

ВОЗДЕЙСТВИЕ МУЛЬТИФИТОАДАПТОГЕНА В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ, УЛУЧШАЮЩЕЕ ВЫЖИВАЕМОСТЬ И СОМАТИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ МЫШЕЙ ВЫСОКОРАКОВОЙ ЛИНИИ

Е.В. Бочаров¹, Р.В. Карпова¹, О.А. Бочарова¹, В.Г. Кучеряну², З.С. Шпрах¹

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8

Контакты: Регина Васильевна Карпова planta39@rambler.ru

Цель исследования — изучение воздействия мультифитоадаптогена (МФА) на продолжительность жизни и соматическое состояние мышей-самцов высокораковой линии СВА при профилактическом применении в раннем постнатальном онтогенезе.

Материалы и методы. В работе исследовали стандартизованный препарат МФА, включающий компоненты 40 растительных экстрактов, в том числе адаптогенов женьшеня, элеутерококка, родиолы розовой. МФА оказывает иммуномодулирующий, адгезиогенный, интерферогенный, антимутагенный, антиоксидантный и радиопротекторный эффекты. В работе использовано 131 животное. Опытные животные получали 10 % раствор МФА с питьевой водой в течение 1-го месяца постнатального развития, включая завершающий период дифференцировки нормальной ткани печени. В позднем онтогенезе оценивали соматическое состояние животных (двигательную активность, массу тела, состояние шерстного покрова), среднюю продолжительность жизни (СПЖ) животных и медиану выживаемости. Двигательную активность определяли, используя тест «открытого поля» в автоматическом режиме, с помощью системы Opto-Varimex-3 (Columbus Instruments, США). Статистический анализ результатов проводили с использованием программы STATISTICA 6.0. Медиану выживаемости определяли методом Каплана—Мейера.

Результаты. Применение МФА способствовало увеличению СПЖ высокоракковых мышей-самцов СВА на 17,1 % ($p < 0,001$), медианы выживаемости — на 25,6 % ($p < 0,001$). Повышение выживаемости сопровождалось сохранением двигательной активности животных без признаков похудения и алопеции.

Заключение. Нетоксичный иммуномодулятор МФА, применяемый в раннем постнатальном онтогенезе, повышал продолжительность жизни, сохранял удовлетворительное соматическое состояние высокоракковых мышей-самцов линии СВА, вместе с тем подавляя развитие гепатокарцином.

Ключевые слова: продолжительность жизни, высокоракковая линия мышей СВА, фитоадаптоген, женьшень, родиола розовая

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-76-81

MULTIPHYTOADAPTOGENE ADMINISTRATION IN EARLY POSTNATAL ONTOGENESIS IMPROVE LIFE-SPAN AND PHYSICAL STATUS OF HIGH-CANCER MICE

E. V. Bocharov¹, R. V. Karpova¹, O. A. Bocharova¹, V. G. Kucheryanu², Z. S. Shprakh²

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe shosse, Moscow 115478, Russia;

²Institute of general pathology and pathophysiology; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia

The aim of this investigation was to evaluate the life-span and physical status (weight, hair character, motor activity) of CBA inbred mice with high frequency of spontaneous hepatocarcinomas using multiphytoadaptogene complex (MPAC) preventive administration in early postnatal ontogenesis.

Materials and method. MPAC is a herbal formula composed of forty plants water-ethanol extracts components including adaptogenes Panax ginseng, Eleutherococcus senticosus, Rhodiola rosea. Anti-tumour, anti-oxidant, anti-mutagenic, immunomodifying activities of MPAC was demonstrated in previous studies. The study was carried out on 131 males of CBA mouse strain. The experimental mice received 10 % MPAC solution in drinking water during the first month of life including the final time period of liver differentiation. Motor activity was determined by a test of the «open field» automatically using Opto-Varimex-3 (Columbus Instruments, USA). The average life-span was evaluated. Statistical analysis was performed with the program STATISTICA 6.0. Survival median was determined by the Kaplan—Meier method.

