

На правах рукописи

ИЛЬЕНКО
ВЕРЕНИКА АЛЕКСАНДРОВНА

**ВЛИЯНИЕ ФИТОАДАПТОГЕНА НА ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ
ИНТЕГРИНЫ ПРИ СПОНТАННОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ У МЫШЕЙ**

Онкология – 14.01.12

Клиническая иммунология, аллергология – 14.03.09

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва- 2012

Работа выполнена в ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН (директор – академик РАН и РАМН, профессор М.И. Давыдов)

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор

О.А. Бочарова

доктор медицинских наук, профессор

А.Ю. Барышников

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

М.В. Киселевский

доктор медицинских наук, профессор

В.К. Боженко

Ведущее учреждение: ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Институт иммунологии»

Защита состоится « ____ » _____ 2012 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.02 при ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН

Автореферат разослан « ____ » _____ 2012 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

д.м.н., профессор

Ю.А. Барсуков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Нарушение адгезивных взаимодействий считают специфическим свойством опухолевого процесса, которое обеспечивает основные проявления опухоли: потерю местного (тканевого) контроля пролиферации, анаплазию, ускользание опухоли от иммунологического надзора, инвазию и метастазирование [Kato Y. et al., 2005; Lascombe I. et al., 2006].

Известно, что на поверхности многих типов клеток присутствуют молекулы межклеточной адгезии (ICAM – intercellular adhesion molecules). С одной стороны, они являются гистонеспецифическими контактными молекулами интеграции клеток в тканевых системах, с другой стороны, служат лигандами для функционально гомологичных молекул лейкоцитарных интегринов в том числе LFA-1 (CD11a/CD18) и Mac-1 (CD11b/CD18), обеспечивающих адгезию иммунных эффекторов и клеток-мишеней [Хаитов Р.М. и др., 2011; Wong S. et al., 2007; Hynes R. et al., 2009].

Показано, что недостаток гистонеспецифических молекул адгезии на мембранах опухолевых клеток индуцирует в том числе снижение экспрессии соответствующих лейкоцитарных интегринов, что приводит к ослаблению их взаимодействий, сводя к минимуму элиминацию клеток-мишеней макрофагами, нейтрофилами, натуральными киллерами, цитотоксическими лимфоцитами. Это вносит определенный вклад в экранирование опухоли от иммунологического надзора [Shirai A. et al., 2003; Kawaguchi T., 2005]. В связи с этим существенной для реализации противоопухолевого эффекта представляется коррекция экспрессии лейкоцитарных интегринов [Sumagin R. et al., 2010; Kadioglu A. et al., 2011].

Вместе с тем, благодаря исследованиям последних лет стало очевидно, что медиаторами сложных взаимоотношений между иммунной системой организма и растущей опухолью являются цитокины. С одной стороны, цитокины принимают участие в активации иммунологических реакций, направленных на лизис опухолевых клеток. С другой стороны, цитокины участвуют в прогрессии и метастазировании опухолей [Dunn G. et al., 2006; Kim D. et al., 2009]. В частности, повышенный уровень ИЛ-6 и ИЛ-10, а также слабая экспрессия молекулы адгезии ICAM-1 сопровождается подавлением иммунных функций и наоборот [Brady G. et al., 2009]. К тому же показано, что цитокины, ассоциируясь с мембранами синтезирующих их клеток, обладают в виде мембранной формы полным спектром биологической активности и проявляют его лишь при межклеточном контакте [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008].

Таким образом, особенности ингибирования цитолитических потенциалов иммунных эффекторов в отношении опухолевых клеток связаны не только с нарушением рецепторного ансамбля, отвечающего за формирование конъюгатов с клеточными мишенями, но и с обязательным цитокиновым сопровождением [Барышников А.Ю. и др., 2008; Fillon M. 2011; Liang J., 2011]. Вероятно, изменение регуляции адгезионных механизмов с участием сигнальной реактивности цитокинов при опухолевом процессе может нуждаться в соответствующей коррекции препаратами с адгезиогенным действием.

Особый интерес в данном аспекте вызывают растительные препараты, относящиеся к группе адаптогенов (женьшень, родиола розовая, элеутерококк, лимонник, заманиха и др.) Известна их способность регулировать межклеточную адгезию, нормализуя тем самым процессы дифференцировки тканей, усиливая иммунологическую реактивность организма в отношении опухолей и проявляя противоопухолевый эффект [Kim S.W., Kwon H., 2003; Guo L. et al., 2009].

Фитомикс-40 (ФМ-40) – комплексный фитоадаптоген, содержащий компоненты экстрактов сорока растений, в том числе адаптогенов. Состав ФМ-40 защищён патентом РФ [Бочарова О.А., 1998]. Препарат стандартизован, сертифицирован в качестве парафармацевтика. В экспериментальных и клинических исследованиях показано, что ФМ-40 проявляет выраженные антиоксидантные, антимуtagenные, иммуномодулирующие, в том числе адгезиогенные и интерферогенные свойства, а также обладает противоопухолевым действием [Бочарова О.А. и др., 2008].

В связи с вышеизложенным представляется актуальным изучение экспрессии лейкоцитарных интегринов и сывороточного уровня некоторых цитокинов при опухолевом процессе на примере высококорактовой линии экспериментальных животных, а также определение значимости коррекции выявленных нарушений с помощью комплексного фитоадаптогена для подавления опухолеобразования и увеличения продолжительности жизни.

Цель исследования: изучение экспрессии лейкоцитарных интегринов у мышей, генетически предрасположенных к развитию гепатом, а также значимости её коррекции комплексным фитоадаптогеном для развития опухолевого процесса.

Задачи исследования

1. Изучение профилактического и лечебного воздействия комплексного фитоадаптогена на экспрессию лейкоцитарных интегринов у мышей-самцов

линии СВА, генетически предрасположенных к возникновению гепатокарцином.

2. Исследование возможности коррекции комплексным фитоадаптогеном сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10 у высокогепатомных животных при разных режимах применения.

3. Определение профилактического и лечебного воздействия комплексного фитоадаптогена на частоту возникновения, количество и размеры гепатокарцином у мышей-самцов линии СВА.

4. Анализ морфологических изменений в спонтанных гепатомах мышей СВА, получавших комплексный фитоадаптоген.

5. Изучение воздействия комплексного фитоадаптогена на соматическое состояние и продолжительность жизни мышей высокоракковой линии.

Научная новизна

Впервые выявлено, что при спонтанном гепатоканцерогенезе у мышей линии СВА снижена экспрессия лейкоцитарных интегринов и повышен сывороточный уровень ИЛ-6 и ИЛ-10.

Получены новые данные, характеризующие особенности инфильтрации и деструкции участков опухолей лимфоцитами, уменьшение частоты образования и размеров спонтанных опухолей, повышение продолжительности и качества жизни при коррекции комплексным фитоадаптогеном экспрессии лейкоцитарных интегринов на клетках иммунитета мышей, предрасположенных к развитию гепатом.

Научно-практическая значимость работы

Коррекция экспрессии лейкоцитарных интегринов при снижении сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10 комплексным фитоадаптогеном, существенная для профилактики наследственных опухолей, может учитываться при разработке профилактических мер, направленных на снижение уровня опухолевых заболеваний у членов "раковых" семей и людей с повышенным риском заболеваемости.

