, only nanoparticles of spherical and spindle-like shapes can identify tumour cells in both total pool and isolated CD44⁺ fraction. The ability of all types of nanoparticles to inhibit the tumour growth *in vivo* is shown, at that the spindle-like nanoparticles in the concentration of 0.87 g/l have maximal potential to inhibit the development of tumour process.

Ключевые слова: наночастицы, ортованадаты, стволовые раковые клетки.

(Получено 19 ноября 2013 г.)

1. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время онкологические заболевания занимают одно из ведущих мест среди всех заболеваний человека. Доказано, что неоплазии любой этиологии, в частности рака молочной железы, обусловлены существованием немногочисленной популяции стволовых раковых клеток (СРК) с фенотипом CD44^{high}CD24^{-/low}, которые способны к неограниченному самоподдержанию и представляют собой высшую ступень в иерархической лестнице их дифференцировки [1, 2]. Субпопуляция CD44⁺/CD24⁺-клеток, также как и CD44^{high}, способна формировать в организме реципиентов опухоль, но при введении в большей концентрации. Наиболее дифференцированным клеткам с фенотипом CD44⁻/CD24⁺ такая активность не присуща [3].

СРК в большинстве своём устойчивы к традиционной терапии, что обуславливает поздние рецидивы и метастазирование опухоли. Продолжается совершенствование методов, технологий и поиск селективных препаратов идентификации, инактивации СРК и повышения эффективности лечения онкологических заболеваний. Успехи в развитии нанотехнологий свидетельствуют о возможности широкого использования наночастиц (НЧ) в диагностике и лечении различных заболеваний [4, 5]. Доступные методы синтеза и модификации НЧ делают их перспективными для биологического и медицинского использования [6, 7, 8]. Биологический эффект НЧ определяется многими как собственными физико-химическими характеристиками, так и взаимодействием с теми или иными структурами клеток [4, 9]. В некоторых работах, например, продемонстрирована связь формы НЧ с возможностью их трансмембранного

транспорта [8, 10]. При этом указывается на возможность НЧ изменять функциональную активность нормальных [11] и трансформированных клеток [4].

Использование метода фенотипической оценки клеток-предшественников разного уровня дифференцировки в опухолевом очаге даёт возможность не только идентифицировать стадии, динамику развития и инвазивность процесса, но и его чувствительность к проведению терапии, включая действие разных форм наноконструктов.

Показано, что соединения ванадия обладают противоопухолевым действием, запуская клетки в апоптоз и/или активируя опухолевосупрессирующие гены [4]. Понимание механизмов реализации противоопухолевой терапии, в частности, с использованием НЧ на основе ортованадатов в эксперименте позволит оптимизировать схемы лечения онкопатологии. Удобной моделью для проведения такого рода исследований является перевиваемая линия опухолевых клеток аденокарциномы Эрлиха [12], являющаяся аналогом рака молочной железы человека.

Исходя из этого, цель данного исследования — оценить способность флуоресцентных НЧ на основе ортованадатов к визуализации и инактивации опухолевых индуцирующих клеток в экспериментальной модели аденокарциномы Эрлиха (АКЭ).

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поскольку ранее было показано [13], что клетки асцитной формы АКЭ у самок дают значительно более выраженный прирост опухолевых клеток в сравнении с самцами, исследования проводились на 8-ми месячных самках мышей линии Balb/C. В качестве первичной культуры выступали клетки АКЭ, стабилизированные после криоконсервирования путём 3-х кратной перевивки *in vivo* [14]. Криоконсервирование клеток АКЭ осуществляли в пластиковых ампулах ('Nunc', США) без применения классических криопротекторов в асцитической жидкости [15].

Наночастицы на основе ортованадатов. В работе были использованы наночастицы на основе ортованадатов редкоземельных элементов, активированных европием в виде коллоидных растворов, синтезированных в Институте сцинтилляционных материалов НАН Украины.

