

FEATURES OF HAEMATOLOGICAL PARAMETER CHANGES IN C57BL/6 MICE DURING PRIMARY TUMOR GROWTH AND METASTATIC PROGRESSION OF LEWIS LUNG CARCINOMA

SI "Institute of Pharmacology and Toxicology of NAMS of Ukraine" (Kyiv, Ukraine)

munandmax@gmail.com

It is well known that tremendous progress has been made to date in understanding the pathogenesis of malignant tumours and developing effective treatments that have significantly improved the prognosis for cancer patients. However, challenges remain in detecting metastatic spread before overt metastases are established and in predicting which patients are at most significant risk of developing metastatic disease, which is the leading cause of death. Screening tests can help to improve the management of metastatic disease, even before symptoms appear, by providing an accurate picture of when metastatic spread occurs and how this process determines the risk profile of cancer patients at diagnosis, throughout treatment, and in remission.

One of the most reliable paraclinical methods of diagnosing diseases is the assessment of haematological blood parameters, which allows the detection of the progression of the oncological process. Today, special attention is focused on disorders in the hemostatic system, which are one of the most essential components of the pathogenesis of the tumour process.

This study aimed to evaluate the hemogram parameters of male C57BL/6 mice with primary Lewis lung carcinoma (LL) tumour and its metastatic progression and assess changes under the conditions of direct-acting anticoagulants to determine biomarkers associated with metastasis.

Based on the studies, a significant decrease in the total platelet count and thrombocrit percentage was found against the background of growth of the primary LL carcinoma tumor and the background of its metastatic progression. Regarding the platelet index – the relative width of platelet distribution by volume (an indicator of platelet heterogeneity), a correlation with the progression of LL carcinoma metastasis was noted. This indicator increased by 15.21-41.65% in the background of the primary tumour – there were no differences compared to intact animals. The use of direct-acting anticoagulants enoxaparin and sulodexide, which inhibited the formation of metastases in the lungs of animals by 60.88% and 63.79%, respectively, significantly increased the number of platelets and decreased the percentage of relative platelet distribution by volume by 15.21% and 1.8%, respectively.

Key words: hemogram, Lewis lung carcinoma, metastases, anticoagulants.

Connection of the publication with planned research works.

The experimental study was performed within the framework of the research work of the Laboratory of Oncopharmacology of the Department of Pharmacology of the SI «Institute of Pharmacology and Toxicology of NAMS of Ukraine» «Study of the effect of anticoagulants on metastasis and the effectiveness of antitumor therapy» (state registration number 0123U101245).

Introduction.

On August 2, 2024, the Cabinet of Ministers of Ukraine approved the National Strategy for the Control of Malignant Tumors until 2030. The strategy was developed to implement the state policy on cancer control, reduce morbidity and mortality caused by cancer, and ensure high-quality, affordable treatment and rehabilitation of cancer patients [1]. Implementation of the National Cancer Control Strategy is key to an effective and systematic fight against cancer, which is one of the leading causes of death not only in Ukraine but also in the world. One of the critical areas of this strategy is to ensure the primary prevention of cancer and promote its early detection.

It should be noted that the effectiveness of treatment of cancer patients and patients in remission, even at least 5 to 10 years after diagnosis and who continue to risk local and regional and metastatic recurrence, depends primarily on their early and timely diagnosis [2].

Currently, hypercoagulability is considered not just a secondary phenomenon in the setting of cancer but

an active factor in the development and progression of malignant tumours. Additional diagnostic criteria for screening for recurrence and secondary malignancies will allow for proper treatment planning and outcome prediction. The use of anticoagulants as adjunctive therapy can also positively impact the growth and spread of malignancy.

The aim of the study.

To evaluate the hemogram parameters of male C₅₇BL/6 mice with primary Lewis lung carcinoma (LL) tumour and its metastatic progression and to assess changes after administration of direct-acting anticoagulants to determine biomarkers associated with metastasis.

Object and research methods.

In vivo experiments, 56 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. According to the experimental groups, mice were housed in polycarbonate cages (410 × 250 × 180) mm in size with galvanised steel lids. The cages were equipped with plastic drinkers. The bedding was sawdust from black alder (*Alnus glutinosa*), previously subjected to autoclaving.

The tumour growth 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 R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Carcinoma LL was transfected at a concentration of $2 \cdot 10^6$ cells according to the method for selecting substances with antitumor activity [3] and $3 \cdot 10^5$ cells to model the process of metastasis by 0.3 ml of saline intramuscularly in the right shin of C₅₇BL/6 mice [4]. Tumor cells were counted in the MMC-SR chamber [5].

The following drugs were administered to the animals: VesselDue F (sulodexide), manufactured by Alphasigma and Enoxaparin-Pharmex (Pharmex Group LLC, Ukraine [6, 7]. The drugs were stored in a dark, dry place at a temperature not exceeding 25°C.

Prior to the study, the Bioethics Committee of the SI «Institute of Pharmacology and Toxicology of NAMS of Ukraine» approved the study protocol and procedures related to animal maintenance and use in the experiment. All animal manipulations were performed following the Law of Ukraine No. 3447-IV «On the Protection of Animals from Cruelty» [8] and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental Research and Other Scientific Purposes [9].

The experiment was divided into three experiments. In the first experiment, animals were divided into two groups of 7 mice each: Group I – control (intact animals), Group II – with tumorigenic LL carcinoma at a cell concentration of $2 \cdot 10^6$ cells. The animals were euthanized on day 14 of the study. In the second and third experiments, the animals were divided into three groups of 7 animals each: Group I – control without tumour, Group II – with tumorigenic LL carcinoma ($3 \cdot 10^5$ cells), Group III (with tumorigenic LL carcinoma) – were administered direct-acting anticoagulants: enoxaparin and sulodexide. Animals were euthanized on day 28 of the study [6, 7].

Animal treatment started on day 5 after the tumourigenesis of LL carcinoma cells. Enoxaparin was administered at 10.0 mg/kg subcutaneously for 20 days. Sulodexide was administered at 2.0 mg/kg (20 LU/kg) intramuscularly for 20 days. Individual doses of the drug were calculated in mg/kg and ml/g, taking into account weekly changes in the body weight of each animal. Control animals of the second experiment received a placebo on day 5 after tumourigenesis of LL carcinoma cells with 0.9% NaCl at a dose of 0.1 ml/20 g per animal, subcutaneously; animals of the third experiment received 0.9% NaCl, 0.05 ml/20 g of body weight, intramuscularly [6, 7].

Selected groups of experimental animals were euthanized on day 14 and day 28 of the study. Immediately before euthanasia, all mice were weighed, and blood samples were taken from the orbital venous sinus for haematological examination

under light ether anaesthesia and euthanized by cervical dislocation. The lungs were removed from all animals for macroscopic studies, and the spleen was removed, the relative weight of which was calculated per 100 g of body weight [6, 7]. The tumour volume was determined by the ellipsoid volume formula [3].

A complete haematological analysis of venous blood allows for the assessment of blood cell content, including haemoglobin, erythrocytes, erythrocyte indices, leukocytes, the leukocyte formula, platelets, and platelet indices. Each of these blood components has a specific function in the body and plays a role in various physiological processes. This analysis enables the identification of haematopoietic system pathologies or helps rule out risk factors for their development. Additionally, it assists in evaluating the effectiveness of the prescribed treatment.

Blood for haematologic studies was collected in 0.2 ml tubes with K₃-EDTA (Voles, Ukraine) and analyzed using an automatic haematology analyzer Mythic 22 (Orphée SA, Switzerland) (table 1).

The normality of the data distribution was checked by the Shapiro-Wilk test. The data obtained were presented as the mean $\pm$ error of the mean ($M \pm m$) for normally distributed variables or the 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 program was used for statistical data processing. The difference between the studied indicators was considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

Research results study and their discussion.

In this study, we compared the haemogram parameters of experimental mice against the background of primary LL tumour growth (day 14 of the study), its metastatic progression and under the conditions of direct anticoagulant administration: enoxaparin sulodexide (day 28 of the study).