Противоопухолевый эффект, установленный при усилении экспрессии лейкоцитарных интегринов под воздействием комплексного фитоадаптогена в лечебном режиме введения, может служить основанием для изучения возможности применения аналогичных препаратов в онкологической клинике.

Изученная модель спонтанного канцерогенеза у мышей с учетом коррекции показателей лейкоцитарных интегринов, снижения частоты и размеров опухолей, их морфологических особенностей, а также повышения продолжительности и качества жизни экспериментальных животных может

использоваться для исследования препаратов, перспективных для профилактики и комплексной терапии онкологических заболеваний.

Связь диссертационной работы с планом основных научных работ

Исследования выполняли в рамках плана РАМН по темам: «Роль лейкоцитарных интегринов в опухолевом процессе» (№ Гос. Регистрации 0120.0809463; 2009-2012 гг.) и «Природные модификаторы в онкологии. Коррекция иммунобиологических реакций при спонтанном канцерогенезе комплексным фитоадаптогеном» (№ Гос. Регистрации 0120.0960417; 2010-2-14 гг.).

Апробация работы состоялась 19 декабря 2011 года в НИИ ЭДИТО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН на совместной конференции лабораторий иммунофармакологии, экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, клеточного иммунитета, химии природных соединений, биомаркёров и механизмов ангиогенеза опухолей, синтетических противоопухолевых веществ.

Основные положения диссертации доложены на X, XVI и XVII Российских конгрессах «Человек и лекарство», Москва, 2003, 2009 и 2010 гг; IX и X Всероссийских научно-практических конференциях «Отечественные противоопухолевые препараты, Москва, 2010 и 2011 гг; XIII Международном конгрессе “Phytopharm-2009”, Бонн, Германия; XIV Международном конгрессе “Phytopharm-2010”, С-Петербург, Россия.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 132 странице машинописного текста; состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 8 таблицами и 15 рисунками. Библиография включает 174 источников, из которых 38 – отечественных и 136 – зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Условия эксперимента на лабораторных животных. Исследование проводили на мышах-самцах линии СВА, которые являются классической моделью генетической предрасположенности к опухолям печени с высоким риском к их возникновению [Медведев Н.Н., 1964; Bilger A. et al., 2004]. Показано, что у всех мышей самцов линии СВА (в 100% случаев), начиная примерно с 18-22-ти месячного возраста, наблюдают гепатокарциномы [Фактор В.М. и др., 1984].

Комплексный фитоадаптоген ФМ-40 применяли в двух режимах введения: 1-й (профилактический) – пероральное введение в течение 1-го месяца постнатального развития животных, захватывая «критический» период завершения дифференцировки ткани печени, примерно за пять месяцев до возникновения гепатом; 2-й (лечебный) – введение per os (курсами), начиная с шестимесячного возраста вплоть до гибели животного. Курс введения препарата составил 3 недели, интервал между курсами – 1 неделю. Доза введения препарата была выбрана на основании предыдущих исследований [Бочарова О.А. и др., 2003; Бочарова О.А. и др., 2006].

Мыши контрольной группы, (n = 90), получали только воду в качестве питья. Мышам **группы 2**, опытной группы (n = 80), в течение 1-го месяца постнатального онтогенеза (профилактическое введение), в питьевую воду добавляли 10% Фитомикса-40. Поскольку препарат является водно-спиртовым экстрактом, мышам дополнительной контрольной группы (n = 60) в течение 1-го месяца постнатального онтогенеза в питьевую воду добавляли раствор этанола соответствующей концентрации. Мышам **группы 3** (n = 70) препарат добавляли в питьевую воду, начиная с возраста 6 мес, курсами вплоть до гибели животного. Контрольные к этой группе мыши (n = 70) в этом же режиме получали соответственно 3%-ный раствор этанола. Всего в работе было использовано 370 мышей.

Следует отметить, что во всех контрольных группах (интактных животных и принимавших 3%-ный раствор этанола в указанных режимах) результаты определения изучаемых параметров достоверно не отличались друг от друга, что наблюдали и в предшествующих исследованиях. В связи с этим мы посчитали правомерным объединить все указанные данные в одну контрольную группу (**группу 1**).

Часть животных (по 10-13 мышей из каждой группы) забивали в возрасте 4, 8, 22 месяцев. Печень контрольных и опытных животных, помимо макроскопического исследования, подвергали гистологической обработке по стандартной методике и окрашиванию гематоксилином и эозином. Макроскопической ревизии подвергали и другие органы животных. Однако опухолей при этом не наблюдали.

На лимфоцитах периферической крови животных исследовали уровни экспрессии лейкоцитарных интегринов CD11a, CD11b. Содержание цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-10 определяли в сыворотке крови. Оставшиеся животные находились под наблюдением вплоть до естественной гибели.

Объём опухолей (мм³) вычисляли по стандартной формуле. Среднюю продолжительность жизни и медиану выживаемости определяли по методу Каплан-Мейера. В позднем онтогенезе оценивали соматическое состояние

животных: число животных с признаками алопеции, вес, двигательную активность. Двигательную активность определяли, используя тест «открытого поля» в автоматическом режиме с помощью системы Opto-Varimex-3 ("Columbus Instruments", США), совместно с лабораторией общей патологии нервной системы Института общей патологии и патофизиологии РАМН (зав. лаб. - академик РАМН Г.Н. Крыжановский).

Характеристика препарата. В работе использовали комплексный фитоадаптоген Фитомикс-40 (ФМ-40), включающий компоненты 40 растительных экстрактов, в том числе женьшеня, родиолы розовой, элеутерококка, лимонника, заманихи, можжевельника, сосновых и березовых почек, калгана, бессмертника, эвкалипта, пустырника, ягод боярышника, шиповника, черной смородины и др. ФМ-40 обладает более высокой адаптогенной активностью по сравнению с отдельными фитоадаптогенами (женьшенем, родиолой розовой). [Бочарова О.А. и др., 1993; Бочарова О.А. и др., 2003]. ФМ-40 проявляет иммуномодулирующие, в том числе адгезиогенные свойства и противоопухолевую активность [Бочарова О.А. и др. 2008].

Анализ экспрессии лейкоцитарных интегринов CD11a и CD11b проводили методом непрямой иммунофлуоресценции на лимфоцитах периферической крови животных в возрасте 4, 8 и 22 месяцев с использованием наборов фирмы BD Biosciences (США).

Реакцию учитывали на проточном цитофлуориметре FACScanto Пс (Becton Dickinson, США) в гейте лимфоцитов.

Уровень цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-10 в сыворотке крови экспериментальных животных в возрасте 4, 8 и 22 месяцев определяли методом твёрдофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы «Diaclone» (Франция).

