

О.А. Главін
Л.І. Маковецька
В.М. Михайленко

Інститут експериментальної
патології, онкології
і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: екзогенні оксиди азоту, фракціоноване іонізуюче випромінювання, карцинома легені Льюїс, первинна пухлина, метастазування.

ВПЛИВ ЕКЗОГЕННИХ ОКСИДІВ АЗОТУ ТА ФРАКЦІОНОВАНОГО ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА РІСТ І МЕТАСТАЗУВАННЯ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬЮІС

Екзогенні оксиди азоту (ОА) та малі дози іонізуючого випромінювання (ІВ) належать до поширених забруднювачів навколишнього середовища, що можуть впливати на систему протипухлинного захисту організму та ріст пухлин. **Мета роботи:** дослідити поєднаний вплив екзогенних ОА та малих доз ІВ на ріст і метастазування карциноми легені Льюїс (КЛЛ) і виживаність експериментальних тварин. **Об'єкт і методи:** дослідження проведено на мишах-самцях лінії $C_{57}Bl_6$. Тварини, яким перещеплювали КЛЛ, зазнавали впливу екзогенних ОА (8 год/добу, 25 мг/м³ повітря до 11-ї чи 28-ї доби росту КЛЛ) та ІВ (сумарно 1 Гр по 0,1 Гр). Вивчали ріст первинної пухлини (ПП), інтенсивність метастазування на 28-му добу та аналізували виживаність тварин. **Результати:** фракціоноване опромінення призводило до гальмування росту ПП, знижувало її метастатичний потенціал і підвищувало виживаність експериментальних тварин. За короткотривалого впливу ОА спостерігали активацію росту тільки ПП. Довготривала дія ОА призводила до аналогічних (але більш виражених) змін росту ПП, активації метастазування та підвищення смертності мишей. Найбільші зміни відбувалися за поєданого впливу чинників. При довготривалій дії ОА зафіксовано адитивний ефект їхнього окремого впливу. **Висновки:** короткотривалій вплив екзогенних ОА підвищував інтенсивність росту ПП КЛЛ, а їхня тривала дія додатково призводила до активації процесів метастазування. Поєднана дія факторів (ОА та ІВ) за тривалого надходження екзогенних ОА супроводжувалася сумациєю їх ефектів на процеси росту та метастазування КЛЛ і викликала підвищення рівня загибелі тварин.

ВСТУП

Екзогенні оксиди азоту (ОА) та малі дози іонізуючого випромінювання (ІВ) є поширеними забруднювачами навколишнього середовища. Окремий вплив цих небезпечних факторів на пухлинний процес вивчали в низці наукових досліджень. Однак отримані результати були неоднозначними та залежали як від обраних для дослідження моделей, так і від режимів впливу факторів. Показано, що при фракційному опроміненні мишей лінії $C_{57}Bl_6$ з карциномою легені Льюїс (КЛЛ) у великій сумарній дозі 18 Гр збільшення проміжків між опроміненнями призводить до зниження протипухлинного ефекту та виживаності тварин [1]. Є суперечливі дані про вплив NO на розвиток різних типів пухлин [2, 3]. На моделі КЛЛ у мишей лінії $C_{57}Bl_6$ показано, що комбінація високо- та низькодозової радіаційної терапії призводить до значного збільшення терміну виживаності мишей, зменшення розмірів пухлин, ступеня ангиогенезу та інтенсивності метастазування і супроводжується активацією імунної системи тварин [4].

Відмічено, що NO зазвичай виступає як промотор пухлинного росту при тривалій дії мікромолярних концентрацій та як інгібітор пухлинного росту при мілімолярних концентраціях [5]. На клітинних лініях карциноми легені H292 та H460 показали [6], що підвищена концентрація NO призводить до морфологічних змін, спрямованих у бік набуття клітинами мезенхімального фенотипу, подібно до стовбурових. Для КЛЛ продемонстровано підвищення вмісту нітритів і нітрозамінів у пухлинних клітинах (ПК) у перший тиждень росту. Наступне зниження їх вмісту корелює з прискоренням росту первинної пухлини (ПП) [7], а нормалізація рівня дериватів NO або їх гіперпродукція веде до супресії пухлинного росту [8]. З іншого боку, клітини КЛЛ є стійкими до дії NO та мають високий метастатичний потенціал. Показано, що як екзогенний, так і ендогенний NO підвищують полімеризацію актину, знижують лабільність клітин КЛЛ і заважають їхньому інтенсивному метастазуванню [9].

Значний інтерес до комбінованого впливу ОА та ІВ зумовлений радіосенсибілізувальною дією монооксид-

ду азоту (NO). Існує пряма кореляція між вмістом NO та радіосенсибілізувальним ефектом. Вважається, що NO, як і кисень, є додатковим фактором, який зумовлює чутливість до радіаційного випромінювання [10].

Слід враховувати, що в більшості досліджень вивчали ефекти, які виникають при змінах у синтезі ендogenous NO внаслідок активації та інгібування NO-синтаз (NOS), або використовували донори та пастки NO. Це не відповідає повною мірою надходженню в організм суміші ОА з повітрям. Тому метою цього дослідження було вивчити поєднаний вплив екзогенних ОА та фракційного γ -випромінювання в малих дозах на ріст і метастазування КЛЛ в експериментальних тварин.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Синтез NO проводили в реакції 20% розчину сірчанокислого заліза (II) із сумішшю концентрованої соляної кислоти та 40% нітриту натрію. Отриманий газ очищували від парів кислоти 10% розчином їдко-го натрію та зберігали у скляних герметичних флаконах [11].

