

nodes, conjunctivitis and Koplik's spots were less often diagnosed, but manifestations of intestinal syndrome were more often recorded than during the outbreak in 2006.

Key words: measles, epidemic outbreak, clinical features, course.

ORCID and contributionship:

Marchenko O. H.: <https://orcid.org/0000-0003-2300-1287> ^{ABCD}

Bodnar V. A.: <https://orcid.org/0000-0002-1277-9344> ^{ADEF}

Pryimenko N. O.: <https://orcid.org/0000-0002-8265-1143> ^{ADEF}

Stetsenko O. O.: <https://orcid.org/0009-0000-5481-4251> ^{ABCD}

Miahkikhlib A. A.: <https://orcid.org/0000-0003-2261-2764> ^{BCD}

Olefir S. A.: — ^{BCD}

Svyrydenko N. P.: — ^{BCD}

Conflict of interest:

The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author

Marchenko Olena Hennadiivna

Poltava State Medical University

Ukraine, 36011, Poltava, 23 Shevchenko str.

Tel.: +380996077977

E-mail: dr.marchenko.o@gmail.com

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article.

Received 25.09.2023

Accepted 27.02.2024

DOI 10.29254/2077-4214-2024-1-172-194-203

UDC 615.273.53+616-006.08

Munko M. A.

EFFECT OF THE ANTICOAGULANT ENOXAPARIN DIRECT ACTION ON THE METASTATIC ACTIVITY OF LEWIS LUNG CARCINOMA

SI "Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences
of Ukraine" (Kyiv, Ukraine)

munandmax@gmail.com

Metastasis is the leading cause of death in patients with cancer. The spread of the tumor process to distant sites occurs mainly through the bloodstream. Tumor growth and aggressiveness largely depend on the ability of cancer cells to cause neoangiogenesis and metastasis. Special attention is paid to the study of various pathological changes in the hemostatic system in cancer patients to improve treatment outcomes by assessing the value of hypercoagulability markers and the coagulation framework of the tumor cell in treating this category of patients.

The aim of the experiment was to investigate the effect of a direct-acting anticoagulant, an antithrombotic drug of the LMWH group, enoxaparin at a dose of 10.0 mg/kg on the metastatic activity of Lewis lung carcinoma (LL), transplanted into male C57BL/6 mice by subcutaneous injection for 20 days and to assess pathological changes in platelet hemostasis, whole blood coagulation activity and their relationship with metastasis progression.

Under conditions of enoxaparin administration at a dose of 10.0 mg/kg against the background of metastatic tumor growth on day 28 of the study, a significant reduction in the metastatic activity of Lewis lung carcinoma was found. A comparative analysis of the platelet component of the hemogram and the coagulation activity of whole blood of experimental animals with LL carcinoma revealed a significant reduction in blood clotting time, pathological enlargement of the spleen (splenomegaly), which is a consequence of increased platelet sequestration and an increase in the splenic pool, causing thrombocytopenia. At the same time, enoxaparin therapy at a dose of 10.0 mg/kg is accompanied by a significant increase in blood clotting time and an increase in the number of platelets in the blood of experimental mice.

Key words: anticoagulants, Lewis lung carcinoma, metastases, C57BL/6 mice.

Connection of the publication with planned research works.

The experimental study was performed within the framework of the research work of the Oncopharmacology Laboratory of the Department of Pharmacology

of the SI "Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine" "Study of the effect of anticoagulants on metastasis and the effectiveness of anticancer therapy" (state registration number 0123U101245).

Introduction.

It is known that malignant neoplasms are one of the most critical medical and social health problems that reduce the quality of life and cause high mortality rates. According to the bulletin of the National Cancer Registry of Ukraine, in 2022, a total of 93276 new cases of cancer were registered in the country (45426 in men and 47850 in women), and 39085 deaths occurred [1].

Even though for patients with certain types of tumors, the 5-year survival rate is 90% [2, 3], a significant number of cases are diagnosed at late stages, after the onset of metastasis; in this case, the 5-year survival rate decreases to (5-25)% [3, 4]. Metastasis is one of the fatal manifestations of tumor growth, the transfer of tumor cells at a distance from the main node and the development of a tumor of the same histological structure in another tissue or organ, and the main cause of death in patients with malignant neoplasms [5].

It has now been proven that malignant tumors have prothrombotic effects and that the degree of hypercoagulation affects the formation of metastases and gives an unfavorable prognosis for cancer patients. Platelet activation and their interaction with a cancer cell are essential in any location of the cancer process, especially in the presence of metastasis [6, 7]. Platelets facilitate the circulation of tumor cells in the circulatory system, as well as their extravasation and colonisation, and can shield tumor cells from the immune response. Platelet depletion or inhibition of platelet activation inhibits tumor metastasis and affects the course of the disease [8, 9]. Therefore, disorders in the hemostasis system in cancer patients require comprehensive correction at all stages of treatment.

To date, there have been studies on the ability of low-molecular-weight heparins to inhibit tumor angiogenesis and proliferation of the OSCC cell line [10]. It is suggested that the antiproliferative effect of heparin is due to its antiangiogenic activity by preventing thrombin formation, inhibiting tissue factor (TF) and fibrin formation [11]. Low-molecular-weight heparins are also the basis for the treatment of cancer-related thromboembolism, but new properties of direct-acting anticoagulants in terms of their effect on metastasis and the effectiveness of anticancer therapy when used in combination with anticancer drugs have not yet been sufficiently studied.

The aim of the study.

This study aims to determine the effect of the direct-acting anticoagulant enoxaparin at a dose of 10.0 mg/kg on the metastatic activity of Lewis lung carcinoma (LL) in C₅₇BL/6 male mice after subcutaneous administration for 20 days and to assess pathological changes in platelet hemostasis and whole blood coagulation activity and their relationship with metastasis progression.

Object and research methods.

In vivo experiments, 37 male mice of the C₅₇BL/6 line weighing 20-22 g (Dali 2001 nursery, Kyiv) were used. The mice were kept in standard vivarium conditions at a temperature of (22-24)°C and relative humidity of (30-70)%, under normal light conditions (12 h of light and 12 h of darkness). The animals were fed ad libitum a standard diet for laboratory animals, and water from the municipal water supply system (after reverse osmosis and UV sterilisation) was provided ad libitum.

The tumorgrowth model used in the experiments was Lewis lung carcinoma (LL). The LL cell strain was obtained from the Human and Animal Cell Bank of the RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine.

LL carcinoma was transplanted at a concentration of $3 \cdot 10^5$ cells in 0.3 ml of saline intramuscularly into the right tibia of C₅₇BL/6 mice [12]. Tumor cells were counted in an MMC-SR chamber [13].

Enoxaparin-Pharmex (Pharmex Group LLC, Ukraine) was used to administer to the animals. The drug was stored in a dark, dry place at a temperature not exceeding 25°C.

