

УДК 616.24-006.6+615.849:576.385.5

Н. А. Мітряєва, Л. В. Гребіник✉, Н. Є. Узленкова

Державна установа «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», вул. Пушкінська, 82, м. Харків, 61024, Україна

ВПЛИВ КОМБІНОВАНОЇ ДІЇ Х-ВИПРОМІНЕННЯ ТА ІНГІБІТОРА ЦИКЛООКСИГЕНАЗИ-2 – МЕЛОКСИВЕТУ НА ВМІСТ VEGF ТА PGE-2 У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ-ПУХЛИНОНОСІЇВ

Мета: вивчення впливу комбінованої дії Х-випромінення та інгібітора циклооксигенази-2 (ЦОГ-2) на рівень фактора росту ендотелію судин (VEGF) і простагландину Е-2 (PGE-2) в сироватці крові щурів з перевитою пухлиною Герена при опроміненні в різних дозах.

Матеріали і методи. 20 щурам-самицям популяції Вістар масою 160–180 г з перещепленою карциномою Герена проводили фракціоноване опромінення (5 Гр + 5 Гр) та (0,5 Гр + 0,5 Гр) зони росту пухлини на апараті РУМ-17 з інтервалом між сеансами 24 год. Препарат «Мелоксивет» – селективний інгібітор ЦОГ-2 вводили за добу до опромінення та за 2 години перед другим опроміненням (0,2 мг на 1 кг маси тіла). Збір крові проводили методом прижиттєвої декапітації через 24 год після останньої фракції опромінення. Вміст VEGF та PGE-2 в сироватці крові визначали методом імуноферментного аналізу з використанням стандартних наборів.

Результати. Після фракціонованого опромінення у сумарній дозі 1 Гр (0,5 Гр + 0,5 Гр) рівень VEGF підвищувався у 1,5 раза порівняно з інтактним контролем, а у тварин, опромінених у сумарній дозі 10 Гр (5 Гр + 5 Гр), рівень VEGF вірогідно знижувався у 1,92 раза. Тобто, спостерігали різницю вмісту VEGF в сироватці крові щурів-пухлиноносіїв залежно від доз опромінення: після опромінення сумарній дозі 1 Гр – стимуляція ангиогенезу, 10 Гр – значне уповільнення цього процесу. У разі поєднаної дії опромінення (10 Гр) та інгібітора ЦОГ-2 – мелоксивету відмічали вірогідне зниження рівня VEGF у 3,49 раза порівняно з контролем та у 1,8 раза з ізольованим опроміненням. При цьому рівень PGE-2 також знижувався відносно ізольованого опромінення у 1,5 раза, що вказує на інгібування ЦОГ-2. При поєднаній дії опромінення в низьких дозах (1 Гр) та інгібітора ЦОГ-2 – мелоксивету спостерігали зниження рівня VEGF у 1,1 раза порівняно з контролем та у 1,7 раза відносно ізольованого опромінення. При цьому рівень PGE-2 також знижувався порівняно з ізольованим опроміненням у 1,1 раза. Отримані результати свідчать про вплив поєднаної дії опромінення і мелоксивету на рівень VEGF та PGE-2, що зумовлює антиангіогенний ефект.

Висновки. Доведено, що низькі дози іонізуючої радіації (1 Гр) та високі дози (10 Гр) по-різному впливають на експресію VEGF, і тим самим на процеси ангиогенезу. Поєднана дія іонізуючої радіації та інгібітора ЦОГ-2 (мелоксивету) впливає на зниження рівня PGE-2, VEGF, тобто, на уповільнення ангиогенезу. У разі великих доз опромінення цей вплив виражений ще більше.

Ключові слова: Х-випромінення, інгібітор ЦОГ-2 – мелоксивет, фактор росту ендотелію судин (VEGF), циклооксигеназа-2 (ЦОГ-2), простагландин Е-2 (PGE-2), ангиогенез.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2019. Вип. 24. С. 261–269. doi: 10.33145/2304-8336-2019-24-261-269

✉ Гребіник Лідія Володимирівна, e-mail: radoncol_lab@ukr.net

N. A. Mitryayeva, L. V. Grebinyk✉, N. E. Uzlenkova

State Institution «Grigoriev Institute for medical Radiology NAMS of Ukraine», 82 Pushkinska St., Kharkiv, 61024, Ukraine

INFLUENCE OF COMBINED ACTION OF X-RADIATION AND CYCLOOXYGENASE-2 – MELOXIVET INHIBITOR ON VEGF AND PGE-2 CONTENT IN BLOOD OF RAT-TUMOR CARRIERS

Objective. The objective of this work was to study the effect of the combined action of X-radiation and the cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor on the level of vascular endothelial growth factor (VEGF) and prostaglandin E2 (PGE-2) in blood serum of rat-tumor carriers at irradiation in different doses.