Table 1 – Indicators, methods of their determination and units of measurement used in the tests of the haematology analyzer Mythic 22

Indicator	Method of determination	Unit of measurement
Haemoglobin	Direct determination	g/dL
Erythrocytes (Red Blood Cells)	Direct determination	$10^6/\mu\text{L}$
Haematocrit	Direct determination	%
Mean corpuscular volume	Calculation	fL
Mean corpuscular haemoglobin concentration	Calculation	g/dL
Mean corpuscular haemoglobin	Calculation	pg
Red cell distribution width – coefficient of variation	Calculation	%
Red cell distribution width – standard deviation	Calculation	fL
Leukocytes	Direct determination	$10^3/\mu\text{L}$
Neutrophils, lymphocytes, eosinophils, basophils, monocytes	Direct determination, calculation	$10^3/\mu\text{L}$, %
Platelets	Direct determination	$10^3/\mu\text{L}$
Mean platelet volume	Calculation	fL
Thrombocrit	Calculation	%
Platelet distribution width	Calculation	%
Platelet-large cell ratio	Calculation	%

Table 2 – Haemogram parameters of C₅₇BL/6 male mice with LL carcinoma on day 14 of the study (M±m or [Me (25%; 75%)], n=7)

Indicator, units of measurement	Control (intact animals)	LLC	p
Leukocytes, 10 ³ /μL	7,6±1,84	10,83±0,08*	0,0006
Lymphocytes, %	86,44±3,66	78,93±2,88*	0,001
Monocytes, %	5,23±2,15	10,61±1,33*	0,0001
Neutrophils, %	4,97±2,11	3,74±0,6	0,16
Eosinophils, %	0,53±0,43	0,11±0,07*	0,03
Basophils, %	2,97±0,65	6,6±1,28*	0,00002
Lymphocytes, 10 ³ /μL	7,29±1,45	8,6(8,3;9)	0,22
Monocytes, 10 ³ /μL	0,41±0,2	1,17±0,14*	0,000003
Neutrophils, 10 ³ /μL	0,34±0,13	0,41±0,07	0,22
Eosinophils, 10 ³ /μL	0(0;0,1)	0	0,2
Basophils, 10 ³ /μL	0,2(0,2;0,3)	0,71±0,13*	0,002
Erythrocytes, 10 ⁶ /μL	9,94(9,47;10,13)	8,24(8,2;8,28)*	0,02
Haemoglobin, g/dL	13,8(13,8;14,2)	11,79±0,09*	0,03
Haematocrit, %	44,5(42,6;44,8)	37,26±0,53*	0,03
Mean corpuscular volume, fL	44,74±1,64	45,29±0,53	0,42
Mean corpuscular haemoglobin, pg	13,8(13,7;14,9)	14,34±0,1	0,2
Mean corpuscular haemoglobin concentration, g/dL	31,5±0,65	31,64±0,36	0,6
Red cell distribution width – coefficient of variation, %	13,7(12,7;15,8)	12,91±0,21	0,2
Red cell distribution width – standard deviation, fL	24,01±2,31	23(22,8;24,8)	0,7
Platelets, 10 ³ /μL	760,29±149,32	520(498;585)*	0,03
Mean platelet volume, fL	6,9±0,68	6,5(6,4;6,6)	0,1
Thrombocrit, %	0,52±0,09	0,34(0,32;0,39)*	0,015
Platelet distribution width, %	34,31±7,11	34,8(34,2;38,3)	0,9
Platelet-large cell ratio, %	9,41±4,63	4,8±0,93*	0,02

Note: * – p<0.05 in comparison with animals of the control group.

The experiment results showed that on day 14 of the study in male C₅₇BL/6 mice, the tumour volume was 4.11±0.06 cm³ against the background of primary tumour growth of LL carcinoma, with no lung metastases

visualized. Analysis of the relative weight of the spleen of mice in the experimental group showed that the animals with tumour growth showed an increase in the mass coefficients of the spleen: 0.53±0.03% (intact animals), 0.60±0.01% (p=0.03) (LL carcinoma).

The general haematological analysis of the venous blood of experimental mice allowed the assessment of changes in haemogram parameters against the background of tumour growth (table 2).

The presented data show that in male C₅₇BL/6 mice with LL carcinoma on day 14 of the study, the number of leukocytes significantly increased compared to the control group (table 2). These changes were due to an increase in the number of monocytes: 5.23±2.15·10³/μL

(control group), 10.61±1.33·10³/μL (LL) and the number of basophils: 0.2 (0.2; 0.3)·10³/μL (control group), 0.71±0.13·10³/μL (LL). The analysis of the leukocyte for-

Table 3 – Haemogram parameters of male C57BL/6 mice with LL carcinoma and enoxaparin treatment for 20 days on day 28 of the study (M±m or [Me (25%; 75%)], n=7)

Indicator, units of measurement	Control	LLC	p1	LLC + enoxaparin	p1	p2
Leukocytes, 10 ³ /μL	6,49±3,42	9,7±1,72	0,29	4,7(4,1;11,2)	1	0,45
Lymphocytes, %	90,91±2,15	76,61±10,43*	0,002	59,26±3,52* **	0,0001	0,0004
Monocytes, %	3,39±1,77	12,5±7,3*	0,01	25,21±4,98* **	0,0001	0,00076
Neutrophils, %	3,14±1,09	3,67±2,19	0,08	5,06±1,21	0,086	0,25
Eosinophils, %	0,1(0;0,1)	0,1(0;0,1)	1	0,1(0,1;0,2)	1	0,46
Basophils, %	2,46±0,99	7,16±3,47*	0,003	10,31±1,31* **	0,0001	0,04
Lymphocytes, 10 ³ /μL	5,96±3,25	7,51±1,93	0,68	2,6(2,5;6,5)**	0,33	0,01
Monocytes, 10 ³ /μL	0,19±0,09	1,17±0,68*	0,03	1,69±0,91*	0,001	0,33
Neutrophils, 10 ³ /μL	0,1(0,1;0,4)	0,34±0,19	0,38	0,2(0,2;0,6)	0,23	1
Eosinophils, 10 ³ /μL	0	0		0		
Basophils, 10 ³ /μL	0,1(0,1;0,1)	0,67±0,31*	0,006	0,4(0,4;1,2)*	0,004	1
Erythrocytes, 10 ⁶ /μL	9,27±1,3	7,07(7,05;7,55)*	0,008	7,25±1,45	0,12	1
Haemoglobin, g/dL	13,33±1,88	9,9±1,02*	0,003	10,43±2,01*	0,013	0,83
Haematocrit, %	43,47±6,75	32,16±3,33*	0,005	34,1±6,63*	0,02	0,8
Mean corpuscular volume, fL	46,86±0,91	46,06±1,06	0,21	47,1±0,46	0,85	0,08
Mean corpuscular haemoglobin, pg	14,39±0,27	14,19±0,28	0,28	14,41±0,12	0,97	0,19
Mean corpuscular haemoglobin concentration, g/dL	30,74±0,73	30,8±0,44	0,97	30,6±0,28	0,86	0,75
Red cell distribution width – coefficient of variation, %	16,47±1,43	13,74±0,69*	0,0003	15,14±0,63**	0,05	0,04
Red cell distribution width – standard deviation, fL	28,63±2,41	25,29±1,93	0,067	28,9(24,8;29,4)	1	0,33
Platelets, 10 ³ /μL	859,43±140,3	367,71±53,15*	0,0001	495,71±56,65* **	0,0001	0,047
Mean platelet volume, fL	6,9±0,86	6,73±0,22	0,85	6,66±0,48	0,72	0,97
Thrombocrit, %	0,6±0,14	0,25±0,03*	0,0001	0,33±0,03*	0,0002	0,22
Platelet distribution width, %	25,81±3,47	36,56±2,54*	0,0003	31(29,6;32,5)**	0,43	0,045
Platelet-large cell ratio, %	9,3(5,9;10,8)	7,34±2,08	1	8,37±4,6	1	1

Notes: *(p1) – compared to the corresponding indicator of the control group; **(p2) – compared to the corresponding indicator of LL carcinoma.

