

Національна академія медичних наук України
ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАМН України"

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Примірник ____

МУНЬКО МАКСИМ АНДРІЙОВИЧ

УДК 615.273.53+616-006.08

**ДИСЕРТАЦІЯ
ВИВЧЕННЯ ЕФЕКТІВ ПРЯМИХ АНТИКОАГУЛЯНТІВ
СУЛОДЕКСИДУ ТА ЕНОКСАПАРИНУ В ПОЄДНАННІ З
ЦИСПЛАТИНОМ НА МЕТАСТАЗУЮЧІЙ МОДЕЛІ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПУХЛИННОГО РОСТУ**

091 – Біологія, освітньо-наукова програма «Фармакологія»

09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ М.А. Мунько

Науковий керівник:

Карацуба Тетяна Анатоліївна, кандидат біологічних наук

Київ 2025

АНОТАЦІЯ

Мунько М. А. Вивчення ефектів прямих антикоагулянтів сулодексиду та еноксапарину в поєднанні з цисплатином на метастазуючій моделі експериментального пухлинного росту – кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія, освітньо-наукова програма «Фармакологія» (09 Біологія). – ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Київ, 2025.

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

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

Фармакологічна модуляція росту пухлини передбачає вплив на різні клітинні та молекулярні шляхи з метою гальмування розвитку пухлини або підвищення ефективності протипухлинної терапії.

Антикоагулянти в контексті онкологічних захворювань застосовуються для профілактики та лікування тромбозів, які часто виникають як ускладнення пухлинного процесу чи протипухлинної терапії. На сьогодні, результати сучасних досліджень охоплюють широкий спектр наукових

праць, присвячених саме протипухлинній та антиметастатичній активності антикоагулянтів прямої дії. Тому пошук та розробка нових схем лікування злоякісних новоутворень з препаратами супроводу розширює можливість протипухлинної терапії.

Представлену дисертаційну роботу було присвячено дослідженню впливу застосування антикоагулянтів прямої дії сулодексиду та еноксапарину на фоні застосування з протипухлинним засобом цисплатину на утворення метастазів у легенях мишей-самців лінії C₅₇BL/6 на тлі спонтанно метастазуючої моделі пухлинного росту карциноми легень Льюїса; оцінці впливу на гематологічні, коагулометричні показники системи гемостазу, тромбоцитопоезу у дослідних тварин та виявленню біомаркерів, які пов'язані з метастазуванням. Контрольною групою слугували миші - самці лінії C₅₇BL/6 без пухлин.

Карциному легень Льюїса перещеплювали в концентрації $3 \cdot 10^5$ клітин у 0,3 мл фізіологічного розчину внутрішньом'язово в праву гомілку мишей лінії C₅₇BL/6. Досліджувані препарати вводили у наступних дозах та режимах: цисплатин на 4-ий день після перещеплення пухлинних клітин у дозі 6,0 мг/кг, одноразово, внутрішньоочеревинно; сулодексид на 5-ий день після перещеплення пухлинних клітин у дозі 2,0 мг/кг, внутрішньом'язово, 20 днів; еноксапарин на 5-ий день після перещеплення пухлинних клітин у дозі 10,0 мг/кг, підшкірно, 20 днів.

До початку перещеплення клітин карциноми легень Льюїса у всіх експериментальних мишей було проведено аналіз на час зсідання крові за Моравіцем, на 0, 14 та 28 дні дослідження. Експериментальні тварини були піддані евтаназії на 28 день експерименту. Безпосередньо перед евтаназією всіх мишей було зважено та під легким ефірним наркозом були відібрані зразки крові з орбітального венозного синусу тварин для гематологічних та коагулометричних досліджень і здійснено евтаназію шляхом цервікальної дислокації. У всіх тварин було вилучено та зважено селезінку, легені, відібрано кістковий мозок для подальшого морфологічного аналізу.

За результатами проведених досліджень показано, що при застосуванні сулодексиду у дозі 2,0 мг/кг, (введення протягом 20 днів, на фоні цисплатину у дозі 6,0 мг/кг, одноразово, на 28 день експерименту) відсоток гальмування утворення метастазів у легенях становив - 97,42 %. При уведенні еноксапарину у дозі 10,0 мг/кг (введення протягом 20 днів, у поєднанні з цисплатином 6,0 мг/кг, одноразово) утворення метастазів гальмувалось на 71,01 %. За умов одноразового уведення цисплатину у дозі 6,0 мг/кг зазначений показник становив 36,83 %.

Дослідження тромбоцитарної ланки гемостазу, коагуляційної активності крові дослідних тварин показали що, на тлі метастазуючого пухлинного росту карциноми легень Льюїса розвивається гіперкоагуляція - скорочення часу зсідання крові до $0,81 \pm 0,25$ хв та тромбоцитопенія - кількість тромбоцитів у крові знижувалась на 55 – 57 %. У контрольних тварин (без пухлини) цей показник становив від $5,12 \pm 0,19$ хв до $5,96 \pm 0,47$ хв, кількість тромбоцитів була на рівні від $802,75 \pm 116,48$ до $802,75 \pm 116,48$ (10^3 /мкл). Вміст фібриногену у плазмі крові дослідних тварин, достовірно підвищувався до $4,50 \pm 0,96$ мг/мл у порівнянні з даним показником контрольних мишей – $3,42 \pm 0,38$ мг/мл. При визначенні протромбінового часу у мишей з масивними метастазами у легенях без лікування було встановлено достовірне зниження до 12(11;12) с. Протромбіновий час контрольної групи тварин становив $16,33 \pm 1,75$ с.

Монотерапія цисплатином у дозі 6,0 мг/кг, одноразово, супроводжувалась збільшенням часу зсідання крові у 4,9 рази та підвищенням кількості тромбоцитів у крові дослідних мишей у 1,7 рази у порівнянні з зазначеними показниками тварин з перещепленою карциномою Льюїса без лікування. Вміст фібриногену та протромбіновий час достовірно не відрізнялись від зазначених показників мишей контрольної групи. Водночас, терапія сулодексидом (у дозі 2,0 мг/кг, протягом 20 днів) та еноксапарином (у дозі 10,0 мг/кг, протягом 20 днів) на фоні застосування з цисплатином (у дозі 6,0 мг/кг, одноразово), супроводжувалась достовірним

збільшенням часу зсідання крові на 10,12 - 11,10 рази, відповідно. Кількість тромбоцитів у крові дослідних тварин при застосуванні сулодексиду у поєднанні з цисплатином була на рівні контрольної групи тварин без пухлин. Терапія еноксапарином у поєднанні з цисплатином не мала достовірних відмінностей з зазначеним показником у дослідних мишей, які отримували одноразово цисплатин, як монотерапію.

Таким чином, порівняльний аналіз отриманих даних виявив значне зниження метастатичної активності епідермоїдної карциноми легень Льюїса за умов застосування антикоагулянтів прямої дії сулодексиду та еноксапарину в поєднанні з цисплатином, ніж використання цисплатину, як монотерапію. Результати досліджень можуть стати основою розробки нових схем лікування онкологічних хворих зі злоякісними новоутвореннями, яким притаманний гематогенний шлях метастазування та спрямованих на тромбоцитарні мішені.

Наукова новизна проведеної роботи.

Уперше експериментально доведено ефективність антиметастатичної та протипухлинної терапії прямих антикоагулянтів сулодексиду та еноксапарину в поєднанні з протипухлинним засобом цисплатином.

У ході даного дослідження вперше показано, що на тлі метастазуючого пухлинного росту *in vivo* розвивається гіперкоагуляційний стан I стадії ДВЗ-синдрому, який характеризується суттєвим скороченням часу зсідання цільної крові, збільшенням вмісту фібриногену, зниженням протромбінового часу у плазмі крові, спленомегалією, яка є наслідком посиленої секвестрації тромбоцитів та збільшення їх селезінкового пулу, що викликає тромбоцитопенію. При аналізі мазків кісткового мозку виявлено пригнічення тромбоцитопоезу, що вказує на реактивний стан кісткового мозку, котре є одною з причин зниження кількості тромбоцитів у крові. Виявлено взаємозв'язок змін у тромбоцитарному гемостазі з прогресуванням метастазування.

У дисертаційній роботі вперше показано високий антиметастатичний ефект застосування сулодексиду на фоні цисплатину. Виявлено, що при застосуванні сулодексиду, як препарату супроводу, показники тромбоцитарного гемостазу, тромбоцитопоезу були на рівні контрольних тварин (без пухлин). Терапія еноксапарином у поєднанні з цисплатином виявила значне зниження метастатичної активності карциноми легень Льюїса. Такі компоненти гемостазу, як вміст фібриногену, протромбіновий час, час зсідання крові та кількість мегакаріоцитів у кістковому мозку були на рівні контрольних тварин, кількість тромбоцитів у крові не мала достовірних відмінностей з зазначеним показником у дослідних мишей, які отримували одноразово цисплатин, як монотерапію.

Практична значимість проведеної роботи

Результати проведеного дослідження розширюють сучасні уявлення про участь паранеопластичного гіперкоагуляційного синдрому в патогенезі метастазування та дії протипухлинних препаратів. Вони слугуватимуть основою розробки нових схем лікування пацієнтів з злоякісними новоутвореннями, спрямованими на тромбоцитарні мішені, та обґрунтуванням застосування антикоагулянтів прямої дії у якості супроводу для лікування метастазуючих форм пухлин.

Результати дослідження впроваджено в навчальний процес і наукову діяльність: кафедри фармакології, загальної та клінічної фармації Дніпровського державного медичного університету, кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, кафедри загальної і клінічної фармакології та фармакогнозії Одеського національного медичного університету.

Особистий внесок здобувача.

Під час підготовки та роботи над дисертацією автор особисто виконав патентний пошук, здійснив критичний аналіз літературних джерел за темою

дисертації. Під керівництвом наукового керівника було сформульовано мету та завдання роботи, а також проведено планування дослідження. Було засвоєно всі необхідні експериментальні методи дослідження – експериментальної онкології, гематологічні (загальний клінічний аналіз крові), коагулометричні (визначення вмісту фібриногену, протромбінового часу (ПЧ), активності антитромбіну III, часу зсідання крові за Моравіцем), морфологічні, цитологічні. За безпосередньої участі автора було проведено перещеплення клітин епідермоїдної карциноми легень Льюїса лінійним мишам-самцям C₅₇Bl/6, уведення досліджуваних препаратів, проведено гематологічні, коагулометричні та гістологічні дослідження. Дисертантом особисто було проведено статистичну обробку цифрових даних, проаналізовано отримані результати, складено таблиці та рисунки, підготовлено та написано розділи роботи. У співпраці з науковим керівником здійснив аналіз та узагальнення отриманих результатів, а також оформив висновки з дисертації. Автор не запозичував ідеї та/або результати роботи інших співавторів у сумісних публікаціях.

Апробація результатів дисертації.

Основні положення та результати дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на: Міжнародній науково-практичній конференції «Стратегічні пріоритети розвитку науки, освіти, технологій і суспільства» (Центр фінансово-економічних наукових досліджень, Полтава, 9 листопада 2023 р.); VI науково-практичній internet-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» (Національний фармацевтичний університет, м. Харків, 16 листопада 2023 р.); Науково-практичній конференції молодих учених із міжнародною участю «Актуальні питання фармакології та лікарської токсикології» (ДУ «Інститут фармакології та токсикології», Київ, 25-26 вересня 2024); Науково-практичній конференції «Експериментальна та клінічна фармакологія», присвячена 100-річчю кафедри фармакології

Національного фармацевтичного університету, (Національний фармацевтичний університет, Харків, 23-24 жовтня 2024 р); Науково-практичній конференції «Сучасні наукові дослідження: від теорії до практики» (Львів, 27-28 червня 2025 р).

Публікації: За матеріалами дисертації опубліковано 10 наукових робіт, у тому числі 5 статей, які надруковані у наукових фахових виданнях України, та 5 тез доповідей у збірниках матеріалів науково-практичних конференцій.

Ключові слова: *епідермоїдна карцинома легень Льюїса, антикоагулянти, пухлинний ріст, метастази, гемограма, тромбоцити, гіперкоагуляція*

ANNOTATION

Munko M. A. The study of the effects of direct anticoagulants sulodexide and enoxaparin in combination with cisplatin on a metastatic model of experimental tumor growth. – A qualification scientific work presented as a manuscript.

Dissertation for the Doctor of Philosophy degree in specialty 091 Biology, educational and scientific program “Pharmacology” (09 Biology). – SI "Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, 2025.

Malignant neoplasms represent one of the most significant medical, biological, social, and economic challenges globally and in Ukraine. The incidence and mortality rates associated with cancer continue to rise, driven by unstable economic conditions, an unfavorable ecological conditions, and the significant aging of the population.

Metastasis remains the primary cause of cancer-related deaths. Tumor dissemination to distant organs predominantly occurs via hematogenous spread. Tumor progression and aggressiveness largely depend on the ability of cancer cells to induce neoangiogenesis and metastasis. Currently, particular attention is paid to studying pathological alterations in the hemostatic system in oncology patients to improve therapeutic outcomes through the evaluation of hypercoagulation markers and the role of the tumor cell coagulation scaffold in the treatment of this category of patients.

Pharmacological modulation of tumor growth involves influencing various cellular and molecular pathways to inhibit tumor development or enhance the efficacy of antitumor therapy.

In oncology, anticoagulants are employed to prevent and treat thrombosis, which frequently arises as a complication of both malignancy and antitumor therapies. Today, the results of modern research cover a wide range of scientific works devoted specifically to the antitumor and antimetastatic activity of direct-acting anticoagulants. Therefore, the search and development of new treatment

regimens for malignant neoplasms with accompanying drugs expands the possibilities of antitumor therapy.

This dissertation was devoted to investigating the effects of direct-acting anticoagulants sulodexide and enoxaparin, under administration of the antitumor agent cisplatin, on lung metastases in male C₅₇BL/6 mice using a spontaneously metastasizing Lewis lung carcinoma model. The study also assessed hematological and coagulometric parameters of the hemostatic system, thrombocytopoiesis, and identified potential biomarkers associated with metastasis. The control group was male C₅₇BL/6 mice without tumors.

Lewis lung carcinoma cells ($3 \cdot 10^5$ cells in 0.3 ml of saline) were inoculated intramuscularly into the right thigh of the C₅₇BL/6 mice. The studied drugs were administered in the following doses and regimens: cisplatin – on day 4 post-inoculation, 6.0 mg/kg, single intraperitoneal injection; sulodexide – on day 5 post-inoculation, 2.0 mg/kg, intramuscularly, daily for 20 days; enoxaparin – on day 5 post-inoculation, 10.0 mg/kg, subcutaneously, daily for 20 days.

Before inoculation of Lewis lung carcinoma cells, all mice underwent blood clotting time evaluation using the Morawitz method. The procedure was performed on the 14th and 28th day of the study. Experimental animals were euthanized on the 28th day of the experiment. Immediately before euthanasia, the mice were weighed, and under light ether anesthesia, blood samples were collected from the retro-orbital venous sinus for hematological and coagulometric analyses. Euthanasia was performed via cervical dislocation. The spleen and lungs were harvested and weighed from all animals, and bone marrow samples were collected for further morphological examination.

Key findings demonstrated that sulodexide (2.0 mg/kg for 20 days) under cisplatin administration (6.0 mg/kg, single dose on the 28th day of the experiment) inhibited lung metastasis formation by 97.42 %. Enoxaparin (10.0 mg/kg for 20 days) in combination with cisplatin (6.0 mg/kg, single dose) reduced metastasis formation by 71.01 %. Cisplatin monotherapy (6.0 mg/kg) showed only 36.83 % inhibition of lung metastases.

Platelet-related hemostasis and blood coagulability analysis indicated a hypercoagulable state and thrombocytopenia under metastatic tumor growth of Lewis lung carcinoma. Clotting time was reduced to 0.81 ± 0.25 min, and platelet counts dropped by 55 – 57 % providing evidence of thrombocytopenia. In control animals (without tumors), clotting time ranged from 5.12 ± 0.19 min to 5.96 ± 0.47 min, and platelet counts were 802.75 ± 116.48 ($10^3/\mu\text{l}$). Fibrinogen levels in tumor-bearing mice increased significantly to 4.50 ± 0.96 mg/ml compared to 3.42 ± 0.38 mg/ml in controls. Prothrombin time decreased markedly to 12 (11;12) s in animals with massive lung metastases, while in controls it was 16.33 ± 1.75 s.

Cisplatin monotherapy (6.0 mg/kg, single dose) increased clotting time 4.9-fold and platelet count 1.7-fold compared to untreated animals with inoculated Lewis carcinoma. Fibrinogen content and prothrombin time remained comparable to those in control mice.

At the same time, therapy with sulodexide at a dose of 2.0 mg/kg, 20 days, and enoxaparin at a dose of 10.0 mg/kg, 20 days, under the use of a single dose of cisplatin (6.0 mg/kg) was accompanied by a significant increase in blood clotting time by 10.12 - 11.10 times, respectively. The number of platelets in the blood of experimental animals when using sulodexide in combination with cisplatin was at the level of the animals without tumors. Therapy with enoxaparin in combination with cisplatin had no significant differences with the indicated parameter in experimental mice that received cisplatin as monotherapy.

Thus, comparative analysis of data obtained revealed that sulodexide and enoxaparin, when used as an adjunct to cisplatin, significantly reduced the metastatic activity of Lewis lung carcinoma. The results of the research may become the basis for the development of new treatment regimens for cancer patients with malignant neoplasms characterized by a hematogenous route of metastasis and directed at platelet targets.

Scientific novelty.

This study was the first to experimentally demonstrate the antimetastatic and antitumor efficacy of direct anticoagulants sulodexide and enoxaparin in combination with the antitumor agent cisplatin.

It was also shown for the first time that metastatic tumor growth *in vivo* is accompanied by a hypercoagulable state corresponding to stage I of disseminated intravascular coagulation (DIC) syndrome, characterized by shortened whole blood clotting time, elevated fibrinogen levels, decreased prothrombin time, and splenomegaly due to increased platelet sequestration and an increase in their splenic pool, which causes thrombocytopenia. Bone marrow smears revealed suppressed thrombocytopoiesis, indicating a reactive state of the bone marrow as a potential cause of reduced peripheral platelet counts. A correlation was established between platelet hemostasis disturbances and metastasis progression.

The dissertation work first demonstrated the high antimetastatic effect of sulodexide under cisplatin administration. It was found that when using sulodexide as a supporting drug, the indicators of platelet hemostasis and thrombocytopoiesis were at the level of control animals (without tumors). Enoxaparin + cisplatin therapy significantly reduced the metastatic activity of Lewis lung carcinoma. Components of hemostasis, such as fibrinogen content, prothrombin time, clotting time, and megakaryocyte counts in bone marrow, were consistent with healthy controls. Platelet counts in this group did not significantly differ from those in mice treated with cisplatin monotherapy (single dose).

Practical significance.

The study's results expand current understanding of the role of paraneoplastic hypercoagulation syndrome in the pathogenesis of metastasis and the mechanism of action of anticancer drugs. The findings may serve as the foundation for the development of novel treatment strategies for cancer patients with malignant neoplasms, with a focus on platelet targets and rationale for using

direct anticoagulants as supportive therapy for the treatment of metastatic forms of tumors.

The results have been implemented into the educational and research activities of: Department of Pharmacology, General and Clinical Pharmacy of Dnipro State Medical University, Department of Biochemistry, ESC "Institute of Biology and Medicine" of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Department of General and Clinical Pharmacology and Pharmacognosy of Odesa National Medical University.

Personal author's contribution.

During the preparation and work on the dissertation, the author independently performed the patent search and conducted a critical analysis of the literature on the topic of the dissertation. Under the guidance of the scientific supervisor, the research aim and objectives of the work were formulated, and the development of the study design was carried out. The author mastered all required experimental techniques, including experimental oncology, hematological (complete blood count), coagulometric (fibrinogen levels, prothrombin time, antithrombin III activity, Morawitz clotting time), and morphological methods. With the direct participation of the author Lewis lung squamous cell carcinoma cells were inoculated into male C57Bl/6 mice, the test drugs were administered, and hematological, coagulometric, and histological studies were performed. Statistical data processing, result analysis, tables, graphs, and manuscript sections writing were also carried out by the author personally. The dissertation's results analysis and generalizations, as well as the conclusions, were prepared in collaboration with the scientific supervisor. No ideas or results from other co-authors were borrowed from joint publications.

Presentation of dissertation results.

The main findings were presented and discussed at: International Scientific and Practical Conference "Strategic Priorities for the Development of Science, Education, Technology and Society" (Poltava, Nov 9, 2023); VI Scientific and Practical Internet Conference with International Participation "Mechanisms of Pathological Processes and Diseases and Their Pharmacological Correction" (Kharkiv, Nov 16, 2023); Scientific and Practical Conference of Young Scientists with International Participation "Current Issues of Pharmacology and Medical Toxicology" (Kyiv, Sept 25–26, 2024); Scientific and Practical Conference "Experimental and Clinical Pharmacology" dedicated to the 100th anniversary of the Department of Pharmacology, National University of Pharmacy (Kharkiv, Oct 23–24, 2024); Scientific and Practical Conference "Modern scientific research: from theory to practice" (Lviv, June 27-28, 2025).

Publications: Based on the materials of the dissertation, 10 scientific works have been published, including 5 articles published in scientific professional issues of Ukraine, and 5 abstracts of scientific presentations in abstract books of scientific and practical conferences.

Keywords: *Lewis epidermoid lung carcinoma, anticoagulants, tumor growth, metastases, hemogram, platelets, hypercoagulability.*

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Пуськов О. М., Мунько М. А., Карацуба Т. А. Вплив сулодексиду на ріст і метастазування карциноми легень Льюїс: збірник тез доповідей Міжнародної науково-практичної конференції «Стратегічні пріоритети розвитку науки, освіти, технологій і суспільства» Частина 2, 9 листопада 2023 р. м. Полтава. С. 34-36.

2. Мунько М.А., Пуськов О.М., Карацуба Т.А. Метастатична активність карциноми легень Льюїс за умов застосування антикоагулянта прямої дії еноксапарину. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція: матеріали VI науково-практичної internet-конференції з міжнародною участю, м. Харків, 16 листопада 2023 р. / НФаУ, 2023. С. 330-331.*

3. Мунько М.А. Вплив антикоагулянта прямої дії еноксапарину на метастатичну активність карциноми легень Льюїс. Вісник проблем біології та медицини. 2024. Вип. 1, №172. С. 194-203. <http://doi.org/10.29254/2077-4214-2024-1-172-194-203>. (Дисертантом проведено аналіз літератури, проведення експериментальних досліджень, обговорення, підготовка тексту статті до друку).

4. Пуськов О.М., Мунько М.А., Карацуба Т.А. Вплив антикоагулянтів прямої дії на процеси метастазування. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2024. № 1 т. 18. С. 43-52. <https://doi.org/10.33250/18.01.043>. (Дисертантом проведено аналіз літератури, обговорення, підготовка тексту статті до друку).

5. Мунько М.А., Карацуба Т.А. Метастатична активність карциноми легень Льюїс за впливу антикоагулянтів прямої дії на тромбоцитарний гемостаз і коагуляційну активність крові. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2024. № 3 т. 18. С. 175-184. <http://doi.org/10.33250/18.03.175>. (Дисертантом проведено аналіз літератури, проведення експериментальних досліджень, обговорення, підготовка тексту статті до друку).

6. Мунько М.А., Карацуба Т.А. Метастатична активність карциноми легень Льюїс за впливу антикоагулянтів прямої дії на тромбоцитарний гемостаз і коагуляційну активність крові. *Актуальні питання фармакології та лікарської токсикології: тези допов. науково-практичної конференції молодих учених із міжнародною участю, 25-26 вересня 2024, Київ / ДУ «ІФТ НАМНУ», 2024. С. 226-228.*

7. Мунько М.А., Пуськов О.М., Карацуба Т.А. Синдром дисемінованого внутрішньосудинного зсідання крові на тлі метастазування карциноми легень Льюїс. *Експериментальна та клінічна фармакологія: тези допов. науково-практичної конференції, присвяченої 100-річчю кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету, 23-24 жовтня 2024. Харків / НФаУ, 2024. С. 73-76.*

8. 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. *Вісник проблем біології та медицини*. 2025. Вип. 1, №176. С. 116-127. <http://doi.org/10.29254/2077-4214-2025-1-176-116-127>. (Дисертантом проведено аналіз літератури, проведення експериментальних досліджень, обговорення, підготовка тексту статті до друку).

9. Мунько М.А., Карацуба Т.А. Модуляція метастатичної активності карциноми легень Льюїс антикоагулянтом прямої дії сулодексидом на фоні застосування цисплатину. *Сучасні наукові дослідження: від теорії до практики: тези допов. науково-практичної конференції, 27-28 червня 2025, Одеса / Видавництво «Молодий вчений», 2025. С. 18-22.*

10. Мунько М.А. Фармакологічна модуляція первинного пухлинного росту та метастатичної прогресії карциноми легень Льюїс антикоагулянтами прямої дії на фоні застосування цисплатину. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2025. № 3 т. 19. С. 249-257. <https://doi.org/10.33250/19.03.249>. (Дисертантом проведено аналіз літератури, проведення експериментальних досліджень, обговорення, підготовка тексту статті до друку).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	19
ВСТУП.....	21
РОЗДІЛ 1. ВПЛИВ АНТИКОАГУЛЯНТІВ НА ПРОЦЕСИ МЕТАСТАЗУВАННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	27
1.1 Механізми метастазування.....	27
1.2 Система зсідання крові.....	32
1.3 Взаємодія метастазування і системи зсідання крові.....	41
1.4 Вплив антикоагулянтів прямої дії на процеси метастазування.....	45
1.4.1 Доклінічні дослідження антиметастатичної дії НФГ (UFH).....	46
1.4.2 Доклінічні дослідження антиметастатичної дії НМГ (LMWH)...	46
1.4.3 Основні механізми антиметастатичної дії НФГ і НМГ.....	50
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	54
2.1 Характеристика лабораторних тварин та експериментальної моделі пухлинного росту.....	54
2.2 Характеристика обраних препаратів	57
2.3 Дослідження протипухлинної та антиметастатичної активності	58
2.4 Клінічні дослідження крові	60
2.4.1 Гематологічний аналіз крові.....	60
2.4.2 Коагулометричні методи дослідження крові.....	64
2.5 Морфологічні методи дослідження.....	66
2.6 Статистична обробка даних.....	67
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	68
3.1 Вплив антикоагулянтів прямої дії сулодексиду й еноксапарину та за умов сумісного застосування з цисплатином на метастатичну активність карциноми легень Льюїса.....	68

	18
3.1.1 Антиметастатична та протипухлинна дія сулодексиду.....	69
3.1.2 Антиметастатична та протипухлинна дія еноксапарину.....	71
3.1.3. Антиметастатична та протипухлинна дія сумісного застосування сулодексиду та енкапарину з цисплатином.....	72
Резюме.....	75
3.2 Клінічні дослідження крові.....	76
3.2.1 Гематологічні дослідження.....	76
Резюме.....	85
3.2.2 Коагулометричні дослідження.....	87
3.2.2.1. Коагуляційна активність цільної крові за методом Моравіца.....	87
3.2.2.2 Визначення вмісту фібриногену, протромбінового часу, антитромбіну III.....	91
Резюме.....	96
3.3 Морфологічні дослідження.....	98
3.3.1 Масові коефіцієнти легень та селезінки.....	98
3.3.2 Макроскопічні дослідження	101
3.3.3 Мікроскопічні дослідження	102
3.3.4 Вміст мегакаріоцитів у кістковому мозку.....	111
Резюме.....	114
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.	116
ВИСНОВКИ.....	120
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	123
Додаток А Акти провадження.....	141
Додаток Б Список опублікованих автором праць на тему дисертації...	145
Додаток В Відомості про апробацію результатів дослідження.....	148

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АДФ – аденозин дифосфат;
АТП – антитромбін ІІ;
ВТЕ – венозна тромбоемболія;
ЕК – ендотеліальні клітини;
ЕМП – епітеліально-мезенхімальний перехід;
ЕЦМ – екстрацелюлярний матрикс;
ІАП-1 – інгібітор тканинного активатора плазміногену;
ММП – матриксна металопротеїназа;
НК – натуральний кілер;
НМГ – низкомолекулярний гепарин;
НФГ – нефракціонований гепарин;
ПВ – позаклітинні везикули;
ПЧ – протромбіновий час;
СЗК – система зсідання крові;
СРП – синдром розпаду пухлин;
ТАП – тканинний активатор плазміногену;
ТГВ – тромбоз глибоких вен;
ТЕЛА – тромбоемболія легеневої артерії;
ТхА2 – тромбоксан А2;
УНМГ – ультранизькомолекулярні гепарини;
ЦПК – циркулюючі пухлинні клітини;
ADAM – дисинтегрин та металопротеїназа;
bFGF – базовий фактор росту фібробластів;
CD63 – cluster of differentiation 63;
CLEC-2 – лектин-подібний рецептор C-типу;
EGF – епідермальний фактор росту;
GPVI – глікопротеїн VI;
IQR – міжквартильний діапазон;

IL-6 – інтерлейкін 6;

LAMP-2 – мембранний білок пов'язаний з лізосомами 2;

LL – епідермоїдна карцинома легень Льюїса;

MDSC – супресорні клітини мієлоїдного походження;

MHC1 – головний комплекс гістосумісності 1;

P2Y – пуринаергічний рецептор;

PAR – рецептор що активується протеазою;

PSGL-1 – глікопротеїновий ліганд Р-селектину 1;

SDF-1 – стромальний фактор клітинного походження;

TF – тканинний фактор;

TFPI – фактор інгібування шляху TF;

TGFβ – фактор росту пухлин бета;

TXA₂ – тромбоксан 2;

VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) – молекула адгезії судинних клітин-1;

VEGF – фактори росту ендотеліоцитів;

VLA-4 – дуже пізній антиген-4;

VWF – фактор фон Віллебранда;

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. На сьогодні війнні дії на території України суттєво впливають на всі аспекти життя населення країни та в цих умовах населення країни зазнає значний стрес, ті хто перебуває у зоні активних воєнних дій зазнають посттравматичного стресового розладу. На цьому тлі загострюються хронічні захворювання та прогресування онкологічних станів.

Фатальність онкологічного захворювання найбільшою мірою зумовлена метастазуванням злоякісного новоутворення. Здатність до інвазії злоякісної пухлини - процес при якому пухлинні клітини або їх емболи віддаляються від первинної пухлини і проникають в навколишні тканини. Інвазія є першим етапом складного інвазивно-метастатичного каскаду, що призводить надалі до метастазування [1].

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

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 онкопацієнтів та їх реабілітації [3].

На теперішній час доведено, що злоякісні новоутворення мають протромбогенні ефекти і ступінь гіперкоагуляції впливає на утворення метастазів та дає несприятливий прогноз для онкохворих. Додаткові діагностичні критерії забезпечать більш ранню та достовірну діагностику прогресування онкологічного процесу, а антитромботичні стратегії також

можуть надати позитивний вплив на контроль зростання та розповсюдження злоякісної пухлини. Тому порушення в системі гемостазу у онкологічних хворих потребує комплексної корекції на всіх етапах лікування. Такими лікарськими засобами можуть слугувати антикоагулянти прямої дії сулодексид та еноксапарин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. 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).

Мета дослідження: На підставі експериментальних досліджень обґрунтувати використання антикоагулянтів прямої дії (сулодексида та еноксапарину), як препаратів супроводу, на фоні протипухлинної терапії (цисплатином) на тлі метастазуючого пухлинного росту.

Завдання дослідження:

1. Провести дослідження впливу препаратів сулодексида, еноксапарину та за сумісного застосування з цисплатином на утворення метастазів у легенях та тривалість життя мишей лінії C₅₇Bl/6 з перещепленою епідермоїдною карциномою легень Льюїса.

2. Оцінити патологічні зміни у системі тромбоцитарного гемостазу, коагуляційної активності цільної крові та їх взаємозв'язок із прогресуванням метастазування.

3. Визначити вплив сулодексида, еноксапарину на фоні застосування цисплатину на такі показники системи тромбоцитарного гемостазу як кількість тромбоцитів, тромбоцитарні індекси, вміст фібріногену, протромбіновий час, активність антитромбіну III, коагуляційна активність цільної крові на тлі спонтанно метастазуючій епідермоїдної карциноми легень Льюїса.

4. Оцінити ефективність впливу антикоагулянтів прямої дії сулодексиду та еноксапарину за сумісного застосування з цисплатином на утворення метастазів та результати протипухлинної терапії.

Об'єкт дослідження – Фармакотерапія процесу метастазування на тлі злоякісних новоутворень.

Предмет дослідження – антиметастатична активність антикоагулянтів прямої дії сулодексиду, еноксапарину за сумісного застосування з цисплатином.

Методи дослідження: *експериментальної онкології* (перещеплення клітин епідермоїдної карциноми легень Льюїс (LL) лінійними мишами C₅₇Bl/6; визначення середньої тривалості життя дослідних тварин; підрахунок метастазів у легенях та визначення їх об'єму); *гістологічні* (аналіз легень, селезінки), *цитологічні* (підрахунок мегакаріоцитів у кістковому мозку); *гематологічні* (визначення кількості тромбоцитів та тромбоцитарних індексів); *коагулометричні показники* (вміст фібриногену, протромбіновий час (ПЧ), активність антитромбіну III, час зсідання крові) і *статистичні* (отримані числові дані були обраховані Origin Pro 2023b та сайту Statistic Kingdom. За критерієм Шапіро-Уїлка перевіряли нормальність розподілу отриманих даних. Дані з нормальним розподілом подавали як середнє значення $\pm$ похибка середнього ($M \pm m$) та порівнювали з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з наступним тестом Тьюкі. Дані з ненормальним розподілом представляли як медіану (Me) та міжквартильний діапазон (IQR) і порівнювали з використанням критерію Краскела-Уолліса. Різницю вважають статистично значимою при $p < 0,05$).

Наукова новизна одержаних результатів.

Уперше експериментально доведено ефективність антиметастатичної та протипухлинної терапії прямих антикоагулянтів сулодексиду та еноксапарину в поєднанні з протипухлинним засобом цисплатином.

У ході даного дослідження вперше показано, що на тлі метастазуючого пухлинного росту *in vivo* розвивається гіперкоагуляційний стан I стадії ДВЗ-

синдрому, який характеризується суттєвим скороченням часу зсідання цільної крові, збільшенням вмісту фібриногену, зниженням протромбінового часу у плазмі крові, спленомегалією, яка є наслідком посиленої секвертації тромбоцитів та збільшення їх селезінкового пулу, що викликає тромбоцитопенію. При аналізі мазків кісткового мозку виявлено пригнічення тромбоцитопоезу, це вказує на реактивний стан кісткового мозку, що є одною з причин зниження кількості тромбоцитів у крові. Виявлено взаємозв'язок змін у тромбоцитарному гемостазі з прогресуванням метастазування.

У дисертаційній роботі вперше показано високий антиметастатичний ефект застосування сулодексиду на фоні цисплатину. Виявлено, що при застосуванні сулодексиду, як препарату супроводу, показники тромбоцитарного гемостазу, тромбопоезу були на рівні контрольних тварин (без пухлин). Терапія еноксапарином у поєднанні з цисплатином виявила значне зниження метастатичної активності карциноми легень Льюїса. Такі компоненти гемостазу, як вміст фібриногену та протромбіновий час, час зсідання крові, кількість мегакаріоцитів у кістковому мозку були на рівні контрольних тварин. Кількість тромбоцитів у крові не мала достовірних відмінностей із зазначеним показником у дослідних мишей, які отримували одноразово цисплатин, як монотерапію.

Практичне значення одержаних результатів.

Результати проведеного дослідження розширюють сучасні уявлення про участь паранеопластичного гіперкоагуляційного синдрому в патогенезі метастазування та дії протипухлинних препаратів, так і слугуватимуть основою розробки нових схем лікування пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями, спрямованих на тромбоцитарні мішені та обґрунтуванням застосування прямих антикоагулянтів прямої дії у якості супроводу для лікування метастазуючих форм пухлин.