Сферические НЧ (размером в 3 нм) имеют состав $Gd_{0,6-0,8}Y_{0,1-0,3}VO_4:Eu^{3+}_{(0,1)}$, веретеноподобные (5×40 нм²) — $Gd_{0,9}VO_4:Eu^{3+}_{(0,1)}$, стержнеподобные (12×250 нм²) — $La_{0,9}VO_4:Eu^{3+}_{(0,1)}$.

Инкубация клеток АКЭ с наночастицами. Известно, что концентрация НЧ ниже 0,8 г/л недостаточна для достоверной регистрации люминесценции наноломинофоров в клетках, а концентрация НЧ

выше 4,4 г/л может проявлять токсичное действие и приводить к снижению количества жизнеспособных клеток, и не только опухолевых [16]. Исходя из этого, в данной работе клетки АКЭ инкубировали 3 часа при комнатной температуре в 5% растворе глюкозы, содержащем НЧ сферической, веретеноподобной и стержнеподобной формы в двух концентрациях: 0,875 и 4,38 г/л.

Всего в работе было проверено 6 вариантов обработки клеток АКЭ наночастицами:

- 1 — АКЭ + сферические НЧ (концентрация 0,87 г/л);
- 2 — АКЭ + сферические НЧ (концентрация 4,38 г/л);
- 3 — АКЭ + веретеноподобные НЧ (концентрация 0,87 г/л);
- 4 — АКЭ + веретеноподобные НЧ (концентрация 4,38 г/л);
- 5 — АКЭ + стержнеподобные НЧ (концентрация 0,87 г/л);
- 6 — АКЭ + стержнеподобные НЧ (концентрация 4,38 г/л);
- 7 — контроль клетки АКЭ, которые инкубировали в растворе 5% глюкозы без добавления НЧ.

Также были продублированы шесть вариантов с обработкой наночастицами фракции CD44⁺-клеток, выделенной из общей популяции АКЭ.

Получение фракции CD44⁺-клеток АКЭ. Фракцию CD44⁺ выделяли из общей популяции клеток АКЭ с помощью магнитного сортера (BDTM Imagnet) с использованием первичных немеченых моноклональных антител к CD44 и вторичных Mouse IgG1 Magnetic Particles-DM ('BD Pharmingen', США) согласно протоколу производителя.

После инкубации с НЧ клетки АКЭ были трижды отмыты физиологическим раствором и протестированы *in vitro* и *in vivo*.

Визуализация клеток АКЭ *in vitro* после инкубации с НЧ. Для визуализации клеток использовался люминесцентный микроскоп Olympus IX71 с источником возбуждения - ксеноновой лампой 75 W. Для возбуждения люминесценции был использован фильтр, пропускающий 460–490 нм и фильтр для наблюдения люминесценции, пропускающий от 510 нм. Микроскоп оснащён дополнительным каналом регистрации спектров, позволяющим анализировать спектры люминесценции наблюдаемых биологических объектов. Спектры регистрировались с помощью спектрометра USB4000 (Ocean Optics, USA). Наблюдение изолированных клеток проводили при увеличении $\times 1000$ в условиях масляной иммерсии.

Оценка структурно-функциональных характеристик клеток АКЭ *in vivo* после инкубации с НЧ. После инкубации клеток АКЭ с НЧ они были введены внутрибрюшинно в дозе $3 \cdot 10^6$ клеток/мышь объёмом 0,3 мл. Клетки АКЭ культивировали на протяжении 7 суток в перитонеальной полости (ПП) мышей.

Оценку иммунофенотипических характеристик клеток АКЭ проводили на проточном цитофлуориметре FACS Calibur ('Becton

Dickinson', США). Были оценены шесть субпопуляций клеток, включая наиболее вероятных претендентов на роль СРК — $CD44^{hi}$ и $CD44^{+}24^{-}$, продвинутых в дифференцировке $CD44^{+}24^{+}$ и $CD44^{-}24^{+}$, а также клетки с маркерами стволовых кроветворных, а именно, $Sca-1^{+}$ и $CD117^{+}$. Для определения концентрации этих клеток были использованы моноклональные антитела ('BD Pharmingen', США) к $CD44$, $CD117$, $Sca-1$ (FITC), а также $CD24$ (PE). Учёт результатов осуществляли с помощью программы WinMDi 2.9.

