

ХІРУРГІЯ, ОНКОЛОГІЯ ТА АНЕСТЕЗІОЛОГІЯ

УДК 602.9:611.018:616-006:636.028

КЛАДНИЦЬКА Л. В., канд. вет. наук*

kladlarisa@yandex.ru

МАЗУРКЕВИЧ А. Й., д-р вет. наук*

ГАРМАНЧУК Л. В., д-р біол. наук**

ВЕЛИЧКО С. В., канд. біол. наук****

МАЛЮК М. О., д-р вет. наук*

КОЗИЦЬКА Т. В., канд. біол. наук****

ДАНІЛОВ В. Б., КОВПАК В. В., ХАРКЕВИЧ Ю. О.,

КОСТЮК А. В., кандидати вет. наук*

ДЖУС О. І., ШЕЛЕСТ Д. В., здобувачі**

* Національний університет біоресурсів і природокористування України

** Національний університет імені Тараса Шевченка

*** Київський Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

**** Лікарня ветеринарної медицини, м. Київ

МОРФОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ ПЕРВИННОЇ ПУХЛИНИ МИШЕЙ C57BL/6 З ТРАНСПЛАНТОВАНОЮ МЕТАСТАТИЧНОЮ КАРЦИНОМОЮ ЛЕГЕНЬ ЛЬЮІС ЗА ВПЛИВУ АЛОГЕННИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

Досліджено морфологічні зміни первинної пухлини мишей C57BL/6 з перещепленою метастатичною карциномою легень Льюїс за впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин. Досліди проводили на самцях мишей C57BL/6 2–3-місячного віку, вагою 20–22 г. Алогенні мезенхімальні стовбурові клітини отримували культивуванням первинного матеріалу, що був виділений з кісткового мозку мишей C57BL/6. Культивування клітин проводили за 37 °C, 100 % вологості і 5 % CO₂ у середовищі DMEM із додаванням 20 % фетальної сироватки телят та 1 % антибіотика-антимікотика. Мишам внутрішньом'язово інюкулювали клітинну суспензію метастатичної карциноми легень Льюїс (LLC) у концентрації $1 \times 10^6/0,1$ мл розчину Хенкса. На 18-ту та 24-ту добу дослідів визначали морфологічні зміни первинної пухлини. На 18-ту добу досліджень за впливу МСК у первинній пухлинній тканині було зареєстровано у 1,3 рази більш високу щільність судин на одиницю площі, ніж у групах тварин без впливу МСК. В судинах реєстрували гемостаз за типом складу еритроцитів. На 24-ту добу в зразках за впливу МСК реєстрували значно дистрофізовані клітини пухлини, а поміж них лімфоцити, які створювали осередки девіталізації пухлинної тканини. Зареєстровано багато ділянок некрозу, оточених дегенеративно зміненими пухлинними клітинами. На 24-ту добу дослідження за впливу алогенних МСК реєстрували вищі показники площі девіталізації та некротизації пухлинної тканини з редукцією судинного русла.

Ключові слова: алогенні мезенхімальні стовбурові клітини, карцинома легень Льюїс, морфологічні показники, первинна пухлина, миші.

Постановка проблеми. МСК володіють природженим тропізмом до осередків запалення. Ефекти впливу МСК переважно пов'язані з безліччю біоактивних молекул, які вони синтезують і виділяють в навколишнє середовище. Відомо, що пухлина виділяє у мікрооточення фактори, подібні до тих, які утворюються при запальних реакціях, що є пусковим механізмом для міграції МСК в пухлинну тканину [1–3]. Як впливають МСК на морфологічні зміни первинної пухлини дотепер остаточно не з'ясовано, проте є багато суперечливих даних літератури [4–7].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. В експериментах на тваринах було виявлено, що застосування ксеногенних МСК, отриманих з жирової тканини людини, у щурів з експериментальною моделлю карциноми Герена привело до значного збільшення відсотка виживаності, а на 21-у добу експерименту було відмічено інгібування росту пухлини на 40 % [8]. Дані інших дослідників засвідчують, що алогенні МСК ефективно інгібують ріст саркоми