У досліді використовували самців мишей лінії $C_{57}Bl_6$ середньої масою 22 г віком 6 тиж розведення віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук України (ІЕПОР НАНУ). Процедури з експериментальними тваринами здійснювали згідно з вимогами Державного комітету з етики.

Використовували клітини КЛЛ із Клітинного банку ліній з тканин людини та тварин ІЕПОР НАНУ. Перещеплення ПК мишам по $3,0 \cdot 10^5$ клітин на тварину в 0,2 мл хлориду натрію проводили відповідно до стандартних методик [12, 13]. Інгаляція тварин ОА: у камеру об'ємом 100 л двома окремими шляхами подавали суміш NO з азотом (1:6) і повітря. Подачу повітря здійснювали зі швидкістю, що забезпечувала у камері 5-разовий газообіг за 1 год. У камері суміш NO з азотом змішувалася з повітрям за допомогою вентилятора та частково окислювалася з утворенням інших ОА. Середня концентрація ОА (у перерахунку на NO) становила 25 мг/м^3 повітря. Контроль вмісту ОА в інгаляційній камері проводили згідно з посібником із контролю забруднення атмосфери [14], концентрацію нітрит-іону визначали за методом Грісса [15]. При концентрації ОА 25 мг/м^3 частка NO у повітрі становила 65–75%, тривалість перебування тварин в інгаляційній камері — 8 год/добу. Застосовано 2 режими впливу ОА: 33 сеанси (з 5-ї доби до перещеплення тваринам КЛЛ до 27-ї доби росту пухлини включно); 16 сеансів (з 5-ї доби до перещеплення КЛЛ до 10-ї доби пухлинного росту, що відповідає фазі дисемінації ПК).

Опромінення тварин проводили фракціоновано у сумарній дозі 1,0 Гр — 10 разів по 0,1 Гр протягом 28 діб. Перше опромінення здійснювали за 4 доби до перещеплення клітин КЛЛ, останнє — на 23-тю добу росту КЛЛ. Доза опромінення на момент пе-

рещеплення пухлини становила 0,2 Гр. Як джерело γ -випромінювання використовували апарат РУМ-17 (напруга на трубці — 200 кВ, струм — 10 мА, фільтр — 0,5 мм Cu + 1 мм Al, шкірно-фокусна відстань — 50 см, потужність дози випромінювання — 0,89 Гр/хв).

Проведено 2 серії досліджень, які відрізнялися тривалістю дії на тварин ОА. У 1-й серії тривалість дії ОА становила 33 доби (до закінчення експерименту), у 2-й вплив ОА було зупинено через 16 діб на початку фази активного метастазування пухлини. Кожна серія складалася з 4 груп експериментальних тварин: 1 — тварини з КЛЛ (позитивний контроль); 2 — КЛЛ + ІВ; 3 — КЛЛ + ОА; 4 — КЛЛ + ОА + ІВ. Визначали початкову та кінцеву чисельність тварин у групах і кількість загинув тварин (табл. 1), динаміку росту пухлин і частоту метастазування КЛЛ.

Таблиця 1

Початкова та кінцева кількість тварин у дослідженні

Групи тварин	1-ша серія		2-га серія	
	Початок	Загинуло	Початок	Загинуло
1. КЛЛ	23	2	18	1
2. КЛЛ + ІВ	20	1	20	1
3. КЛЛ + ОА	37	9	28	6
4. КЛЛ + ОА + ІВ	40	13	33	3

Вимірювання розмірів ПП проводили 1 раз на 2 доби з 6-ї по 28-му добу росту КЛЛ. Для визначення кількості та розмірів метастазів (М) легені тварин, що були забиті на 28-му добу росту КЛЛ, фіксували в розчині Буена і зберігали при 4 °С. Підрахунок М і вимірювання їх розмірів проводили з використанням мікроскопа ($\times 40$). Об'єм ПП (V_o) розраховували за формулою:

$$V_o = \frac{D \cdot Ш \cdot B \cdot \pi}{6},$$

де D , $Ш$ і B — відповідно довжина, ширина та висота пухлини. Об'єм M (V_m) обчислювали за формулою:

$$V_m = \frac{D^3 \cdot \pi}{6},$$

де D — діаметр M . Визначали частоту метастазування (відношення кількості тварин із M до загальної кількості тварин у групі); середню кількість M на тварину; середній об'єм M на тварину; а також індекс метастазування (ІМ) за формулою:

$$IM = \frac{(A \cdot B - A_k \cdot B_k)}{(A_k \cdot B_k)} \cdot 100\%,$$

де A та A_k — частота метастазування в дослідній і контрольній групах, відповідно B і B_k — середня кількість M на 1 тварину в групах. Додатні значення ІМ свідчать про активацію, а від'ємні — про інгібування процесів метастазування пухлин у легені.

Статистичну обробку виконано з використанням t -тесту за параметричним (Student) і непараметричним (Mann — Whitney) методами. Наявність впливу ОА та/або ІВ на ріст ПП КЛЛ оцінювали з використанням методу двофакторного дисперсійного аналізу за результатами росту пухлини у тварин, які знаходилися в дослідженні до його закінчення [16].