Индекс ингибиции роста опухоли оценивали по формуле:

$$\frac{V(k) - V(o)}{V(k)} \cdot 100\%,$$

$V(k)$ и $V(o)$ — абсолютные количества клеток АКЭ в ПП контрольной и опытной групп соответственно.

Полученные экспериментальные данные статистически обрабатывали в электронных таблицах 'Microsoft Excel 2000'.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Электронно-микроскопические фотографии твёрдой фазы коллоидных растворов НЧ представлены на рис. 1. Твёрдая фаза первого раствора (рис. 1, *а*) представляет собой полидисперсную систему сферических НЧ (2 нм), второго раствора (рис. 1, *б*) — веретеноподобных НЧ (5×40 нм) и третьего раствора (рис. 1, *в*) — стержнеподобных НЧ (12×250 нм).

Методом люминесцентной микроскопии показано, что в гетерогенной популяции клеток АКЭ только сферические и веретеноподобные НЧ позволяют визуализировать небольшой процент клеток (6,2% и 0,9% соответственно), о чем свидетельствует их красно-оранжевая люминесценция (рис. 2, *а*). Возможно, что эти клетки относятся к СРК. Учитывая, что для СРК характерна экспрессия

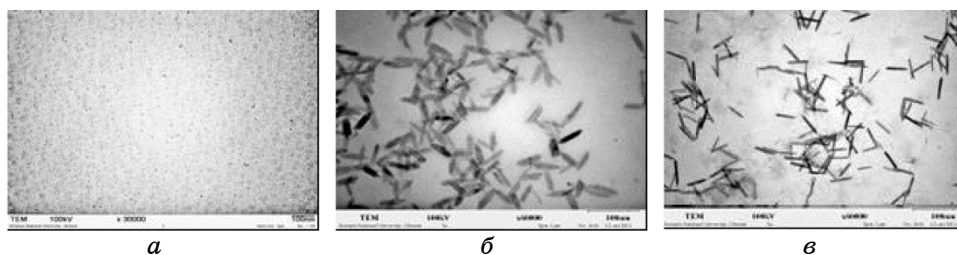


Рис. 1. Электронно-микроскопические фотографии твёрдой фазы коллоидных растворов НЧ. Примечание: *а* — сферические, *б* — веретеноподобные, *в* — стержнеподобные НЧ.