Table 4 – Haemogram parameters of C₅₇BL/6 male mice with LL carcinoma and sulodexide administration for 20 days on day 28 of the study (M±m or [Me (25%; 75%)], n=7)

Indicator, units of measurement	Control	LLC	p1	LLC + sulodexide	p1	p2
Leukocytes, 10 ³ /μL	2,94±1,54	7,68±0,89*	0,0008	9,67±2,79*	0,0001	0,18
Lymphocytes, %	84,21±7,34	63,02±7,73*	0,0004	67,74±8,62*	0,002	0,54
Monocytes, %	5,85±2,9	20,22±5,33*	0,0002	17,67±5,89*	0,0005	0,61
Neutrophils, %	5,63±2,87	5,12±1,8	0,89	4,70±0,79	0,67	0,93
Eosinophils, %	0,2(0,1;1)	0,15±0,1	1	0,1(0;0,1)	0,08	0,49
Basophils, %	3,83±2,25	11,37±2,97*	0,0002	9,83±2,49*	0,0008	0,53
Lymphocytes, 10 ³ /μL	1,9(1,8;2,9)	4,87±1,08	0,07	6,73±2,7*	0,004	1
Monocytes, 10 ³ /μL	0,18±0,1	1,53±0,27*	0,003	1,5(1,4;1,6)*	0,005	1
Neutrophils, 10 ³ /μL	0,15(0,1;0,2)	0,4±0,14*	0,02	0,5(0,4;0,5)*	0,002	1
Eosinophils, 10 ³ /μL	0	0		0		
Basophils, 10 ³ /μL	0,1(0,1;1,5)	0,9±0,21*	0,004	0,9(0,9;0,9)*	0,004	1
Erythrocytes, 10 ⁶ /μL	10,55(9,85;11,2)	8,64±0,67*	0,04	9,17±0,85	0,23	1
Haemoglobin, g/dL	15(13,3;15,56)	12,12±0,64*	0,03	12,74±1,12	0,33	1
Haematocrit, %	45(40,35;48,3)	38,92±2,29	0,07	41,34±3,5	0,68	0,87
Mean corpuscular volume, fL	40,95(40,3;45,6)	45,7(44,3;45,8)	0,22	45,1±0,87	0,69	1
Mean corpuscular haemoglobin, pg	14,05(13,65;14,75)	14,05±0,53	1	13,9±0,28	1	1
Mean corpuscular haemoglobin concentration, g/dL	32,78±0,98	31,13±0,59*	0,002	30,81±0,56*	0,0003	0,73
Red cell distribution width – coefficient of variation, %	13,3(12,4;16,25)	14,8±0,88	1	14,74±1,2	1	1
Red cell distribution width – standard deviation, fL	20,05(19,9;27,1)	25,5±3,18	0,23	22,7(22,7;26,9)	0,82	1
Platelets, 10 ³ /μL	802,75±116,48	364,17±89,15*	0,0001	422±105,35*	0,0001	0,59
Mean platelet volume, fL	6,61±0,34	7,3±0,44	0,05	7(6,6;7,7)	0,4	1
Thrombocrit, %	0,5(0,46;0,57)	0,26±0,05*	0,003	0,28(0,24;0,34)*	0,04	1
Platelet distribution width, %	35,29±8,21	41,08±0,35	0,1	40,34±2,6	0,2	0,96
Platelet-large cell ratio, %	6,75(5,85;8,65)	12,33±3,19	0,08	9,9(8;15,5)	0,3	1

Notes: *(p1) – compared to the corresponding indicator of the control group; **(p2) – compared to the corresponding indicator of LL carcinoma.

mula showed a decrease in the percentage of lymphocytes and eosinophils in the experimental animals.

The analysis of experimental mice's red blood counts and erythrocyte indices showed significant changes in the number of erythrocytes, haemoglobin content, and haematocrit percentage, but the erythrocyte indices did not change.

Particular attention should have been paid to the indicators of the platelet component of the haemogram of the experimental animals, such as platelet count, mean platelet volume, thrombocrit, platelet distribution width, and the platelet-large cell ratio. Against the background of the growth of the primary LL tumour, a decrease in the number of platelets, the percentage of thrombocrit, and the percentage of large platelets were noted in the 14th study (**table 2**).

In order to conduct a comparative analysis and evaluate changes in haematological parameters of blood against the background of metastasis of LL carcinoma and under the conditions of anticoagulant administration, a general analysis of venous blood of experimental animals was performed on day 28 of the study [6, 7] (**tables 3, 4**).

The results of **tables 2, 3, 4** demonstrate that against the background of LL carcinoma's primary tumour growth and its metastatic progression, pathological changes occur in the blood of experimental mice, such as a decrease in the number of erythrocytes, haemoglobin content, haematocrit percentage, an increase in the number of leukocytes, and changes in the leukocyte formula. Such hematologic changes are the most common complication of tumour disease [10].

A comparative analysis of the platelet component of the haemogram of experimental mice made it possible to assess pathological changes in the platelet haemosta-

sis system and their relationship with the progression of metastasis.

On day 14 of the study, the platelet count was 760.29±149.32·10³/ml (control group), 520 (498;585)·10³/ml (LL). The percentage of the platelet distribution width was at the level of the control group: 34.31±7.11% (control group), 34.8 (34.2;38.3)% (LL).

In previous studies [6, 7], we found that on day 28 of the experiment in the second experiment, in the presence of metastases (6.57±0.94) in the lungs of male C₅₇BL/6 mice with tumorigenic LL carcinoma, a significant decrease in the number of platelets by 57.21%, thrombocrit by 58.33%, and an increase in the percentage of the platelet distribution width by volume by 41.65% were noted.

Under the conditions of enoxaparin administration, which inhibited the formation of lung metastases by 60.88% [6], the number of erythrocytes did not change compared with the control group (without tumour), but such indicators as haemoglobin content, hematocrit percentage, and mean corpuscular volume decreased. The number of leukocytes did not change, but significant changes in the leukocyte formula were noted. Decrease in the percentage of lymphocytes: 90.91±2.15% (control group), 76.61±10.43% (LL), 59.26±3.52%; increase in the percentage of monocytes: 3.39±1.77% (control group), 12.5±7.3% (LL), 25.21±4.98%; basophils: 2.46±0.99%, 7.16±3.47%, 10.31±1.31%, respectively (**table 3**). Regarding the platelet component, there was an increase in the number of platelets by 34.81%, thrombocrit by 32.0% and a decrease in the percentage of platelet distribution width by 15.21% compared to the group with LL carcinoma.

In the third experiment, in the presence of metastases (6.71±2.14) in the lungs of male C₅₇BL/6 mice, a

significant decrease in platelet count by 54.63%, thrombocrit by 48.0%, and an increase in the percentage of platelet distribution width by volume by 16.41% were noted. The use of sulodexide, which inhibited the formation of lung metastases by 63.79% [7], red blood counts were at the level of the control group, but the leukocyte formula and the number of leukocytes did not change significantly relative to these indicators in animals with LL carcinoma (table 4). As for the platelet component, the number of platelets increased by 15.88%, thrombocrit by 7.69%, and a decrease in the percentage of platelet distribution width by 1.80% was noted.

Based on the studies, a significant decrease in the total platelet count and thrombocrit percentage was found against the background of primary LL carcinoma tumour growth and its metastatic progression. Regarding the platelet index of the platelet distribution width (an indicator of platelet heterogeneity), a correlation with the progression of LL carcinoma metastasis was noted. This indicator increased by 15.21-41.65% and may predict metastasis in cancer patients [11, 12].

The use of direct-acting anticoagulants enoxaparin and sulodexide, which inhibited the formation of metastases in the lungs of experimental animals by 60.88% and 63.79%, respectively, significantly increased the number

of platelets and decreased the percentage of platelet distribution width by 15.21% and 1.8%, respectively.

Conclusions.

1. The data analysis revealed a correlation between the platelet index, such as the platelet distribution width, and metastasis of Lewis lung carcinoma. This indicator increased by 15.21-41.65% against the background of metastases formation in the lungs of male C₅₇BL/6 mice. The data obtained may be the basis for additional diagnostic criteria and will provide an earlier and more reliable diagnosis of the progression of the oncological process.

2. The use of direct-acting anticoagulants enoxaparin and sulodexide, which inhibited the formation of metastases in the lungs of experimental animals by 60.88% and 63.79%, increased the number of platelets by 34.81% and 15.88% and decreased the percentage of platelet distribution width by 15.21% and 1.8%, respectively.

Prospects for further research.

The data obtained indicate the feasibility of further in-depth studies to determine the predictors of metastasis. These studies may become the basis for the development of antithrombotic strategies that not only control thromboembolic complications but also participate in controlling malignant tumour progression.

DOI 10.29254/2077-4214-2025-1-176-116-127

УДК 615.273.53+616-006.08

Мунько М. А., Карацуба Т. А.

ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН ГЕМАТОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ КРОВІ МИШЕЙ C57BL/6 НА ТЛІ ПЕРВИННОГО ПУХЛИННОГО РОСТУ ТА МЕТАСТАТИЧНОЇ ПРОГРЕСІЇ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНЬ ЛЬЮЇС

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

munandmax@gmail.com

Відомо, що на сьогоднішній день досягнуто величезних успіхів щодо розуміння патогенезу злоякісних пухлин та розробці ефективних методів лікування, які суттєво покращили прогноз для онкологічних хворих. Проте, залишаються проблеми з виявленням метастатичного поширення до встановлення явних метастазів і з прогнозуванням того, які пацієнти схильні до найбільшого ризику розвитку метастатичного захворювання, який є основною причиною смерті. Скринінгові тести можуть допомогти щодо поліпшення управління метастатичним захворюванням, ще до появи симптомів, отримати точну картину того, коли відбувається метастатичне поширення, і як цей процес визначає профіль ризику для онкохворих при постановці діагнозу, протягом усього лікування, так і у стані ремісії.

