

На правах рукописи

**ВЕРШИНСКАЯ
АННА АРКАДЬЕВНА**

**ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ ИНТЕГРИНЫ ПРИ СПОНТАННОМ
ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗЕ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СУХОГО ЭКСТРАКТА
ФИТОАДАПТОГЕНА**

14.01.12 Онкология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва — 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор — академик РАН, профессор М.И. Давыдов)

Научные руководители:

доктор биологических наук,
профессор

Бочарова Ольга Алексеевна

кандидат фармацевтических наук

Барышникова Мария Анатольевна

Официальные оппоненты:

Боженко Владимир Константинович — доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Голенков Анатолий Константинович — доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела клинической гематологии и иммунотерапии государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский научно-исследовательский институт онкологии»

Защита состоится «___» _____ 2015 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.02 на базе ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478 г. Москва, Каширское шоссе д. 23

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478 г. Москва, Каширское шоссе д. 24 и на сайте www.ronc.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Барсуков Юрий Андреевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Дефицит тканевонеспецифических молекул адгезии мембран злокачественных клеток (ICAM-1,2), в частности, способствует подавлению экспрессии контррецепторов из семейства лейкоцитарных интегринов (например, LFA-1, Mac-1), обеспечивающих прикрепление иммунных эффекторов (натуральных киллеров, цитотоксических лимфоцитов и др.) к клеткам-мишеням [Бочарова О.А., 2014; Sumagin R., Prizant H. et al., 2010; Kadioglu A., De Filippo K. et al., 2011]. Это приводит в том числе к защите опухоли от иммунологического надзора. Очевидно, коррекция экспрессии лейкоцитарных интегринов может внести вклад в реализацию противоопухолевого эффекта.

Вместе с тем, известно, что снижение активности иммунных эффекторов в отношении опухолевых клеток связано как с ослаблением их адгезионных взаимодействий с клеточными мишенями [Барышников А.Ю., 2008; Kadioglu A., De Filippo K. et al., 2011], так и с нарушением цитокиновой регуляции [Liang J., 20011; Kim D., Oh S., Kwon H. et al., 2009]. Изучение возможности восстановления регуляции адгезионных механизмов при участии реактивности цитокинов в опухолевом процессе неспецифическими препаратами с адгезиогенным действием является актуальным.

Интерес в данном случае представляют фитоадаптогены, нормализующие межклеточную адгезию, усиливая процессы дифференцировки тканей и иммунологическую реактивность организма [Бочарова О.А., 2009; Guo L. et al., 2009].

В предыдущих исследованиях на модели спонтанного гепатоканцерогенеза у мышей высокоразовой инбредной линии СВА было выявлено, что кратковременное в раннем онтогенезе и долговременное в зрелом и позднем онтогенезе на фоне возникших гепатом воздействие на примере комплексного фитоадаптогена (содержащего компоненты нескольких адаптогенов) в форме жидкого экстракта приводит к усилению экспрессии лейкоцитарных интегринов на эффекторах иммунитета [Бочарова О.А., Барышников А.Ю. и др., 2013]. Оно сопровождается признаками лейкоцитарной инфильтрации и деструкции опухолевых узлов, а также подавлением сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10 [Бочарова О.А., Барышников А.Ю. и др., 2014]. Полученные результаты оказались существенными для снижения частоты спонтанного опухолеобразования при обоих режимах введения препарата и увеличения средней продолжительности жизни [Бочарова О.А., Бочаров Е.В. и др., 2014].

Однако проведенные исследования оставили невыявленным фенотип клеток, инфильтрирующих опухоль, а также вопрос о том, экспрессированы ли на этих клетках, в частности, молекулы лейкоцитарных интегринов при использовании комплексного фитоадаптогена. Также целесообразной является оценка роли гормонов, особенно стресс-

гормона кортикостерона и полового гормона тестостерона, при увеличении продолжительности жизни высокоракowych животных.

Наряду с этим, с фармакологической точки зрения более современной и перспективной является сухая форма экстракта. Изучение влияния сухой формы, практически субстанции препарата фитоадаптогена, на модели спонтанного гепатоканцерогенеза у мышей позволит с более высокой степенью объективности оценить результаты подавления опухолевого процесса и повышения продолжительности жизни животных.

Таким образом, исследование воздействия сухого экстракта комплексного фитоадаптогена на экспрессию лейкоцитарных интегринов, содержание некоторых цитокинов и гормонов, частоту спонтанных гепатокарцином высокоракowych мышей, а также оценка значимости коррекции нарушений для снижения уровня опухолеобразования и повышения выживаемости является актуальным.

Цель исследования: изучение экспрессии молекул лейкоцитарных интегринов на клетках периферической крови и лейкоцитах, инфильтрирующих опухоль, при воздействии сухого экстракта фитоадаптогена у высокоракowych мышей линии СВА, а также значимости её коррекции при спонтанном гепатоканцерогенезе.

Задачи исследования

1. Исследование экспрессии лейкоцитарных интегринов на клетках периферической крови у мышей-самцов линии СВА с высокой частотой спонтанного опухолеобразования при воздействии сухого экстракта фитоадаптогена в раннем и зрелом онтогенезе.

2. Оценка влияния сухого экстракта фитоадаптогена на сывороточный уровень ИЛ-6 и ИЛ-10 у высокоракowych мышей.

3. Определение воздействия сухого экстракта на частоту возникновения, количество и размеры гепатокарцином у мышей-самцов линии СВА.

4. Морфологическое исследование ткани печени высокоракowych мышей при разных режимах применения сухого экстракта фитоадаптогена.

5. Иммунофенотипирование опухоль-инфильтрирующих лейкоцитов в ткани печени высокоракowych мышей, получавших сухой экстракт фитоадаптогена в разных режимах.

6. Исследование воздействия сухого экстракта фитоадаптогена на концентрацию тестостерона и кортикостерона в сыворотке крови мышей высокораковой линии СВА.

7. Изучение воздействия сухой формы препарата на продолжительность и качество жизни мышей с высокой частотой спонтанного опухолеобразования.

Научная новизна

Впервые описано воздействие сухого экстракта фитоадаптогена на экспрессию лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 клетками периферической крови, сывороточный уровень цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-10 у мышей-самцов высокоракковой линии СВА в онтогенезе.

Получены новые данные об инфильтрации спонтанных гепатокарцином высокоракковых мышей цитотоксическими CD8+лимфоцитами, экспрессирующими CD11a и CD11b лейкоцитарные интегринны, при воздействии сухого экстракта фитоадаптогена.

Впервые определено воздействие фитоадаптогена в форме сухого экстракта на содержание гормонов тестостерона и кортикостерона в сыворотке крови мышей высокоракковой линии.

Впервые проведена оценка влияния комплексного фитоадаптогена в сухой форме на уровень спонтанного опухолеобразования, продолжительность и качество жизни животных.

Практическая значимость исследования

Инфильтрация цитотоксическими CD8+лимфоцитами, экспрессирующими лейкоцитарные интегринны CD11a и CD11b, спонтанных гепатокарцином высокоракковых мышей может иметь значение для подавления опухолевого процесса и увеличения продолжительности жизни животных.

Модель генетически обусловленного гепатоканцерогенеза мышей с учетом коррекции показателей лейкоцитарных интегринов и некоторых цитокинов периферической крови, сывороточного содержания гормонов кортикостерона и тестостерона, снижения уровня опухолеобразования, фенотипа опухолев-инфильтрирующих лимфоцитов, а также увеличения выживаемости и улучшения соматического состояния экспериментальных животных может применяться для исследования препаратов, перспективных для применения в качестве компонентов профилактических и терапевтических воздействий на пациентов с повышенным риском развития злокачественных новообразований и с целью предотвращения прогрессирования процесса, особенно при гепатоканцерогенезе и начальных стадиях гепатокарцином.