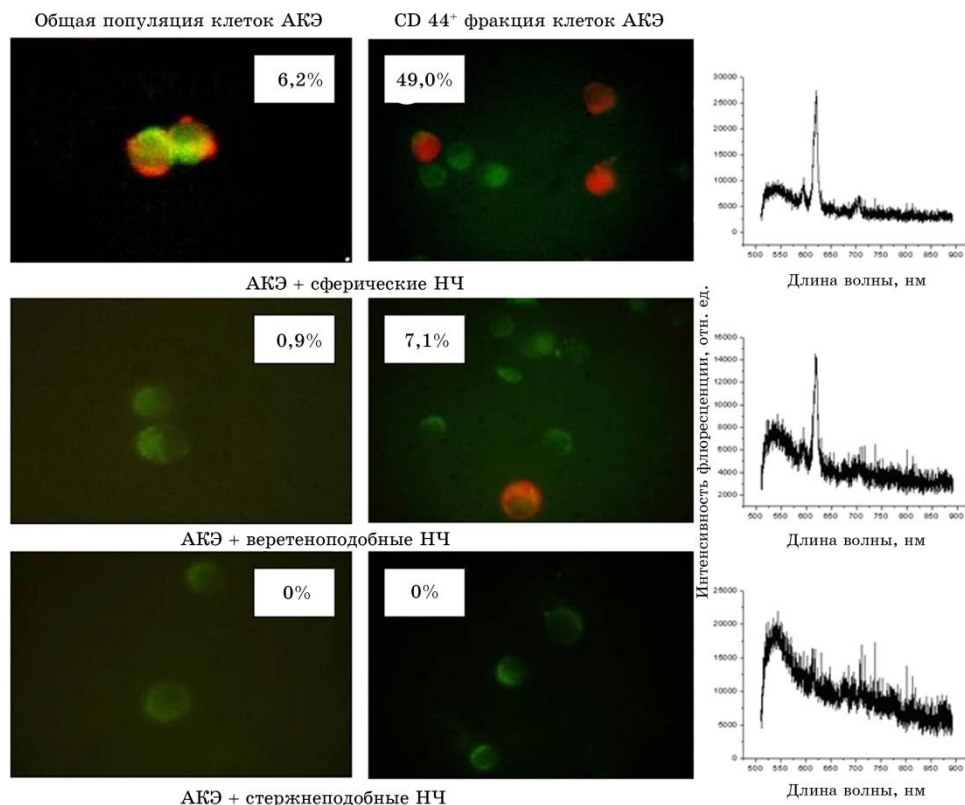


Рис. 2. Идентификация НЧ разного вида в клетках АКЭ методом люминесцентной спектрометрии (а) и визуализация аккумуляции НЧ в клетках — методом люминесцентной микроскопии (б).

CD44-маркёра, мы оценили способность НЧ визуализировать клетки-предшественники в выделенной на магнитном сортере фракции CD44⁺-клеток. Как видно из рис. 2, концентрация идентифицируемых сферическими и веретеноподобными НЧ клеток в CD44⁺-фракции повышалась в обоих случаях почти в 10 раз (49,0% и 7,1% соответственно). Это говорит в пользу предположения о селективном связывании НЧ с клетками, несущими CD44-маркёр. Проникновение сферических и веретеноподобных НЧ внутрь клеток АКЭ было подтверждено спектрометрически в виде пика флуоресценции при длине волны 619 нм (рис. 2, б).

После инкубации клеток АКЭ со стержнеподобными НЧ наблюдалась только ярко-зелёная аутофлуоресценция, свидетельствующая об отсутствии их связывания во всех вариантах оценки, что подтверждено и спектроскопически при использовании фильтра возбуждения люминесценции 460–490 нм и фильтра для наблюде-

ния люминесценции, пропускающего от 510 нм. В данном случае отсутствует пик флюоресценции НЧ на спектрограмме (рис. 2, б).

Таким образом, обнаруженная нами способность проникновения НЧ внутрь клеток в значительной мере зависит от их геометрических параметров, влияющих на трансмембранный транспорт. Данный факт позволяет предположить возможность модификации под действием НЧ функционального потенциала клеток АКЕ, что было оценено в системе *in vivo*.

При аттестации клеточного состава гетерогенного пула АКЭ было установлено, что в нем присутствуют клетки с такими фенотипическими маркерами как CD44^{hi}, CD44⁺24⁻, CD44⁺24⁺, CD44⁻24⁺, CD117⁺, Sca-1⁺. Важным является установленный нами факт присутствия среди клеток АКЭ субпопуляций с маркерами CD117⁺ и Sca-1⁺. Молекула CD117 представляет собой трансмембранный тирозинкиназный рецептор. В нормальных условиях он активируется соответствующим лигандом — фактором роста стволовых клеток (stem cell factor—SCF) [17]. В условиях онкопатологии повышенная экспрессия CD117-маркёра отмечена также при миелоидной лейкемии, мелкоклеточной карциноме лёгких, раке молочной железы [18, 19, 20, 21]. При этом происходит лигандонезависимая активация рецептора c-KIT, которая чаще всего (до 92% случаев) является следствием мутации c-kit онкогена [22], либо обусловлена нарушением механизмов регуляции функции данного рецептора [23].

Sca-1 также является маркёром стволовых клеток [24], который экспрессируется разными популяциями клеток-предшественников, включая прогениторы молочной железы [25]. Впервые он был идентифицирован на стволовых клетках костного мозга и других тканей. Показано [26], что в ткани молочной железы здоровых мышей количество Sca-1⁺ клеток не превышает 20%, в то время как у трансгенных мышей со спонтанным развитием опухоли молочной железы наблюдается увеличение их количества в 3 раза вследствие активации онкогена W_{nt} .