Results. MPAC preventive use in early postnatal ontogenesis promotes mouse longevity increase for 17,1 % ($p \leq 0,001$), longevity median — for 25,6 % ($p \leq 0,001$). Physical status of experimental animals using MPAC administration had an advantage over control mice.

Conclusion. So, data obtained demonstrate nontoxic MPAC administration in early ontogenesis promotes significant life-span increase, keeps the body weight, good coat state, motor activity as well as prevents hepatocarcinomas formation.

Key words: life-span, CBA high-cancer strain of mice, phytoadaptogene, *Panax ginseng*, *Rhodiola rosea*

Введение

Профилактические в отношении опухолей эффекты препаратов принято оценивать, учитывая их превентивное действие на спонтанное опухолеобразование у линейных мышей. Классической экспериментальной моделью спонтанного канцерогенеза признана линия мышей СВА с высокой частотой возникновения гепатом. У мышей-самцов этой линии гепатомы наблюдают начиная с 6 мес, и в позднем онтогенезе (в возрасте 18–22 мес) определяют в 100 % случаев [1–4]. Вместе с тем выявление профилактического эффекта препаратов становится возможным благодаря изучению роли иммунобиологических систем в противоопухолевых реакциях организма.

В предыдущих исследованиях у 10 % мышей-самцов линии СВА уже в возрасте 8 мес определяли трабекулярные гепатокарциномы умеренной дифференцировки. В позднем онтогенезе (22 мес) у 100 % животных были выявлены низкодифференцированные трабекулярно-ацинарные гепатокарциномы [5]. Опухолевая прогрессия сопровождалась снижением экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 (которые могут обеспечивать контактные взаимодействия иммунных эффекторов и опухолевых клеток), что способствует экранированию опухоли от иммунологического надзора. Вместе с тем подавление иммунных реакций, вероятно, обеспечено и возрастанием сывороточного уровня супрессорных интерлейкинов-6 и -10 (ИЛ-6, ИЛ-10) [6]. Применение нетоксичного адгезиогенного мультифитоадаптогена (МФА) в раннем постнатальном онтогенезе способствовало долговременному повышению экспрессии LFA-1 и Mac-1, подавлению сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10 [6], снижению уровня наследственного опухолеобразования (количества и размеров гепатокарцином по сравнению с контрольными животными) [7]. Вместе с тем при воздействии МФА выявлена лейкоцитарная, в основном с участием лимфоцитов, инфильтрация и деструкция гепатокарцином [5].

Целью настоящего исследования явилось изучение профилактического воздействия МФА в раннем постнатальном онтогенезе на продолжительность жизни и соматическое состояние мышей-самцов линии СВА с высокой частотой спонтанного опухолеобразования.

Материалы и методы

В исследование были включены опытная группа ($n = 48$) и 2 контрольные группы (1-я группа – 61, 2-я группа – 22) мышей-самцов высокоразово-

линии СВА (сублиния СВА/Лас Y). Мыши были получены из отдела разведения лабораторных животных ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с международными этическими нормами, мышам давали обычный пищевой рацион. Начиная с последних сроков беременности до отъема детенышей в возрасте 3 нед самкам давали МФА. Затем в течение 1 нед детеныши-самцы пили воду с препаратом самостоятельно. Таким образом, опытные животные получали 10 % раствор МФА с питьевой водой в течение 1-го месяца постнатального развития, включая период (5–15-й день) завершения дифференцировки нормальной ткани печени. В 1-й контрольной группе мыши получали воду в качестве питья. Поскольку препарат является водно-спиртовым экстрактом, во 2-й контрольной группе мыши получали 3 % раствор этанола в воде (что соответствует концентрации этанола в получаемом животными препарате). Результаты определения изучаемых параметров в обеих контрольных группах не имели достоверных различий, поэтому эти группы были объединены в одну контрольную группу ($n = 83$).

В позднем онтогенезе оценивали массу тела, двигательную активность, состояние шерстного покрова и число животных с признаками алопеции. Двигательную активность определяли, используя тест «открытого поля» в автоматическом режиме, с помощью системы Opto-Varimex-3 (Columbus Instruments, США).