Статистический анализ результатов проводили с использованием алгоритмов компьютерной программы "STATISTICA" 6.0 с помощью однофакторного дисперсионного анализа ONE-WAY ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение иммунологических показателей. Результаты работы показали (таблица 1), что у мышей-самцов линии СВА контрольной группы, предрасположенных к возникновению спонтанных гепатом в возрасте 4 и 8 месяцев, число лимфоцитов, экспрессирующих **лейкоцитарный интегрин LFA-1 (CD11a)**, практически одинаково. В возрасте 22 мес этот показатель у животных снижается до уровня $35,3 \pm 1,6\%$. У мышей при профилактическом введении ФМ-40 (группа 2) изучаемый показатель к 22 месяцам снижается в

меньшей степени ($40,7 \pm 1,9\%$) и статистически не значимо в сравнении с таким же периодом онтогенеза у контрольных мышей. Лечебное введение препарата (группа 3) к 22 месяцам выявило достоверное повышение данного показателя ($42,3 \pm 2,9\%$) в сравнении с контролем.

Таблица 1. Воздействие Фитомикса-40 на экспрессию CD11a антигена лимфоцитами крови у мышей высококорактовой линии СВА

Группы	CD 11a (%)			
	4 мес	8 мес	22 мес	P
1. Контроль	$47,8 \pm 2,6$	$44,1 \pm 2,4$	$35,4 \pm 1,6$	$p_{4-8}=0,31$ $p_{8-22}=0,005$ $p_{4-22}=0,0003$
2. Прием ФМ-40 в течение 1-го мес.	$50,0 \pm 4,8$	$48,1 \pm 4,8$	$40,7 \pm 1,9$	$p_{4-8}=0,77$ $p_{8-22}=0,18$ $p_{4-22}=0,09$
3. Прием ФМ-40, начиная с 6-го мес.	$46,6 \pm 3,5$	$47,1 \pm 3,8$	$42,3 \pm 2,9$	$p_{4-8}=0,93$ $p_{8-22}=0,33$ $p_{4-22}=0,36$
P	$p_{1-2}=0,67$ $p_{1-3}=0,83$ $p_{2-3}=0,57$	$p_{1-2}=0,45$ $p_{1-3}=0,53$ $p_{2-3}=0,88$	$p_{1-2}=0,09$ $p_{1-3}=0,04$ $p_{2-3}=0,5$	

Таблица 2. Воздействие Фитомикса-40 на экспрессию CD11b антигена лимфоцитами крови у мышей высококорактовой линии СВА

Группы	CD 11b (%)			
	4 мес	8 мес	22 мес	P
1. Контроль	$15,7 \pm 1,1$	$13,6 \pm 1,2$	$7,8 \pm 1,0$	$p_{4-8}=0,21$ $p_{8-22}=0,0008$ $p_{4-22}=0,0001$
2. Прием ФМ-40 в течение 1-го мес.	$19,2 \pm 2,0$	$17,5 \pm 1,9$	$11,5 \pm 1,1$	$p_{4-8}=0,54$ $p_{8-22}=0,013$ $p_{4-22}=0,003$
3. Прием ФМ-40, начиная с 6-го мес.	$16,4 \pm 2,0$	$20,3 \pm 2,0$	$12,8 \pm 1,7$	$p_{4-8}=0,18$ $p_{8-22}=0,010$ $p_{4-22}=0,18$
P	$p_{1-2}=0,10$ $p_{1-3}=0,77$	$p_{1-2}=0,10$ $p_{1-3}=0,01$	$p_{1-2}=0,05$ $p_{1-3}=0,01$	

	$p_{2-3}=0,16$	$p_{2-3}=0,4$	$p_{2-3}=0,3$	
--	----------------	---------------	---------------	--

Также было показано (таблица 2), что в контрольной группе (1) количество лимфоцитов крови мышей линии СВА, экспрессирующих **лейкоцитарный интегрин Mac-1 (CD11b)**, к возрасту 22 месяца достоверно снижалось до $7,8\pm 1,0\%$. У опытных мышей «профилактической» (2) и «лечебной» (3) групп в возрасте 22 месяцев изучаемый параметр снижался в меньшей степени в сравнении с уровнем контроля в этом возрасте ($11,5\pm 1,1$ и $12,8\pm 1,7\%$ соответственно).

Таблица 3. Сывороточный уровень ИЛ-6 у мышей линии СВА при воздействии Фитомикса-40

Группы	ИЛ-6 (пг/мл)			P
	4 мес	8 мес	22 мес	
1. Контроль	$80,9\pm 4,1$	$88,5\pm 4,3$	$139,1\pm 6,6$	$p_{4-8}=0,21$ $p_{4-22}=0,001$ $p_{8-22}=0,001$
2. Прием ФМ-40 в течение 1-го мес.	$78,7\pm 6,9$	$80,5\pm 7,53$	$114,8\pm 12,3$	$p_{4-8}=0,85$ $p_{4-22}=0,02$ $p_{8-22}=0,03$
3. Прием ФМ-40, начиная с 6-го мес.	$82,9\pm 6,0$	$84,1\pm 5,9$	$111,4\pm 10,5$	$p_{4-8}=0,89$ $p_{4-22}=0,04$ $p_{8-22}=0,03$
P	$p_{1-2}=0,78$ $p_{1-3}=0,80$ $p_{2-3}=0,64$	$p_{1-2}=0,40$ $p_{1-3}=0,58$ $p_{2-3}=0,70$	$p_{1-2}=0,05$ $p_{1-3}=0,03$ $p_{2-3}=0,83$	

Концентрация ИЛ-6 в сыворотке крови у контрольных животных (группа 1) к 22-х месячному возрасту достоверно возросла до $139,1\pm 6,6$ пг/мл (таблица 3). При профилактическом введении ФМ-40 у опытных мышей (2-я группа) сывороточный уровень ИЛ-6 к 22-х месячному возрасту также достоверно увеличился до $114,8\pm 12,3$ пг/мл, отставая тем не менее по значению от контрольной группы. Применение ФМ-40 в лечебном режиме (группа 3) сопровождалось ещё меньшим повышением сывороточного

содержания ИЛ-6 ($111,4 \pm 10,5$ пг/мл), которое не достигло уровня у контрольных мышей в этом возрасте.

Таблица 4. Сывороточный уровень ИЛ-10 у мышей высокоракковой линии СВА при введении Фитомикса-40

Группы	ИЛ-10 (пг/мл)			Р
	4 мес	8 мес	22 мес	
1. Контроль	$24,8 \pm 2,0$	$31,8 \pm 2,7$	$60,9 \pm 3,9$	$p_{4-8}=0,40$ $p_{4-22}=0,001$ $p_{8-22}=0,001$
2. Прием ФМ-40 в течение 1-го мес.	$20,2 \pm 2,7$	$25,1 \pm 3,4$	$46,8 \pm 5,3$	$p_{4-8}=0,27$ $p_{4-22}=0,004$ $p_{8-22}=0,003$
3. Прием ФМ-40, начиная с 6-го мес.	$21,5 \pm 3,4$	$22,7 \pm 2,7$	$45,1 \pm 5,6$	$p_{4-8}=0,77$ $p_{4-22}=0,001$ $p_{8-22}=0,001$
Р	$p_{1-2}=0,26$ $p_{1-3}=0,52$ $p_{2-3}=0,61$	$p_{1-2}=0,21$ $p_{1-3}=0,047$ $p_{2-3}=0,45$	$p_{1-2}=0,07$ $p_{1-3}=0,04$ $p_{2-3}=0,82$	

Также выявлено (таблица 4), что **сывороточный уровень ИЛ-10** у контрольных животных к 22-х месячному возрасту достоверно возрос до $60,9 \pm 3,9$ пг/мл. При введении комплексного фитоадаптогена в профилактическом режиме у опытных мышей (группа 2) сывороточное содержание ИЛ-10 в позднем онтогенезе увеличилось ($46,8 \pm 5,3$ пг/мл), но не достигло контрольных значений. У мышей «лечебной» группы (3) при долговременном применении препарата динамика показателя ИЛ-10 аналогична таковой для 2-й группы. Вместе с тем выявлено, что содержание ИЛ-10 к возрасту 22 месяцев достоверно отстаёт от контрольного уровня. Таким образом, применение комплексного фитоадаптогена на фоне

возникающих спонтанных опухолей, т.е. в лечебном режиме, также может способствовать подавлению сывороточного уровня ИЛ-10.