Результати дослідження впроваджено в навчальний процес і наукову діяльність: кафедри фармакології, загальної та клінічної фармації

Дніпровського державного медичного університету, кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, кафедри загально-клінічної фармакології та фармакогнозії Одеського національного медичного університету.

Особистий внесок здобувача.

Під час підготовки та роботи над дисертацією автор особисто виконав патентний пошук, здійснив критичний аналіз літературних джерел за темою дисертації. Під керівництвом наукового керівника було сформульовано мету та завдання роботи, а також проведено планування дослідження. Було засвоєно всі необхідні експериментальні методи дослідження – експериментальної онкології, гематологічні (загальний клінічний аналіз крові), коагулометричні (визначення вмісту фібриногену, протромбінового часу (ПЧ), активності антитромбіну III, часу зсідання крові за Моравіцем), морфологічні. За безпосередньої участі автора було проведено перещеплення клітин епідермоїдної карциноми легень Льюїс лінійним мишам-самцям C₅₇Bl/6, введення досліджуваних препаратів, проведено гематологічні, коагулометричні та гістологічні дослідження. Дисертантом особисто було проведено статистичну обробку числових даних, проаналізовано отримані результати, складено таблиці та рисунки, підготовлено та написано розділи роботи. У співпраці з науковим керівником здійснив аналіз та узагальнення отриманих результатів, а також оформив висновки з дисертації. Автор не запозичував ідеї та/або результати роботи інших співавторів у сумісних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації були повідомлені та обговорені на вітчизняних та міжнародних конференціях: XVI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні питання клінічної медицини» (24-25 листопада 2022, Запоріжжя, Україна); Міжнародна науково-практична конференція «Стратегічні пріоритети розвитку науки, освіти, технологій і суспільства» (9 листопада 2023, Полтава, Україна); VI науково-практична internet-конференція з міжнародною участю

«Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» (16 листопада 2023, Харків, Україна); Науково-практична конференція молодих учених із міжнародною участю «Актуальні питання фармакології та лікарської токсикології» (25-26 вересня 2024, Київ, Україна); Науково-практична конференція, присвячена 100-річчю кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету «Експериментальна та клінічна фармакологія» (23-24 жовтня 2024, Харків, Україна).

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 10 наукових праць, зокрема 5 наукових статей у фахових виданнях України. Окрім того, опубліковано 5 тез доповідей у збірниках матеріалів науково-практичних конференцій.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертаційна робота викладена державною мовою на 148 сторінках машинописного тексту та складається з анотації, списку друкованих праць, вступу, 4 розділів: огляду літератури, матеріалів та методів, власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, а також загальних висновків, списку використаних джерел (з яких кирилицею – 22, латиницею – 141) та додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 117 сторінок друкованого тексту. Роботу ілюстровано 13 таблицями та 17 рисунками.

РОЗДІЛ 1

ВПЛИВ АНТИКОАГУЛЯНТІВ НА ПРОЦЕСИ МЕТАСТАЗУВАННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Механізми метастазування

Метастазування є небажаним процесом для онкохворих пацієнтів, котрий значно зменшує їх шанси на успішне лікування злоякісного новоутворення. Це складний та багатоетапний процес, здатний залучати імунну систему, систему зсідання крові та інші клітини організму для утворення нових пухлин, віддалених від первинної. Початком метастазування вважається зміна фенотипу пухлинних клітин на більш рухливий. Причиною може бути геномна нестабільність, проявом якої є генотипове та фенотипове різноманіття клітин у межах однієї пухлини. Додатковим стимулом також може слугувати реакція оточуючого середовища на чужорідні клітини та конкуренція між пухлинними клітинами за більш придатні умови існування. В результаті даного відбору виникає популяція клітин з усіма необхідними для метастазування ознаками. Певну роль в метастазуванні вчені також надають і епітеліально-мезенхімальному переходу (ЕМП). Це процес характерний для періоду ембріогенезу, але варто зазначити, що він не є тотожним ЕМП пухлин, а лише має спільні риси. Для нього характерна дедиференціація клітин та втрата ознак, характерних для клітин епітелію, натомість формується мезенхімальний фенотип. Важливим для ЕМП є втрата клітинами Е-кадгеринів, білків міжклітинних контактів, характерних для епітелію. Також вважається, що під час дедиференціації утворюються стовбурові ракові клітини, котрі і є попередниками віддалених метастазів. Набуття пухлинною клітиною рухливості є початком першої стадії метастазування - *інвазії*, тобто міграції пухлинних клітин крізь екстрацелюлярний матрикс (ЕЦМ) в оточуючих тканинах [1]. Для цього клітини перебудовують свій цитоскелет та за допомогою інтегринів

прикріплюється до матриксу, використовуючи його як опору [4]. Також важливу роль в інвазії грає виділення пухлинними клітинами ферментів, що лізують матрикс та полегшують міграцію. До них відносяться серинові протеїнази, цистеїнові протеїнази, аспартилові протеїнази і металозалежні протеїнази з родини матриксних металопротеїназ (ММП) та родини металопротеїназ, дизинтегрин та металопротеїназа (a disintegrin and metalloprotease, ADAM) [1].

Існує кілька можливих шляхів поширення метастатичних клітин у віддалені органи. Найпоширенішими вважаються лімфогенний та гематогенний (рис. 1.1) (котрий буде розглядатись далі) шляхи, а ураження лімфатичних вузлів є основою клінічної стадії та визначає терапевтичні підходи. Також були виявлені периневральна інвазія та трансцеліомне поширення (через черевну порожнину), котрі часто залишаються поза увагою [5].

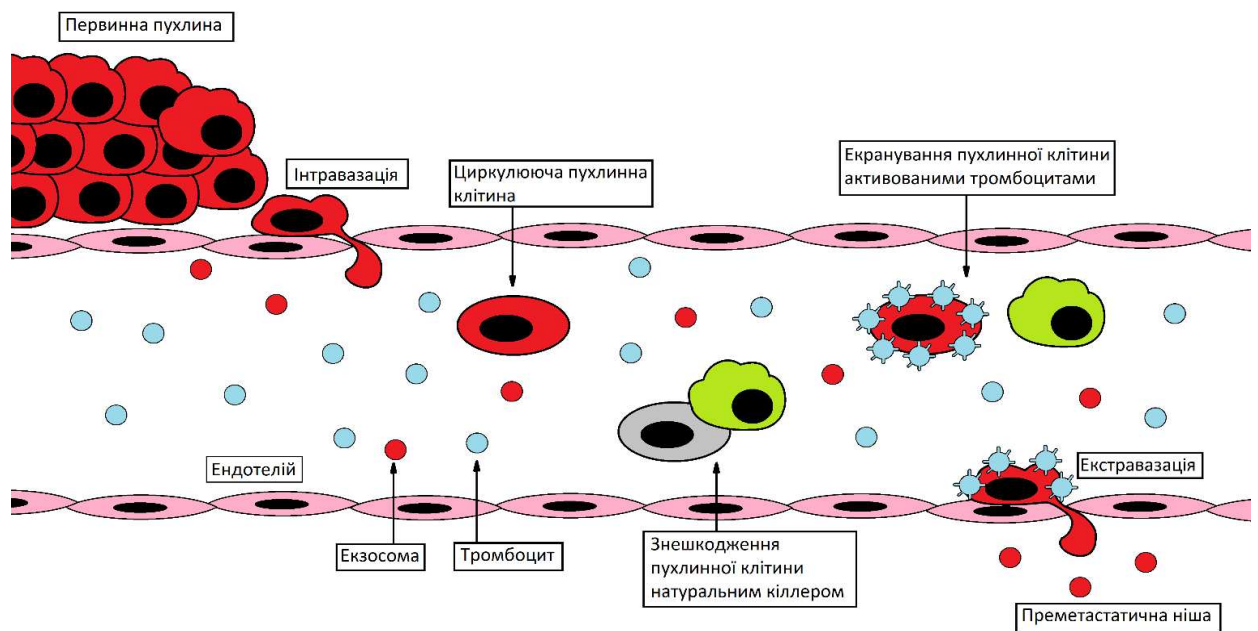


Рис. 1.1. Схематичне зображення інвазії злоякісної пухлини та взаємодія її клітин з тромбоцитами у кровоносному руслі [6].

Рух метастатичних клітин у ЕЦМ не є випадковим, а відбувається шляхом хемотаксису за хімічним градієнтом. Було показано, що інтерлейкін-6 (IL-6), що виділяється ендотелієм, слугує хемоатрактантом для пухлинних клітин та сприяє їх проникненню у кровоносне русло [7].

Ендотелій — це одношаровий шар клітин у формі бруківки, який покриває внутрішню стінку кровоносних судин, відокремлюючи просвіт від навколишніх тканин як целофановий бар'єр. Хоча товщина ендотелію становить менше 0,2 мкм, у людини середнього зросту він важить приблизно 1 кг і покриває загальну площу від 4000 до 7000 м². Ендотеліальні клітини (ЕК) є центральною і активною частиною двох основних систем організму — імунної та судинної. Залежно від тканини походження, структура ЕК варіюється. Функції ЕК є різноманітними і включають регулювання транспорту з крові до клітин і оточуючих тканин, проникності, судинного тонуусу, клітинної адгезії, проліферації гладких м'язових клітин, ангіогенезу і запалення стінки судин. ЕК здатні реагувати на фізичні та хімічні сигнали шляхом вироблення широкого спектру факторів, що регулюють ці процеси [8].

Наступним кроком є проникнення метастазів у кровоносні або лімфатичні судини - *інтравазація*. Було виявлено, що для проникнення крізь стінку судин ракові клітини можуть залучати макрофаги, що продукують ферменти, необхідні для лізису ЕЦМ та базальної мембрани ендотеліоцитів. Після цього пухлинна клітина просуває філодоподію у міжклітинний просвіт і проникає у люмен, не порушуючи міжклітинні контакти ендотеліоцитів [9]. Інвазія та інтравазація можуть бути не єдиним способом проникнення пухлинних клітин у кровотік, певну роль може грати і ангіогенез. За умов недостатності поживних речовин та кисню пухлини здатні стимулювати ріст нових судин, виділяючи фактори росту ендотеліоцитів (VEGF), чим активують їх міграцію та проліферацію.

VEGF, є одним із поліпептидних білків і найбільш відомим фактором у сімействі VEGF. Поєднуючись із своїми рецепторами, VEGFR-1 і VEGFR-2,

він опосередковує ангиогенез, судинну проникність і запалення, завдяки чому відомий як фактор судинної проникності. Фізіологічний ангиогенез, тобто формування кровоносних судин у процесі реваскуляризації тканин, передбачає каскад множинних сигналів. VEGF-A, що є основою цього процесу, має вирішальне значення для ангиогенезу та функцій ендотеліальних клітин, тоді як патологічний ангиогенез є маркером запальних та ішемічних захворювань. VEGF-A експресується в більшості систем людського організму. У серцево-судинній системі основними місцями експресії є періцити, ендотеліальні клітини та ангиобласти. В умовах гіпоксії та запалення VEGF-A також може продукуватися клітинами крові, включаючи моноцити, активовані Т-клітини, нейтрофіли, дендритні клітини та тромбоцити [10].

Судини, сформовані навколо пухлин, часто є недорозвиненими, не мають периваскулярних клітин і не формують суцільного шару. Наявність великих просвітів в пухлинних судинах значно полегшує проникнення пухлинних клітин у кровотік та сприяє метастазуванню [11].

Наступним етапом метастазування після інтравазації є *циркуляція*. Доволі мала кількість пухлинних клітин виживає у кровоносному руслі. Через реакцію імунної системи (в тому числі і натуральних кілерів), а також велику силу потоку крові вважається, що під час циркуляції виживає приблизно 0,1 % всіх метастатичних клітин [12]. Шанси на виживання значно вищі, якщо клітини пухлини потрапили у кровотік не окремими клітинами, а у вигляді скупчення, наприклад, через судини пухлин. Також шанси утворити метастази збільшується завдяки здатності пухлинної клітини активувати тромбоцити та формувати з них захисний екран від імунної відповіді. Окрім тромбоцитів можуть залучатись і імунні клітини, наприклад, нейтрофіли, що формують кластери з емболами пухлинних клітин, завдяки чому збільшується шанс утворення метастазів. Якщо сила адгезії мембрани метастатичної клітини більша, ніж сила потоку крові, то клітина здатна затриматись на поверхні судинної стінки. Це відбувається у зонах з великою

кількістю капілярів та низьким судинним тиском, тому доволі часто метастази утворюються у печінці та кістковій тканині. Іншим чинником є затримка клітинного емболу у вузькому просвіті капіляру. Після зупинки на новому місці відбувається *екстравазіція* пухлинних клітин. Вони проходять між ендотеліоцитами подібно до трансендотеліальної міграції лейкоцитів.

Особливої уваги вартий той факт, що первинна пухлина є не лише джерелом метастатичних клітин, але й здатна створювати покращені умови у місці утворення метастазів. Пухлинні клітини виділяють велику кількість екзосом, що несуть у собі мікроРНК, фактори росту (наприклад, ліганди рецептора EGF) та інші біологічно активні речовини, здатні змінювати фенотип неракових клітин на більш сприятливий для розвитку пухлини. Завдяки виділенню екзосом у судини первинна пухлина здатна формувати *преметастатичні ніші* - ділянки тканин зі сприятливими умовами для розвитку нової пухлини. Основними ознаками метастатичної ніші є ремоделювання ЕЦМ, підвищена проникність ендотелію, пригнічення активності імунних клітин. Також екзосоми відіграють важливу роль у органотропності метастазів [13]. Англійський хірург Стівен Паджет висунув теорію "насіння та ґрунту", яка описує закономірності метастазування для різних пухлин. Згідно теорії кожен тип пухлини має набір внутрішніх властивостей, завдяки яким він може давати метастази лише у специфічному для нього мікро-оточенні. Сучасні дані показують що більшість пухлин мають характерні органи, в які вони метастазують з більшою частотою. Загальні принципи органотропності можна охарактеризувати наступним чином: по перше, органотропність формується перед появою метастатичних клітин, наприклад, шляхом формування преметастатичної ніші; по друге, тканина виділяє специфічні хемоатрактанти та адгезивні білки, що слугують орієнтиром для дисемінованих пухлинних клітин; по третє, структура судин, їх проникність у певному органі також відіграє важливу роль для успішного метастазування; по четверте, в межах однієї тканини експресія білків та ЕЦМ може відрізнятись і це також впливає на успішність розвитку пухлинних

клітин; і по п'яте, важливу роль грає здатність ракових клітин впливати на роботу нормальних клітин, змінювати їх експресію для створення більш сприятливих для метастазування умов [14]. Завершальним етапом метастазування є *колонізація* цільової тканини пухлинними клітинами. Залежно від умов, вони можуть як дати початок новій пухлині, так і перейти у стан "сплячки". Основними причинами переходу у сплячий стан є перевага помираючих клітин над клітинами, що діляться (ангіогенна сплячка), а також уникнення цитотоксичної імунної відповіді (імуногенна сплячка). Сплячка ракових клітин є однією з причин рецидивів у пацієнтів, що пройшли лікування, та робить метастазування ще більш небезпечним процесом у розвитку онкологічного захворювання [13].

1.2 Система зсідання крові

Система зсідання крові - це комплекс з клітин, ферментів (серинових протеаз), коферментів (факторів зсідання) та сигнальних молекул, основною функцією якого є відновлення та збереження цілісності судин і, відповідно, запобігання великій крововтраті. До системи зсідання відносяться наступні фактори:

Фактор I (фібриноген) – це глікопротеїн 340 кДа, який відіграє важливу роль у багатьох фізіологічних і біохімічних процесах. Вперше назву «фібриноген» використав у 1847 році Рудольф Вірхов, а в 1872 році Олександр Шмідт вказав, що перетворення фібриногену на фібрин є ферментативним процесом. Фізіологічно майже весь фібриноген міститься в плазмі крові, і його концентрація становить 1,5-3,5 г/л (діапазони нормальних концентрацій можуть дещо відрізнятися в різних лабораторіях: період напів-виведення ($T_{1/2}$) становить 3-5 днів). Основна фізіологічна функція фібриногену - участь у завершальній стадії процесу згортання крові та перетворення на фібрилярний білок - фібрин, який формує згусток крові. Крім того, фібриноген бере участь у фізіології матриксу (шляхом взаємодії з

плазміногеном, FXIII, вітронектином і фібронектином), регуляції запального процесу, інфекції, загоєння ран, міжклітинної взаємодії, міграції клітин, та ангиогенезу [15].

Фактор II (протромбін) – це глікопротеїн масою 72 кДа, що виробляється печінкою. Він активується до тромбіну (фактор IIa) шляхом ферментативного розщеплення двох ділянок активованим FX (FXa). Активований тромбін призводить до розщеплення фібриногену на мономери фібрину, які після полімеризації утворюють фібриновий згусток. Тому активація протромбіну має вирішальне значення у фізіологічній та патофізіологічній коагуляції [16].

Фактор III (тромбопластин/тканинний фактор) – це глікозильований, транс-мембранний білок масою близько 46 кДа, що складається з одного поліпептидного ланцюга з 261 або 263 амінокислотами. Мембранне закріплення TF через його єдиний мембраноспецифічний домен є важливим для повноцінної прокоагулянтної активності [17]. Експресується в периваскулярний простір такими клітинами як фібробласти, перицити та імунні клітини (макрофаги та моноцити). Запускає зовнішній каскад коагуляції крові шляхом зв'язування з активованим фактором VII коагуляції крові (FVIIa), після чого відбувається активація фактора X (FX), що секретується печінкою [18].

Фактор IV (Іони кальцію) – вивільняються з кісток у кров, необхідні для широкого спектру фізіологічних функцій, включаючи життєво важливі шляхи позаклітинної передачі сигналів, такі як зсідання крові, міжклітинна адгезія та цілісність скелета [19].

Фактор V (проакселерин) – це великий (330 кДа) попередник активованого фактора V (також відомого як **фактор VI**, акселерин), який разом з ферментом FXa, а також Ca^{2+} і фосфоліпідами визначає протромбіназний комплекс і швидко перетворює протромбін на тромбін. Крім того, FV бере безпосередню участь у регуляції інгібітору шляху

тканинного фактора α (TFPI α) та шляхів протеїну C, які інгібують коагуляційну реакцію [20].

Фактор VII (проконвертин) – це вітамін К-залежна серинова протеаза з молекулярною масою 50 кДа, що виробляється в печінці. FVII відіграє важливу роль у запуску процесу утворення згустку в рамках зовнішнього шляху каскаду коагуляції. При пошкодженні ендотелію з просвіту судини вивільняється тканинний фактор (TF), що взаємодіє з FVII, утворюючи комплекс TF/FVIIa. Комплекс TF/FVIIa здатний активувати FX в FXa (утворюючи комплекс «зовнішньої тенази») і FIX в активований FIX (FIXa) [21].

Фактор VIII (Антигемофільний глобулін A) – це глікопротеїновий кофактор у внутрішньому ланцюзі каскаду зсідання крові. Перед активацією FVIII знаходиться в кровообігу, міцно зв'язаний з фактором фон Віллебранда (VWF). Після початку каскаду зсідання крові FVIII, зв'язаний з VWF, активується тромбіном з утворенням FVIIIa, який дисоціює від VWF і згодом зв'язується з активованим FIX (FIXa) у присутності негативно заряджених фосфоліпідів на поверхні активованих тромбоцитів. Комплекс FVIIIa/FIXa відомий як внутрішній «теназний» комплекс, що перетворює FX на FXa [22].

Фактор фон Віллебранда (VWF) – це великий мультимерний глікопротеїн плазми, який відіграє ключову роль у нормальному гемостазі, зв'язуючись з колагеном у місцях пошкодження судин і залучаючи тромбоцити до місця пошкодження. Крім того, VWF також діє як молекула-носіє для фактора VIII. За нормальних умов приблизно 95 % FVIII у плазмі циркулює у високоафінному комплексі з VWF. Кількісне або якісне зниження рівня VWF у плазмі призводить до розвитку хвороби фон Віллебранда (VWD), яка є найпоширенішим спадковим порушенням зсідання крові. І навпаки, підвищений рівень комплексу VWF-FVIII у плазмі є дозозалежним фактором ризику тромбозу. Існує ряд функцій VWF, у регулюванні низки негемостатичних біологічних процесів. До них належать запалення, загоєння ран, ангіогенез та метаболізм кісткової тканини [23].

Фактор IX (Антигемофільний глобулін В) – це вітамін К-залежна серинова протеаза, що синтезується у печінці, масою ≈ 55 кДа, що складається з 415 амінокислот. Протеолітично активується ферментативним комплексом тканинного фактора TF-FVIIa при пошкодженні судин і FXIa через тромбін-опосередковану зворотну активацію. Активований FIX (FIXa) з'єднується з кофактором VIIIa на аніонних фосфоліпідах у присутності іонів Ca^{2+} у внутрішній тензний комплекс для каталізації протеолітичної активації FX, тим самим посилюючи утворення тромбіну [24].

Фактор X (фактор Стюарта-Прауера) – це вітамін К-залежна серинова протеаза, масою 59 кДа. Як екзогенний, так і ендогенний шляхи можуть призвести до активації FX. В екзогенному шляху активація FX відбувається шляхом утворення комплексу TF/FVIIa з іонами кальцію на поверхні фосфоліпідів. В ендогенному шляху активація FX відбувається, коли FIXa та його кофактор FVIIIa утворюють ендогенний комплекс тензи в присутності іонів кальцію на поверхні фосфоліпідів. FXa є найважливішим активатором протромбіну, розщеплюючи протромбін для утворення тромбіну через комплекс протромбінази. FXa також активує FV і FVIII та гідролізують FVII до FVIIa, завершуючи цикл зворотного зв'язку FVII-FX [25].

Фактор XI (фактор Розенталя) – це серинова протеаза, масою 70,1 кДа, що циркулює в плазмі в концентрації близько 30 мкМ і у вигляді нековалентного комплексу з глікопротеїном кініногену з високою молекулярною масою (HMWK). Значення взаємодії FXI-HMWK до кінця не з'ясоване, але вважається, що вона сприяє зв'язуванню FXIa з поверхнею тромбоцитів і ендотеліальних клітин.

Структурно FXI є димером, що складається з двох ідентичних субодиниць, з'єднаних дисульфідним зв'язком. Місцем утворення FXI є переважно печінка, як і в інших факторів зсідання крові, але також і в інших типах клітин, таких як клітини Лангерганса, мегакаріоцити або клітини ниркових каналців. Роль FXI класично визначається у внутрішньому шляху

зсідання крові. Зараз загально прийнято, що FXIa, після його активації з FXI, відіграє головну роль у тромбозі та другорядну роль у гемостазі [26].

Фактор XII (фактор Хагемана) – це серинова протеаза, яка виробляється в печінці і зазвичай циркулює у вигляді 80 кДа однополіпептидного проферменту. Під впливом негативно заряджених поверхонь зазнає протеолітичної зміни і активується. XIIa складається з дисульфідно-пов'язаної дволанцюгової молекули з важким ланцюгом 50 кДа і легким ланцюгом 30 кДа. Каталітично активний легкий ланцюг (FXIIa-b) може бути повністю відщеплений від важкого ланцюга шляхом активації плазмового калікреїну. Активовані форми FXII ініціюють контактну активаційну систему та внутрішній шлях коагуляції, що сприяє запаленню та прокоагулянтній активності [27].

Фактор XIII (Фібрин-стабілізуючий фактор) – це транглутаміназа, що активується тромбіном і каталізує утворення ϵ -N-(γ -глутаміл)-лізинових ізопептидних зв'язків у білковому субстраті, чим забезпечує стабільність фібрину. Дефіцит FXIIIA2 проявляється у вигляді тяжкої кровоточивості, що підкреслює його важливість у цьому шляху [28].

Окрім факторів зсідання, для коагуляції важливу роль відіграє клітинний компонент – тромбоцити, і пов'язані з ними активні молекули. Циркулюючі без'ядерні тромбоцити описуються як динамічні спеціалізовані клітини, що утворюються в складний спосіб з їх попередників, мегакаріоцитів. Нормальна кількість тромбоцитів становить від 150 до 450×10^3 клітин на мкл крові, що робить їх другим за чисельністю типом клітин у крові, після еритроцитів. Середньостатистичний дорослий виробляє 10^{11} тромбоцитів на день, щоб підтримувати цю кількість. Тромбоцити переміщуються в кровообігу у вигляді неактивних дископодібних фрагментів, а складний внутрішній цитоскелет дозволяє їм змінювати форму при контакті з пошкодженою кровоносною судиною.

Розмір зрілого тромбоцита становить приблизно 2-4 мкм, що робить їх найменшими клітинами в кровообігу, а їх середня товщина становить

0,5 мкм, а об'єм — близько 7 мкм. Їх невеликий розмір сприяє виконанню ними ролі «охоронців судинної системи», оскільки в умовах ламінарного потоку тромбоцити виштовхуються на периферію більшими білими та червоними кров'яними клітинами. Як наслідок, вони залишаються в безпосередній близькості від стінки кровоносної судини, де можуть швидко реагувати на будь-яке пошкодження судин [29].

Реакція на зміни в оточуючому середовищі забезпечується широким спектром рецепторів клітинної поверхні та молекул адгезії. Серед них найпоширенішими є молекули адгезії та сигналізації інтегрину, такі як $\alpha\text{IIb}\beta 3$, $\alpha\text{V}\beta 3$ та $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ і $\alpha 2\beta 1$. Крім того, глікопротеїни, багаті на лейцин, такі як комплекс GPIb-IX-V, рецептори, пов'язані з G-білком, такі як PAR-1, PAR-4, P2X1, P2Y1 і P2Y12, а також простагландинові рецептори, такі як тромбоксановий рецептор і простацикліновий рецептор, та імунорецептори, що відіграють важливу роль в активації та агрегації тромбоцитів.

Тромбоцити також містять дві унікальні органели, α -гранули та щільні тіла, які сприяють цим процесам. α -гранули містять мембранні рецептори ($\alpha\text{IIb}\beta 3$, GPVI), фактори зсідання (FV, VWF, FVIII), антикоагулянти (білок S, антитромбін, плазміноген), а також цитокіни, хемокіни, фактори росту та імунні сигнальні молекули. В щільних гранулах також містяться мембранні білки (CD63, LAMP-2), аденінові нуклеотиди (АДФ), гістамін, серотонін, іони (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+}), пірофосфати та поліфосфати [30].

Аденін-дифосфат (АДФ) є важливим фізіологічним агоністом, який відіграє життєво важливу роль у нормальному гемостазі та тромбозі. Важливість АДФ у нормальному гемостазі чітко продемонстрована у пацієнтів, які страждають на захворювання накопичення крові і мають надмірну схильність до кровотеч. Доведено, що АДФ активує тромбоцити через пуринергічні рецептори (P2Y1, P2Y12). Рецептори P2Y1 та P2Y12 є G-білковими рецепторами, які відіграють важливу роль у зміні форми тромбоцитів, їх агрегації, утворенні тромбоксану A_2 , прокоагулянтній активності, адгезії до іммобілізованого фібриногену та утворенні тромбів в

умовах зсуву. Крім того, рецептор P2Y₁₂ також важливий для потенціювання активації тромбоцитів, опосередкованої іншими фізіологічними агоністами, включаючи колаген, фон Віллебранда та тромбоксан A₂ [31].

Тромбоксан A₂ (TxA₂) належить до родини ліпідів, відомих як ейкозаноїди, які є метаболітами арахідонової кислоти. Спочатку вважалося, що TxA₂ вивільняється з тромбоцитів, але зараз відомо, що його вивільняють і інші клітини, зокрема макрофаги, нейтрофіли та ендотеліальні клітини. Названий на честь своєї ролі в тромбозі, TxA₂ має протромботичні властивості, оскільки стимулює активацію тромбоцитів та їх агрегацію. TxA₂ також є відомим вазоконстриктором і активується під час пошкодження тканин та запалення. TxA₂ слугує медіатором позитивного зворотного зв'язку під час активації тромбоцитів. Через короткий період напіврозпаду, що становить близько 30 секунд, TxA₂ діє в аутокринному або паракринному режимі, активуючи сусідні тромбоцити, генеруючи більше TxA₂ і підсилюючи дію інших, більш потужних агоністів тромбоцитів. Коли TxA₂ зв'язується з тромбоцитами, їх активація призводить до зміни їх форми, активації фосфоліпази A₂, дегрануляції тромбоцитів щільних гранул і альфа-гранул та агрегації тромбоцитів. TxA₂ також викликає вазоконстрикцію гладких м'язів. [32]

На мембрані неактивних тромбоцитів, найпоширенішим є рецептор α IIb β 3, що знаходиться в так званій закритій конформації, з низькою афінністю до своїх лігандів VWF, фібронектину та фібриногену. Після активації тромбоцитів, сигналізація «зсередини назовні» викликає конформаційну зміну в α IIb β 3, що призводить до високої афінності, «відкритої» конформації. Згодом, завдяки множинним місцям зв'язування для α IIb β 3, фібриноген і VWF можуть утворювати містки між тромбоцитами. Зв'язування з α IIb β 3 призводить до сигналізації «ззовні всередину» і, за участю різних сигнальних кіназ, до незворотної агрегації тромбоцитів та ретракції тромбу. Крім того, секреція гранул після активації тромбоцитів

збільшує кількість $\alpha\text{IIb}\beta_3$ на мембрані тромбоцитів, що ще більше посилює взаємодію між тромбоцитами [30].

На початковому етапі зсідання існують два шляхи його ініціації - зовнішній та внутрішній. Зовнішній шлях спричиняють фактори зсідання, що за нормальних умов не циркулюють у кровотоці. До них відноситься тканинний фактор (TF, FIII), котрий міститься у міжклітинному матриксі біля судинних стінок. Внутрішній шлях ініціюється фактором FXII, ферментом, що циркулює в кровотоку та може активуватись колагеном. В умовах *in vivo* ці два шляхи можуть активуватись одночасно та взаємодіяти між собою. Згідно з сучасними поглядами процес зсідання починається з фази *ініціації*, коли після порушення цілісності судинної стінки в кров потрапляють філаменти позаклітинного матриксу, в першу чергу - колаген та клітини сусідніх тканин, на мембрані яких розташований TF. Разом з факторами FVII та FIII (іони Ca^{2+}) тканинний фактор формує комплекс, здатний активувати FIX та FX. Активований FX (FXa) утворює нові FVIIa та Va, а також утворює комплекс Ca^{2+} -FXa-FVa – прямий активатор тромбіну. Для обмеження утворення тромбіну у цій фазі присутні інгібуючі молекули - TFPI (фактор інгібування шляху TF) та антитромбін III [33].

Наступною є фаза *ампліфікації (посилення)*, в яку активно залучаються тромбоцити. Невеликі порції тромбіну, що утворились у попередній фазі, сприяють активації найближчих тромбоцитів [33].

Тромбін активує фактори FV та FVIII, FVIII утворює з Ca^{2+} та FXa "теназний комплекс", що в свою чергу активує FX. В результаті кількість тромбіну значно збільшується (відбувається "тромбіновий вибух"), що дозволяє утворити достатню кількість фібрину для стабільного згустка.

У третій фазі, що носить назву *поширення* або *пропагація*, в якій тромбін активує фібриноген (FI) та фібриназу (FXIII). Фібриноген перетворюється у фібрин, а фібриназа сприяє стабілізації його волокон [33].

Зсідання може регулюватися кількома способами, один з яких це білки, що інгібують фактори зсідання крові. До них відносяться антитромбін III та

гепарин, котрі утворюють комплекс інактивації тромбіну, окрім якого антитромбін III також інактивує фактори XI та XII. Іншим інгібітором каскаду зсідання є білок С, котрий активується на поверхні ендотеліоцитів комплексом білків тромбін-тромбомодулін, та разом з білком S інактивує фактори VIII та V.

Іншою частиною системи регуляції зсідання є плазміни – ферменти, що руйнують ланцюги фібрину. Для них також існує кілька шляхів активації: зовнішній шлях - білок С здатен пригнічувати інгібітор тканинного активатора плазміногену (ІАП-1). Тканинний активатор плазміногену та плазміноген розщеплюють фібрин та фібриноген, залишки яких активують одноланцюгову урокіназу - ще один активатор плазміногену; у внутрішньому шляху активації фібринолізу беруть участь фактори XI, XII, прекалікреїн, калікреїн, високомолекулярний кініноген, що також є активаторами плазміну [34]. Іншим типом клітин, що відіграють важливу роль у гемостазі, є ендотеліоцити. За звичайних умов вони продукують фактори пригнічення тромбоцитів, такі як NO, простациклін та ферменти, що деградують АДФ, а також мають негативний заряд на мембрані для зменшення взаємодії з тромбоцитами. При порушенні цілісності судини ці властивості втрачаються і найближчі до місця ураження ендотеліоцити залучаються у регуляцію зсідання, в той час як більш віддалені посилюють антикоагулянтні властивості для запобігання розповсюдженню згустка крові [35]. Ендотеліоцити здатні синтезувати як прокоагулянтні, так і антикоагулянтні молекули, тож є важливим чинником у процесі правильного проходження утворення та лізису кров'яного згустка. До прокоагулянтів відносяться: тканинний фактор, VWF, FVIII, інгібітор активатора плазміногену. До антикоагулянтів відносяться тромбомодулін, ендотеліальний рецептор білка С, тканинний активатор плазміногену, інгібітор шляху тканинного фактору [36]. Важливо, щоб ендотеліальна поверхня забезпечувала білки, які інгібують тромбін і протидіють прогресуванню коагуляції. Таким потужним інгібітором тромбіну є антитромбін III (АТІІІ), плазмовий білок, що

виробляється печінкою. Він становить до 80% інгібуючого компонента утворення тромбіну. Дефіцит антитромбіну має клінічний зв'язок із підвищеним ризиком тромбозу, тромбоемболії та супутніх ускладнень, пов'язаних із гіперкоагуляційним станом. АТІІІ утворює комплекс з тромбіном та іншими сериновими протеазами, такими як фактори згортання ІХа, Ха, Хіа та ХІІа, і регулює їх, запобігаючи контакту активного центру цих протеаз з їх субстратами. Активність АТІІІ значно посилюється гепарансульфатами. Утворення комплексу антитромбін-протеаза, хоча і є незворотним, є природною повільною і неефективною реакцією. Цей процес може бути швидко прискорений у 1000 разів за наявності сульфатованих полісахаридів у формі гепарину та гепарансульфату. АТІІІ зв'язується зі специфічними гепарансульфатами протеогліканів у глікокаліксі, що покриває ендотеліальну поверхню. У людей важливість цієї системи була підкреслена виникненням тромботичних захворювань у пацієнтів з дефіцитом АТІІІ [8, 37].

1.3 Взаємодія метастазування та системи зсідання крові

Ще у 1865 р. відомий французький лікар Арман Труссо звертав увагу на те, що тромбофлебіт може бути цінним елементом діагностики раку [38]. Численні подальші дослідження також підтверджували взаємозв'язок венозної тромбоемболії та ракового захворювання. У 1968 р. D. Gasic показав залежність між кількістю тромбоцитів та розвитком метастазів [39].

Все більше досліджень вказують на більш тісний зв'язок метастазування та системи зсідання крові, що викликає інтерес до того, які саме механізми лежать в основі цього зв'язку. Було виявлено, що первинна пухлина здатна виділяти тромбопоетин та інші фактори стимуляції утворення тромбоцитів, в результаті чого у пацієнтів спостерігається тромбоцитоз та збільшується ризик ВТЕ [40]. Також тромбоцити здатні захоплювати різні

білки з плазми крові шляхом ендоцитозу. Це стосується і факторів, що експресуються пухлинними клітинами. Вважається, що цей механізм може використовуватись первинними пухлинами для встановлення зв'язку з своїми метастатичними нішами для подальшої стимуляції їх розвитку. Окрім цього, фактори росту можуть доставлятися і в кістковий мозок для підвищення рівня утворення тромбоцитів мегакаріоцитами. Також поглинуті тромбоцитами білки здатні впливати на експресію їх мРНК, чим можуть надавати тромбоцитам унікальний фенотип [41]. Сприяння метастазуванню починається на етапі екстравазації, завдяки експресії тромбоцитами факторів активації ангіогенезу (VEGF, ангіопоетин, SDF-1, bFGF) та матриксних металопротеїназ, що сприяє ремоделюванню стінок судин та полегшеному проникненню пухлинних клітин у кровотік [42].

