

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

Е. В. Бочаров<sup>1</sup>, Р. В. Карпова<sup>1</sup>, О. А. Бочарова<sup>1</sup>, В. Г. Кучеряну<sup>2</sup>, З. С. Шпрах<sup>1</sup>

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

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

**Контакты:** Регина Васильевна Карпова [planta39@rambler.ru](mailto: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, адезиогенный, 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. Bocharov<sup>1</sup>, R. V. Karpova<sup>1</sup>, O. A. Bocharova<sup>1</sup>, V. G. Kucheryanu<sup>2</sup>, Z. S. Shprakh<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Institute 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 высокоразованной

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,

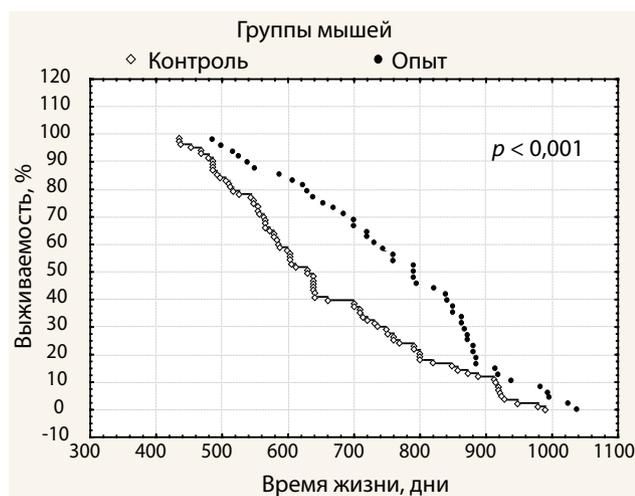
**Таблица 1.** Средняя продолжительность жизни (СПЖ) и медиана выживаемости мышей-самцов линии СВА при воздействии МФА в раннем постнатальном онтогенезе

Показатель	Группа		p
	контрольная	опытная	
Количество животных	83	48	
СПЖ (M ± m), день (мес)	662,0 ± 16,5 (21,7)	775,1 ± 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 ± 0,3 (n = 2)	

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

### Результаты и обсуждение

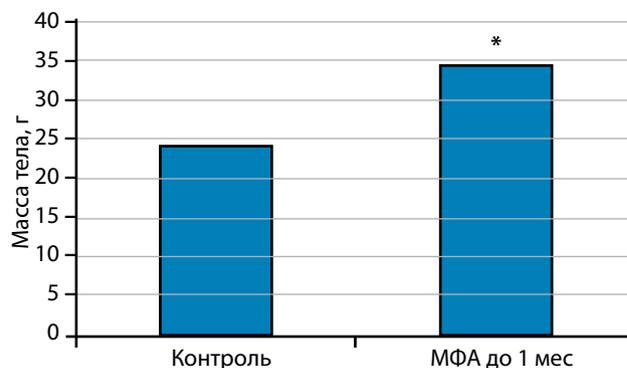
В табл. 1 представлены результаты определения СПЖ и медианы выживаемости мышей-самцов высококорактовой линии СВА под воздействием МФА в раннем постнатальном онтогенезе. СПЖ мышей контрольной группы в среднем составила  $662,0 \pm 16,5$  дня (21,7 мес), едва не достигнув 2 лет. Использование МФА способствовало 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 ( $*p < 0,01$ )

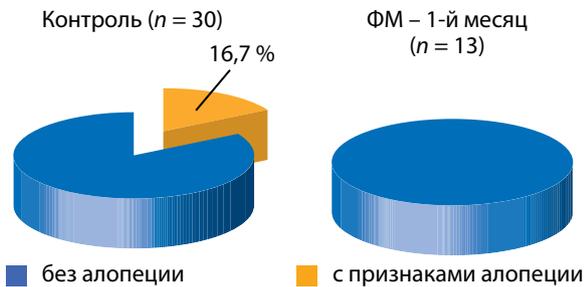


Рис. 3. Характер шерстного покрова мышей-самцов СВА в возрасте 22 мес при воздействии МФА в раннем постнатальном онтогенезе

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

1. Медведев Н.Н. Линейные мыши. Л.: Медицина, 1964. 230 с.
2. Sharp J., Riches A., Littlewood V., Thomas D. The incidence, pathology and transplantation of hepatomas in CBA mice. *J Pathol* 1976;119(4):211–20. DOI: 10.1002/path.1711190405. PMID: 182943.
3. Бочарова О.А., Модянова Е.А. Изменение межклеточных контактов гепатоцитов в онкогенезе у мышей инбридных линий с высокой и низкой частотой спонтанных гепатом. *Онтогенез* 1982;13(4):427–9.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Бочарова О.А., Барышников А.Ю. Фитоадаптогены в онкологии. М.: ЗооМедВет, 2004. 138 с.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Куренная О.Н., Карпова Р.В., Бочарова О.А. и др. Антимутагенез мультифитоадаптогена в клетках дрожжей-сахаромицетов. *Генетика* 2013;49(12):1364–9.
19. 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.
20. 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. PMID: PMC2493043.