Materials and methods. 20 tumor-bearing rats of the Wistar population weighing 160–180 g, with transplanted Guerin carcinoma, fractionated irradiation (5 Gy + 5 Gy) and (0.5 Gy + 0.5 Gy) of the tumor growth zone on the RUM-17 was carried out, with an interval between sessions of 24 hours. The drug «Meloxicet» – a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 was administered 24 hours before irradiation and 2 hours before the second exposure (0.2 mg per 1 kg body weight). Blood sampling was performed by the method of life-time decapitation after 24 hours after the last fraction of irradiation. The content of VEGF in blood serum was determined by the method of enzyme immunoassay using standard.

Results. After fractionated irradiation in a total dose of 1 Gy (0.5 Gy + 0.5 Gy), the level of VEGF was increased by 1.5 times compared with intact control, and in animals that were irradiated in a total dose of 10 Gy (5 Gy + 5 Gy), the VEGF level was reduced by 1.92 times. That is, there was a difference in the content of VEGF in blood serum of rat tumor carriers, depending on the dose of irradiation: in a total dose of 1 Gy – stimulation of angiogenesis, and in the total dose of 10 Gy – a significant slowdown in this process. In the case of combined exposure to radiation (10 Gy) and the COX-2 inhibitor, meloxicet, the potential decrease in VEGF levels was 3.49 times compared to control and 1.8 times with isolated exposure. At the same time, the level of PGE-2 also decreased with respect to isolated exposure by 1.5 times, indicating COX-2 inhibition. With a combined low dose (1 Gy) irradiation and COX-2-meloxicet inhibitor, VEGF levels were reduced by 1.1 times compared to control and 1.7 times relative to isolated exposure. At the same time, the level of PGE-2 also decreased in comparison with isolated radiation in 1.1 times. The obtained results indicate the influence of the combined act of irradiation and meloxicet on the level of VEGF and PGE-2, which causes the antiangiogenic effect.

Conclusions. It has been shown that low doses of ionizing radiation (1 Gy) and high doses (10 Gy) have a different effect on VEGF expression, and thus on angiogenesis processes. The combined effect of ionizing radiation and the COX-2 inhibitor (meloxicet) affects the level of PGE-2, VEGF, ie, the slowing of angiogenesis. In the case of large doses of exposure, this effect is even more expressed.

Key words: X-radiation, COX-2-meloxicet inhibitor, VEGF, cyclooxygenase-2 (COX-2), prostaglandin E-2 (PGE-2), angiogenesis.

Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2019;24:261-269. doi: 10.33145/2304-8336-2019-24-261-269

ВСТУП

Перспективним напрямком розвитку променевої терапії злоякісних новоутворень може стати селективне управління радіочутливістю пухлини з використанням агентів, що інгібують ангиогенез. Ключовим проангіогенним фактором є фактор росту ендотелію судин (VEGF). Існує декілька шляхів блокування ангиогенезу, один із них – використання інгібіторів циклооксигенази-2 (ЦОГ-2). Циклооксигеназа-2 є ферментом, який каталізує перетворення арахідонової кислоти у простагландин H2 – стимулятор росту

INTRODUCTION

A promising direction of the development of radiation therapy for malignant tumors may be the selective management of radiosensitivity of the tumor using agents that inhibit angiogenesis. A key proangiogenic factor is vascular endothelial growth factor (VEGF). There are several ways to block angiogenesis, one of which is the use of cyclooxygenase-2 inhibitors (COX-2). Cyclooxygenase-2 is an enzyme that catalyzes the conversion of arachidonic acid to prostaglandin H2 – a cell growth stimulator [1]. It

✉ Lidia V. Grebinyk, e-mail: radoncol_lab@ukr.net

клітин [1]. Показано, що внаслідок гіперекспресії ЦОГ-2 в експериментальній моделі пухлини відбувається інгібування апоптозу та індукція ангиогенезу, синтез ферменту активується в умовах гіпоксії. Експресія ЦОГ-2 збільшується при різноманітних пухлинах. Підвищення вмісту ЦОГ-2 корелює з радіо- та хіміорезистентністю. Наразі ЦОГ-2 розглядається як важлива мішень для протипухлинної терапії. Блокування ЦОГ-2 веде до зниження рівня простагландинів і проангіогенного фактора VEGF [2]. Саме з антиангіогенною терапією нині пов'язують надії на підвищення ефективності лікування хворих онкологічного профілю. Отже, поєднання фармакологічних інгібіторів ангиогенезу та іонізуючої радіації має суттєве значення для протипухлинної терапії солідних пухлин.

З огляду на викладене, в радіаційній онкології активно триває пошук шляхів направлено блокування ангиогенезу для підвищення радіочутливості пухлини. Проте механізми інгібування ангиогенезу за умов спільної дії іонізуючого випромінювання та антиангіогенних факторів – селективних інгібіторів ЦОГ-2 залишаються практично не вивченими, досі невідомі дози, коли комбінована дія найбільш ефективна. Через це актуальним і важливим є вивчення механізмів впливу інгібіторів ЦОГ-2 на блокування ангиогенезу.