TGF β є одним з найбільш плеїотропних цитокінів, що належать до суперсімейства трансформуючих факторів росту, яке включає три різні ізоформи ссавців (1–3) та багато інших сигнальних білків. Білки TGF β продукуються всіма лініями лейкоцитів. Після зв'язування TGF β рецептор активує різні субстрати та регуляторні білки, індукуючи транскрипцію декількох цільових генів, які сприяють диференціації, хемотаксису, проліферації та активації імунних клітин. Роль TGF β у подальшій активації VEGF в пухлинах, що призводить до утворення середовища, яке є одночасно поживним завдяки ангіогенезу та імунотолерантним. Інший механізм пухлиноутворення, пов'язаний з TGF β , полягає у сприянні епітеліально-мезенхімальному переходу (ЕМП). Тромбоцити є потужним резервуаром трансформуючого фактору росту-бета (TGF β), що містить більшу частку цієї молекули в крові (до 40%) [43]. На дослідженнях раку молочної залози та колоректального раку було показано, що активовані тромбоцити виділяють TGF β , що сприяє ЕМП [44].

Тромбін також є важливим білком протягом усього процесу метастазування. Завдяки PAR-1 на поверхні пухлинних клітин, тромбін здатен сприяти їх росту та виживанню, сприяє ЕМП. Дослідження раку

молочної залози показали посилення у пухлини здатності до розщеплення білків, інвазії, поділу та ангіогенезу [45]. У кров'яному руслі циркулючі пухлинні клітини (ЦПК) виділяють фактори активації тромбоцитів, такі як TXA_2 та АДФ, а також ТФ, що вмикає зовнішній шлях каскаду зсідання крові. Даний процес отримав назву агрегація тромбоцитів, індукована пухлинними клітинами (tumor cell-induced platelet aggregation, TCIPA) [46]. Також активація тромбоцитів відбувається за безпосередньої взаємодії з ЦПК. Останні мають на поверхні подопланін, що взаємодіє з CLEC-2 рецептором тромбоцитів. ЦПК експресують на своїй поверхні ряд інтегринів ($\alpha\text{IIb}\beta_3$, $\alpha\nu\beta_3$), що забезпечують зв'язування з фібриногеном та VWF [47]. Подопланін — це трансмембранний сіалоглікопротеїн, здатний активувати тромбоцити через рецептор 2 типу С-лектину (CLEC-2). Він суттєво експресується на лімфатичних ендотеліальних клітинах і тому використовується як маркер лімфангіогенезу. Подопланін також експресується широким спектром інших тканин (наприклад, подоцитами нирок, альвеолярними клітинами типу I, остеобластами, фібробластичними ретикулярними клітинами). Більше того, було виявлено, що подопланін підвищений на певних клітинах імунної системи та виконує важливі функції під час ембріонального розвитку. Попередні дослідження показали, що миші з дефіцитом подопланіну гинуть незабаром після народження через аномалії легенів, серця та лімфатичної судинної системи. Подопланін на лімфатичному ендотелії та CLEC-2 на тромбоцитах сприяють відокремленню лімфатичної системи від кровообігу під час онтогенезу. Він також є необхідним під час розвитку нормальних лімфатичних вузлів [48]. В результаті ЦПК оточують себе захисною оболонкою з тромбоцитів та фібрину, що екранують її від імунної відповіді та зсувних сил потоку крові. Окрім фізичного екранування від натуральних кілерів (НК), тромбоцити також здатні передавати ЦПК MHC1, а $\text{TGF}\beta$ не тільки сприяє ЕМП ракових клітин, але й пригнічує Т-лімфоцити, збільшуючи захист від імунної відповіді [46].

Важливою умовою для формування метастатичного ураження в віддалених органах є формування преметастатичної ніші. Первинна пухлина виділяє у кровотік позаклітинні везикули (ПВ), що містять різні білкові сигнальні молекули та мРНК, необхідні для зміни міжклітинного середовища у тканинах цільового органу на більш придатне для майбутніх ЦПК. Наприклад, спостерігається збільшення синтезу фібронектину та колагену. Також у формування преметастатичної ніші активно залучаються тромбоцити. Вони не тільки активують ангіогенез та підвищують коагуляційну активність крові у ділянках майбутньої ніші, але й здатні залучати імунні клітини, такі як нейтрофіли та MDSC. Для преметастатичної ніші характерні такі ознаки як імуносупресія, активація запальних процесів, гетерогенність клітин та зміни у метаболізмі [49, 50].

Завдяки своїй здатності взаємодіяти з ендотеліальними клітинами, тромбоцити залучаються у інвазію пухлинних клітин в тканини цільового органу. На мембранах активованих тромбоцитів та ендотеліоцитів експресуються Р-селектин та PSGL-1, що дозволяє тромбоцитам закріплюватись на поверхні ендотеліоцитів, що в свою чергу забезпечує затримку ЦПК на поверхні судини, з подальшою інтравазіцією [51].

Р-селектин — це одноланцюговий глікопротеїн з молекулярною масою 140 кДа, що робить його найбільшим представником родини селектинових молекул клітинної адгезії. Р-селектин зберігається в α -гранулах тромбоцитів і тілах Вейбеля-Паладе в ендотеліальних клітинах і швидко експресується на поверхні цих клітин після активації. Активація тромбоцитів і ендотеліальних клітин також викликає вивільнення розчинного Р-селектину в плазму. Р-селектин взаємодіє з глікопротеїновим лігандом-1 Р-селектину (PSGL-1) на лейкоцитах, сприяючи адгезії та коченню лейкоцитів на ендотеліальних клітинах, а також взаємодії між активованими тромбоцитами та лейкоцитами. Рівні Р-селектину корелюють з кількістю позаклітинних везикул (EV), що походять з тромбоцитів, і було показано, що ці EV індукують утворення тромбіну. Крім того, Р-селектин збільшує експресію

тканинного фактору на моноцитах і сприяє утворенню великих і стабільних агрегатів тромбоцитів [52].

Як і в випадку з первинною пухлиною, тромбоцити виділяють фактори росту ендотеліоцитів (VEGF, ангіопоедин, SDF-1, bFGF), збільшуючи проникність судинної стінки та ріст нових судин для майбутнього метастазу. Окрім вищевказаних факторів, також тромбоцитами виділяється АДФ, що діє на P2Y рецептори, збільшуючи проникність ендотелію [53]. Тромбін здатен активувати PAR-1 в ендотеліоцитах, що спричиняє підвищення рівню Ca^{2+} та активацію сигнального каскаду, в результаті якого послаблюється адгезія між ендотеліоцитами та втрачаються фокальні адгезивні контакти. Окрім цього, його присутністю потенціює активацію VEGF ендотелію та виділення ММП. В результаті відбувається трансендотеліальна міграція пухлинних клітин [45].

1.4 Вплив антикоагулянтів прямої дії на процеси метастазування

Численні дослідження показали, що антикоагулянти не тільки зменшують тромбоемболічні ускладнення, пов'язані з раком, а й покращують виживання, перешкоджаючи прогресу раку та метастазуванню [54–56].

Детальне вивчення антиметастатичної дії антикоагулянтів почалося у 1960-70-х рр. Серед піонерських робіт цього напрямку слід відзначити експерименти Nagmar B et al. [57] і Hilgard P. et al. [58]. Дослідження гепарину щодо його протипухлинної й антиметастатичної активності відображено в оглядах Smorenburg S. M. et al. [59] та Engelberg H. [60].

Серед антикоагулянтів прямої дії, крім гепарину, зараз широко використовуються нефракціонований гепарин (НФГ), низькомолекулярні гепарини (НМГ), ультранизькомолекулярні гепарини (УНМГ), гепариноїди та пероральні інгібітори Ха фактору.

1.4.1 Доклінічні дослідження антиметастатичної дії НФГ (UFH)

НФГ – це суміш глікозаміногліканів, що не була піддана фракціонуванню для отримання молекул із низькою молекулярною масою. Серед препаратів НФГ відомий Liquemin (Drossapharm AG).

Collen A. et al. дослідили дію НФГ у порівнянні з ревіпарином (НМГ) на ангіогенез *in vitro*. І НФГ, і ревіпарин однаково пригнічували на (36–60) % bFGF-індуковану проліферацію мікросудинних ендотеліальних клітин людини лінії HMVEC [61].

Згодом Ludwig R. J. et al. показали, що НФГ інгібує ріст легневих метастазів на тваринній моделі та цей процес корелює зі здатністю інгібувати Р-селектин [62].

Tani N. et al. вивчали вплив НФГ і гемцитабіну на метастазування раку підшлункової залози. Самцям мишей BALB/c інтрапортально ксенотрансплантували клітини аденокарциноми підшлункової залози людини лінії AsPC-1. НФГ виявляв антиметастатичну дію шляхом пригнічення ангіогенезу та інвазії пухлинних клітин. Крім того, коли НФГ і гемцитабін застосовували одночасно, результати свідчили про можливість синергічного ефекту [63].

Підсумовуючи наведені дані, треба зазначити, що НФГ проявляє *in vitro* та на тваринних моделях антиметастатичну активність, яка опосередковується пригніченням Р-селектину й ангіогенезу.

1.4.2 Доклінічні дослідження антиметастатичної дії НМГ (LMWH)

Вважається, що НМГ викликають більш передбачувану антикоагулянтну відповідь у порівнянні з гепарином і НФГ, тому не потрібний частий моніторинг для коригування дози [64]. Наявні на даний момент НМГ виготовляють шляхом деполімеризації НФГ, який отримують зі слизової оболонки кишечника свиней.

Тинзапарин. У роботі Amirkhosravi A. et al. вивчалися антиметастатичні ефекти тинзапарину. Показано, що тинзапарин у дозі 10 мг/кг, підшкірно, протягом 14 днів знижує у мишей метастазування меланоми B-16 у легені на 96 % [65].

Schlesinger M. et al. продемонстрували, що застосування тинзапарину виявило повну блокаду рецепторів адгезії VLA-4 *in vitro*, як на стимульованих клітинах меланоми B16F10, так і на нестимульованих B16F10-VLA-4kd. Крім того, отримано дані, що лікування мишей тинзапарином практично нівелювало експериментальне метастазування клітин B16F10 і B16F10-VLA-4kd [66]. Було зроблено висновок, що сигнал передається через VLA-4/VCAM-1. VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) – молекула адгезії судинних клітин-1, білок, що входить до суперродини імуноглобулінів, який є посередником адгезії лейкоцитів та інших клітин; VLA-4 (very late antigen-4) – дуже пізній антиген-4, природний ліганд VCAM-1.

Пізніше Zhao X. P. et al. виявили, що переважно VLA-4/VCAM-1 бере участь у прикріпленні клітин меланоми до фібробластів *in vitro* [67]. Фібробласти поряд із перицитами та макрофагами присутні у стінці судин. Отже, тинзапарин практично запобігає метастазуванню меланоми B-16, B16F10 і B16F10-VLA-4kd, завдяки інгібуванню адгезії фібробластів до стінки судин переважно через VLA-4/VCAM-1.

Дальтепарин. Arce M. et al. вивчали вплив дальтепарину та фактора коагуляції Ха (FXa) на пухлинний ріст і метастазування. FXa збільшував метастази в легені, печінку, нирки та лімфатичні вузли клітин меланоми B16F10, уведених у хвостову вену дослідних мишей. При одночасному введенні FXa та дальтепарину метастази в легенях значно зменшилися, а в інших органах не спостерігалися [68].

Pollari S. et al. оцінили терапевтичний потенціал дальтепарину на мишачій моделі кісткових метастазів раку молочної залози. Клітини MDA-MB-231 були інокульовані в лівий шлуночок серця безтимусних мишей-

самиць BALB/c nu/nu, які отримували дальтепарин у дозі 5 мг/кг, підшкірно. Дальтепарин пригнічував зниження ваги, зменшував площу остеолітичного ураження та пригнічував утворення метастазів у кістках [69].

У мишей із карциномою легень Льюїс (LLC) дальтепарин і меншою мірою НФГ інгібували як ріст пухлини, так і ангиогенез [70].

Таким чином, дальтепарин на тваринних моделях виявив антиметастатичну активність щодо меланоми B16F10 і раку молочної залози MDA-MB-231 та протипухлинну й антиангіогенну дії відносно LLC.

Надропарин. Yu C. J. et al. визначили *in vitro*, що надропарин у дозі 20 МО/мл зменшує приблизно на 40 % інвазію, на 25 % міграцію та на 27 % адгезію клітин раку легень людини A549. У дозі 80 МО/мл ступінь цих ефектів був ще вищий [71].

Результати дослідження Zhuang X. et al. показали, що рентгенівське опромінення сприяє інвазії та міграції клітин раку легень людини A549 *in vitro*, тоді як надропарин у дозах 50 і 100 МО/мл пригнічує цей побічний ефект залежно від дози [72].

Szende B. et al. вивчали надропарин на мишах лінії C₅₇Bl/6 на моделі метастазування 3LL-НН для внутрішньовенного введення, B-16 внутрішньостопної подушечки та 3LL-НН внутрішньоселезінкової моделі. Надропарин у дозі 57 МО/кг мав суттєву антиметастатичну дію на моделі внутрішньовенного введення метастазів. Лікування, розпочате за 6 год до інокуляції пухлини, із застосуванням 172 МО/кг надропарину призвело до сильного пригнічення легеневих метастазів на моделі внутрішньостопної подушечки, але було неефективним щодо внутрішньоселезінкової моделі [73].

Як підсумок, надропарин чинить *in vitro* дозозалежну антиметастатичну дію щодо клітин раку легень людини A549 у широкому діапазоні доз (20–100) МО/мл, а також проявляє антиметастатичні ефекти стосовно карциноми легень 3LL-НН і меланоми B-16 у мишей. Еноксапарин. Djaafar S. et al. продемонстрували, що клітини

колоректальної карциноми миші MCA38 експресують гепараназу, а також них впливає лікування еноксапарином. Для імітації гематогенної фази дисемінації пухлинних клітин під час метастатичного процесу клітини MCA38 вводили у ворітну вену. Еноксапарин значно (на 76 %) запобігав зростанню метастазів у печінці [74].

Ran Y. et al. дослідили *in vitro*, що еноксапарин посилює протипухлинну та антиміграційну активність гефітінібу щодо раку легень людини A549 і H1975 шляхом пригнічення експресії DOCK1, активності Akt і фосфорилування віментину [75]. DOCK1 – це фосфопротейн, що задіяний в апоптозі, а серин/треонінова протеїнкіназа Akt є ключовим регулятором апоптозу [76].

Mousa S. A. et al. продемонстрували на мишах лінії C₅₇Bl/6, що еноксапарин у щодобовій дозі 10 мг/кг протягом 14 діб інгібує метастазування меланоми B16F10 у легені на 70 % [77].

Результати роботи Ataabadi F. V. et al. показали на меланомі B16F10, що одночасна доставка дакарбазину та еноксапарину за допомогою наночастинок хитозану може посилити протимеланомний ефект дакарбазину [78]. Автори вважають, що еноксапарин може запобігати метастазуванню меланоми завдяки своїй антиангіогенній активності.

Отже, еноксапарин має значний антиметастатичний потенціал щодо колоректальної карциноми, раку легень і меланоми, а розробка комплексних засобів типу цитостатик + еноксапарин або цитостатик + еноксапарин + носій є перспективним напрямком створення антиметастатичних препаратів.

Ревіпарин. Collen A. et al. показали *in vitro*, що ревіпарин пригнічує ангіогенез [61]. Pross M. et al. вивчили антиметастатичні ефекти ревіпарину *in vitro* з використанням клітин аденокарциноми CC-531 і виявили дуже значне інгібування адгезії та інвазії пухлинних клітин ($p < 0,001$) ревіпарином у концентраціях 0,55; 1,10 і 2,76 мг/мл [79]. CC-531 характеризується як щуряча модель колоректальних метастазів у печінці [80].

Крім того, у щурів після інтраперитонеальної трансплантації СС-531 вага пухлини значно зменшилася, порівняно з контролем за використання ревіпарину в дозах 4,0 і 10,0 мг/кг, але цього ефекту не було за введення в дозах 0,5 і 2,0 мг/кг. Зменшення метастазування спостерігалось в усіх групах лікування. Ці ефекти були найбільш вираженими після підшкірного або комбінованого (інтраперитонеального й підшкірного) введення [81].

Як підсумок, ревіпарин виявляє значну антиметастатичну дію щодо колоректальної аденокарциноми СС-531 *in vitro*, інгібуючи адгезію, інвазію та ангиогенез, і має помірний антиметастатичний ефект на тваринній моделі.

Беміпарин. Vignoli A. et al. показали, що беміпарин ефективний у запобіганні ангиогенезу на моделях клітин лейкемії, раку легень і раку молочної залози *in vitro*. Беміпарин також інгібував ангиогенну відповідь, викликану очищеними VEGF і FGF-2 [82].

Alur I. et al. виявили, що беміпарин *in vitro* пригнічує інвазію, міграцію та колонієутворення клітин ліній HepG2 й MIA PaCa-2 [83].

Отже, беміпарин проявляє антиметастатичні властивості щодо клітин раку легень, молочної залози, гепатоцелюлярної карциноми та раку підшлункової залози людини *in vitro*.

1.4.3 Основні механізми антиметастатичної дії НФГ і НМГ

Пригнічення лімфангіогенезу: Клінічні дослідження показали, що частота метастазування раку через лімфатичні судини у 3–5 разів вища, ніж через кровоносні судини [84]. Одним із проявів біологічної активності НФГ і НМГ є інгібування лімфангіогенезу.

Tammela T. et al. продемонстрували, що вісь фактора росту ендотелію судин С (VEGF-C) / рецептора фактора росту ендотелію судин 3 (VEGFR-3) відіграє важливу роль у лімфангіогенезі [85]. Кон'югат гепарину LHbisD4 пригнічує лімфангіогенез і послаблює метастазування в лімфатичні вузли, блокуючи сигнальний шлях VEGF-C [84]. Роботами кількох груп дослідників

було показано, що саме за допомогою хемокінового шляху CXCL12/CXCR4 здійснюється регуляція лімфангіогенезу й неоваскуляризації [86, 87].

Результати декількох досліджень позначили, що антиметастатична активність НФГ і НМГ пов'язана з модуляцією шляху CXCL12/CXCR4 [88, 89]. Згодом було показано, що цей шлях активується через JAK2 [90]. JAK2 – фосфопротейн, молекулярною масою 131 кДа, який задіяний у процесах виживання та проліферації клітин.

Таким чином, НФГ і НМГ послаблюють метастазування, пригнічуючи лімфангіогенез, та цей процес здійснюється переважно через VEGF-C/VEGFR-3 й CXCL12/CXCR4.

Інгібування гепаранази: У 1975 р. було виявлено ендоглікозидазу, яка могла розщеплювати бічні ланцюги гепарансульфату, і вперше охарактеризували активність цього ферменту [91]. Три роки потому ця ендоглікозидаза (ендо- β -D-глюкуронідаза) була названа гепараназою [92]. До речі, вона єдина відома на даний час ендо- β -D-глюкуронідаза ссавців.

Гепараназа фізіологічно експресується переважно в тромбоцитах, активованих лейкоцитах та плаценті [93].

Гіперекспресія гепаранази спостерігається за кількох злоякісних новоутворень і патологічних станів, включаючи гостре та хронічне запалення, фіброз, амілоїдоз, діабет і пов'язані з ним нефропатії [93–95].

Також було виявлено, що підвищена експресія гепаранази пухлинними клітинами корелює з більш високим метастатичним потенціалом [96].

Гепараназа є основним ферментом, відповідальним за руйнування базальних мембран – необхідного процесу для надходження клітин, що метастазують, у кровоток [88].

У місці метастазування гепараназа, що секретується пухлинними або стромальними клітинами, є важливим модифікатором мікрооточення пухлини, одночасно сприяючи інвазивності та ангіогенезу [97]. Інгібування гепаранази може проявляти антиангіогенний ефект [98].

Гепараназа інгібується НМГ, хоча і з дещо меншою ефективністю, ніж НФГ [99]. Пізніше Achour O. et al. дослідили інгібування гепаранази некомерційними УНМГ, отриманими різними способами деполімеризації НФГ, у порівнянні з комерційними НМГ [100].

Пошуки інгібіторів гепаранази, як протиракових засобів, стали передумовою до розробки чотирьох речовин: мупарфостат (PI-88), піксатимод (PG545), ронепарстат (SST0001) і некупараніб (M-402), які пройшли клінічні випробування [101, 102]. Незважаючи на вражаючі ефекти в різних доклінічних моделях, клінічні дані виявилися менш переконливими, а розробка деяких із цих сполук припинена або призупинена [101].

Отже, НФГ, НМГ й УНМГ можуть бути корисними як інгібітори гепаранази за метастазування та для лікування деяких видів раку.

Інгібування Р-селектину: Р-селектин – глікопротеїн масою 140 кДа родини селектинів (білків клітинної адгезії). Р-селектин присутній у тільцях Вайбеля-Паладе ендотеліоцитів та в α -гранулах тромбоцитів [103]. Сьогодні вже добре відома роль Р-селектину за тромбозів та запалення [104].

У 2001 р. Borsig L. et al. показали, що Р-селектин тромбоцитів полегшує метастазування карциноми людини у мишей з імунодефіцитом, опосередковуючи ранню взаємодію тромбоцитів із пухлинними клітинами, і цей процес може бути заблокований гепарином [105].

Згодом Coupland L. A. et al. дослідили, що Р-селектин ендотеліоцитів відіграє важливу роль у стимулюванні метастазування в легені та печінку [106]. Тобто було продемонстровано органоспецифічну роль Р-селектину в метастазуванні.

Здатність різних гепаринів пригнічувати Р-селектин *in vitro* корелює з їхньою здатністю інгібувати гематогенні метастази *in vivo* [62].

Як підсумок, Р-селектин може бути мішенню для протиметастазної терапії, напр., НФГ, НМГ або кризанлізумабом – антитілом до Р-селектину. FDA вже схвалено кризанлізумаб для використання як засобу за

вазооклюзійних больових кризів і серповидноклітинній анемії [107, 108]. Залишається затвердити його як антиметастатичний засіб.

Пригнічення ангиогенезу: Інгібування ангиогенезу позбавляє пухлину або метастаз потрібної для їх росту крові. Властивість пригнічувати ангиогенез є як в НФГ [70, 109], так і в НМГ (тинзапарин [110], дальтепарин [70, 109], еноксапарин [109], ревіпарин [61], беміпарин [82]).

Дальтепарин та еноксапарин мають вищу інгібіторну активність порівняно з НФГ в інтервалі концентрацій 0,1-1,0 МО/мл, що відповідає діапазону терапевтичних доз, які використовуються в клініці [109].

Показано, що НФГ і НМГ пригнічують проліферацію ендотеліоцитів, індуковану FGF-2 або VEGF [70, 109, 111]. Крім того, Takahashi H. et al. виявили значне зниження VEGF у крові мишей, що отримували дальтепарин [70].

Найбільший антиангіогенний ефект серед досліджених НФГ і НМГ спостерігається в дальтепарину [70, 109, 111].

Хоча НФГ і НМГ можна використовувати як антиангіогенні та антиметастатичні засоби, антикоагулянтна активність цих препаратів робить їх менш придатними для лікування раку та метастазування через ризик кровотеч [112].

Підсумовуючи наведені дані, треба зауважити, що НФГ і НМГ із різною активністю інгібують ангиогенез переважно через пригнічення VEGF.

НФГ і НМГ запобігають метастазам і зменшують ріст первинної пухлини та збільшують виживання на експериментальних моделях раку.

Конструювання комплексних препаратів, що містить цитостатик і НМГ, є багатообіцяючим шляхом створення антиметастатичних засобів.

Зважаючи на те, що серед антикоагулянтів прямої дії з'являються нові, більш безпечні засоби, є необхідність подальшого вивчення їх впливу на процеси метастазування.

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Характеристика лабораторних тварин та експериментальної моделі пухлинного росту.

Проведення експериментального дослідження було схвалено Комітетом з біоетики ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (Протокол № 01/12/22 дата: 27 грудня 2022 р.). Усі маніпуляції з тваринами проводились у відповідності до Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [113] та Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та з іншою науковою метою [114].

У експериментах *in vivo* було використано 155 самців мишей лінії C₅₇BL/6 масою тіла 20-22 г – віком 2 місяці, отриманих з віварію ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». 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 згодовувався стандартний раціон для лабораторних тварин, вода з міського водогону (після оберненого осмосу та стерилізації УФ-випромінюванням) подавалась *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 слугувала тирса з вільхи чорної (*Alnus glutinosa*), попередньо піддана автоклавуванню [115].

У дослідях було використано спонтанно метастазуючу у легені мишей лінії C₅₇BL/6 модель пухлинного росту – епідермоїдну карциному легень Льюїса (LL), яка виникла спонтанно, як карцинома легень миші

C₅₇BL/6 в 1951 р. в лабораторії M.R. Lewis, The Wistar Institute of Anatomy and Biology, Філадельфія, Пенсільванія [116, 117].

Штам клітин карциноми LL було отримано з Клітинного банку ліній людини і тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

Методика отримання пухлинних клітин карциноми LL. Після розморожування ампули з клітинами карциноми LL проводили двократне перещеплювання мишам-самцям лінії C₅₇BL/6. На 12 день росту карциноми LL в асептичних умовах у тварини - донора вилущували пухлину. У стерильній чашці Петрі в розчині 0,9 % NaCl тканину пухлини звільняли від капсули, кровоносних судин, ділянок некрозу. Підготовлену тканину ще раз промивали у фізіологічному розчині, дрібно подрібнювали ножицями та готували пухлинну завись, яку проціджували через капроновий фільтр та готували концентровану завись вже пухлинних клітин, підрахунок яких проводили в камері ММС-SR [118]. Потім готували робочі зависі для перещеплення дослідним мишам-самцям лінії C₅₇BL/6. Карциному LL перещеплювали у концентрації $2 \cdot 10^6$ клітин згідно методу щодо відбору речовин з протипухлинною активністю [116] та $3 \cdot 10^5$ клітин щодо моделювання процесу метастазування по 0,3 мл фізіологічного розчину внутрішньом'язово в праву гомілку мишей лінії C₅₇BL/6 [119].

Перед початком дослідження всі експериментальні тварини були зважені на вагах електронних ВПТ-1 (Radwag, Польща).

Для виконання поставлених завдань дисертаційної роботи було проведено 4 експерименти:

1. Вивчення протипухлинної та антиметастатичної дії сулодексиду, як монопрепарату. Мишей-самців лінії C₅₇BL/6 було розподілено на три дослідні групи: перша група (n = 8) - контроль (без пухлини); друга група (n = 18) – з перещепленою карциномою LL, третя група (n = 13) – з перещепленою карциномою LL та за умов введення сулодексиду у дозі 2,0 мг/кг, 20 днів, внутрішньом'язово. Дослідні тварини другої та третьої

групи ще розподілялись на дві підгрупи по терміну виведення з експерименту (28-ий день дослідження та моніторинг тривалості життя) [116, 117]. Миші першої та другої групи отримували 0,9 % NaCl, 0,05 мл/20 г маси тіла, 20 днів, внутрішньом'язово;

2. Вивчення протипухлинної та антиметастатичної дії еноксапарину, як монопрепарату. Мишей-самців лінії C₅₇BL/6 було розподілене на три дослідні групи: перша група (n = 7) - контроль (без пухлини); друга група (n = 18) – з перещепленою карциномою LL, третя група (n = 14) – з перещепленою карциномою LL та за умов уведення еноксапарину у дозі 10,0 мг/кг, 20 днів, підшкірно. Дослідні тварини другої та третьої групи ще розподілялись на дві підгрупи по терміну виведення з експерименту (28-ий день дослідження та моніторинг тривалості життя) [116, 117]. Миші першої та другої групи отримували 0,9 % NaCl у дозі 0,1 мл /20 г на тварину, підшкірно;

3. Визначення параметрів гемограми мишей-самців лінії C₅₇BL/6 з первинною пухлиною карциноми легень Льюїса для визначення біомаркерів, які пов'язані з метастазуванням. Мишей-самців лінії C₅₇BL/6 було розподілено на дві дослідні групи: перша група (n = 7) - контроль (без пухлини); друга група (n = 7) з перещепленою карциномою LL у концентрації клітин $2 \cdot 10^6$ у 0,3 мл фізіологічного розчину на мишу;

4. Вивчення впливу застосування антикоагулянтів прямої дії сулодексиду та еноксапарину на фоні застосування протипухлинного засобу цисплатину на утворення метастазів у легенях мишей - самців лінії C₅₇BL/6. Мишей-самців лінії C₅₇BL/6 було розподілене на п'ять груп. Перша група (n = 7) – контроль (без пухлини), друга група (n = 14) – з перещепленою карциномою LL. Третя група (n = 14) отримувала цисплатин одноразово у дозі 6,0 мг/кг, внутрішньоочеревинно на 4 день після перещеплення клітин карциноми LL. Четверта група (n = 14) та п'ята група (n = 14) дослідних мишей отримувала цисплатин як зазначено вище. При цьому, тваринам четвертої групи вводили сулодексид на 5 день після перещеплення клітин карциноми LL у дозі

2,0 мг/кг внутрішньом'язово протягом 20 днів. Тваринам п'ятої групи застосовували еноксапарин у дозі 10,0 мг/кг, підшкірно. Дослідні тварини другої, третьої, четвертої та п'ятої груп ще розподілялись на дві підгрупи ($n = 7$) по терміну виведення з експерименту (28-ий день дослідження та моніторинг тривалості життя).

2.2 Характеристика обраних препаратів

1. ВесселДуе Ф (сулодексид), виробництва АльфасігмаС.п.А, Італія. *Сулодексид* є гепариноїдом та антитромбічним і гіполіпідемічним засобом, пригнічує агрегацію тромбоцитів, активований фактор Х, знижує вміст фібриногену у плазмі крові, підвищує рівень активатора плазміногену та знижує вміст у крові інгібітора тканинного плазміногену. Застосовується при ангіопатіях з підвищеним ризиком тромбозу, у т.ч. тромбоз після перенесеного гострого інфаркту міокарда, цереброваскулярних захворюваннях, інсульті і т.д. [120]. Препарат вводили на 5 день після перещеплення клітин карциноми LL в дозі 2,0 мг/кг, протягом 20 днів, внутрішньом'язово.

2. Еноксапарин-Фармекс, виробництва ТОВ «Фармекс Груп», Україна. *Еноксапарин* є низькомолекулярним гепарином (НМГ), дія якого полягає у пригніченні фактора Ха згортання крові, опосередкованого антитромбіном. Застосовується для профілактики тромбоемболічних ускладнень, лікування тромбозів та тромбоемболій і при гострому коронарному синдромі [97]. Препарат вводили на 5 день після перещеплення клітин карциноми LL в дозі 10,0 мг/кг, протягом 20 днів, підшкірно.

3. Цисплатин Аккорд, виробництва Accord Healthcare Limited, Велика Британія. 50 мл (1 мг/мл). *Цисплатин* – є антинеопластичним засобом, сполукою платини, що інгібує синтез ДНК шляхом формування перехресних зв'язів (зшивок) всередині ниток ДНК і між ними. Хоча протипухлинна дія

цисплатину пов'язана переважно з інгібуванням синтезу ДНК, інші механізми, включаючи підвищення імуногенності пухлин, можуть бути залучені до його антинеопластичної дії [122]. Препарат вводили на 4 день після перещеплення клітин карциноми LL у дозі 6,0 мг/кг, одноразово, внутрішньоочеревинно.

Розведення препаратів проводили з використанням дозаторів піпеткових змінного об'єму (Eppendorf, США) та хімічного посуду для аналітичних досліджень.

2.3 Дослідження протипухлинної та антиметастатичної активності

У дослідних мишей-самців лінії C₅₇BL/6, яким перещеплювали клітини карциноми LL у концентрації $2 \cdot 10^6$ та $3 \cdot 10^5$ у 0,3 мл фізіологічного розчину на 14-ий та 28-ий день експерименту, відповідно, вимірювали параметри первинної пухлини для обчислення об'єму пухлини. Об'єм пухлин визначався за формулою еліпсоїда:

$$v = \frac{4}{3} \pi a b^2 \quad (2.1)$$

де: v – об'єм пухлин;

a – найбільша вісь пухлини, мм;

b – найменша вісь пухлини, мм.

Кількість метастазів у легенях визначали візуально. Розмір кожного метастазу встановлювали шляхом візуального порівняння його діаметра з міліметровою шкалою та за допомогою бінокулярного стереоскопічного мікроскопу МБС-10. Об'єм метастазів розраховували, виходячи з припущення їхньої кулястості, за формулою об'єму кулі:

$$v \approx 0,524 d^3, \quad (2.2)$$

де: v – об'єм метастазу, мм^3 ;

d – діаметр метастазу, мм .

Протипухлинну активність оцінювали за відсотком гальмування росту пухлин та метастазів за об'ємом, за формулою:

$$T_{\%} = \frac{(o_k - o_d)}{o_k} \cdot 100\% \quad (2.3)$$

де: $T_{\%}$ - відсоток гальмування росту пухлин та метастазів за об'ємом;

o_k – середній об'єм пухлини у контрольній групі (карцинома LL) (мм^3);

o_d – середній об'єм пухлини у дослідній групі (мм^3).

Антиметастатичну активність оцінювали за відсотком гальмування утворення метастазів, за формулою:

$$M_{\%} = \frac{(o_k - o_d)}{o_k} \cdot 100\% \quad (2.4)$$

де: $M_{\%}$ - відсоток гальмування росту пухлин та метастазів за об'ємом;

o_k – середній об'єм метастазів у контрольній групі (карцинома LL) (мм^3);

o_d – середній об'єм метастазів у дослідній групі (мм^3) [123].

Вплив досліджуваних препаратів на процеси метастазування оцінювали і за середньою тривалістю життя тварин:

$$T_{\%} = \frac{(m_d - m_k)}{m_k} \cdot 100\% \quad (2.5)$$

де: $T_{\%}$ – відсоток гальмування росту пухлин за тривалістю життя тварин;

m_k – середня тривалість життя тварин в контролі;

m_d – середня тривалість життя тварин в досліді.

2.4 Клінічні дослідження крові

2.4.1 Гематологічний аналіз крові

На 28-ий день експерименту, під легким ефірним наркозом, була зібрана кров з орбітального венозного синусу за медіальним кутом очної щілини у мишей усіх експериментальних груп у пробірки для забору крові 0,2 мл з K_3 ЕДТА [115]. Загальний гематологічний аналіз венозної крові здійснювали на автоматичному гемоаналізаторі Mythic 22 (Orphée SA).

Методи, показники та одиниці вимірювання, що використовували у гематологічних тестах наведені нижче:

WBC (White Blood Count, 10^3 /мкл) – абсолютний вміст лейкоцитів – Кількість лейкоцитів зростає при інфекціях, лейкозах. Знижується через пригнічене утворення лейкоцитів у кістковомозку при тяжких інфекціях, онкологічних і аутоімунних захворюваннях;

LYM% (Lymphocyte) – відносний (%) вміст лімфоцитів. Лейкоцити, які борються з вірусними інфекціями. Знищують чужорідні клітини і змінені власні клітини, виділяють в кров антитіла (імуноглобуліни). Висока місткість характерно для вірусних інфекцій і лімфолейкозу; низьке – при гострих не вірусних інфекціях; хворобах кісткового мозку; системного червоного вовчака; імунодефіцитах;

LYM, 10^3 /мкл – абсолютний вміст лімфоцитів;

MON% (Monocyte) - відносний (%) вміст моноцитів; Лейкоцити, які ідуть в тканини. Остаточно знижують чужорідні клітини і білки, вогнище запалення, зруйновані тканини. Високі показники відмічають при вірусних, грибкових і протозойних (що викликаються найпростішими) інфекціях; туберкульозі; саркоїдозі; сифілісі; лейкозах; ревматоїдному артриті; системному червоному вовчаку; вузликовому періартриті, низькі – при захворюваннях кісткового мозку.

