

М. А. Мунько, Т. А. Карацуба

Метастатична активність карциноми легень Льюїс за впливу антикоагулянтів прямої дії на тромбоцитарний гемостаз і коагуляційну активність крові

Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України», м. Київ

Ключові слова: антикоагулянти прямої дії, метастази, карцинома легень Льюїс

Злоякісні новоутворення – одна з найважливіших медико-біологічних і соціально-економічних проблем у всьому світі та в Україні. Захворюваність і смертність від злоякісних новоутворень постійно зростають у зв'язку з нестабільним економічним станом, несприятливою економічною ситуацією та значним старінням населення [1].

За даними бюлетеня Національного канцер-реєстру України за 2023 рік на обліку в онкологічних закладах перебуває 1 153 519 осіб (413 818 – чоловіки, 739 701 – жінки) [2].

Сьогодні воєнні дії на території України суттєво впливають на всі аспекти життя населення країни, яке за цих умов зазнає значного стресу, а в тих, хто перебуває в зоні активних воєнних дій, розвивається посттравматичний стресовий розлад. На цьому тлі відбувається загострення хронічних і прогресування онкологічних захворювань.

Фатальність онкологічного захворювання найчастіше зумовлена метастазуванням злоякісного новоутворення. Здатність до інвазії злоякісної пухлини, процес, при якому пухлинні клітини або їхні емболи віддаляються від первинної пухлини та проникають у навколишні тканини. Інвазія є першим етапом склад-

ного інвазивно-метастатичного каскаду, що призводить надалі до метастазування [3]. Під час метастатичного дисемінування пухлинні клітини надходять у кровеносні або лімфатичні судини [4]. Поширення пухлинного процесу у віддалені ділянки відбувається переважно з током крові [5]. Усе починається з реорганізації цитоскелету, клітина змінює свою форму, у неї з'являється виділений напрямок [4]. Після цього на мембрані клітини з'являються специфічні рецептори. Далі починають працювати мембранні протеази, звільняючи місце для подальшого руху клітини. І наприкінці всередині клітини активується білок міозин 2, що забезпечує її рух. Після цього задній кінець клітини відділяється від свого оточення та підтягується до переднього кінця. Клітина покидає пухлину та починає рухатись кровообігом (рисунок).

За активації спеціальних молекулярних механізмів клітина піддається впливу несприятливих фізичних умов, а також атакам імунної системи. Наприклад, доволі велика ракова клітина може закупорити судину та призвести до локальної запальної реакції, у такому випадку запускаються механізми апоптозу, ракову клітину атакують клітини імунної системи, що зупиняє розповсюдження метастазів. Щоб вижити в кровообігу,

пухлинні клітини запускають коагуляційний каскад і формують навколо себе захисну оболонку з тромбоцитів. Цей процес є універсальним для багатьох пухлин [6, 7].

Натепер уже накопичено достатньо даних щодо протипухлинної й антиметастатичної активності антикоагулянтів прямої дії [9]. Результати сучасних клінічних досліджень