Выявление эффективности сухого экстракта фитоадаптогена на модели спонтанного гепатоканцерогенеза у мышей имеет практическое значение при его использовании в качестве субстанции для исследований различных форм препарата при разных способах его применения.

Эффект снижения частоты и размеров опухолей, выявленный при усилении экспрессии лейкоцитарных интегринов под воздействием как жидкого, так и сухого

экстрактов фитоадаптогена в разных режимах введения на модели спонтанного гепатоканцерогенеза у мышей, имеет значение для повышения объективной оценки результатов подавления опухолевого процесса и увеличения продолжительности жизни животных.

Личный вклад автора

В ходе научной деятельности диссертантом самостоятельно собран экспериментальный материал, проведена статистическая обработка полученных данных с использованием современных компьютерных программ и анализ результатов исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – онкология, пунктам 1-2.

Положение, выносимое на защиту

Инфильтрация спонтанных гепатокарцином высокоракковых мышей цитотоксическими CD8⁺лимфоцитами, экспрессирующими CD11a и CD11b лейкоцитарные интегрин, может иметь значение для подавления опухолевого процесса, а также повышения выживаемости и качества жизни высокоракковых животных.

Апробация диссертации

Апробация работы состоялась 27 марта 2015 года в НИИ ЭДиТО ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н.Блохина» на совместной научной конференции с участием лабораторий иммунофармакологии, экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, фармакологии и токсикологии, клеточного иммунитета, экспериментальной химиотерапии, медицинской биотехнологии.

Основные положения диссертации доложены на XVII, XVIII, XIX международном конгрессе «Phytopharm» (Вена, 2013 г.; Санкт-Петербург, 2014 г.; Бонн, 2015 г.); XXI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2014 г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Отечественные противоопухолевые препараты" (Москва, 2014 г.; 2015 г.)

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 145 страницах 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 10 таблицами и 17 рисунками. Библиография включает 205 источников, из которых 59 — отечественных и 146 — зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Лабораторные животные. Работу проводили на мышах-самцах высокоракковой инбредной линии СВА (сублиния СВА/Lac Y). Классической моделью генетической предрасположенности к гепатокарциномам с высоким риском возникновения считают именно эту линию экспериментальных животных. У мышей-самцов линии СВА спонтанные гепатомы возникают, начиная с 6-месячного возраста, и встречаются в 7 раз чаще, чем у самок [Медведев Н.Н. 1964; Sharp J. et al., 1976]. В возрасте 18-22 месяца гепатокарциномы у самцов выявляют в 100% случаев [Фактор В.М. и др., 1984; Sharp J. et al., 1976].

Описание препарата. Комплексный фитоадаптоген (фитомикс-40, фм-40) содержит вещества из экстрактов сорока растений, в том числе адаптогенов (флавоноиды, полифенолы, гинзенозиды, аралозиды, схизандрин, салидрозид, элеутерозиды и др.) [Шевченко В.Е., Шейченко О.П. и др., 2013]. Препарат сертифицирован в качестве парафармацевтика. Экспериментальные и клинические исследования показали отсутствие токсичности, антимуtagenные, антиоксидантные, иммуномодулирующие, в том числе адгезиогенные и интерферогенные свойства, а также противоопухолевое действие препарата [Бочарова О.А., и др., 2008]. В работе использовали порошок, полученный при высушивании жидкой формы комплексного фитоадаптогена по определённой технологии.

Описание эксперимента на лабораторных животных. Сухой экстракт применяли в двух режимах введения: 1 – в течение 1-го месяца постнатального развития животных, включая время завершения дифференцировки, соответствующее нормальной ткани печени, примерно за пять месяцев до возникновения гепатом; 2 – с шестимесячного возраста (курсами) на фоне возникающих гепатом до естественной гибели животного. Курс применения препарата - 3 недели, интервал между курсами – 1 неделя. Доза сухого экстракта была приведена в соответствие с эффективной дозой жидкой формы фм-40, которая была выбрана на основании предыдущих исследований. [Бочарова О.А. и др., 2003; Бочарова О.А. и др., 2006].

Мыши контрольной группы (группа 1, n=110) получали в качестве питья только воду. Животные пили воду самостоятельно. Мыши группы 2 (n=95) получали 0,3% водный раствор сухого экстракта, который принимали самки, начиная с рождения детенышей до их отъема в возрасте 1 мес постнатального развития. Мыши группы 3 (n=95) получали аналогичный раствор сухого экстракта в питьевой воде, начиная с возраста 6 мес (курсами) до естественной гибели животного. Всего в работе было использовано 300 мышей.

Часть животных (по 11-20 мышей из каждой группы) забивали в соответствии с этическими нормами в возрасте 4, 8, 22 мес для определения изучаемых показателей. Оставшиеся животные находились под наблюдением вплоть до естественной гибели.

Методы. Печень контрольных и опытных животных, помимо макроскопического исследования, подвергали гистологической обработке по стандартной методике и окрашиванию гематоксилином-эозином, а также специально обрабатывали для проведения иммуногистохимического определения CD8, CD11a, CD11b антигенов на лейкоцитах, инфильтрирующих гепатокарциномы. Макроскопической ревизии подвергали и другие органы животных. Однако опухолей при этом не наблюдали.

Объем опухолей (мм³) вычисляли по стандартной формуле: $A \times B \times C \times 0,52$; где А, В, С – максимальные размеры опухоли по длине, ширине и высоте. Среднюю продолжительность жизни и медиану выживаемости определяли по методу Каплан-Мейера. В позднем онтогенезе оценивали массу тела, наличие алопеций и седой шерсти у животных как показатели их соматического состояния.

Экспрессию лейкоцитарных интегринов CD11a и CD11b анализировали методом непрямой иммунофлуоресценции на клетках периферической крови животных в возрасте 4, 8 и 22 месяцев, применяя наборы фирмы BD Biosciences (США). Реакцию оценивали на проточном цитофлуориметре FACScanto IIc (Becton Dickinson, США) в гейте лимфоцитов.

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

Иммуногистохимический анализ CD8, CD11a, CD11b антигенов на лейкоцитах, инфильтрирующих гепатокарциномы, проводили на парафиновых срезах гепатокарцином. Реакцию учитывали, используя непрямое иммуногистохимическое окрашивание CD8, CD11a, CD11b антигенов с применением авидин-биотин-пероксидазного комплекса (Thermo Scientific, Barrington, IL, USA).

Иммуноферментный анализ применяли для определения в сыворотке крови мышей концентрации тестостерона («Direct ELISA Kit. The EiAsyTM Way Testosterone», «Diagnostic Biochem Canada Inc») и кортикостерона («Corticosterone EIA» IDS, USA).

Результаты анализировали с помощью алгоритмов компьютерной программы “STATISTICA” 6.0, применяя однофакторный дисперсионный анализ ONE-WAY ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования выявили, что у мышей-самцов линии СВА в возрасте 4 и 8 мес число клеток крови, экспрессирующих лейкоцитарный интегрин LFA-1, или CD11a, в контрольной группе, практически одинаково (таблица 1). В возрасте 22 мес этот показатель достоверно снижался до уровня $36,5 \pm 1,9\%$ ($p_{4-22}=0,005$). У мышей 2 группы изучаемый показатель к 22 мес снижался не значимо ($44,6 \pm 2,1\%$; $p_{1-2}=0,01$). У мышей 3 группы в этом же возрасте выявлено также достоверное повышение данного показателя в сравнении с контролем ($43,4 \pm 2,6\%$; $p_{1-3}=0,04$).