MON, $10^3/\text{мкл}$ - абсолютний вміст моноцитів;

NEU% (Neutrophil) - відносний (%) вміст нейтрофілів. Група специфічних лейкоцитів, які відповідають за боротьбу з інфекцією. Підвищення при інфекціях (бактеріальних, грибкових, паразитних), запаленнях, інтоксикаціях, ниркової і печінкової недостатності, психоемоційному збудженні, злоякісних пухлинах. Зниження – при деяких інфекціях (вірусних, хронічних, тяжких, особливо в людей похилого віку); хворобах кісткового мозку; генетичних порушеннях імунітету;

NEU, $10^3/\text{мкл}$ - абсолютний вміст нейтрофілів;

EOS% (Eosinphel) - відносний (%) вміст еозинофілів. Їх підвищення характерно для алергії і паразитарних захворювань, особливо при глистових інфекціях; пониження – при гнійних інфекціях, після родів і операцій;

EOS, $10^3/\text{мкл}$ - абсолютний вміст еозинофілів;

BAS% (Basophil) - відносний (%) вміст базофілів. Відповідають за виділення гістаміну — одного з гормонів алергії. Підвищення кількості характерно для людей, що страждають алергічними захворюваннями, знижені (гіпо-)функції щитоподібної залози; хронічних синуситів. Зниження – при підвищенні (гіпер-) функції щитоподібної залози; овуляції; вагітності; стресі; інших інфекціях;

BAS, $10^3/\text{мкл}$ - абсолютний вміст базофілів;

RBC (Red blood cells), $10^6/\text{мкл}$ – абсолютний вміст еритроцитів. Високоспеціалізовані клітини, функцією яких є транспортування кисню з легень до тканин тіла. При різноманітних захворюваннях крові можлива зміна кольору еритроцитів, їх розмірів, кількості, а також форми;

HGB (Hemoglobin) – концентрація гемоглобіну в цільній крові. Якщо гемоглобіну стає менше, тканини отримують менше кисню. Це відбувається

при анемії (недокрів'ї), після втрати крові, при деяких спадкових захворюваннях;

HCT (Hematocrit) – гематокрит, частина від загального об'єму крові, що припадає на форменні елементи. Якщо гематокрит падає, людина або перенесла кровотечу, або в нього різко пригнічене утворення нових клітин крові. Це буває при тяжких інфекціях і аутоімунних захворюваннях. Підвищення гематокриту свідчить про загущення крові, наприклад при зневодненні;

MCV (Mean cell volume), фл – середній об'єм еритроцита, у фемтолітрах. У залежності від значень MCV відбувається диференціація анемії на мікроцитарні, нормоцитарні і макроцитарні. Даний показник допомагає у визначенні причин розвитку анемії;

MCH (Mean corpuscular hemoglobin mass), пг (пікограм) - середній вміст гемоглобіну в окремому еритроциті в абсолютних одиницях. На підставі значень MCH розрізняють нормохромні, гіперхромні і гіпохромні анемії;

MCHC (Mean corpuscular hemoglobin concentration), г/дл - середній вміст гемоглобіну в еритроцитарній масі. Відображає ступінь насичення еритроцита гемоглобіном. Виявляє приховані запальні процеси в організмі, злоякісні пухлини, анемії у випадках його підвищення. Зниження може говорити про збільшеній кількості еритроцитів;

RDWC (Red blood cell volume distribution width, calculated as percentage), % - Відносна ширина розподілу еритроцитів за об'ємом, коефіцієнт варіації. Тест RDW зазвичай використовується для діагностики або визначення причини анемії - стану, при якому організм не виробляє достатньої кількості еритроцитів;

RDWS (Red blood cell volume distribution width, at 20% histogram height), фл - Відносна ширина розподілу еритроцитів за об'ємом, стандартне відхилення;

PLT (Platelet), $10^3/\text{мкл}$ – абсолютний вміст тромбоцитів. Клітини, що відповідають за згортання крові. Високу місткість визначають при поліцитемії; лейкозі; запаленнях; низькі показники – при захворюваннях кісткового мозку; системному червоному вовчаку; гемолітичній анемії. Також вміст тромбоцитів нижче норми може свідчити про імунологічне захворювання чи тяжке запалення;

MPV (Mean platelet volume), фл - середній об'єм тромбоцитів (норма 7-9 фл). Застосовується для виявлення тромбоцитопенії або тромбоцитозу, а також інших захворювань;

PCT (Plateletcrit), % - тромбокрит, частка об'єму цільної крові, яку займають тромбоцити;

PDW (Platelet distribution width), % - відносна ширина розподілу тромбоцитів за об'ємом, показник гетерогенності тромбоцитів. Його підвищення може вказувати на судинні захворювання та деякі види раку;

PLCR (Platelet large cell ratio), % – коефіцієнт великих тромбоцитів. Важливість P-LCR тесту полягає в його здатності дати уявлення про функцію тромбоцитів та їх виробництво. Великі тромбоцити, як правило, молодші і потенційно більш активні в процесі зсідання крові. Підвищене значення P-LCR може вказувати на більшу частку цих великих тромбоцитів, що може бути пов'язано з різними захворюваннями, включаючи запальні захворювання, серцево-судинні захворювання та порушення, що впливають на вироблення тромбоцитів у кістковому мозку. [124-129].

Реактиви: Трансферний розчин Mythic 22 HM22-001-1 (Orphee); лізуючий реагент Mythic 22 OnlyOne HM22-002-1 (Orphee); розчинник для

Mythic 22 HM22-003-1 (Orphee); промивний розчин Mythic 22 HM18-011-025 (Orphee).

2.4.2 Коагулометричні методи дослідження крові

Метод Моравіца. До початку перещеплення клітин карциноми легень Льюїса у всіх експериментальних мишей було проведено аналіз на час зсідання крові за Моравіцем. Краплю капілярної крові з кінчика хвоста тварини, діаметром 4–6 мм наносять на скло. Поверхню краплі кожні 30 с погладжують тонким скляним капіляром. Час зсідання визначають за часом появи перших ниток фібрину, що тягнуться за капіляром. Процедуру проводили на 14-ий і 28-ий день дослідження [130].

У контрольних мишей (без пухлини), з перещепленою карциномою LL та за умов курсового введення антикоагулянтів сулодексиду та енкапарину на фоні застосування цисплатину на 28-ий день дослідження під легким ефірним наркозом була зібрана кров з орбітального венозного синусу у пробірки 100 мкл з 3,8 % розчином цитрата натрію у відношенні 1:9. Зразки крові відкручувались на Centrifuge 5810 R (Eppendorf, Німеччина) при 1500 g, 10 хв для отримання плазми крові для визначення вмісту фібриногену (FG), протромбінового часу (PT), концентрації антитромбіну III (АТ-III).

Визначення вмісту фібриногену. в скляну пробірку вносять 0,2 мл досліджуваної плазми і 1,7 мл 0,1 М фосфатного буфера з рН 7.0 потім в суміш додавали 0,1 мл тромбіноподібного ензиму з отрути щитомордника звичайного. Суміш ретельно перемішують і витримують в термостаті за температури 37°C 30 хв. Згусток фібрину центрифугують (Centrifuge 5810 R (Eppendorf, Німеччина)) та розчиняють в 5 мл 1,5 % розчину оцтової кислоти. Концентрацію білка в отриманому розчині визначають спектрофотометрично (Ultrospec 2000, Pharmacia, США), вимірюючи поглинання при довжині хвилі 280 і 320 нм (поглинання при 320 нм визначають для розрахунку поправки на

мутність розчину) [131]. Вміст фібриногену Φ в плазмі крові розраховували за формулою:

$$\Phi = \frac{(E_{280} - E_{320}) \cdot 255}{1,5} \quad (2.6)$$

де: Φ – концентрація фібриногену в плазмі (г/л);

255 – коефіцієнт для перерахунку вмісту фібриногену в об'ємі зразка на його концентрацію в плазмі;

1.5 – коефіцієнт молярної екстинції поглинання при довжині хвилі 280 нм 1% – го розчину фібрину.

Визначення активності антитромбіну III. Аналіз проводять відповідно до рекомендацій виробника. Залишкову активність тромбіну вимірюють за допомогою хромогенного тромбін-специфічного субстрату S2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA) Siemens, Німеччина. Утворення паранітроаніліну (pNa) контролюють при 405 нм за допомогою аналізатора імуноферментного Multiscan EX (Thermo LabSystem, Фінляндія).

Для визначення вмісту АТІІІ в плазмі крові використовують калібрувальну криву, яку будують з використанням відомих концентрацій ензиму; оптичну густину дослідного зразка порівнюють зі стандартною кривою для визначення концентрації протеїну [132].

Визначення протромбінового часу. Метод ґрунтується на здатності тканинного тромбопластину і Ca^{2+} активувати зовнішній шлях зсідання крові та використовується як скринінговий, який дозволяє оцінити загальну тенденцію до зміщення динамічної рівноваги системи гемостазу в бік коагуляції. До 0,1 мл плазми крові послідовно вносять 0,1 мл реагенту тромбопластину та 0,1 мл 0,025 М CaCl_2 . Фіксують час утворення згустку за допомогою аналізатора імуноферментного Multiscan EX (Thermo LabSystem,

Фінляндія), за довжини хвилі 405 нм. Як контроль використовують плазму крові мишей контрольної групи [133].

У роботі було використано: 3,8 % розчин цитрату натрію, фосфатний буфер pH 7.0, тромбіноподібний ензим з отрути щитомордника звичайного, оцтова кислота, хромогенний тромбін-специфічний субстрат S2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA) Siemens, Німеччина, реагент тромбопластину та 0,025 М CaCl₂, діагностичний набір для вивчення активності антитромбіну III («Siemens», Німеччина).

2.5 Морфологічні методи дослідження

Об'єктом морфологічного дослідження слугували легені, селезінка та кістковий мозок усіх експериментальних тварин.

Макроскопічні дослідження. Перед евтаназією тварини були зважені на вагах електронних ВПТ-1 (Radwag, Польща). Метод евтаназії – цервікальна дислокація (під легким ефірним наркозом). Під час аутопсії експериментальних тварин були вилучені та зважені легені та селезінка. Органи зважували на вагах електронних Europe 500 (Gibbertini, Італія).

Маса органів. Були зважені наступні органи: селезінка, легені. Масові коефіцієнти органів (МКО) розраховувались за формулою:

$$\text{МКО} = \frac{m_o}{m_T} \cdot 100\% \quad (2.7)$$

де: m_o – маса органа;

m_T – маса тварини.

Мікроскопічні дослідження. Шматочки легень та селезінки експериментальних тварин фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну зневоднювали в етанолі зростаючої концентрації та заливали в парафін за стандартною методикою [134]. На ротаційному мікротомі Shandon

Finesse 325 (Thermo Shandon, США) готували парафінові зрізи товщиною 5 – 6 μm , які забарвлювали гематоксиліном та еозином.

Кістковий мозок відбирали зі стегнової кістки [135, 136] для приготування й фарбування мазка та подальшого аналізу. Для гістологічних досліджень пунктату кісткового мозку користувались фарбою Giemsa Stain, Modified (Sigma-Aldrich, США). Підрахунок мегакаріоцитів здійснювали шляхом оцінки мазків кісткового мозку при малому збільшенні ($\times 100$), з подальшим визначенням їх кількості на 1000 клітин. Препарати вивчали на мікроскопі Leica DM LS2 (Німеччина).

2.6 Статистична обробка даних

Отримані дані обраховували за допомогою програми Origin Pro 2023b та сайту Statistic Kingdom [137]. Нормальність даних перевіряли за критерієм Шапіро-Уїлка. Дані з нормальним розподілом подавали як середнє значення $\pm$ похибка середнього ($M \pm m$) та порівнювали з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з наступним тестом Тьюкі. Дані з ненормальним розподілом представляли як медіану (Me) та міжквартильний діапазон (IQR) і порівнювали з використанням критерію Краскела-Уолліса. Для парних вимірів у незалежних вибірках отримані дані порівнювали з використанням критерію Манна-Вітні (для ненормального розподілу) та критерію Стюдента (для нормального розподілу). Діаграми представлені у вигляді боксів з вусами та позначені наступним чином: коробка – міжквартильний діапазон (IQR); лінія всередині коробки – медіана; $\times$ – середнє значення; вуса – діапазон від $Q1 - 1,5 \cdot IQR$ до $Q3 - 1,5 \cdot IQR$. Значення-викиди позначені окремими точками. Різницю вважали статистично значущою, якщо рівень $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Вплив антикоагулянтів прямої дії сулодексиду й еноксапарину та за умов сумісного застосування з цисплатином на метастатичну активність епідермоїдної карциноми легень Льюїса.

Для лікування злоякісних новоутворень використовують комбіновану хіміотерапію, яка передбачає одночасне використання декількох протипухлинних препаратів з різними механізмами дії для досягнення вищого терапевтичного ефекту. Така комбінація може значно підвищити ефективність лікування та обмежити його токсичність.

Платиновмісний протипухлинний препарат цисплатин застосовують як самостійно, так і при комбінованій терапії метастатичного раку яєчка, яєчника, сечового міхура, плоскоклітинного раку голови та шиї, недрібноклітинного та дрібноклітинного раку легень, при лікуванні цервікальних пухлин [138]. На III та IV стадіях цих хвороб виникають метастази у віддалених органах, які мають велике кровопостачання, таких як легені, печінка, головний мозок, кістки. На цьому фоні у онкологічних хворих виникають асоційовані з раком тромботичні ускладнення: венозна тромбоемболія (ВТЕ), яка призводить до тромбозу глибоких вен (ТГВ) або тромбоемболії легеневої артерії (ТЕЛА), що є причиною високої смертності [139]. Також вплив на зсідання крові та пошкодження судин, який призводить до тромбозів та крововиливів може бути синдром розпаду пухлини (СРП) – це критичний метаболічний стан, спричинений масовою загибеллю ракових клітин, що вивільняє їхній вміст у кров [140].

Тому антикоагулянти застосовують, як профілактичні та лікувальні засоби при тромбозах [141, 142]. Також, результати сучасних клінічних

досліджень доводять, що застосування антикоагулянтів розширює можливість протипухлинної терапії, підвищує якість життя онкохворих та покращує прогноз перебігу хвороби [143 - 145].

Сулодексид - високоочищений глікозаміноглікан, має властивості інгібувати агрегацію та адгезію тромбоцитів на рівні судинної стінки, знижувати концентрацію фібриногену в плазмі крові, рівень інгібітору активатора плазміногену-1 та підвищувати активність тканинного активатора плазміногену, а також системну фібринолітичну та тромболітичну активність [96, 146]. Еноксапарин є низькомолекулярними гепарином, який чинить пряму антикоагулянту та антитромботичну дію, інгібує фактори зсідання крові Ха (тромбокіназу), фактор IIa (тромбін) [121].

До теперішнього часу накопичено достатньо даних щодо протипухлинної та антиметастатичної активності антикоагулянтів прямої дії [147 - 149]. Тому пошук та розробка нових схем лікування злоякісних новоутворень з препаратами супроводу розширює можливість протипухлинної терапії.

3.1.1 Антиметастатична та протипухлинна дія сулодексиду

На тлі спонтанно метастазуючої у легені мишей лінії C₅₇BL/6 карциноми легень Льюїса було досліджено вплив сулодексиду на утворення та розвиток метастазів у легенях та безпосередньо на зростання первинної пухлини, середньої тривалості життя дослідних тварин. Лікування тварин починали на 5 день після перещеплення клітин карциноми LL. Сулодексид застосовувався в дозі 2,0 мг/кг, внутрішньом'язово, 20 днів. Результати дослідження представлені у табл. 3.1.1.

Таблиця 3.1.1

Вплив сулодексиду на пухлинний ріст та метастазування карциноми легень Льюїса, перещепленої мишам - самцям лінії C₅₇Bl/6 протягом 20 днів ($M \pm m$ або [Me (25%; 75 %)], $n \leq 10$)

Показники \ Групи	карцинома LL	карцинома LL + сулодексид
Кількість метастазів	6,71±2,14	3,0(2,0;3,0)*
$M \pm m$	-	2,43±1,13
Гальмування за кількістю метастазів, %	-	63,79
Об'єм метастазів, мм ³	8,78±5,97	0,07(0,07;0,6)*
$M \pm m$	-	0,27±0,28
Гальмування за об'ємом метастазів, %	-	96,91
Об'єм первинної пухлини, мм ³	6,13(5,4;6,42)	4,65±1,09
$M \pm m$	5,43±1,81	-
Гальмування за об'ємом первинної пухлини, %	-	14,64
Середня тривалість життя, дні	33,0±2,98	35,0±3,16
Збільшення середньої тривалості життя, %	-	6,06

Примітка: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою тварин з перещепленою карциномою LL.

Аналіз отриманих даних виявив значне зниження метастатичної активності карциноми LL за умов уведення антикоагулянту прямої дії сулодексиду у дозі 2,0 мг/кг. Кількість метастазів у легень дослідних тварин на 28 день дослідження зменшувалась на 63,79 %, а їх об'єм на 96,91%. Гальмування росту первинної пухлини карциноми LL сулодексидом

становило - 14,64 %, що нижче критерію значущості для цієї пухлини (> 50 %) [117], середня тривалість життя збільшувалась на 6,06 %, але статистична обробка отриманих даних не виявила статистично значущих відмінностей між дослідними групами.

3.1.2. Антиметастатична та протипухлинна дія еноксапарину

Антиметастатичну та протипухлинну дію еноксапарину було досліджено на тлі спонтанно метастазуючої у легені мишей-самців лінії C₅₇BL/6 карциноми легень Льюїса. Лікування тварин починали на 5 день після перещеплення клітин карциноми LL. Еноксапарин застосовувався у дозі 10,0 мг/кг, підшкірно, 20 днів (табл.3.1.2).

Таблиця 3.1.2

Вплив еноксапарину на пухлинний ріст та метастазування карциноми легень Льюїса, перещепленої мишам - самцям лінії C₅₇Bl/6 протягом 20 днів (M ± m або [Me (25%; 75 %)], n ≤ 10)

Показники \ Групи	карцинома LL	карцинома LL + еноксапарин
1	2	3
Кількість метастазів	6,57±0,95	2,0(2,0;3,0)*
M ± m	-	2,57±0,79
Гальмування за кількістю метастазів, %	-	60,88
Об'єм метастазів, мм ³	11,07±2,77	0,065(0,0;1,05)*
M ± m	-	0,34±0,5
Гальмування за об'ємом метастазів, %	-	96,88
Об'єм первинної пухлини, мм ³	5,75±0,72	3,48(3,29;4,56)

Продовження таблиці 3.1.2

1	2	3
$M \pm m$	-	$4,64 \pm 2,8$
Гальмування за об'ємом первинної пухлини, %	-	19,3
Середня тривалість життя, дні	$33,0 \pm 2,5$	$35,5 \pm 1,38$
Збільшення середньої тривалості життя, %	-	7,6

Примітка: * - $p \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою тварин з перещепленою карциномою LL.

Результати дослідження показали, що на 28 день експерименту за умов уведення антикоагулянту прямої дії еноксапарину у дозі 10,0 мг/кг, кількість метастазів зменшувалась на 60,88 % , а їх об'єм на 96,88 %. Гальмування росту первинної пухлини карциноми LL на 19,3 %, що нижче критерію значущості для цієї пухлини ($> 50\%$) [117], середня тривалість життя дослідних тварин збільшувалась на 7,60 %, але статистична обробка отриманих даних не виявила статистично значущих відмінностей між дослідними групами.

3.1.3. Антиметастатична та протипухлинна дія сумісного застосування сулодексиду та еноксапарину у поєднанні з цисплатином

Фармакологічна модуляція росту пухлини передбачає вплив на різні клітинні та молекулярні шляхи з метою гальмування розвитку пухлини або підвищення ефективності протиракової терапії. Цього можна досягти шляхом впливу на специфічні молекули, що беруть участь у зростанні пухлинних клітин, ангіогенезі, або змінюють мікрооточення пухлини, а також шляхом модуляції імунної відповіді на пухлину [150 - 152].

У даній роботі ми порівняли вплив антикоагулянтів прямої дії - сулодексиду та еноксапарину на фоні застосування з цисплатином на метастатичну активність карциноми легень Льюїса. З метою порівняльного аналізу та експериментальним обґрунтуванням доцільності застосування сулодексиду та еноксапарину, як препаратів супроводу, було застосовано окрему групу дослідних тварин, які отримували монотерапію цисплатином.

Досліджувані препарати вводили у наступних дозах та режимах: цисплатин на 4-ий день після перещеплення пухлинних клітин у дозі 6,0 мг/кг, одноразово, внутрішньоочеревинно; сулодексид на 5-ий день після перещеплення пухлинних клітин у дозі 2,0 мг/кг, внутрішньом'язово, 20 днів; еноксапарин на 5-ий день після перещеплення пухлинних клітин у дозі 10,0 мг/кг, підшкірно, 20 днів (табл.3.1.3).

Таблиця 3.1.3

Вплив сулодексиду й еноксапарину на фоні застосування цисплатину на пухлинний ріст та метастазування карциноми легень Льюїса, перещепленої мишам – самцям лінії C₅₇Bl/6 ($M \pm m$ або [Me (25%; 75 %)], $n \leq 14$)

Групи Показники	карцинома LL	карцинома LL+ цисплатин	карцинома LL+ цисплатин +сулодексид	карцинома LL+ цисплатин +еноксапарин
1	2	3	4	5
Кількість метастазів	6 (5;6)	4(3;4)	0,14±0,38* **	0,0(0,0;2,0)* **
$M \pm m$	5,43±0,79	3,43±0,79	-	0,86±0,97
Гальмування за кількістю метастазів, %	-	36,83	97,42	84,16
Об'єм метастазів, мм ³	4,78(1,18;5,37)	0,55±0,32	0 ^a	0,0(0,0;0,06)*
$M \pm m$	4,90±4,96	-	-	0,86±0,96

Продовження таблиці 3.1.3

1	2	3	4	5
Гальмування за об'ємом метастазів, %	-	88,77	100,0	97,75
Об'єм первинної пухлини, мм ³	6,34±1,58	4,12±0,45*	3,74±0,45*	4,05±0,57*
Гальмування за об'ємом первинної пухлини, %	-	35,02	41,01	36,12
Середня тривалість життя, дні	36,43±2,07	46,57±1,9*	48,43±1,72*	47,43±1,99*
Збільшення середньої тривалості життя, %	-	27,83	32,94	30,19

Примітка: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою тварин з перещепленою карциномою LL; ** – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою тварин з перещепленою карциномою LL за умов введення цисплатину; ^a – $d < 0,5$ мм (метастаз у аваскулярній фазі).

При застосуванні сулодексиду (у дозі 2,0 мг/кг, введення протягом 20 днів) на фоні одноразового введення на 4-ий день після перещеплення пухлинних клітин цисплатину у дозі 6,0 мг/кг, відсоток гальмування утворення метастазів у легенях становив – 97,42 %, їх об'єм зменшувався на 100 % (виявлено 1 метастаз у аваскулярній фазі). Зростала середня тривалість життя на 32,94 % при гальмуванні первинної пухлини за об'ємом на 41,01 %.

При застосуванні еноксапарину (у дозі 10,0 мг/кг, введення протягом 20 днів) на фоні одноразового введення на 4-ий день після перещеплення пухлинних клітин цисплатину у дозі 6,0 мг/кг, відсоток гальмування

утворення метастазів у легенях становив – 84,16 %, їх об'єм на 97,75 % . Зростала середня тривалість життя на 36,12 % при гальмуванні первинної пухлини за об'ємом на 30,19 %.

За умов одноразового введення цисплатину у дозі 6,0 мг/кг зазначені показники становили: 36,83 %, 27,83 %, 35,02 %, відповідно.

Отриманні данні дозволили оцінити фармакологічну модуляцію первинного пухлинного росту та метастатичної прогресії карциноми легень Льюїса, якій притаманний гематогенний шлях метастазування, антикоагулянтами прямої дії сулодексиду та еноксапарину на фоні застосування протипухлинного засобу цисплатину.

Резюме

Отже, за результатами дослідження застосування сулодексиду у дозі 2,0 мг/кг, як препарату супроводу на фоні одноразового введення цисплатину у дозі 6,0 мг/кг було визначено високий антиметастатичний ефект. Еноксапарин у дозі 10 мг/кг, за даних умов експерименту, мав значну антиметастатичну дію.

Результати наших досліджень обґрунтовують доцільність використання антикоагулянтів прямої дії сулодексиду та еноксапарину, як препаратів супроводу для лікування метастазуючих форм пухлин.

Матеріали даного розділу відображені в наступних публікаціях:

1. Мунько М.А. Вплив антикоагулянта прямої дії еноксапарину на метастатичну активність карциноми легень Льюїс. Вісник проблем біології та медицини. 2024. Вип. 1, №172. С. 194-203. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2024-1-172-194-203>

2. Мунько М.А., Карацуба Т.А. Метастатична активність карциноми легень Льюїс за впливу антикоагулянтів прямої дії на тромбоцитарний гемостаз і коагуляційну активність крові. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2024. № 3 т. 18. С. 175-184. <https://doi.org/10.33250/18.03.175>

3. Мунько М.А. Фармакологічна модуляція первинного пухлинного росту та метастатичної прогресії карциноми легень Льюїс антикоагулянтами прямої дії на фоні застосування цисплатину. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2025. № 3 т. 19. С. 249-257. <https://doi.org/10.33250/19.03.249>.

3.2 Клінічні дослідження крові

3.2.1 Гематологічні дослідження

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 онкопацієнтів. В останні роки особливу увагу зосереджено на механізмах розвитку злоякісних новоутворень і, зокрема, на порушеннях у системі гемостазу, як однієї з найважливіших компонентів патогенезу пухлинного процесу.

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

Для визначення динамічних біомаркерів, які пов'язані з метастазуванням була проведена оцінка параметрів гемограми мишей-самців лінії C₅₇BL/6 із перещепленою карциноми LL щодо росту первинної пухлини

(14-ий день дослідження) та на тлі її метастатичної прогресії і оцінці змін за умов уведення антикоагулянтів прямої дії, як монотерапії, так і на фоні застосування цисплатину (28-ий день дослідження). Результати експерименту показали, що на 14-ий 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. Загальний гематологічний аналіз венозної крові дослідних мишей дозволив оцінити зміни параметрів гемограми на тлі первинного пухлинного росту (табл. 3.2.1).

Таблиця 3.2.1

Показники гемограми мишей-самців C₅₇BL/6 із перещепленою карциномою LL на 14 день дослідження ($M \pm m$ або [Me (25%; 75 %)], n = 7)

Показник, одиниці вимірювання	Дослідні групи	
	Контроль (інтактні тварини)	карцинома LL
1	2	3
Лейкоцити, 10 ³ /мкл	7,6 $\pm$ 1,84	10,83 $\pm$ 0,08*
Лімфоцити, %	86,44 $\pm$ 3,66	78,93 $\pm$ 2,88*
Моноцити, %	5,23 $\pm$ 2,15	10,61 $\pm$ 1,33*
Нейтрофіли, %	4,97 $\pm$ 2,11	3,74 $\pm$ 0,6
Еозинофіли, %	0,53 $\pm$ 0,43	0,11 $\pm$ 0,07*
Базофіли, %	2,97 $\pm$ 0,65	6,6 $\pm$ 1,28*
Лімфоцити, 10 ³ /мкл	7,29 $\pm$ 1,45	8,6(8,3;9)
Моноцити, 10 ³ /мкл	0,41 $\pm$ 0,2	1,17 $\pm$ 0,14*
Нейтрофіли, 10 ³ /мкл	0,34 $\pm$ 0,13	0,41 $\pm$ 0,07
Еозинофіли, 10 ³ /мкл	0(0;0,1)	0
Базофіли, 10 ³ /мкл	0,2(0,2;0,3)	0,71 $\pm$ 0,13*
Еритроцити, 10 ⁶ /мкл	9,94(9,47;10,13)	8,24(8,2;8,28)*
Гемоглобін, г/дл	13,8(13,8;14,2)	11,79 $\pm$ 0,09*

Продовження таблиці 3.2.1

1	2	3
Гематокрит, %	44,5(42,6;44,8)	37,26±0,53*
Середній об'єм еритроцита, фл	44,74±1,64	45,29±0,53
Середній вміст гемоглобіну в еритроциті, пг	13,8(13,7;14,9)	14,34±0,1
Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті, г/дл	31,5±0,65	31,64±0,36
Відносна ширина розподілу еритроцитів за об'ємом, коефіцієнт варіації, %	13,7(12,7;15,8)	12,91±0,21
Відносна ширина розподілу еритроцитів за об'ємом, стандартне відхилення, фл	24,01±2,31	23(22,8;24,8)
Тромбоцити, 10 ³ /мкл	760,29±149,32	520(498;585)*
Середній об'єм тромбоцита, фл	6,9±0,68	6,5(6,4;6,6)
Тромбокрит, %	0,52±0,09	0,34(0,32;0,39)*
Відносна ширина розподілу тромбоцитів за об'ємом, %	34,31±7,11	34,8(34,2;38,3)
Коефіцієнт великих тромбоцитів, %	9,41±4,63	4,8±0,93*

Примітка: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою тварин з перещепленою карциномою LL.

Представлені дані свідчать, що у мишей-самців C₅₇BL/6 з первиною пухлиною карциноми LL на 14-ий день дослідження кількість лейкоцитів у крові достовірно збільшувалась у порівнянні з контрольною групою (інтактні

тварини). При аналізі лейкоцитарної формули визначено, що ці зміни відбулися за рахунок збільшення відсотку моноцитів та базофілів.

Аналіз показників червоної крові та еритроцитарних індексів дослідних мишей показав достовірні зміни щодо зменшення кількості еритроцитів, вмісту гемоглобіну, відсотку гематокриту, але еритроцитарні індекси не змінювались. Особливу увагу приділили показникам тромбоцитарної ланки гемограми дослідних тварин, таким як: кількість тромбоцитів, середній об'єм тромбоциту, відсоток тромбокриту, відносна ширина розподілу тромбоцитів за об'ємом, коефіцієнт великих тромбоцитів.

На тлі росту первинної пухлини карциноми LL на 14-ий день дослідження відмічалось достовірне зниження кількості тромбоцитів, відсотку тромбокриту та відсотку коефіцієнту великих тромбоцитів, відсоток відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом був на рівні контрольної групи.

Для того, щоб провести порівняльний аналіз і оцінити зміни гематологічних показників крові на тлі метастазування карциноми LL та за умов уведення антикоагулянтів, як монотерапії, так і сумісного застосування з цисплатином загальний аналіз венозної крові експериментальних тварин проводили на 28-ий день дослідження (табл. 3.2.2; 3.2.3).

Таблиця 3.2.2

Показники гемограми мишей-самців C₅₇BL/6 із перещепленою карциномою LL та за умов сумісного застосування сулодексида з цисплатином на 28 день дослідження. (M ± m або [Me (25%; 75 %)], n ≤ 8)

Показник, одиниці вимірювання	Дослідні групи				
	контроль	карцинома LL	карцинома LL +цисплатин	карцинома LL +сулодексид	карцинома LL +цисплатин +сулодексид
1	2	3	4	5	6
Лейкоцити, 10 ³ /мкл	2,94±1,54	7,68±0,36*	9,82±0,15*	9,67±1,06*	8,45±0,63*
Лімфоцити, %	84,21±7,34	63,02±3,16*	68,5±3,08	67,74±3,26*	80,3(79,1;82,1)**
Моноцити, %	5,85±2,9	20,22±2,18*	13,48±1,19* **	17,67±2,23*	6,52±1,72** **** ****
Нейтрофіли, %	5,63±2,87	5,12±0,73*	7,7±2,08	4,7±0,3*	7,8(7,3;9)** ****
Еозинофіли, %	0,2(0,1;1)	0,15±0,04	0,48±0,28	0,1(0;0,1)	1,77±(0,9)** ****
Базофіли, %	3,83±2,25	11,37±1,21*	9,83±0,63	9,83±0,94*	3,8(3,6;4,2)**
Лімфоцити, 10 ³ /мкл	1,9(1,8;2,9)	4,87±0,44	6,72±0,37*	6,73±1,02*	6,57±0,29*
Моноцити, 10 ³ /мкл	0,18±0,1	1,53±0,11*	1,320,12*	1,5(1,4;1,6)*	0,5(0,5;0,5)
Нейтрофіли, 10 ³ /мкл	0,15(0,1;0,2)	0,4±0,06	0,77±0,18*	0,5(0,4;0,5)	0,65(0,6;0,7)*
Еозинофіли, 10 ³ /мкл	0	0	0(0;0)	0	0,2(0,1;0,2)
Базофіли, 10 ³ /мкл	0,1(0,1;1,5)	0,9±0,09*	1(1;1)*	0,9(0,9;0,9)*	0,3(0,3;0,3)
Еритроцити, 10 ⁶ /мкл	10,55(9,85;11,2)	8,64±0,27*	9,45±0,15	9,17±0,32	10,1±0,28**
Гемоглобін, г/дл	15(13,3;15,65)	12,12±0,26*	13,13±0,08	12,74±0,42	14,1±0,28**
Гематокрит, %	45(40,35;48,3)	38,92±0,93	42,17±1,25	41,34±1,32	45,37±1,32**
Середній об'єм еритроцита, фл	40,95(40,3;45,6)	45,7(44,3;45,8)	44,63±0,76	45,1±0,33	44,93±1,25

Продовження таблиці 3.2.2

1	2	3	4	5	6
Середній вміст гемоглобіну в еритроциті, пг	14,05(13,65;14,75)	14,05±0,22	13,9±0,2	13,9±0,1	13,97±0,16
Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті, г/дл	32,78±0,98	31,13±0,24	31,25(30,5;31,9)	30,81±0,21*	31,1±0,68
Відносна ширина розподілу еритроцитів за об'ємом, коефіцієнт варіації, %	13,3(12,4;16,25)	14,8±0,36	13,5(13,4;13,9)	14,74±0,45	13,68±0,94
Відносна ширина розподілу еритроцитів за об'ємом, стандартне відхилення, фл	20,05(19,9;27,1)	25,5±1,3	24,65(22,8;24,8)	22,7(22,7;26,9)	24,65(24,5;24,8)**
Тромбоцити, 10 ³ /мкл	802,75±116,48	364,17±36,39*	606,5±33,58**	422,86±39,82*	925,5±232,17** *** ****
Середній об'єм тромбоцита, фл	6,61±0,34	7,30±0,18	7,1(7;7,1)	7(6,6;7,7)	6,45±0,12
Тромбоцитрит, %	0,5(0,46;0,57)	0,26±0,02*	0,43±0,02	0,28(0,24;0,34)*	0,59±0,14** ****
Відносна ширина розподілу тромбоцитів за об'ємом, %	35,29±8,21	41,08±0,14	37,65±1,06	40,34±0,98	32,67±5,86**
Коефіцієнт великих тромбоцитів, %	6,75(5,85;8,65)	12,33±1,3	10,58±0,54	9,9(8;15,5)	5,2±0,77** *** ****

Примітка: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контролем; ** – $p \leq 0,05$ у порівнянні з карциномою LL; *** – $p \leq 0,05$ у порівнянні з цисплатином; **** – $p \leq 0,05$ у порівнянні з карцинома LL+сулодексид.