Полученные результаты показали, что у мышей при спонтанном гепатоканцерогенезе происходит снижение экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на эффекторах иммунитета при повышении сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10. Кратковременное введение комплексного фитоадаптогена ФМ-40 (в течение первого месяца постнатального онтогенеза, в период, захватывающий окончательную дифференцировку ткани печени) мышам высококорактовой линии способствует долговременному увеличению числа лимфоцитов, экспрессирующих LFA-1 (CD11a/CD18) и Mac-1 (CD11b/CD18) по сравнению с контрольными животными. Последнее сопровождается подавлением сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10. Введение препарата в лечебном режиме, минуя «критический» период дифференцировки ткани печени, долговременно, курсами, начиная с 6-месячного возраста (когда образуются первые гепатомы), кардинально не меняет влияние на изучаемые показатели по сравнению с профилактическим вариантом введения ФМ-40.

Учитывая, что лигандами молекул LFA-1 и Mac-1 являются молекулы межклеточной адгезии ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 (которые могут находиться на опухолевых клетках), можно предполагать активизацию способности лимфоцитов, нейтрофилов, НК-клеток, моноцитов мигрировать в опухоль, контактировать с клетками-мишенями, что помогает гибели последних. Вероятно, при этом повышается иммунореактивность в осуществлении киллинга опухолевых клеток эффекторами иммунитета [Sasada T, Suekane S., 2011]. Следует также отметить, что полученные результаты согласуются с подавлением уровней ИЛ-6 и ИЛ-10, которое способствует ослаблению образования противоопухолевых антител, блокирующих антигены опухолевых клеток и, следовательно, рецепторы эффекторов иммунитета [Jones S. et al., 2005; Szkaradkiewicz A. et al., 2010], а также снижению ингибирования экспрессии в том числе молекул адгезии ICAM-1 на клетках-мишенях [Fulghesu A., Sanna F., 2011].

В результате, вероятно, нарушается ускользание опухолевых клеток от иммунологического надзора. При этом может происходить миграция, накопление лимфоцитов в патологическом узле и образование конъюгатов эффекторов иммунитета с опухолевыми клетками-мишенями. В данном случае, во-первых, в клетки опухоли могут проникать факторы разрушения, в том числе протеиназы, лимфотоксины и реактивные интермедиаты кислорода, азота, водорода (ОН, O₂, H₂O₂, NO). Во-вторых, в этих условиях возможна активизация FasAPO1, или CD95-антигена (рецептора апоптоза),

запускающего механизм «самоубийства» клетки. Все эти процессы могут иметь значение при восстановлении иммунореактивности в отношении опухолевых клеток при новообразованиях [Хайтов Р.М., 2005; Danese S. et al., 2005].

Исследование «клинических» показателей. В возрасте 22 мес в контрольной группе (1) опухоли были выявлены у всех животных (таблица 5), частота возникновения опухолей была равна 100%. Число опухолевых узлов на мышь составило $2,7 \pm 0,3$. У животных опытной группы (2), принимавших препарат профилактически, опухоли возникали реже - в 69,2% случаев ($p_{1-2} \leq 0,001$). Количество гепатом на мышь ($1,0 \pm 0,3$) при этом оказалось достоверно меньшим, чем в контроле ($p_{1-2} \leq 0,001$). В «лечебной» группе животных (3) число животных с гепатомами сравнимо со 2-й группой (70,0%; $p_{13} \leq 0,001$). Вместе с тем число опухолевых узлов на мышь ($1,6 \pm 0,2$) было снижено не достоверно ($p_{1-3} = 0,056$).

Таблица 5. Воздействие Фитомикса-40 на частоту возникновения спонтанных гепатом у мышей линии СВА в возрасте 22 месяца

Группы	Число мышей в группе	Число мышей с опухолями	Число опухолевых узлов на мышь ($M \pm m$)
1. Контроль	30	30 (100%)	$2,7 \pm 0,3$
2. Прием ФМ-40 в течение 1-го мес.	13	9 (69,2%)	$1,0 \pm 0,3$
3. Прием ФМ-40 с 6-ти мес.	10	7 (70,0%)	$1,6 \pm 0,4$
P		$p_{1-2} \leq 0,001$ $p_{1-3} \leq 0,001$ $p_{2-3} \geq 0,1$	$p_{1-2} \leq 0,001$ $p_{1-3} = 0,056$ $p_{2-3} = 0,24$

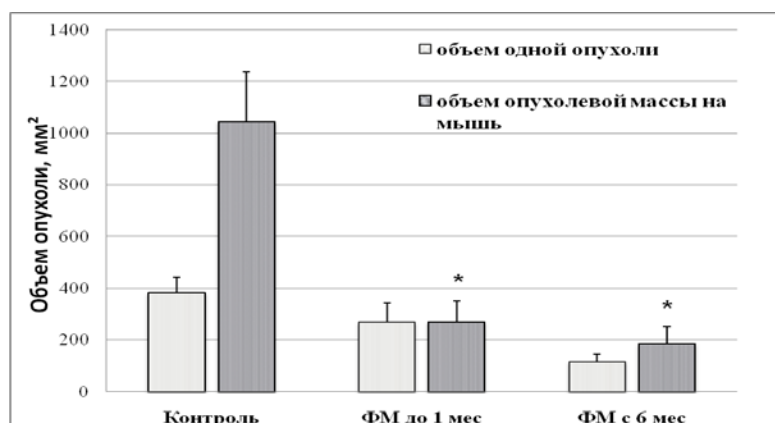


Рисунок 1. Воздействие ФМ-40 на размеры спонтанных гепатом мышей линии СВА в возрасте 22 мес. * - $p < 0,05$

Средний объём одного опухолевого узла у животных контрольной группы оказался равным $381,9 \pm 62,0 \text{ мм}^3$. **Общий объём опухолевой массы** у одного животного при этом был равен $1043,9 \pm 193 \text{ мм}^3$ (рисунок 1). При профилактическом введении ФМ-40 (группа 2), средний объём опухолевого узла ($268,4 \pm 74,9 \text{ мм}^3$) не имел статистически значимых отличий от контроля ($p = 0,48$). В то же время общий объём опухолевой массы у одного животного ($268,3 \pm 81,7 \text{ мм}^3$) оказался достоверно ниже ($p_{1-2} = 0,02$). В «лечебной» группе мышей (3) средний объём гепатомы уменьшился ($115,7 \pm 30,2 \text{ мм}^3$) не значимо ($p_{1-3} = 0,06$) по сравнению с контрольной группой. Вместе с тем общий объём опухолевой массы на мышь ($185,1 \pm 67,4 \text{ мм}^3$) достоверно снизился ($p_{1-3} = 0,02$).