Капоші в людини [9]. Проведено ряд досліджень щодо впливу МСК на ангиогенез. Зокрема, визначено що МСК секретують ангиогенні чинники, фактори росту, цитокіни, які впливають на ендотеліальні клітини *in vitro* й індукують ангиогенез *in vivo* [10]. У деяких моделях пухлин уведення МСК зумовило проангіогенний ефект [11] і збільшення росту пухлини [12]. На противагу цьому, в іншій моделі пухлин, МСК інгібували ангиогенез [13]. Як ми бачимо, вплив МСК на мікросередовище самої пухлини, а також на біологічні властивості пухлинної тканини є складним процесом, остаточно не з'ясованим, і тому актуальність цього питання не викликає сумніву.

Мета дослідження – дослідити морфологічні зміни первинної пухлини мишей C57BL/6 з перещепленою метастатичною карциномою легень Льюїс за впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження проведені в умовах проблемної наукової лабораторії фізіології та експериментальної патології тварин, кафедри фізіології, патофізіології та імунології тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Дослідження проводили на самцях мишей C57BL/6 вагою 20–22 г віком 2–3 місяці. Усі дослідження на тваринах були проведені відповідно до Правил належної лабораторної практики щодо використання експериментальних тварин [14] та з дотриманням закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.) і принципів «Міжнародної Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986).

У якості моделі використали епідерміїдну метастатичну карциному легень Льюїс (LLC) [15]. Клітини LLC культивували за стандартних умов у середовищі DMEM із додаванням 10 % фетальної сироватки телят (FBS) та 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma, USA) за 37 °C, 100 % вологості і 5 % CO₂. Самцям мишей C57BL/6 2–3-місячного віку, вагою 20–22 г внутрішньом'язово інюкулювали клітинну суспензію метастатичної карциноми легень Льюїс у концентрації 1x10⁶/0,1 мл розчину Хенкса. Після інюкації пухлинних клітин миші були розділені на групи. У першу групу входили миші з трансплантованою карциномою легень Льюїс, у другу – миші-пухлиноносії, яким на 8-й день після інюкації пухлинних клітин вводили внутрішньовенно алогенні МСК 4-го пасажу в кількості 1,25x10⁴. У третю групу були об'єднані тварини-пухлиноносії, яким вводили 0,9 % NaCl.

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

На 18-ту та 24-ту добу досліду визначали патоморфологічні зміни у м'язовій тканині мишей з перещепленою карциномою легень Льюїс (LLC) за впливу алогенних МСК. З цією метою виготовляли гістологічні препарати. Для цього відбір матеріалу проводили одразу після евтаназії тварин дослідних груп. Відбір пухлинної тканини проводили з центральної, периферичної ділянок пухлини та на межі з неураженою м'язовою тканиною. Відібраний матеріал подрібнювали на шматочки розміром 3–4 мм³, фіксували, заливали у парафін, виготовляли зрізи за допомогою санного мікротома MC-2. Товщина зрізів сягала 5–9 мкм. Отримані зрізи наносили на підготовлені предметні стекла (вимиті, знежирені та оброблені сумішшю білка курячого яйця з гліцерином) із застосуванням дистильованої води t=37–40 °C для розправлення. Предметні стекла зі зрізами витримували на столику для підсушування зразків упродовж 24–36 годин. Фарбування зрізів проводили гематоксиліном і еозином та за Ван Гізон [17]. Фарбовані зрізи досліджували за допомогою світлооптичного мікроскопа Olympus, Lomo.

Основні результати досліджень. У мишей з трансплантованою карциномою легень Льюїс, починаючи з 8-ої доби, відмічено значний ріст первинної пухлини. На 18-ту добу дослідження на гістозрізах зафіксовано проникнення пухлинних клітин між міофібрилами (рис. 1).

У цей період з'являлись новоутворені судини щілиноподібної форми здебільшого капілярного типу, а також із потовщеними стінками. Водночас реєстрували осередкові некрози внаслідок відсутності новоутворених капілярів центральних ділянок (рис. 2).