Один із надійних параклінічних методів діагностики захворювань є оцінка гематологічних показників крові, яка дозволяє виявити прогресування онкологічного процесу. На сьогодні, особливу увагу зосереджено на порушеннях у системі гемостазу, які є одним із найважливіших компонентів патогенезу пухлинного процесу.

Метою даного дослідження була оцінка параметрів гемограми мишей самців лінії C57BL/6 з первинною пухлиною карциноми легень Льюїс (LL) та на тлі її метастатичної прогресії, та оцінка змін за умов введення антикоагулянтів прямої дії щодо визначення біомаркерів, які пов'язані з метастазуванням.

На підставі проведених досліджень встановлено вірогідне зниження загальної кількості тромбоцитів, відсотку тромбоцитів на тлі росту первинної пухлини карциноми LL та на тлі її метастатичної прогресії. Щодо тромбоцитарного індексу – відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом (показник гетерогенності тромбоцитів), відмічена кореляція з прогресуванням метастазуванням карциноми LL. Зазначений показник підвищувався на 15,21-41,65%, на тлі первинної пухлини – не було відмінностей порівняно з інтактними тваринами. При застосуванні антикоагулянтів прямої дії еноксапарину та сулодексиду, які гальмували утворення метастазів у легенях тварин на 60,88% та на 63,79% відповідно, вірогідно збільшувалась кількість тромбоцитів та зменшувалась відсоток відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом на 15,21% та на 1,8% відповідно.

Ключові слова: гемограма, карцинома легень Льюїс, метастази, антикоагулянти.

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» (номер державної реєстрації 0123U101245).

Вступ.

2 серпня 2024 року Кабінет Міністрів України схвалив Національну стратегію щодо контролю злоякісних новоутворень до 2030 року. Стратегію розроблено для втілення в життя державної політики з питань протиракової боротьби, зниження рівня захворюваності та смертності, спричиненої онкологічними захворюваннями, а також забезпечення високоякісного доступного лікування онкопациєнтів та їх реабілітації [1]. Впровадження національної стратегії контролю злоякісних новоутворень має ключове значення для ефективної та систематичної боротьби з онкологічними захворюваннями, які є однією з основних причин смерті не лише в Україні, а і в світі. Один з важливих напрямів цієї стратегії є забезпечення первинної профілактики онкологічних захворювань та сприяння їх ранньому виявленню.

Слід відзначити, що ефективність лікування онкологічних хворих та пацієнтів що перебувають у ремісії, навіть принаймні від 5 до 10 років після встановлення діагнозу і які продовжують ризикувати локально-регіональними та метастатичними рецидивами залежить, передусім, від їх ранньої та своєчасної діагностики [2].

На теперішній час гіперкоагуляцію розглядають не просто як вторинне явище на тлі онкологічного захворювання, а як активний чинник розвитку та прогресування злоякісної пухлини. Додаткові діагностичні критерії при скринінгу рецидивів та вторинних злоякісних новоутворень дозволять правильно планувати лікування та прогнозувати результат. Застосування антикоагулянтів, як препаратів супроводу, також можуть надати позитивний вплив на процес зростання та розповсюдження злоякісного новоутворення.

Мета дослідження.

Оцінка параметрів гемограми мишей самців лінії C₅₇BL/6 з первинною пухлиною карциноми легень Льюїс (LL) та на тлі її метастатичної прогресії і оцінити зміни за умов уведення антикоагулянтів прямої дії щодо визначення біомаркерів, які пов'язані з метастазуванням.

Об'єкт і методи дослідження.

У експериментах *in vivo* було використано 56 самців 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 згодовувалася *ad libitum* стандартний раціон для лабораторних тварин, вода з міського водогону (після оберненого осмосу та стерилізації УФ-випромінюванням) подавалася *ad libitum*. Миші розміщувались відповідно дослідним групам у клітках із полікарбонату розмірами (410 × 250 × 180) мм із кришками з гальванізованої сталі. Клітки були забезпечені пластиковими поїлками. Підстилкою слу-

гувала тирса з вільхи чорної (*Alnus glutinosa*), попередньо піддана автоклавуванню.

У дослідях 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 перевивали у концентрації 2·20⁶ клітин згідно методу щодо відбору речовин з протипухлинною активністю [3] та 3·10⁵ клітин щодо моделювання процесу метастазування по 0,3 мл фізіологічного розчину внутрішньом'язево в праву гомілку мишей лінії C₅₇BL/6 [4]. Підрахунок пухлинних клітин проводили в камері MMC-SR [5].

Для введення тваринам застосовували препарати: ВесселДуе Ф (сулодексид), виробник: Альфасігма Сл.А. та Еноксапарин-Фармекс (ТОВ «Фармекс Груп», Україна [6, 7]. Препарати зберігалися 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» [8] та Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та з іншою науковою метою [9].

Експеримент було розподілено на три досліді. У першому досліді тварини розподіляли на дві групи по 7 мишей у кожній: I-контроль (інтактні тварини), II – з перевитою карциномою LL у концентрації клітин 2·20⁶. Тварин знеживлювали на 14 день дослідження. У другому та третьому досліді тварини розподілялися на 3 групи, по 7 тварин у кожній: I – контроль без пухлини, II група з перевитою карциномою LL (3·10⁵ клітин), III група (з перевитою карциномою LL) – вводили антикоагулянти прямої дії: еноксапарин та сулодексид. Тварин знеживлювали на 28 день дослідження [6, 7].

Лікування тварин починали на 5 добу після перевивки клітин карциноми LL. Еноксапарин застосовувався в дозі 10,0 мг/кг підшкірно, 20 діб. Сулодексид вводили в дозі 2,0 мг/кг (20 ЛО/кг) внутрішньом'язево протягом 20 діб. Індивідуальні дози препарату розраховували в мг/кг та мл/г з урахуванням щотижневих змін маси тіла кожної з тварин. Контрольні тварини другого досліді отримували плацебо на 5 день після перевивки клітин карциноми LL 0,9% NaCl у дозі 0,1 мл/20 г на тварину, підшкірно; тварини третього досліді – 0,9% NaCl, 0,05 мл / 20 г маси тіла, внутрішньом'язево [6, 7].

Відібрані групи дослідних тварин були піддані етаназії на 14 день та на 28 день дослідження. Безпосередньо перед етаназією всіх мишей було зважено та під легким ефірним наркозом були відібрані зразки крові з орбітального венозного синусу тварин для гематологічного дослідження і здійснено етаназію шляхом цервікальної дислокації. У всіх тварин були вилучені легені, для макроскопічних досліджень, селезінка, відносну масу якої розраховували на 100 г маси тіла [6, 7]. Об'єм пухлини визначався за формулою об'єму еліпсоїда [3].

Загальний гематологічний аналіз венозної крові дозволяє оцінити зміст формених елементів крові. До них відносять гемоглобін, еритроцити, еритроцитарні індекси, лейкоцити, лейкоцитарну формулу, тромбоцити та тромбоцитарні індекси. Кожен з цих елементів крові має свою функцію в організмі і несе відповідальність за певні дії. Дозволяє виявити в організмі патології системи кровотворення або виключити чинник ризику їх розвитку. Так само сприяє оцінці ефективності призначеного лікування.

Кров для гематологічних досліджень збирали у пробірки об'ємом 0,2 мл із K_3 -ЕДТА («ВОЛЕС», Україна) й аналізували на автоматичному гематологічному аналізаторі Mythic 22 (Orphée SA, Швейцарія) (табл. 1).

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 змінених 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 Origin-Pro 2023b. Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною в разі $p \leq 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

У даній роботі ми порівняли показники гемограми дослідних мишей на тлі росту первинної пухлини LL (14 день дослідження), її метастатичної прогресії та за умов уведення прямих антикоагулянтів: еноксапарину сулодексида (28 день дослідження).

Результати експерименту показали, що на тлі первинного пухлинного росту карциноми LL на 14 день дослідження у мишей самців лінії C₅₇BL/6 об'єм пухлини становив $-4,11 \pm 0,06$ см³, при цьому метастази у легенях не візуалізувались. Аналіз відносної маси селезінки мишей дослідної групи показав, що у тварин на тлі пухлинного росту спостерігається збільшення масових коефіцієнтів селезінки: $0,53 \pm 0,03\%$ (інтактні тварини), $0,60 \pm 0,01\%$ ($p=0,03$) (карцинома LL).