Before the study, the Bioethics Committee of the SI «Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine» approved the study protocol and procedures related to the maintenance of animals and their use in the experiment. All animal manipulations were carried out following the Law of Ukraine No. 3447-IV «On the Protection of Animals from Cruelty» [14] and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental Research and Other Scientific Purposes [15].

In the experiment, the animals were divided into the following groups: group one (n=7) – control (without tumour), group two (n=13) – with grafted LL carcinoma, group three (n=17) – with grafted LL carcinoma and under the conditions of enoxaparin administration at a dose of 10.0 mg/kg, subcutaneously, for 20 days. The experimental animals of the second and third groups were further divided into two subgroups according to the term of withdrawal from the experiment (day 28 of the study and monitoring of life expectancy) [16, 17]. Mice of the first and second groups received 0.9% NaCl at a dose of 0.1 ml/20 g per animal.

The animals were identified using a system of individual white tags on the tail.

Animal treatment started on day 5 after the transplantation of LL cells. Enoxaparin was administered subcutaneously at a dose of 10.0 mg/kg for 20 days. Individual doses of the drug were calculated in mg/kg and ml/g, taking into account weekly changes in each animal's body weight.

The effect parameters were the percentage of inhibition of primary tumorgrowth, the number and volume of metastases, and the increase in the life expectancy of experimental animals [16, 17]. The minimum criterion for activity is an inhibition of tumorgrowth of more than 50% [17].

The ellipsoid volume formula determined the tumor volume. To characterise the metastatic activity of LL carcinoma, the presence of metastases in the lungs of experimental animals was assessed on day 28 after transplantation of tumor cells. The number of lung metastases was counted visually and using a binocular stereoscopic microscope MBS-10. The size of a visual metastasis was determined by comparing its diameter with a millimetre scale. The volume of the metastasis was calculated based on the assumption of their sphericity, using the formula for the volume of a sphere. The effect parameters were the percentage of inhibition of the volume and number of metastases in the lungs of experimental animals [12, 16, 17].

Table 1 – Indicators of the platelet component of the blood, their methods of determination and units of measurement

Indicator	Method	Unit of measurement
Platelets	Direct definition	$10^3 \mu\text{l}$
Mean platelet volume	Calculations	fl
Plateletcrit	Calculations	%
Platelet Distribution Width	Calculations	%
Platelet-large cell ratio	Calculations	%

Hypercoagulation and disorganised angiogenesis are observed against the background of tumorprogression. Such disorders cause thrombosis and reduce the rate of intratumoral perfusion and delivery of anticancer drugs by reducing the effective cross-sectional area of blood vessels [18]. The Moravitz clotting time [19] and other methods of determining the clotting time reflect the speed of the fibrinogen-to-fibrin conversion process. This method makes it possible to assess the coagulation activity of whole blood by the rate of clot formation.

Therefore, before the transplantation of LL cells, all experimental mice underwent a Moravitz coagulation time assay [19]. The procedure was performed on days 14 and 28 of the study, which allowed the study to assess the effect of LL carcinoma and LL carcinoma + enoxaparin on the coagulation activity of the blood of experimental mice.

Selected groups of experimental animals were euthanised on day 28 of the study. Immediately before euthanasia, all mice were weighed and tested for coagulation time reduction. Then, under light ether anaesthesia, blood samples were taken from the orbital venous sinus for haematological examination, and euthanasia was performed by cervical dislocation. The spleen was removed from all animals and weighed, and its relative weight was calculated per 100 g of body weight.

A general haematological analysis of venous blood allows us to analyse the level of such indicators of platelet haemostasis as: platelet count, mean platelet volume, plateletcrit, platelet distribution width, and platelet-large cell ratio (**table 1**).

Blood for haematological studies was collected in 0.2 ml tubes with K_3 -EDTA (VOLES, Ukraine) and analysed using an automatic haematological analyser Mythic 22 (Orphée SA, Switzerland).

The normality of the data distribution was checked using the Shapiro-Wilk test. The data obtained were presented as mean $\pm$ error of the mean ($M \pm m$) for normally distributed variables or median and 25th and 75th quartiles [Me (25% ;75%)] for variables with non-normal distribution. The statistical analysis of the experimental results was performed using one-factor analysis of variance (ANOVA) for normally distributed variables and the Kruskal-Wallis test for variables with non-normal distribution. The OriginPro 2023b software was used for statistical data processing. The difference between the studied indicators was statistically significant at $p \leq 0.05$.

Results of the study and their discussion.

Against the background of Lewis lung carcinoma (LL) spontaneously metastasising to the lungs of $C_{57}BL/6$

mice, we studied the effect of enoxaparin on the formation and development of lung metastases and directly on the growth of the primary tumour. The study results showed that on day 28 of the experiment, the number of lung metastases in animals with LL carcinoma was 6.57 ± 0.94 , and their volume was $11.07 \pm 2.77 \text{ mm}^3$. Under the conditions of enoxaparin administration, the number of metastases was 2.0 (2.0; 3.0) (60.88% inhibition), and their volume was 0.065 (0.1; 0.48) mm^3 (96.88% inhibition) (**table 2**).

It should be noted that a significant percentage of inhibition of metastasis growth in the lungs of experimental mice indicates that the dissemination of tumorcells to the lungs from the primary tumorprobably occurred already against the background of tumorprogression and will serve as an experimental justification for the use of direct-acting anticoagulants as a maintenance therapy for the treatment of metastatic tumours.

A study of the effect of enoxaparin on the primary tumorshowed that it has a slight antitumoreffect – 19.3%, which is below the significance criterion ($>50\%$) [17] (**table 2**), and the average life expectancy of the experimental animals was increased by 6.29%.

The studies' results showed that blood coagulation activity was violated against the background of metastatic tumorgrowth.

Table 2 – Effect of enoxaparin on tumorgrowth and metastasis of Lewis lung carcinoma in male $C_{57}BL/6$ mice under subcutaneous administration for 20 days ($m \pm m$ or [me (25%; 75%)], $n=7$)

Indicators	Groups	Carcinoma LL	Carcinoma LL + enoxaparin	p
Number of metastases		$6,57 \pm 0,94$	2,0 (2,0;3,0)*	0,0023
Inhibition by the number of metastases, %		-	60,88	-
Volume of metastases, mm^3		$11,07 \pm 2,77$	0,065 (0,1;0,48)*	0,0006
Inhibition by the volume of metastases, %		-	96,88	-
Primary tumorvolume, mm^3		$5,74 \pm 0,72$	3,48 (3,29;4,56)	0,12
Inhibition by primary tumorvolume, %		-	19,3	-
Average life expectancy, days		$33,40 \pm 0,79$	$35,50 \pm 0,56$	0,08
Increase in life expectancy, %		-	6,29	-

Note: * – $p \leq 0.05$ compared to the group with LL carcinoma.

Reduced blood clotting time occurs only with increased thrombosis and allows us to follow the process in tumorgrowth and metastasis dynamics.