МЕТА

Метою роботи було вивчення впливу комбінованої дії X-випромінювання та інгібітора ЦОГ-2 на рівень VEGF і простагландину E2 (PGE-2) в сироватці крові щурів з перевитою пухлиною Герена при опроміненні в різних дозах.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено на 20 щурах-самицях популяції Вістар масою 160–180 г, яким перещеплювали карциному Герена. Всі дослідження на тваринах виконували з дотриманням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 1985), і Національних загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001). Тваринам підшкірно вводили 0,5 мл 20 % суспензії клітин, отриманих з пухлинної тканини експериментальної карциноми Герена (Guerin's carcinoma), штаму якої було одержано з Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Е. Кавецького НАН України. Експеримент починали на 10–12-ту добу після перещеплення пухлини, коли роз-

was shown that as a result of overexpression of COX-2 in the experimental tumor model there is inhibition of apoptosis and induction of angiogenesis, the synthesis of the enzyme is activated under hypoxia conditions. Expression of COX-2 increases with various tumors. Increasing the content of COX-2 correlates with radio- and chemo-resistance. Currently, COX-2 is considered an important target for antitumor therapy. Blocking COX-2 leads to a decrease in the level of prostaglandins and the proangiogenic factor of VEGF [2]. Nowadays, hopes for increasing in the efficiency of treatment of cancer patients are linked with anti-angiogenic therapy. Therefore, a combination of pharmacological inhibitors of angiogenesis and ionizing radiation is essential for antitumor therapy of solid tumors.

From the above, there is an active search of the ways of blocking angiogenesis for increasing the radiosensitivity of the tumor happens in the radiation oncology. However, mechanisms of inhibition of angiogenesis under conditions of joint action of ionizing radiation and antiangiogenic factors – selective COX-2 inhibitors remain practically unexplored, still unknown dosages, when the combined effect is most effective. In this regard, it is relevant and important to study the mechanisms of exposure of COX-2 inhibitors to blocking angiogenesis.

OBJECTIVE

The objective of this work was to study the effect of the combined action of X-radiation and the COX-2 – meloxicam inhibitor on the level of VEGF and prostaglandin E2 (PGE-2) in blood serum of rat-tumor carriers at irradiation in different doses.

MATERIALS AND METHODS

The research was conducted on 20 female rats in the Wistar population weighing 160–180 g, which were transplanted with Guerin's carcinoma. All animal studies were performed in compliance with the International Principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experiments and other scientific purposes (Strasbourg, 1985) and the National General Ethical Principles of Animal Experiments (Ukraine, 2001). Animals were subcutaneously injected with 0.5 mL of 20 % suspension of cells derived from the tumor tissue of the experimental Guerin's carcinoma, the strain of which was obtained from the Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radio-

міри пухлинного вузла досягали в діаметрі 1,5–2,0 см. Локальне опромінення зони росту пухлини проводили на апараті РУМ-17 (ікс-випромінення) за стандартних технічних умов: напруга – 190 кВ, сила струму – 10 мА, фільтри: 0,5 мм Cu плюс 1 мм Al, потужність поглинутої дози у повітрі X-випромінення – 1,36 Гр/хв, фокусна відстань 30 см. Опромінювали фракційно при поглинутій дозі на фракцію 5 Гр, час опромінення – 3 хв 44 с, та при поглинутій дозі на фракцію 0,5 Гр, час опромінення – 22 с, з інтервалом між сеансами 24 год, сумарна поглинута доза на зону росту пухлини складала (5 Гр + 5 Гр) 10 Гр та (0,5 Гр + 0,5 Гр) 1 Гр. Препарат «Мелоксивет» – нестероїдний протизапальний лікарський засіб класу оксикамів (селективний інгібітор циклооксигенази-2) вводили за добу до опромінення та за 2 години перед другим опроміненням (0,2 мг на 1 кг маси тіла). Забір крові та зразків пухлини проводили методом прижиттєвої декапітації через 24 год після останньої фракції опромінення. Сироватку отримували шляхом центрифугування крові при 3000 об/хв протягом 15 хв. Концентрацію VEGF визначали методом ІФА на напівавтоматичному імуоферментному аналізаторі «Immunochem-2100» (США) з використанням стандартних наборів реактивів ЗАО «Вектор-Бест», Росія. Визначення PGE-2 проводили методом ІФА з використанням комерційних наборів реактивів фірми «Prostaglandin T2 ELISA Kit» (Германія).

Статистичний аналіз даних здійснювали за допомогою пакета статистичних програм для ПК «Statistica», використовуючи параметричні (Стьюдента-Фішера) та непараметричні методи для малих вибірок, порівнювали їх між групами за допомогою критерію Вілкоксона при порівнянні парних вибірок, розбіжності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У цій роботі представлено результати дослідження комбінованого впливу фракціонованого опромінення в сумарних дозах 10 Гр (5 Гр + 5 Гр) та 1 Гр (0,5 Гр + 0,5 Гр) на апараті РУМ-17 (X-випромінення) і селективного інгібітора ЦОГ-2 – мелоксивету у сироватці крові шурів-пухлиноносіїв на рівні VEGF та PGE-2. Вибір показника PGE-2, основного ЦОГ-2 продукту, не є випадковим і пов'язаний з тим, що він на відміну від інших ейкозаноїдів стимулює аутокринним і паракринним механізмами зростання, поділ і процеси проліферації клітин, тому прямо стосується метастазування злоякісних новоутворень і обумовлює агресивність пухлини. Аналіз рівня PGE-2 було використано також для оцінки активності ключового ферменту синтезу PGE-2 – ЦОГ-2.