Таблиця 3.2.3

Показники гемограми мишей-самців C₅₇BL/6 із перещепленою карциномою LL та за умов сумісного застосування еноксапарина з цисплатином на 28 день дослідження. (M ± m або [Me (25%; 75 %)], n ≤ 7)

Показник, одиниці вимірювання	Дослідні групи				
	контроль	карцинома LL	карцинома LL +цисплатин	карцинома LL +еноксапарин	карцинома LL +цисплатин +еноксапарин
1	2	3	4	5	6
Лейкоцити, 10 ³ /мкл	6,49±3,42	9,70±0,65*	9,82±0,15**	4,7(4,1;11,2)	13,7(9,7;17,7)**
Лімфоцити, %	90,91±2,15	76,61±3,94*	68,50±3,08*	59,26±1,33* **	74,52±11,04* ****
Моноцити, %	3,39±1,77	12,50±2,76*	13,48±1,19*	25,21±1,88* ** ***	10,27±3,87****
Нейтрофіли, %	3,14±1,09	3,67±0,83	7,70±2,08*	5,06±0,46	8,45±4,8* **
Еозинофіли, %	0,1(0;0,1)	0,1(0;0,1)	0,48±0,28* **	0,1(0,1;0,2)	0,15(0,1;0,2)
Базофіли, %	2,46±0,99	7,16±1,31*	9,83±0,63*	10,31±0,5*	6,40±2,33* ****
Лімфоцити, 10 ³ /мкл	5,96±3,25	7,51±0,73	6,72±0,37	2,6(2,5;6,5)**	10,2(6,3;14,9)
Моноцити, 10 ³ /мкл	0,19±0,09	1,17±0,26	1,32±0,12*	1,69±0,34*	1,3(1,3;1,3)*
Нейтрофіли, 10 ³ /мкл	0,10(0,1;0,4)	0,34±0,07	0,77±0,18*	0,2(0,2;0,6)	0,98±0,32* **
Еозинофіли, 10 ³ /мкл	0	0	0(0;0)	0	0(0;0)
Базофіли, 10 ³ /мкл	0,1(0,1;0,1)	0,67±0,12	1(1;1)*	0,4(0,4;1,2)	0,82±0,22*
Еритроцити, 10 ⁶ /мкл	9,27±1,3	7,07(7,05;7,55)*	9,45±0,15**	7,25±0,55	9,57±0,54**
Гемоглобін, г/дл	13,33±1,88	9,90±0,38*	13,13±0,08**	10,43±0,76* ***	13,37±0,78** ****
Гематокрит, %	43,47±6,75	32,16±1,26*	42,17±1,25**	34,10±2,51*	43,7±4,28** ****
Середній об'єм еритроцита, фл	46,86±0,91	46,06±0,4	44,63±0,76*	47,10±0,17***	45,58±1,92

Продовження таблиці 3.2.3

1	2	3	4	5	6
Середній вміст гемоглобіну в еритроциті, пг	14,39±0,27	14,19±0,11	13,90±0,2*	14,41±0,05***	13,95±0,14* ****
Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті, г/дл	30,74±0,73	30,80±0,17	31,25(30,5;31,9)	30,60±0,11	30,7±1,33
Відносна ширина розподілу еритроцитів за об'ємом, коефіцієнт варіації, %	16,47±1,43	13,74±0,26*	13,50(13,4;13,9)*	15,14±0,24	14,05(12,4;15,7)
Відносна ширина розподілу еритроцитів за об'ємом, стандартне відхилення, фл	28,63±2,14	25,29±0,73	24,65(22,8;24,8)*	28,90(24,8;29,4) ***	23,85(22,8;24,9)*
Тромбоцити, 10 ³ /мкл	859,43±140,3	367,71±20,09*	606,50±33,58* **	495,71±21,41*	652±126,37* ** ****
Середній об'єм тромбоцита, фл	6,90±0,86	6,73±0,08	7,1(7;7,1)	6,66±0,18	7,5(6,4;8,9)
Тромбоцитрит, %	0,60±0,14	0,25±0,01*	0,43±0,02* **	0,33±0,01*	0,49±0,04** ****
Відносна ширина розподілу тромбоцитів за об'ємом, %	25,81±3,47	36,56±0,96*	37,65±1,06*	31(29,6;32,5)	36,03±7,37*
Коефіцієнт великих тромбоцитів, %	9,3(5,9;10,8)	7,34±0,79	10,58±0,54	8,37±1,74	13,55(4,8;24,7)

Примітка: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контролем; ** – $p \leq 0,05$ у порівнянні з карцинома LL; *** – $p \leq 0,05$ у порівнянні з цисплатином; **** – $p \leq 0,05$ у порівнянні з карцинома LL + еноксапарин.

Результати даних табл. 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3 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 [153].

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

Зазначені показники порівнювали між групами дослідних тварин у відповідності до кожного експерименту.

Нами було визначено, що на 28-ий день дослідження щодо вивчення антиметастатичної активності сулодексиду, у легенях мишей-самців C₅₇BL/6 із перещепленою карциномою LL без лікування, при наявності метастазів у легенях ($6,71 \pm 2,14$), відмічалось значне зниження кількості тромбоцитів на 54,63 %, тромбокриту – 48,0 % та збільшення відсотку відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом на 16,41 %. При застосуванні сулодексиду, як монотерапії, який на 63,79 % гальмував утворення метастазів у легенях, відмічається збільшення кількості тромбоцитів на 15,88 %, тромбокриту - 7,69 %, зменшення відсотку відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом на 1,80%.

Кількість тромбоцитів у крові дослідних тварин та тромбоцитарні індекси при курсовому введенні сулодексиду (гальмування утворення метастазів у легенях на 97,42 %) у поєднанні з цисплатином були на рівні контрольної групи тварин без пухлин.

У експерименті щодо вивчення антиметастатичної активності еноксапарину у дослідних мишей з карциномою LL без лікування та наявності метастазів у легенях ($6,57 \pm 0,94$) відмічалось значне зниження

кількості тромбоцитів на 57,21 %, тромбокрити – 58,33 % та збільшення відсотку відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом на 41,65 %.

За умов уведення еноксапарину, який гальмував утворення метастазів у легень на 60,88 %, відмічене збільшення кількості тромбоцитів на 34,81 %, тромбокрити на 32,0 %, зменшення відсотку відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом на 15,21% у порівнянні з групою мишей з карциномою LL без лікування. Терапія еноксапарином у поєднанні з цисплатином не мала достовірних відмінностей з зазначеним показником у дослідних мишей, які отримували одноразово цисплатин, як монотерапію (гальмування утворення метастазів у легенях на 36,83 %), відсоток відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом був достовірно підвищений до $36,03 \pm 7,37$ % у порівнянні із зазначеним показником контрольної групи мишей без пухлин.

Отже, на підставі проведених досліджень встановлено вірогідне зниження загальної кількості тромбоцитів, відсотку тромбокрити 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), відмічене взаємозв'язок з прогресуванням метастазуванням карциноми LL. Зазначений показник підвищувався на 15,21-41,65 % та може бути предиктором метастазування у онкологічних хворих [154, 155].

Резюме

Аналіз отриманих даних виявив зміни відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом, які пов'язані з прогресуванням метастазування карциноми легень Льюїс. Зазначений показник підвищувався на 15,21–41,65 % на фоні утворення метастазів у легенях мишей, однак, на фоні первинного пухлинного росту цей показник не змінювався відносно контрольних тварин. Отримані дані можуть бути підставою щодо створення

додаткових діагностичних критеріїв та забезпечать більш ранню та достовірну діагностику прогресування онкологічного процесу щодо скринінгу рецидивів та вторинних злоякісних новоутворень.

Матеріали даного розділу відображені в наступни публікаціях:

1. 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. *Вісник проблем біології та медицини*. 2025. Вип. 1, №176. С. 116-127. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2025-1-176-116-127>

3.2.2. Коагулометричні дослідження

3.2.2.1. Коагуляційна активність цільної крові за методом Моравіца

На тлі пухлинної прогресії спостерігаються порушення зсідання крові такі, як гіперкоагуляція та дезорганізований ангіогенез. Це викликає тромбоз і знижує швидкість внутрішньопухлинної перфузії та доставки протипухлинних препаратів за рахунок зменшення ефективної площі поперечного перерізу кровоносних судин [156]. Час зсідання крові за методом Моравіца [130], 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 нами було проведено дослідження часу зсідання крові у всіх дослідних мишей до перещеплення пухлинних клітин, на 14-ий і 28-ий день експерименту, що дало змогу оцінити у динаміці вплив метастатичної прогресії карциноми LL на коагуляційну активність крові та визначити ефекти антикоагулянтів прямої дії сулодексиду у дозі 2,0 мг/кг та еноксапарину у дозі 10,0 мг/кг, як монотерапії, так і на фоні застосування цитостатика – цисплатину за умов одноразового уведення у дозі 6,0 мг/кг (рис. 3.1; 3.2; 3.3).

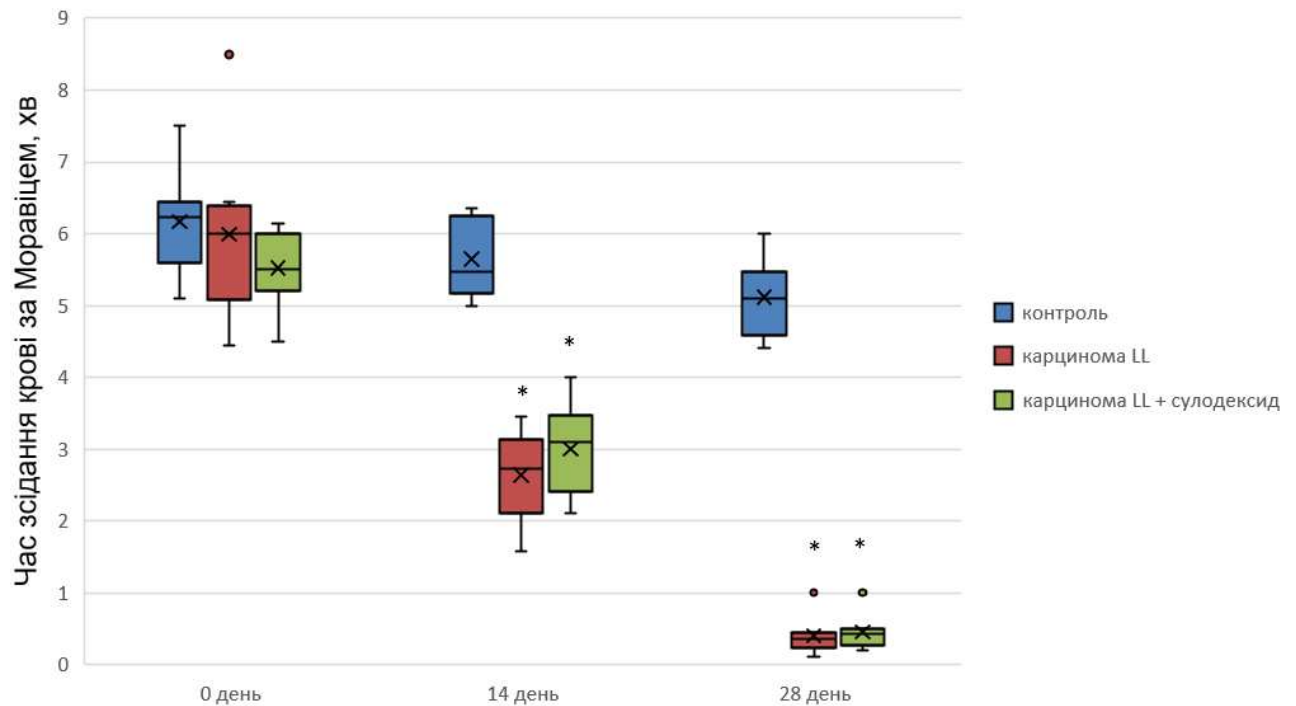


Рис. 3.1 Динаміка змін часу зсідання крові мишей-самців $C_{57}BL/6$ із перещепленою карциномою LL та за умов курсового введення сулодексиду.

Примітка: контроль – миші-самці $C_{57}BL/6$ без пухлини ($n = 8$); карцинома LL – миші-самці $C_{57}BL/6$ з перещепленою карциномою LL ($n = 7$); карцинома LL + сулодексид – миші-самці $C_{57}BL/6$ з перещепленою карциномою LL та за умов курсового введення сулодексиду у дозі 2,0 мг/кг ($n = 7$).

* – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою тварин.

Виявлені нами зміни часу зсідання крові дослідних тварин із карциномою LL на 14-ий день дослідження свідчать про підвищення коагуляційної активності цільної крові від $2,64 \pm 0,23$ хв до $3,41 \pm 0,30$ хв, а скорочення часу зсідання крові від $0,40 \pm 0,10$ хв до $0,81 \pm 0,25$ хв на 28-ий день досліду свідчить про гіперкоагуляцію (рис. 3.1; 3.2; 3.3). У контрольних тварин (без пухлин) цей показник становив від $5,12 \pm 0,19$ хв до $5,96 \pm 0,47$ хв. Курсове введення сулодексиду у дозі 2,0 мг/кг, як монотерапія, не сприяло корекції зазначених показників, вони були на рівні групи дослідних мишей з карциномою LL без лікування.

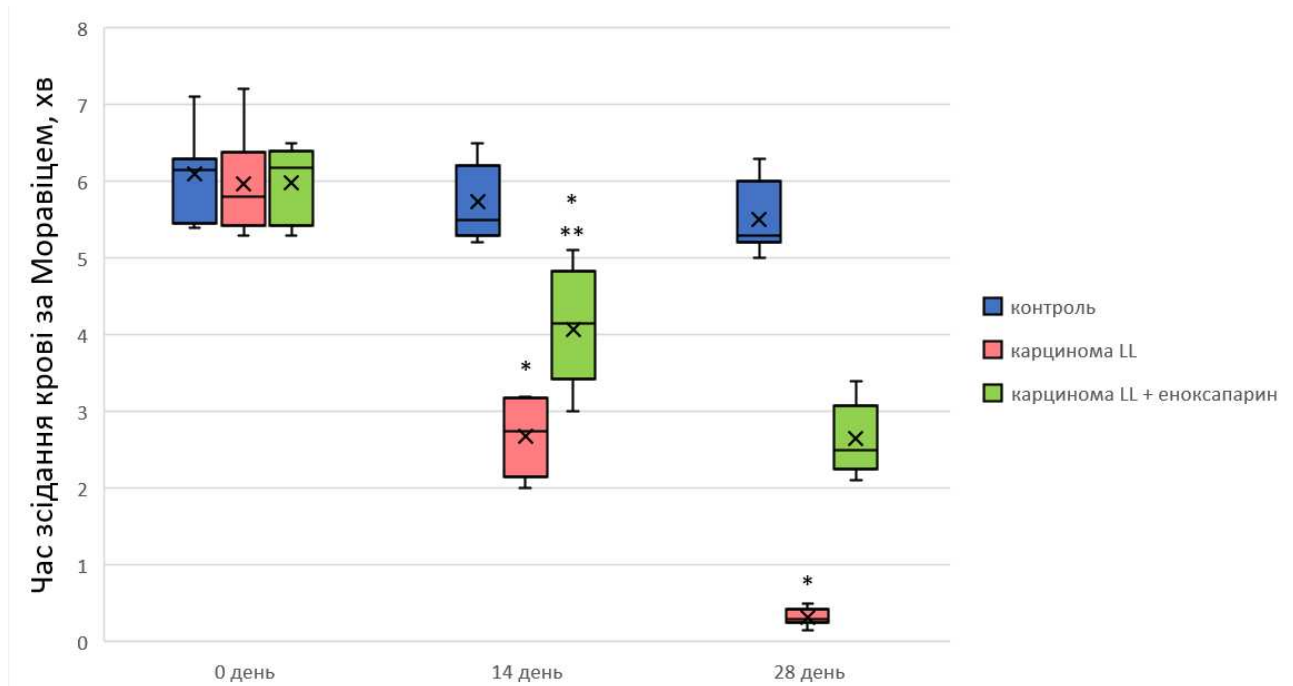


Рис. 3.2 Динаміка змін часу зсідання крові мишей-самців $C_{57}BL/6$ із перещепленою карциномою LL та за умов курсового введення еноксапарину.

Примітка: контроль – миші-самці $C_{57}BL/6$ без пухлини ($n=7$); карцинома LL – миші-самці $C_{57}BL/6$ з перещепленою карциномою LL ($n=7$); карцинома LL + еноксапарин – миші-самці $C_{57}BL/6$ із перещепленою карциномою LL та за умов курсового введення еноксапарину у дозі 10,0 мг/кг ($n=7$).

* – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контролем.

** – $p \leq 0,05$ у порівнянні з карциномою LL.

За умов введення еноксапарину у дозі 10,0 мг/кг на 14-ий день досліджу час зсідання крові становив – $4,08 \pm 0,26$ хв, на 28-ий день – $2,65 \pm 0,16$ хв (рис. 3.2). Отже, еноксапарин коригував скорочення часу зсідання крові у тварин із карциномою LL. Ймовірно, цей ефект обумовлений антитромбічними та протизапальними властивостями еноксапарину.

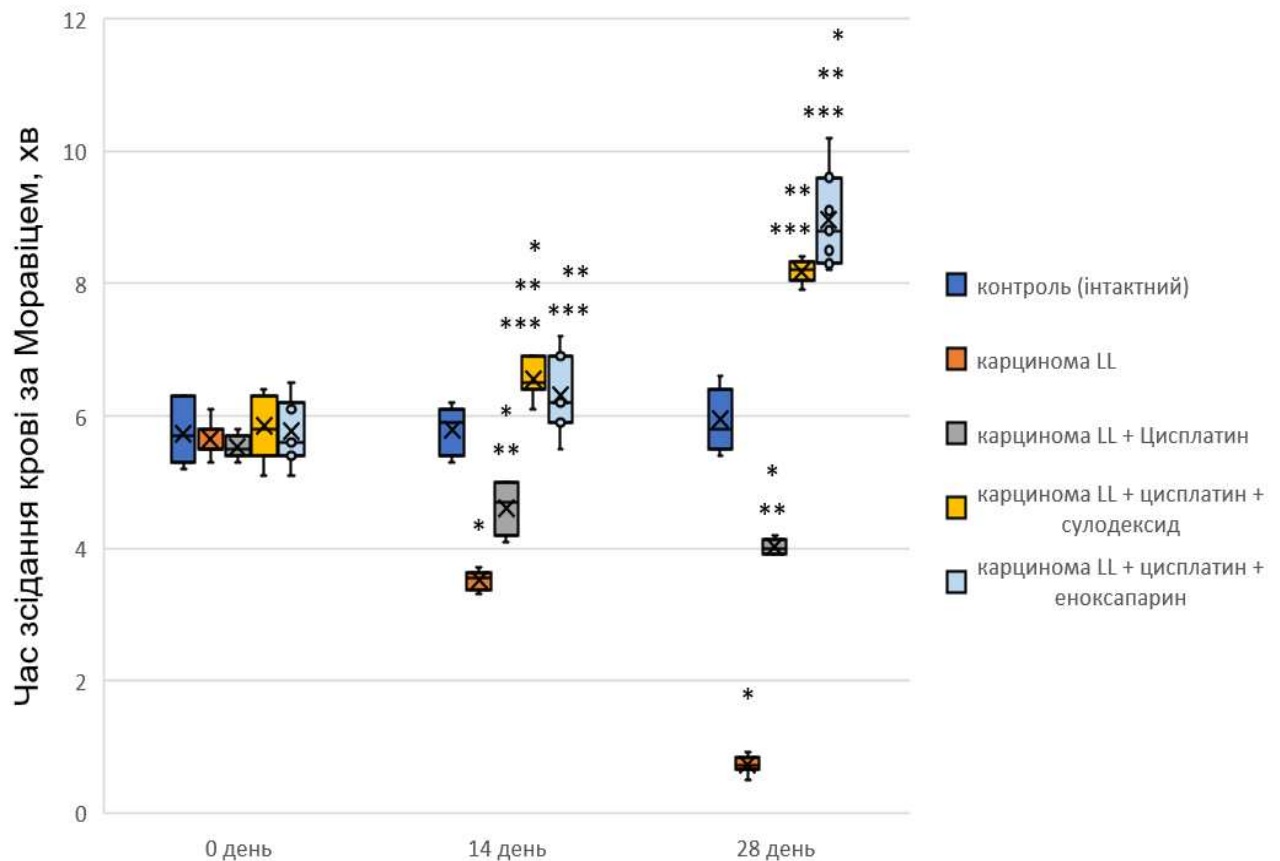


Рис. 3.3 Динаміка змін часу зсідання крові мишей-самців $C_{57}Bl/6$ із перещепленою карциномою LL та за умов курсового введення сулодексиду та еноксапарину на фоні застосування цисплатину.

Примітка: контроль – миші-самці $C_{57}Bl/6$ без пухлини ($n=7$); карцинома LL – миші-самці $C_{57}Bl/6$ із перещепленою карциномою LL ($n=7$); карцинома LL + цисплатин – миші-самці $C_{57}Bl/6$ із перещепленою карциномою LL та за умов введення цисплатину у дозі 6,0 мг/кг, одноразово ($n=7$), карцинома LL + цисплатин + сулодексид – миші-самці $C_{57}Bl/6$ із перещепленою карциномою LL та за умов курсового введення сулодексиду 2,0 мг/кг у поєднанні з цисплатином у дозі 6,0 мг/кг, одноразово ($n=7$); карцинома LL + цисплатин + еноксапарин – миші-самці $C_{57}Bl/6$ із перещепленою карциномою LL та за умов курсового введення еноксапарину у дозі 10,0 мг/кг у поєднанні з цисплатином у дозі 6,0 мг/кг, одноразово ($n=7$); * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контролем; ** – $p \leq 0,05$ у порівнянні з карциномою LL; *** – $p \leq 0,05$ у порівнянні з карцинома LL + цисплатин.

Серед механізмів анти-тромбічного 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 [121].

Ці фактори роблять свій внесок у загальний антитромбічний ефект еноксапарину.

При застосуванні цисплатину одноразово у дозі 6,0 мг/кг на 14 день дослідження час зсідання крові дослідних тварин становив $4,60 \pm 0,37$ хв, а на 28 день – $3,94 \pm 0,22$ хв. При курсовому введенні сулодексиду та еноксапарину на фоні застосування цисплатину, на 14 день дослідження, час зсідання становив $6,56 \pm 0,29$ хв та $6,31 \pm 0,58$ хв, на 28 день експерименту, $8,20(8,1;8,4)$ хв, $8,96 \pm 0,73$ хв, відповідно (рис. 3.3). Аналіз отриманих даних демонструє, що терапія сулодексидом та еноксапарином у поєднанні з цисплатином суттєво збільшує час зсідання крові у дослідних тварин порівняно з тваринами з карциномою LL та тваринами, які отримували одноразово цисплатин, та не мав достовірних відмінностей від зазначених показників тварин контрольної групи.

3.2.2.2 Визначення вмісту фібриногену, протромбінового часу, антитромбіну III

Для оцінки взаємозв'язку порушень у системі гемостазу дослідних мишей з метастазуванням карциноми LL було проведено дослідження деяких показників системи зсідання крові. У інтактних мишей, з перещепленою карциномою LL та за умов курсового введення антикоагулянтів сулодексиду та еноксапарину на фоні застосування цисплатину було визначено вміст фібриногену, протромбіновий час та активність антитромбіну III у плазмі крові.

Визначення фібриногену (рис. 3.4). **Фібриноген** є першим (I) фактором зсідання плазми крові – перетворення фібриногену в фібрин під дією тромбіну є заключним етапом формування згустку. Також фібриноген бере

участь в агрегації тромбоцитів, визначає в'язкість крові і впливає на взаємодію формених елементів крові з судинною стінкою [157]. Окрім того цей білок підвищується внаслідок запальної реакції, спричиненої пухлиною.

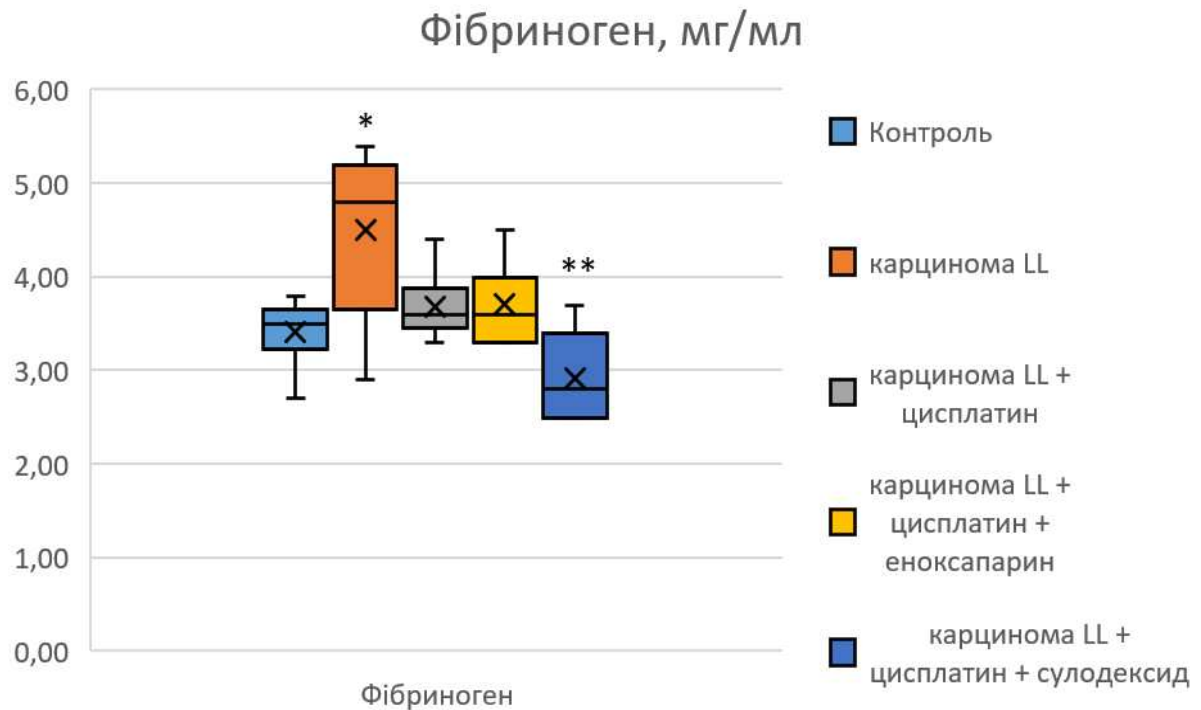


Рис. 3.4 Вміст фібриногену у плазмі крові мишей-самців C₅₇BL/6 із перещепленою карциномою LL та за умов уведення сулодексиду та еноксапарину на фоні застосування цисплатину.

Примітка: контроль – миші-самці C₅₇BL/6 без пухлини (n=6); карцинома LL – миші-самці C₅₇BL/6 із перещепленою карциномою LL (n=5); карцинома LL + цисплатин – миші-самці C₅₇BL/6 із перещепленою карциномою LL та за умов уведення цисплатину у дозі 6,0 мг/кг, одноразово (n=6); карцинома LL + цисплатин + еноксапарин – миші-самці C₅₇BL/6 із перещепленою карциномою LL та за умов курсового уведення еноксапарину у дозі 10,0 мг/кг у поєднанні з цисплатином у дозі 6,0 мг/кг, одноразово (n=5); карцинома LL + цисплатин + сулодексид – тварини із перещепленою карциномою LL та за умов курсового уведення сулодексиду 2,0 мг/кг у поєднанні з цисплатином у дозі 6,0 мг/кг, одноразово (n=5); * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контролем; ** – $p \leq 0,05$ у порівнянні з карциномою LL.

Вміст фібриногену у плазмі крові тварин, які не отримували лікування, на тлі пухлинної та метастатичної прогресії карциноми LL достовірно підвищувався – $4,50 \pm 0,96$ мг/мл у порівнянні з даним показником контрольних мишей – $3,42 \pm 0,38$ мг/мл. При застосуванні цисплатину, та курсового уведення сулодексиду та еноксапарину вміст фібриногену був на рівні контрольної групи тварин – $3,68 \pm 0,38$ мг/мл; $2,92 \pm 0,50$ мг/мл; $3,84 \pm 0,45$ мг/мл, відповідно.

Визначення протромбінового часу (рис .3.5). Протромбіновий час (ПЧ) – показник, що дозволяє оцінити систему зсідання крові. Це час, за який відбувається утворення згустку крові. Дослідження відображає активність факторів зсідання, які беруть участь у зовнішньому шляху коагуляції, включаючи фактори I (фібриноген), II (протромбін), V, VII і X. При визначенні протромбінового часу в плазмі крові експериментальних мишей було встановлено суттєве зниження до 12 (11; 12) с даного показника у мишей з масивними метастазами у легенях.

Знижений ПЧ свідчить про підвищену здатність крові до утворення згустків (гіперкоагуляція) та підвищений ризик тромбоутворення. При застосуванні цисплатину ($14,13 \pm 1,13$ с), курсового уведення сулодексиду ($18(18;19)$ с), та еноксапарину ($18,17 \pm 2,04$ с) ПЧ був на рівні контрольної групи тварин ($16,33 \pm 1,75$ с) .

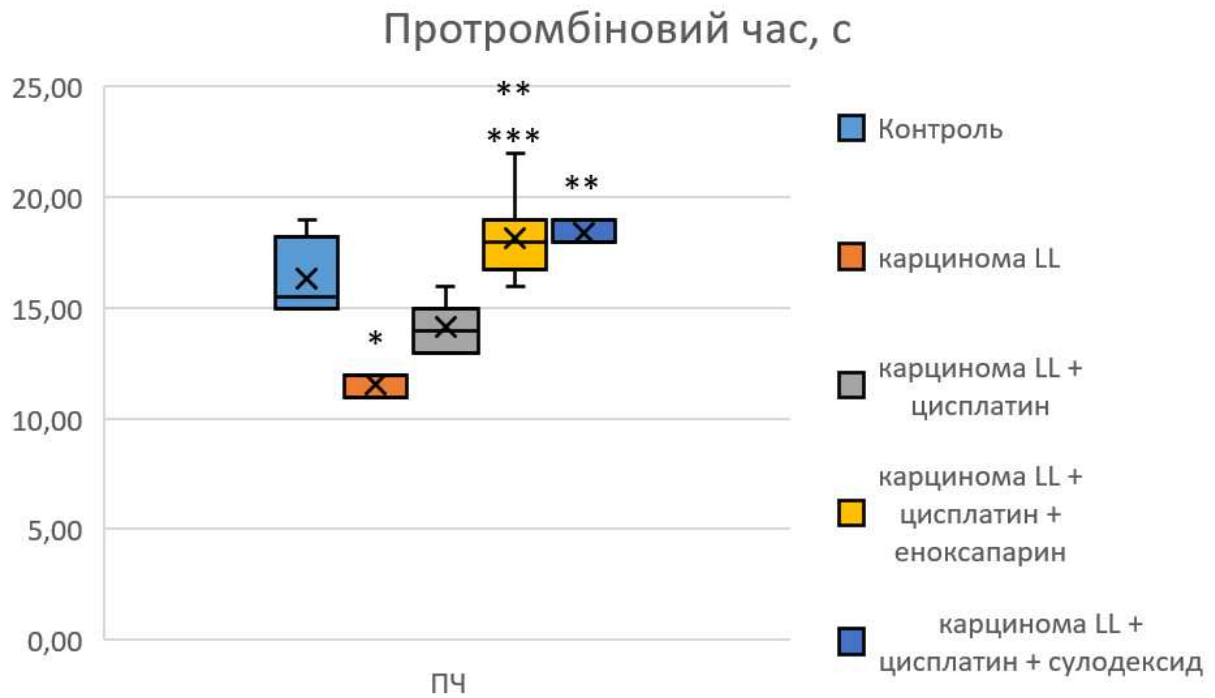


Рис. 3.5 Протромбіновий час у плазмі крові мишей-самців $C_{57}Bl/6$ із перещепленою карциномою LL та за умов уведення сулодексиду та еноксапарину на фоні застосування цисплатину.

Примітка: контроль – миші-самці $C_{57}Bl/6$ без пухлини ($n=6$); карцинома LL – миші-самці $C_{57}Bl/6$ із перещепленою карциномою LL ($n=5$); карцинома LL + цисплатин – миші-самці $C_{57}Bl/6$ із перещепленою карциномою LL та за умов уведення цисплатину у дозі 6,0 мг/кг, одноразово ($n=7$); карцинома LL + цисплатин + еноксапарин – миші-самці $C_{57}Bl/6$ із перещепленою карциномою LL та за умов курсового уведення еноксапарину у дозі 10,0 мг/кг у поєднанні з цисплатином у дозі 6,0 мг/кг, одноразово ($n=6$); карцинома LL + цисплатин + сулодексид – миші-самці $C_{57}Bl/6$ із перещепленою карциномою LL та за умов курсового уведення сулодексиду 2,0 мг/кг у поєднанні з цисплатином у дозі 6,0 мг/кг, одноразово ($n=5$); * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контролем; ** – $p \leq 0,05$ у порівнянні з карциномою LL; *** – $p \leq 0,05$ у порівнянні з карциномою LL + цисплатин.

Визначення активності антитромбіну III (рис .3.6). Антитромбін III - це специфічний білок антикоагуляційної системи плазми крові, серинова

протеаза, джерелом синтезу якої є судинний ендотелій та гепатоцити печінки.

В комплексі з гепарином він інактивує тромбін та інші фактори зсідання, забезпечуючи таким чином потужній антикоагуляційний ефект [34].

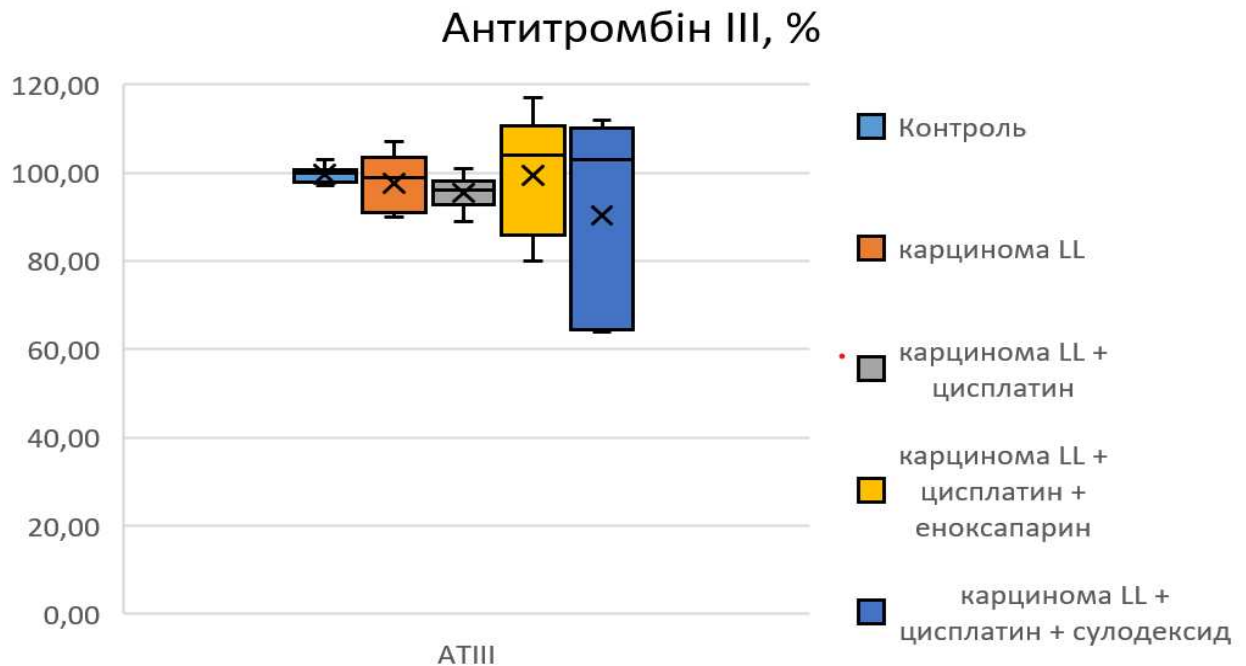


Рис. 3.6 Активність антитромбіну III у плазмі крові мишей-самців C₅₇Bl/6 із перещепленою карциномою LL та за умов уведення сулодексиду та еноксапарину на фоні застосування цисплатину.