Таблица 1. Уровень экспрессии CD11a антигена лимфоцитами крови у мышей линии СВА при воздействии сухого экстракта фитоадаптогена

Группы	CD 11a (%)			
	4 мес	8 мес	22 мес	p
1. Контроль	$49,4 \pm 3,6$	$45,9 \pm 3,4$	$36,5 \pm 1,9$	$p_{4-8}=0,5$ $p_{8-22}=0,03$ $p_{4-22}=0,005$
2. Прием в течение 1 месяца	$52,3 \pm 3,0$	$49,0 \pm 2,9$	$44,6 \pm 2,1$	$p_{4-8}=0,4$ $p_{8-22}=0,2$ $p_{4-22}=0,05$
3. Прием с 6 месяцев	$50,2 \pm 3,1$	$47,9 \pm 3,3$	$43,4 \pm 2,6$	$p_{4-8}=0,5$ $p_{8-22}=0,3$ $p_{4-22}=0,1$
p	$p_{1-2}=0,5$ $p_{1-3}=0,8$ $p_{2-3}=0,8$	$p_{1-2}=0,5$ $p_{1-3}=0,7$ $p_{2-3}=0,6$	$p_{1-2}=0,01$ $p_{1-3}=0,04$ $p_{2-3}=0,8$	

Таблица 2 демонстрирует, что в контрольной группе количество мононуклеаров крови мышей линии СВА, экспрессирующих лейкоцитарный интегрин Mac-1, или CD11b, в онтогенезе к возрасту 22 мес достоверно подавляется до $6,8 \pm 1,1\%$ ($p_{4-22}=0,004$). У опытных мышей 2 группы изучаемый показатель в позднем онтогенезе достоверно отставал в своем снижении от уровня контроля в этом возрасте ($12,1 \pm 1,1\%$; $p_{1-2}=0,003$). В 3 группе в позднем онтогенезе параметр также статистически значимо превышал цифру в группе контроля ($13,2 \pm 1,4\%$; $p_{1-2}=0,002$).

Таблица 2. Уровень экспрессии CD11b антигена лимфоцитами крови у мышей линии СВА при при воздействии сухого экстракта фитоадаптогена

Группы	CD 11b (%)			
	4 мес	8 мес	22 мес	p
1. Контроль	13,4±1,7	12,1±1,7	6,8±1,1	p ₄₋₈ =0,6 p ₈₋₂₂ =0,02 p ₄₋₂₂ =0,004
2. Прием в течение 1 месяца	17,2±1,5	15,6±1,4	12,1±1,1	p ₄₋₈ =0,5 p ₈₋₂₂ =0,06 p ₄₋₂₂ =0,01
3. Прием с 6 месяцев	15,0±1,5	17,9±1,4	13,2±1,4	p ₄₋₈ =0,2 p ₈₋₂₂ =0,03 p ₄₋₂₂ =0,4
p	p ₁₋₂ =0,1 p ₁₋₃ =0,5 p ₂₋₃ =0,4	p ₁₋₂ =0,1 p ₁₋₃ =0,02 p ₂₋₃ =0,3	p ₁₋₂ =0,003 p ₁₋₃ =0,002 p ₂₋₃ =0,5	

Таблица 3. Изменение уровня интерлейкина 6 в сыворотке крови у мышей высокоракковой линии СВА при воздействии сухого экстракта фитоадаптогена

Группы	ИЛ-6 (пг/мл)			p
	4 мес	8 мес	22 мес	
1. Контроль	84,2±5,2	89,7±4,1	140,2±7,2	p ₄₋₈ =0,4 p ₄₋₂₂ =0,0005 p ₈₋₂₂ =0,0005
2. Прием в течение 1 месяца	82,0±4,4	85,1±5,8	117,0±7,2	p ₄₋₈ =0,8 p ₄₋₂₂ =0,001 p ₈₋₂₂ =0,004
3. Прием с 6 месяцев	85,3±5,1	87,3±5,6	113,1±6,4	p ₄₋₈ =0,8 p ₄₋₂₂ =0,04 p ₈₋₂₂ =0,03
p	p ₁₋₂ =0,3 p ₁₋₃ =0,2 p ₂₋₃ =0,8	p ₁₋₂ =0,5 p ₁₋₃ =0,7 p ₂₋₃ =0,7	p ₁₋₂ =0,03 p ₁₋₃ =0,01 p ₂₋₃ =0,7	

Из таблицы 3 следует, что у контрольных животных концентрация ИЛ-6 в сыворотке крови к 22 месячному возрасту достоверно возросла до 140,2±7,2 пг/мл (p₄₋₂₂=0,0005). У опытных мышей 2 группы сывороточный уровень ИЛ-6 к 22 месячному возрасту достоверно возрос, отставая в своём значении от контрольной группы в позднем онтогенезе статистически значимо (117,0±7,2 пг/мл; p₁₋₂=0,03). В 3 группе животных содержание сывороточного ИЛ-6 к 22 мес также повышалось, достоверно не достигая контрольных значений в этом возрасте (113,1±6,4 пг/мл; p₁₋₃=0,01).

Таблица 4. Изменение уровня интерлейкина 10 в сыворотке крови у мышей высококорактовой линии СВА при при воздействии сухого экстракта фитоадаптогена

Группы	ИЛ-10 (пг/мл)			p
	4 мес	8 мес	22 мес	
1. Контроль	30,3±3,0	37,0±3,9	65,0±4,1	p ₄₋₈ =0,19 p ₄₋₂₂ =0,0002 p ₈₋₂₂ =0,0002
2. Прием в течение 1 месяца	25,3±2,4	29,4±3,4	50,3±4,7	p ₄₋₈ =0,33 p ₄₋₂₂ =0,0002 p ₈₋₂₂ =0,001
3. Прием с 6 месяцев	23,7±3,1	26,3±2,7	48,4±4,0	p ₄₋₈ =0,54 p ₄₋₂₂ =0,0002 p ₈₋₂₂ =0,0002
p	p ₁₋₂ =0,20 p ₁₋₃ =0,34 p ₂₋₃ =0,71	p ₁₋₂ =0,15 p ₁₋₃ =0,032 p ₂₋₃ =0,74	p ₁₋₂ =0,03 p ₁₋₃ =0,009 p ₂₋₃ =0,82	

Кроме того, определено, что сывороточная концентрация ИЛ-10 у контрольных животных в постнатальном онтогенезе растет (таблица 4). В возрасте 22 мес показатель ИЛ-10 достоверно превышал значения в более ранние периоды (65,0±4,1 пг/мл; p₄₋₂₂=0,0002). У опытных мышей 2 группы содержание ИЛ-10 в позднем онтогенезе увеличивается в меньшей степени и достоверно не достигает контрольных значений (50,3±4,7 пг/мл; p₁₋₂=0,03). У мышей 3 группы динамика показателя ИЛ-10 аналогична таковой для 2 группы. Содержание ИЛ-10 к возрасту 22 мес достоверно отстаёт от контрольного уровня (48,4±4,0 пг/мл; p₁₋₃=0,009).