The changes in blood clotting time of experimental animals with LL carcinoma on day 14 of the study indicate an increase in the coagulation activity of whole blood: a decrease in blood clotting time to 2.67 ± 0.05 min, on day 28 of the experiment to 0.31 (0.27; 0.46) min, which indicates hypercoagulation. The introduction of enoxaparin under these experimental conditions contributed to the correction of these indicators; on day 14 of the experiment, the blood clotting time was (4.07 ± 0.74) min, and on day 28 – (2.65 ± 0.46) min (**fig.**).

Thus, enoxaparin corrected the reduction in blood clotting time in animals with LL carcinoma. This effect is probably due to the antithrombotic and anti-inflammatory properties of enoxaparin. The mechanisms of enoxaparin's antithrombotic effect include antithrombin III-dependent inhibition of other coagulation factors, such as factor VIIa, induction of endogenous release of

tissue factor pathway inhibitor (TFPI), and reduction of von Willebrand factor (vWF) release from the vascular endothelium into the circulation. These factors contribute to the overall antithrombotic effect of enoxaparin.

A complete haematological analysis of venous blood allows you to determine the level of platelet haemostasis. Understanding the state of platelet haemostasis can identify potential strategies for further treatment and substantiate the potential function of platelets in regulating tumor-progression.

The analysis of platelet haemostasis showed that in animals of all experimental groups there was a significant decrease in the number of platelets (thrombocytopenia) and plateletcrit: (859.43±53.03) 103/mL; (0.59±0.05)% (control group), (367.71±20.09) 103/mL; (0.24±0.01)% (carcinoma LL), (495.71±21.41) 103/mL; (495.71±21.41) 103/mL; (0.33±0.01)% (enoxaparin), respectively (table 3).

The analysis of the relative weight of the spleen of mice of all experimental groups showed that splenomegaly, a pathological enlargement of the spleen, was observed in animals with metastatic tumorgrowth: 0.52±0.06% (control group), 0.92±0.08% (LL carcinoma), 1.01±0.06% (enoxaparin).

This may be a consequence of increased platelet sequestration and an increase in the splenic pool, which causes thrombocytopenia.

The obtained data provide an idea of the involvement of paraneoplastic hypercoagulable syndrome in the pathogenesis of metastasis and will serve as an experimental justification for using direct-acting anticoagulants as supportive therapy for the treatment of metastatic tumours.

Conclusions.

1. The analysis of the data revealed a significant decrease in the metastatic activity of Lewis lung carcinoma under the conditions of administration of the direct-acting anticoagulant enoxaparin. The study drug inhibited the formation of metastases in the lungs of mice by 60.9%, and growth – by 96.9%.

DOI 10.29254/2077-4214-2024-1-172-194-203

УДК 615.273.53+616-006.08

Мунько М. А.

ВПЛИВ АНТИКОАГУЛЯНТА ПРЯМОЇ ДІЇ ЕНОКСАПАРИНУ НА МЕТАСТАТИЧНУ АКТИВНІСТЬ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНЬ ЛЬОґС

ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (м. Київ, Україна)

munandmax@gmail.com

Метастазування - основна причина смерті хворих з онкопатологією. Поширення пухлинного процесу у віддалені ділянки відбувається переважно з током крові. Збільшення пухлини та її агресивність значною

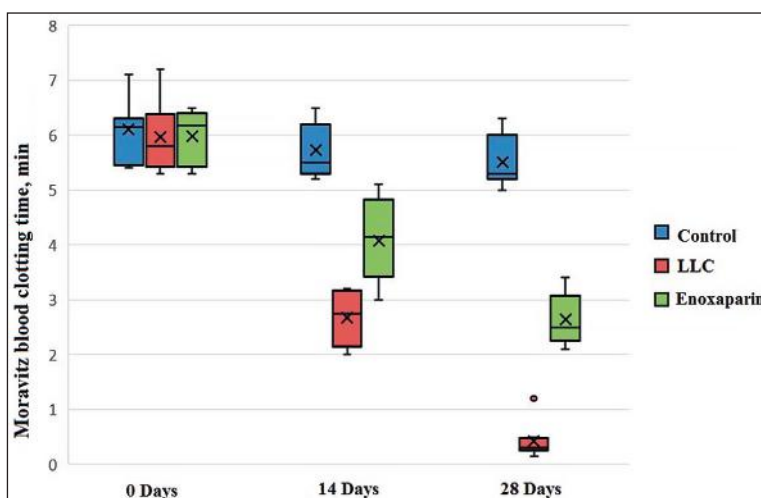


Figure – Dynamics of changes in blood clotting time in male C57BL/6 mice at the studied time points of all experimental groups.

2. Against the background of metastasising tumorgrowth of Lewis lung carcinoma, a hypercoagulable state of the DIC syndrome stage develops, characterised by a significant reduction in blood clotting time, pathological enlargement of the spleen (splenomegaly), which is a consequence of increased platelet sequestration and an increase in the splenic pool, causing thrombocytopenia.

Table 3 – Platelet counts in C57BL/6 haemogram with LL carcinoma and enoxaparin treatment for 20 days (M±m or [Me (25%; 75%)], n=7)

Groups	Platelets, 10 ³ /μl	Mean platelet volume, fl	Mean platelet volume, %	Platelet Distribution Width, %
Control	859,43±53,03	6,9±0,32	0,59±0,05	25,81±1,31
Carcinoma LL	367,71±20,09* p1=0,0002	6,73±0,08 p1=0,8	0,24±0,01* p1=0,0002	36,55±0,96* p1=0,0003
Carcinoma LL+ enoxaparin	495,71±21,41* ** p1=0,0002 p2=0,05	6,65±0,18 p1=0,7 p2=0,9	0,33±0,01* p1=0,0002 p2=0,2	31,0(29,6;32,5)** p1=0,4 p2=0,04

Notes: p1 – compared with the corresponding indicator of the control group; p2 – compared with the corresponding indicator of LL carcinoma.

3. Enoxaparin therapy is accompanied by a significant increase in blood clotting time by 6.2 times and an increase in the number of platelets in the blood of experimental mice against the background of metastatic tumorgrowth.

Prospects for further research.

The development of new treatment regimens for cancer patients aimed at possible platelet targets is a promising area of anticancer therapy that can not only inhibit tumorprogression and metastasis, but also reduce the concomitant risks of thrombotic complications in cancer patients.

мірою залежить від здатності ракових клітин викликати неоангіогенез і метастазування. На теперішній час особливу увагу приділяють вивченню різних патологічних змін системи гемостазу у онкологічних хворих з метою поліпшення результатів лікування шляхом оцінки значення маркерів гіперкоагуляції та коагуляційного каркаса пухлинної клітини у терапії даної категорії хворих.