Морфологические исследования ткани печени мышей-самцов линии СВА, предрасположенных к возникновению спонтанных гепатом, показали, что в возрасте 4 месяцев ни в контрольной (рис. 2), ни в опытных группах опухоли обнаружены не были.

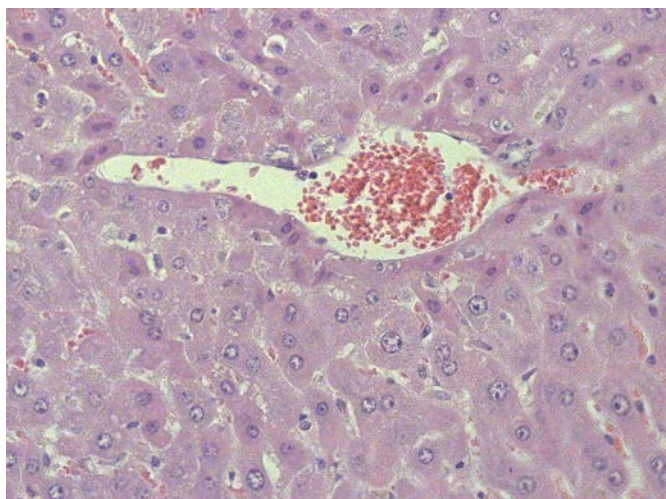


Рисунок 2. Нормальная ткань печени мышей линии СВА контрольной группы в возрасте 4 месяцев (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$)

На рисунке 2 представлена нормальная ткань печени мышей линии СВА контрольной группы в возрасте 4 месяцев. Микроскопическое строение ткани печени животных в возрасте 4 месяцев, принимавших ФМ-40 в профилактическом режиме, практически не отличалась от таковой в контроле. То же самое можно отметить и для животных из 3-й, «лечебной» группы.

Между тем, известно, что у высокоразвитых самцов линии СВА первые опухоли в печени возникают в период, близкий к шестимесячному возрасту [Н.Н. Медведев, 1964]. В нашем эксперименте в контрольной группе мышей в возрасте 8 месяцев макроскопически и микроскопически мы наблюдали опухоли у 10% исследованных животных. На рисунке 3 продемонстрирован гистологический препарат с гепатокарциномой контрольного животного в возрасте 8 месяцев. В данном случае опухоль можно оценить как трабекулярную гепатокарциному умеренной дифференцировки.

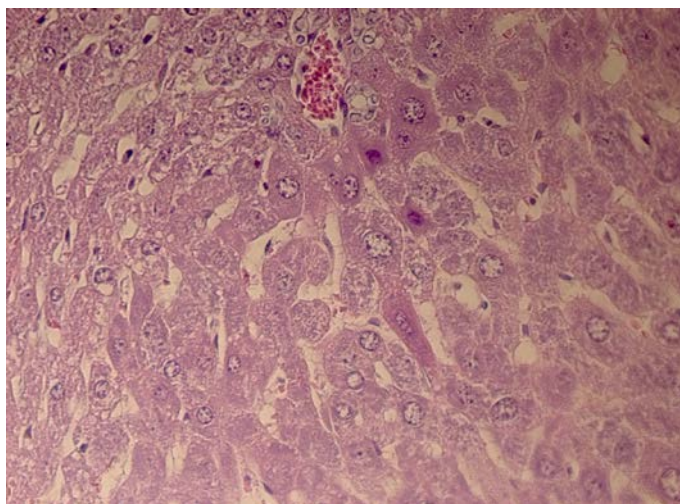


Рисунок 3. Трабекулярная гепатокарцинома умеренной дифференцировки у самца линии СВА в возрасте 8 месяцев контрольной группы (окраска гематоксилином и эозином, увеличение × 400)

Аналогичные по строению и частоте возникновения опухоли мы обнаружили в «лечебной» группе (3). Однако микроскопически в них были выявлены некоторые особенности. На рисунке 4 показана опухоль экспериментального животного в возрасте 8 месяцев из 3-й группы. По строению представленная гепатокарцинома сходна с вариантом опухоли на рисунке 2. Вместе с тем на данном срезе гепатокарциномы видна инфильтрация опухоли лейкоцитами, в большей степени, вероятно, с участием лимфоцитов, образующих выраженные скопления. В данном случае опухоль подвержена миграции в неё клеток иммунной системы.

Вместе с тем необходимо подчеркнуть, что у животных группы 2, принимавших ФМ-40 в профилактическом режиме, мы не наблюдали признаков опухолевого процесса в возрасте 8 мес.

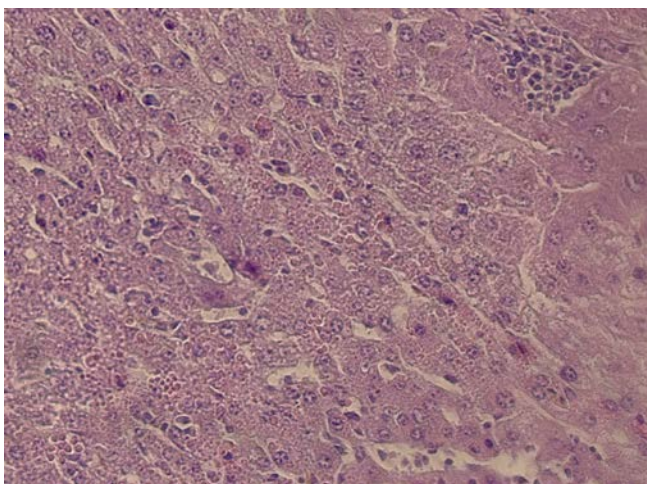


Рисунок 4. Инфильтрированная лимфоцитами гепатокарцинома. Экспериментальное животное в возрасте 8 месяцев при введении комплексного фитоадаптогена с 6-ти месячного возраста (окраска гематоксилином и эозином, увеличение × 400)

В возрасте 22 месяца в контрольной группе мышей линии СВА микроскопически обнаружены в том числе низкодифференцированные трабекулярно-ацинарные гепатокарциномы, т.е. опухоли смешанного строения (рисунок 5).