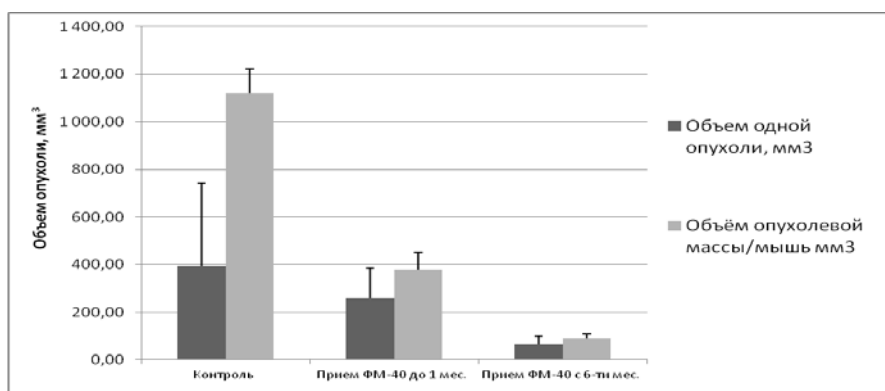
Таким образом, применение комплексного фитоадаптогена в форме сухого экстракта на фоне возникающих спонтанных опухолей может способствовать подавлению сывороточной концентрации ИЛ-10.

В контрольной группе мышей в возрасте 22 мес опухоли выявлены у всех животных, т.е. частота возникновения опухолей составляет 100%. Число опухолей на мышь в данном случае составило 2,8±0,5. У животных 2 группы опухоли возникали реже - в 66,7% случаев. При этом количество гепатом на мышь достоверно ниже, чем в контроле - 1,5±0,4. В 3 группе животных как частота возникновения гепатом (72,7%), так и число опухолей у одного животного (1,6±0,2) сравнимо с показателями мышей 2 группы (таблица 5).

Таблица 5. Изменение частоты возникновения спонтанных гепатом у мышей самцов линии СВА в возрасте 22 месяца под воздействием сухого экстракта фитoadаптогена

Группы мышей	Число мышей в группе	Число мышей с опухолями	Число опухолей/мышь (M±m)
1. Контроль	15	15 (100%)	2,8±0,5
2. Прием в течение 1 месяца	15	10 (66,7%)	1,5±0,4
3. Прием с 6 месяцев	11	8 (72,7%)	1,4±0,4
p		p ₁₋₂ ≤0,001 p ₁₋₃ ≤0,001 P ₂₋₃ ≥ 0,1	p ₁₋₂ = 0,03 p ₁₋₃ =0,04 p ₂₋₃ =0,84

Рисунок 1. Размеры спонтанных гепатом у мышей-самцов линии СВА в возрасте 22 месяца под воздействием сухого экстракта комплексного фитoadаптогена



Средний объем одной опухоли у контрольных животных был равен $393,6 \pm 102,3 \text{ мм}^3$ (рисунок 1). При этом величина опухолевой массы в среднем у одного животного равна $1120,2 \pm 350,5 \text{ мм}^3$. Во 2 группе средний объем одной опухоли $258,4 \pm 71,3 \text{ мм}^3$ не имел достоверных отличий от контроля ($p_{1-2}=0,35$). В то же время общий объем опухолевой массы у одного животного оказался значимо меньше — $378,9 \pm 126,8 \text{ мм}^3$ ($p_{1-2} = 0,04$). В 3 группе как объем одной опухоли ($66,3 \pm 17,5 \text{ мм}^3$; $p_{1-3}=0,048$), так и общий объем опухолевой массы ($90,4 \pm 32,6 \text{ мм}^3$; $p_{1-3} = 0,01$) снизились по сравнению с контролем достоверно.

Морфологическое изучение ткани печени показало, что в возрасте 4 мес у мышей всех групп опухолей не было выявлено. На рисунке 2 в качестве примера представлен срез нормальной ткани печени контрольного животного в возрасте 4 мес. Строение ткани

печени животных опытных групп в возрасте 4 мес микроскопически не отличалось от такового контрольных животных.

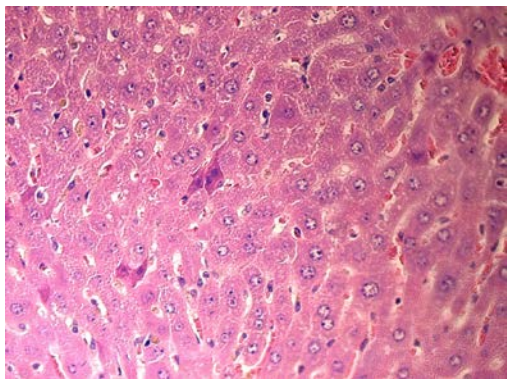


Рисунок 2. Ткань печени самца линии СВА контрольной группы в возрасте 4 мес (окраска гематоксилином и эозином увеличение $\times 400$).

В 1 и 3 группах мышей в возрасте 8 мес микроскопически трабекулярные гепатокарциномы умеренной дифференцировки были выявлены у 15% и 13,3% животных соответственно. При этом в 3 группе на срезах опухоли были видны отдельные лейкоциты. Во 2 группе в этом возрасте у всех животных опухолей не наблюдали.

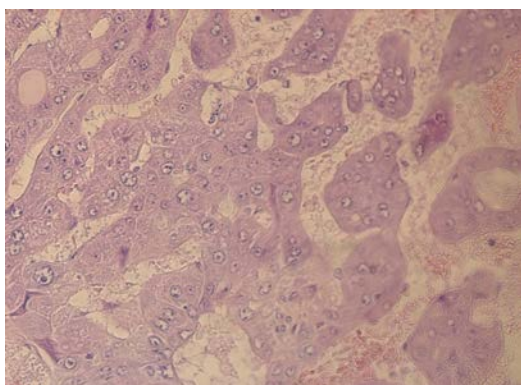


Рисунок 3. Трабекулярно-ацинарная гепатокарцинома низкой дифференцировки. Ткань печени самца линии СВА контрольной группы в возрасте 22 мес (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$)

На рисунке 3 представлен гистологический препарат опухолевой ткани печени животного контрольной группы в возрасте 22 мес. В данном случае наблюдается трабекулярно-ацинарная гепатокарцинома низкой дифференцировки, т.е. опухоль смешанного строения.

Следует отметить, что у опытных мышей в 22 мес в отличие от контрольных в гепатокарциномах определена выраженная лейкоцитарная инфильтрация и деструкция опухолевой ткани. При этом у опытных животных наблюдали снижение частоты и размеров опухолей.

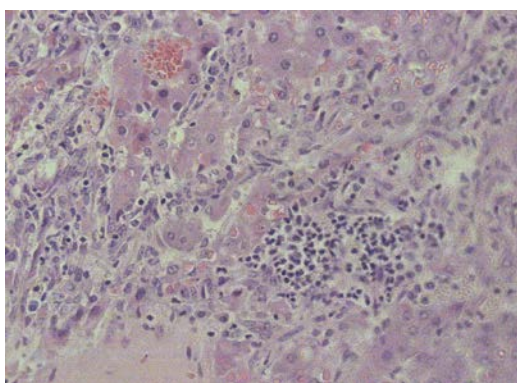


Рисунок 4. Трабекулярно-ацинарная гепатокарцинома низкой дифференцировки, инфильтрированная лейкоцитами. Ткань печени самца линии СВА 2 группы в возрасте 22 мес (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$)

На рисунке 4 представлена гепатокарцинома такого же строения, как и в контроле, мышей 2 группы в возрасте 22 мес.

Рисунок 5 демонстрирует опухоль печени мышей 3 группы в возрасте 22 мес.

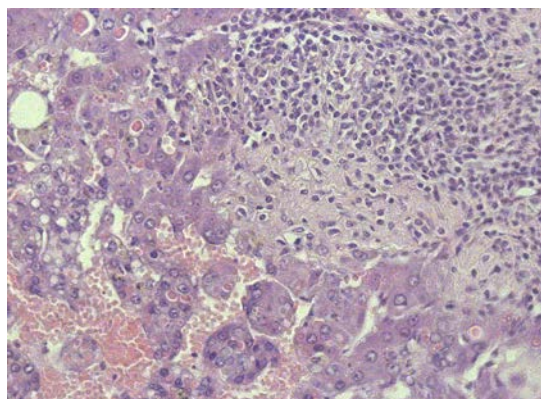


Рисунок 5. Трабекулярно-ацинарная гепатокарцинома, инфильтрированная лейкоцитами. Ткань печени самца линии СВА 3 группы в возрасте 22 мес (окраска гематоксилином и эозином, увеличение × 400).