Метою експерименту було дослідити вплив антикоагулянту прямої дії, антитромботичного лікарського засобу групи НМГ, еноксапарину у дозі 10,0 мг/кг на метастатичну активність карциноми легень Льюїс (LL), перевитої мишам самцям лінії C57BL/6 за умов підшкірного уведення, протягом 20 днів та оцінити патологічні зміни у системі тромбоцитарного гемостазу, коагуляційної активності цільної крові та їх взаємозв'язок із прогресуванням метастазування.

За умов застосування еноксапарину у дозі 10,0 мг/кг на тлі метастазуючого пухлинного росту на 28 день дослідження встановлено значне зниження метастатичної активності карциноми легень Льюїс. У результаті порівняльного аналізу показників тромбоцитарної ланки гемограми, коагуляційної активності цільної крові дослідних тварин з карциномою LL виявлено суттєве зниження часу зсідання крові, патологічне збільшення селезінки (спленомегалія), що є наслідком посиленої секвестрації тромбоцитів і збільшення їх селезінкового пулу, що викликає тромбоцитопенію. Водночас терапія еноксапарином у дозі 10,0 мг/кг супроводжується достовірним збільшенням часу зсідання крові та підвищенням кількості тромбоцитів у крові дослідних мишей.

Ключові слова: антикоагулянти, карцинома легень Льюїс, метастази, миші C57BL/6.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Експериментальне дослідження виконано у рамках науково-дослідної роботи лабораторії онкофармакології відділу фармакології ДУ «ІФТ НАМН України» «Вивчення впливу антикоагулянтів на процеси метастазування та ефективність протипухлинної терапії» (№ державної реєстрації 0123U101245).

Вступ.

Відомо, що злоякісні новоутворення є однією з найважливіших медико-соціальних проблем охорони здоров'я, що знижує якість життя та зумовлює високий рівень смертності. За даними бюлетеня Національного канцер-реєстру України впродовж 2022 р. усього в країні було зареєстровано 93276 нових випадків захворювання на онкопатологію (45426 у чоловіків і 47850 у жінок) та 39085 померлих [1].

Незважаючи на те, що для пацієнтів із деякими типами пухлин 5-річне виживання становить 90% [2, 3], значна частина випадків захворювання діагностується на пізніх стадіях, після початку метастазування; при цьому 5-річне виживання зменшується до (5–25)% [3, 4]. Метастазування – це один із фатальних проявів пухлинного росту, перенесення клітин пухлини на відстань від основного вузла й розвиток пухлини такої ж гістологічної будови в іншій тканині або органі та основна причина смерті хворих на злоякісні новоутворення [5].

На теперішній час доведено, що злоякісні новоутворення мають протромбогенні ефекти і ступінь гіперкоагуляції впливає на утворення метастазів та дає несприятливий прогноз для хворих на рак. Активація тромбоцитів та їх взаємодія з раковою клітиною є важливими за будь-якої локалізації онкологічного процесу, особливо, за наявності метастазування [6, 7]. Тромбоцити сприяють циркуляції пухлинних клітин у кровоносній системі, а також їх екстравазації й колонізації та мають здатність екранувати пухлинні клітини від імунної відповіді. Виснаження тромбоцитів або гальмування їх активації пригнічує метастазування пухлини та впливає на перебіг захворювання [8, 9]. Тому порушення в системі гемостазу у онкологічних хворих потребує комплексної корекції на всіх етапах лікування.

На сьогодні є дослідження щодо здатності низькомолекулярних гепаринів інгібувати пухлинний ангіогенез, проліферацію лінії клітин OSCC [10]. Припускають, що антипроліферативний ефект гепарину зумовлений його антиангіогенною активністю за рахунок перешкоджання утворення тромбіну, інгібування тканинного фактора (TF) та утворення фібрину [11]. Також низькомолекулярні гепарини є основою лікування тромбоемболії пов'язаної з онкопроцесом, але досі не достатньо вивчено нових властивостей антикоагулянтів прямої дії щодо впливу на процеси метастазування, ефективність протипухлинної терапії за умов їх сумісного застосування з протипухлинними препаратами.

Мета дослідження.

Визначити вплив антикоагулянту прямої дії еноксапарину у дозі 10,0 мг/кг на метастатичну активність карциноми легень Льюїс (LL) перевитою мишам самцям лінії C₅₇BL/6 за умов підшкірного уведення протягом 20 днів та оцінити патологічні зміни у системі тромбоцитарного гемостазу, коагуляційної активності цільної крові та їх взаємозв'язок із прогресуванням метастазування.

Об'єкт і методи дослідження.

У експериментах *in vivo* було використано 37 самця мишей лінії C₅₇BL/6 масою тіла 20–22 г. (розплідник «Далі 2001» м. Київ). Мишей утримували в стандартних умовах віварію за температури (22–24)°C та відносної вологості повітря (30–70)%, за звичайного світлового режиму (12 год світла і 12 год темряви). Тваринам згодовувалися *ad libitum* стандартний раціон для лабораторних тварин, вода з міського водогону (після оберненого осмосу та стерилізації УФ-випромінюванням) подавалась *ad libitum*.

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

Карциному LL переливали в концентрації 3·10⁵ клітин у 0,3 мл фізіологічного розчину внутрішньом'язово в праву гомілку мишей лінії C₅₇BL/6 [12]. Підрахунок пухлинних клітин проводили в камері MMC-SR [13].

Для введення тваринам застосовували Еноксапарин-Фармекс (ТОВ «Фармекс Груп», Україна). Препарат зберігався у темному, сухому місці за температури не вище 25°C.

Перед початком дослідження Комітет з біоетики ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ» узгодив протокол дослідження, а також процедури, пов'язані з утриманням тварин та їхнім використанням в експерименті. Усі маніпуляції з тваринами проводились у відповідності до Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [14] та Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та з іншою науковою метою [15].

В експерименті тварини розподілялись на такі групи: перша група (n=7) – контроль (без пухлини), друга група (n=13) – з перевитою карциномою LL, третя група (n=17) – з перевитою карциномою LL та за умов уведення еноксапарину у дозі 10,0 мг/кг, підшкірно, протягом 20 днів. Дослідні тварини другої та третьої групи ще розподілялись на дві підгрупи по терміну виведення з експерименту (28 день дослідження та моніторинг тривалості життя) [16, 17]. Миші першої та другої групи отримували 0,9% NaCl у дозі 0,1 мл/20 г на тварину.

Ідентифікацію тварин проводили з використанням системи індивідуальних білих міток на хвості.

Лікування тварин починали на 5 день після перевивки клітин LL. Еноксапарин застосовувався в дозі 10,0 мг/кг підшкірно, 20 днів. Індивідуальні дози препарату розраховували в мг/кг та мл/г з урахуванням щотижневих змін маси тіла кожної з тварин.

Параметрами ефекту був відсоток гальмування росту первинної пухлини, кількість та об'єм метастазів, збільшення тривалості життя дослідних тварин [16, 17]. Мінімальний критерій активності – гальмування росту пухлини більше 50% [17].