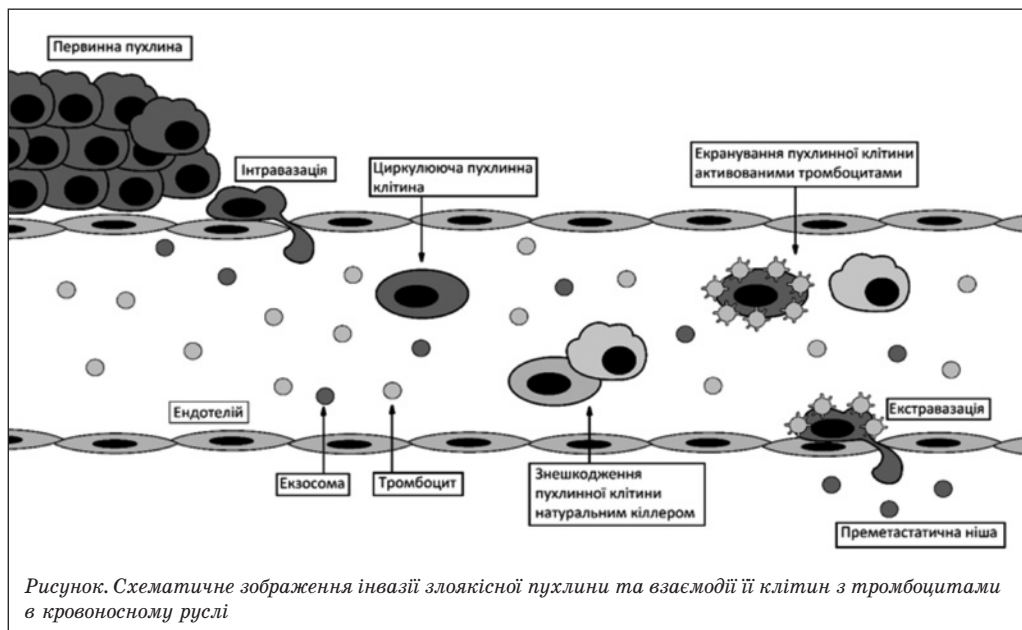


Рисунок. Схематичне зображення інвазії злоякісної пухлини та взаємодії її клітин з тромбоцитами в кровоносному руслі

Ключовими молекулами, експресія яких на поверхні клітини запускає коагуляцію, вважають фактор III (тромбопластин) і мембранний фосfolіпід фосфатидилсерин [8]. Останній створює сприятливу поверхню для прилипання тромбоцитів, фактор III активує тромбоцити та запускає коагуляційний сигнальний каскад. У результаті ракова клітина є оточеною захисною оболонкою з тромбоцитів, що допомагає їй рухатись кров'яним руслом і формувати нові пухлини. Гальмування активації та виснаження тромбоцитів пригнічує метастазування злоякісного новоутворення [6, 7]. Тому розробка нових терапевтичних агентів, що спрямовані на можливі тромбоцитарні мішені, і пошук нових властивостей доступних препаратів супроводу є перспективним напрямом протипухлинної терапії.

доводять, що застосування антикоагулянтів розширює можливість протипухлинної терапії, підвищує якість життя онкохворого та покращує прогноз перебігу хвороби [10, 11]. Проте багато аспектів залишається не вивченими, пошук нових мішеней щодо запобігання метастазуванню досі ще є актуальним. За попередніми дослідженнями були отримані дані щодо впливу еноксапарину, низькомолекулярного гепарину (НМГ), у дозі 10,0 мг/кг на метастатичну активність карциноми легень Льюїс (LL) [12]. У даному дослідженні ми порівняли вплив антикоагулянтів прямої дії – нефракціонованого гепарину (НФГ) та НМГ за даних умов експерименту.

Мета дослідження – вивчити вплив антикоагулянтів прямої дії – НФГ (сулодексиду) та НМГ (енокса-

парину) на метастатичну активність карциноми LL, порушення коагуляційної активності крові та тромбоцитарного гемостазу.

Матеріали та методи. Перед початком дослідження Комітет з біоетики ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» узгодив протокол дослідження, а також процедури, які пов'язані з утриманням тварин та їхнім використанням в експерименті. Усі маніпуляції з тваринами проводились відповідно до Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [13] та Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та з іншою науковою метою [14].

У дослідах було використано модель пухлинного росту – карциному LL. Штам клітин карциноми LL отримано з Клітинного банку ліній раку людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

З метою вивчення антиметастатичних властивостей НФГ – сулодексиду на моделі спонтанно метастазуючої карциноми LL мишей лінії C₅₇BL/6 було розподілено на три групи по 7 тварин у кожній: першій – контроль (без пухлини) та другій групам (з перевитою карциномою LL) вводили 0,9 % NaCl, 0,05 мл/20 г маси тіла, третій групі (з перевитою карциномою LL) вводили сулодексид у дозі 2,0 мг/кг.

Карциному LL перевивали в концентрації $3 \cdot 10^5$ клітин у 0,3 мл фізіологічного розчину внутрішньом'язово в праву гомілку мишей лінії C₅₇BL/6 [15]. Підрахунок пухлинних клітин проводили в камері MMC-SR [16].

Лікування тварин починали на 5 добу після перевивки клітин карциноми LL. Сулодексид вводили в дозі 2,0 мг/кг внутрішньом'язово протягом 20 діб. Еноксапарин застосовували в дозі 10,0 мг/кг підшкірно, 20 діб [12]. Індивідуальні дози препарату розраховували в мг/кг та мл/г з урахуванням щотижневих змін маси тіла кожної з тварин.

Для введення тваринам застосовували сулодексид (Вессел Две Ф, виробництва Альфасігма Сл.А.) та еноксапарин (Еноксапарин-Фармекс, виробництва ТОВ «Фармекс Груп», Україна) [12]. Препарати зберігали в темному, сухому місці за температури не вище ніж 25 °С.

Параметрами ефекту був відсоток гальмування росту первинної пухлини, кількість та об'єм метастазів [17, 18]. Мінімальний критерій активності – гальмування росту пухлини понад 50 % [18].