biology named R. E. Kavetsky National Academy of Sciences of Ukraine. The experiment started at 10–12 days after tumor transplantation, when the size of the tumor node was reached in the diameter of 1.5–2.0 cm. Local irradiation of the tumor growth zone was performed on the device RUM-17 (X-radiation) under standard technical conditions: the voltage is 190 kV, the current is 10 mA, the filters: 0.5 mm Cu plus 1 mm Al, the absorbed dose in the air x-radiation – 1.36 Gy/min, focal length is 30 cm, is irradiated fractionally at the absorbed dose at a fraction of 5 Gy, an irradiation time of 3 minutes 44 seconds, and at an absorbed dose to a fraction of 0.5 Gy, an exposure time of 22 seconds, with an interval between sessions 24 hours, total swallowed up dose on the tumor growth zone was (5 Gy + 5 Gy = 10 Gy) and (0.5 Gy + 0.5 Gy = 1 Gy). The serum was obtained by centrifuging blood at 3000 rpm for 15 min. The concentration of VEGF was determined by ELISA on a semi-automatic immunoassay analyzer «Immunochem-2100» (USA) using standard recipe sets of Vektor-Best CJSC, Russia. The determination of PGE-2 was carried out by ELISA using commercial reagent kits of the Prostaglandin T2 ELISA Kit (Germany).

Statistical analysis of data was carried out using a statistical software package for the Statistica PC using parametric (Student-Fisher) and non-parametric methods for small samples, compared them between groups using the Wilcoxon criterion when comparing pair samples, differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

In this paper, the results of the study of the combined effect of fractionated irradiation in the total doses of 10 Gy (5 Gy + 5 Gy) and 1 Gy (0.5 Gy + 0.5 Gy) on the device of RUM-17 (X-radiation) and selective COX inhibitor are presented in blood serum of rat-tumor carriers at the level of VEGF and PGE-2. The choice of PGE-2, the main COX-2 product, is not accidental and linked with fact that it, unlike other eicosanoids, stimulates autocrine and paracrine mechanisms of growth, division and cell proliferation processes, therefore directly concerns metastatic malignant tumors and causes aggressiveness of the tumor. The analysis of PGE-2 level was also used to evaluate the activity of the key enzyme for synthesis of PGE-2-cyclooxygenase-2.

Піддослідні тварини були розподілені на шість груп: 1 – інтактні пухлиноносії (контроль), 2 – фракціоноване опромінення у сумарній дозі 10 Гр (5 Гр + 5 Гр), 3 – фракціоноване опромінення у сумарній дозі 1 Гр (0,5 Гр + 0,5 Гр), 4 – поєднана дія фракціонованого опромінення у сумарній дозі 10 Гр (5 Гр + 5 Гр) та інгібітора ЦОГ-2 (мелоксивету), 5 – поєднана дія фракціонованого опромінення у сумарній дозі 1 Гр (0,5 Гр + 0,5 Гр) та інгібітора ЦОГ-2; 6 – інгібітор ЦОГ-2 (мелоксивет). Оцінку впливу опромінення на вміст ключового медіатора ангіогенезу VEGF та PGE-2, який є основним продуктом ЦОГ-2, що індукує VEGF, проводили в порівнянні з групою інтактних тварин-пухлиноносіїв та групою ізольовано опромінених тварин.

У таблиці 1 представлені дані вмісту VEGF і PGE-2 у сироватці крові щурів-пухлиноносіїв після поєднаної дії фракціонованого опромінення (5 Гр + 5 Гр) та впливу мелоксивету.

Як видно з таблиці 1, рівень VEGF у контрольній групі складав ($312,8 \pm 51,4$) пг/мл, а рівень PGE-2 – ($65,4 \pm 8,7$) пг/мл. Після фракціонованого опромінення у сумарній дозі 10 Гр (5 Гр + 5 Гр) рівень VEGF знижувався у 1,92 раза порівняно з контрольною групою на фоні практично незмінного PGE-2. Це свідчить про те, що PGE-2 та ЦОГ-2 корелюють з високою стійкістю до променевої терапії за умов фракціонованого опромінення в сумарній дозі 10 Гр. У разі поєднаної дії опромінення та інгібітора ЦОГ-2 – мелоксивету відзначали вірогідне зниження рівня VEGF у 3,49 раза порівняно з контролем та у 1,8 раза порівняно з ізольованим опроміненням. При цьому рівень PGE-2 також знижувався відносно ізольованого опромінення у 1,5 раза, що вказує на інгібування ЦОГ-2. На фоні введення ізольованого інгібітора ЦОГ-2 вміст PGE-2 знижувався у 1,16 раза, а рівень VEGF мав