Факторами вважали наявність того чи іншого впливу на тварин і тривалість росту ПП (з 10-ї по 28-му добу). Для обробки результатів виживаності мишей використовували процедуру Каплана — Мейера, порівняння виживаності в експериментальних групах проводили за непараметричним критерієм Гехана з використанням поправки Йейтса [17].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Початок росту КЛЛ в експериментальних мишей зафіксовано на 10-ту добу після перещеплення тваринам ПК. Результати представлено на рис. 1 та в табл. 2 і 3.

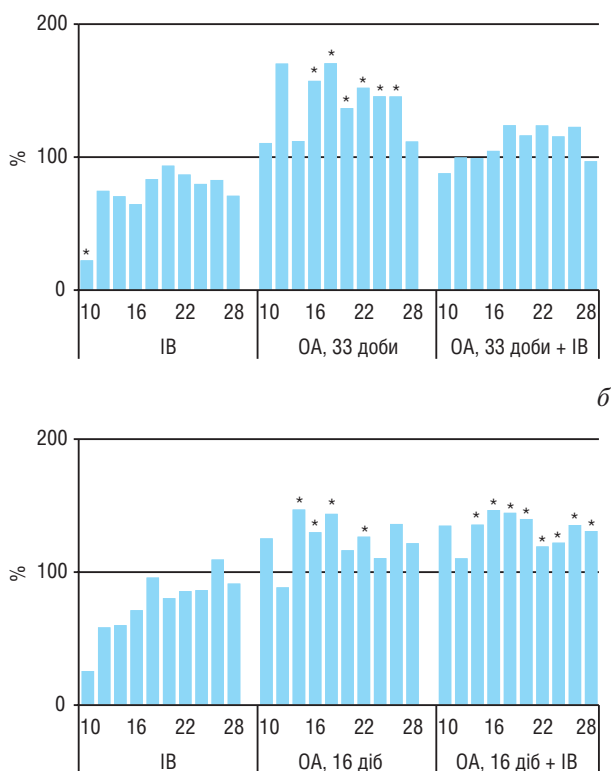


Рис. 1. Зміни росту ПП КЛЛ за тривалої (а) та короткої (б) дії ОА та/або ІВ (відносно контрольної групи). За 100% прийнято середній розмір ПП у контрольній групі КЛЛ. *Достовірна різниця ($p < 0,05$) з контрольною групою

Тривала дія екзогенних ОА призводила до стійких достовірних змін інтенсивності росту ПП (у 1,4–1,7 раза; $p < 0,05$) з 16-ї по 26-ту добу. Максимальну активацію росту (в 1,7 раза) зареєстровано на 18-ту добу після перещеплення КЛЛ. При опроміненні тварин розміри ПП були менші за контрольні, однак достовірно зменшення ($p < 0,05$) відзначали лише на самому початку росту КЛЛ — гальмування у 4,4 раза на 10-ту добу. У подальшому такі зміни були на рівні тенденції із затримкою росту в 1,1–1,5 раза. У разі поєднаної дії цих двох факторів зафіксовано сумачію їх окремого впливу з тенденцією до незначного гальмування росту ПП КЛЛ на 10-ту добу та активації з 16-ї по 26-ту добу (збільшення розмірів від 4 до 24%). Двофакторний дисперсійний аналіз змін розмірів ПП у тварин, що вижили

протягом експерименту, показав наявність достовірного ($p < 0,05$) гальмування росту пухлин у групі КЛЛ + ІВ порівняно з іншими експериментальними групами. Також достовірною ($p < 0,05$) була різниця в рості ПП у групах КЛЛ + ОА + ІВ і КЛЛ + ОА, чого не зафіксовано при аналізі результатів за проміжними термінами дослідження.

Таблиця 2

Ріст ПП КЛЛ за тривалого впливу ОА та фракціонованої дії малих доз ІВ (1-ша серія)

Термін росту пухлини (дів)	Середній розмір ПП (мм ³) та кількість тварин у групі (n)**			
	КЛЛ	КЛЛ + ІВ	КЛЛ + ОА	КЛЛ + ОА + ІВ
10	18 ± 6 ^{2*} (19)	4 ± 2 ¹ (16)	20 ± 5 (31)	16 ± 4 (27)
12	34 ± 8 (19)	26 ± 9 (16)	58 ± 11 (31)	34 ± 8 (27)
14	216 ± 41 (19)	152 ± 32 (16)	242 ± 23 (30)	214 ± 35 (27)
16	450 ± 64 ³ (15)	291 ± 71 (11)	708 ± 40 ¹ (24)	471 ± 48 (25)
18	747 ± 78 ³ (15)	623 ± 116 (11)	1274 ± 81 ¹ (24)	926 ± 58 (24)
20	1294 ± 156 ³ (14)	1211 ± 236 (11)	1770 ± 124 ¹ (23)	1505 ± 161 (24)
22	1709 ± 156 ³ (14)	1486 ± 225 (11)	2601 ± 206 ¹ (22)	2118 ± 161 (22)
24	2700 ± 237 ³ (10)	2156 ± 463 (8)	3933 ± 229 ¹ (19)	3121 ± 244 (16)
26	3284 ± 253 ³ (10)	2720 ± 633 (8)	4783 ± 311 ¹ (18)	4031 ± 318 (13)
28	5076 ± 367 (9)	3606 ± 907 (8)	5673 ± 248 (14)	4922 ± 412 (11)

*Номер групи, відносно якої відмінності достовірні ($p < 0,05$): 1 – КЛЛ, 2 – КЛЛ + ІВ, 3 – КЛЛ + ОА.