Примітка: контроль – миші-самці C₅₇Bl/6 без пухлини (n=6); карцинома LL – миші-самці C₅₇Bl/6 із перещепленою карциномою LL (n=5); карцинома LL + цисплатин – миші-самці C₅₇Bl/6 із перещепленою карциномою LL та за умов уведення цисплатину у дозі 6,0 мг/кг, одноразово (n = 6); карцинома LL + цисплатин + еноксапарин – миші-самці C₅₇Bl/6 із перещепленою карциномою LL та за умов курсового уведення еноксапарину у дозі 10,0 мг/кг у поєднанні з цисплатином у дозі 6,0 мг/кг, одноразово (n = 5); карцинома LL + цисплатин + сулодексид – миші-самці C₅₇Bl/6 із перещепленою карциномою LL та за умов курсового уведення сулодексиду 2,0 мг/кг у поєднанні з цисплатином у дозі 6,0 мг/кг, одноразово (n = 5);

При визначенні відсотку антитромбіну ІІІ у плазмі крові дослідних мишей, достовірних відмінностей зазначеного показника між експериментальними групами не відмічалось (рис .3.6).

Отримані нами дані узгоджуються з даними великої кількості досліджень, які свідчать, що внаслідок порушення балансу у системі гемостазу, на тлі злоякісного пухлинного росту, виникають відкладення фібрину у судинній системі, стабілізуючи адгезію пухлинних клітин або емболів, асоційованих з пухлинними клітинами, до ендотелію, що сприяє метастазуванню пухлини. Крім того, фібриновий матрикс пов'язує та секвеструє ряд факторів росту (bFGF, VEGF та інсуліноподібний фактор росту-1) та захищає їх від протеолітичної деградації [158].

Резюме

Дослідження тромбоцитарної ланки гемостазу, коагуляційної активності крові дослідних тварин показали, що на тлі метастазуючого пухлинного росту карциноми легень Льюїса розвивається гіперкоагуляція - скорочення часу зсідання крові до $0,81 \pm 0,25$ хв та тромбоцитопенія - кількість тромбоцитів у крові знижувалась на 55 – 57 %. У контрольних тварин (без пухлини) цей показник становив від $5,12 \pm 0,19$ хв до $5,96 \pm 0,47$ хв, кількість тромбоцитів була на рівні від $802,75 \pm 116,48$ до $802,75 \pm 116,48$ ($10^3/\text{мкл}$). Вміст фібриногену у плазмі крові тварин, достовірно підвищувався до $4,50 \pm 0,96$ мг/мл у порівнянні з даним показником контрольних мишей – $3,42 \pm 0,38$ мг/мл. При визначенні протромбінового часу було встановлено суттєве зниження до 12 (11; 12) с даного показника у мишей з масивними метастазами у легенях. Протромбіновий час контрольної групи тварин становив – 16,33 с. Монотерапія цисплатином у дозі 6,0 мг/кг, одноразово, супроводжувалась збільшенням часу зсідання крові у 4,9 рази та підвищенням кількості тромбоцитів у крові дослідних мишей у 1,7 рази у порівнянні з зазначеними

показниками тварин з перещепленою карциномою Льюїса. Вміст фібриногену та протромбіновий час достовірно не відрізнялись від зазначених показників мишей контрольної групи. Водночас терапія сулодексидом у дозі 2,0 мг/кг, протягом 20 днів та еноксапарином у дозі 10,0 мг/кг, протягом 20 днів, на фоні застосування з цисплатином у дозі 6,0 мг/кг, одноразово, супроводжувалась достовірним збільшенням часу зсідання крові на 10,12 - 11,10 разів, відповідно. Кількість тромбоцитів у крові дослідних тварин при застосуванні сулодексиду у поєднанні з цисплатином була на рівні контрольної групи тварин без пухлин. Терапія еноксапарином у поєднанні з цисплатином не мала достовірних відмінностей у порівнянні з зазначеним показником у дослідних мишей, які отримували одноразово цисплатин, як монотерапію.

Матеріали даного розділу відображені в наступних публікаціях:

1. Мунько М.А. Вплив антикоагулянта прямої дії еноксапарину на метастатичну активність карциноми легень Льюїс. Вісник проблем біології та медицини. 2024. Вип. 1, №172. С. 194-203. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2024-1-172-194-203>

2. Мунько М.А., Карацуба Т.А. Метастатична активність карциноми легень Льюїс за впливу антикоагулянтів прямої дії на тромбоцитарний гемостаз і коагуляційну активність крові. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2024. № 3 т. 18. С. 175-184. <https://doi.org/10.33250/18.03.175>

3. Мунько М.А., Карацуба Т.А. Особливості змін гематологічних показників крові мишей С₅₇Вl/6 на тлі первинного пухлинного росту та метастатичної прогресії карциноми легень Льюїс. *Вісник проблем біології та медицини*. 2025. Вип. 1, №176. С. 116-127. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2025-1-176-116-127>

4. Мунько М.А. Фармакологічна модуляція первинного пухлинного росту та метастатичної прогресії карциноми легень Льюїс антикоагулянтами прямої

дії на фоні застосування цисплатину. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2025. № 3 т. 19. С. 249-257. <https://doi.org/10.33250/19.03.249>

3.3 Морфологічні дослідження

3.3.1 Масові коефіцієнти легень та селезінки

Розрахунки масових коефіцієнтів легень та селезінки, як інтегральних показників, дали змогу оцінити стан легень, як органу-мішені, та селезінки, яка є органом, що регулює кровотворення. Тому на 14-ий та 28-ий день експерименту, після евтаназії, була проведена аутопсія дослідних тварин. Були вилучені та зважені легені та селезінка. Результати статистичного аналізу отриманих даних наведено в табл. 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3, 3.3.4.

Таблиця 3.3.1

Масові коефіцієнти легень та селезінки мишей-самців C₅₇Bl/6 із перещепленою карциномою легень Льюїса у концентрації $2 \cdot 10^6$ клітин на 14-ий день експерименту ($M \pm m$, $n = 7$)

Дослідні групи	Масові коефіцієнти, %	
	органи	
	Легені	Селезінка
Контроль (інтактні тварини)	0,74±0,04	0,53±0,07
Карцинома LL	0,81±0,02*	0,60±0,03*

Примітка: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з показниками контрольної групи тварин.

Масові коефіцієнти легень та селезінки мишей-самців C₅₇Bl/6, у легенях яких на тлі первинного пухлинного росту карциноми LL на 14-ий день дослідження не відмічались метастази, мали незначні але достовірні відмінності від зазначених показників тварин контрольної групи.

Таблиця 3.3.2

Масові коефіцієнти легень та селезінки мишей-самців C₅₇Bl/6 із перещепленою карциномою легень Льюїса на 28-ий день дослідження за умов уведення сулодексиду ($M \pm m$ або [Me (25%; 75 %)], n = 7)

Дослідні групи	Масові коефіцієнти, %	
	органи	
	Легені	Селезінка
Контроль	0,81±0,13	0,42±0,07
Карцинома LL	1,03±0,27	0,98±0,29*
Карцинома LL + сулодексид	0,94±0,25	1,2(0,87;1,26)*

Примітка: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з показниками контрольної групи тварин.

Таблиця 3.3.3

Масові коефіцієнти легень та селезінки мишей-самців C₅₇Bl/6 із перещепленою карциномою легень Льюїса на 28-ий день дослідження за умов уведення еноксапарину ($M \pm m$, n = 7)

Дослідні групи	Масові коефіцієнти, %	
	органи	
	Легені	Селезінка
Контроль	0,64±0,08	0,52±0,16
Карцинома LL	0,84±0,16*	0,92±0,21*
Карцинома LL + еноксапарин	0,86±0,11*	1,01±0,17*

Примітка: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з показниками контрольної групи тварин

На 28-ий день експерименту у дослідних мишей на тлі метастатичної прогресії карциноми LL та за умов уведення сулодексиду та еноксапарину, як монотерапії, відмічали збільшення масових коефіцієнтів легень та селезінки у порівнянні з відповідними показниками контрольних тварин без пухлин.

Таблиця 3.3.4

Масові коефіцієнти легень та селезінки мишей-самців C₅₇Bl/6 із перещепленою карциномою легень Льюїса на 28-ий день дослідження за умов уведення сулодексиду й еноксапарину на фоні застосування цисплатину (M ± m або [Me (25%; 75 %)], n = 7)

Дослідні групи	Масові коефіцієнти, %	
	органи	
	Легені	Селезінка
Контроль	0,74±0,04	0,53±0,07
Карцинома LL	1,14 (1,1;1,16)*	0,95 (0,9;1,0)*
Карцинома LL + цисплатин	0,91±0,04*	0,76±0,06
Карцинома LL + цисплатин+ сулодексид	0,87±0,05**	0,78±0,04
Карцинома LL + цисплатин+ еноксапарин	0,88±0,06**	0,80±0,05*

Примітка: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з показниками контрольної групи тварин;

** – $p \leq 0,05$ у порівнянні з показниками тварин з карциномою LL.

При застосуванні цисплатину, як монопрепарату, не відмічається змін масового коефіцієнту легенів, у порівнянні з зазначеним показником тварин з перещепленою карциномою LL без лікування. У групах тварин, яким вводили сулодексид та еноксапарин на фоні застосування цисплатину масові коефіцієнти легень не мали достовірних відмінностей від даного показника контрольної групи. Достовірне збільшення масового коефіцієнту селезінки відмічається тільки у тварин, яким вводили еноксапарин на фоні застосування цисплатину.

3.3.2 Макроскопічні дослідження

Проведено макроскопічні дослідження легень та селезінки експериментальних мишей – самців C₅₇Bl/6 із перещепленою карциномою LL у концентрації $2 \cdot 10^6$ клітин, евтаназією на 14-ий день дослідження та перещепленням $3 \cdot 10^5$ клітин на 28-ий день дослідження, за умов уведення, як монотерапії, сулодексиду у дозі 2,0 мг/кг, протягом 20 днів, еноксапарину у дозі 10,0 мг/кг, протягом 20 днів, відповідно; цисплатину у дозі 6,0 мг/кг, одноразово та за умов уведення сулодексиду та еноксапарину на фоні застосування цисплатину у вищезазначених дозах та режимах.

Легені. Тканина легень інтактних тварин однорідна, пухкої консистенції, на розрізі – блідо-рожевого кольору. Ознак нерівномірного кровонаповнення, ділянок ателектазу в долях легень не спостерігалось. У легенях дослідних мишей із перещепленою карциномою LL у концентрації $2 \cdot 10^6$ клітин на 14-ий день дослідження об'єм пухлини становив $- 4,11 \pm 0,06$ см³, при цьому метастази у легенях не візуалізувались, при макроскопічному дослідженні не мали відмінностей від інтактних тварин. У дослідних мишей із перещепленою карциномою LL у концентрації $3 \cdot 10^5$ клітин щодо моделювання процесу метастазування на 28-ий день експерименту в легенях виявлялись дрібні та масивні метастази ($d \leq 3$ мм). За умов уведення сулодексиду та еноксапарину, як монотерапії, у легенях тварин спостерігались дрібні метастази ($d \leq 1$ мм).

У легенях мишей які отримували монотерапію цисплатиною у дозі 6,0 мг/кг одноразово виявлялись дрібні метастази ($d \leq 1$ мм). Локалізація метастазів була різною, переважно вони розташовувались в легеневій паренхімі.

При застосуванні сулодексиду у дозі 2,0 мг/кг, на фоні цисплатину, у однієї тварини виявлено один метастаз у аваскулярній фазі ($d < 0,5$ мм). При застосуванні еноксапарину у дозі 10,0 мг/кг на фоні цисплатину у легенях

дослідних мишей дрібні метастази ($d \leq 1$ мм) визначали у трьох з семи тварин.

Селезінка. Селезінка інтактних тварин звичайних розмірів, еластичної консистенції, тканина однорідна, червонувато-вишневого кольору, капсула гладенька, без порушень. Макроскопічна структура селезінки дослідних мишей з перещепленою карциномою LL у концентрації $2 \cdot 10^6$ клітин на 14-ий день дослідження притаманна інтактним тваринам, без проявів альтеративних змін, гемодинамічних порушень, атрофії чи гіперплазії, але масовий коефіцієнт органу вже достовірно збільшений (табл. 3.3.1) При макроскопічному дослідженні селезінки мишей всіх дослідних груп з перещепленою карциномою LL у концентрації $3 \cdot 10^5$ клітин на тлі пухлинного росту та наявності метастазів у легенях на 28-ий день експерименту спостерігається гіпертрофія органу та збільшення масового коефіцієнту.

3.3.3 Мікроскопічні дослідження

Об'єктом гістологічного дослідження слугували легені та селезінка інтактних мишей-самців $C_{57}Bl/6$ із перещепленою карциномою LL у концентрації $2 \cdot 10^6$ клітин на 14-ий день дослідження та у концентрації $3 \cdot 10^5$ клітин на 28-ий день дослідження за умов введення цисплатину 6,0 мг/кг, одноразово, та за умов уведення сулодексиду 2,0 мг/кг й еноксапарину 10,0 мг/кг, протягом 20 днів на фоні застосування цисплатину 6,0 мг/кг.

Легені Тканина легень інтактних тварин, здебільшого, повітряна, тонкостінні альвеоли з вільними просвітом, розділені між собою тонкими прошарками сполучної тканини, їх внутрішня поверхня вистелена одношаровим плоским епітелієм, розташованим на базальній мембрані, до якої прилягають кровоносні капіляри (рис. 3.7).

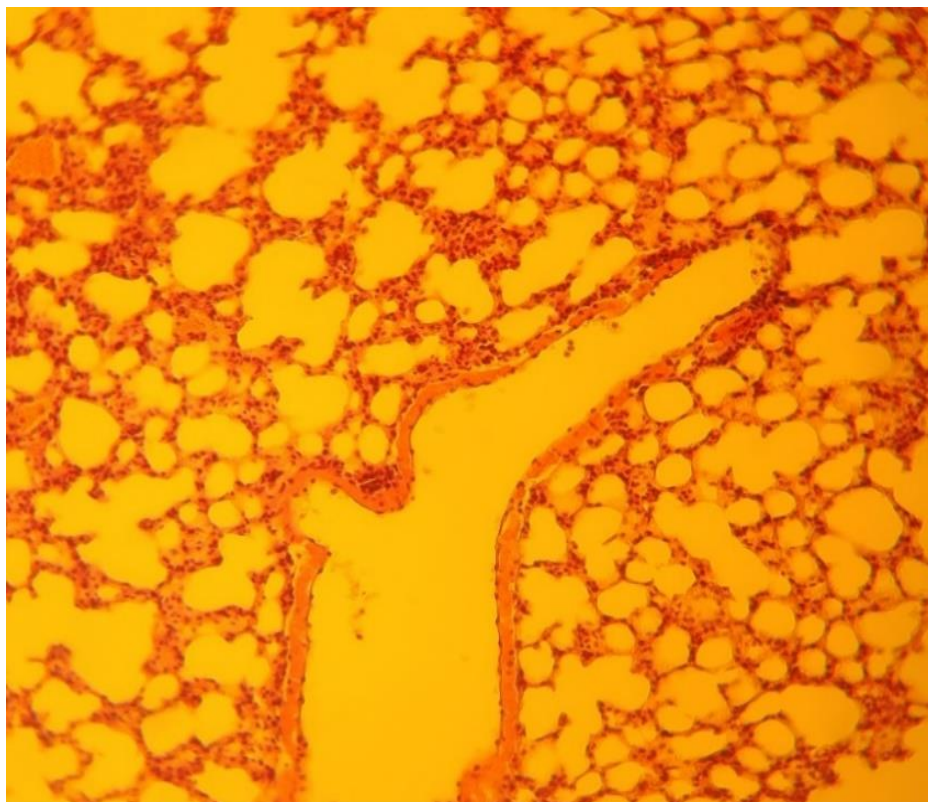


Рис. 3.7 – Тканина легень контрольної (інтактної) миші - самця C₅₇Bl/6. По центру видно кровоносну судину. Забарвлення гематоксиліном і еозином x200

При макроскопічному та гістологічних дослідженнях у тварин із перещепленою карциномою LL на 14-ий день дослідження метастази у легенях не візуалізувались. Але спостерігались вогнища ателектазу при якому внаслідок закриття просвіту бронхів відбувається спадання легеневих сегментів, що може блокувати надходження повітря у певну частину легенів, викликаючи її колапс і виключаючи з газообміну. Цей стан може бути однією з перших ознак утворення метастазів у легенях та призводить до таких ускладнень, як дихальна недостатність. Спостерігаються перибронхіальні лімфоїдні інфільтрати (рис. 3.8).

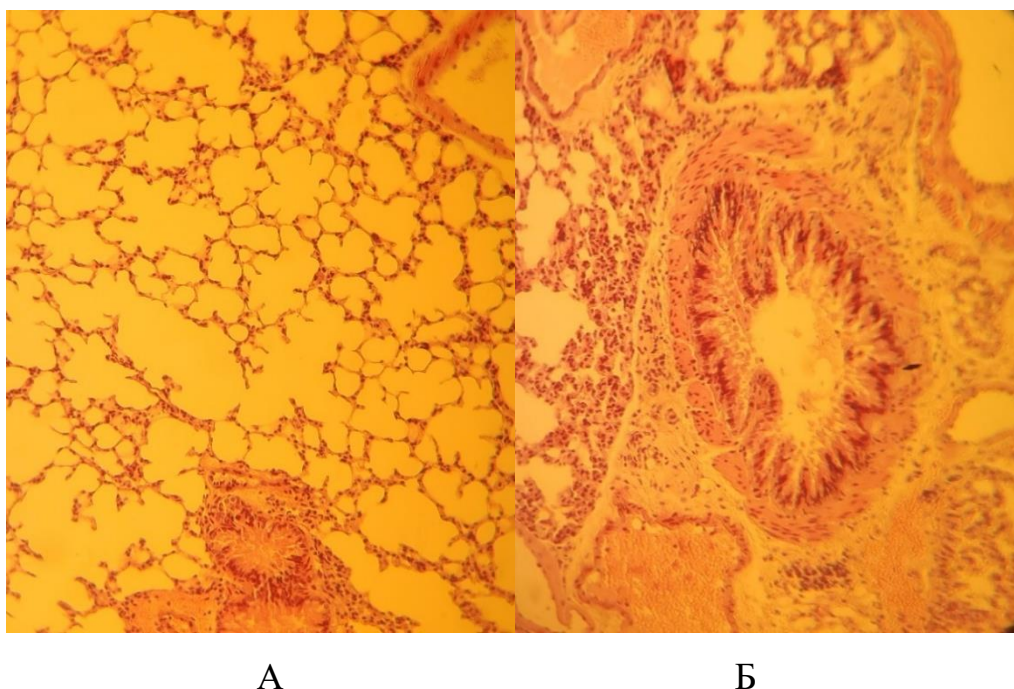


Рис. 3.8 – Легені миші-самця C₅₇Bl/6 із перещепленою карциномою LL у концентрації $2 \cdot 10^6$ клітин на 14-ий день дослідження. А – вогнища ателектазу в бронхах x100; Б – потовщення стінок судин легень x200. Забарвлення гематоксиліном і еозином.

У тварин із перещепленою карциномою LL без лікування, на 28-ий день дослідження в легенях виявлялись дрібні та масивні метастази. Локалізація метастазів була різною, переважно вони розташовувались в легеневій паренхімі. Тканина дрібних метастазів представлена незначним числом поліморфних, атипових пухлинних клітин, зустрічались клітини з великими гіперхромними ядрами. Масивні метастази утворені значним скупченням поліморфних, атипових пухлинних клітин у яких нерідко спостерігались мітози. В пухлинній тканині, як дрібних так і в масивних метастазах легень не виявлялось осередків некрозу, перифокально не відмічалось запальної інфільтрації. Кількість вогнищ ателектазу збільшилось. Імунна реакція на метастазування відсутня, не спостерігаються лімфоїдні інфільтрати (рис. 3.9).

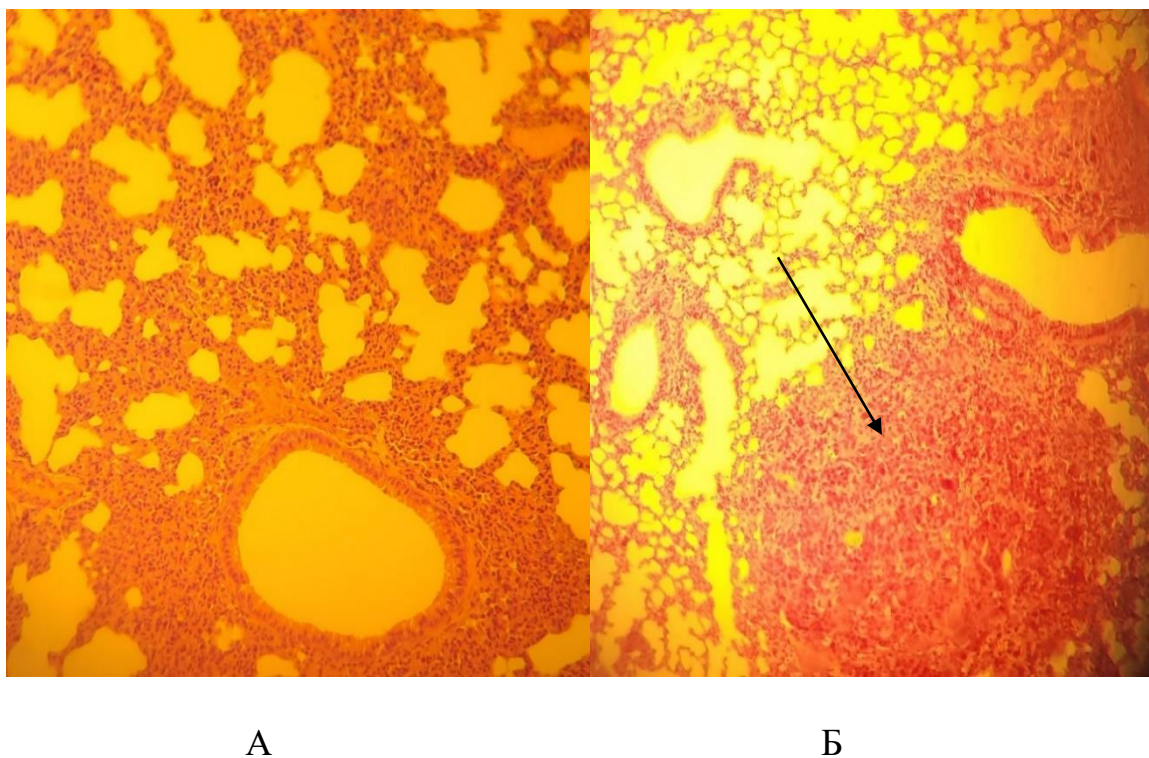


Рис. 3.9 – Легені миші-самця C₅₇Bl/6 з перещепленою карциномою LL у концентрації $3 \cdot 10^5$ клітин на 28-ий день дослідження. А – вогнища ателектазу; Б – масивний метастаз (позначено чорною стрілкою). Забарвлення гематоксиліном і еозином x100

На фоні одноразового введення цисплатину у дозі 6,0 мг/кг у легенях дослідних мишей на 28-ий день дослідження виявлялись дрібні метастази. Локалізація метастазів була різною, переважно вони розташовувались в легеневій паренхімі. Тканина дрібних метастазів представлена незначним числом поліморфних, атипових пухлинних клітин (рис. 3.10).

При застосуванні сулодексиду 2,0 мг/кг на фоні застосування цисплатину 6,0 мг/кг на 28-ий день дослідження у легенях дослідних мишей відмічаються вогнища ателектазу, осередкові периваскулярні лімфоїдні інфільтрати. У легенях однієї тварини відмічено один метастаз у аваскулярній фазі (рис. 3.11).

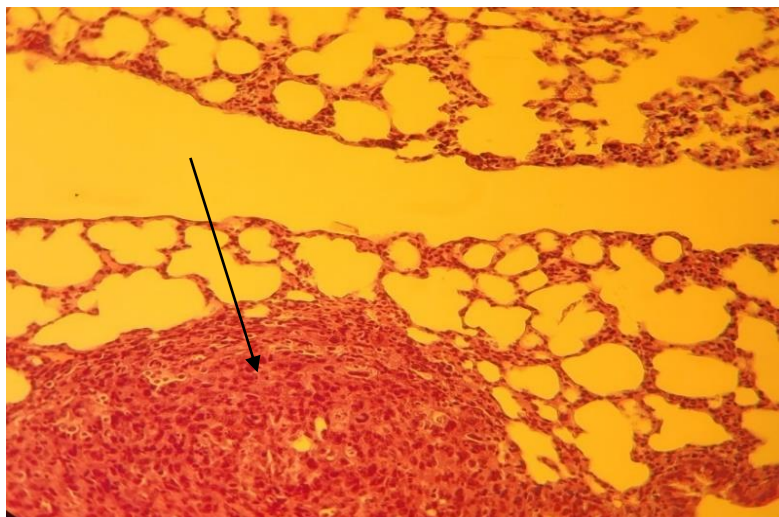


Рис. 3.10 – Легені миші-самця $C_{57}Bl/6$ з перещепленою карциною LL у концентрації $3 \cdot 10^5$ клітин за умов введення цисплатину 6,0 мг/кг, одноразово на 28-ий день дослідження. Метастаз позначено чорною стрілкою. Забарвлення гематоксиліном і еозином $\times 200$

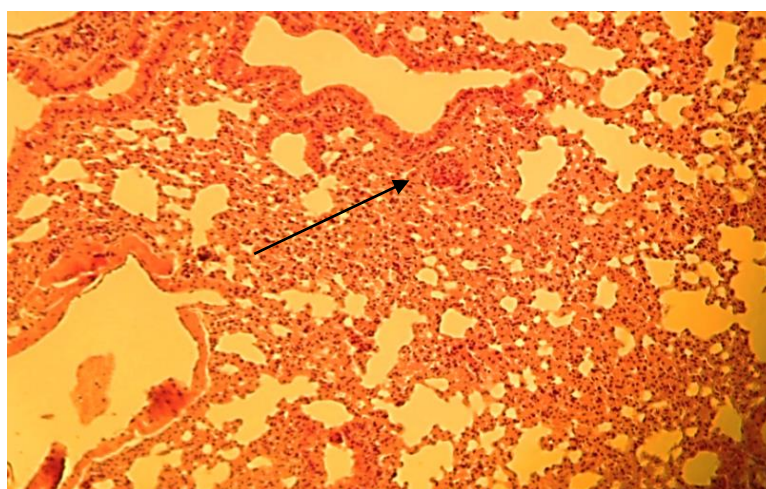


Рис. 3.11 – Легені миші-самця $C_{57}Bl/6$ із перещепленою карциною LL у концентрації $3 \cdot 10^5$ клітин за умов введення сулодексиду 2,0 мг/кг на фоні застосування цисплатину 6,0 мг/кг на 28-ий день дослідження. Метастаз у аваскулярній фазі (позначено чорною стрілкою). Забарвлення гематоксиліном і еозином $\times 100$.

При застосуванні еноксапарину 10,0 мг/кг у поєднанні з цисплатиною 6,0 мг/кг, на 28-ий день дослідження у легенях дослідних мишей-самців C₅₇Bl/6 визначаються дрібні метастази, тканини яких представлені незначним числом поліморфних, атипових пухлинних клітин. У легенях тварин, у яких не відмічається метастатичне ураження спостерігаються вогнища перибронхіальних лімфоїдних інфільтратів (рис. 3.12).

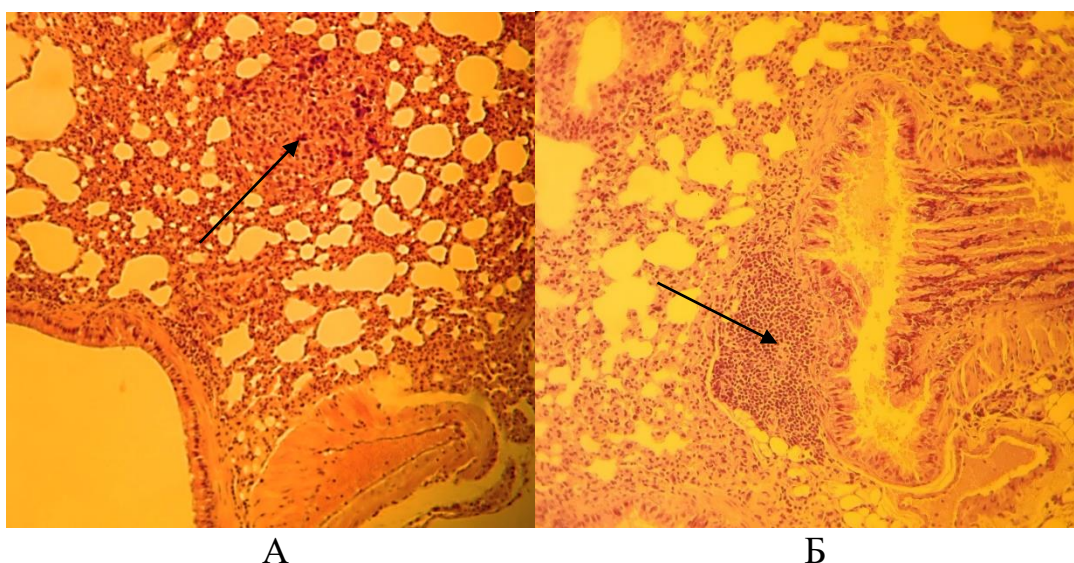
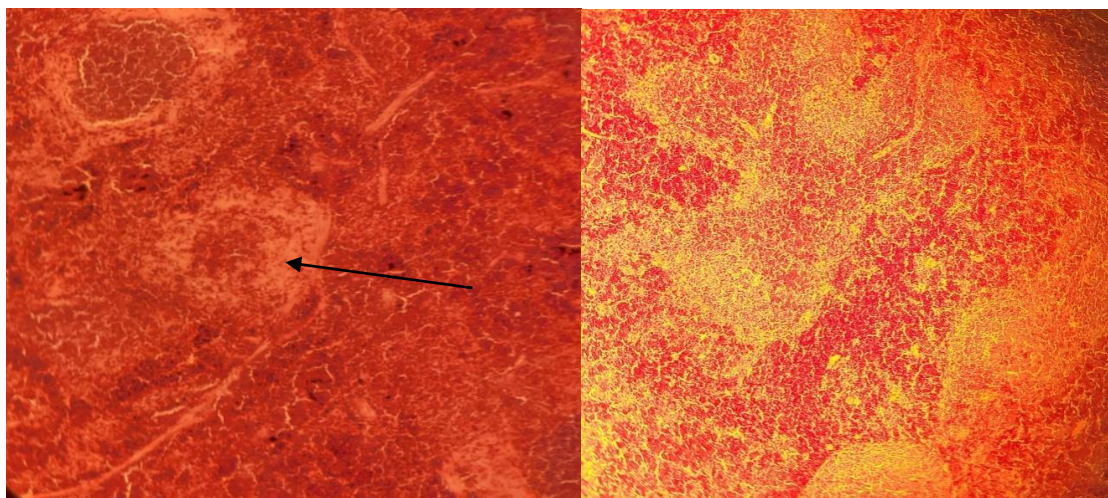


Рис. 3.12 – Легені мишей-самців C₅₇Bl/6 із перещепленою карциномою LL у концентрації $3 \cdot 10^5$ клітин за умов уведення еноксапарину 10,0 мг/кг на фоні застосування цисплатину 6,0 мг/кг на 28-ий день дослідження. А – дрібний метастаз (позначено чорною стрілкою); Б – скупчення лімфоцитів (вогнища метастазів не визначаються, позначено чорною стрілкою). Зabarвлення гематоксиліном і еозином $\times 100$.

Селезінка. Селезінка контрольних (інтактних) мишей-самців C₅₇Bl/6 по периферії оточена сполучнотканинною капсулою, від якої в середину органу відходять трабекули, що утворюють своєрідний сітчастий каркас. Капсула і

трабекули склалися із щільної сполучної та гладенької м'язової тканин. Між трабекулами знаходилась біла і червона пульпа. Червона пульпа утворена системою венозних синусів, міжтрабекулярною та міжфолікулярною сполучною тканиною, заповнена еритроцитами. Біла пульпа представлена поодинокими вузликами різних розмірів, заповнених лімфоцитами (рис. 3.13 А)

Гістологічне дослідження селезінки дослідних тварин із перещепленою карциномою LL у концентрації $2 \cdot 10^6$ клітин на 14-ий день дослідження показало зміну її структури, відмінну від притаманної інтактним тваринами. Відмічається гіперплазія білої пульпи, спостерігається схильність до злиття лімфатичних фолікулів (рис 3.13 Б).



А

Б

Рис. 3.13 – Селезінка мишей-самців $C_{57}Bl/6$. А – контроль (інтактна миша). Біла пульпа, позначена чорною стрілкою; Б – із перещепленою карциномою LL у концентрації $2 \cdot 10^6$ клітин на 14-ий день дослідження. Спостерігається гіперплазія білої пульпи, злиття лімфатичних фолікулів; Забарвлення гематоксиліном і еозином $\times 100$.

Гістологічна картина селезінки мишей-самців із перещепленою карциномою LL концентрації $3 \cdot 10^5$ клітин на 28-ий день дослідження демонструє осередкову проліферацію В-залежних зон білої пульпи (рис. 3.14).

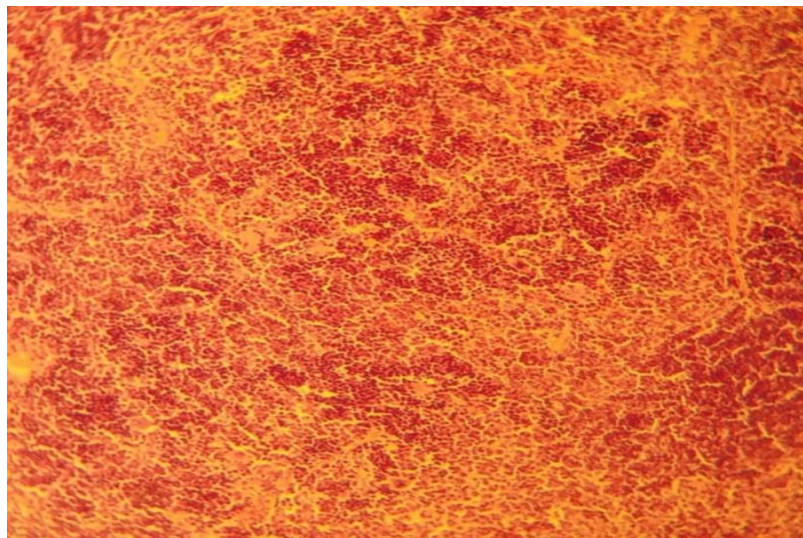


Рис. 3.14 – Селезінка самця -миші $C_{57}Bl/6$ із перещепленою карциномою LL у концентрації $3 \cdot 10^5$ клітин на 28-ий день дослідження. Спостерігається проліферація В-залежних зон білої пульпи. Забарвлення гематоксиліном і еозином $\times 100$

На фоні одноразового введення цисплатину у дозі 6,0 мг/кг гістологічна картина селезінки на тлі метастатичної прогресії карциноми LL також демонструє злиття лімфатичних фолікулів, відмічається зменшення кількості В-залежних зон білої пульпи. При введенні сулодексиду 2,0 мг/кг та еноксапарину 10,0 мг/кг, протягом 20 днів, на фоні застосування цисплатину 6,0 мг/кг маргінальні зони фолікулів розширені за рахунок накопичення середніх лімфоцитів, макрофагів, в меншій мірі, плазматичних клітин, а також активацією екстра-медулярного кровотворення з проліферацією у червоній пульпі клітин-попередників кровотворення, в тому числі макрофагів (рис. 3.15; 3.16).