Об'єм пухлини визначали за формулою об'єму еліпсоїда. Для характеристики метастатичної активності карциноми LL проводили оцінку наявності метастазів у легенях експериментальних тварин на 28 день після перевивки пухлинних клітин. Підрахунок кількості метастазів у легенях здійснювали візуально та за допомогою бінокулярного стереоскопічного мікроскопа МБС-10. Візуально розмір метастазу визначали шляхом порівняння його діаметра з міліметровою шкалою. Об'єм метастазу розраховували, виходячи з припущення його кулястості, за формулою об'єму кулі. Параметрами ефекту був відсоток зменшення об'єму та кількості метастазів у легенях дослідних тварин [15, 17, 18].

У більшості онкохворих спостерігаються зміни в системі гемостазу [1, 19, 20], які виявляються за

допомогою лабораторних тестів. Одним із маркерів оцінки коагуляційної активності цільної крові є швидкість перетворення рідкої крові в еластичний згусток у результаті переходу розчиненого в плазмі крові білка фібриногену в нерозчинний фібрин. Час зсідання крові за методом Моравіца дає змогу швидко оцінити коагуляційну активність цільної крові в експериментальних тварин [21].

Тому до початку перевивки клітин карциноми LL у всіх експериментальних мишей було зроблено аналіз на час зсідання крові за Моравіцем [21]. Процедуру проводили на 14 та 28 день дослідження, що дало змогу оцінити вплив LL та LL + сулодексид на коагуляційну активність крові дослідних мишей.

Експериментальні тварини були піддані евтаназії на 28 день дослідження. Безпосередньо перед евтаназією всіх мишей було зважено та визначено час зсідання крові. Потім під легким ефірним наркозом були відібрані зразки крові з орбітального венозного синусу тварин для гематологічного дослідження та здійснено евтаназію шляхом цервікальної дислокації. У всіх тварин була вилучена та зважена селезінка, відносну масу якої розраховували на 100 г маси тіла.

Розуміння стану тромбоцитарного гемостазу на тлі пухлинної прогресії може визначити потенційні стратегії подальшого лікування й обґрунтувати потенційну функцію тромбоцитів у регуляції прогресування новоутворення.

Загальний гематологічний аналіз венозної крові дозволяє проаналізувати рівень таких показників тромбоцитарного гемостазу, як кількість тромбоцитів, середній об'єм

тромбоциту, тромбоцит, відносна ширина розподілу тромбоцитів за об'ємом, коефіцієнт великих тромбоцитів.

Кров для гематологічних досліджень збирали в пробірки об'ємом 0,2 мл із K_3 -ЕДТА («ВОЛЕС», Україна) й аналізували на автоматичному гематологічному аналізаторі Mythic 22 (Orphie SA, Швейцарія).

Статистичний аналіз результатів експерименту проводили з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) для нормально розподілених змінних і за критерієм Краскела-Волліса для змінних з ненормальним розподілом. Нормальність розподілу отриманих даних перевіряли за тестом Шапіро-Уїлка. Отримані дані представляли як середнє значення \pm похибка середнього ($M \pm m$) для нормально розподілених змінних або медіана та 25 і 75 квартилі [Me (25 % ;75 %)]. Для статистичної обробки даних використовували програму OriginPro 2023b. Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною в разі $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. У дослідженні визначено вплив антикоагулянту прямої дії, НФГ сулодексиду, на метастатичну активність карциноми LL та порівняння його з раніше отриманими результатами щодо ефекту НМГ еноксапарину [12].

Аналіз отриманих даних виявив значне зниження метастатичної активності карциноми LL за умов уведення антикоагулянтів прямої дії. Сулодексид гальмував кількість метастазів у легнях мишей на 63,79 %, а об'єм метастазів – на 96,91 % (табл. 1), еноксапарин – відповідно на 60,88 % і 96,88 % [12].

Показники пухлинного росту та метастазування карциноми легень Льюїс, перевитої мишам-самцям лінії C₅₇Bl/6, за умов уведення сулодексиду (M ± m або [Me (25 %; 75 %)], n = 7)

Показник	Експериментальна група	
	карцинома легень Льюїс	карцинома легень Льюїс + сулодексид
Кількість метастазів	6,71 ± 2,14	3,0 (2,0; 3,0)*
Гальмування кількості метастазів, %	-	63,79
Об'єм метастазів, мм ³	8,78 ± 5,97	0,07 (0,07; 0,6)*
Гальмування об'єму метастазів, %	-	96,91
Об'єм первинної пухлини, мм ³	6,13 (5,4; 6,42)	4,65 ± 1,09
Гальмування об'єму первинної пухлини, %	-	14,64

Примітка. *p ≤ 0,05 порівняно з групою Карцинома LL.