Предобработка клеток АКЭ наночастицами и последующее их культивирование *in vivo* приводило к выраженным изменениям процесса формирования как общего пула клеток в ПП, так и субпопуляций клеток-предшественников с разным фенотипом, отражающим уровень их дифференцировки (см. таблицу). Исключением были Sca-1⁺ клетки, концентрация которых достоверно не снижалась при всех видах обработки.

Так, сферические НЧ при малой концентрации (0,87 г/л) проявляли ингибирующий эффект в отношении наиболее канцерогенных CD44^{hi}-клеток в сравнении с контролем и большей концентрацией этих НЧ. Сферические НЧ обеих концентраций абсолютно в равной степени ингибировали формирование CD44⁺/24⁻-клеток в сравнении с контролем (более чем в 4 раза).

ТАБЛИЦА. Влияние наночастиц на фенотипические и функциональные характеристики клеток АКЭ ($M \pm m$, $n = 5$).

Показатель	Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3	Вариант 4	Вариант 5	Вариант 6	Вариант 7
	Тип наночастиц						
	Сферические		Вереленоподобные		Стержнеподобные		
	Концентрация наночастиц, г/л						
	0,87	4,38	0,87	4,38	0,87	4,38	—
CD 44 ^{hi} , %	0,05 ± 0,004*	0,09 ± 0,006*	0,47 ± 0,03*	0,06 ± 0,004*	0,07 ± 0,005*	0,035 ± 0,007*	0,14 ± 0,009
CD 44 ⁺ /24 ⁻ , %	0,75 ± 0,05*	0,69 ± 0,05*	1,45 ± 0,10*	0,52 ± 0,04*	0,50 ± 0,04*	0,26 ± 0,02*	3,38 ± 0,2
CD 44 ⁺ /24 ⁺ , %	0,62 ± 0,04*	0,87 ± 0,06*	1,19 ± 0,08*	0,33 ± 0,02*	0,49 ± 0,03*	0,28 ± 0,02*	2,17 ± 0,02
CD 44 ⁻ /24 ⁺ , %	4,97 ± 0,31	2,85 ± 0,20*	1,45 ± 0,10*	0,52 ± 0,04*	2,40 ± 0,20*	3,61 ± 0,32*	5,33 ± 0,40
CD117, %	1,02 ± 0,07*	0,32 ± 0,08*	0,38 ± 0,03*	1,07 ± 0,07*	1,68 ± 0,11*	0,20 ± 0,01*	7,81 ± 0,51
Sca-1 ⁺ , %	87,96 ± 6,21	91,3 ± 6,41	77,80 ± 5,41	92,61 ± 6,50	90,90 ± 6,42	83,12 ± 5,83	90,32 ± 6,3
Соотношение CD44 ^{hi} /CD117 ⁺ - клеток	0,05	0,28	1,24	0,056	0,04	0,175	0,017
Абс. количество клеток в ПП × 10 ⁷	38,04 ± 2,70	22,36 ± 1,60*	8,91 ± 0,60*	39,42 ± 2,81	32,58 ± 2,30*	18,00 ± 1,30	46,57 ± 3,32
Ингибция роста АКЭ, %	18,00 ± 1,32	52,00 ± 3,63	80,34 ± 5,61	15,00 ± 1,05	30,00 ± 2,10	51,00 ± 4,30	0

Примечание: * — различия статистически достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Повышение концентрации НЧ до 4,38 г/л вызывало наибольшее снижение содержания клеток с фенотипом CD117⁺. Обращает на себя внимание и факт достоверной ингибиции формирования наиболее дифференцированных CD44⁻/24⁺-клеток при использовании НЧ в концентрации 4,38 г/л (вариант 2).