Загальний гематологічний аналіз венозної крові дослідних мишей дозволив оцінити зміни параметрів гемограми на тлі пухлинного росту (табл. 2).

Представлені дані свідчать, що у мишей-самців C₅₇BL/6 із переважною карциномою LL на 14 день дослідження кількість лейкоцитів вірогідно збільшувалась у порівнянні з контрольною групою табл. 2. Ці зміни відбулися за рахунок збільшення кількості моноцитів: $5,23 \pm 2,15 \cdot 10^3$ /мкл (контрольна група), $10,61 \pm 1,33 \cdot 10^3$ /мкл (LL) та кількості базофілів: $0,2$ ($0,2; 0,3$) $\cdot 10^3$ /мкл (контрольна група), $0,71 \pm 0,13 \cdot 10^3$ /мкл (LL). При аналізі лейкоцитарної формули відмі-

чено зниження відсотку лімфоцитів та еозинофілів у дослідних тварин.

Аналіз показників червоної крові та еритроцитарних індексів дослідних мишей показав вірогідні зміни щодо зменшення кількості еритроцитів, вмісту гемоглобіну, відсотку гематокриту, але еритроцитарні індекси не змінювались.

Особливу увагу було варто приділити показникам тромбоцитарної ланки гемограми дослідних тварин, таких як: кількість тромбоцитів, середній об'єм тромбоциту, тромбокрит, відносна ширина розподілу тромбоцитів за об'ємом, коефіцієнт великих тромбоцитів. На тлі росту первинної пухлини LL на 14 дослідження відмічалось зниження кількості тромбоцитів, відсоток тромбокриту та відсоток великих тромбоцитів (табл. 2).

Для того щоб провести порівняльний аналіз і оцінити зміни гематологічних показників крові на тлі метастазування карциноми LL та за умов уведення антикоагулянтів, загальний аналіз венозної крові експериментальних тварин проводили на 28 день дослідження [6, 7], (табл. 3, 4).

Результати даних таблиць 2, 3, 4 демонструють, що на тлі первинного пухлинного росту карциноми LL та на тлі її метастатичної прогресії відбуваються патологічні зміни у крові дослідних мишей, такі як зниження кількості еритроцитів, вмісту гемоглобіну, відсотку гематокриту, збільшення кількості лейкоцитів, зміни у лейкоцитарній формулі. Такі гематологічні зміни є із найбільш поширеним ускладненням при пухлинній хворобі [10].

Порівняльний аналіз тромбоцитарної ланки гемограми дослідних мишей дав змогу оцінити патологічні зміни у системі тромбоцитарного гемостазу та їх взаємозв'язок із прогресуванням метастазування.

На 14 день дослідження кількість тромбоцитів становила: $760,29 \pm 149,32 \cdot 10^3$ /мл (контрольна група), 520 ($498; 585$) $\cdot 10^3$ /мл (LL). Відсоток відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом був на рівні контрольної групи: $34,31 \pm 7,11\%$ (контрольна група), $34,8$ ($34,2; 38,3$)% (LL).

Таблиця 1 – Показники, способи їх визначення та одиниці вимірювання, що використовувались у тестах гемоаналізатора Mythic 22

Показник	Спосіб визначення	Одиниця вимірювання
Гемоглобін	Пряме визначення	g/dL
Еритроцити	Пряме визначення	$10^6/\mu\text{L}$
Гематокрит	Пряме визначення	%
Середній об'єм еритроцита	Обчислення	fL
Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті	Обчислення	g/dL
Середній вміст гемоглобіну в еритроциті	Обчислення	pg
Відносна ширина розподілу еритроцитів за об'ємом, коефіцієнт варіації	Обчислення	%
Відносна ширина розподілу еритроцитів за об'ємом, стандартне відхилення	Обчислення	fL
Лейкоцити	Пряме визначення	$10^3/\mu\text{L}$
Нейтрофіли, лімфоцити, еозинофіли, базофіли, моноцити	Пряме визначення, обчислення	$10^3/\mu\text{L}$, %
Тромбоцити	Пряме визначення	$10^3/\mu\text{L}$
Середній об'єм тромбоцита	Обчислення	fL
Тромбокрит	Обчислення	%
Відносна ширина розподілу тромбоцитів за об'ємом	Обчислення	%
Коефіцієнт великих тромбоцитів	Обчислення	%

У попередніх дослідженнях [6, 7] нами було визначено, що на 28 день експерименту у другому досліді при наявності метастазів (6,57±0,94) у легенях мишей-самців C₅₇BL/6 із перевитою карциномою LL, відмічалось значне зниження кількості тромбоцитів на 57,21%, тромбоцитів – 58,33% та збільшення відсотку відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом на 41,65%.

За умов уведення еноксапарину, який гальмував утворення метастазів у легеня на 60,88% [6] кількість еритроцитів не змінювалась порівняно з контрольною групою (без пухлини), але знижувались такі показники, як вміст гемоглобіну, відсоток гематокриту, відносна ширина розподілу еритроцитів за об'ємом. Кількість лейкоцитів не змінювалась, але відмічаються суттєві зміни у лейкоцитарній формулі. Зменшення

Таблиця 2 – Показники гемограми мишей-самців C₅₇BL/6 із перевитою карциномою LL на 14 день дослідження (M±m або [Me (25%; 75%)], n=7)

Показник, одиниці вимірювання	Контроль (інтактні тварини)	LLC	p
Лейкоцити, 10 ³ /мкл	7,6±1,84	10,83±0,08*	0,0006
Лімфоцити, %	86,44±3,66	78,93±2,88*	0,001
Моноцити, %	5,23±2,15	10,61±1,33*	0,0001
Нейтрофіли, %	4,97±2,11	3,74±0,6	0,16
Еозинофіли, %	0,53±0,43	0,11±0,07*	0,03
Базофіли, %	2,97±0,65	6,6±1,28*	0,00002
Лімфоцити, 10 ³ /мкл	7,29±1,45	8,6(8,3;9)	0,22
Моноцити, 10 ³ /мкл	0,41±0,2	1,17±0,14*	0,000003
Нейтрофіли, 10 ³ /мкл	0,34±0,13	0,41±0,07	0,22
Еозинофіли, 10 ³ /мкл	0(0;0,1)	0	0,2
Базофіли, 10 ³ /мкл	0,2(0,2;0,3)	0,71±0,13*	0,002
Еритроцити, 10 ⁶ /мкл	9,94(9,47;10,13)	8,24(8,2;8,28)*	0,02
Гемоглобін, г/дл	13,8(13,8;14,2)	11,79±0,09*	0,03
Гематокрит, %	44,5(42,6;44,8)	37,26±0,53*	0,03
Середній об'єм еритроцита, фл	44,74±1,64	45,29±0,53	0,42
Середній вміст гемоглобіну в еритроциті, пг	13,8(13,7;14,9)	14,34±0,1	0,2
Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті, г/дл	31,5±0,65	31,64±0,36	0,6
Відносна ширина розподілу еритроцитів за об'ємом, коефіцієнт варіації, %	13,7(12,7;15,8)	12,91±0,21	0,2
Відносна ширина розподілу еритроцитів за об'ємом, стандартне відхилення, фл	24,01±2,31	23(22,8;24,8)	0,7
Тромбоцити, 10 ³ /мкл	760,29±149,32	520(498;585)*	0,03
Середній об'єм тромбоцита, фл	6,9±0,68	6,5(6,4;6,6)	0,1
Тромбоцит, %	0,52±0,09	0,34(0,32;0,39)*	0,015
Відносна ширина розподілу тромбоцитів за об'ємом, %	34,31±7,11	34,8(34,2;38,3)	0,9
Коефіцієнт великих тромбоцитів, %	9,41±4,63	4,8±0,93*	0,02

Примітка: * – p<0.05 у порівнянні з тваринами контрольної групи.