Дослідження протипухлинної дії сулодексиду (табл. 1) та еноксапарину [12] показали, що зазначені препарати мають незначну протипухлинну дію щодо первинної карциноми LL. Гальмування росту первинної пухлини LL сулодексидом – 14,64 %, еноксапарином – 19,3 %, що нижче критерію значущості для цієї пухлини (> 50 %) [18]. Але значний відсоток гальмування росту метастазів як окремих пухлин у легенях дослідних мишей вказує на те, що дисемінація пухлинних клітин у легені з первинної пухлини, імовірно, відбувалась вже на пізній стадії пухлинного

росту. Це може бути експериментальним обґрунтуванням застосування антикоагулянтів прямої дії як препаратів супроводу для лікування злоякісних новоутворень переважно з гематогенним метастазуванням [1].

За результатами досліджень показано, що на тлі метастазуючого пухлинного росту відбувається порушення коагуляційної активності крові [12].

Скорочення часу зсідання крові спостерігається тільки за підвищеного тромбоутворення та дозволяє прослідкувати процес у динаміці на тлі росту та метастазування пухлини (табл. 2).

Час зсідання крові мишей самців C₅₇Bl/6 з перевитою карциномою легень Льюїс за умов уведення сулодексиду, хв (M ± m, n = 7)

Експериментальна група	Дні дослідження		
	0	14	28
Контроль	6,17 ± 0,72	5,65 ± 0,53	5,12 ± 0,53
Карцинома легень Льюїс	5,99 ± 1,22	2,64 ± 0,64*, **	0,40 ± 0,29*, **
Карцинома легень Льюїс + сулодексид	5,46 ± 0,55	3,13 ± 0,57*, **	0,37 ± 0,13*, **

Примітка. *Тут і в табл. 3: *p ≤ 0,05 порівняно з 0 днем дослідження, **p ≤ 0,05 порівняно з контрольною групою.

Час зсідання крові в дослідних тварин з карциною LL на 14 день дослідження значно скорочується, тобто, підвищується коагуляційна активність цільної крові; на 28 день досліду час зсідання крові скорочується ще більше, до 0,40 хв, що свідчить про тромбоутворення. Уведення сулодексиду в дозі 2,0 мг/кг за даних

Порівняльний аналіз показників контрольних і дослідних тварин дав змогу оцінити патологічні зміни в системі тромбоцитарного гемостазу та їхній взаємозв'язок із прогресуванням метастазування.

Результати дослідження венозної крові експериментальних мишей наведено в таблиці 3.

Таблиця 3

Показники тромбоцитарної ланки гемограми мишей C₅₇BL/6 із перевитою карциною легень Льюїс за умов уведення сулодексиду (M ± m або [Me (25 %; 75 %)], n = 7)

Показник	Експериментальна група		
	контроль	карцинома легень Льюїс	карцинома легень Льюїс + сулодексид
Тромбоцити, 10 ³ /мкл	802,75 ± 116,48	364,17 ± 89,15**	422,86 ± 105,35**
Середній об'єм тромбоцита, фл	6,61 ± 0,34	7,30 ± 0,44	7,0 (6,6; 7,7)
Тромбокрит, %	0,50 (0,46; 0,57)	0,26 ± 0,05**	0,28 (0,24; 0,34)**
Відносна ширина розподілу тромбоцитів за об'ємом, %	35,29 ± 8,21	41,08 ± 0,35	40,34 ± 2,60
Коефіцієнт великих тромбоцитів	6,75 (5,85; 8,65)	12,33 ± 3,19	9,9 (8,0; 15,5)

умов експерименту не сприяло корекції зазначених показників, водночас за введення еноксапарину в дозі 10,0 мг/кг на 28 день досліду час зсідання крові дослідних мишей становив (2,65 ± 0,16) хв [12]. Імовірно, ці ефекти зумовлені додатковими антитромботичними та протизапальними властивостями еноксапарину.

Загальний гематологічний аналіз венозної крові дозволяє проаналізувати показники тромбоцитарного гемостазу, такі як: кількість тромбоцитів, середній об'єм тромбоциту, тромбокрит, відносна ширина розподілу тромбоцитів за об'ємом, коефіцієнт великих тромбоцитів.