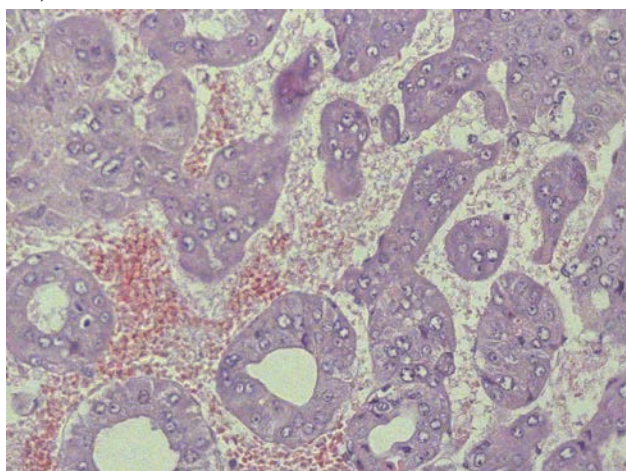


Рисунок 5. Трабекулярно-ацинарная гепатокарцинома низкой дифференцировки. Самец линии мышей СВА группы контроля в возрасте 22 месяца (окраска гематоксилином и эозином, увеличение × 400)

При введении комплексного фитоадаптогена в профилактическом режиме у мышей линии СВА в возрасте 22 мес в спонтанных гепатокарциномах выявлена в основном **лимфоцитарная инфильтрация**

опухоли (рисунок 6). При этом в опухолевой ткани выражены деструктивные признаки.

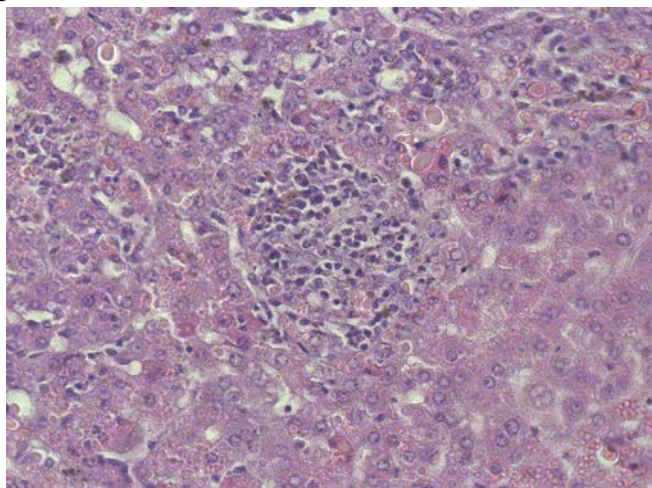


Рисунок 6. Трабекулярная гепатокарцинома, инфильтрированная лимфоцитами. Самец линии мышей СВА в возрасте 22 мес., получавший ФМ-40 в течение 1-го месяца жизни (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$)

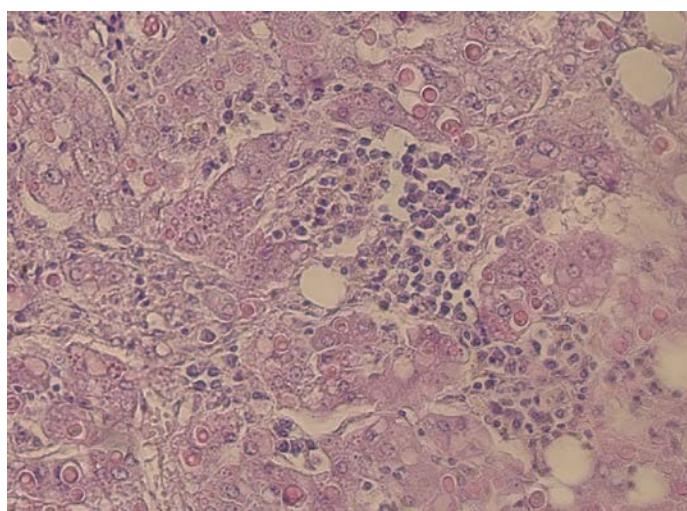


Рисунок 7. Трабекулярно-ацинарная гепатокарцинома, инфильтрированная лимфоцитами. Самец линии мышей СВА в возрасте 22 мес, получавший ФМ-40 с 6-и месячного возраста постнатального онтогенеза в лечебном режиме (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$).

У мышей третьей группы в возрасте 22 месяцев, которым комплексный фитоадаптоген вводили в лечебном режиме, также были

выявлены трабекулярно-ацинарные гепатокарциномы. Представленный на рисунке 7 участок опухоли инфильтрирован в основном лимфоцитами, которые располагаются группами и тяжами. В данном случае ткань опухоли также подвержена деструкции.

Следует отметить, что миграция лимфоцитов в опухолевые узлы является положительным прогностическим фактором для онкологического процесса [Oble D. et al., 2009]. Эффекторы иммунитета (активированные лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы и др.) при этом контактируют с клетками-мишенями, что может являться критическим фактором, который приводит в конечном итоге к гибели опухолевых клеток [Wansom D., Light E., 2012].

При спонтанном гепатоканцерогенезе, т.е. в контрольной группе животных, лимфоцитарной инфильтрации в опухолях не наблюдали. При этом были выявлены сниженная экспрессия лейкоцитарных интегринов, высокая частота возникновения опухолей, существенное их количество и размеры.

Морфологическая картина опухолевых узлов с признаками деструкции и инфильтрации лимфоцитами в результате воздействия комплексного фитоадаптогена при разных схемах введения сочетается с повышением экспрессии лейкоцитарных интегринов и подавлением процесса гепатоканцерогенеза у мышей линии СВА.

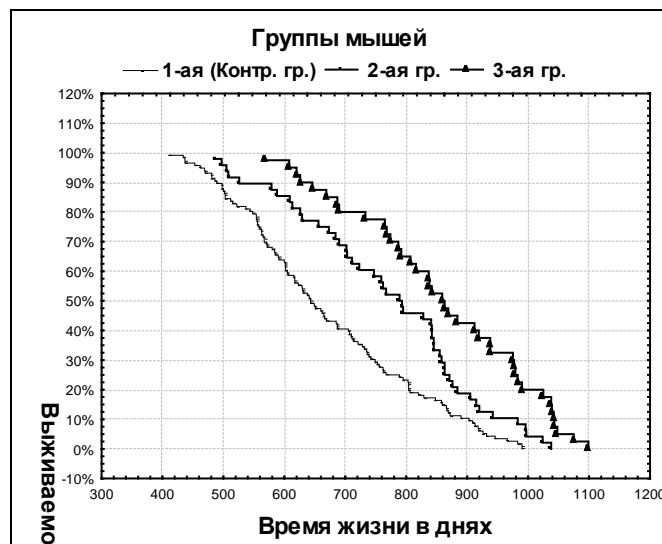


Рисунок 8. Кривые выживаемости мышей линии СВА при разных схемах введения комплексного фитоадаптогена ($p \leq 0,001$).

На основании построенных по методу Каплан-Мейера кривых выживаемости (рисунок 8) было выявлено, что **средняя продолжительность**

жизни мышей, наследственно предрасположенных к возникновению гепатом, в среднем не достигает двухлетнего возраста (таблица 6). Профилактическое и лечебное использование комплексного фитоадаптогена способствует удлинению жизни подопытных мышей практически на 98 дней (примерно 3 мес.) и 188 дней (около 6 мес.) соответственно. Между тем, **медиана выживаемости** при профилактическом применении препарата превышает контрольную величину на 146 дней (около 5 мес.), в то время как при лечебном воздействии – на 216 дней (примерно на 7 мес.). Вместе с тем ни одно животное контрольной группы не пережило 1000 дней (около 33 мес). В «профилактической» группе указанный срок пережило 2 мыши ($p_{1-2} \leq 0,001$). Выживаемость животных «лечебной» группы в данном случае равняется 20%, что составило 8 мышей ($p_{1-3} \leq 0,001$): их выживаемость в среднем составила 1051 ± 24 дня (около 34,5 мес). Рекорд по долгожительству из них побил самец, проживший 1099 дней (36 мес, или 3 года).