У ділянках біля осередків некрозу судини були колаптоїдно розширені, тонкостінні і містили нитки фібрину. Судинні стінки були деструктуровані (рис. 3).

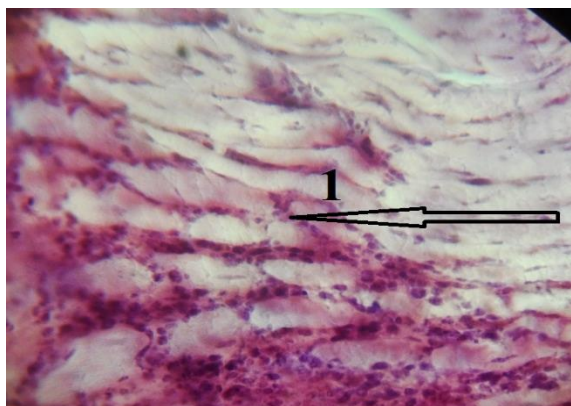


Рис. 1. Проникнення пухлинних клітин між міофібрилами, фарбування гематоксиліном і еозином, мікрофото, х 400.

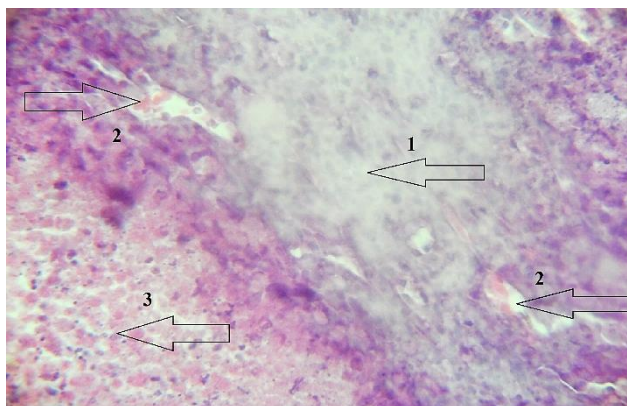


Рис. 2. Поширена площа некротизації (1), судини щілинноподібної форми (2), крововиливи (3), фарбування гематоксиліном і еозином, мікрофото, х 400.

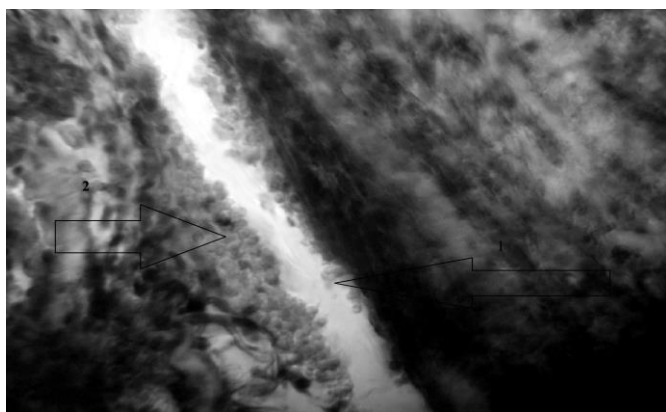


Рис. 3. Роширення судини (1) із явищем складжування еритроцитів (2), ділянка кровоплину, що оточується пухлинними клітинами (2), фарбування гематоксиліном і еозином, мікрофото, х 400.

На рисунках 4, 5 ми реєструємо інфільтрацію пухлинної тканини клітинами крові, загибель пухлинних клітин, судини із стазом та осередки некрозу. В ділянках дезорганізації пухлинної паренхіми все ще спостерігалась фіброзна і ангіобластна активність. Судини були капілярного типу.

На 24-ту добу виникали поширені площі некротизації з редукцією судинної сітки. Судини були розширені і повнокровні, що є ознакою стазу в них, а також злипання (складжування) еритроцитів (рис. 6, 7). Часто оточенням для кровоплину були клітини самої пухлини.