Таблиця 3 – Показники гемограми мишей-самців C57BL/6 із перевитою карциномою LL та за умов уведення еноксапарину протягом 20 днів на 28 день дослідження (M±m або [Me (25%; 75 %)], n=7)

Показник, одиниці вимірювання	Контроль	LLC	p1	LLC + еноксапарин	p1	p2
Лейкоцити, 10 ³ /мкл	6,49±3,42	9,7±1,72	0,29	4,7(4,1;11,2)	1	0,45
Лімфоцити, %	90,91±2,15	76,61±10,43*	0,002	59,26±3,52* **	0,0001	0,0004
Моноцити, %	3,39±1,77	12,5±7,3*	0,01	25,21±4,98* **	0,0001	0,00076
Нейтрофіли, %	3,14±1,09	3,67±2,19	0,08	5,06±1,21	0,086	0,25
Еозинофіли, %	0,1(0;0,1)	0,1(0;0,1)	1	0,1(0,1;0,2)	1	0,46
Базофіли, %	2,46±0,99	7,16±3,47*	0,003	10,31±1,31* **	0,0001	0,04
Лімфоцити, 10 ³ /мкл	5,96±3,25	7,51±1,93	0,68	2,6(2,5;6,5)**	0,33	0,01
Моноцити, 10 ³ /мкл	0,19±0,09	1,17±0,68*	0,03	1,69±0,91*	0,001	0,33
Нейтрофіли, 10 ³ /мкл	0,1(0,1;0,4)	0,34±0,19	0,38	0,2(0,2;0,6)	0,23	1
Еозинофіли, 10 ³ /мкл	0	0		0		
Базофіли, 10 ³ /мкл	0,1(0,1;0,1)	0,67±0,31*	0,006	0,4(0,4;1,2)*	0,004	1
Еритроцити, 10 ⁶ /мкл	9,27±1,3	7,07(7,05;7,55)*	0,008	7,25±1,45	0,12	1
Гемоглобін, г/дл	13,33±1,88	9,9±1,02*	0,003	10,43±2,01*	0,013	0,83
Гематокрит, %	43,47±6,75	32,16±3,33*	0,005	34,1±6,63*	0,02	0,8
Середній об'єм еритроцита, фл	46,86±0,91	46,06±1,06	0,21	47,1±0,46	0,85	0,08
Середній вміст гемоглобіну в еритроциті, пг	14,39±0,27	14,19±0,28	0,28	14,41±0,12	0,97	0,19
Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті, г/дл	30,74±0,73	30,8±0,44	0,97	30,6±0,28	0,86	0,75
Відносна ширина розподілу еритроцитів за об'ємом, коефіцієнт варіації, %	16,47±1,43	13,74±0,69*	0,0003	15,14±0,63**	0,05	0,04
Відносна ширина розподілу еритроцитів за об'ємом, стандартне відхилення, фл	28,63±2,41	25,29±1,93	0,067	28,9(24,8;29,4)	1	0,33
Тромбоцити, 10 ³ /мкл	859,43±140,3	367,71±53,15*	0,0001	495,71±56,65* **	0,0001	0,047
Середній об'єм тромбоцита, фл	6,9±0,86	6,73±0,22	0,85	6,66±0,48	0,72	0,97
Тромбоцит, %	0,6±0,14	0,25±0,03*	0,0001	0,33±0,03*	0,0002	0,22
Відносна ширина розподілу тромбоцитів за об'ємом, %	25,81±3,47	36,56±2,54*	0,0003	31(29,6;32,5)**	0,43	0,045
Коефіцієнт великих тромбоцитів, %	9,3(5,9;10,8)	7,34±2,08	1	8,37±4,6	1	1

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

Таблиця 4 – Показники гемограми мишей-самців C₅₇BL/6 із перевитою карциномою LL та за умов введення сулодексиду протягом 20 днів на 28 день дослідження (M±m або [Me (25%; 75 %)], n=7)

Показник, одиниці вимірювання	Контроль	LLC	p1	LLC + сулодексид	p1	p2
Лейкоцити, 10 ³ /мкл	2,94±1,54	7,68±0,89*	0,0008	9,67±2,79*	0,0001	0,18
Лімфоцити, %	84,21±7,34	63,02±7,73*	0,0004	67,74±8,62*	0,002	0,54
Моноцити, %	5,85±2,9	20,22±5,33*	0,0002	17,67±5,89*	0,0005	0,61
Нейтрофіли, %	5,63±2,87	5,12±1,8	0,89	4,70±0,79	0,67	0,93
Еозинофіли, %	0,2(0,1;1)	0,15±0,1	1	0,1(0;0,1)	0,08	0,49
Базофіли, %	3,83±2,25	11,37±2,97*	0,0002	9,83±2,49*	0,0008	0,53
Лімфоцити, 10 ³ /мкл	1,9(1,8;2,9)	4,87±1,08	0,07	6,73±2,7*	0,004	1
Моноцити, 10 ³ /мкл	0,18±0,1	1,53±0,27*	0,003	1,5(1,4;1,6)*	0,005	1
Нейтрофіли, 10 ³ /мкл	0,15(0,1;0,2)	0,4±0,14*	0,02	0,5(0,4;0,5)*	0,002	1
Еозинофіли, 10 ³ /мкл	0	0		0		
Базофіли, 10 ³ /мкл	0,1(0,1;1,5)	0,9±0,21*	0,004	0,9(0,9;0,9)*	0,004	1
Еритроцити, 10 ⁶ /мкл	10,55(9,85;11,2)	8,64±0,67*	0,04	9,17±0,85	0,23	1
Гемоглобін, г/дл	15(13,3;15,56)	12,12±0,64*	0,03	12,74±1,12	0,33	1
Гематокрит, %	45(40,35;48,3)	38,92±2,29	0,07	41,34±3,5	0,68	0,87
Середній об'єм еритроцита, фл	40,95(40,3;45,6)	45,7(44,3;45,8)	0,22	45,1±0,87	0,69	1
Середній вміст гемоглобіну в еритроциті, пг	14,05(13,65;14,75)	14,05±0,53	1	13,9±0,28	1	1
Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті, г/дл	32,78±0,98	31,13±0,59*	0,002	30,81±0,56*	0,0003	0,73
Відносна ширина розподілу еритроцитів за об'ємом, коефіцієнт варіації, %	13,3(12,4;16,25)	14,8±0,88	1	14,74±1,2	1	1
Відносна ширина розподілу еритроцитів за об'ємом, стандартне відхилення, фл	20,05(19,9;27,1)	25,5±3,18	0,23	22,7(22,7;26,9)	0,82	1
Тромбоцити, 10 ³ /мкл	802,75±116,48	364,17±89,15*	0,0001	422±105,35*	0,0001	0,59
Середній об'єм тромбоцита, фл	6,61±0,34	7,3±0,44	0,05	7(6,6;7,7)	0,4	1
Тромбоцитрит, %	0,5(0,46;0,57)	0,26±0,05*	0,003	0,28(0,24;0,34)*	0,04	1
Відносна ширина розподілу тромбоцитів за об'ємом, %	35,29±8,21	41,08±0,35	0,1	40,34±2,6	0,2	0,96
Коефіцієнт великих тромбоцитів, %	6,75(5,85;8,65)	12,33±3,19	0,08	9,9(8;15,5)	0,3	1

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

відсотку лімфоцитів: 90,91±2,15% (контрольна група), 76,61±10,43% (LL), 59,26±3,52%; збільшення відсотку моноцитів: 3,39±1,77% (контрольна група), 12,5±7,3% (LL), 25,21±4,98%; базофілів: 2,46±0,99%, 7,16±3,47%, 10,31±1,31% відповідно **табл. 3**. Щодо тромбоцитарної ланки, відмічене збільшення кількості тромбоцитів на 34,81%, тромбоцитрит на 32,0%, зменшення відсотку відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом на 15,21% у порівнянні групою з карциномою LL.

У третьому досліді, при наявності метастазів (6,71±2,14) у легенях мишей-самців C₅₇BL/6, відмічалось значне зниження кількості тромбоцитів на 54,63%, тромбоцитрит – 48,0% та збільшення відсотку відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом на 16,41%. Застосування сулодексиду, який на 63,79% гальмував утворення метастазів у легеня [7] показники червоної крові були на рівні контрольної групи, але достовірно не змінювалась лейкоцитарна формула та кількість лейкоцитів відносно зазначених показників у тварин з карциномою LL (**табл. 4**). Щодо тромбоцитарної ланки відмічена збільшення кількості тромбоцитів на 15,88%, тромбоцитрит – 7,69%, зменшення відсотку відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом на 1,80%.

На підставі проведених досліджень встановлено вірогідне зниження загальної кількості тромбоцитів, відсотку тромбоцитрит на тлі росту первинної пухлини карциноми LL та на тлі її метастатичної прогресії. Щодо тромбоцитарного індексу відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом (показник гетерогенності тромбоцитів), відмічена кореляція з прогресуванням метастазуванням карциноми LL. Зазначений показник підвищувався на 15,21-41,65% та може

бути предиктором метастазування у онкологічних хворих [11, 12].