Experimental animals were divided into six groups: 1 – intact tumor carriers (control), 2 – fractionated irradiation in a total dose of 10 Gy (5 Gy + 5 Gy), 3 – fractionated irradiation in a total dose of 1 Gy (0.5 Gy + 0.5 Gy), 4 – the combined effect of fractionated irradiation in a total dose of 10 Gy (5 Gy + 5 Gy) and COX-2 inhibitor (meloxivet); 5 – the combined effect of fractionated irradiation in a total dose of 1 Gy (0.5 Gy + 0.5 Gy) and the COX-2 inhibitor; 6 is an inhibitor of COX-2 (meloxivet). Evaluation of radiation effect on the content of a key angiogenesis mediator VEGF and PGE-2, which is the major product of COG-2 inducing VEGF, was performed in comparison with the group of intact animal tumor-carriers and a group of isolated irradiated animals.

Table 1 shows the content of VEGF and PGE-2 in blood serum of rat tumor carriers after combined fractionated irradiation (5 Gy + 5 Gy) and the effect of meloximate.

As can be seen from Table 1, the level of VEGF in the control group was (312.8 ± 51.4) pg/mL, and PGE-2 level was (65.4 ± 8.7) pg/mL. After fractionated irradiation in a total dose of 10 Gy (5 Gy + 5 Gy), VEGF levels decreased by 1.92 times compared with the control group against the background of virtually unchanged PGE-2. This indicates that PGE-2 and COX-2 correlate with high resistance to radiotherapy in a fractionated irradiation dose of 10 Gy. In the case of combined irradiation and COX-2 inhibitor, meloxivete, there was a significant decrease in the level of VEGF in 3.49 times compared to control and 1.8 fold compared with isolated exposure. At the same time, the level of PGE-2 also decreased with respect to isolated exposure by 1.5 times, indicating COX-2 inhibition. On the background of the introduction of the isolated COX-2 inhibitor, the content of PGE-2 decreased by 1.16

Таблиця 1

Вплив X-випромінення, мелоксивету та їх поєднаної дії на вміст VEGF та PGE-2 у сироватці крові щурів-пухлиноносіїв за умов фракціонованого опромінення в сумарній дозі 10 Гр (5 Гр + 5 Гр), ($X \pm Sx$)

Table 1

Influence of X-radiation, meloxivet and their combined action on the content of VEGF and PGE-2 in blood serum of rat tumor carriers under fractionated irradiation in a total dose of 10 Gy (5 Gy + 5 Gy), ($X \pm Sx$)

Група піддослідних тварин A group of experimental animals	n	VEGF, пг/мл VEGF, pg/mL	PGE-2, пг/мл PGE-2, pg/mL
Контроль / Control	6	$312,8 \pm 51,4$	$65,4 \pm 8,7$
Опромінення / Irradiation	6	$162,2 \pm 69,5^*$	$59,7 \pm 14,2$
Опромінення + Мелоксивет / Irradiation + Meloxivet	6	$89,6 \pm 9,8^{**}$	$38,5 \pm 13,5^*$
Мелоксивет / Meloxivet	6	$247,1 \pm 31,8^\#$	$44,8 \pm 8,7$

Примітки. * – значущість відмінностей відносно групи контролю, $p < 0,05$; # – значущість відмінностей між групами, $p < 0,05$ (критерій Вілкоксона).

Notes. * – the significance of differences with respect to the control group, $p < 0.05$; # – the significance of differences between groups, $p < 0.05$ (Wilcoxon criterion).

тенденцію до зниження (відносно контролю), проте залишався підвищеним порівняно з поєднаною дією опромінення та інгібітора ЦОГ-2 у 2,7 раза. Отримані результати свідчать про безпосередню участь VEGF у відповіді на опромінення та на поєднану дію опромінення і мелоксивету. Викладе не узгоджується з дослідженнями інших авторів, які довели, що селективні інгібітори ЦОГ-2 гальмують ангиогенез [3].

У таблиці 2 представлені дані вмісту VEGF і PGE-2 у крові щурів-пухлиноносіїв після фракціонованого опромінення в дозі 1 Гр (0,5 Гр + 0,5 Гр).

Як видно з таблиці 2, рівень VEGF після фракціонованого опромінення у дозах 0,5 Гр + 0,5 Гр підвищувався у 1,5 раза, при цьому PGE-2 практично не змінювався порівняно з контрольною групою. Це свідчить, що ЦОГ-2 корелює з високою стійкістю до променевої дії при фракційному опроміненні в сумарній дозі 1 Гр. У разі поєднаної дії опромінення в низьких дозах та інгібітора ЦОГ-2 – мелоксивету спостерігали незначне зниження рівня VEGF у 1,1 раза порівняно з контролем та у 1,7 раза порівняно з ізольованим опроміненням. При цьому рівень PGE-2 також знижувався відносно ізольованого опромінення у 1,1 раза, що вказує на дію препарату, яка направлена на інгібування ЦОГ-2.