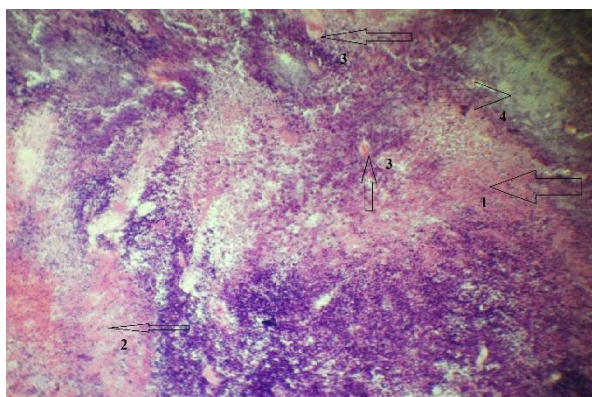


Рис. 4. Ділянки крововиливів (1, 2), судини із стазом (3), осередки некрозу (4), забарвлення гематоксиліном і еозином, мікрофото, х 100.

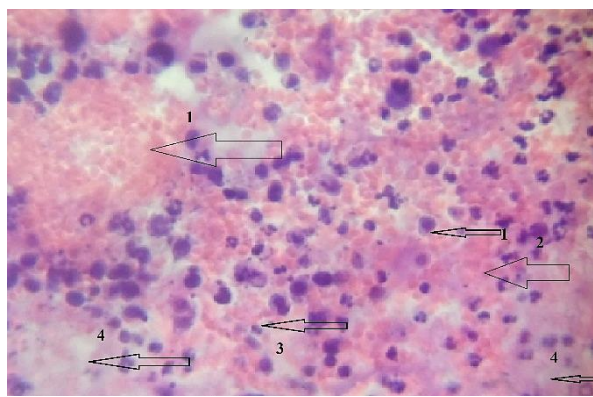


Рис. 5. Інфільтрація клітинами крові (1), імунними клітинами (1), загибель пухлинних клітин (3) та ділянками масивного некрозу (2, 4) в тканині пухлини, фарбування гематоксиліном і еозином, мікрофото, х 400.

Паренхіма пухлини характеризувалась клітинним поліморфізмом з дистрофічними та некротичними змінами, фігурами мітозів. Збережені пухлинні клітини були з ознаками проліферативної активності (збережене ядро, ядерце, багато хроматину) (рис. 8).



Рис. 6. Судини із явищами стази (1), ділянки девіталізації (3), некротизації тканини (2), фарбування гематоксилином і еозином, мікрофото, х 100.

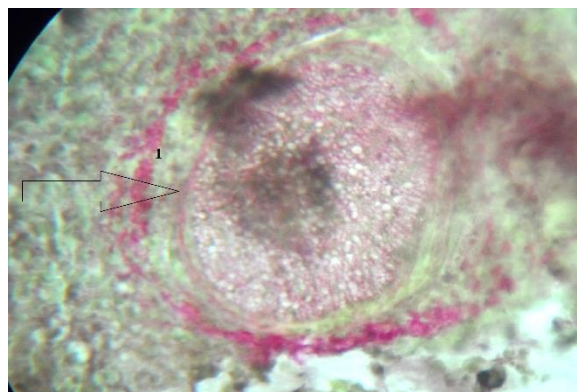


Рис. 7. Повнокровна судина із явищем складжування еритроцитів (адвентиція яскраво-червоного кольору), фарбування за Ван Гізона, х 400.

На 24-ту добу дослідження виявлялися ще більш поширені ділянки некротизованої тканини. В ділянках, що межували із зонами некрозу було зареєстровано дисконфлексію клітинних популяцій, міжклітинний набряк з лімфоцитами і нейтрофілами (рис. 9). На 24-ту добу дослідження за впливу МСК домінували процеси незворотної альтерації пухлинної паренхіми. У осередках некрозу не реєстрували пухлинні клітини, судини і була відсутня стромальна смуга.