Аналіз тромбоцитарної ланки гемограми показав, що у тварин усіх дослідних груп відмічається значне зниження кількості тромбоцитів (тромбоцитопенія) і тромбокриту (табл. 3). За умов уведення сулодексиду дослідним тваринам кількість тромбоцитів тендеційно підвищувалася (табл. 3). При введенні еноксапарину зазначені показники становили: кількість тромбоцитів – (495,712 ± 21,410) 10³/мл; тромбокрит – (0,33 ± 0,01) % [12].

Розрахунки масових коефіцієнтів селезінки як інтегральних показників дали змогу оцінити стан селезінки, яка є органом, що регулює кровотворення.

Аналіз відносної маси селезінки мишей дослідних груп показав, що в тварин на тлі метастазуючого пухлинного росту спостерігається спленомегалія – патологічне збільшення селезінки, а саме: (0,42 ± 0,07) % (контрольна група); (0,98 ± 0,29) % (карцинома LL); 1,20 (0,87; 1,26) % (сулодексид); (1,01 ± 0,06) % (еноксапарин) [12].

Таким чином, на тлі метастазуючого пухлинного росту карциноми LL у мишей лінії C₅₇BL/6 розвивається гіперкоагуляційний стан I стадії ДВЗ-синдрому, який характеризується суттєвим зменшенням часу зсідання крові, спленомегалією, яка є наслідком посиленої секвертації тромбоцитів та збільшення їхнього селезінкового пулу, що викликає тромбоцитопенію [22].

Це вказує на участь паранеопластичного гіперкоагуляційного синдрому в патогенезі метастазування. За даними літератури антитромбічна дія сулодексиду та еноксапарину зумовлена пригніченням Ха – активності та зменшенням рівня фібриногену в плазмі крові, який є необхідною умовою для агрегації тромбоцитів на поверхні циркулюючої пухлинної клітини в кровоносному руслі та має зробити її доступною для імунної системи [23].

Висновки

1. Порівняльний аналіз отриманих результатів за умов експерименту виявив значне зниження метаста-

тичної активності карциноми LL на тлі терапії антикоагулянтами прямої дії, НФГ (сулодексидом) і НМГ (еноксапарином). Сулодексид гальмував утворення метастазів у легенях мишей на 63,79 %, а збільшення їхнього об'єму – на 96,91 %, еноксапарин – відповідно на 60,88 % і 96,88 % .

2. Дослідження тромбоцитарного гемостазу, коагуляційної активності крові дослідних тварин показали, що на тлі метастазуючого пухлинного росту карциноми LL розвивається гіперкоагуляційний стан I стадії ДВЗ-синдрому. Терапія сулодексидом у дозі 2,0 мг/кг та еноксапарином у дозі 10,0 мг/кг супроводжувалась тенденційним підвищенням кількості тромбоцитів у крові дослідних мишей.

3. За результатами проведених досліджень встановлено, що антикоагулянти прямої дії, сулодексид та еноксапарин, достовірно не впливають на розмір первинної пухлини, але значно зменшують кількість та об'єм метастазів. За впливом на тромбоцитарну ланку гемостазу, антикоагулянти прямої дії показали тенденційне підвищення рівня тромбоцитів, достовірні зміни в інших показниках були відсутні. Отримані дані свідчать про доцільність подальших поглиблених досліджень механізму антиметастатичних ефектів антикоагулянтів прямої дії.

1. Севідов В. В., Касевич Н. М. Онкологія: підручник; за ред. проф. В. П. Баштана. 3-є вид. виправл. Київ: ВСВ «Медицина», 2015. 232 с.
2. Рак в Україні, 2022–2023. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. З. П. Федоренко, О. В. Сумкіна, Є. Л. Горох та ін. *Бюлетень Національного канцер-реєстру України*. 2024. № 25. С. 1–132. URL: http://ncru.inf.ua/publications/BULL_25/index.htm (дата звернення: 12.07.2024).
3. Молекулярні механізми утворення метастазів. Маркери метастазування при карциномах щитоподібної залози (огляд літератури). П. П. Зінич та ін. *Ендокринологія*. 2020. Вип. 25, ч. 3. С. 227–242.