Таблица 6. Выживаемость высокоракowych мышей линии СВА при разных схемах введения комплексного фитоадаптогена

Группы	Кол-во животных	Продолжительность жизни ($M \pm m$), дни (мес)	Медиана выживаемости (дни)	Выживаемость > 1000 дней (%)
1.Контрольная	116	$671,2 \pm 13,7$ (22)	643(21,1)	0
2. Прием ФМ-40 в течение 1-го мес.	48	$769,0 \pm 21,5$ (25,2)	789(25,9)	$4,2 \pm 0,3$
3. Прием ФМ-40 с 6 мес.	40	$859,2 \pm 23,3$ (28,2)	859(28,2)	$20,0 \pm 2,2$
P		$p_{1-2} = 0,001$ $p_{1-3} = 0,001$ $p_{2-3} = 0,006$	$p_{1-2} \leq 0,001$ $p_{1-3} \leq 0,001$ $p_{2-3} = 0,001$	$p_{1-2} \leq 0,001$ $p_{1-3} \leq 0,001$ $p_{2-3} = 0,3$

Таким образом, полученные результаты по увеличению продолжительности жизни у высокоракowych мышей на 14,5% и 28,2% (по медиане – на 23% и 33,6%) соответственно при профилактическом и лечебном введении комплексного фитоадаптогена имеют существенное значение, учитывая тот факт, что при этом выявлен противоопухолевый эффект.

Соматическое состояние подопытных животных «профилактической» и «лечебной» групп имело преимущество перед контрольными мышами.

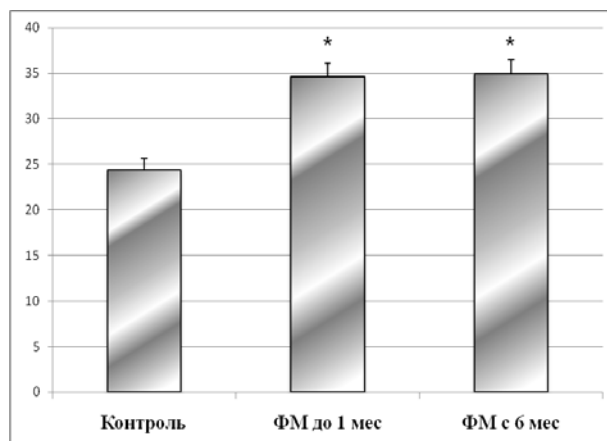


Рисунок 9. Вес мышей линии СВА (в граммах) в возрасте 22 месяца, получавших комплексный фитоадаптоген в разных режимах (*- $p < 0,01$)

Вес животных опытных групп в возрасте 22 мес был достоверно выше, чем в контроле (рисунок 9), что сочетается с подавлением сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10, которые могут негативно регулировать патогенез кахексии животных, снижая сывороточный уровень С-реактивного белка и предотвращая при этом расщепление мышечных белков, [Krzystek-Korpaska M. et al., 2008; Deans D. Et al., 2009].

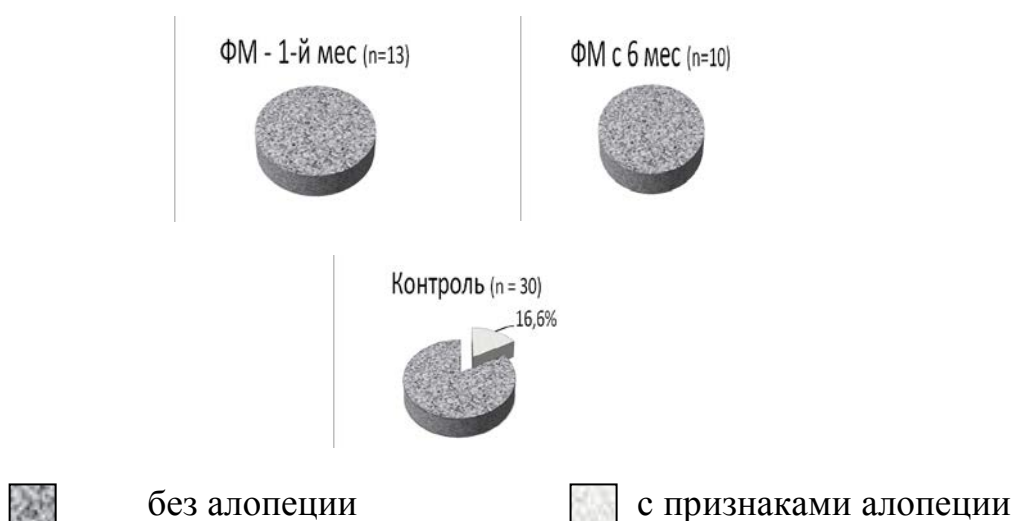


Рисунок 10. Характер шерстного покрова мышей СВА в возрасте 22 месяца, получавших Фитомикс-40 в разных режимах

Характер шерстного покрова был полноценным в обеих опытных группах. Однако в контрольной группе мы наблюдали признаки алопеции в

16,6% случаев (рисунок 10). Полноценный шерстный покров мышей опытных групп сочетается со снижением сывороточного уровня ИЛ-6. Последнее может препятствовать потере шерсти в результате стимуляции функциональной активности волосяных фолликулов при подавлении воспалительного процесса в кожном покрове [Biswas S. et al., 2001; Yu M., 2008].

По показателям двигательной активности высокоракковых мышей линии СВА в позднем онтогенезе достоверных отличий между группами мы не получили, несмотря на то, что контрольные животные на момент измерений были моложе подопытных (таблица 7). Иными словами, **двигательная активность** более старых животных подопытных групп 2 и 3, которые принимали ФМ-40 профилактически либо в лечебном варианте, практически не уступала таковой у более молодых (на шесть-семь месяцев) контрольных мышей. В конечном итоге, удовлетворительное соматическое состояние высокоракковых мышей при профилактическом и лечебном воздействии комплексного фитоадаптогена сочетается с увеличением продолжительности их жизни по сравнению с контрольными животными.

Таблица 7. Параметры двигательной активности у мышей линии СВА в позднем онтогенезе при введении Фитомикса-40

Группы (n)	Возраст, мес	Пройденный путь, см	Время без движения, сек	Число «стоек»	Число мелких движений
1. Контроль (n=16)	23,9±0,1	1089,6±74,8	82,5±7,6	10,0±1,8	220,5±21,
2. ФМ-40 в течение 1-го мес. (n=7)	30,1±0,3	933,7±150,2	109,3±16,7	5,5±1,3	195,5±20
3. ФМ-40 с 6-го мес. (n=10)	31,0±0,4	851,4±192,5	100,5±14,2	4,8±2,0	203,9±10,7
P	p ₁₋₂ ≤0,001 p ₁₋₃ ≤0,001 p ₂₋₃ = 0,1	p ₁₋₂ =0,12 p ₁₋₃ =0,19 p ₂₋₃ =0,77	p ₁₋₂ =0,07 p ₁₋₃ =0,23 p ₂₋₃ =0,69	p ₁₋₂ = 0,31 p ₁₋₃ = 0,11 p ₂₋₃ = 0,09	p ₁₋₂ = 0,02 p ₁₋₃ = 0,13 p ₂₋₃ = 0,69

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При спонтанном гепатоканцерогенезе у мышей было выявлено снижение экспрессии лейкоцитарных интегринов параллельно с возрастанием сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10, высокой частотой возникновения опухолей (100%), увеличением их количества и размеров, а также средней продолжительностью жизни, не достигающей двухлетнего возраста. Выраженной инфильтрации лейкоцитами опухолей при этом не наблюдали.