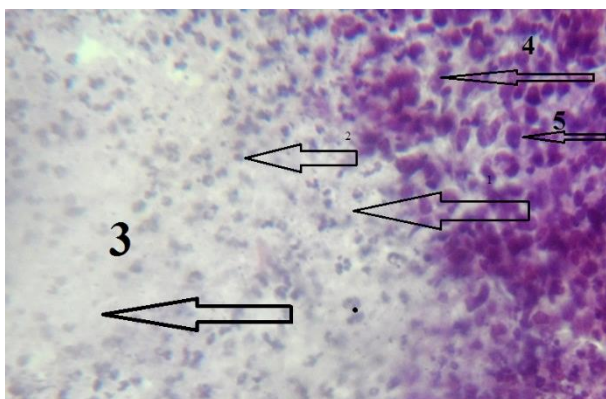


Рис. 8. Ділянки девіталізації (1, 2), некрозу (3), (клітини зі слабо профарбованими ядрами), фігури мітозу, клітини у стані проліферації, фарбування гематоксилином і еозином, мікрофото, х 400.

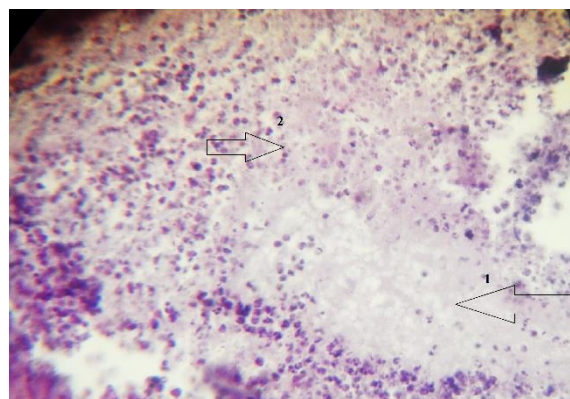


Рис. 9. Ділянка некрозу (1), клітини пухлинної тканини з каріорексисом і каріолізісом (2), редукція судинного русла, фарбування гематоксилином і еозином, х 100.

Висновки. На 18-ту добу досліджень за впливу МСК у первинній пухлинній тканині було зареєстровано високу щільність судин на одиницю площі, яка була у 1,3 рази більшою, ніж у групах тварин без впливу МСК. В судинах реєстрували гемостаз за типом складу еритроцитів. На 24-ту добу в зразках за впливу МСК реєстрували значно дистрофізовані клітини пухлини, які створювали осередки девіталізації пухлинної тканини, а поміж них лімфоцити. Зареєстровано багато ділянок некрозу, оточених дегенеративно зміненими пухлинними клітинами. За впливу алогенних МСК на 24-ту добу дослідження реєстрували вищі показники площі девіталізації та некротизації пухлинної тканини з редукцією судинного русла.

В подальшому планується робота з визначення впливу ксеногенних мезенхімальних клітин на перебіг пухлинного процесу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment / A.H. Klopp, E.L. Spaeth, J.L. Dembinski [et al.] // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – P. 95.
2. Sun Z. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment / Z. Sun, S. Wang, R. Zhao // *J. Hematol Oncol.* – 2014. – Vol. 67 (1). – P. 7–14.
3. Studeny M. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents / M. Studeny, F.C. Marini, J.L. Dembinski // *J. Natl Cancer Inst.* – 2004. – Vol. 96 (1). – P. 593–603.

4. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model / L. Qiao, Z. Xu, T. Zhao, Z. Zhao // *Cell Res.* – 2008. – Vol. 18. – P. 500–507.
5. Inhibition of lung cancer cell proliferation mediated by human mesenchymal stem cells / L. Li, H. Tian, Z. Chen, W. Yue. // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* – 2011. – Vol. 43. – P. 143–148.
6. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis / A.E. Karnoub, A.B. Dash, A.P. Vo [et al.] // *Nature.* – 2007. – Vol. 449. – P. 557–563.
7. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression / E.L. Spaeth, J.L. Dembinski, A.K. Sasser [et al.] // *PLoS One.* – 2009. – Vol. 4. – P. 49–92.
8. Guerin carcinoma growth inhibition in rats after administration mesenchymal stromal cells of human adipose tissue and bio-regulators of stem and progenitor cells / D.V. Cherkashyna, A.S. Lebedinskii, J.A. Buchanan [et al.] // *J. A. Med. Sci. of Ukraine.* – 2010. – Vol. 16 (3). – P. 492–506.
9. Khakoo A.Y. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma / A.Y. Khakoo, S. Pati, S.A. Anderson // *Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203. – P. 1235–1247.
10. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis / A. Bronckaers, P. Hilken, W. Martens [et al.] // *Pharmacology and Therapeutics.* – 2014. – Vol. 143, iss. 2. – P. 181–196.
11. A new metastasizing cell line from a BALB/c spontaneous mammary adenocarcinoma / P. Nanni, C. Giovanni, P.L. Lollini [et al.] // *Clin. Exp. Metastasis.* – 1983. – Vol. 1. – P. 373–380.
12. Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and or microenvironmental manipulation in vitro / C. Moriscot, F. Fraipont, M.J. Richard [et al.] // *Stem Cells.* – 2005. – Vol. 23. – P. 594–603.
13. Meazza R. Gene transfer of a secreted form of IL-15 in murine adenocarcinoma cells: effects on tumorigenicity, metastatic potential and immune response / R. Meazza, P.L. Lollini, P. Nanni // *Int. J. Cancer.* – 2000. – Vol. 87. – P. 574–581.
14. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. – Washington: National Academy of Press, 1996. – 140 p.
15. Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during Lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance / O.N. Pyaskovskaya, O.I. Dasyukovich, L.V. Garmanchuk, D.L. Kolesnik // *Experimental oncology.* – 2007. – Vol. 29 (3). – P. 197–202.
16. Mazurkevich A. Features conditions selection and cultivation mouse bone marrow adhesive fraction mononuclear cells / A. Mazurkevich, L. Kladnytska, V. Kovpak // *Вісник Київ. нац. ун-ту імені Тараса Шевченка.* – 2013. – Вип. 2 (64). – С. 41–43.
17. Горальський Л.П. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології / Л.П. Горальський, В.Т. Хомич, О.І. Кононський. – Житомир: Полісся, 2005. – 228 с.

REFERENCES

1. Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment / A.H. Klopp, E.L. Spaeth, J.L. Dembinski [et al.] // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – P. 95.
2. Sun Z. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment / Z. Sun, S. Wang, R. Zhao // *J. Hematol Oncol.* – 2014. – Vol. 67 (1). – P. 7–14.
3. Studeny M. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents / M. Studeny, F.C. Marini, J.L. Dembinski // *J. Natl Cancer Inst.* – 2004. – Vol. 96 (1). – P. 593–603.
4. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model / L. Qiao, Z. Xu, T. Zhao, Z. Zhao // *Cell Res.* – 2008. – Vol. 18. – P. 500–507.
5. Inhibition of lung cancer cell proliferation mediated by human mesenchymal stem cells / L. Li, H. Tian, Z. Chen, W. Yue // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* – 2011. – Vol. 43. – P. 143–148.
6. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis / A.E. Karnoub, A.B. Dash, A.P. Vo [et al.] // *Nature.* – 2007. – Vol. 449. – P. 557–563.
7. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression / E.L. Spaeth, J.L. Dembinski, A.K. Sasser [et al.] // *PLoS One.* – 2009. – Vol. 4. – P. 49–92.
8. Guerin carcinoma growth inhibition in rats after administration mesenchymal stromal cells of human adipose tissue and bio-regulators of stem and progenitor cells / D.V. Cherkashyna, A.S. Lebedinskii, J.A. Buchanan [et al.] // *J. A. Med. Sci. of Ukraine.* – 2010. – Vol. 16 (3). – P. 492–506.
9. Khakoo A.Y. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma / A.Y. Khakoo, S. Pati, S.A. Anderson // *Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203. – P. 1235–1247.
10. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis / A. Bronckaers, P. Hilken, W. Martens [et al.] // *Pharmacology and Therapeutics.* – 2014. – Vol. 143, iss. 2. – P. 181–196.
11. A new metastasizing cell line from a BALB/c spontaneous mammary adenocarcinoma / P. Nanni, C. Giovanni, P.L. Lollini [et al.] // *Clin. Exp. Metastasis.* – 1983. – Vol. 1. – P. 373–380.
12. Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and or microenvironmental manipulation in vitro / C. Moriscot, F. Fraipont, M.J. Richard [et al.] // *Stem Cells.* – 2005. – Vol. 23. – P. 594–603.
13. Meazza R. Gene transfer of a secreted form of IL-15 in murine adenocarcinoma cells: effects on tumorigenicity, metastatic potential and immune response / R. Meazza, P.L. Lollini, P. Nanni // *Int. J. Cancer.* – 2000. – Vol. 87. – P. 574–581.
14. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. – Washington: National Academy of Press, 1996. – 140 p.
15. Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during Lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance / O.N. Pyaskovskaya, O.I. Dasyukovich, L.V. Garmanchuk, D.L. Kolesnik // *Experimental oncology.* – 2007. – Vol. 29 (3). – P. 197–202.