**У дужках наведено кількість експериментальних тварин за групами на момент вимірювання розмірів ПП.

Таблиця 3

Ріст ПП КЛЛ за короткотривалого впливу ОА та фракціонованої дії малих доз ІВ (2-га серія)

Термін росту пухлини (дів)	Середній розмір ПП (мм ³) та кількість тварин у групі (n)**			
	КЛЛ	КЛЛ + ІВ	КЛЛ + ОА	КЛЛ + ОА + ІВ
10	5 ± 2 (15)	1 ± 1 ^{3,4} (17)	7 ± 2 ² (28)	8 ± 2 ² (29)
12	118 ± 28 (15)	75 ± 13 ⁴ (16)	113 ± 14 (28)	142 ± 19 ² (29)
14	321 ± 50 ^{3,4*} (15)	210 ± 30 ^{3,4} (16)	515 ± 52 ^{1,2} (27)	475 ± 39 ^{1,2} (28)
16	664 ± 88 ^{3,4} (11)	515 ± 108 ^{3,4} (12)	941 ± 83 ^{1,2} (24)	1062 ± 75 ^{1,2} (24)
18	1058 ± 165 ^{3,4} (11)	1104 ± 159 ^{3,4} (12)	1660 ± 132 ^{1,2} (22)	1669 ± 100 ^{1,2} (24)
20	1666 ± 186 ⁴ (11)	1457 ± 242 ^{3,4} (12)	2115 ± 180 ² (20)	2543 ± 123 ^{1,2} (24)
22	2218 ± 247 ^{3,4} (10)	2068 ± 308 ^{3,4} (12)	3062 ± 233 ^{1,2} (20)	2884 ± 127 ^{1,2} (24)
24	2811 ± 334 ⁴ (6)	2647 ± 425 ⁴ (8)	3384 ± 279 (16)	3744 ± 220 ^{1,2} (18)
26	2726 ± 621 ⁴ (5)	3250 ± 458 (8)	4051 ± 315 (15)	4026 ± 226 ¹ (17)
28	3715 ± 444 ⁴ (5)	3695 ± 467 ³ (8)	4928 ± 341 ² (13)	5302 ± 307 ^{1,2} (17)

*Номер групи, відносно якої відмінності достовірні ($p < 0,05$): 1 – КЛЛ, 2 – КЛЛ + ІВ, 3 – КЛЛ + ОА, 4 – КЛЛ + ОА + ІВ.

**У дужках наведено кількість експериментальних тварин за групами на момент вимірювання розмірів ПП.

У 2-й серії досліджень за окремого опромінення тварин, як і в 1-й серії, зареєстровано тенденцію до гальмування росту ПП відносно контрольної групи. Воно особливо виражено на 10-ту (у 3,6 раза; $p < 0,05$) та 12–14-ту добу (в 1,6 та 1,5 раза). Водночас скорочення терміну впливу ОА (до 10-ї доби росту КЛЛ) призводило до менш вираженої активації росту ПП за окремої дії цього фактора — достовірні відмінності від контрольної групи спостерігали з 14-ї

до 22-ї доби (збільшення розмірів у 1,4–1,6 раза). У разі поєднаної дії ОА та опромінення спостерігали синергізм їхнього впливу з більш стабільним ефектом активації швидкості росту ПП з 14-ї доби після перещеплення до закінчення експерименту (в 1,3–1,6 раза; $p < 0,05$). Також слід відзначити, що розміри ПП у групі КЛЛ + ІВ були достовірно меншими ($p < 0,05$), ніж у групах КЛЛ + ОА (з 14-ї по 22-гу та на 28-му добу росту пухлини) та КЛЛ + ОА + ІВ (з 14-ї по 24-ту та на 28-му добу). Використання двофакторного дисперсійного аналізу для оцінки росту ПП показало, що в групі КЛЛ + ОА + ІВ швидкість росту КЛЛ була достовірно вищою ($p < 0,05$) порівняно з групою КЛЛ + ОА.

Таким чином, опромінення мишей із КЛЛ призводило до гальмування росту ПП, а надходження до організму тварин екзогенних ОА, навпаки, прискорювало її ріст. Цей ефект був більш стабільним за умов тривалішого надходження ОА до організму експериментальних тварин. За поєднаної дії ОА та ІВ більш тривале надходження ОА до організму тварин супроводжувалося адитивним ефектом протилежного впливу цих факторів на ріст первинного пухлинного вузла. Цього не спостерігали у випадку припинення дії ОА на 11-ту добу росту КЛЛ. Активация росту ПП у групі КЛЛ + ОА + ІВ була більшою, ніж у групі КЛЛ + ОА.

Частота метастазування КЛЛ у легені у більшості експериментальних груп становила 100%. Лише в другому дослідженні в групах КЛЛ і КЛЛ + ОА було по 1 миші без М і частота метастазування сягала відповідно 80,00 та 93,75%.