4. Десятерик В. І., Шевченко Є. С., Медведков О. В. Гемостатичні механізми гематогенного метастазування пухлин. *Хірургія України*. 2015. № 4. С. 96–104.
5. Joyce J. A., Pollard J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer*. 2009. No. 9. P. 239–252.
6. Mitchell M. J., King M. R. Fluid shear stress sensitizes cancer cells to receptor-mediated apoptosis via trimeric death receptors. *New J. Phys.* 2013. V. 15, No. 1. P. 1–18.
7. Egan K., Cooke N., Kenny D. Living in shear: platelets protect cancer cells from shear induced damage. *Clin Exp Metast.* 2014. V. 31, No. 6. P. 697–704.
8. Carlsen E., Stinessen M., Prydz H. Differential effect of alpha-interferon and gamma-interferon on thromboplastin response in monocytes and endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 1987. V. 70 (2). P. 471–478.
9. Пуськов О. М., Мунько М. А., Карацуба Т. А. Вплив антикоагулянтів прямої дії на процеси метастазування. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2024. Т. 18, № 1. С. 43–52.
10. Falanga A., Marchetti M. Heparin in tumor progression and metastatic dissemination. *Semin Thromb Hemost.* 2007. V. 33, No. 7. P. 688–694. <https://doi.org/10.1055/s-2007-991536>.
11. Low molecular weight heparin synergistically enhances the efficacy of adoptive and anti-PD-1-based immunotherapy by increasing lymphocyte infiltration in colorectal cancer. Y. Quan, J. He, Q. Zou et al. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2023. V. 11. P. 1–18. <https://doi.org/10.1136/jitc-2023-007080>.
12. Мунько М. А. Вплив антикоагулянта прямої дії еноксапарину на метастатичну активність карциноми легень Льюїс. *Вісник проблем біології та медицини*. 2024. Вип. 1, № 172. С. 194
13. Про захист тварин від жорстокого поводження: Закон України від 06.11.2023 № 3447-IV. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text> (дата звернення 10.07.2024).
14. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe, Strasbourg. 1986:53.
15. Suppression of proliferation, tumorigenicity and metastasis of lung cancer cells after their transduction by interferon-beta gene in baculovirus vector. A. A. Lykhova, Y. I. Kudryavets, L. I. Strokovska et al. *Cytokine*. 2015. V. 71. No. 2. P. 318–326.
16. Пат. 149330 UA, МПК G09B23/28, C12N5/00, C12N15/00. Спосіб перевивки експериментальних пухлин (саркома 45 (S-45) та карциносаркома Уокера W256). Серединська Н. М. [UA], Шарикіна Н. І. [UA], Хавич О. О. [UA], Карацуба Т. А. [UA], Бухтіарова Т. А. [UA], Марченко О. М. [UA]. № u202100710; заявл. 17.02.2021; опубл. 10.11.2021. Бюл. № 46.
17. Балицкий К. П., Воронцова А. Л., Лисняк И. А. Метастазирование опухолей: патогенетические аспекты; под ред. К. П. Балицкого. Киев: Наук. думка, 1991. 200 с.
18. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації; за ред. О. В. Стефанова. Київ : ВД «Авіцена», 2001. 528 с.
19. Мельник А. А. Маркеры гиперкоагуляции у пациентов с онкологическими заболеваниями. *Онкологія*. 2017. Вип. 50, № 4. С. 40–41.
20. Залюбовська О. І., Гладких Н. О. Первинний аналіз тромбоцитарної ланки гемограми у пацієнтів з новоутвореннями щитовидної залози [Електронний ресурс]. *Збірник наукових праць SCIENTIA*. 2021. Т. 5. С. 56–59. URL: <https://ojs.ukrlogos.in.ua/index.php/scientia/issue/view/29.01.2021/430>.
21. Modern methods for measuring parameters of blood coagulation. I. A. Bazaev, A. V. Przhivalgovskaya, P. A. Rudenko et al. *Biomed Eng.* 2015. V. 49, No. 3. P. 136–141.
22. Видиборець С. В., Андріяка А. О. Синдром внутрішньо-судинного зсідання крові. *Сімейна медицина*. 2016. Вип. 67, № 5. С. 45–51.
23. Viver E. What is natural in natural killer cells? *Immunol. Lett.* 2006. V. 107. P. 1–7.