16. Mazurkevich A. Features conditions selection and cultivation mouse bone marrow adhesive fraction mononuclear cells / A. Mazurkevich, L. Kladnytska, V. Kovpak // Visnyk Kyi'v. nac. un-tu imeni Tarasa Shevchenka. – 2013. – Vyp. 2 (64). – S. 41–43.
17. Goral's'kyj L.P. Osnovy gistologichnoi' tehniky i morfofunkcional'ni metody doslidzhen' u normi ta pry patologii' / L.P. Goral's'kyj, V.T. Homych, O.I. Konons'kyj. – Zhytomyr: Polissja, 2005. – 228 s.

Морфологические показатели первичной опухоли мышей C57Bl/6 с трансплантированной метастатической карциномой легких Льюис при влиянии алогенных мезенхимальных стволовых клеток

Л. В. Кладницкая, А. Й. Мазуркевич, Л. В. Гарманчук, С. В. Величко, М. О. Малюк, Т. В. Козицкая, В. Б. Данилов, В. В. Ковпак, Ю. О. Харкевич, А. В. Костюк, О. И. Джус, Д. В. Шелест

Исследованы морфологические изменения первичной опухоли мышей C57Bl/6 с перевитой метастатической карциномой легких Льюис при влиянии алогенных мезенхимальных стволовых клеток. Опы ты проводили на самцах мышей C57Bl/6 2–3-месячного возраста, весом 20–22 г. Аллогенные мезенхимальные стволовые клетки получали культивированием первичного материала, который был выделен из костного мозга мышей C57Bl/6. Культивирование клеток проводили при 37 °C, 100 % влажности и содержании 5 % CO₂ в среде DMEM с добавлением 20 % фетальной сыворотки телят и 1 % антибиотика-антимикотика. Мышам внутримышечно вводили клеточную суспензию метастатической карциномы легких Льюис (LLC) в концентрации 1x10⁶/0,1 мл раствора Хэнкса. На 18-е и 24-е сутки опыта определяли морфологические изменения первичной опухоли. На 18-е сутки исследований при влиянии МСК в первичной опухолевой ткани было зарегистрировано в 1,3 раза более высокую плотность сосудов на единицу площади, чем в группах животных без влияния МСК. В сосудах регистрировали гемостаз по типу сладж-эффекта эритроцитов. На 24-е сутки в образцах при воздействии МСК в очагах девитализации опухолевой ткани регистрировали дистрофические клетки опухоли, а между ними лимфоциты. Зарегистрировано много участков некроза, окруженных дегенеративно измененными опухолевыми клетками. На 24-е сутки исследования при воздействии аллогенных МСК регистрировали высокие показатели площади девитализации и некротизации опухолевой ткани с редукцией сосудистого русла.

Ключевые слова: аллогенные мезенхимальные стволовые клетки, карцинома легких Льюис, морфологические показатели, первичная опухоль, мышцы.