Оцінку впливу дії іонізуючої радіації при різних дозах і поєднаної дії опромінення та мелоксивету на вміст VEGF і PGE-2 проводили у зіставленні з інтактними тваринами-пухлиноносійми. Порівнювали співвідношення вмісту досліджуваних маркерів у крові інтактних тварин до їхньої концентрації маркера після терапії за коефіцієнтом відношення $K = C \text{ контроль} / C \text{ терапія}$, де $C \text{ контроль}$ – концентрація маркера у крові інтактних тварин-пухлиноносіїв, $C \text{ терапія}$ – концентрація маркера у крові тварин-пухлиноносіїв після дії іонізуючої радіації при

times, while the VEGF level tended to decrease (relative to control), but remained higher compared to the combined effect of irradiation and the COX-2 inhibitor 2.7 times. The results obtained indicate the direct involvement of VEGF in response to irradiation and the combined effect of irradiation and meloxivete. The above is consistent with studies by other authors who have shown that selective COX-2 inhibitors inhibit angiogenesis [3].

Table 2 shows the content of VEGF, PGE-2 in blood of rat-tumor carriers after fractional irradiation at a dose of 1 Gy (0.5 Gy + 0.5 Gy).

As can be seen from Table 2, the level of VEGF after fractional irradiation at doses of 0.5 Gy + 0.5 Gy was increased by 1.5 times, with PGE-2 practically unchanged compared to the control group, which indicates that COX-2 correlates with high resistance to radiation in fractionated irradiation in a total dose of 1 Gy. In the case of a combination of low dose exposure and the COX-2 meloxytit inhibitor, a slight decrease in VEGF levels was observed in 1.1 times compared with control and 1.7 times compared with isolated exposure. At the same time, the level of PGE-2 also decreased with respect to isolated exposure in 1.1 times, indicating the effect of the drug, which aims to inhibit COX-2.

An assessment of the effect of ionizing radiation at different doses and the combined effect of irradiation and meloxivet on the content of VEGF and PGE-2 was performed compared with intact animal tumorous carriers. Compared the ratio of the content of the studied markers in the blood of intact animals to their marker concentration after therapy at a ratio of $K = C \text{ control} / C \text{ therapy}$, where $C \text{ control}$ – concentration of marker in the blood of intact animal tumorous, $C \text{ therapy}$ – concentration of marker in the blood of animal tumor after the effects of ionizing

Таблиця 2

Вплив X-випромінення, мелоксивету та їх поєднаної дії на вміст VEGF та PGE-2 в сироватці крові щурів-пухлиноносіїв за умов фракціонованого опромінення в сумарній дозі 1 Гр (0,5 Гр + 0,5 Гр), ($X \pm Sx$)

Table 2

Effect of X-radiation, meloxivet and their combined action on the content of VEGF and PGE-2 in blood serum of rat tumorous tissues under fractionated irradiation in a total dose of 1 Gy (0.5 Gy + 0.5 Gy), ($X \pm Sx$)

Група піддослідних тварин A group of experimental animals	n	VEGF, пг/мл VEGF, pg/mL	PGE-2, пг/мл PGE-2, pg/mL
Контроль / Control	6	312,8±51,4	65,4 ± 8,7
Опромінення / Irradiation	6	481,9± 69,5*	61,2 ± 16,2
Опромінення + Мелоксивет / Irradiation + Meloxivet	6	284,4± 39,7*#	52,9 ± 14,6
Мелоксивет / Meloxivet	6	247,1± 31,8#	44,8 ± 8,7

Примітки. * – значущість відмінностей відносно групи контролю, $p < 0,05$; # – значущість відмінностей між групами, $p < 0,05$ (критерій Вілкоксона).

Notes. * – the significance of differences with respect to the control group, $p < 0,05$; # – the significance of differences between groups, $p < 0,05$ (Wilcoxon criterion).

Таблиця 3

Оцінка впливу поєднаної дії опромінення і мелоксивету за коефіцієнтом відношення показників порівняно з інтактним контролем

Table 3

Estimation of the effect of combined exposure to irradiation and meloxicam on the coefficient of ratio of indices compared to intact control

Група підслідних тварин / A group of experimental animals	VEGF, пг/мл VEGF, pg/mL	K PGE-2	PGE-2, пг/мл PGE-2, pg/mL	K PGE-2
Контроль / Control	312,8 ± 51,4	–	65,4 ± 8,7	–
Опромінення (0,5 Гр + 0,5 Гр) / Irradiation (0.5 Gy + 0.5 Gy)	481,9 ± 69,5*	0,65	61,2 ± 16,2	1,06
Опромінення (5 Гр + 5 Гр) / Irradiation (5 Gy + 5 Gy)	162,2 ± 69,5*	1,93	59,7 ± 14,2	1,09
Опромінення (0,5 Гр + 0,5 Гр) мелоксивет / Irradiation (0.5 Gy + 0.5 Gy) Meloxicam	284,4 ± 39,7	1,11	52,9 ± 14,6	1,24
Опромінення (5 Гр + 5 Гр) мелоксивет / Irradiation (0.5 Gy + 0.5 Gy) Meloxicam	89,6 ± 9,8*	3,49	38,5 ± 13,5*	1,70

Примітка. * – значущість відмінностей відносно групи контролю, p < 0,05.