М. А. Мунько, Т. А. Карацуба

Метастатична активність карциноми легень Льюїс за впливу антикоагулянтів прямої дії на тромбоцитарний гемостаз і коагуляційну активність крові

Злоякісні новоутворення – одна з найважливіших медико-біологічних і соціально-економічних проблем у всьому світі та в Україні. Захворюваність і смертність від злоякісних новоутворень постійно зростають у зв'язку з нестабільною, несприятливою економічною ситуацією та значним старінням населення. Фатальність онкологічного захворювання найчастіше зумовлена метастазуванням злоякісного новоутворення. Здатність до інвазії злоякісної пухлини, процес при якому пухлинні клітини або їхні емболи віддаляються від первинної пухлини й проникають у навколишні тканини. Інвазія є першим етапом складного інвазивно-метастатичного каскаду, що призводить надалі до метастазування. Гіперактивація системи гемостазу та прогресування й агресивність злоякісної пухлини взаємопов'язані процеси. Тому розробка нових терапевтичних агентів, спрямованих на можливі тромбоцитарні мішені, і пошук нових властивостей доступних препаратів супроводу є перспективним напрямом протипухлинної терапії. Результати сучасних клінічних досліджень доводять, що

застосування антикоагулянтів розширює можливість протипухлинної терапії, підвищує якість життя онкохворого та покращує прогноз перебігу хвороби. Проте багато аспектів залишається не вивченими, та пошук нових мішеней щодо запобігання метастазуванню є досі актуальним. У дослідженні ми порівняли вплив антикоагулянтів прямої дії – нефракціонованого гепарину (НФГ) та низкомолекулярного гепарину (НМГ) на метастатичну активність карциноми легень Льюїс (LL).

Мета дослідження – вивчити вплив антикоагулянтів прямої дії – НФГ (сулодексиду) та НМГ (еноксапарину) на метастатичну активність карциноми LL, порушення коагуляційної активності крові та тромбоцитарного гемостазу.

Антиметастатичні властивості сулодексиду вивчали на моделі спонтанно метастазуючої карциноми LL у мишей лінії C₅₇BL/6, яких було розподілено на три групи по 7 тварин у кожній: першій групі – контроль (без пухлини) та другій групі (з перевитою карциномою LL) вводили 0,9 % NaCl, 0,05 мл/20 г маси тіла; третій групі (з перевитою карциномою LL) вводили сулодексид у дозі 2,0 мг/кг. Карциному LL перевивали в концентрації $3 \cdot 10^5$ клітин у 0,3 мл фізіологічного розчину внутрішньом'язово в праву гомілку мишей лінії C₅₇BL/6. Лікування тварин починали на 5 добу після перевивки клітин карциноми LL. Сулодексид вводили в дозі 2,0 мг/кг внутрішньом'язово протягом 20 днів. До початку перевивки клітин LL у всіх експериментальних мишей було визначено час зсідання крові за Моравіцем. Процедура проводили також на 14 та 28 день дослідження, що дало змогу оцінити вплив карциноми LL, карциноми LL + сулодексиду на коагуляційну активність крові дослідних мишей. На 28 день дослідження тварин знеживлювали, визначали гематологічні параметри, вилучали легені для підрахунку метастазів і селезінку для подальшого аналізу.

За попередніми дослідженнями були отримані дані щодо впливу антикоагулянту прямої дії еноксапарину в дозі 10,0 мг/кг на метастатичну активність карциноми LL. Порівняльний аналіз отриманих даних виявив значне зниження метастатичної активності карциноми легень LL за умов введення антикоагулянтів прямої дії: у разі застосування сулодексиду утворення метастазів у легенях мишей гальмувалось на 63,79 %, а їхній об'єм – на 96,91 %, еноксапарину – відповідно на 60,88 % та 96,88 %.

На тлі метастазуючого пухлинного росту карциноми LL у мишей лінії C₅₇BL/6 розвивається гіперкоагуляційний стан I стадії ДВЗ-синдрому, який характеризується суттєвим зниженням часу зсідання крові, сплено мегалією, яка є наслідком посиленої секвертації тромбоцитів та збільшення їхнього селезінкового пулу, що викликає тромбоцитопенію.

Терапія сулодексидом у дозі 2,0 мг/кг та еноксапарином у дозі 10,0 мг/кг супроводжувалась тенденційним підвищенням кількості тромбоцитів у крові дослідних мишей на тлі метастазуючого пухлинного росту.

За результатами проведених досліджень встановлено, що антикоагулянти прямої дії, сулодексид та еноксапарин, достовірно не впливають на розмір первинної пухлини, але значно зменшують кількість та об'єм метастазів. За впливом на тромбоцитарну ланку гемостазу, антикоагулянти прямої дії показали тенденційне підвищення рівня тромбоцитів, достовірні зміни в інших показниках були відсутні. Отримані дані свідчать про доцільність подальших поглиблених досліджень механізму антиметастатичних ефектів антикоагулянтів прямої дії.