Статистический анализ результатов проводили с использованием программы STATISTICA 6.0, применяя дисперсионный анализ One-way ANOVA с оценкой достоверности различий по критерию Newman-Keuls в дальнейшем. Выживаемость животных анализировали по методу Каплана–Майера с определением достоверности различий между группами по F-критерию Кокса.

МФА представляет собой нетоксичный препарат на основе компонентов экстрактов 40 растений, включенных в Госфармакопею РФ, в том числе известных адаптогенов женьшеня, родиолы розовой, элеутерококка, лимонника, аралии. В составе МФА определены гинзенозиды, аралозиды, элеутерозиды, флавоноиды, полифенолы, витамины, аминокислоты и др. Разработаны способы его биологической и химической стандартизации [8–11]. В ранее проведенных исследованиях показаны иммуномодулирующие, в том числе интерферогенные и адгезиогенные,

Таблица 1. Средняя продолжительность жизни (СПЖ) и медиана выживаемости мышей-самцов линии СВА при воздействии МФА в раннем постнатальном онтогенезе

Показатель	Группа		p
	контрольная	опытная	
Количество животных	83	48	
СПЖ ($M \pm m$), день (мес)	$662,0 \pm 16,5$ (21,7)	$775,1 \pm 21,3$ (25,4)	$p_{1-2} < 0,001$
Медиана выживаемости, день (мес)	631,4 (20,7)	793 (26,0)	$p_{1-2} < 0,001$
Выживаемость > 1000 дней, %	0	$4,2 \pm 0,3$ ($n = 2$)	

антиоксидантные, антимуtagenные, радиопротекторные, противоопухолевые свойства МФА [12–20].

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты определения СПЖ и медианы выживаемости мышей-самцов высококорактовой линии СВА под воздействием МФА в раннем постнатальном онтогенезе. СПЖ мышей контрольной группы в среднем составила $662,0 \pm 16,5$ дня (21,7 мес), едва не достигнув 2 лет. Использование МФА способствовало продлению жизни опытных мышей на 17,1 % (до $775,1 \pm 21,3$ дня, или 25,4 мес). На основании кривых выживаемости (рис. 1), построенных по методу Каплана–Майера, было выявлено, что медиана выживаемости мышей опытной группы увеличилась на 25,6 % по сравнению с мышами контрольной группы и составила 26,0 мес (793 дня) и 20,7 мес (631,4 дня) соответственно. Полученные результаты, вероятно, имеют существенное значение, учитывая тот факт, что профилактическое воздействие МФА снижало уровень наследственного опухолеобразования, а именно количество мышей с опухолями, число и объем опухолей у 1 животного [7].

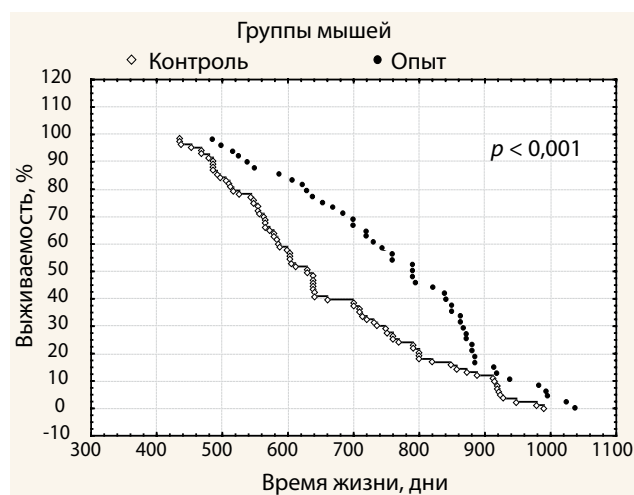


Рис. 1. Кривые выживаемости мышей-самцов линии СВА при воздействии МФА в раннем постнатальном онтогенезе ($p \leq 0,001$)

По соматическому состоянию опытные животные имели преимущество перед контрольными мышами. В возрасте 22 мес среднее значение массы тела опытных животных было достоверно выше, чем контрольных (рис. 2). Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что у контрольных животных в той или иной степени выражены кахектические явления, очевидно, связанные как с возрастными изменениями, так и с опухолевым процессом. Вместе с тем в сыворотке крови мышей контрольной группы выявлена повышенная концентрация ИЛ-6 и ИЛ-10, участвующих в патогенезе кахексии, в частности способствующих повышению сывороточного уровня С-реактивного белка и расщеплению мышечных белков [21, 22]. У животных опытной группы сохранение массы тела и отсутствие кахектических явлений сочетались с уменьшением сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10 [6]. Вероятно, снижая воспалительную реакцию, МФА препятствует распаду белков и, соответственно, потере мышечной массы.