При застосуванні антикоагулянтів прямої дії еноксапарину та сулодексиду, які гальмували утворення метастазів у легенях тварин дослідних на 60,88% та на 63,79% відповідно, вірогідно збільшувалась кількість тромбоцитів та зменшувався відсоток відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом на 15,21% та на 1,8% відповідно.

Висновки.

1. Аналіз отриманих даних виявив кореляцію тромбоцитарного індексу такого, як відносна ширина розподілу тромбоцитів за об'ємом з метастазуванням карциноми легень Льюїс. Зазначений показник підвищувався на 15,21-41,65% на тлі утворення метастазів у легенях мишей-самців C₅₇BL/6. Отримані дані можуть бути підставою щодо додаткових діагностичних критеріїв та забезпечать більш ранню та достовірну діагностику прогресування онкологічного процесу.

2. При застосуванні антикоагулянтів прямої дії еноксапарину та сулодексиду, які гальмували утворення метастазів у легенях дослідних тварин на 60,88% та на 63,79%, збільшувалась кількість тромбоцитів на 34,81% та 15,88% та зменшувався відсоток відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом на 15,21% та на 1,8% відповідно.

Перспективи подальших досліджень.

Отримані дані свідчать про доцільність подальших поглиблених досліджень щодо визначення предикторів метастазування і можуть стати основою розробки антитромботичних стратегій, які не тільки контролюють тромбоемболічні ускладнення, але й беруть участь у контролі прогресування злоякісних пухлин.

References / Література

1. Kabinet Ministriv Ukrainy. Rozporiadzhennia Kabinetu Ministriv Ukrainy № 730-p Pro skhvalennia Natsionalnoi stratehii kontroliu zloiakisnykh novoutvoren na period do 2030 roku ta zatverdzhennia planu dii z yii realizatsii na period do 2025 roku. Kyiv: Kabinet Ministriv Ukrainy; 2024. Dostupno: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/730-2024-%D1%80/sp:dark?dark=0#Text>. [in Ukrainian].
2. Simard JL, Kircher SM, Didwania A, Goel MS. Screening for Recurrence and Secondary Cancers. Med Clin North Am. 2017;101(6):1167-1180. DOI: [10.1016/j.mcna.2017.06.010](https://doi.org/10.1016/j.mcna.2017.06.010).
3. Stefanov OV, redaktor. Doklinichni doslidzhennia likarskykh zasobiv. Kyiv: Avitsena; 2001. 528 s. [in Ukrainian].
4. 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;71(2):318-26.
5. Seredynska NM, Sharykina NI, Khavych OO, Karatsuba TA, Bukhtiarova TA, Marchenko OM, vynakhidnyky; DU «Instytut farmakolohii ta toksykolohii NAMN Ukrainy» patentovlasnyk. Sposib perevyvky eksperymentalnykh pukhlyln (sarkoma 45 (S-45) ta kartsynosarkoma Uokera W256). Patent Ukrainy № 149330. 2021 Lyst 10. [in Ukrainian].
6. Munko MA. Effect of the anticoagulant enoxaparin direct action on the metastatic activity of Lewis lung carcinoma. Bulletin of Problems in Biology and Medicine. 2024;1(172):194-203.
7. Munko MA, Karatsuba TA. Metastatic activity of Lewis lung carcinoma under effects of direct-acting anticoagulants on platelet hemostasis system and blood coagulation activity. Pharmacology and Drug Toxicology. 2024;18(3):175-84.
8. Verkhovna Rada Ukrayiny. Zakon Ukrainy № 3447-IV Pro zakhyst tvaryn vid zhorstokoho povodzhennia. Kyiv: Verkhovna Rada Ukrayiny; 2023. Dostupno: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text>. [in Ukrainian].
9. 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.
10. Berta DM, Teketelew BB, Chane E, Bayleyegn B, Tamir M, Cherie N, et al. Hematological changes in women with cervical cancer before and after cancer treatment: retrospective cohort study. Sci Rep. 2024;14:1-11. DOI: [10.1038/s41598-024-75937-6](https://doi.org/10.1038/s41598-024-75937-6).
11. Gunaldi M, Erdem D, Goksu S, Gunduz S, Okuturlar Y, Tiken E, et al. Platelet Distribution Width as a Predictor of Metastasis in Gastric Cancer Patients. J Gastrointest Canc. 2017;48:341-346.
12. Oncel M, Kiyici A, Oncel M, Sunam GS, Sahin E, Adam B. Evaluation of Platelet Indices in Lung Cancer Patients. Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(17):7599-602.

ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН ГЕМАТОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ КРОВІ МИШЕЙ C₅₇BL/6 НА ТЛІ ПЕРВИННОГО ПУХЛИННОГО РОСТУ ТА МЕТАСТАТИЧНОЇ ПРОГРЕСІЇ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНЬ ЛЬЮІС

Мунько М. А., Карацуба Т. А.

Резюме. Відомо, що злоякісні новоутворення з метастатичним потенціалом важко піддаються лікуванню і є причиною більшості смертей від онкологічних захворювань. Сучасні підходи до лікування метастатичного раку полягають у запобіганні метастатичного процесу замість його лікування після того, як він вже з'явився. Оцінка гематологічних чинників одна із надійних параклінічних методів діагностики захворювань. Гематологічні параметри можуть забезпечити більш ранню та достовірну діагностику прогресування онкологічного процесу та подальше лікування онкопациєнтів. В останні роки особливу увагу зосереджено на механізмах розвитку злоякісних новоутворень і зокрема, на порушеннях у системі гемостазу, які є одним із найважливіших компонентів патогенезу пухлинного процесу.

Метою даного дослідження була оцінка параметрів гемограми мишей самців лінії C₅₇BL/6 з первинною пухлиною карциноми легень Льюїс (LL) та на тлі її метастатичної прогресії, та оцінка змін за умов уведення антикоагулянтів прямої дії щодо визначення біомаркерів, які пов'язані з метастазуванням.

Карциному LL перевивали у концентрації 2·10⁶ клітин згідно методу щодо відбору речовин з протипухлинною активністю та 3·10⁵ клітин щодо моделювання процесу метастазування по 0,3 мл фізіологічного розчину внутрішньом'язево в праву голілку мишей лінії C₅₇BL/6.

Експеримент було розподілено на три досліді. У першому досліді тварин розподіляли на дві групи по 7 мишей у кожній: I-контроль (інтактні тварини), II – з перевитою карциномою LL у концентрації клітин 2·10⁶. Тварин знеживлювали на 14 день дослідження. У другому та третьому досліді тварини розподілялися на 3 групи, по 7 тварин у кожній: I – контроль без пухлини, II група з перевитою карциномою LL (3·10⁵клітин), III група (з перевитою карциномою LL) – вводили антикоагулянти прямої дії: еноксапарин та сулодексид. Тварин знеживлювали на 28 день дослідження.

Лікування тварин починали на 5 добу після перевивки клітин карциноми LL. Еноксапарин застосовувався в дозі 10,0 мг/кг підшкірно, 20 діб. Сулодексид вводили в дозі 2,0 мг/кг (20 ЛО/кг) внутрішньом'язево протягом 20 діб. Індивідуальні дози препарату розраховували в мг/кг та мл/г з урахуванням щотижневих змін маси тіла кожної з тварин. Контрольні тварини другого досліді розимували плацебо на 5 день після перевивки клітин карциноми LL 0,9% NaCl у дозі 0,1 мл/20 г на тварину, підшкірно; тварини третього досліді – 0,9% NaCl, 0,05 мл / 20 г маси тіла, внутрішньом'язево.

Відібрані групи дослідних тварин були піддані евтаназії на 14 день та на 28 день дослідження. Безпосередньо перед евтаназією всіх мишей було зважено та 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 були вилучені легені, для макроскопічних досліджень. Об'єм пухлини визначався за формулою об'єму еліпсоїда.

Загальний гематологічний аналіз венозної крові дозволяє оцінити зміст формених елементів крові та виявити в організмі патології системи кровотворення або виключити чинник ризику їх розвитку. Так само сприяє оцінці ефективності призначеного лікування.

На підставі проведених досліджень встановлено вірогідне зниження загальної кількості тромбоцитів, відсотку тромбоцитів на тлі росту первинної пухлини карциноми LL та на тлі її метастатичної прогресії. Щодо тромбоцитарного індексу – відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом (показник гетерогенності тромбоцитів), відмічена кореляція з прогресуванням метастазуванням пухлини LL. Зазначений показник підвищувався на 15,21-41,65%, на тлі первинної пухлини – не було відмінностей порівняно з інтактними тваринами. При застосуванні антикоагулянтів еноксапарину та сулодексида, які гальмували утворення метастазів у

легенях тварин на 60,88% та на 63,79% відповідно, вірогідно збільшувалась кількість тромбоцитів та зменшувався відсоток відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом на 15,21% та на 1,8% відповідно.