Об'єм пухлини визначався 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 мікроскопу МБС-10. Розмір візуального метастазу визначали шляхом порівняння його діаметра з міліметровою шкалою. Об'єм метастазу розраховували, виходячи з припущення їхньої кулястості, за формулою об'єму кулі. Параметрами ефекту був відсоток гальмування об'єму та кількості метастазів у легенях дослідних тварин [12, 16, 17].

На тлі пухлинної прогресії спостерігається гіперкоагуляція та дезорганізований ангіогенез. Такі порушення викликають тромбоз і знижують швидкість внутрішньопухлинної перфузії та доставку протипухлинних препаратів за рахунок зменшення ефективної площі поперечного перерізу кровоносних судин [18]. Час зсідання крові за методом Моравіца [19], нарівні з іншими методами визначення часу зсідання крові, відображає швидкість процесу переходу фібриногену в фібрин. Цей метод дає змогу оцінити коагуляційну активність цільної крові за швидкістю утворення в ній згустку.

Тому до початку перевивки клітин LL у всіх дослідних мишей було зроблено аналіз на час зсідання крові за Моравіцем [19]. Процедуру проводили на 14 та 28 день дослідження, що дало змогу оцінити вплив карциноми LL, карциноми LL + еноксапарин на коагуляційну активність крові дослідних мишей.

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

Загальний гематологічний аналіз венозної крові дозволяє проаналізувати рівень таких показників тромбоцитарного гемостазу, як: кількість тромбоцитів, середній об'єм тромбоциту, тромбокрит, відносна ширина розподілу тромбоцитів за об'ємом, коефіцієнт великих тромбоцитів (табл. 1).

Таблиця 1 – Показники тромбоцитарної ланки крові, їх методи визначення та одиниці виміру

Показник	Метод	Одиниця вимірювання
Тромбоцити	Пряме визначення	10 ³ /мкл
Середній об'єм тромбоцита	Обчислення	фл
Тромбокрит	Обчислення	%
Відносна ширина розподілу тромбоцитів за об'ємом	Обчислення	%
Коефіцієнт великих тромбоцитів	Обчислення	%

Кров для гематологічних досліджень збирали у пробірки об'ємом 0,2 мл із K₃-ЕДТА («ВОЛЕС», Україна) й аналізували на автоматичному гематологічному аналізаторі Mythic 22 (Orphée SA, Швейцарія).

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

Результати дослідження та їх обговорення.

На тлі спонтанно метастазуючої у легені мишей лінії C₅₇BL/6 карциноми легень Льюїс (LL) нами було досліджено вплив еноксапарину на утворення й розвиток метастазів у легенях та безпосередньо на зростання первинної пухлини. Результати дослідження показали, що на 28 день експерименту кількість метастазів у легенях тварин з карциномою LL становила 6,57±0,94, а їх об'єм складав 11,07±2,77 мм³. За умов уведення еноксапарину кількість метастазів була – 2,0 (2,0;3,0), (60,88% гальмування), а їх об'єм становив – 0,065 (0,1;0,48) мм³ (96,88% гальмування) (табл. 2).

Таблиця 2 – Вплив еноксапарину на пухлинний ріст та метастазування карциноми легень Льюїс перевитої мишам – самцям лінії C₅₇Bl/6 за умов підшкірного уведення протягом 20 днів (M±m або [Me (25%; 75%)], n=7)

Показники	Групи	Карцинома LL	Карцинома LL + еноксапарин	p
Кількість метастазів		6,57±0,94	2,0 (2,0;3,0)*	0,0023
Гальмування за кількістю метастазів, %		-	60,88	-
Об'єм метастазів, мм ³		11,07±2,77	0,065 (0,1;0,48)*	0,0006
Гальмування за об'ємом метастазів, %		-	96,88	-
Об'єм первинної пухлини, мм ³		5,74±0,72	3,48 (3,29;4,56)	0,12
Гальмування за об'ємом первинної пухлини, %		-	19,3	-
Середня тривалість життя, дні		33,40±0,79	35,50±0,56	0,08
Збільшення тривалості життя, %		-	6,29	-

Примітка: * – p<0.05 у порівнянні з групою з карциномою LL.

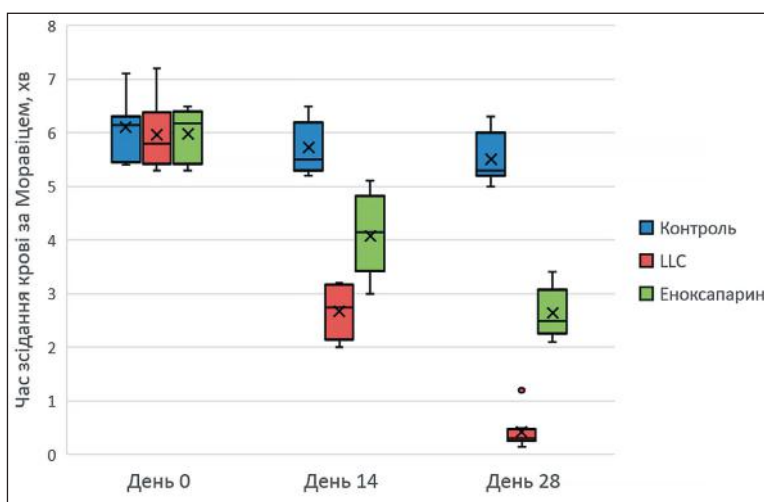


Рисунок – Динаміка змін часу зсідання крові мишей-самців лінії C57BL/6 на досліджуваних термінах усіх експериментальних груп.

Слід відзначити, що значний відсоток гальмування росту метастазів у легенях дослідних мишей вказує на те, що дисемінація пухлинних клітин у легені з первинної пухлини, ймовірно, відбувалась вже на тлі пухлинної прогресії і слугуватимуть експериментальним обґрунтуванням застосування антикоагулянтів прямої дії у якості терапії супроводу для лікування метастазуючих форм пухлин.

Дослідження впливу еноксапарину щодо первинної пухлини показало, що він має незначний протипухлинний ефект- 19,3% це нижче критерію значущості (>50%) [17] (таблиця 2), а середня тривалість життя дослідних тварин була збільшена на 6,29%.

Таблиця 3 – Показники тромбоцитарної ланки гемограми C57BL/6 із перевитою карциномою LL і за умов уведення еноксапарину протягом 20 днів (M±m або [Me (25%; 75%)], n=7)

Групи	Тромбоцити, 10 ³ /мкл	Середній об'єм тромбоцита, фл	Тромбоцит, %	Відносна ширина розподілу тромбоцитів за об'ємом, %
Контроль	859,43±53,03	6,9±0,32	0,59±0,05	25,81±1,31
Карцинома LL	367,71±20,09*	6,73±0,08	0,24±0,01*	36,55±0,96*
Карцинома LL+ еноксапарин	495,71±21,41**	6,65±0,18	0,33±0,01*	31,0(29,6;32,5)**

Примітки: p1 – у порівнянні з відповідним показником контрольної групи; p2 – у порівнянні з відповідним показником карциноми LL.