У мышей опытной группы шерстный покров был полноценным. У 5 (16,7 %) из 30 мышей контрольной группы мы наблюдали признаки алопеции (рис. 3). Полноценный шерстный покров мышей опытной группы сочетался со снижением сывороточного уровня ИЛ-6. Последнее может препятствовать потере шерсти в результате стимуляции функциональной

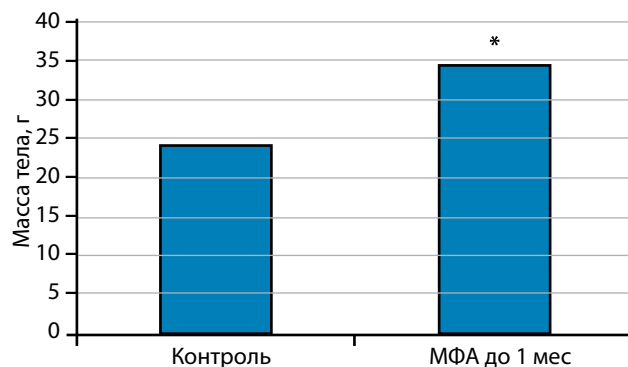


Рис. 2. Масса тела мышей-самцов линии СВА в возрасте 22 мес при воздействии МФА в раннем постнатальном онтогенезе (* $p < 0,01$)

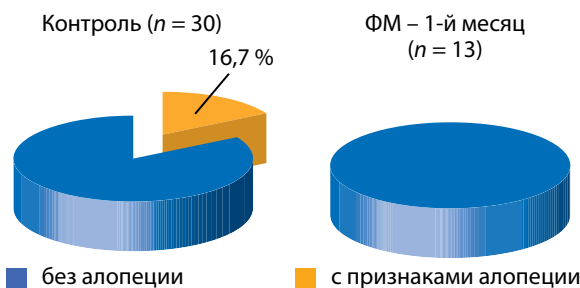


Рис. 3. Характер шерстного покрова мышей-самцов СВА в возрасте 22 мес при воздействии МФА в раннем постнатальном онтогенезе

активности волосяных фолликулов при подавлении воспалительного процесса в кожном покрове [23, 24].

На рис. 4 в качестве примера представлен самец контрольной группы в возрасте 23 мес. Как видно, шерстный покров имеет участки алопеции с признаками седины. Кроме того, у животного снижен вес, что характерно при кахексии. Аналогичный внешний вид в позднем онтогенезе имели 16,7 % животных контрольной группы. На рис. 5 в качестве примера представлено животное опытной группы. Похожее состояние шерстного покрова без дефектов мы наблюдали и у других опытных мышей.

Показатели двигательной активности мышей-самцов линии СВА представлены в табл. 2. Практически по всем изученным параметрам мы не получили достоверных различий между группами, хотя на момент измерений средний возраст контрольных мышей ($23,9 \pm 0,1$ мес) оказался на 6–7 мес меньше по сравнению с опытными животными ($30,1 \pm 0,3$ мес). Иными словами, состояние двигательной активности сравнительно старых животных опытной группы, получавших МФА в течение 1 мес постнатального онтогенеза, практически не уступало аналогичным показателям более молодых контрольных мышей. Вместе с тем, несмотря на более молодой возраст, в контрольной группе мы наблюдали мышей с признаками алопеции, с обесцвеченным шерстным покровом, чего не встречалось у опытных животных.

В конечном итоге при профилактическом воздействии МФА хорошее соматическое состояние



Рис. 4. Внешний вид самца контрольной группы в возрасте 23 мес (16,7 % мышей с признаками алопеции)



Рис. 5. Внешний вид самца опытной группы в возрасте 33 мес (100 % животных без признаков алопеции)

мышей высококорактовой линии сочеталось с увеличением продолжительности жизни по сравнению с контрольными животными.