Обчислення кількості та об'єму М у легенях тварин, що зазнали тривалішого впливу ОА, показало (табл. 4), що дія ОА достовірно збільшувала середню кількість М у перерахунку на легені однієї тварини (в 1,8 раза; $p < 0,05$), а їхній середній об'єм збільшувався в 1,6 раза. За опромінення мишей відзначено тенденцію до зменшення середньої кількості М та їхнього загального об'єму на 1 тварину (відповідно в 1,3 та 1,7 раза). При поєднаному впливі ІВ та ОА переважала дія останніх, і зафіксовано збільшення загальної кількості М та їхнього об'єму на 1 тварину в 1,6 ($p < 0,05$) та 1,1 раза порівняно з контрольною групою КЛЛ. Однак активация метастазування КЛЛ була менш вираженою, ніж за надходження до організму мишей екзоген-

них ОА, ймовірно, за рахунок протилежно спрямованої дії ІВ.

У 2-й серії досліджень, де тривалість дії ОА на тварин була скорочена, їхній вплив, навпаки, призводив до гальмування процесу метастазування — зменшення в 1,3 та 2,4 раза чисельності та об'єму М на 1 мишу (див. табл. 4). Дія ІВ мала таку саму спрямованість, як і в 1-й серії досліджень, гальмувала процес метастазування в групі КЛЛ + ІВ у 1,8 та 1,3 раза за показниками середньої кількості та об'єму М відповідно. На відміну від 1-ї серії досліджень, де ІВ та ОА впливали на процес метастазування в протилежних напрямках із сумациєю ефектів за поєднаної дії, у 2-й серії відзначали різного ступеня антиметастатичний ефект як ІВ, так і ОА, але без сумачії їхнього впливу. При цьому в групі КЛЛ + ІВ середня кількість М у легенях однієї тварини була меншою, ніж у групах КЛЛ, КЛЛ + ОА та КЛЛ + ОА + ІВ.

Значення ІМ в експериментальних групах наведено на рис. 2. Для тварин, що зазнали окремого впливу ІВ, ІМ становили –20,9 та –28,9% відповідно, тобто були досить близькими. Водночас за різних режимів надходження до організму тварин ОА ІМ значно різнилися. При тривалому впливі ОА показник сягав 81,4%, а у випадку припинення дії ОА до початку стадії дисемінації ПК достовірно не відрізнявся від контрольного значення і становив –9,9%. У разі поєднаного впливу ОА та ІВ (1-ша серія досліджень) ІМ дорівнював 57,8%, що практично збігалось із сумою показників груп КЛЛ + ІВ і КЛЛ + ОА (59,5%). При коротшому терміні дії ОА (2-га серія досліджень) такого ефекту не зафіксовано.

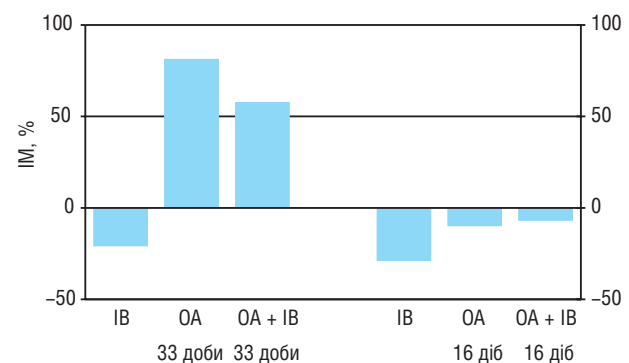


Рис. 2. Зміни ІМ за впливу ОА та/або ІВ на мишей із КЛЛ

Таблиця 4

Вплив ОА та/або ІВ на метастазування КЛЛ

Групи тварин	Середня кількість М на мишу		Середній об'єм М на мишу, мм ³	
	1-ша серія	2-га серія	1-ша серія	2-га серія
КЛЛ	13,11 ± 4,28 (9)**	24,40 ± 6,41 (5)	38,51 ± 16,27 (9)	67,23 ± 31,08 (5)
КЛЛ + ІВ	10,38 ± 2,38 ^{3,4*} (8)	13,88 ± 5,45 (8)	21,97 ± 6,33 (8)	51,62 ± 30,60 (8)
КЛЛ + ОА	23,79 ± 3,50 ² (14)	18,75 ± 3,12 (16)	62,26 ± 15,91 (14)	27,84 ± 6,56 (16)
КЛЛ + ОА + ІВ	20,69 ± 3,14 ² (13)	18,18 ± 3,10 (17)	42,13 ± 12,29 (13)	33,50 ± 8,52 (17)

*Номер групи, відносно якої відмінності достовірні ($p < 0,05$): 2 – КЛЛ + ІВ, 3 – КЛЛ + ОА, 4 – КЛЛ + ІВ + ОА.

**У дужках наведено кількість експериментальних тварин за групами на момент вимірювання розмірів М.

Оскільки інтенсивність росту та метастазування КЛЛ у контрольних групах досліду дещо відрізнялися, для порівняння змін за дії ІВ та/або ОА на метастазування КЛЛ середні показники за чисельністю та об'ємом М на 1 тварину в контрольних групах прийнято за 100%, а значення, отримані в експериментальних групах, відповідно, перераховано у відсотках. За такого обчислення зміни середньої кількості М при більш та менш тривалому впливі ОА мали різну спрямованість і достовірно ($p < 0,05$) відрізнялися між собою (рис. 3). Це стосується як окремого впливу ОА, так і їхньої поєднаної дії з ІВ. Зміни середнього об'єму М (рис. 4) мали аналогічний характер, але достовірні відмінності між серіями досліджень ($p < 0,05$) були лише у випадку окремого впливу ОА.