Рис. 3.15 – Селезінка самця-миші C₅₇Bl/6 із перещепленою карциномою LL у концентрації $3 \cdot 10^5$ клітин на 28-ий день дослідження за умов одноразового введення цисплатину 6,0 мг/кг. Спостерігається злиття лімфатичних фолікулів. Забарвлення гематоксиліном і еозином x100

При введенні сулодексиду 2,0 мг/кг та еноксапарину 10,0 мг/кг, протягом 20 днів, на фоні застосування цисплатину 6,0 мг/кг маргінальні зони фолікулів розширені за рахунок накопичення середніх лімфоцитів, макрофагів, в меншій мірі, плазматичних клітин, а також активацією екстрамедулярного кровотворення з проліферацією у червоній пульпі клітин-попередників кровотворення, в тому числі макрофагів (рис. 3.16).

На тлі пухлинної прогресії макрофаги в селезінці можуть грати двояку роль: з одного боку, вони беруть участь у руйнуванні пухлинних клітин, а з іншого - в умовах пухлинного росту можуть перемикатися на пропухлинну функцію, сприяючи зростанню та метастазування. Збільшення селезінки при пухлинах (спленомегалія) часто відбувається через розростання тканини.

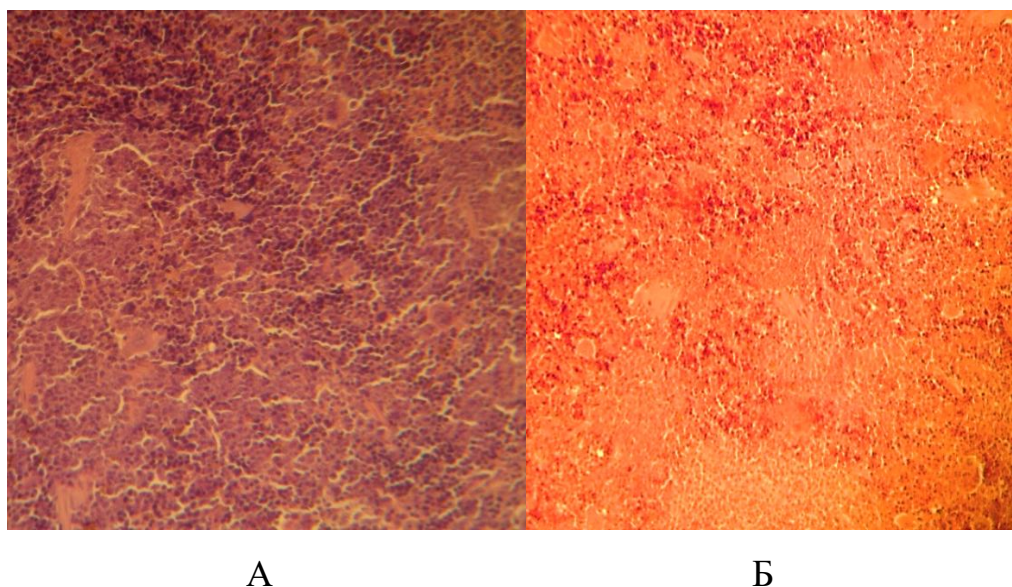


Рис. 3.16 – Селезінка миші-самця C₅₇Bl/6 з перещепленою карциномою LL у концентрації $3 \cdot 10^5$ клітин. А – за умов уведення сулодексиду 2,0 мг/кг на фоні застосування цисплатину 6,0 мг/кг; Б – за умов уведення еноксапарину 10,0 мг/кг на фоні застосування цисплатину 6,0 мг/кг. Маргінальні зони фолікулів розширені за рахунок накопичення середніх лімфоцитів, макрофагів. Забарвлення гематоксиліном і еозином А – х100; Б – х200.

3.3.4 Вміст мегакаріоцитів у кістковому мозку

Мегакаріоцити – це великі, (50 – 100 мкм), високоспеціалізовані клітини, які виробляють і вивільняють тромбоцити в кровотік. Мегакаріоцити походять від плюрипотентних стовбурових клітин і піддаються багаторазовій реплікації ДНК без клітинних поділів завдяки ендомітозу [159]. У процесі численних ендомітозів мегакаріоцити накопичують 4-, 8-, 16-, 32-, 64-кратний вміст ДНК в одному багаточасточковому ядрі [159, 160]. Один мегакаріоцит може вивільнити приблизно 10 тис. тромбоцитів [160].

Дослідження мегакаріоцитів у мазку кісткового мозку здійснювали за допомогою мікроскопа DM LS2 (Leica, Німеччина). Кількість мегакаріоцитів підраховували на 1000 клітин кісткового мозку.

Статистичний аналіз даних вказує, що на тлі росту та метастатичної прогресії карциноми LL відмічається достовірне зниження відсотку мегариоцитів у кістковому мозку дослідних мишей до 0,3(0,3;0,4) %. У контрольних мишей (без пухлин) цей показник був на рівні від 0,5(0,4;0,5) % до 0,6(0,5;0,6) % (табл. 3.4.5, 3.4.6, 3.4.7) Водночас, при аналізі морфологічного стану клітин відмічали поодинокий емпериполез гранулоцитів у мегакариоцит, що призводить до деградації клітини. Це вказує на реактивний стан кісткового мозку, що є однією з причин зниження кількості тромбоцитів у крові мишей з перещепленою карциномою LL без лікування.

При аналізі мазків кісткового мозку дослідних мишей, яким вводили, як монотерапію, сулодексид у дозі 2,0 мг/кг та еноксапарин у дозі 10,0 мг/кг спостерігається тенденція до зниження відсотку мегакарицитів (табл. 3.4.5; 3.4.6), що відображається на кількості тромбоцитів у крові дослідних тварин.

Результати статистичного аналізу отриманих даних наведено в табл. 3.4.5, 3.4.6.

Таблиця 3.4.5

Вміст мегакаріоцитів у кістковому мозку мишей-самців лінії C₅₇BL/6 з перещепленою карциномою Льюїса та за умов застосування сулодексиду на 28 день дослідження (n = 7) Me(25%;75%)

Дослідна група	Вміст мегакариоцитів, %
1	2
Контроль	0,5(0,4;0,5)
Карцинома LL	0,3(0,3;0,4)*

Продовження таблиці 3.4.5

1	2
Карцинома LL + сулодексид	0,4(0,4;0,4)

Примітка: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з показниками контрольної групи.

Таблиця 3.4.6

Вміст мегакаріоцитів у кістковому мозку мишей-самців лінії C₅₇BL/6 з перещепленою карциномою Льюїса та за умов застосування еноксапарину на 28 день дослідження (n = 7) Ме(25%;75%)

Дослідна група	Вміст мегакаріоцитів, %
Контроль	0,5(0,5;0,5)
Карцинома LL	0,4(0,3;0,4)
Карцинома LL + еноксапарин	0,4(0,4;0,5)

При курсовому введенні сулодексиду 2,0 мг/кг на фоні застосування цисплатину у дозі 6,0 мг/кг відсоток мегакаріоцитів був на рівні показника контрольних тварин (табл. 3.4.7), кількість тромбоцитів у крові також була на рівні контрольних тварин.

При курсовому введенні еноксапарину 10,0 мг/кг на фоні застосування цисплатину 6,0 мг/кг спостерігається тенденція до зниження відсотку мегакаріоцитів до 0,5(0,4;0,5) % (табл. 3.4.7), але цей показник не мав достовірних відмінностей від зазначеного показника у контрольних тварин. При одноразовому введенні цисплатину у дозі 6,0 мг/кг дослідним мишам відсоток мегакаріоцитів становив 0,4(0,4;0,4) % та був на рівні тварин з карциномою LL без лікування, внаслідок чого спостерігаються зміни у

тромбоцитарній ланці гемограми. При аналізі морфологічного стану мегакаріоцитів у кістковому мозку дослідних тварин, які отримували терапію сулодексидом, еноксапарином, цисплатином як монотерапію, та сулодексидом та еноксапарином на фоні застосування цисплатину на тлі пухлинного росту та метастазування карциноми LL не відмічались випадки емпериполезу.

Таблиця 3.4.7

Вміст мегакаріоцитів у кістковому мозку мишей-самців лінії C₅₇BL/6 із перещепленою карциномою легень Льюїса на 28 день дослідження за умов уведення сулодексида та еноксапарину на фоні застосування цисплатину
(n = 7) Me(25%;75%)

Дослідна група	Вміст мегакаріоцитів, %
Контроль	0,6(0,5;0,6)
Карцинома LL	0,4(0,3;0,4)*
Карцинома LL + цисплатин	0,4(0,4;0,4)*
Карцинома LL + цисплатин + сулодексид	0,6(0,6;0,6)** ***
Карцинома LL + цисплатин + еноксапарин	0,5(0,4;0,5)

Примітка: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з контролем; ** – $p \leq 0,05$ у порівнянні з карциномою LL; *** – $p \leq 0,05$ у порівнянні з карцинома LL + цисплатин.

Резюме

На тлі пухлинної прогресії епідермоїдної карциноми легень Льюїса спостерігається спленомегалія – збільшення масового коефіцієнту селезінки дослідних тварин, яка є наслідком посиленої секвестрації тромбоцитів та

збільшення їх селезінкового пулу, що викликає тромбоцитопенію. При аналізі мазків кісткового мозку виявлено пригнічення тромбоцитопоезу, що вказує на реактивний стан кісткового мозку, котре є одною з причин зниження кількості тромбоцитів у крові. При застосуванні сулодексиду, еноксапарину, цисплатину, як монотерапію, та сулодексиду та еноксапарину на фоні застосування цисплатину на тлі пухлинного росту та метастазування карциноми LL не відмічались зміни у кількості мегакаріоцитів у кістковому мозку дослідних тварин у порівнянні з зазначеним показником контрольних тварин без пухлин.

Отримані дані демонструють зворотний зв'язок між метастатичною прогресією карциноми LL та тромбоцитопоезом.

Матеріали даного розділу відображені в наступних публікаціях:

1. Мунько М.А. Вплив антикоагулянта прямої дії еноксапарину на метастатичну активність карциноми легень Льюїс. Вісник проблем біології та медицини. 2024. Вип. 1, №172. С. 194-203. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2024-1-172-194-203>

2. Мунько М.А., Карацуба Т.А. Метастатична активність карциноми легень Льюїс за впливу антикоагулянтів прямої дії на тромбоцитарний гемостаз і коагуляційну активність крові. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2024. № 3 т. 18. С. 175-184. <https://doi.org/10.33250/18.03.175>

3. Мунько М.А. Фармакологічна модуляція первинного пухлинного росту та метастатичної прогресії карциноми легень Льюїс антикоагулянтами прямої дії на фоні застосування цисплатину. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2025. № 3 т. 19. С. 249-257. <https://doi.org/10.33250/19.03.249>

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

На сьогодні, результати сучасних досліджень охоплюють широкий спектр наукових праць, присвячених протипухлинній та антиметастатичній активності антикоагулянтів прямої дії [54–56]. Тому на першому етапі досліджень ми порівнювали вплив антикоагулянтів прямої дії - сулодексиду та еноксапарину, як монотерапії, на первинний пухлинний ріст та метастатичну активність епідермоїдної карциноми легень Льюїса.

Результати дослідження виявили суттєвий антиметастатичний ефект на 28-ий день дослідження після перещеплення пухлинних клітин та введення сулодексиду та еноксапарину. Сулодексид гальмував утворення метастазів у легенях дослідних мишей на 63,79 %, еноксапарин на 60,88 %, але за даних умов експерименту не виявлено суттєвого протипухлинного ефекту та впливу на середню тривалість життя дослідних тварин. Це пояснюється тим, що антикоагулянти не є прямими протипухлинними засобами, але їх використання, як препаратів супроводу, може покращити якість життя пацієнтів та знизити ризики серйозних ускладнень [143].

Тому пошук та розробка нових схем лікування злоякісних новоутворень з препаратами супроводу розширює можливість протипухлинної терапії.

У багатьох схемах лікування онкологічних захворювань використовують платиновмісний препарат – цисплатин, який призначається при поширених або метастатичних злоякісних пухлинах [138].

Тому було доречним порівняти ефекти антикоагулянтів прямої дії - сулодексиду й еноксапарину у сумісному застосуванні з цисплатином на пухлинну прогресію карциноми легень Льюїса. З метою експериментального обґрунтування доцільності застосування сулодексиду та еноксапарину, як препаратів супроводу, було застосовано окрему групу дослідних тварин, які отримували монотерапію цисплатином.

Порівняльний аналіз отриманих даних виявив значне зниження метастатичної активності карциноми легень Льюїса при застосуванні сулодексиду, на фоні цисплатину. Відсоток гальмування утворення метастазів у легенях становив - 97,42 %, зростала середня тривалість життя на 32,94 % при гальмуванні первинної пухлини за об'ємом на 41,01 %. Еноксапарин, за даних умов експерименту, гальмував утворення метастазів у легенях на 71,01 % при цьому середня тривалість життя зростала на 30,19 % при гальмуванні первинної пухлини за об'ємом на 36,12 %. Монотерапія цисплатином мала значно нижчі показники щодо протипухлинної та антиметастатичної дії.

Онкологічні хворі характеризуються порушенням регуляції системи гемостазу та системною гіперкоагуляцією. Різні компоненти системи гемостазу беруть участь у механізмах, що сприяють розвитку пухлини, включаючи зростання первинної пухлини, інвазію ракових клітин, вислизання від імунної відповіді, ангіогенез та метастатичний процес, що у свою чергу, погіршує прогноз і підвищує рівень смертності [161].

Отримані в нашому дослідженні дані продемонстрували взаємозв'язок між системною гіперкоагуляцією та різними компонентами системи гемостазу з розвитком первинної пухлини та метастатичним процесом. Це узгоджується з сучасними уявленнями про участь паранеопластичного гіперкоагуляційного синдрому в патогенезі метастазування злоякісних новоутворень [161]

Розуміння стану тромбоцитарного гемостазу може визначити потенційні стратегії подальшого лікування та обґрунтувати потенційну функцію тромбоцитів у регуляції прогресування новоутворення .

Для визначення динамічних біомаркерів, які пов'язані з метастазуванням, була проведена оцінка параметрів гемограми мишей-самців лінії C₅₇BL/6 із перещепленою карциномою Льюїса щодо росту первинної пухлини на 14-ий день дослідження та на тлі її метастатичної прогресії на 28-ий день дослідження. Аналіз отриманих даних виявив зміни відносної

ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом, які пов'язані з прогресуванням метастазування карциноми легень Льюїса. Зазначений показник підвищувався на 15,21–41,65 % на фоні утворення метастазів у легенях мишей, однак, на фоні первинного пухлинного росту цей показник не змінювався відносно контрольних тварин і може бути предиктором метастазування онкологічних хворих.

Отримані дані можуть бути підґрунтям для створення додаткових діагностичних критеріїв та забезпечать більш ранню та достовірну діагностику прогресування онкологічного процесу щодо скринінгу рецидивів та вторинних злоякісних новоутворень.

Дослідження тромбоцитарного гемостазу, коагуляційної активності крові дослідних тварин показали, що на тлі метастазуючого пухлинного росту карциноми легень Льюїса розвивається гіперкоагуляційний стан І стадії ДВЗ-синдрому (дисеміноване внутрішньосудинне зсідання крові), який характеризувався зниженням кількості тромбоцитів у крові на 55 – 57 % (тромбцитопенія), скороченням часу зсідання крові до $0,81 \pm 0,25$ хв (гіперкоагуляція), підвищенням вмісту фібриногену та суттєвому зниженню протромбінового часу, збільшенням масового коефіцієнту селезінки на 96,5 % (спленомегалія).

За даними сучасних клінічних досліджень ДВЗ-синдром може бути проявом недіагностованого злоякісного новоутворення. Він може виявлятися у формі різних фенотипів, що ускладнює його діагностику та призводить до високої смертності [162], так як він може протікати субклінічно, а першим клінічним симптомом може бути кровотеча у місці пухлини [163].

Отримані дані у нашому дослідженні коагуляційної активності цільної крові на 14-ий день після перещеплення пухлинних клітин карциноми легень Льюїса свідчать вже про підвищення коагуляційної активності цільної крові, а на 28-ий день досліду відмічено скорочення часу зсідання крові, при наявності метастазів у легенях, що свідчить про гіперкоагуляцію. Одержані дані свідчать про доцільність моніторингу показників тромбоцитарного

гемостазу, коагуляційної активності крові у пацієнтів з діагностованими злоякісними захворюваннями, навіть коли вони перебувають у ремісії.

Терапія сулодексидом та еноксапарином на фоні застосування з цисплатином супроводжувалась достовірним збільшенням часу зсідання крові на 10,12 - 11,10 разів, відповідно. Кількість тромбоцитів у крові дослідних тварин при застосуванні сулодексиду у поєднанні з цисплатином була на рівні контрольної групи тварин без пухлин. Терапія еноксапарином у поєднанні з цисплатином не мала достовірних відмінностей у порівнянні з зазначеним показником у дослідних мишей, які отримували одноразово цисплатин, як монотерапію. Монотерапія цисплатином супроводжувалась збільшенням часу зсідання крові у 4,9 рази та підвищенням кількості тромбоцитів у крові дослідних мишей у 1,7 рази у порівнянні з зазначеними показниками тварин з перещепленою карциномою Льюїса. Вміст фібриногену та протромбіновий час достовірно не відрізнялись від зазначених показників групи мишей з перещепленою пухлиною LL без лікування.

При аналізі мазків кісткового мозку виявлено пригнічення тромбоцитопоезу, що вказує на реактивний стан кісткового мозку, що є однією з причин зниження кількості тромбоцитів у крові. При застосуванні сулодексиду, еноксапарину, цисплатину, як монотерапії, та сулодексиду та еноксапарину на фоні застосування цисплатину на тлі пухлинного росту та метастазування карциноми LL не відмічались зміни у кількості мегакаріоцитів у кістковому мозку дослідних тварин у порівнянні з контрольними тваринами без пухлин.

Виявлено взаємозв'язок змін у тромбоцитарному гемостазі з прогресуванням метастазування. Отримані дані демонструють зворотний зв'язок між метастатичною прогресією карциноми LL та тромбоцитопоезом.

ВИСНОВКИ

Актуальність лікування злоякісних новоутворень зумовлена зростанням випадків онкологічних захворювань та необхідністю впровадження нових персоналізованих діагностичних та лікувальних підходів. У дисертаційній роботі подано теоретичне узагальнення та нове вирішення науково-практичного завдання щодо впливу антикоагулянтів прямої дії сулодексиду та еноксапарину, як препаратів супроводу, на фоні застосування цисплатину на метастатичну прогресію експериментальної моделі епідермоїдної карциноми легенів Льюїса.

1. Сулодексид при курсовому введенні, як монотерапія, (на 5-ий день після перещеплення клітин епідермоїдної карциноми легень Льюїса у дозі 2,0 мг/кг, введення 20 днів) на 28 день дослідження гальмував утворення метастазів у легенях мишей – самців лінії C₅₇Bl/6 на 63,79 %, а об'єм – на 96,91 %. Гальмування росту первинної пухлини за об'ємом становило – 14,64 %, середня тривалість життя – збільшувалась на 6,06 %.

При застосуванні сулодексиду (у дозі 2,0 мг/кг, введення протягом 20 днів) на фоні одноразового введення на 4-ий день після перещеплення пухлинних клітин цисплатину у дозі 6,0 мг/кг відсоток гальмування утворення метастазів у легенях становив – 97,42 %, а їх об'єм зменшувався на 100 % (виявлено 1 метастаз у аваскулярній фазі). Зростала середня тривалість життя на 32,94 % при гальмуванні первинної пухлини за об'ємом на 41,01 %.

2. Еноксапарин при курсовому введенні, як монотерапія, (на 5-ий день після перещеплення клітин епідермоїдної карциноми легень Льюїса у дозі 10,0 мг/кг, введення протягом 20 днів) на 28 день дослідження гальмував утворення метастазів у легенях мишей – самців лінії C₅₇Bl/6 на 60,88 %, а їх об'єм – на 96,88 %. Гальмування росту первинної пухлини за об'ємом становило – 19,3 %, середня тривалість життя тварин збільшувалась на 7,6 %.

При застосуванні еноксапарину (у дозі 10,0 мг/кг, введення протягом 20 днів) на фоні одноразового введення на 4-ий день після перещеплення пухлинних клітин цисплатину у дозі 6,0 мг/кг відсоток гальмування утворення метастазів у легенях становив – 84,16 %, їх об'єм на 97,75 % . Зростала середня тривалість життя на 36,12 % при гальмуванні первинної пухлини за об'ємом на 30,19 %.

3. Дослідження тромбоцитарного гемостазу виявило, що на тлі метастазуючого пухлинного росту *in vivo* розвивається гіперкоагуляційний стан I стадії ДВЗ-синдрому, який характеризується тромбоцитопенією, зниження кількості тромбоцитів у крові на 55 – 57 %; гіперкоагуляцією – скороченням часу зсідання крові до $0,81 \pm 0,25$ хв; достовірним підвищенням вмісту фібриногену у плазмі крові до $4,50 \pm 0,96$ мг/мл, зниженням протромбінового часу до 12(11;12) с, спленомегалією – масовий коефіцієнт селезінки збільшувався в середньому на 96,5 %, у порівнянні з контрольними тваринами без пухлин. Виявлені зміни відносної ширини розподілу тромбоцитів за об'ємом, пов'язані з прогресуванням метастазування карциноми легень Льюїса. Зазначений показник підвищувався на 15,21 - 41,65 % і може бути предиктором метастазування.

4. При курсовому введенні сулодексиду у дозі 2,0 мг/кг, введення протягом 20 днів та еноксапарину у дозі 10,0 мг/кг, введення протягом 20 днів, на фоні одноразового введення цисплатину у дозі 6,0 мг/кг, вміст фібриногену, протромбіновий час достовірно не відрізнялись від зазначених показників мишей контрольної групи. Час зсідання цільної крові підвищувався у 10,12 - 11,10 разів, відповідно. Кількість тромбоцитів у крові дослідних тварин та тромбоцитарні індекси при застосуванні сулодексиду, у поєднанні з цисплатином, були на рівні контрольної групи тварин без пухлин. Терапія еноксапарином у поєднанні з цисплатином не мала достовірних відмінностей у порівнянні із зазначеним показником у дослідних мишей, які отримували одноразово цисплатин, як монотерапію. Відсоток відносної ширини розподілу

тромбоцитів за об'ємом був достовірно підвищений до $36,03 \pm 7,37 \%$ у порівнянні із зазначеним показником контрольної групи мишей.

5. Порівняльний аналіз отриманих даних виявив значне зниження метастатичної активності епідермоїдної карциноми легень Люїса за умов застосування антикоагулянтів прямої дії сулодексиду та еноксапарину на фоні застосування цисплатину, ніж використання цисплатину, як монотерапію. Результати досліджень можуть стати основою розробки нових схем лікування онкологічних хворих з злоякісними новоутвореннями, яким притаманний гематогенний шлях метастазування та спрямованих на тромбоцитарні мішені.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Зінич П.П. та ін. Молекулярні механізми утворення метастазів. Маркери метастазування при карциномах щитоподібної залози (огляд літератури). *Ендокринологія*. 2020. Вип. 25, ч. 3. С. 227-242. <https://doi.org/10.31793/1680-1466.2020.25-3.227>
2. Simard JL, Kircher SM, Didwania A, Goel MS. Screening for Recurrence and Secondary Cancers. *Med Clin North Am*. 2017. Nov;101(6):1167-1180. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2017.06.010>. PMID: 28992861.
3. Pro skhvalennia Natsionalnoi stratehii kontroliu zloiakisnykh novoutvoren na period do 2030 roku ta zatverdzhennia planu dii z yii realizatsii na period do 2025 roku, Rozporiadzhennia Kabinetu Ministriv Ukrainy № 730-p [Internet], 2 serp. 2024 [cited 14 grud. 2024] Available from: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/730-2024-%D1%80/sp:dark?dark=0#Text>.
4. Hamidi H., Ivaska J. Every step of the way - integrins in cancer progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer*. 2018. Vol. 18. P. 533-548. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0038-z>
5. Mantovani A., Marchesi F., Di Mitri D., Garlanda C. Macrophage diversity in cancer dissemination and metastasis. *Cellular & Molecular Immunology*. 2024. Vol. 21. P. 1201-1214. <https://doi.org/10.1038/s41423-024-01216-z>
6. Мунько М.А., Карацуба Т.А. Метастатична активність карциноми легень Льюїс за впливу антикоагулянтів прямої дії на тромбоцитарний гемостаз і коагуляційну активність крові. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2024. № 3 т. 18. С. 175-184. <https://doi.org/10.33250/18.03.175>
7. Kim S.H. et al. Endothelial-derived interleukin-6 induces cancer stem cell motility by generating a chemotactic gradient towards blood vessels. *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 59. P. 100339-100352. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22225>
8. Neubauer K., Zieger B. Endothelial cells and coagulation. *Cell and Tissue Research*. 2022. Vol. 387. P. 391-398. <https://doi.org/10.1007/s00441-021-03471-2>.

9. Welch D.R., Hurst D.R. Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Research*. 2019. Vol. 79, № 12. P. 3011-3027. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0458>
10. Zhou Y., et al. The Role of the VEGF Family in Coronary Heart Disease. *Front. Cardiovasc. Med.* 2021. Vol. 8. P. 1-16. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.738325>.
11. Дрижак В.І. Метастазування злоякісних клітин та його регуляція. *Вісник наукових досліджень*. 2007. Вид. 1, № 46. С. 98-100.
12. Десятерик В.І., Шевченко Є.С. Механізми гематогенного метастазування пухлин. *Теоретична медицина*. 2015. Вид. 16., Том XXI, № 1. С. 10-18.
13. Fares J. et al. Molecular principles of metastasis- a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020. Vol. 5, № 28. P. 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
14. Yang G. et al. Metastasis Organotropism- Redefining the Congenial Soil. *Developmental Cell*. 2019. Vol. 49. P. 375-391. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.04.012>
15. Surma S., Banach M. Fibrinogen and Atherosclerotic Cardiovascular Diseases—Review of the Literature and Clinical Studies. *The International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 22, № 193. P. 1-20. <https://doi.org/10.3390/ijms23010193>.
16. Göbel K., et al. The Coagulation Factors Fibrinogen, Thrombin, and Factor XII in Inflammatory Disorders—A Systematic Review. *Frontiers in Immunology*. 2018. Vol. 9, № 1731 P. 1-14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01731>.
17. Smith S.A., Travers R.J., Morrissey J.H. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2015. Vol. 50, № 4. P 1-11. <https://doi.org/10.3109/10409238.2015.1050550>.
18. Koizume S., Miyagi Y. Tissue factor in cancer-associated thromboembolism: possible mechanisms and clinical applications. *British Journal of*

Cancer. 2022. Vol. 127. P. 2099–2107. <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01968-3>.

19. Wei X., et al. Coagulation factor IV is an indicator of symptomatic pulmonary embolism in patients with primary lung cancer. *Clin. Respir. J.* 2020. Vol. 14. P. 124-131. <https://doi.org/10.1111/crj.13109>.

20. Mohammed B.M., Pelc L.A., Rau M.J., Di Cera E. Cryo-EM structure of coagulation factor V short. *Blood*. 2023. Vol. 141, № 26. P. 3215-3225. <https://doi.org/10.1182/blood.2022019486>.

21. Spronk H.M.H., et al. Pleiotropic effects of factor Xa and thrombin: what to expect from novel anticoagulants. *Cardiovascular Research*. 2014. Vol. 101, № 3. P. 1-28. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt343>.

22. Childers K.C., Peters S.C., Spiegel P.C. Jr. Structural insights into blood coagulation factor VIII: Procoagulant complexes, membrane binding, and antibody inhibition. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2022. Vol. 20. P. 1957-1970. <https://doi.org/10.1111/jth.15793>.

23. Atiq F., O'Donnell J. Novel functions for von Willebrand factor. Novel functions for von Willebrand factor. *Blood*. 2024. Vol. 144, № 12. P. 1247–1256. <https://doi.org/10.1182/blood.2023021915>.

24. Bos M.H.A., van Diest R.E., Monroe D.M. Blood coagulation factor IX: structural insights impacting hemophilia B therapy. *Blood*. 2024. Vol. 144, № 21. P. 2198–2210. <https://doi.org/10.1182/blood.2023023276>.

25. Batsuli G., Kouides P. Rare Coagulation Factor Deficiencies (Factors VII, X, V, and II). *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2021. Vol. 35, № 6 P. 1181-1196. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2021.07.010>.

26. Vlădăreanu A.M., Roșca A. Factor XI and coagulation. Factor XI inhibitors – antithrombotic perspectives. *Rom. J. Intern. Med.* 2024. Vol. 62, № 2. P. 91–100. <https://doi.org/10.2478/rjim-2023-0034>.

27. Jaffar J., et al. Coagulation factor-XII induces interleukin-6 by primary lung fibroblasts: a role in idiopathic pulmonary fibrosis? *Am. J. Physiol. Lung Cell*

Mol Physiol. 2022. Vol. 322: P. 258–272.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00165.2021>.

28. Bazzan E. et al. Macrophages-derived Factor XIII links coagulation to inflammation in COPD. *Frontiers in Immunology*. 2023. Vol. 14. P. 1-9.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1131292>.

29. Twomey L. et al. Platelets: From Formation to Function. Homeostasis - An Integrated Vision / ed. By Lasakosvitsch Castanho F., Dos Anjos Garnes S. : IntechOpen. 2019. P. 71-92. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80924>.

30. Sang Y. et al. Interplay between platelets and coagulation. *Blood Reviews*. 2021. Vol. 46. P. 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100733>

31. Murugappan S., Kunapuli S.P. The role of ADP receptors in platelet function. *Frontiers in Bioscience*. 2006. Vol. 11. P. 1977-1986.

32. Physiology, Thromboxane A2 / Rucker D., Dhamoon A.S. *StatPearls Publishing*. 2022. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK539817/>. (Date of access: 14.08.2025).

33. Стасишин О.В. Сучасний погляд на функцію системи гемостазу. *Український Медичний Часопис*. 2020. Вип. 6, № 140. С. 1-3.

34. Фізіологія : підручник для студ. вищ. мед. навч. закладів / В. Г. Шевчук та ін. Вінниця : Нова Книга, 2012. 448 с.

35. Austis S.K. Haemostasis. *Medicine*. 2017. Vol. 45, № 4. P. 204-208.
<https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.01.013>

36. Aird W.C. Endothelium and haemostasis. *Hämostaseologie*. 2015. Vol. 1. P. 11-16. - DOI: 10.5482/HAMO-14-11-0075 <https://doi.org/10.5482/HAMO-14-11-0075>

37. Biochemistry, Antithrombin III / Hsu E., Moosavi L. *StatPearls Publishing*. 2023. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545295/>. (Date of access: 14.08.2025).

38. Metharom P., Falasca M., Berndt M.C. The History of Armand Trousseau and Cancer-Associated Thrombosis. *Cancers*. 2019. Vol. 11, № 158. P. 1-4.
<https://doi.org/10.3390/cancers11020158>

39. Десятерик В.І., Медведков О.В., Шевченко Є.С. Нові можливості та перспективи лікування онкологічної патології з використанням низькомолекулярних гепаринів. *Хірургія України*. 2015. № 3. С. 70-74.
40. Raskov H., Orhan A., Agerbæk M.Ø., Gogenur I. The impact of platelets on the metastatic potential of tumour cells. *Heliyon*. 2024. Vol. 10, № 14. P. 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e34361>
41. Roweth H.G., Battinelli E.M. Lessons to learn from tumor-educated platelets. *Blood*. 2021. Vol. 137, № 23. P. 3174-3180. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003976>
42. Bian X., et al. Roles of platelets in tumor invasion and metastasis: A review. *Heliyon*. 2022. Vol. 8, № 12. P. 3174-3180. P. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12072>
43. Strassenburg W., et al. Tumor Cell-Induced Platelet Aggregation as an Emerging Therapeutic Target for Cancer Therapy. *Front Oncol*. 2022. Vol 12, № 909767. P 1-14. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.909767>.
44. Zhao J., et al. Decoding the role of platelets in tumour metastasis: enigmatic accomplices and intricate targets for anticancer treatments. *Frontiers in Immunology*. 2023. Vol. 14. P. 3174-3180. P. 1-12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1256129>
45. Wojtukiewicz M.Z. et al. Thrombin—unique coagulation system protein with multifaceted impacts on cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2016. Vol. 35. P. 213-233. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9626-0>
46. Tang L., Shi H., Luo Y. Small but mighty: Platelets as multifunctional architects of tumor metastasis and immune regulation. *MedComm – Future Medicine*. 2024. Vol. 3, № 4. P. 1-24. <https://doi.org/10.1002/mef2.70000>
47. Riaz M., et al. Exploring the platelet and cancer cell interaction in metastasis targeting. *Journal of Current Oncology*. 2024. Vol. 4, № 2. P. 834-844.
48. Nazari P.M.S., Riedl J., Pabinger I., Ay C. The role of podoplanin in cancer-associated thrombosis. *Thrombosis Research*. 2018. Vol. 164. P. 34-39. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.01.020>.

49. Wang H., et al. Characteristics of pre-metastatic niche: the landscape of molecular and cellular pathways. *Molecular Biomedicine*. 2021. Vol. 2, № 3. P. 1-32. <https://doi.org/10.1186/s43556-020-00022-z>
50. Patras L., Shaashua L., Matei I., Lyden D. Immune determinants of the pre-metastatic niche. *Cancer Cell*. 2023. Vol. 41. P. 546-572. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.018>
51. Xue J., et al. The interaction of platelet-related factors with tumor cells promotes tumor metastasis. *Journal of Translational Medicine*. 2024. Vol. 22, № 371. P. 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05126-6>
52. Swamy S., et al. Plasma levels of P-selectin and future risk of incident venous thromboembolism. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2023. Vol. 21, № 9. P. 2451-2460. <https://doi.org/10.1016/j.jtha.2023.04.038>.
53. Lucotti S., Muschel R. J. Platelets and Metastasis: New Implications of an Old Interplay. *Frontiers in Oncology*. 2020. Vol. 10, № 1350. P. 1-23. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01350>
54. Kuderer N. M., Ortel T. L., Francis C. W. Impact of venous thromboembolism and anticoagulation on cancer and cancer survival. *J. Clin. Oncol.* 2009. Vol. 27, № 29. P. 4902. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.4584>
55. Remiker A. S., Palumbo J. S. Mechanisms coupling thrombin to metastasis and tumorigenesis. *Thromb. Res.* 2018. Vol. 164, Suppl. 1. P. S29–S33. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2017.12.020>
56. Bobek V. Anticoagulant and fibrinolytic drugs – possible agents in treatment of lung cancer? *Anticancer Agents Med. Chem.* 2012. V. 12, No. 6. P. 580–588. <https://doi.org/10.2174/187152012800617687>
57. Hagmar B., Norrby K. Evidence for effects of heparin on cell surfaces influencing experimental metastases. *Int. J. Cancer*. 1970. Vol. 5, № 1. P. 72–84. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910050110>
58. Hilgard P., et al. Oral anticoagulation in the treatment of a spontaneously metastatic murine tumour (3LL). *Br. J. Cancer*. 1977. Vol. 35, № 1. P. 78–85. <https://doi.org/10.1038/bjc.1977.6>

59. Smorenburg S. M., Van Noorden C. J. F. The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies. *Pharmacol. Rev.* 2001. Vol. 53, № 1. P. 93–106. [https://doi.org/10.1016/S0031-6997\(24\)01481-9](https://doi.org/10.1016/S0031-6997(24)01481-9)
60. Engelberg H. Actions of heparin that may affect the malignant process. *Cancer.* 1999. Vol. 85, № 2. P. 257–272. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19990115\)85:2<257::AID-CNCR1>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19990115)85:2<257::AID-CNCR1>3.0.CO;2-2)
61. Collen A., et al. Unfractionated and low molecular weight heparin affect fibrin structure and angiogenesis *in vitro*. *Cancer Res.* 2000. Vol. 60, № 21. P. 6196–6200.
62. Ludwig R. J., et al. The ability of different forms of heparins to suppress P-selectin function *in vitro* correlates to their inhibitory capacity on bloodborne metastasis *in vivo*. *Thromb. Haemost.* 2006. Vol. 95, № 3. P. 535–540. <https://doi.org/10.1160/TH05-07-0515>
63. Tani N., et al. Anticancer effects of heparin in the experimental metastasis of the pancreatic cancer model with enhanced potency of gemcitabine. *Cancer Res.* 2010. V. 70, № 8. P. 4175. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM10-4175>
64. Bosch M.M., Vignoli A., Villamediana R.L., Prandoni P. Bemiparin in oncology. *Drugs.* 2010. V. 70. P. 35–42. <https://doi.org/10.2165/1158585-S0-000000000-00000>
65. Amirkhosravi A., Mousa S. A., Amaya M., Francis J.L. Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin. *J. Thromb. Haemost.* 2003. Vol. 1, № 9. P. 1972–1976. <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00341.x>
66. Schlesinger M., et al. The role of VLA-4 binding for experimental melanoma metastasis and its inhibition by heparin. *Thromb. Res.* 2014. Vol. 133, № 5. P. 855–862. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.02.020>
67. Zhao X. P., et al. Membrane microvesicles as mediators for melanoma-fibroblasts communication: roles of the VCAM-1/VLA-4 axis and the ERK1/2 signal pathway. *Cancer Lett.* 2015. Vol. 360, № 2. P. 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.01.032>
68. Arce M., et al. Coagulation factor Xa promotes solid tumor growth,

experimental metastasis and endothelial cell activation. *Cancers*. 2019. Vol. 11, № 8. P. 1103. <https://doi.org/10.3390/cancers11081103>

69. Pollari S., et al. Heparin-like polysaccharides reduce osteolytic bone destruction and tumor growth in a mouse model of breast cancer bone metastasis. *Mol. Cancer. Res.* 2012. Vol. 10, № 5. P. 597–604. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0482>

70. Takahashi H., et al. A comparison of the effects of unfractionated heparin, dalteparin and danaparoid on vascular endothelial growth factor-induced tumour angiogenesis and heparanase activity. *Br. J. Pharmacol.* 2005. Vol. 146, № 3. P. 333–343. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706344>

71. Yu C. J., et al. Effect of Fraxiparine, a type of low molecular weight heparin, on the invasion and metastasis of lung adenocarcinoma A549 cells. *Oncol. Lett.* 2010. Vol. 1, № 4. P. 755–760. https://doi.org/10.3892/ol_00000132

72. Zhuang X., et al. Combination of nadroparin with radiotherapy results in powerful synergistic antitumor effects in lung adenocarcinoma A549 cells. *Oncol. Rep.* 2016. Vol. 36, № 4. P. 2200–2206. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4990>

73. Szende B., et al. Effect of Fraxiparine and heparin on experimental tumor metastasis in mice. *Anticancer Res.* 2005. Vol. 25, № 4. P. 2869–2872.