Прогностична значущість дослідження тромбоцитарних показників є достатньо високою для поліпшення стратегій лікування онкологічних хворих.

Ключові слова: гемограма, карцинома легень Льюїс, метастази, антикоагулянти.

FEATURES OF HAEMATOLOGICAL PARAMETER CHANGES IN C57BL/6 MICE DURING PRIMARY TUMOR GROWTH AND METASTATIC PROGRESSION OF LEWIS LUNG CARCINOMA

Munko M. A., Karatsuba T. A.

Abstract. It is known that malignant neoplasms with metastatic potential are difficult to treat and they are the cause of most deaths from cancer. Modern approaches to the treatment of metastatic cancer include prevention of the metastatic process instead of its treatment after the emergence. Assessment of haematological factors is one of the reliable paraclinical methods in disease diagnostics. Haematological parameters can provide an earlier and more reliable diagnosis of the oncological process progression and further treatment of cancer patients. In recent years, special attention has been focused on the mechanisms of development of malignant neoplasms, particularly disorders in the hemostasis system, as one of the most important components of the tumor process pathogenesis.

The aim of this study was to evaluate the hemogram parameters of male C₅₇BL/6 mice with primary Lewis lung carcinoma (LL) tumor, including against the background of its metastatic progression, and to evaluate its changes upon administration of direct-acting anticoagulants to determine biomarkers associated with metastasis.

LL carcinoma was inoculated intramuscularly into the right lower leg of C₅₇BL/6 mice in 0.3 ml of saline at a concentration of $2 \cdot 10^6$ cells according to the method for selecting substances with antitumor activity and $3 \cdot 10^5$ cells to simulate the metastasis process.

The experiment was divided into three parts. In the first part, animals were divided into two groups of 7 mice each: I – control (intact animals), II – with inoculated LL carcinoma at a cell concentration of $2 \cdot 10^6$. The animals were euthanized on the 14th day of the study. In the second and third parts, animals were divided into 3 groups of 7 animals each: I – control without a tumor, II – with transplanted LL carcinoma ($3 \cdot 10^5$ cells), III (with transplanted LL carcinoma) – direct-acting anticoagulants administration: enoxaparin and sulodexide. The animals were euthanized on the 28th day of the study.

Treatment of animals was started on the 5th day after inoculation of LL carcinoma cells. Enoxaparin was used at a dose of 10.0 mg/kg subcutaneously for 20 days. Sulodexide was administered at a dose of 2.0 mg/kg (20 LU/kg) intramuscularly for 20 days. Individual doses of the drug were calculated in mg/kg and ml/g taking into account weekly changes in body weight of each animal. In the second part of experiment on the 5th day after inoculation of LL carcinoma cells control animals received placebo – 0.9% NaCl at a dose of 0.1 ml/20 g per animal, subcutaneously; in the third part of experiment – 0.9% NaCl, 0.05 ml/20 g body weight, intramuscularly.

Selected groups of experimental animals were euthanized on day 14 and day 28 of the study. Immediately before euthanasia, all mice were weighed and, under light ether anesthesia, blood samples were taken from the orbital venous sinus for haematological examination. After that the euthanasia was performed by cervical dislocation. Lungs were removed from all animals for macroscopic examination. Tumor volume was determined by the ellipsoid volume formula.

A general haematological analysis of venous blood allows for the assessment of the content of formed blood elements, the detection of pathologies of the hematopoietic system in the body, and the elimination of risk factors for their development. It also helps to assess the effectiveness of the prescribed treatment.

The conducted studies revealed a statistically significant decrease in the overall platelet count and an increase in thrombocytes against the background of the growth of LL carcinoma and against the background of its metastatic progression. Regarding the platelet index – the relative width of the platelet distribution by volume (an indicator of platelet heterogeneity), a correlation was noted with the progression of LL tumor metastasis. This indicator increased by 15.21–41.65%, against the background of the primary tumor – there were no differences compared to intact animals.

When using anticoagulants enoxaparin and sulodexide, which inhibited the formation of metastases in the lungs of animals by 60.88% and 63.79%, respectively, the number of platelets significantly increased and the percentage of the relative width of the platelet distribution by volume decreased by 15.21% and 1.8%, respectively.

The prognostic significance of platelet parameters is high enough to improve treatment strategies for cancer patients.

Key words: hemogram, Lewis lung carcinoma, metastases, anticoagulants.

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

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

Karatsuba T. A.: <https://orcid.org/0000-0003-4913-5953> ^{AEF}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest. / Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

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 – Wrighting 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 27.09.2024 / Стаття надійшла 27.09.2024 року

Accepted 28.02.2025 / Стаття прийнята до друку 28.02.2025 року

DOI 10.29254/2077-4214-2025-1-176-127-135

UDC 572.087:612.13:796.071

Stepanenko I. O. Sarafyniuk L. A.

CORRELATIONS OF RHEOGRAPHIC INDICATORS OF ARTERIAL TONE IN THE SHIN WITH ANTHROPOMETRIC DIMENSIONS IN VOLLEYBALL PLAYERS OF DIFFERENT SOMATOTYPES

National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya (Vinnytsya, Ukraine)

lsarafynyuk@gmail.com

Constitutional features of the body of volleyball players can have a significant impact on sports performance and are closely related to indicators of the cardiovascular system. The aim of the work is to investigate the relationships between the tonic parameters of the lower leg rheovasogram and external body dimensions in highly professional female volleyball players of different somatotypes. A study was conducted on 108 female volleyball players aged 16-20 years playing at a competitive level with sports experience of 6.361 ± 2.865 years. Indicators of the tone of the shin arteries were determined as derivatives of amplitude and time rheovasographic parameters using the tetrapolar rheocardiography method. Anthropometric research was carried out according to the recommendations of P. P. Shaparenko (2000). The Heath-Carter method (1990) was used in the somatotypological study. Statistical analysis was performed in the "Statistica 5.5" program; Spearman's method was used to establish correlations between hemodynamic and anthropometric indicators. The results of our study also indicate pronounced differences in the strength and quantity of relationships between rheovasographic parameters of the shin, which reflect vascular tone, and anthropometric indicators in volleyball players with different somatotypes. More relationships were detected in volleyball players of the ectomorphic somatotype; the smallest number of relationships was found in volleyball players of the mesomorphic type. In volleyball players of all somatotypes, body composition indicators were the tone indicator of all arteries of the shin were most closely correlated.

Key words: correlation, peripheral hemodynamics, anthropometry, somatotype, female athletes, volleyball.

Connection of the publication with planned research works.

The work is a fragment of the planned research work of National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya "Somato-viscerometric features of the human body in different periods of ontogenesis" (state registration number 0121U113772).

Introduction.

Constitutional features of the athletes' body, such as absolute and relative values of longitudinal and girth dimensions of the body [1, 2, 3], the value of individual components of body mass [4], can have a significant impact on the performance of athletes in many sports. Despite the fact that systematic, long-term, specific, professional training in a particular sport adjusts the morpho-functional characteristics of the athlete's body to their needs [5], individuals with different somatotypes of the same sport, gender, and age have a significant difference in the values of the external structure of the body and the cardiovascular system [6, 7]. Therefore, studying the characteristics of heart function and vascular condition, as the main limiting factor of performance, in highly professional female athletes of different constitutional types is of great importance [8, 9, 10]. The state of peripheral hemodynamics, especially the indicators of

arterial tone of a particular region of the vascular bed, determines the level of adaptive capabilities to physical exertion [11, 12]. Significant relationships were found between peripheral hemodynamic parameters and individual anthropometric dimensions and the magnitude of the components of the somatotype and human body weight. [13]. This pattern was also found in athletes. [14]. Unfortunately, we have not found any scientific studies that have studied the relationships between the parameters of the external structure of the body and the indicators of the tone of arteries of different diameters on the shin in professional volleyball players belonging to different constitutional types.

The aim of the study.

To investigate the relationships between the tonic parameters of the rheovasogram of the shin and the external body dimensions in highly professional female volleyball players of different somatotypes.

Object and research methods.

In the period 2017-2023, 108 volleyball players of the adolescent period of ontogenesis (from 16 to 20 years inclusive) with a high level of sports skills (from II adult to masters of sports) with an average sports experience of 6.361 ± 2.865 years were studied. The examination was performed during the competitive period, with