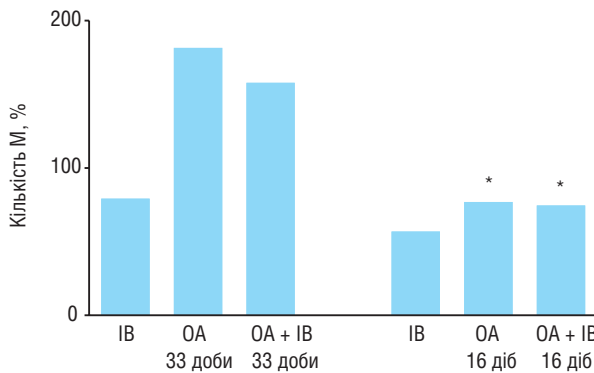


Рис. 3. Відносні зміни середньої кількості М у легенях мишей на 28-му добу росту КЛЛ за впливу ОА та/або ІВ. За 100% прийнято середню кількість М на 1 тварину в контрольній групі. * $p < 0,05$ при порівнянні відповідних груп 1-ї та 2-ї серій дослідів

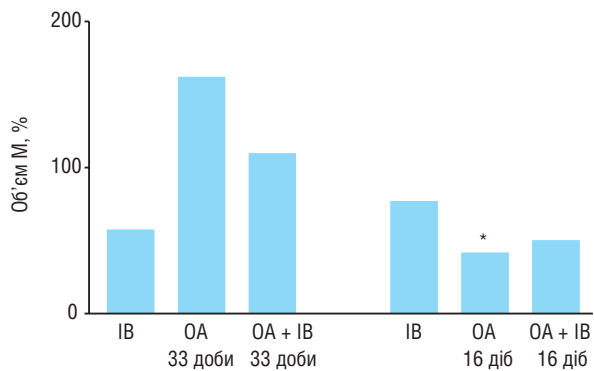


Рис. 4. Середній об'єм М у легенях мишей на 28-му добу росту КЛЛ за впливу ОА та/або ІВ. За 100% прийнято середній об'єм М на 1 тварину в контрольній групі. * $p < 0,05$ при порівнянні відповідних груп 1-ї та 2-ї серій дослідів

Таким чином показано, що фракційне опромінення тварин у малих дозах призводить до гальмування метастазування КЛЛ, тоді як ефект екзогенних ОА залежав від тривалості їхньої дії. За довготривалої дії ОА відмічено значну активацію метастазування пухлин, а за поєднаної дії з ІВ відбувалася сумація індивідуальних ефектів цих факторів. Припинення надходження ОА в організм тварин на стадії дисемінації ПК, навпаки, зменшувало

чисельність М у легенях, а поєднана дія з ІВ не посилювала цього ефекту.

Оцінку негативного чи позитивного впливу ОА та/або ІВ на експериментальних тварин здійснювали шляхом аналізу виживаності в процесі росту КЛЛ. Динаміку виживаності тварин наведено в табл. 5 та 6, а на рис. 5 подано дані щодо виживаності тварин на 28-му добу росту КЛЛ.

Таблиця 5
Виживаність (процедура Каплана – Мейєра) в експериментальних групах тварин із КЛЛ при тривалій дії ОА та/або ІВ

Термін росту КЛЛ	Виживаність у групах тварин			
	КЛЛ	КЛЛ + ІВ	КЛЛ + ОА	КЛЛ + ОА + ІВ
0	1,000	1,000	1,000	1,000
2	1,000	1,000	1,000	0,974
7	1,000	1,000	0,969	0,974
14	1,000	1,000	0,938	0,974
15	1,000	0,909	0,938	0,974
17	1,000	0,909	0,938	0,940
19	1,000	0,909	0,898	0,940
21	1,000	0,909	0,898	0,867
22	1,000	0,909	0,859	0,867
23	1,000	0,909	0,859	0,730
24	0,909	0,909	0,859	0,690
25	0,909	0,909	0,814	0,649
26	0,909	0,909	0,769	0,609
27	0,818	0,909	0,724	0,468
28	0,818	0,909	0,627	0,468

Таблиця 6
Виживаність (процедура Каплана – Мейєра) в експериментальних групах тварин із КЛЛ за короткотривалої дії ОА та/або ІВ

Термін росту КЛЛ	Виживаність у групах тварин			
	КЛЛ	КЛЛ + ІВ	КЛЛ + ОА	КЛЛ + ОА + ІВ
0	1,000	1,000	1,000	1,000
7	1,000	1,000	1,000	0,969
12	1,000	0,938	1,000	0,969
14	1,000	0,938	1,000	0,934
17	1,000	0,938	0,957	0,934
18	1,000	0,938	0,913	0,934
19	1,000	0,938	0,822	0,934
21	0,900	0,938	0,822	0,934
25	0,720	0,938	0,822	0,885
26	0,720	0,938	0,767	0,885
28	0,720	0,938	0,712	0,885