При инкубации клеток АКЭ с веретенородными НЧ в концентрации 0,87 г/л (вариант 3) отмечено максимальное в сравнении со всеми опытными группами повышение количества CD44^{hi}-клеток на фоне минимального содержания CD117⁺-клеток. Повышение концентрации веретенородных НЧ до 4,38 г/л приводило к снижению содержания CD44^{hi} и остальных более дифференцированных субпопуляций АКЭ, за исключением CD117⁺-клеток. Интересно, что ингибирующее влияние данного вида НЧ в концентрации 4,38 г/л на все субпопуляции клеток-предшественников было весьма схожим с вариантом 1 (сферические НЧ в концентрации 0,87 г/л). Исключение составляет лишь субпопуляция CD44⁻/24⁺, которая была максимально ингибирована (в 10 раз в сравнении с контролем) из всех оценённых субпопуляций. Тем не менее, этот «нюанс» практически не повлиял на общее количество клеток в ПП (табл.).

Весьма интересно, что предобработка клеток АКЭ стержнеподобными НЧ также вызывала существенное снижение содержания всех субпопуляций клеток в ПП в сравнении с контролем, причём НЧ в концентрации 4,38 г/л в большей степени обладали такой активностью. Так, наиболее выраженное снижение содержания CD44^{hi} и CD117⁺, в сравнении с контролем и со всеми исследуемыми группами клеток, было отмечено при использовании стержнеподобных НЧ в концентрации 4,38 г/л (группа 6). Закономерное снижение количества более дифференцированных субпопуляций клеток АКЭ с фенотипом CD44⁺/24⁻, CD44⁺/24⁺ вызвало также значительное (в 2,5 раза) уменьшение абсолютного содержания клеток в ПП.

Таким образом, изменение субпопуляционного состава клеток АКЭ после предобработки НЧ, по-видимому, является причиной ингибиции роста опухоли, причём интенсивность такого процесса определялась как видом и концентрацией НЧ, так и кооперативными взаимодействиями клеток-предшественников АКЭ.

Наиболее значительными были результаты почти 80% ингибиции роста опухоли после обработки АКЭ веретенородными НЧ при малой их концентрации. Удивительно, но стержнеподобные наночастицы, присутствие которых на клетках ни одним из методов мы не обнаружили, изменяли не только субпопуляционный состав клеток АКЭ, но и ингибировали рост асцитной опухоли.

Значительный ингибирующий эффект роста опухоли отмечен в вариантах 2, 3 и 6, что сопровождалось повышением соотношения CD44^{hi}- к CD117⁺-клеткам в сравнении с контролем, причём верете-

ноподобные НЧ в концентрации 0, 875 г/л (вариант 3) проявляли его в максимальной степени. В данном случае точкой приложения действия веретеноподобных НЧ могли быть CD117⁺-клетки, ингибция функции которых приводила к повышению содержания CD44^{hi}-клеток за счёт блокады их дифференцировочного потенциала.

4. ВЫВОДЫ

1. Синтезированные наночастицы ортованадатов редкоземельных металлов (сферические, веретеноподобные и стержнеподобные) обладали различным потенциалом связывания с опухолевыми клетками-предшественниками *in vitro*.

2. Методами люминесцентной микроскопии и спектрометрии установлено, что только сферические и веретеноподобные наночастицы способны визуализировать СРК, хотя противоопухолевой активностью *in vivo* обладали все формы наночастиц.