Таким образом, снижение уровня спонтанного опухолеобразования, наблюдаемое у мышей опытных групп, принимавших сухой экстракт комплексного фитоадаптогена, можно, вероятно, объяснить в том числе выраженной лейкоцитарной инфильтрацией и деструкцией опухолевых узлов, выявляемых при морфологическом анализе гепатокарцином.

Иммуногистохимическая реакция с CD8 антигеном на лимфоцитах, инфильтрирующих трабекулярно-ацинарную гепатокарциному, самца СВА 2 группы в возрасте 22 мес представлена на рисунке 6.

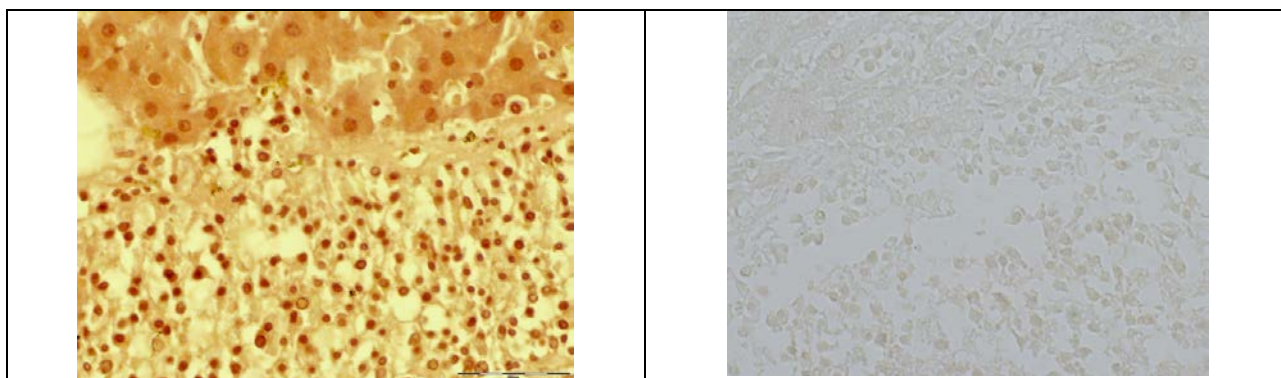


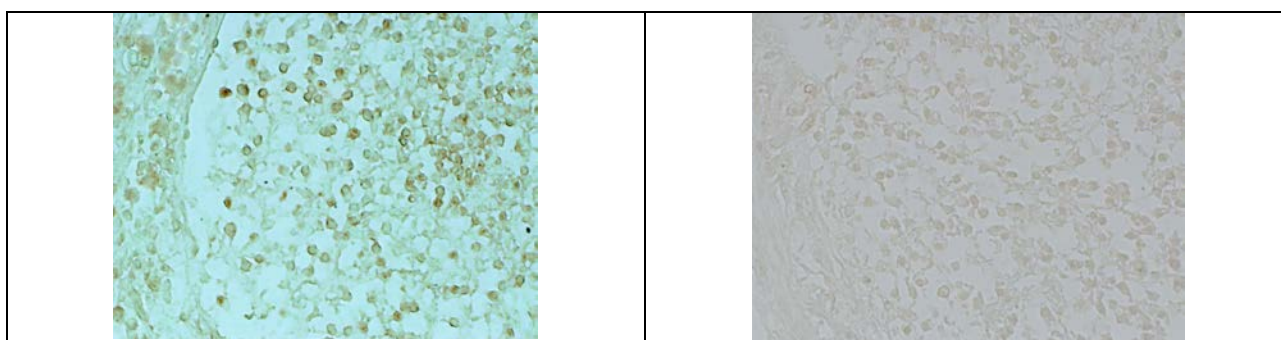
Рисунок 6. Иммуногистохимическая реакция с CD8 антигеном на лимфоцитах, инфильтрирующих трабекулярно-ацинарную гепатокарциному, самца линии СВА 2 группы в возрасте 22 мес: а – положительная реакция с CD8 антигеном на лимфоцитах, б – контрольный срез, не покрытый моноклональными антителами.

На рисунке 7 показана иммуногистохимическая реакция с CD11a антигеном на лимфоцитах, инфильтрирующих трабекулярно-ацинарную гепатокарциному, самца линии мышей СВА 2 группы в возрасте 22 мес.

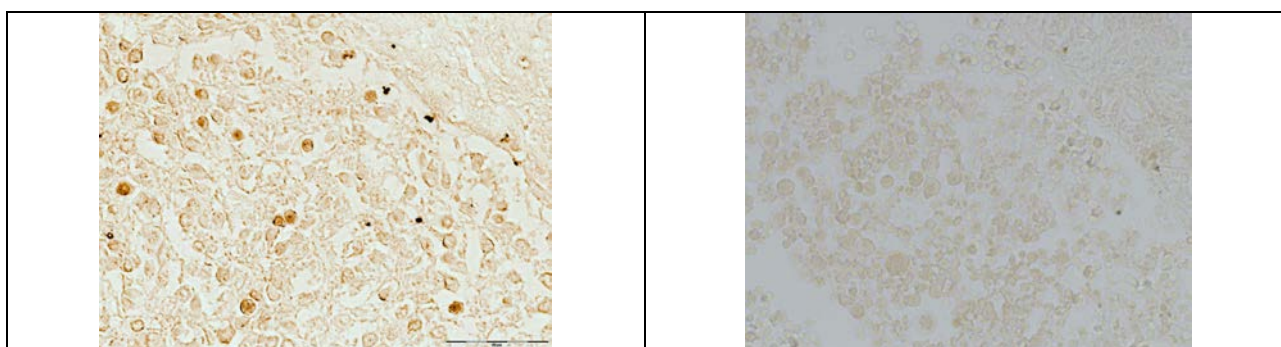
На рисунке 8 видна иммуногистохимическая реакция с CD11b антигеном на лимфоцитах, инфильтрирующих трабекулярно-ацинарную гепатокарциному, самца линии мышей СВА 2 группы в возрасте 22 мес.

На рисунке 9 представлена иммуногистохимическая реакция с CD8 антигеном на лимфоцитах, инфильтрирующих трабекулярно-ацинарную гепатокарциному, самца линии мышей СВА 3 группы в возрасте 22 мес.

На рисунке 10 представлена иммуногистохимическая реакция с CD11a антигеном на лимфоцитах, инфильтрирующих трабекулярно-ацинарную гепатокарциному, самца линии мышей СВА 3 группы в возрасте 22 мес.



а) б)
Рисунок 7. Иммуногистохимическая реакция с CD11a антигеном на лимфоцитах, инфильтрирующих трабекулярно-ацинарную гепатокарциному, самца линии СВА 2 группы в возрасте 22 месяца: а) – положительная реакция с CD11a-антигеном на лимфоцитах; б) – контрольный срез, не покрытый моноклональными антителами.



а) б)
Рисунок 8. Иммуногистохимическая реакция с CD11b антигеном на лимфоцитах, инфильтрирующих трабекулярно-ацинарную гепатокарциному, самца линии СВА 2 группы в возрасте 22 месяца: а) – положительная реакция с CD11b антигеном на лимфоцитах; б) – контрольный срез, не покрытый моноклональными антителами.