74. Djaafar S., et al. Enoxaparin attenuates mouse colon cancer liver metastases by inhibiting heparanase and interferon- γ -inducible chemokines. *Anticancer Res.* 2016. Vol. 36, № 8. P. 4019–4032.

75. Pan Y., et al. Enoxaparin sensitizes human non-small-cell lung carcinomas to gefitinib by inhibiting DOCK1 expression, vimentin phosphorylation, and Akt activation. *Mol. Pharmacol.* 2015. Vol. 87, № 3. P. 378–390. <https://doi.org/10.1124/mol.114.094425>

76. Пуськов А. Н., Лихова А. А., Мунько М. А. Противоопухолевые и антиметастатические эффекты полиметоксилированных флавонов нобилетина и тангеретина. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. Т. 15, № 3. С. 169–180. <https://doi.org/10.33250/15.03.169>

77. Mousa S. A., Linhardt R., Francis J. L., Amirkhosravi A. Anti-metastatic

effect of a non-anticoagulant low-molecular-weight heparin versus the standard low-molecular-weight heparin, enoxaparin. *Thromb. Haemost.* 2006. Vol. 96, № 12. P. 816–821. <https://doi.org/10.1160/TH06-05-0289>

78. Ataabadi F. V., Oveissi F., Etebari M., Taheri A. Preparation of chitosan nanoparticles for simultaneous drug delivery of dacarbazine and enoxaparin in melanoma. *Carbohydr. Polym.* 2023. Vol. 316. P. 121041. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121041>

79. Pross M., et al. Low-molecular-weight heparin (reviparin) diminishes tumor cell adhesion and invasion *in vitro*, and decreases intraperitoneal growth of colonadeno-carcinoma cells in rats after laparoscopy. *Thromb. Res.* 2003. Vol. 110, № 4. P. 215–220. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(03\)00296-2](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(03)00296-2)

80. White S. B., et al. Characterization of CC-531 as a rat model of colorectal liver metastases. *PLoS One.* 2016. Vol. 11, № 5. P. e0155334. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155334>

81. Pross M. et al. Effect of low molecular weight heparin on intra-abdominal metastasis in a laparoscopic experimental study. *Int. J. Colorectal Dis.* 2004. Vol. 19, № 2. P. 143–146. <https://doi.org/10.1007/s00384-003-0535-7>

82. Vignoli A., Marchetti M., Russo L. LMWH bemiparin and ULMWH RO-14 reduce the endothelial angio genic features elicited by leukemia, lung cancer, or breast cancer cells. *Cancer Invest.* 2011. Vol. 29, No. 2. P. 153–161. <https://doi.org/10.3109/07357907.2010.543217>

83. Alur I., et al. Anti-tumor effects of bemiparin in HepG2 and MIA PaCa-2 cells. *Gene.* 2016. Vol. 585, № 2. P. 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.03.044>

84. Choi J. U., et al. A heparin conjugate, LHbisD4, inhibits lymphangiogenesis and attenuates lymph node metastasis by blocking VEGF-C signaling pathway. *Biomaterials.* 2017. Vol. 139. P. 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.05.026>

85. Tammela T., Alitalo K. Lymphangiogenesis: molecular mechanisms and future promise. *Cell.* 2010. Vol. 140, № 4. P. 460–476.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.045>

86. Zhuo W., et al. The CXCL12–CXCR4 chemokine pathway: a novel axis regulates lymphangiogenesis. *Clin. Cancer Res.* 2012. Vol. 18, № 19. P. 5387–5398. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0708>

87. Du L. L., Liu P. CXCL12/CXCR4 axis regulates neovascularization and lymphangiogenesis in sutured corneas in mice. *Mol. Med. Rep.* 2016. Vol. 13, № 6. P. 4987–4994. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5179>

88. Simka M. Anti-metastatic activity of heparin is probably associated with modulation of SDF-1-CXCR4 axis. *Med. Hypotheses.* 2007. Vol. 69, № 3. P. 709. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.01.008>

89. Ma L., et al. Modulating the interaction of CXCR4 and CXCL12 by low-molecular-weight heparin inhibits hepatic metastasis of colon cancer. *Invest. New Drugs.* 2012. Vol. 30, № 2. P. 508–517. <https://doi.org/10.1007/s10637-010-9578-0>

90. Abdelouahab H., et al. CXCL12/CXCR4 pathway is activated by oncogenic JAK2 in a PI3K-dependent manner. *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, № 33. P. 54082–54095. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10789>

91. Liu H., Chen X., Gao W., Jiang G. The expression of heparanase and microRNA-1258 in human non-small cell lung cancer. *Tumor Biol.* 2012. Vol. 33, № 5. P. 1327–1334. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0380-9>

92. Orenstein N. S., et al. Sulfated glycosaminoglycans of guinea pig basophilic leukocytes. *J. Immunol.* 1978. Vol. 121, № 2. P. 586–592.

93. Cassinelli G., Torri G., Naggi A. Non-anticoagulant heparins as heparanase inhibitors. *Heparanase.* 2020. Vol. 1221. P. 493–522. https://doi.org/10.1007/978-3-030-34521-1_20

94. Mohan C. D., et al. Targeting heparanase in cancer: inhibition by synthetic, chemically modified, and natural compounds. *iScience.* 2019. Vol. 15. P. 360–390. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.04.034>

95. Rivara S., Milazzo F. M., Giannini G. Heparanase: a rainbow pharmacological target associated to multiple pathologies including rare diseases. *Future Med. Chem.* 2016. Vol. 8, № 6. P. 647–680. <https://doi.org/10.4155/fmc->

2016-0012

96. Vlodavsky I., et al. The impact of heparanase and heparin on cancer metastasis and angiogenesis. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 2006. Vol. 35, № 1–2. P. 116–127. <https://doi.org/10.1159/000093553>

97. Bendas G., Borsig L. Heparanase in cancer metastasis – heparin as a potential inhibitor of cell adhesion molecules. Heparanase. Eds. by I. Vlodavsky, R. D. Sanderson, N. Ilan. *Springer Cham.* 2020. Ch. 11. P. 309–329. https://doi.org/10.1007/978-3-030-34521-1_11

98. Norrby K. Low-molecular-weight heparins and angiogenesis. *APMIS.* 2006. Vol. 114, № 2. P. 79–102. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2006.apm_235.x

99. Nasser N. J., et al. Heparanase neutralizes the anticoagulation properties of heparin and low-molecular-weight heparin. *J. Thromb. Haemost.* 2006. Vol. 4, № 3. P. 560–565. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01792.x>

100. Achour O., et al. Anti-heparanase activity of ultra-low-molecular-weight heparin produced by physicochemical depolymerization. *Carbohydr. Polym.* 2016. Vol. 135. P. 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.041>

101. Coombe D. R., Gandhi N. S. Heparanase: a challenging cancer drug target. *Front. Oncol.* 2019. Vol. 9. P. 1316. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01316>

102. Yang Y., et al. Potential roles of heparanase in cancer therapy: current trends and future direction. *J. Cell. Physiol.* 2023. Vol. 238, № 5. P. 896–917. <https://doi.org/10.1002/jcp.30995>

103. Murphy J. F., McGregor J. L. A peptide (P2) derived from the variable heavy chain of an anti-P-selectin monoclonal antibody (LYP20) inhibits leucocyte adhesion to thrombin-activated platelets and endothelial cells. *Brit. J. Haematol.* 2003. Vol. 120, № 4. P. 605–610. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04116.x>

104. Polgar J., Matuskova J., Wagner D. D. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J. Thromb. Haemost.* 2005. Vol. 3, № 8. P. 1590–1596. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01373.x>

105. Borsig L., et al. Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. Vol. 98, № 6. P. 3352–3357. <https://doi.org/10.1073/pnas.061615598>
106. Coupland L. A., Chong B. H., Parish C. R. Platelets and P-selectin control tumor cell metastasis in an organ-specific manner and independently of NK cells. *Cancer Res*. 2012. Vol. 72, № 18. P. 4662–4671. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-4010>
107. Saad A. A. Targeting cancer-associated glycans as a therapeutic strategy in leukemia. *All Life*. 2022. Vol. 15, № 1. P. 378–433. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.08.018>
108. Han J., Saraf S. L., Gordeuk V. R. Systematic review of crizanlizumab: a new parenteral option to reduce vaso-occlusive pain crises in patients with sickle cell disease. *Pharmacotherapy*. 2020. Vol. 40, № 6. P. 535–543. <https://doi.org/10.1002/phar.2409>
109. Marchetti M., et al. Endothelial capillary tube formation and cell proliferation induced by tumor cells are affected by low molecular weight heparins and unfractionated heparin. *Thromb. Res*. 2008. Vol. 121, № 5. P. 637–645. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2007.06.015>
110. Mousa S. A., Mohamed S. Anti-angiogenic mechanisms and efficacy of the low molecular weight heparin, tinzaparin: anti-cancer efficacy. *Oncol. Rep*. 2004. Vol. 12, № 4. P. 683–688.
111. Khorana A. A., et al. Heparin inhibition of endothelial cell proliferation and organization is dependent on molecular weight. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2003. Vol. 23, № 11. P. 2110–2115. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000090671.56682.D7>
112. Chao B. H., Lepeak L., Leal T., Robins H. I. Clinical use of the low-molecular-weight heparins in cancer patients: focus on the improved patient outcomes. *Thrombosis*. 2011. Vol. 2011. P. 530183. <https://doi.org/10.1155/2011/530183>

113. Про захист тварин від жорстокого поводження: Закон України від 06.11.2023 № 3447-IV. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text> (дата звернення 10.07.2024).

114. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe, Strasbourg. 1986:53.

115. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними : монографія / Ю.М. Кожем'якін та ін. ; Київ : Інтерсервіс, 2017. 182 с.

116. Goldin A. Experimental Evaluation of Antitumor Drugs in the USA and USSR and Clinical Correlations. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Cancer Institute. 1980. 179 p.

117. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації; за ред. О. В. Стефанова. Київ : ВД «Авіцена», 2001. 528 с.

118. Пат. 149330 UA, МПК G09B23/28, C12N5/00, C12N15/00. Спосіб перевивки експериментальних пухлин (саркома 45 (S-45) та карциносаркома Уокера W256). Серединська Н. М. [UA], Шарикіна Н. І. [UA], Хавич О. О. [UA], Карацуба Т. А. [UA], Бухтіарова Т. А. [UA], Марченко О. М. [UA]. № u202100710; заявл. 17.02.2021; опубл. 10.11.2021. Бюл. № 46.

119. Suppression of proliferation, tumorigenicity and metastasis of lung cancer cells after their transduction by interferon-beta gene in baculovirus vector. A. A. Lykhova, Y. I. Kudryavets, L. I. Strokovska et al. Cytokine. 2015. V. 71. No. 2. P. 318–326. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.10.029>

120. Вессел Дуге Ф розчин для ін'єкцій 600 ЛО ампула 2 мл №10. URL: <https://compendium.com.ua/dec/273284/4371/> (дата звернення: 14.03.2024)

121. Еноксапарин-Фармекс розчин для ін'єкцій 10000 анти-Ха МО/1 мл флакон багатодозовий 3 мл №1 URL: <https://compendium.com.ua/dec/265103/330868/> (дата звернення: 14.03.2024)

122. Цисплатина Аккорд концентрат для розчину для інфузій 1 мг/мл флакон 50 мл №1. URL: <https://compendium.com.ua/dec/266079/407037/> (дата звернення: 14.03.2024).

123. Фільчаков Ф.В., та ін. Імуно-опосередковані механізми антиметастатичної дії карциномаспецифічного фактора переносу в умовах росту експериментальних пухлин у мишей C57BL/6 . *Клінічна онкологія*. 2014. Т. 13, № 1. С. 53-57.

124. Дослідження крові. URL: <https://rclld.com.ua/analizi/zagalnoklinichni/doslidzhennya-krovi/> (Дата звернення: 07.08.2025)

125. Загальний аналіз крові. URL: <https://artmediuz.od.ua/zagalnii-analiz-krovi-bez-ruchnogo-pidrakhunku-leikotsitarnoyi-formuli-i-shoe>. (Дата звернення: 07.08.2025)

126. RDW (Red Cell Distribution Width) URL: <https://medlineplus.gov/lab-tests/rdw-red-cell-distribution-width/> (Дата звернення: 07.08.2025)

127. Mean Platelet Volume (MPV) Test: Purpose, Results, and More URL: <https://redcliffelabs.com/myhealth/lab-test/mean-platelet-volume-mpv-test-purpose-results-and-more/> (Дата звернення: 07.08.2025)

128. Mean Platelet Volume (MPV) Test: Purpose, Results, and More# Platelet Distribution Width (PDW) Blood Test: Interpretation, Management, and Related Disorders. URL: <https://www.truemedics.in/blog/pdw-blood-test-overview-and-management>. (Дата звернення: 07.08.2025)

129. Decoding P-LCR Blood Test (Platelet-larger Cell Ratio). URL: <https://flabslis.com/blogs/p-lcr-blood-test>. (Дата звернення: 07.08.2025)

130. Modern methods for measuring parameters of blood coagulation. I. A. Bazaev, A. V. Przhiyalgovskaya, P. A. Rudenko et al. *Biomed Eng*. 2015. V. 49, No. 3. P. 136–141. <https://doi.org/10.3171/spi.2002.96.3.0298>

131. Sokolovska AS, Chernyshenko TM, Ivanenko TI. Comparative characteristic of fibrinogen level determination methods in blood plasma. *Exp Clin Physiol Biochem*. 2002; 3: 82-86.

132. Korolova D. S., et al. Thromboelastographic study of fibrin clot and molecular basis of maximum clot firmness. *Ukr. Biochem. J.* 2021, Vol. 93, № 2. P. 62-70. <https://doi.org/10.15407/ubj93.02.062>

133. Rojnik, T., et al. Comparison of antithrombin activity assays in detection of patients with heparin binding site antithrombin deficiency: systematic review and meta-analysis. *Scientific reports.* 2023. Vol. 13, № 1. P. 16734. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43941-x>

134. Hematoxylin and Eosin Stain – For Paraffin-Embedded Tissue Sections / Michael X. Henderson. *Protocols.io.* 2023. URL: <https://www.protocols.io/view/hematoxylin-and-eosin-stain-for-paraffin-embedded-t-kxygx3q9zg8j/v1> (дата звернення: 12.03.2024)

135. Тишин О. Л. Вплив Е-селену на тлі тривалого введення препарату клозаверм-а на показники метафазного аналізу клітин кісткового мозку щурів. *Найковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького.* 2012. Том 14, Вип. 52, № 2. С. 149-153.

136. Ahluwalia N. W., Kakkar N., Kwart K. S. A Comparative Study of Bone Marrow Squash and Wedge Aspiration Smears. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2021. Vol. 37. P. 108-118. <https://doi.org/10.1007/s12288-020-01321-9>

137. Statistic Kingdom. URL: <https://www.statskingdom.com/> (дата звернення: 20.06.2025)

138. O'Dwyer R., et al. Split-Dose Cisplatin in Patients with Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma: A Systematic Literature Review and Network Meta-Analysis. *Clinical Genitourinary Cancer.* 2024. Vol. 22, № 6. P. 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2024.102176>

139. Falanga A., Brenner B., Khorana A.A., Francis C.W. Thrombotic complications in patients with cancer: Advances in pathogenesis, prevention, and treatment-A report from ICTHIC 2021. *Res Pract Thromb Haemost.* 2022. Vol 6, № 5. P. 1-8. <https://doi.org/10.1002/rth2.12744>

140. Tumor Lysis Syndrome / Adeyinka A., Kaur A., Bashir K. *StatPearls Publishing.* 2025. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30085527/>. (Date of

access: 14.08.2025).

141. Sato N., et al. Acute aortic thrombosis in the ascending aorta after cisplatin-based chemotherapy for esophageal cancer: a case report. *Surg Case Rep.* 2022. Vol 8, № 1. P. 1-5. <https://doi.org/10.1186/s40792-022-01431-8>.

142. Valiyaveetil D., et al. Cisplatin induced cerebral sinus venous thrombosis in cervical cancer patients treated with concurrent chemoradiation: a case series. *Ecancermedicalsecience.* 2021. Vol. 15, P. 1-6. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2021.1320>.

143. Севідов В. В., Касевич Н. М. Онкологія: підручник; за ред. проф. В. П. Баштана. 3-є вид. виправл. Київ: ВСВ «Медицина», 2015. 232 с.

144. Wang T.F., Connors J.M. The Pursuit of "Best" Anticoagulant for Cancer-Associated Thrombosis: Are We There Yet? *JACC CardioOncol.* 2024 Vol 6, № 1. P. 114-116. <https://doi.org/10.1016/j.jaccao.2023.12.001>

145. Fujisaki T., et al. Comparing Anticoagulation Strategies for Venous Thromboembolism Associated with Active Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JACC CardioOncol.* 2024. Vol 6, № 1. P. 99-113. <https://doi.org/10.1016/j.jaccao.2023.10.009>

146. Lasierira-Cirujeda J., Coronel P., Aza M., Gimeno M. Use of sulodexide in patients with peripheral vascular disease. *J Blood Med.* 2010. Vol 1. P. 105-15. <https://doi.org/10.2147/JBM.S10558>.

147. Hejna M., Raderer M., Zielinski C. C. Inhibition of Metastases by Anticoagulants. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* 1999. Vol. 91. № 1. P. 22-36. <https://doi.org/10.1093/jnci/91.1.22>

148. Пуськов О.М., Мунько М.А., Карацуба Т.А. Вплив антикоагулянтів прямої дії на процеси метастазування. *Фармакологія та лікарська токсикологія.* 2024. № 1 т. 18. С. 43-52.

149. Мунько М.А. Фармакологічна модуляція первинного пухлинного росту та метастатичної прогресії карциноми легень Льюїс антикоагулянтами прямої дії на фоні застосування цисплатину. *Фармакологія та лікарська токсикологія.* 2025. № 3 т. 19. С. 249-257. <https://doi.org/10.33250/19.03.249>

150. Wang N., et al Research trends in pharmacological modulation of tumor-associated macrophages.. *Clinical and Translational Medicine*. 2021. Vol. 11, № 1. P. 1-41. <https://doi.org/10.1002/ctm2.288>
151. Lin P.I., et al. Pharmacological Modulation of Mutant *TP53* with Oncotargets Against Esophageal Cancer and Therapy Resistance. *Biomedicines*. 2025. Vol. 13, № 2. P. 1-12. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13020450>
152. Tagliaferri P., et al. Pharmacological modulation of peptide growth factor receptor expression on tumor cells as a basis for cancer therapy. *Anticancer Drugs*. 1994. Vol. 5, № 4. P. 379-393. <https://doi.org/10.1097/00001813-199408000-00001>
153. Berta, D.M., *et al.* Hematological changes in women with cervical cancer before and after cancer treatment: retrospective cohort study. *Sci Rep*. 2024. Vol. 14. P. 27630 <https://doi.org/10.1038/s41598-024-75937-6>
154. Gunaldi M., et al. Platelet Distribution Width as a Predictor of Metastasis in Gastric Cancer Patients. *J Gastrointest Canc*. 2017. Vol 48. P. 341-346. <https://doi.org/10.1007/s12029-016-9886-5>.
155. 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. Vol. 16, № 17. P. 7599-602. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.17.7599>.
156. Wang J., C. Zhu. Anticoagulation in combination with antiangiogenesis and chemotherapy for cancer patients: evidence and hypothesis. *Onco Targets Ther*. 2016. Vol. 9. P. 4737–4746. <https://doi.org/10.2147/OTT.S103184>. eCollection 2016.
157. Surma S., Banach M. Fibrinogen and Atherosclerotic Cardiovascular Diseases—Review of the Literature and Clinical Studies. *Int. J. Mol. Sci*. 2022. Vol. 23 № 193. P 1-20. <https://doi.org/10.3390/ijms23010193>.
158. Falanga A., Marchetti M., Vignoli A. Coagulation and cancer: biological and clinical aspects. *J. Thromb. Haemost*. 2013. Vol. 11, № 2. P. 223-233. <https://doi.org/10.1111/jth.12075>.

159. Machlus, K. R., Italiano Jr. J. E. Megakaryocyte Development and Platelet Formation. *Platelets* / ed. by A.D. Michelson. 4th ed. Academic Press, 2019. P. 25–46.

160. Machlus, K. R., Italiano Jr. J. E. Machlus, K. R. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol.* 2013. Vol. 201, № 6. P. 785–796.

161. Moik F., Ay C. Hemostasis and cancer: Impact of haemostatic biomarkers for the prediction of clinical outcomes in patients with cancer. *J Thromb Haemost.* 2022. Vol. 20, № 12. P. 2733-2745. <https://doi.org/10.1111/jth.15880>.

162. Sohal S., Thakur A., Zia A., Sous M., Trelles D. Disseminated Intravascular Coagulation and Malignancy: A Case Report and Literature Review. *Case Rep Oncol Med.* 2020. № 9147105. P. 1-5. <https://doi.org/10.1155/2020/9147105>.

163. Levi M. Management of cancer-associated disseminated intravascular coagulation. *Thrombosis Research.* 2016. Vol. 140. P. 66-70. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(16\)30101-3](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(16)30101-3).

Додаток А1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Перший проректор
Дніпровського державного медичного
університету
професор Ігор Шпонька

2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
результатів, отриманих у дисертаційній роботі,
у навчальний процес і наукову роботу

- Назва пропозиції для впровадження:** Вивчення ефектів прямих антикоагулянтів сулодексиду та еноксапарину в поєднанні з цисплатином на метастазуючій моделі експериментального пухлинного росту.
- Установа, її адреса, виконавці:** ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ, 0357, вулиця Антона Цедіка, 14, аспірант Мунько Максим Андрійович, к. біол. н. Карацуба Тетяна Анатоліївна.
- Джерела інформації:**
 - Мунько М.А. Вплив антикоагулянта прямої дії еноксапарину на метастатичну активність карциноми легень Льюїс. *Вісник проблем біології та медицини*. 2024. Вип. 1, №172. С. 194-203. doi: 10.29254/2077-4214-2024-1-172-194-203.
 - Мунько М.А., Карацуба Т.А. Метастатична активність карциноми легень Льюїс за впливу антикоагулянтів прямої дії на тромбоцитарний гемостаз і коагуляційну активність крові. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2024. № 3 т. 18. С. 175-184. doi: 10.33250/18.03.175.
 - 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. *Вісник проблем біології та медицини*. 2025. Вип. 1, №176. С. 116-127. doi: 10.29254/2077-4214-2025-1-176-116-127.
 - Мунько М.А. Фармакологічна модуляція первинного пухлинного росту та метастатичної прогресії карциноми легень Льюїс антикоагулянтами прямої дії на фоні застосування цисплатину. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2025. № 3 т. 19. С. 249-257. doi: 10.33250/19.03.249.
- Де і коли впроваджено:** Кафедра фармакології, загальної та клінічної фармації Дніпровського державного медичного університету у лекційному курсі та при проведенні практичних занять з теми «Протипухлинні лікарські засоби».
- Термін впровадження:** протягом 2025 р.
- Форма впровадження пропозиції:** у навчальний процес та наукову роботу.
- Результати впровадження:** отримані дані дозволяють розширити уявлення про участь паранеопластичного гіперкоагуляційного синдрому в патогенезі метастазування та антиметастатичні ефекти антикоагулянтів.
- Зауваження, пропозиції:** не вносились.
- Обговорено та затверджено на засіданні структурного підрозділу:**

Протокол № №1 від « 29 » вересня 2025 р.

Відповідальний за впровадження:

Професор кафедри фармакології,
загальної та клінічної фармації
Дніпровського державного медичного
університету, д.мед.н., професор

(Підпис)

Володимир ЖИЛЮК

Додаток А2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор

Навчально-наукового центру

«Інститут біології та медицини»

Київського національного

університету

імені Тараса Шевченка



Дмитро ЛУКАШОВ

« 20 ____ р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результатів, отриманих у дисертаційній роботі, у навчальний процес

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Вивчення ефектів прямих антикоагулянтів сулодексиду та еноксапарину в поєднанні з цисплатином на метастазуючій моделі експериментального пухлинного росту.
2. **Установа, її адреса, виконавці:** ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ, 0357, вулиця Антона Цедіка, 14
аспірант Мунько Максим Андрійович, канд. біол. наук Карацуба Тетяна Анатоліївна.
3. **Джерела інформації:**
 - Мунько М.А. Вплив антикоагулянта прямої дії еноксапарину на метастатичну активність карциноми легень Льюїс. Вісник проблем біології та медицини. 2024. Вип. 1, №172. С. 194-203. doi: 10.29254/2077-4214-2024-1-172-194-203.
 - Мунько М.А., Карацуба Т.А. Метастатична активність карциноми легень Льюїс за впливу антикоагулянтів прямої дії на тромбоцитарний гемостаз і коагуляційну активність крові. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2024. № 3 т. 18. С. 175-184. doi: 10.33250/18.03.175.
 - 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. *Вісник проблем біології та медицини*. 2025. Вип. 1, №176. С. 116-127. doi: 10.29254/2077-4214-2025-1-176-116-127.
 - Мунько М.А. Фармакологічна модуляція первинного пухлинного росту та метастатичної прогресії карциноми легень Льюїс антикоагулянтами прямої дії на фоні застосування цисплатину. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2025. № 3 т. 19. С. 249-257. doi: 10.33250/19.03.249.

Додаток А2 (продовження)

4. Де і коли впроваджено: ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка (вул. Володимирська, 64/13, Київ, 01601).
5. Термін впровадження: протягом 2025 р.
6. Форма впровадження пропозиції: у наукову та навчальну роботу.
7. Результати впровадження: використання отриманих наукових даних у дослідницький та освітній діяльності дозволяє розширити уявлення про участь паранеопластичного гіперкоагуляційного синдрому в патогенезі метастазування та антиметастатичні ефекти антикоагулянтів прямої дії та за умов їх сумісного застосування з протипухлинними препаратами.
8. Зауваження, пропозиції: не вносились.
9. Обговорено та затверджено на засіданні структурного підрозділу: кафедра біохімії.

Протокол № 2 від «09» вересня 2025 р.

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри біохімії,
д-р біол. наук, професор



Олексій САВЧУК

Додаток АЗ



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

В.о. проректора з науково-педагогічної роботи
Одеського національного медичного
університету, к.мед.н., доцент
Катерина НІТОЧКО
" " 2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ результатів, отриманих у дисертаційній роботі

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Вивчення ефектів прямих антикоагулянтів сулодексиду та еноксапарину в поєднанні з цисплатином на метастазуючій моделі експериментального пухлинного росту.
2. **Установа, її адреса, виконавці:** ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ, 0357, вулиця Антона Цедіка, 14 аспірант Мунько Максим Андрійович, к. біол. н. Карацуба Тетяна Анатоліївна.
3. **Джерела інформації:**
 - Мунько М.А. Вплив антикоагулянта прямої дії еноксапарину на метастатичну активність карциноми легень Льюїс. *Вісник проблем біології та медицини*. 2024. Вип. 1, №172. С. 194-203. doi: 10.29254/2077-4214-2024-1-172-194-203.
 - Мунько М.А., Карацуба Т.А. Метастатична активність карциноми легень Льюїс за впливу антикоагулянтів прямої дії на тромбоцитарний гемостаз і коагуляційну активність крові. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2024. № 3 т. 18. С. 175-184. doi: 10.33250/18.03.175.
 - 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. *Вісник проблем біології та медицини*. 2025. Вип. 1, №176. С. 116-127. doi: 10.29254/2077-4214-2025-1-176-116-127.
 - Мунько М.А. Фармакологічна модуляція первинного пухлинного росту та метастатичної прогресії карциноми легень Льюїс антикоагулянтами прямої дії на фоні застосування цисплатину. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2025. № 3 т. 19. С. 249-257. doi: 10.33250/19.03.249.
4. **Впроваджено:** у освітньо-науковий процес кафедри загальної і клінічної фармакології та фармакогнозії Одеського національного медичного університету (ОНМедУ). Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології та фармакогнозії ОНМедУ, протокол №1 від «28» серпня 2025р.
5. **Термін впровадження:** 2025-2026 навчальний рік.
6. **Результати впровадження:** використання отриманих наукових даних у дослідницький та освітній діяльності дозволяє розширити уявлення про антиметастатичні ефекти антикоагулянтів прямої дії та за умов їх сумісного застосування з протипухлинними препаратами.
7. **Зауваження, пропозиції:** не вносились.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри загальної і клінічної фармакології
та фармакогнозії Одеського національного
медичного університету
д. мед. наук, професор



Ярослав РОЖКОВСЬКИЙ

Додаток Б

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Пуськов О. М., Мунько М. А., Карацуба Т. А. Вплив сулодексиду на ріст і метастазування карциноми легень Льюїс: збірник тез доповідей Міжнародної науково-практичної конференції «Стратегічні пріоритети розвитку науки, освіти, технологій і суспільства» Частина 2, 9 листопада 2023 р. м. Полтава. С. 34-36.

2. Мунько М.А., Пуськов О.М., Карацуба Т.А. Метастатична активність карциноми легень Льюїс за умов застосування антикоагулянта прямої дії еноксапарину. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція*: матеріали VI науково-практичної internet-конференції з міжнародною участю, м. Харків, 16 листопада 2023 р. / НФаУ, 2023. С. 330-331.

3. Мунько М.А. Вплив антикоагулянта прямої дії еноксапарину на метастатичну активність карциноми легень Льюїс. Вісник проблем біології та медицини. 2024. Вип. 1, №172. С. 194-203. <http://doi.org/10.29254/2077-4214-2024-1-172-194-203> (Дисертантом проведено аналіз літератури, проведення експериментальних досліджень, обговорення, підготовка тексту статті до друку).

4. Пуськов О.М., Мунько М.А., Карацуба Т.А. Вплив антикоагулянтів прямої дії на процеси метастазування. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2024. № 1 т. 18. С. 43-52. <https://doi.org/10.33250/18.01.043>. (Дисертантом проведено аналіз літератури, обговорення, підготовка тексту статті до друку).

5. Мунько М.А., Карацуба Т.А. Метастатична активність карциноми легень Льюїс за впливу антикоагулянтів прямої дії на тромбоцитарний гемостаз і коагуляційну активність крові. *Фармакологія та лікарська*

токсикологія. 2024. № 3 т. 18. С. 175-184. doi: 10.33250/18.03.175 <http://doi.org/10.33250/18.03.175>. (Дисертантом проведено аналіз літератури, проведення експериментальних досліджень, обговорення, підготовка тексту статті до друку).

6. Мунько М.А., Карацуба Т.А. Метастатична активність карциноми легень Льюїс за впливу антикоагулянтів прямої дії на тромбоцитарний гемостаз і коагуляційну активність крові. *Актуальні питання фармакології та лікарської токсикології: тези допов. науково-практичної конференції молодих учених із міжнародною участю, 25-26 вересня 2024, Київ / ДУ «ІФТ НАМНУ», 2024. С. 226-228.*

7. Мунько М.А., Пуськов О.М., Карацуба Т.А. Синдром дисемінованого внутрішньосудинного зсідання крові на тлі метастазування карциноми легень Льюїс. *Експериментальна та клінічна фармакологія: тези допов. науково-практичної конференції, присвяченої 100-річчю кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету, 23-24 жовтня 2024. Харків / НФаУ, 2024. С. 73-76.*

8. 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. *Вісник проблем біології та медицини. 2025. Вип. 1, №176. С. 116-127. <http://doi.org/10.29254/2077-4214-2025-1-176-116-127>. (Дисертантом проведено аналіз літератури, проведення експериментальних досліджень, обговорення, підготовка тексту статті до друку).*

9. Мунько М.А., Карацуба Т.А. Модуляція метастатичної активності карциноми легень Льюїс антикоагулянтом прямої дії сулодексидом на фоні застосування цисплатину. *Сучасні наукові дослідження: від теорії до практики: тези допов. науково-практичної конференції, 27-28 червня 2025, Одеса / Видавництво «Молодий вчений», 2025. С. 18-22.*

10. Мунько М.А. Фармакологічна модуляція первинного пухлинного росту та метастатичної прогресії карциноми легень Льюїс антикоагулянтами

прямої дії на фоні застосування цисплатину. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2025. № 3 т. 19. С. 249-257. <https://doi.org/10.33250/19.03.249>.

(Дисертантом проведено аналіз літератури, проведення експериментальних досліджень, обговорення, підготовка тексту статті до друку).

ДОДАТОК В

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Міжнародної науково-практичної конференції «Стратегічні пріоритети розвитку науки, освіти, технологій і суспільства» (Полтава, 9 листопада 2023 р.). — публікація тез доповіді.
2. VI науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція», м. Харків, 16 листопада 2023 р. — публікація тез доповіді.
3. Науково-практична конференція молодих учени із міжнародною участю «Актуальні питання фармакології та лікарської токсикології», Київ, 25-26 вересня 2024. — Доповідь, публікація тез доповіді.
4. Науково-практична конференція «Експериментальна та клінічна фармакологія», присвячена 100-річчю кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету, Харків 23-24 жовтня 2024 р. — публікація тез доповіді.
5. Науково-практична конференція «Сучасні наукові дослідження: від теорії до практики», Львів, 27-28 червня 2025 р. — публікація тез доповіді.