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

Скорочення часу зсідання крові зустрічається тільки за підвищеного тромбоутворення і дозволяє прослідкувати процес у динаміці на тлі росту та метастазування пухлини.

Виявлені нами зміни часу зсідання крові дослідних тварин з карциномою LL на 14 день дослідження свідчать про підвищення коагуляційної активності цільної крові: скорочення часу зсідання крові до 2,67±0,05 хв, на 28 день досліду до 0,31 (0,27;0,46) хв, що свідчить про гіперкоагуляцію. Уведення еноксапарину за даних умов експерименту сприяло корекції зазначених показників, на 14 день досліду час зсідання крові становив – (4,07±0,74) хв, на 28 день – (2,65±0,46) хв (рис.).

Отже, еноксапарин коригував скорочення часу зсідання крові в тварин з карциномою LL. Ймовірно, цей ефект обумовлений антитромбінними та протизапальними властивостями еноксапарину. Серед механізмів антитромбінного ефекту еноксапарину треба виділити: антитромбін III-залежне інгібування інших факторів зсідання крові, напр., таких як фактор VIIa, індукція ендогенного вивільнення інгібітора шляху тканинного фактора (TFPI), а також зменшення вивільнення фактора фон Віллебранда (vWF) з судинного ендотелію у циркуляторне русло. Ці фактори роблять свій внесок у загальний антитромбінний ефект еноксапарину.

Загальний гематологічний аналіз венозної крові дозволяє визначити рівень показників тромбоцитарного гемостазу. Розуміння стану тромбоцитарного гемостазу може визначити потенційні стратегії подальшого лікування та обґрунтувати потенційну функцію тромбоцитів у регуляції прогресування новоутворення.

Аналіз тромбоцитарного гемостазу показав, що у тварин усіх дослідних груп відмічається значне зниження кількості тромбоцитів (тромбоцитопенія) та тромбоцитів: (859,43±53,03) 103/мкл; (0,59±0,05)% (контрольна група), (367,71±20,09) 103/мкл; (0,24±0,01)% (карцинома LL), (495,71±21,41) 103/мкл; (495,71±21,41) 103/мкл; (0,33±0,01)% (еноксапарин) відповідно (табл. 3).

Аналіз відносної маси селезінки мишей усіх дослідних груп показав, що у тварин на тлі метастазуючого пухлинного росту спостерігається спленомегалія – патологічне збільшення

селезінки: $0,52 \pm 0,06\%$ (контрольна група), $0,92 \pm 0,08\%$ (карцинома LL), $1,01 \pm 0,06\%$ (еноксапарин).

Це може бути наслідком посиленої секвестрації тромбоцитів і збільшення їх селезінкового пулу, що викликає тромбоцитопенію.

Отримані дані дають уявлення про участь паранеопластичного гіперкоагуляційного синдрому в патогенезі метастазування так і слугуватимуть експериментальним обґрунтуванням застосування антикоагулянтів прямої дії у якості терапії супроводу для лікування метастазуючих форм пухлин.

Висновки.

1. Аналіз отриманих даних виявив значне зниження метастатичної активності карциноми легень Льюїс за умов уведення антикоагулянту прямої дії еноксапарину. Досліджуваний препарат гальмував утворення метастазів у легенях мишей на 60,9%, а зростання – на 96,9%.

2. На тлі метастазуючого пухлинного росту карциноми легень Льюїс розвивається гіперкоагуляційний

стан стадії ДВЗ-синдрому, що характеризується суттєвим зниженням часу зсідання крові, патологічним збільшенням селезінки (спленоомегалія), що є наслідком посиленої секвестрації тромбоцитів і збільшення їх селезінкового пулу, що викликає тромбоцитопенію.

3. Терапія еноксапарином супроводжується суттєвим зростанням часу зсідання крові у 6,2 рази та підвищенням кількості тромбоцитів у крові дослідних мишей на тлі метастазуючого пухлинного росту.

Перспективи подальших досліджень.

Розробка нових схем лікування онкологічних пацієнтів спрямованих на можливі тромбоцитарні мішені, є перспективним напрямком протипухлинної терапії здатної не тільки загальмувати прогресування пухлини та метастазування, але й знизити супутні ризики тромботичних ускладнень у онкологічних хворих.

References / Література

1. Fedorenko ZP, Sumkina OV, Zuba VO, Horokh YeL, Hulak LO, Ryzhov Alu, ta in. Rak v Ukraini, 2021-2022. Zakhvoriuvaniist, smertnist, pokaznyky diialnosti onkologichnoi sluzhby. Biuleten Natsionalnoho kantser-reiestru Ukrainy № 24 [Internet]. Kyiv: Natsionalnyi kantser-reiestr Ukrainy; 2023 [cited 2023 Ver 18]; 145 p. Dostupno: . [in Ukrainian].
2. Maciel EO, Carvalhal GF, da Silva VD, Batista JrEL, Garicochea B. Increased Tissue Factor Expression and Poor Nephroblastoma Prognosis. J Urol. 2009 Oct 6;182(4):1594-9.
3. Silva DD, Noronha JAP, Silva VD, Carvalhal GF. Increased Tissue Factor Expression is an Independent Predictor of Mortality in Clear Cell Carcinoma of the Kidney. Int Braz J Urol. 2014 Aug 4;40(4):499-506.
4. Davis ME. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. Clin J Oncol Nurs. 2016 Nov 25;20(5):2-8.
5. Atamanenko YA, Mykhailov YV. Patofyziolohiya opukholevoho rosta. Gomel: GoSMU; 2008. 40 s.
6. Desiateryk VI, Shevchenko YeS, Medvedkov OV. Hemostatychni mekhanizmy hematohennoho metastazuvannia pukhlyny. Surgery of Ukraine. 2015;4:96-104. [in Ukrainian].
7. Zhang M, Huang XZ, Song YX, Gao P, Sun JX, Wang ZN. High Platelet-to-Lymphocyte Ratio Predicts Poor Prognosis and Clinicopathological Characteristics in Patients with Breast Cancer: A Meta-Analysis. Biomed Res Int [Internet]. 2017 Aug 31 [cited 2023 Ver 14];2017:1-11. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/9503025/>.
8. Mitchell MJ, King MR. Fluid shear stress sensitizes cancer cells to receptor-mediated apoptosis via trimeric death receptors. New J Phys. 2013 Jan 18;15(1):1-18.
9. Egan K, Cooke N, Kenny D. Living in shear: Platelets protect cancer cells from shear induced damage. Clin Exp Metast. 2014 Jun 19;31(6):697-704.
10. Camacho-Alonso F, Gomez-Albentosa T, Onate-Sanchez RE, Tudela-Mulero MR, Sánchez-Siles M, Gómez-García FJ, et al. In Vitro Study of Synergic Effect of Cisplatin and Low Molecular Weight Heparin on Oral Squamous Cell Carcinoma. Front Oncol. 2020;10(549412):1-11. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2020.549412/full>.
11. Ueda K, Inoue S, Zhang Y, Kutsuna T, Inoue S, Noto K, et al. Heparin Induces Apoptosis through Suppression of AKt in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. Anticancer Res. 2009 Apr 1;29(4):1079-88.
12. Lykhova AA, Kudryavets YI, Strokovska LI, Bezdenezhnykh NA, Semesiuk NI, Adamenko IN, et al. Suppression of proliferation, tumorigenicity and metastasis of lung cancer cells after their transduction by interferon-beta gene in baculovirus vector. Cytokine. 2015 Feb;71(2):318-26.
13. Seredynska NM, Sharykina NI, Khavych OO, Karatsuba TA, Bukhtiarova TA, Marchenko OM, vynakhidnyky; DU «Instytut farmakolohii ta toksykolohii NAMN Ukrainy» patentovlasnyk. Sposib perevyvky eksperymentalnykh pukhlyn (sarkoma 45 (S-45) ta kartsynosarkoma Uokera W256). Patent Ukrainy №149330. 2021 Lyst 10. [in Ukrainian].
14. Verhovna Rada Ukrainy. Zakon Ukrainy № 3447-IV Pro zakhyst tvaryn vid zhorstokoho povodzhennia [Internet]; Kyiv: VRU; 2023 [cited 2023 Ver 10]. Dostupno: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text>. [in Ukrainian].
15. Council of Europe. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe; 1986. 53 p.
16. Balytskyi KP, redaktor. Metastazyrovanye opukholei: patohenetycheskye aspekty. Kyev: Nauk. dumka; 1991. 200 s.
17. Stefanov OV, redaktor. Doklinichni doslidzhennia likarskykh zasobiv. Kyiv: Avitsena; 2001. 528 s. [in Ukrainian].
18. Wang J, Zhu C. Anticoagulation in combination with antiangiogenesis and chemotherapy for cancer patients: evidence and hypothesis. Onco Targets Ther. 2016 Jul 29;9:4737-46.
19. Bazaev IA, Przhivalgovskaya AV, Rudenko PA, Trovin AV, Lifshits GI. Modern Methods for Measuring Parameters of Blood Coagulation. Biomed Eng. 2015 Sep 21;49:136-41.