Note. * – the significance of differences in the control group, p < 0.05.

різних дозах та при поєднаній дії опромінення і мелоксивету (табл. 3).

Як видно з таблиці 3, при низьких дозах опромінення коефіцієнт співвідношення рівня VEGF у 2,97 раза менший, ніж при високих дозах. Отже було виявлено значну різницю вмісту VEGF у сироватці крові щурів-пухлиноносіїв залежно від дози опромінення. Оскільки VEGF є відомим маркером активності неоангіогенезу, підвищення цього показника у крові щурів-пухлиноносіїв після опромінення в сумарній дозі 1 Гр свідчить про стимуляцію процесів неоангіогенезу. Опромінення в сумарній дозі 10 Гр викликає значне уповільнення цього процесу.

Порівнюючи коефіцієнти рівнів VEGF при ізольованому опроміненні (5 Гр + 5 Гр) та опроміненні з мелоксиветом, спостерігаємо підвищення показника у 1,8 раза за комбінованої дії, на тлі підвищення коефіцієнта рівнів PGE-2 в 1,6 раза, що свідчить про суттєвий вплив мелоксивету на інгібування ЦОГ-2 та ангіогенезу. За комбінованої дії опромінення (0,5 Гр + 0,5 Гр) і мелоксивету доведено, що коефіцієнт рівнів VEGF підвищувався в 1,7 раза, а рівнів PGE-2 – у 1,2 раза, тобто, препарат теж впливає на рівень ЦОГ-2 та ангіогенез за таких умов.

Отримані результати свідчать про безпосередню участь VEGF у відповіді на опромінення. Слід зазначити, що низькі дози іонізуючої радіації (1 Гр) та високі дози (10 Гр) по-різному впливають на експресію VEGF, і тим самим на процеси ангіогенезу. Ці дані узгоджуються з дослідженнями, які продемонстрували, що опромінення в низьких дозах (0,8 Гр) прискорює ангіогенез і розвиток ендотеліальної сітки у пухлині мишей, спричиняє її ріст та утворення метастазів, залежних від VEGF [4]. Виконані радіобіологічні дослідження по-новому

radiation at different doses and with the combined effect of irradiation and meloxime (see Table 3).

As can be seen from Table 3, at low doses of irradiation, the ratio of the level of VEGF, 2.97 times less than at high doses. Consequently, a significant difference in the content of VEGF in blood serum of rat-tumor carriers was detected, depending on the dose of irradiation. Since VEGF is a well-known marker of neo-angiogenesis activity, an increasing this indicator in the blood of rat-tumor carriers after irradiation in a total dose of 1 Gy suggests stimulating neo-angiogenesis. Irradiation in a total dose of 10 Gy causes a significant slowdown in this process.

Comparing the coefficients of VEGF levels with isolated irradiation (5 Gy + 5 Gy) and irradiation with meloxicam, we observe an increase in the index by 1.8 times in combination with the increase of the factor of levels of PGE-2 in 1.6 times, which shows a significant effect meloxicam for inhibition of COX-2 and angiogenesis. The combined effect of irradiation (0.5 Gy + 0.5 Gy) and meloxicam has been shown to increase the VEGF levels by 1.7 times, and the levels of PGE-2 by 1.2 times, that is, the medication also affects the level of COX-2 and angiogenesis under such conditions.

The results obtained indicate the direct involvement of VEGF in response to irradiation. It should be noted that low doses of ionizing radiation (1 Gy) and high doses (10 Gy) have a different effect on expression of VEGF, and therefore on angiogenesis processes. These data are agree with researches that demonstrated that low doses (0.8 Gy) accelerate the angiogenesis and the development of an endothelial net in the tumor of the mice, leading to its growth and the formation of VEGF-dependent metastases

розкривають механізми прометастатичних ефектів іонізуючої радіації і відкривають нові терапевтичні перспективи для поліпшення радіотерапевтичних протоколів.

У тварин ЦОГ-2 експресується в новоутвореній судинній сітці в межах пухлини, тоді як у нормальному фізіологічному стані інтактна судинна сітка експресує тільки ЦОГ-1 ензим [5]. Отже, одним із механізмів, за рахунок яких ЦОГ-2 діє як «промоутер» пухлини, визнана стимуляція ангіогенезу. Гальмування ЦОГ-2 нестероїдними протизапальними препаратами спричиняє обмеження ангіогенезу і порушення регуляції продукції проангіогенних факторів, зокрема, VEGF. Проведені експериментальні дослідження свідчать, що поєднана дія іонізуючої радіації та інгібітора ЦОГ-2 (мелоксивету) впливає на зниження рівнів PGE-2, VEGF, тобто на уповільнення ангіогенезу. Під час опромінення у великих дозах цей вплив виражений ще більше.