Следует отметить, что в литературе отмечено увеличение продолжительности жизни мышей без опухолевых патологий до 1356 дней при использовании низкокалорийной диеты, снижающей массу тела животного, начиная с раннего онтогенеза [25]. Механизм действия ограничения калорийности питания

Таблица 2. Параметры двигательной активности в позднем онтогенезе у мышей линии СВА при профилактическом воздействии МФА

Показатель	Группа		P_{1-2}
	Контроль ($n = 16$)	Прием МФА в течение 1 мес ($n = 7$)	
Возраст, мес	$23,9 \pm 0,1$	$30,1 \pm 0,3$	$\leq 0,001$
Пройденный путь, см	$1089,6 \pm 74,8$	$933,7 \pm 150,2$	0,12
Время без движения, с	$82,5 \pm 7,6$	$109,3 \pm 16,7$	0,07
Число стоек	$10,0 \pm 1,8$	$5,5 \pm 1,3$	0,31
Число мелких движений	$220,5 \pm 21,0$	$195,5 \pm 20,0$	0,02

включает в себя, например, подавление TOR-сигнального пути регуляции роста и метаболизма, ассоциированного со старением.

Сопоставление с данными других исследователей показывает преимущество полученных нами результатов. Действительно, не обладая токсичностью и проявляя иммуномодулирующие свойства, МФА, применяемый в раннем постнатальном онтогенезе, увеличивал выживаемость мышей, сохраняя удовлетворительный уровень их соматического статуса несмотря на возраст, в том числе без существенного снижения массы тела.

В связи с вышеизложенным полученные результаты значимы для обсуждения механизмов противо-

опухолевых и геропротекторных эффектов нетоксичного препарата иммуномодулирующего действия.

Выводы

Воздействие МФА в раннем онтогенезе, включая завершающий период дифференцировки нормальной ткани печени, увеличивало СПЖ мышей-самцов высокоракковой линии СВА на 17,1 % и медиану выживаемости на 25,6 % по сравнению с контрольными животными.