ВПЛИВ АНТИКОАГУЛЯНТА ПРЯМОЇ ДІЇ ЕНОКСАПАРИНУ НА МЕТАСТАТИЧНУ АКТИВНІСТЬ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНЬ ЛЬЮЇС

Мунько М. А.

Резюме. Метастазування – це один із фатальних проявів пухлинного росту, перенесення клітин пухлини на відстань від основного вузла й розвиток пухлини такої ж гістологічної будови в іншій тканині або органі та основна причина смерті онкологічних хворих. На теперішній час доведено, що злоскісні новоутворення мають протромбогенні ефекти і ступінь гіперкоагуляції впливає на утворення метастазів та дає несприятливий прогноз для хворих на рак. Активація тромбоцитів та їх взаємодія з раковою клітиною є важливими за будь-якої локалізації онкологічного процесу, особливо, за наявності метастазування. Тромбоцити сприяють циркуляції пухлинних клітин у кровоносній системі, а також їх екстравазації й колонізації та мають здатність екранувати пухлинні клітини від імунної відповіді. Виснаження тромбоцитів або гальмування їх активації при-

гнічує метастазування пухлини та впливає на перебіг захворювання. Тому порушення в системі гемостазу у онкологічних хворих потребує комплексної корекції на всіх етапах лікування. У літературних джерелах відмічають здатність низькомолекулярних гепаринів інгібувати пухлинний ангиогенез, проліферацію лінії клітин OSCC. Припускають, що антипроліферативний ефект гепарину зумовлений його антиангіогенною активністю за рахунок перешкоджання утворення тромбіну, інгібування тканинного фактора (TF) та утворення фібрину. Також низькомолекулярні гепарини є основою лікування тромбоемболії пов'язаної з онкопроцесом, але досі не достатньо вивчено нових властивостей антикоагулянтів прямої дії щодо впливу на процеси метастазування, ефективність протипухлинної терапії за умов їх сумісного застосування з протипухлинними препаратами.

Метою роботи було визначити вплив антикоагулянту прямої дії еноксапарину у дозі 10,0 мг/кг на метастатичну активність карциноми легень Льюїс, перевитою мишам самцям лінії C₅₇BL/6 за умов підшкірного уведення протягом 20 днів та оцінити патологічні зміни у системі тромбоцитарного гемостазу, коагуляційної активності цільної крові та їх взаємозв'язок із прогресуванням метастазування.

Дослідження проведено на 37 самцях мишей лінії C₅₇BL/6, масою тіла 20-22 г. Карциному легень Льюїс (LL) перевивали в концентрації $3 \cdot 10^5$ клітин у 0,3 мл фізіологічного розчину внутрішньом'язово в праву голімку мишей лінії C₅₇BL/6. В експерименті тварини розподілялись на такі групи: перша група – контроль (без пухлини), друга група – з перевитою карциномою LL, третя група – з перевитою карциномою LL та за умов уведення еноксапарину у дозі 10 мг/кг, підшкірно, протягом 20 днів. Дослідні тварини другої та третьої групи ще розподілялись на дві підгрупи по терміну виведення з експерименту (28 день дослідження та моніторинг тривалості життя). Миші першої та другої групи отримували 0,9% NaCl у дозі 0,1 мл /20 г на тварину. Лікування тварин починали на 5 день після перевивки клітин LL. До початку перевивки клітин LL у всіх експериментальних мишей було зроблено аналіз на час зсідання крові за Моравіцем. Процедура проводили на 14 та 28 день дослідження, що дало змогу оцінити вплив карциноми LL, карциноми LL+ еноксапарин на коагуляційну активність крові дослідних мишей. На 28 день дослідження тварин відібраних груп неживлювали, визначали гематологічні параметри, вилучали легені для підрахунку метастазів та селезінку для подальшого аналізу.

Аналіз отриманих даних виявив значне зниження метастатичної активності карциноми легень Льюїс за умов уведення антикоагулянту прямої дії еноксапарину. Досліджуваний препарат гальмував утворення метастазів у легенях мишей на 60,9%, а зростання – на 96,9%.

За нашими результатами, порушення коагуляційної активності крові виникає на тлі метастазування пухлини. Час зсідання крові у тварин з перевитою карциномою LL знижувався майже у 13 разів, що вказує на гіперкоагуляційний стан на стадії ДВЗ-синдрому. У крові тварин з карциномою LL спостерігалось зниження кількості тромбоцитів у 2,29 рази, що свідчить про посилену секвестрацію, яка характеризується їх перерозподілом з пулу циркулюючих тромбоцитів на користь селезінкового пулу. Водночас терапія еноксапарином у дозі 10 мг/кг супроводжується достовірним збільшенням часу зсідання крові у 6,2 рази та підвищенням кількості тромбоцитів у крові дослідних мишей.