Morphological parameters of the primary tumor in mice C57Bl/6 with transplanted Lewis lung carcinoma under the effect of allogeneic mesenchymal stem cells

L. Kladnytska, A. Mazurkevich, L. Harmanchuk, S. Velychko, M. Malyuk, T. Kozitska, V. Danilov, V. Kovpak, U. Harkevych, A. Kostyuk, O. Dzhus, D. Shelest

The investigation was carried out in C57Bl/6 male mice weighing 20–22 g aged 2 to 3 months. All researches on animals were carried out according to Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

The strain of metastatic Lewis lung carcinoma (LLC) was kindly given by National Bank of Cell Lines and Tumor Strains of R.E. Kavetsky Institute of experimental pathology, oncology and radiobiology of National Academy of Sciences of Ukraine (IEPOR, NASU). The tumor cell suspension (1x10⁶/0.1ml of Haenk's solution) which was obtained from LLC primary tumor tissues with routine procedure of trypsinization was inoculated intramuscularly into mice. After tumor cell inoculation mice were divided into experimental and control groups not After inoculation of tumor cells was formed three groups of animals. The first group consisted of mice with Lewis lung transplant carcinoma, the second – mice with Lewis lung transplant carcinoma on the 8th day after inoculation of tumor cells was administered intravenously allogeneic MSCs 4th passage in the amount 1,25x10⁴. The third group were combined animal tumor, which was administered saline 0.9 % NaCl (8 animals in each). Mice of experimental group received the course of inoculation of MSCs in concentration 1.25x10⁴ cells were administrated on 8th day after tumor cell inoculation.

MSCs were obtained from male mice bone marrow. Six-week-old C57Bl/6 mice were sacrificed by cervical dislocation. Their femurs were carefully cleaned of soft tissues; epiphyses were removed in sterile conditions; and the bone marrow was harvested by inserting a syringe needle (20-gauge) into one end of the bone and flushing with medium DMEM (Sigma, USA). Cell suspension was layered on ficoll-triombast with index density gradient 1.074 and centrifuged at 300 g. Then select cell fraction which was on the verge ficoll-triombast, added Dulbecco's phosphate buffered saline solution, made suspension and centrifugation at 300 g. The cell pellet was resuspended in medium DMEM and cultured in standard condition with the addition of 20 % FBS (fetal bovine serum) and 1 mkl/sm³ antibiotic-antimycotic. Medium was replaced every 3–4 days. Visual assessment carried out by forming a monolayer every 24 hours using an inverted microscope Axiovert 40 (Carl Zeiss). When the cells formed a monolayer, they were shooting from the culture dishes 0.025 % trypsin containing 0.02 % EDTA. The trypsin action was stopped by adding FBS. After centrifugation cells were seeded on the larger diameter cultural dishes and cultivated by the formation of a next passage cells monolayer.

In the 18 th and 24 th day of the experiment was determined pathomorphological changes in muscular tissue of mice with Lewis lung carcinoma perescheplenoyu (LLC) under the influence of allogeneic MSCs. For this purpose produced histological preparations. For this selection of material performed immediately after euthanasia of animals research groups. The selection of tumor tissue was performed with the central, peripheral areas of the tumor and on the verge of muscle tissue unaffected. The selected material is crushed into pieces the size of 3–4 mm³, fixed, embedded in paraffin, sections were produced using sleigh Microtomes MS-2. Slice thickness reaches 5–9 microns. The resulting sections were applied to slides prepared (cleaned, degreased and treated with a mixture of egg protein with glycerol) using distilled water t=37–40 °C for smoothing. Subject glass with slices kept on the table for drying samples within 24–36 hours. Painting cuts performed with hematoxylin and eosin and by Van Ghisone. Painted cuts light optic studied by microscope Olympus, Lomo.

In the 18 th and 24 th day of the experiment determined the morphological changes of the primary tumor. On the 18th day of research on the impact of MSCs in primary tumor tissue were registered 1.3 times higher density of blood vessels per

unit area than in groups of animals without the influence of MSCs. In vascular hemostasis recorded the type of sludge-effect of erythrocytes. On the 24th day the samples when exposed to MSCs devitalization foci of tumor tissue were recorded dystrophic tumor cells, and between them – lymphocytes. Registered many areas of necrosis, surrounded by degenerative modified tumor cells. On the 24th day study on the impact of allogeneic MSCs areas recorded higher levels of devitalization and necrosis area of tumor with reduce vessel.

Key words: allogeneic mesenchymal stem cells, Lewis lung carcinoma, morphological indexes, primary tumor mouse.

Надійшла 08.06.2016 р.