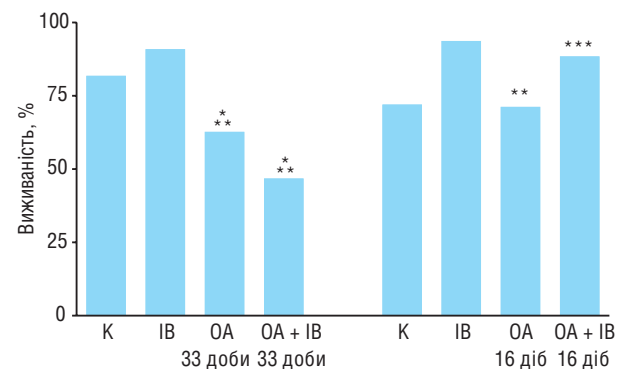


Рис. 5. Виживаність експериментальних тварин на 28-му добу росту КЛЛ за впливу ОА та/або ІВ. Достовірні відмінності ($p < 0,05$) відносно: *групи К, **групи ІВ, ***групи ОА

У 1-й серії досліджень виживаність контрольних тварин становила 81,8%, а у 2-й серії — 72,0%. ІВ по-

зитивно впливало на виживаність мишей, яка сягала відповідно 90,9 та 93,7%. Тривалий вплив ОА протягом усього експерименту призводив до достовірного ($p < 0,05$) зниження виживаності експериментальних мишей як при окремії, так і при поєднаній дії з ІВ. Смертність тварин достовірно підвищувалася (з 18,2% у групі КЛЛ до 37,3% у групі КЛЛ + ОА та до 53,2% у групі КЛЛ + ОА + ІВ). Короткотривала дія ОА на тварин із КЛЛ не викликала підвищення рівня загибелі мишей у групах КЛЛ + ОА та КЛЛ + ОА + ІВ порівняно з групою КЛЛ. Достовірну різницю у виживаності тварин відзначали між групою КЛЛ + ОА та групами КЛЛ + ІВ і КЛЛ + ОА + ІВ ($p < 0,05$), де проявлявся ефект гальмування загибелі експериментальних тварин внаслідок опромінення (див. рис. 5).

Таким чином, фракційне опромінення мишей із КЛЛ дещо підвищувало їхню виживаність протягом 28 днів росту пухлини. Постійне надходження в організм екзогенних ОА мало токсичний характер і значно підвищувало смертність тварин із КЛЛ. У випадку поєднаної дії ОА та ІВ вплив на виживаність тварин значно відрізнявся залежно від тривалості надходження ОА до організму.

Судячи з отриманих результатів, можна зробити висновок, що фракціоноване γ -опромінення мишей із КЛЛ призводило до гальмування росту ПП, знижувало її метастатичний потенціал, що сприяло підвищенню виживаності експериментальних тварин на 28-му добу з моменту перещеплення ПК. Можливо, такий досить позитивний ефект пов'язаний із впливом ІВ на пухлиноасоційовані макрофаги М2 фенотипу з їх перетворенням у М1 макрофаги [18].

Дія екзогенних ОА на мишей із КЛЛ в основному мала негативний характер. Їхній вплив на ріст і метастазування КЛЛ прямо залежав від тривалості дії. Короткотривале інгаляційне надходження ОА до початку фази дисемінації ПК супроводжувалося активацією росту ПП без значних змін у показниках метастазування та виживаності мишей. У випадку дії екзогенних ОА протягом усього періоду розвитку КЛЛ зміни росту ПП були більш вираженими; відмічали значну активацію метастазування КЛЛ і підвищення смертності тварин.

Зміни росту та метастазування КЛЛ за поєднаної дії факторів в основному визначалися тривалістю дії екзогенних ОА. При їхньому постійному надходженні до організму тварин відзначено адитивний ефект. Скорочення терміну впливу ОА до 10-ї доби росту КЛЛ призводило до появи синергізму дії цих факторів — зафіксовано активацію росту ПП та анулювання позитивного впливу ІВ на метастазування. Судячи з результатів виживаності тварин в експериментальних групах, можна зробити висновок, що загибель мишей була в першу чергу пов'язана з інтенсивністю утворення М КЛЛ у легенях і токсичною дією ОА внаслідок тривалого надходження в організм із повітрям.

Отримані результати свідчать про багатогранність і варіабельність механізмів дії НО залежно від тривалості впливу, шляхів утворення та надходження ОА в організм. Наші дані не корелюють з даними літератури щодо значного гальмування інтенсивності метастазування [9] або зниження темпів росту КЛЛ [7, 8] за надходження ОА в організм [10]. Також одержані результати свідчать про можливу небезпеку тривалого впливу підвищених доз ОА та ІВ як забруднювачів навколишнього середовища на організм при розвитку пухлинної хвороби.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що поширені забруднювачі навколишнього середовища, екзогенні ОА та малі дози ІВ, можуть суттєво впливати на ріст і метастазування пухлин, а їхні ефекти залежать від режимів впливу цих чинників на організм.

2. Тривалий вплив екзогенних ОА призводить до активації росту та метастазування КЛЛ і скорочує термін виживаності експериментальних тварин. Короткотривала дія екзогенних ОА (до початку стадії дисемінації ПК) не впливала на процеси метастазування, але підвищувала інтенсивність росту ПП.