Отримані дані дають уявлення про участь паранеопластичного гіперкоагуляційного синдрому в патогенезі метастазування та можуть стати основою обґрунтування застосування прямих антикоагулянтів прямої дії у якості терапії супроводу для лікування метастазуючих форм пухлин.

Ключові слова: антикоагулянти, карцинома легень Льюїс, метастази, миші C₅₇BL/6.

EFFECT OF THE ANTICOAGULANT ENOXAPARIN DIRECT ACTION ON THE METASTATIC ACTIVITY OF LEWIS LUNG CARCINOMA

Munko M. A.

Abstract. Metastasis is one of the fatal manifestations of tumor growth; it is the transfer of tumor cells at a distance from the main node and the development of a tumor of the same histological structure in another tissue or organ and the main cause of death in cancer patients. Today it has been proven that malignant neoplasms have prothrombogenic effects and the degree of hypercoagulability affects metastasis and gives a poor prognosis for cancer patients. Activation of platelets and their interaction with a cancer cell is important for any localization of the oncological process, especially in the presence of metastasis. Platelets promote the circulation of tumor cells in the circulatory system, as well as their extravasation and colonization, and they can shield tumor cells from the immune response. Depletion of platelets or inhibition of their activation inhibits tumor metastasis and affects the course of the disease. Therefore, disturbances in the hemostatic system in cancer patients require complex correction at all stages of the treatment. Literature sources note the ability of low molecular weight heparins to inhibit tumor angiogenesis and proliferation of the OSCC cell line. The antiproliferative effect of heparin is thought to be due to its antiangiogenic activity by inhibiting thrombin formation, tissue factor (TF) inhibition, and fibrin formation. In addition, low-molecular-weight heparins are the basis for the treatment of thromboembolism associated with the oncological process, but the new properties of direct-acting anticoagulants on the effect on metastasis processes and the effectiveness of antitumor therapy (when used together with anticancer drugs) have not yet been sufficiently studied.

The work aimed to determine the effect of the direct anticoagulant enoxaparin at a dose of 10.0 mg/kg when administered subcutaneously for 20 days on the metastatic activity of Lewis lung carcinoma (LL) transplanted into male C₅₇BL/6 mice and to evaluate the platelet hemostasis system pathological changes and its relationship with the progression of metastasis.

The study was carried out on 37 male C₅₇BL/6 mice with body weight 20-22 g. LLCarcinoma was grafted at a concentration of 3×10^5 cells in 0.3 ml of physiological solution intramuscularly into the right shin of C₅₇BL/6 mice. The animals were divided into the following groups: I – control (without tumor), II – LL carcinoma, III – LL carcinoma+enoxaparin. Mice of the first and second groups received 0.9% NaCl at a dose of 0.1 ml/20 g per animal.

Animals of the second and third groups were also divided into two subgroups according to the period of withdrawal from the experiment (day 28 of the study and life expectancy monitoring). Treatment of animals began on the 5th day after transplantation of LL cells. Before the start of LL cell inoculation, all mice underwent a Morawitz blood clotting time test. The procedure was carried out on days 14 and 28 of the study, which made it possible to evaluate the effect of LL carcinoma and LL carcinoma+ enoxaparin on the coagulation activity of the experimental mice blood. On the 28th day of the study, animals of the corresponding groups were euthanized for hematological parameters examination, and the removal of lungs (for metastases counting) and spleen (for further examination). Analysis of the data obtained revealed a significant decrease in the metastatic activity of LL carcinoma with the administration of the direct anticoagulant enoxaparin. The drug studied inhibited the formation of metastases in the lungs by 60.9% and its growth by 96.9%.

According to our results, a disturbance of blood coagulation activity occurs at the background of metastasizing tumor growth. The blood clotting time in animals with grafted LL carcinoma decreased almost 13 times, which indicates a hypercoagulable state at the stage of DIC syndrome. There was a 2.29-fold decrease in the number of platelets in the blood of animals with LL carcinoma, which indicates their enhanced sequestration, characterized by redistribution from the pool of circulating platelets in favor of the splenic pool. At the same time, therapy with enoxaparin at a dose of 10 mg/kg was accompanied by a significant increase in blood clotting time by 6.2 times and an increase in the number of platelets in the blood of experimental mice.

The data obtained provide insight into the involvement of paraneoplastic hypercoagulability syndrome in the pathogenesis of metastasis and can form the basis for experimental justification for the use of direct anticoagulants as accompanying therapy for the treatment of metastatic forms of tumors.

Key words: anticoagulants, Lewis lung carcinoma, metastases, C₅₇BL/6 mice.

ORCID and contributionship: / ORCID автора та його внесок до статті:

Munko M.A.: <https://orcid.org/0000-0001-7784-9625> ^{ABCDEF}

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Munko Maksym Andriiovych / Мунько Максим Андрійович

SI «Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine» / ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»

Ukraine, 03057, Kyiv, 14 Anton Tsedik str. / Адреса: Україна, 03057, м. Київ, вул. Антона Цедіка 14

Tel.: 0685105243 / Тел.: 0685105243

E-mail: munandmax@gmail.com

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статистичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 28.09.2023 / Стаття надійшла 28.09.2023 року

Accepted 28.02.2024 / Стаття прийнята до друку 28.02.2024 року

DOI 10.29254/2077-4214-2024-1-172-203-208

UDC 616-74:615.462:678.742.3:57.084

Nakonechna O. A., Kyslov O. V.

THE ROLE OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN RATS AFTER IMPLANTATION OF POLYPROPYLENE SURGICAL MESH WITH A COATING BASED ON TANTALUM AND ITS DERIVATIVES

Kharkiv National Medical University (Kharkiv, Ukraine)

ov.kyslov@knmu.edu.ua

Since the early 2000s, polypropylene has become the main material used in hernia repair. However, negative statistics regarding the development of the inflammatory process after implantation of surgical meshes made of different materials still remain disappointing. The development of the inflammatory process after implantation of polypropylene surgical meshes is observed in 30-40% of patients. These data force scientists all over the world to continue the search for the optimal surgical mesh according to the chemical composition, which would suit specialists not only from the side of the physical properties of the surgical mesh, but also from the side of its biocompatible and anti-inflammatory properties. In recent years, tantalum has been successfully used to produce biocompatible medical implants in surgery, orthopedics, and orthodontics.

The aim of our study was to determine the content of IL-18 and IL-6 in the blood plasma of experimental animals 28 days after implantation of polypropylene surgical meshes with a coating based on tantalum and its derivatives, in particular tantalum oxide and nitride.

The experimental groups included 40 male rats of the WAG population. A 15x15mm polypropylene surgical mesh with different types of coatings was implanted between the abdominal wall and the colon with the help of surgery. 28 days after surgery, blood was collected to determine the content of IL-18 and IL-6.