Таким чином, встановлено, що продукція проангіогенних факторів VEGF, PGE-2 значно знижується у разі поєднаної дії опромінення і селективного інгібітора ЦОГ-2, це обумовлює її антиангіогенний ефект і дозволяє визначити підходи до розробки нових технологій протипухлинної терапії.

ВИСНОВОК

Експериментально на щурах з перевитою пухлиною Герена встановлено, що поєднана дія X-випромінення та інгібітора ЦОГ-2 – мелоксивету знижує рівні VEGF і PGE-2, що пов'язано з механізмом блокування ЦОГ-2 і свідчить про її вплив на уповільнення процесу ангіогенезу. Виразніший ефект спостерігається при сумарній дозі 10 Гр.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer / Y.E. Joo, J.S. Rew, Y.H. Seo et al. *J. Clin. Gastroenterol.* 2006. Vol. 37, no. 1. P. 28–33.
2. Low doses of ionizing radiation promote tumor growth and metastasis by enhancing angiogenesis / I. S. Vala, L. R. Martins, N. Imaizumi et al. *PLoS One.* 2010. Vol. 5(6). P. e11222. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011222.g001>.
3. Thun M. J., Jacobs E. J., Patrono C. The role of aspirin in cancer prevention. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2012. Vol. 9, no. 5. P. 259–267. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.199>.
4. Harris R. E., Beebe-Donk J., Alshafie G. A. Cancer chemoprevention by cyclooxygenase 2 (COX-2) blockade: results of case control studies. *Subcell Biochem.* 2007. Vol. 42. P. 193–212.

[4]. Performed radiobiological studies in a new way reveal the mechanisms of pro-metastatic effects of ionizing radiation and open new therapeutic perspectives for improving radiotherapy protocols.

In animals, COX-2 is expressed in a newly formed vascular net within the tumor, whereas in normal physiological state, the intact vascular net expresses only COX-1 enzyme [5]. Therefore, one of the mechanisms by which COX-2 acts as a «promoter» of the tumor, recognized stimulation of angiogenesis. The contraction of COX-2 inhibitors leads to limitation of angiogenesis and violation of the regulation of pro-angiogenic factors, in particular VEGF. The conducted experimental studies indicate that the combined effect of ionizing radiation and the COX-2 inhibitor (meloxicet) affects the level of PGE-2, VEGF, ie, the slowing of angiogenesis. At high doses of radiation, this effect is even more expressed.

Therefore, the production of pro-angiogenic factors of VEGF, PGE-2 is significantly reduced in the case of combined radiation exposure and selective COX-2 inhibitor, which determines its antiangiogenic effect and allows to identify approaches to the development of new antitumor technology.

CONCLUSION

Experimentally, on the rats with Guerin's tumor was found that the combined effect of X-radiation and the COX-2-meloxytit inhibitor reduces levels of VEGF, PGE-2, which is associated with the blocking mechanism of COX-2 and suggests its effect on slowing down the process of angiogenesis. A more pronounced effect is observed at a total dose of 10 Gy.

REFERENCES

1. Joo YE, Rew JS, Seo YH, Choi SK, Kim YJ, Park CS, Kim SJ. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol.* 2006;37(1):28-33.
2. Vala IS, Martins LR, Imaizumi N, Nunes RJ, Rino J, Kuonen F, et al. Low doses of ionizing radiation promote tumor growth and metastasis by enhancing angiogenesis. *PLoS One.* 2010; 5(6):e11222. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011222.g001>.
3. Thun MJ, Jacobs EJ, Patrono C. The role of aspirin in cancer prevention. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012;9(5):259-67. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.199>.
4. Harris RE, Beebe-Donk J, Alshafie GA. Cancer chemoprevention by cyclooxygenase 2 (COX-2) blockade: results of case control studies. *Subcell Biochem.* 2007;42:193-212.

5. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression / N. V. Chandrasekharan, H. Dai, K. L. Roos et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. Vol. 99, no. 21. P. 13926–13931. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.162468699>.

ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

Мітряєва Наталія Андріївна – доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, завідувачка лабораторії радіаційної онкології, Державна установа «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», м. Харків

Гребіник Лідія Володимирівна – науковий співробітник лабораторії радіаційної онкології, Державна установа «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», м. Харків

Узленкова Наталія Євгеніївна – кандидат біологічних наук, завідувачка лабораторії протирадіаційних засобів і клітинних технологій, Державна установа «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», м. Харків

5. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(21): 13926-31. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.162468699>.

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Nataliia A. Mitryayeva – Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Radiation Oncology, State Institution «Grigoriev Institute for medical Radiology NAMS of Ukraine», Kharkiv, Ukraine

Lidiia V. Grebinyk – Researcher, Laboratory of Cancer Oncology, State Institution «Grigoriev Institute for medical Radiology NAMS of Ukraine», Kharkiv, Ukraine

Nataliia E. Uzlenkova – Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Radiation Drugs and Cell Technologies, State Institution «Grigoriev Institute for medical Radiology NAMS of Ukraine», Kharkiv, Ukraine

Стаття надійшла до редакції 28.03.2019

Received: 28.03.2019