3. За умов поєднаної дії факторів, при тривалому надходженні екзогенних ОА відбувалася сумація дії окремих ефектів на процеси росту і метастазування КЛЛ, яка супроводжувалася підвищенням рівня загибелі тварин. Скорочення терміну впливу ОА призводило до синергізму індивідуальних ефектів з додатковою активацією росту ПП.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Wang X, Xiong XP, Lu J, *et al.* The *in vivo* study on the radiobiologic effect of prolonged delivery time to tumor control in C57BL mice implanted with Lewis lung cancer. *Radiat Oncol* 2011; **6** (4): 6 p.
2. Babykutty S, Suboj P, Srinvals P, *et al.* Insidious role of nitric oxide in migration/invasion of colon cancer cells by upregulating MMP-2/9 via activation of cGMP-PKG-ERK signaling pathways. *Clin Exp Metastasis* 2012; **29** (5): 471–92.
3. Aishima S, Mano Y, Kubo Y, *et al.* Different roles of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in carcinogenesis and metastasis of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* 2013; **44** (6): 1031–7.
4. Wu N, Jin SZ, Pan XN, Liu SZ. Increase in efficacy of cancer radiotherapy by combination with whole-body low dose irradiation. *Int J Radiat Biol* 2008; **84** (3): 201–10.
5. Luanpitpong S, Iyer AK, Azad N, *et al.* Nitrosylthiol signaling in anoikis resistance and cancer metastasis. *For Immunopathol Dis Therap* 2012; **3** (2): 141–54.
6. Yongsanguanchai N, Pongrakhananon V, Mutirangura A, *et al.* Nitric oxide induces cancer stem cell-like phenotypes in human lung cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015; **308** (2): 89–100.
7. Deriagina VP, Ryzhova NI, Krivosheeva LV, Golubeva IS. Production of nitric oxide metabolites during transplanted tumors growth with different metastatic potential. *Biomed Khim* 2014; **60** (6): 661–7.
8. Deryagina VP, Ryzhova NI, Golubkina NA. Production of nitrogen oxide derivatives under the influence of NO-synthase inhibitors and natural compounds in mice with transplanted tumors. *Exp Oncol* 2012; **34** (1): 29–33.

9. Kokubo K, Igawa S, Fukuda A, *et al.* The role of nitric oxide in reducing deformability of Lewis lung tumor cell stimulated by inflammatory cytokines. *Nitric Oxide* 2008; **9** (4): 312–9.

10. Jordan BF, Sonveaux P, Feron O, *et al.* Nitric oxide as a radiosensitizer: evidence for an intrinsic role in addition to its effect on oxygen delivery and consumption. *Int J Cancer* 2004; **109** (5): 768–73.

11. Карякин ЮВ, Ангелов ИИ. Чистые химические вещества. Москва: Химия, 1974. 407 с.

12. Трещалина ЕМ, Жукова ОС, Герасимова ГК и др. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. В: Хабриев РУ (ред.). Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Москва: Медицина (Изд. 2), 2005: 637–51.

13. Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and approval. In: Teicher BA, Andrews PA, eds. (Second ed.). Totowa, New Jersey: Humana Press, 2004. 450 p.

14. Руководство по контролю загрязнения атмосферы. Москва: Комитет по гидрометеорологии МЗ СССР, 1991. 693 с.

15. ГОСТ 24481–80. Вода питьевая — 29 декабря 1980 г.

16. Лакин ГФ. Биометрия. Москва: Высшая школа, 1990. 352 с.

17. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Москва: Практика, 1999. 462 с.

18. Klug F, Prakash H, Huber PE, *et al.* Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS⁺/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy. *Beckhove Cancer Cell* 2013; **24** (5): 589–602.

EFFECT OF EXOGENOUS NITROGEN OXIDES AND FRACTIONATED IONIZING RADIATION ON GROWTH AND METASTASIS OF THE LEWIS LUNG CARCINOMA

O.A. Glavin, L.I. Makovetska, V.M. Mikhailenko

Summary. *Exogenous nitrogen oxides (NOx) and low doses of ionizing radiation (IR) are common environmental pollutants that can influence the system of anti-tumor resistance and tumor growth in the organism. Objective: to investigate the combined effects of exogenous NOx and low doses of IR on the growth and metastasis of Lewis lung carcinoma (LLC) as well as survival of*

experimental animals. Object and Methods: the study was conducted on the C₅₇Bl₆ male mice. Animals with LLC exposed to exogenous OA (8 hr/day, 25 mg/m³ to the 11th or 28th day of LLC growth) and IR (total dose 1 Gr, 0.1 Gr × 10). Primary tumor growth, metastasis intensity and animal survival were studied. Result: fractionated irradiation resulted in inhibition of primary tumor growth, reduced its metastatic potential and increased survival of experimental animals. For the short-term exposition to NOx was observed activation of the primary tumor growth. Long-term NOx exposition led to more distinct changes in primary tumor growth, metastasis activation and increased mice deaths. But, the most pronounced changes occurred after combined influence of these factors. Long treatment with NOx and IR resulted in highest level of animal deaths and summation of the individual factors effects on the LLC growth and metastasis. On the contrary, short-term NOx exposure combined with IR led to the primary tumor growth activation. Conclusions: short-term effects of exogenous NOx accelerated rate of growth of the primary LLC tumor. Their long-term effect also led to activation of metastasis formation. The combined effect of factors under long-term NOx inhalation accompanied by summation of their effects on the LLC growth and metastasis and caused an increase in the level of animal deaths.

Key Words: exogenous nitric oxide, fractionated ionizing radiation, Lewis lung carcinoma, primary tumor, metastasis.

Адреса для листування:

Главін О.А.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: veterok61@ukr.net

Одержано: 18.11.2015