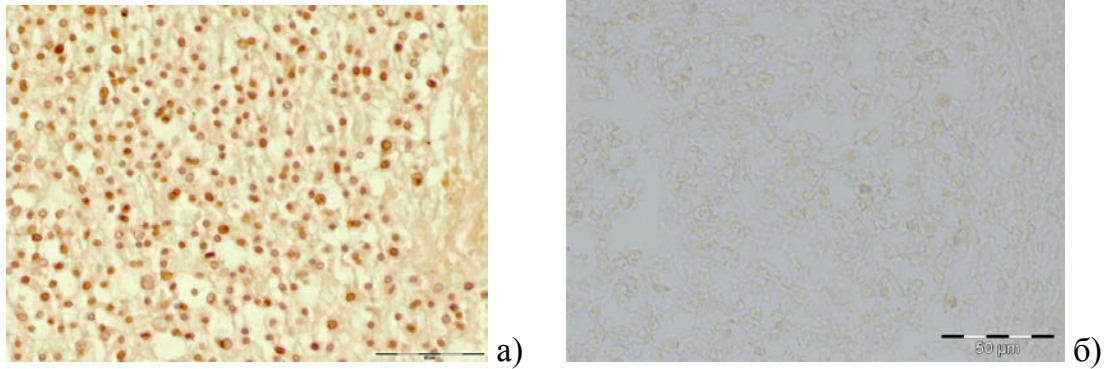


Рисунок 9. Иммуногистохимическая реакция с CD8 антигеном на лимфоцитах, инфильтрирующих трабекулярно-ацинарную гепатокарциному, самца линии СВА 3 группы в возрасте 22 месяца: а) – положительная реакция с CD8 антигеном на лимфоцитах; б) – контрольный срез, не покрытый антителами.

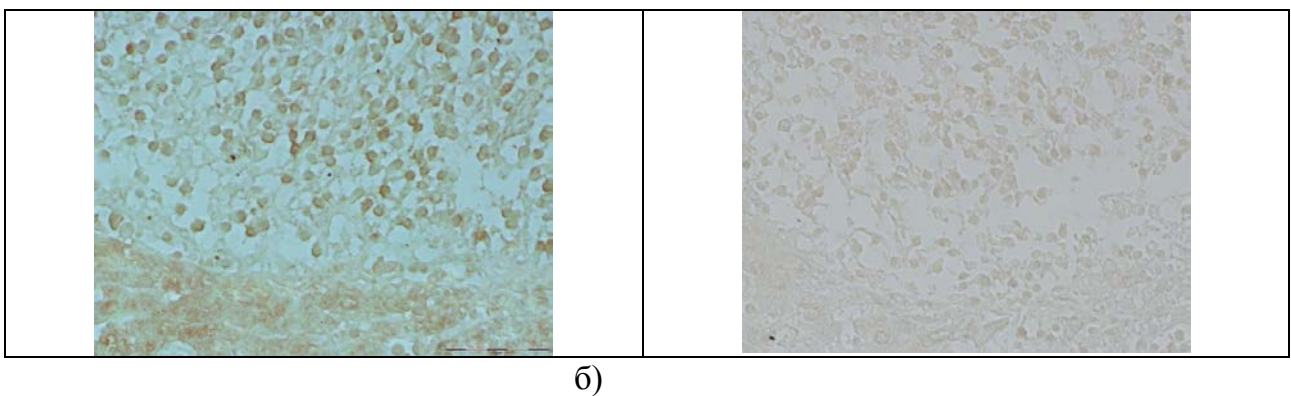


Рисунок 10. Иммуногистохимическая реакция с CD11a антигеном на лимфоцитах, инфильтрирующих трабекулярно-ацинарную гепатокарциному, самца линии СВА 3 группы в возрасте 22 месяца: а) – положительная реакция с CD11a антигеном на лимфоцитах; б) – контрольный срез, не покрытый антителами.

На рисунке 11 представлена иммуногистохимическая реакция с CD11b антигеном на лимфоцитах, инфильтрирующих трабекулярно-ацинарную гепатокарциному, самца линии мышей СВА 3 группы в возрасте 22 мес.

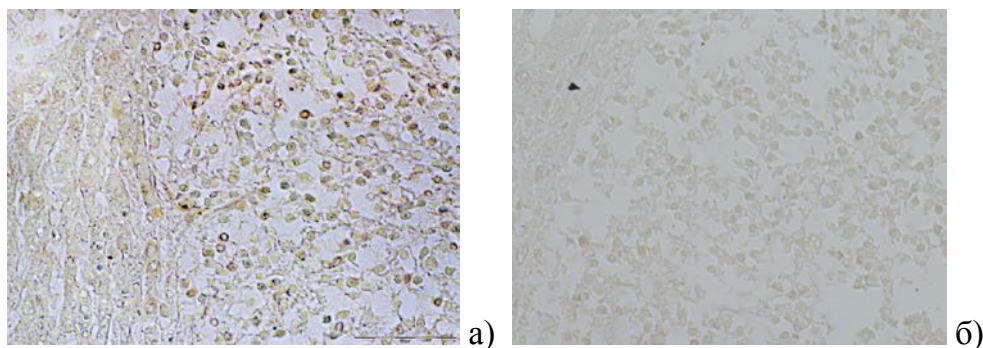


Рисунок 11. Иммуногистохимическая реакция с CD11b антигеном на лимфоцитах, инфильтрирующих трабекулярно-ацинарную гепатокарциному, самца линии СВА 3 группы в возрасте 22 месяца: а) – положительная реакция с CD11b антигеном на лимфоцитах; б) - контрольный срез, не покрытый антителами.

Следовательно, можно полагать, что мигрирующие в опухоль цитотоксические CD8+ лимфоциты экспрессируют на своей поверхности молекулы гетеропитической адгезии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1, что согласуется с подавлением образования гепатокарцином в опытных группах. Таким образом, с определенной долей уверенности можно сделать вывод о том, что воздействие сухого экстракта комплексного фитоадаптогена в том и другом режимах применения способствует инфильтрации опухолевых узлов цитотоксическими CD8+ лимфоцитами, что обеспечивается адгезионными механизмами с участием CD11a и CD11b лейкоцитарных интегринов. Очевидно, это имеет значение для подавления возникновения и прогрессии спонтанных гепатокарцином, а также, соответственно, улучшения выживаемости и соматического состояния животных.

На рис. 12 показаны кривые выживаемости мышей-самцов линии СВА, построенные по методу Каплан-Мейера, при разных схемах введения комплексного фитоадаптогена.

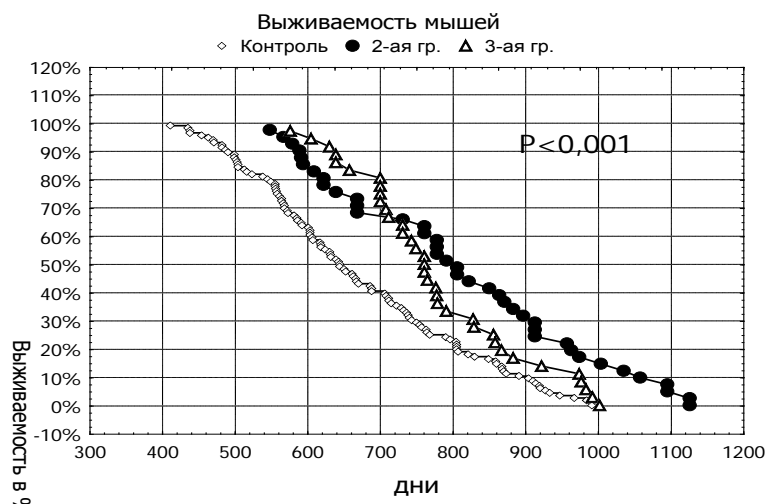


Рисунок 12. Кривые выживаемости (по Каплан-Мейеру) мышей контрольной и опытных групп высокораковой линии СВА ($p = 0,001$)