Ключові слова: антикоагулянти, карцинома легень Льюїс, метастази

M. A. Munko, T. A. Karatsuba

Metastatic activity of Lewis lung carcinoma under effects of direct-acting anticoagulants on platelet hemostasis system and blood coagulation activity

Malignant neoplasms are one of the main medico-biological and socio-economic problems throughout the world and in Ukraine. Morbidity and mortality from malignant neoplasms are constantly increasing due to unstable and unfavorable economic situation and significant aging of the population. The fatality of an oncological disease is largely determined by the metastasis of a malignant neoplasm. The ability of a malignant tumor to invade is a process in which cancer cells or their emboli move away from the primary part and penetrate into the surrounding tissues. Invasion is the first stage of a complex invasive-metastatic cascade, which further leads to metastasis. Hyperactivation of the hemostasis system, the progression and aggressiveness of a malignant tumor are interrelated processes. Therefore, the development of new therapeutic agents oriented at possible platelet targets and the search for new properties of available accompanying drugs is a promising direction of anticancer therapy. The results of modern clinical studies prove that the use of anticoagulants expands the possibility of anticancer therapy, improves the quality of life of a cancer patient, and improves the prognosis of the course of the disease. However, many aspects remain unexplored, and the search for new targets to prevent metastasis is still relevant. In this paper, we compared the effect of direct-acting anticoagulants (unfractionated heparin and low-molecular-weight heparin) on the metastatic activity of Lewis carcinoma.

The aim of the study – to evaluate the effects of direct-acting anticoagulants (unfractionated heparin – sulodexide and low molecular weight heparin – enoxaparin) on the metastatic activity of Lewis lung carcinoma and impaired blood coagulation activity (platelet hemostasis).

In order to study the antimetastatic properties of unfractionated heparin sulodexide (UFH) on the model of spontaneously metastasizing Lewis lung carcinoma (LL) in the lungs, mice of the C₅₇BL/6 line were

divided into three groups of 7 animals each. The first group – control (without tumor) and the second group (inoculated with LL carcinoma) were administered 0.9% NaCl, 0.05 ml/20 g of body weight; the third group (inoculated with LL carcinoma) was administered sulodexide at a dose of 2.0 mg/kg. LL carcinoma was inoculated at a concentration of $3 \cdot 10^5$ cells in 0.3 ml of saline intramuscularly into the right leg of C₅₇BL/6 mice. Treatment of animals started on the 5th day after LL carcinoma cells inoculation. Sulodexide was administered at a dose of 2.0 mg/kg intramuscularly for 20 days. Before the start of LL cells inoculation, all experimental mice were analyzed for blood clotting time according to Morawitz. Such procedure was performed also on the 14th and 28th day of the study, which made it possible to evaluate the effect of LL carcinoma and LL carcinoma + sulodexide on the coagulation activity of the blood of experimental mice. On the 28th day of the study, the animals were eutanazied, hematological parameters were determined, the lungs were removed to count metastases, and the spleen was removed for further analysis.

According to previous studies, data on the effect of the low molecular weight heparin (LMWH) at a dose of 10.0 mg/kg on the metastatic activity of LL carcinoma were obtained. A comparative analysis of the data obtained revealed a significant decrease in the metastatic activity of LL carcinoma under the administration of direct-acting anticoagulants: UFH inhibited the number of metastases in the lungs of mice by 63.79 %, and their volume – by 96.91%; LMWH – respectively by 60.88 and 96.88%.

Against the background of metastatic tumor growth of LL carcinoma in mice of the C₅₇BL/6 line, a hypercoagulable state of the DVZ-syndrome I stage develops, which is characterized by a significant decrease in blood clotting time and splenomegaly, which is a consequence of increased sequestration of platelets and an increase in their splenic pool causing thrombocytopenia.

Therapy with UFH at a dose of 2.0 mg/kg and LMWH at a dose of 10.0 mg/kg was accompanied by trend to increase in the number of platelets in the blood of experimental mice against the background of metastatic tumor growth.

As to results obtained, it was established that direct-acting anticoagulants, sulodexide and enoxaparin, had no reliable effect on the size of primary tumor, but significantly reduce the number and volume of metastases. Direct-acting anticoagulants demonstrated trend to increasing platelets quantity and had no reliable effects on other studied parameters. The data obtained indicate the feasibility of further research of these drugs' antimetastatic action mechanisms.

Key words: direct-acting anticoagulants, Lewis lung carcinoma, metastases

Надійшла: 21 липня 2024 р.

Прийнята до друку: 21 серпня 2024 р.

Контактна особа: Мунько Максим Андрійович, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 42 56.