Механизм реализации противоопухолевого эффекта *in vivo* зависит от формы и концентрации наночастиц, а также характера модификации опухолевых прекурсоров разной степени дифференцировки.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. M. S. Wicha, *Breast Cancer Res.*, **10**: 105 (2008).
2. H. Ghebeh, G. M. Sleiman, P. S. Manogaran, A. Al-Mazrou, E. Barhoush, F. H. Al-Mohanna, A. Tulbah, K. Al-Faqeeh, and C. N. Adra, *BMC Cancer.*, **13**: 289 (2013).
3. M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, and M. F. Clarke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, No. 7: 3983-8 (2003).
4. A. M. Evangelou, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **42**, No. 3: 249 (2002).
5. Ю. П. Мешалкин, Н. П. Братова, *Journal of Siberian Federal University Biology*, **3**: 248 (2008).
6. S. M. Moghimi, A. C. Hunter, and J. C. Murray, *Pharmacol Rev.*, **53**: 283 (2001).
7. N. G. Portney and M. Ozkan, *Anal. Bioanal. Chem.*, **384**: 620 (2006).
8. В. К. Клочков, Н. С. Кавок, Ю. В. Малюкин, В. П. Семиноженко, *Доповіди Національної академії наук України*, № 10: 81 (2010).
9. V. Mailander and K. Landfester, *Biomacromolecules*, **10**: 2379 (2009).
10. X. Chen, F. Tian, X. Zhang, and W. Wang, *Soft Matter*, **9**: 7592 (2013).
11. A. Manke, L. Wang, and Y. Rojanasakul, *Biomed. Res. Int.*, **13**: 942916 (2013).
12. Н. М. Эммануэль, *Кинетика экспериментальных опухолевых процессов* (Москва: Наука: 1977).
13. P. C. Vincent and A. Nicholls, *Cancer Res.*, **27**, No. 1: 1058 (1967).
14. А. М. Гольцев, О. В. Сафранчук, М. О. Бондарович та ін., *Доповіди Національної академії наук України*, № 8: 115 (2012).

15. А. М. Гольцев, О. В. Сафранчук, М. О. Бондарович, М. В. Останков, Н. М. Бабенко, Ю. О. Гаевська, О. В. Челомбитько, *Фізіол. журн.*, **57**, № 4: 68 (2011).
16. D. Iordachescu, D. Dinu, A. Bonoiu, G. Bucata, R. Ciubar, C. Homeghiu, C. Iancu, C. Stain, and S. Nae, *Romanian J. Biophys.*, **12**, Nos. 3–4: 69 (2002).
17. D. Kent, M. Copley, C. Benz, B. Dykstra, M. Bowie, and C. Eaves, *Clin. Cancer Res.*, **14**, No. 7: 1926 (2008).
18. H. Ikeda, Y. Kanakura, T. Tamaki, A. Kuriu, H. Kitayama, J. Ishikawa, Y. Kanayama, T. Yonezawa, S. Tarui, and J. D. Griffin, *Blood*, **78**, No. 11: 2962 (1991).
19. P. Micke, M. Basrai, A. Faldum, F. Bittinger, L. Rönstrand, A. Blaukat, K. M. Beeh, F. Oesch, B. Fischer, R. Buhl, and J. G. Hengstler, *Clin. Cancer Res.*, **1**: 188 (2003).
20. P. Ulivi, W. Zoli, L. Medri, D. Amadori, L. Saragoni, F. Barbanti, D. Calistri, and R. Silvestrini, *Breast Cancer Res. Treat.*, **83**: 33 (2004).
21. A. Talaiezhadeh, S. N. Jazayeri, and J. Nateghi, *Wspolczesna Onkol.*, **16**, No. 4: 306 (2012).
22. S. Hirota, K. Isozaki, Y. Moriyama, K. Isozaki, Y. Moriyama, K. Hashimoto, T. Nishida, S. Ishiguro, K. Kawano, M. Hanada, A. Kurata, M. Takeda, M. G. Tunio, Y. Matsuzawa, Y. Kanakura, Y. Shinomura, and Y. Kitamura, *Science*, **279**: 577 (1998).
23. Д. А. Носов, *Сборник материалов VII Российской онкологической конференции*, 11 (2003).
24. C. Holmes and W. L. Stanford, *Stem Cells*, **25**, No. 6: 1339 (2007).
25. C. Grange, S. Lanzardo, F. Cavallo, G. Camussi, and B. Bussolati, *Neoplasia*, **10**, No. 12: 1433 (2008).
26. Y. Li, B. Welm, K. Podsypanina, S. Huang, M. Chamorro, X. Zhang, T. Rowlands, M. Egeblad, P. Cowin, Z. Werb, L. K. Tan, J. M. Rosen, and H. E. Varmus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**: 15853 (2003).