При этом средняя продолжительность жизни мышей в контроле составила 665 дней, или 22,0 мес (таблица 6). У мышей 2 группы выживаемость увеличилась до 779 дней (25,6 мес), разница между первой и второй группой оказалась 114 дней (3,5 мес). Этот же показатель в группе 3 оказался 812 дней (26,6 мес). Следовательно, мыши 3 группы жили дольше животных контрольной группы на 4, 5 месяца. В то же время медиана выживаемости животных увеличилась во 2 группе по сравнению с контролем примерно на 5 мес, а в 3 - на 6 мес. Также мы посчитали количество мышей, которые жили более 1000 дней. В 1 группе таковых не было, во 2 группе - 1 самец, в 3 группе - 7 мышей. Средняя продолжительность жизни последних составила 1076 дней. Рекордсменами были 2 самца, прожившие 36 месяцев, то есть 3 года. При этом у них выявили по одной опухоли объёмом 260,0 и 28,0 мм³.

Таблица 6. Выживаемость высококоракowych мышей линии СВА при разных схемах введения сухого экстракта комплексного фитоадаптогена

Группы	Кол-во мышей	Продолжительность жизни (M±m), дни (мес)	Медиана выживаемости (мес)	Выживаемость (%) > 1000 дней
1. Контрольная	61	665,0±20,1 (22,1±0,7)	617,0(20,5)	0
2. Прием в течение 1 месяца	36	778,6±19,1 (25,6±0,4)	760,0 (25,3)	1001 (2,7%), n = 1
3. Прием с 6 месяцев	41	811,5±26,8 (26,6±0,9)	805,0 (26,8)	1076±17,5 (17,1%), n = 7
p		p ₁₋₂ < 0,001 p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,33	p ₁₋₂ = 0,015 p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,08	

В общем, получены результаты увеличения продолжительности жизни высококоракowych самцов СВА на 17% при введении препарата кратковременно в раннем онтогенезе и на 22% - долговременно, начиная с 6 мес до естественной гибели животных.

При оценке соматического состояния в возрасте 22 мес у 20% контрольных животных констатировали седую шерсть и признаки алопеции (рисунок 13). Все животные 2 и 3 групп в этом же возрасте были покрыты практически полноценным шерстным покровом, что сочеталось 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].

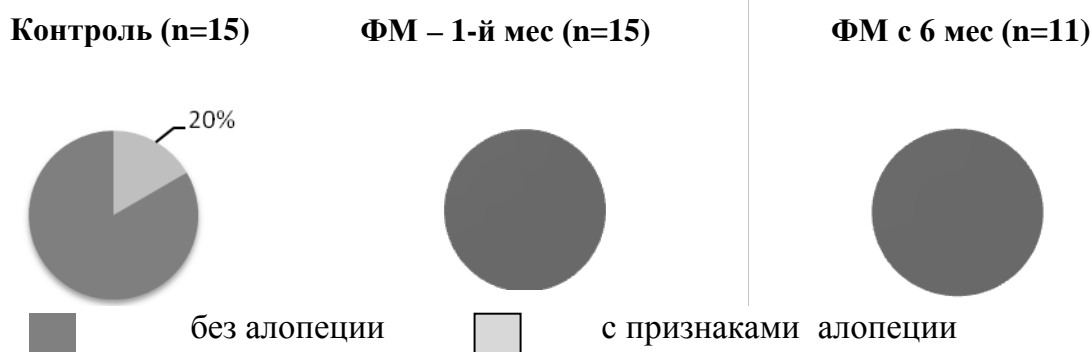


Рисунок 13. Состояние шерстного покрова мышей СВА контрольной и опытных групп в позднем онтогенезе (в возрасте 22 мес).

На рисунке 14 представлен внешний вид контрольного самца в возрасте 23 мес. Как видно, шерстный покров животного имеет участки алопеций с признаками седины. Часть животных контрольной группы в позднем онтогенезе имели аналогичный внешний вид.



Рисунок 14. Внешний вид самца контрольной группы в возрасте 23 мес.

На рисунках 15 и 16 в качестве примера представлены животные опытных групп. Как видно на фотографиях, животные имеют полноценный шерстный покров без признаков седины. Следует отметить, что на рис. 16 показан один из двух самцов, которые прожили 36 месяцев. Похожее состояние шерстного покрова без дефектов мы наблюдали и у других опытных мышей.



Рисунок 15. Внешний вид самца 2 группы в возрасте 33 мес.



Рисунок 16. Внешний вид самца 3 группы в возрасте 36 мес.

Контрольное взвешивание показало, что в 4 мес масса тела животных во всех группах примерно одинакова, к 8 месяцам она достоверно увеличивается (рис.17). В позднем онтогенезе средний вес животных в контроле снижается, а в опытных группах остается почти на уровне возраста 8 мес.

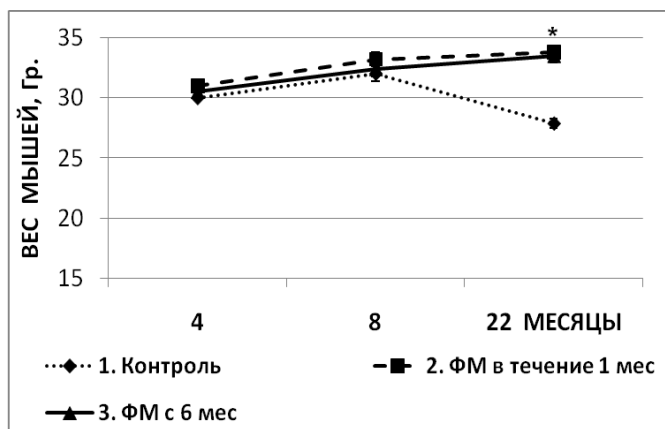


Рисунок 17. Вес мышей высокоракковой линии СВА контрольной и опытных групп в разные периоды онтогенеза

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у животных контрольной группы в той или иной степени выражены кахектические явления, что, очевидно, связано с возрастными изменениями и наличием опухолевого процесса у 100% животных этой группы. Вместе с тем, у мышей контрольной группы выявлено увеличение в сыворотке крови содержания ИЛ-6 и ИЛ-10, участвующих в патогенезе кахексии, в частности, способствуя повышению сывороточного уровня С-реактивного белка и расщеплению мышечных белков [Krzystek-Korpaska M. et al., 2008; Deans D. et al., 2009].

У животных опытных групп сохранение массы тела и отсутствие кахектических явлений сочеталось с уменьшением сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10. Вероятно, сухой экстракт фитоадаптогена при обоих режимах введения, снижая воспалительную реакцию, препятствует распаду белков и, соответственно, потере мышечной массы.

Также в результате работы было выявлено, что уровень тестостерона в онтогенезе контрольных мышей достоверно падает (таблица 7). В опытных группах снижение этого гормона с возрастом значимо отстаёт от контроля.