Лучшую выживаемость мышей-самцов линии СВА, получавших МФА в качестве профилактики, сопровождала удовлетворительная двигательная активность без признаков похудения и алопеции.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Медведев Н. Н. Линейные мыши. Л.: Медицина, 1964. 230 с.
- Sharp J., Riches A., Littlewood V., Thomas D. The incidence, pathology and transplanted of hepatomas in CBA mice. *J Pathol* 1976;119 (4):211–20. DOI: 10.1002/path.1711190405. PMID: 182943.
- Бочарова О. А., Модянова Е. А. Изменение межклеточных контактов гепатоцитов в онкогенезе у мышей инбредных линий с высокой и низкой частотой спонтанных гепатом. *Онтогенез* 1982;13(4):427–9.
- Модянова Е. А., Бочарова О. А., Маленков А. Г. Профилактическое действие контактинов-кейлонов на спонтанный канцерогенез у линейных мышей. *Experimental oncology* 1983;5(3):39–42.
- Бочаров Е. В., Карпова Р. В., Вершинская А. А. и др. Лимфоцитарная инфильтрация гепатокарцином мышей высокоракковой линии СВА при воздействии мультифитоадаптогена в раннем постнатальном онтогенезе. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(2):85–90.
- Бочарова О. А., Карпова Р. В., Ильенко В. А. и др. Лейкоцитарные интегрин при гепатоканцерогенезе мышей высокоракковой линии СВА. *Российский биотерапевтический журнал* 2013;12(3):53–6.
- Бочарова О. А., Бочаров Е. В., Карпова Р. В. и др. Снижение возникновения гепатом при воздействии фитоадаптогена у высокоракковых мышей СВА. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(2):73–6.
- Шейченко О. П., Бочарова О. А., Шейченко В. И. и др. Возможность использования электронных спектров поглощения для стандартизации многокомпонентного препарата «Фитомикс-40». *Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии* 2007;5(2):20–5.
- Шейченко О. П., Бочарова О. А., Крапивкин Б. А. и др. Исследование комплексного фитоадаптогена методом ВЭЖХ. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии* 2012;10:52–9.
- Карпова Р. В., Шевченко В. Е., Бочаров Е. В. и др. Возможности использования высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией для количественного и качественного определения биологически активных веществ женьшеня в фитоэкстрактах. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(2):36–46.
- Бочарова О. А., Лыженкова М. А., Мезенцева М. В. и др. Фитоадаптоген для профилактической онкологии: иммунобиологические критерии состава. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2003;136 (12):670–3.
- Бочарова О. А., Пожарицкая М. М., Чекалина Т. Л. и др. Роль адгезионных нарушений в патогенезе лейкоплакии и возможности их коррекции неспецифическим иммуномодулятором. *Иммунология* 2004;25(1):36–43.
- Бочарова О. А., Барышников А. Ю. *Фитоадаптогены в онкологии*. М.: ЗооМедВет, 2004. 138 с.
- Пожарицкая М. М., Бочарова О. А., Чекалина Т. Л., Воронин В. Ф. Современные аспекты патогенеза и лечения лейкоплакии слизистой оболочки полости рта. *Методическое пособие для врачей*. М.: ГОУ ВУНМЦ, 2004. 46 с.
- Бочарова О. А., Карпова Р. В., Матвеев В. Б. и др. Иммуномодулирующий и интерферогенный эффекты комплексного фитоадаптогена при доброкачественной гиперплазии предстательной железы. *Российский биотерапевтический журнал* 2004;3(1):90–5.
- Бочаров Е. В., Кучеряну В. Г., Крыжановский Г. Н. и др. Влияние комплексного фитоадаптогена на МФТП-индуцированный паркинсонический синдром у мышей. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2006;141(5):495–8.
- Бочарова О. А., Давыдов М. И., Клименков А. А. и др. Перспективы применения фитоадаптогена в лечении распространенного рака желудка. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2009;148(7):96–9.
- Куренная О. Н., Карпова Р. В., Бочарова О. А. и др. Антимутагенез мультифитоадаптогена в клетках дрожжей-сахаромикетов. *Генетика* 2013;49(12):1364–9.
- Бочаров Е. В., Карпова Р. В., Казеев И. В. и др. Исследование радиозащитной активности мультифитоадаптогена в эксперименте на мышах. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 2013;3(3):55–8.
- Карпова Р. В., Бочаров Е. В., Казеев И. В. и др. Радиозащитная эффективность мультифитоадаптогена в опытах на собаках. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 2013;4(4):51–4.

21. Deans D., Tan B., Ross J. et al. Cancer cachexia is associated with the IL10–1082 gene promoter polymorphism in patients with gastroesophageal malignancy. *Am J Clin Nutr* 2009;89(4):1164–72. DOI: 10.3945/ajcn.2008.27025. PMID: 19244371.
22. Krzystek-Korpacka M., Matusiewicz M., Diakowska D. et al. Acute-phase response proteins are related to cachexia and accelerated angiogenesis in gastroesophageal cancers. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(3):359–64. DOI: 10.1515/CCLM.2008.089. PMID: 18303990.
23. Biswas S., Pinson D., Bronshteyn I.G., LeVine S. IL-6 deficiency allows for enhanced therapeutic value after bone marrow transplantation across a minor histocompatibility barrier in the twitcher (globoid cell leukodystrophy) mouse. *J Neurosci Res* 2001;65(4):298–307. DOI: 10.1002/Jnr.1154. PMID: 11494365.
24. Yu M., Kissling S., Freyschmidt-Paul P. et al. Interleukin-6 cytokine family member oncostain M is a hair-follicle-expressed factor with hair growth inhibitory properties. *Exp Dermatol* 2008;17(1):12–19. DOI: 10.1111/j.1600–0625.2007.00643.x. PMID: 17979974.
25. Schumacher B., van der Pluijm I., Moorhouse M. et al. Delayed and accelerated aging share common longevity assurance mechanisms. *PLoS Genet* 2008;4 (8):e1000161. PMCID: PMC2493043.