Кратковременное введение комплексного фитоадаптогена с адгезиогенным действием, захватывая завершающий период дифференцировки ткани, предрасположенной к возникновению опухолей, приводит к долговременному усилению экспрессии молекул гетеротипической адгезии лейкоцитарных интегринов LFA-1 (CD11a/CD18) и Mac-1 (CD11b/CD18), обеспечивающих контактные взаимодействия иммунных эффекторов и клеток-мишеней. Последнее может способствовать повышению активности противоопухолевых реакций иммунитета при инфильтрации спонтанных гепатокарцином в основном активированными лимфоцитами и деструкции опухолевой ткани. В результате, получено снижение частоты возникновения, количества и размеров наследственных опухолей, а также повышение выживаемости и качества жизни животных.

Вместе с тем продолжительное использование препарата, начиная с периода возникновения опухолей, также может поддерживать состояние коррекции экспрессии лейкоцитарных интегринов на эффекторах иммунитета, что существенно для деструктивных процессов в опухоли при её лимфоцитарной инфильтрации. Последнее, очевидно, значимо для подавления частоты возникновения и размеров спонтанных гепатокарцином (без изменения их количества у одного животного), а также улучшения выживаемости и соматического состояния старых мышей.

Таким образом, усиление экспрессии лейкоцитарных интегринов на эффекторах иммунитета, которое сопровождается признаками лимфоцитарной инфильтрации и деструкции опухолевых узлов, а также подавлением сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10 имеет значение для

реализации противоопухолевого эффекта, а также повышения продолжительности и качества жизни высококорактовых животных.

Выводы

1. У мышей-самцов высококорактовой линии СВА снижена экспрессия лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках крови, а также повышен сывороточный уровень интерлейкина-6 и интерлейкина-10.

2. У 100% высококорактовых мышей линии СВА в возрасте 22 месяца выявлены множественные умеренно- и низкодифференцированные трабекулярные и трабекулярно-ацинарные гепатокарциномы.

3. Пероральное введение комплексного фитоадаптогена мышам линии СВА в профилактическом режиме, включая завершающий период дифференцировки ткани печени, усиливает экспрессию молекул лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1, подавляет сывороточный уровень интерлейкина-6 и интерлейкина-10, а также снижает частоту возникновения, количество и размеры гепатокарцином.

4. Введение комплексного фитоадаптогена мышам линии СВА долговременно в лечебном режиме способствует коррекции показателей лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1, интерлейкинов -6 и -10, уменьшает частоту возникновения и размеры гепатокарцином, не влияя на их количество у одного животного.

5. При воздействии комплексного фитоадаптогена в профилактическом и лечебном режимах выявлена лейкоцитарная, в основном с участием лимфоцитов, инфильтрация, а также деструкция опухолевых узлов.

6. Профилактическое и лечебное применение комплексного фитоадаптогена при спонтанном канцерогенезе увеличивает выживаемость экспериментальных мышей примерно на 5 и 7 месяцев соответственно по сравнению с контрольными животными.

7. Лучшую выживаемость высококорактовых мышей линии СВА, получавших комплексный фитоадаптоген при разных схемах введения, сопровождает удовлетворительная двигательная активность опытных животных без признаков похудения и алопеции.

Список опубликованных работ:

1. Бочарова О.А., Чулкова С.В., Клименков А.А., Лыженкова М.А., Ильенко В.А. Возможности комплексного фитоадаптогена «Фитомикс-40» в лечении распространенного рака желудка. // Российский иммунологический журнал. 2008. - Т. 2. - № 2-3. - с. 304.
2. Бочарова О.А., Клименков А.А., Чулкова С.В., Лыженкова М.А., Карпова Р.В., Ильенко В.А. Использование комплексного фитоадаптогена для коррекции клинических и иммунобиологических показателей у больных распространенным раком желудка. // Материалы XVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – 2009. - с. 624.
3. Бочарова О.А., Давыдов М.И., Клименков А.А., Барышников А.Ю., Карпова Р.В., Чулкова С.В., Горожанская Э.Г., Ильенко В.А. Перспективы применения фитоадаптогена в лечении распространенного рака желудка. // БЭБиМ. – 2009. – Т. 148. - № 7. - с. 96-99.
4. Klimenkov A., Bocharova O., Karпова R., Chulkova S., Bocharov E., Pyenro V. Phytoadaptogens complex is effective for far-advanced gastric cancer patients. // Abstracts of the 13 International Congress «Phytopharm-2009», Bonn, Germany. – 2009. - p. 15.
5. Бочаров Е.В., Иванова-Смоленская И.А., Полещук В.В., Кучеряну В.Г., Ильенко В.А. Бочарова О.А. Возможности фитоадаптогена-нейропротектора при лечении нейродегенеративного заболевания. // БЭБиМ. – 2010. - Т. 149. - № 6. - с. 619-621.
6. Бочарова О.А., Лыженкова М.А., Карпова Р.В., Ильенко В.А., Чулкова С.В., Клименков А.А. К механизмам противоопухолевого действия комплексного фитоадаптогена при распространенном раке желудка. // Материалы XVII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – 2010. - с. 55.
7. Бочарова О.А., Лыженкова М.А., Карпова Р.В., Ильенко В.А., Чулкова С.В., Клименков А.А. Изменение уровня некоторых цитокинов при опухолевом процессе комплексным фитоадаптогеном. // Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты», Москва, Российский биотерапевтический журнал. 2010. – Т. 9. - № 1. - с. 6.
8. Bocharova O., Klimenkov A., Lyzhenkova M., Karпова R., Chulkova S., Pyenko V.A. Phytoadaptogens complex is effective for far-advanced patients. Abstracts of the 14 International Congress «Phytopharm-2010», St. Peterburg. - 2010. - p. 19.
9. Бочарова О.А., Барышников А.Ю., Ильенко В.А., Карпова Р.В., Лыженкова М.А., Бочаров Е.В., Казеев И.В. Коррекция адгезионных взаимодействий при опухолевом процессе перспективна для разработки нетоксических противоопухолевых препаратов. // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10. - №1. - с. 11-13.

10. Чулкова С.В., Клименков А.А., Бочарова О.А., Петерсон С.Б., Беневский А.И., Карпова Р.В., Лыженкова М.А. Ильенко В.А., Горожанская Э.Г., Егорова А.В., Барышников А.Ю. Возможности комплексного лечения распространенного рака желудка с использованием Фитомикса-40. Методическое пособие для врачей. Утверждено центральным координационным методическим советом ГОУ ВПО РГМУ Росздрава, Москва, 2011. 53 с.