Таблица 7. Воздействие сухого фитоадаптогена на уровень тестостерона в сыворотке крови у мышей высококорактовой линии СВА

Группы	Тестостерон (нг/мл)			
	4 мес	8 мес	22 мес	p
1. Контроль	2,6±0,3	1,6±0,4	0,3±0,1	p ₄₋₈ =0,05 p ₈₋₂₂ =0,002 p ₄₋₂₂ =0,002
2. Прием в течение 1 месяца	3,6±0,4	2,8±0,2	0,8±0,1	p ₄₋₈ =0,08 p ₈₋₂₂ =0,002 p ₄₋₂₂ =0,002
3. Прием с 6 месяца	2,6±0,2	3,1±0,3	1,8±0,2	p ₄₋₈ =0,24 p ₈₋₂₂ =0,002 p ₄₋₂₂ =0,01
P	p ₁₋₂ =0,07 p ₁₋₃ =0,2 p ₂₋₃ =0,05	p ₁₋₂ =0,01 p ₁₋₃ =0,01 p ₂₋₃ =0,40	p ₁₋₂ =0,001 p ₁₋₃ =0,0001 p ₂₋₃ =0,0004	

Таблица 8. Воздействие сухого фитоадаптогена на уровень кортикостерона в сыворотке крови у мышей высококорактовой линии СВА

Группы	Кортикостерон (нг/мл)			
	4 мес	8 мес	22 мес	p
1. Контроль	75,6±1,7	96,5±7,2	140,0±4,5	p ₄₋₈ =0,01 p ₈₋₂₂ =0,0002 p ₄₋₂₂ =0,0002
2. Прием в течение 1 месяца	69,2±2,9	79,1±3,6	105,0±1,9	p ₄₋₈ =0,05 p ₈₋₂₂ =0,0002 p ₄₋₂₂ =0,0002
3. Прием с 6 месяца	70,9±3,8	81,3±3,9	60,5±2,4	p ₄₋₈ =0,05 p ₈₋₂₂ =0,0002 p ₄₋₂₂ =0,0002
p	p ₁₋₂ =0,07 p ₁₋₃ =0,27 p ₂₋₃ =0,72	p ₁₋₂ =0,05 p ₁₋₃ =0,06 p ₂₋₃ =0,65	p ₁₋₂ =0,0002 p ₁₋₃ =0,0002 p ₂₋₃ =0,0002	

Стресс-гормон кортикостерон (который, как известно, является гормоном стресса и вызывает, в частности, апоптоз лимфоцитов) достоверно возрастает в онтогенезе контрольных животных (таблица 8). В опытных группах увеличение уровня этого гормона значимо отставало от контроля.

Применение сухого экстракта комплексного фитоадаптогена оказало гормономодулирующий эффект: в отношении анаболического тестостерона предотвращало в определенной мере его снижение, а в отношении катаболического кортикостерона — его повышение. Гормономодулирующее воздействие сопровождается повышением иммунореактивности, подавлением частоты образования гепатокарцином, повышением продолжительности и качества жизни, что можно расценивать как

геропротекторный эффект. Последний может быть связан как с противоопухолевым влиянием препарата, с регуляцией механизмов старения, так и с тем и другим одновременно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты работы показали, что воздействие сухого экстракта комплексного фитоадаптогена на уровень экспрессии лейкоцитарных интегринов сравнимо с таковым для жидкой формы фитоадаптогена, определенным в предыдущих исследованиях [Бочарова О.А. и др., 2012; 2013]. Выявление эффективности сухой формы препарата фитоадаптогена, которая является более современной и перспективной с точки зрения хранения и транспортировки, имеет практическое значение при его использовании в качестве субстанции для исследований различных форм препарата при разных способах его применения.

При введении препарата высокогепатомным мышам кратковременно в раннем постнатальном онтогенезе, включая завершающий период дифференцировки нормальной ткани печени (5-15 день постнатального развития) можно обеспечить длительный эффект повышения экспрессии на клетках периферической крови молекул лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1. Долговременное применение сухой формы фитоадаптогена, начиная с 6 месяцев, периода возникновения опухолей, и до естественной гибели животных, может приводить к аналогичным результатам. Очевидно, курсовое введение адгезиогенного препарата на фоне возникших опухолей в течение длительного времени способствует поддержанию экспрессии молекул, обеспечивающих контактные взаимодействия между эффекторами иммунитета и клетками-мишенями. При этом в обеих опытных группах выявлено долговременное снижение уровня сывороточного содержания ИЛ-6 и ИЛ-10. В данном случае, вероятно, подавляется ингибирование экспрессии молекул адгезии ICAM-1, 2 на клетках-мишенях и усиленное образование антител (блокирующих антигены опухолевых клеток и, следовательно, рецепторы эффекторов иммунитета). В результате, нарушается ускользание опухолевых клеток от иммунологического надзора [Danese S., Semeraro S. et al., 2005].

Наряду с этим, может происходить миграция и накопление в опухоли цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов, обеспечивающих контактные взаимодействия с опухолевыми клетками при участии молекул гетеропитической адгезии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1, что согласуется с подавлением образования гепатокарцином в опытных группах. При этом, во-первых, в клетки опухоли, вероятно, проникают факторы разрушения, в том числе протеиназы, лимфотоксины и реактивные интермедиаты кислорода, азота, водорода. Во-вторых, может происходить несекреторный лизис опухолевых клеток при активации на них FasAPO1, или CD95-антигена – рецептора апоптоза, запускающего механизм клеточной гибели. Все эти процессы могут иметь значение при восстановлении иммунореактивности в отношении опухолевых клеток при новообразованиях [Kovalovich K. Et al., 2001; Narimatsu M. et al., 2001].

Организму редко удается преодолеть способность опухоли ускользать от иммунологического надзора [Gooden M.J., de Bock G.H. et al., 2011]. Поэтому,

действительно, главной целью противоопухолевой иммунотерапии является индукция реактивности CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов [Beatty P.L., Cascio S., Lutz E., 2011]. Таким образом, повышение экспрессии лейкоцитарных интегринов на иммунных эффекторах периферической крови, подавление сывороточного ИЛ-6 и ИЛ-10, которое сочетается с выраженной инфильтрацией опухоли цитотоксическими CD8⁺, CD11a⁺, CD11b⁺ лимфоцитами при её деструкции, а также с увеличением уровня сывороточного тестостерона и снижением - кортикостерона под воздействием комплексного фитоадаптогена в сухой форме, вероятно, контролирует противоопухолевые реакции иммунитета, а также выживаемость и качество жизни высококорковых животных.

В работе продемонстрировано, что нетоксичный комплексный фитоадаптоген в сухой форме, применяемый с питьевой водой в раннем, среднем и позднем онтогенезе, снижал уровень гепатокарцином, вызывая иммуномодулирующее и гормонотропное действие, увеличивал выживаемость и улучшал соматическое состояние высококорковых мышей.

Следовательно, полученные результаты значимы для обсуждения механизмов противоопухолевых и геропротекторных эффектов нетоксичного препарата иммуномодулирующего действия.

ВЫВОДЫ

1. При воздействии сухой формы комплексного фитоадаптогена в раннем постнатальном онтогенезе в течение первого месяца жизни, включая завершающий период дифференцировки нормальной ткани печени, а также начиная с 6 месяцев, периода появления первых гепатом, до естественной гибели животного, происходит долговременное повышение экспрессии молекул лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках периферической крови высокогепатомных мышей-самцов линии СВА.

2. Применение комплексного фитоадаптогена в сухой форме выявило долговременное снижение сывороточного содержания ИЛ-6 и ИЛ-10 в обеих опытных группах.

3. Введение сухого экстракта фитоадаптогена в обеих опытных группах способствует снижению частоты возникновения наследственных гепатом, а также уменьшению числа опухолей и объема опухолевой массы у одного животного.

4. При воздействии сухого экстракта комплексного фитоадаптогена у мышей обеих опытных групп микроскопические и иммуногистохимические исследования выявили инфильтрацию трабекулярных и трабекулярно-ацинарных гепатокарцином умеренной и низкой дифференцировки цитотоксическими CD8⁺ лимфоцитами, экспрессирующими LFA-1 и Mac-1 лейкоцитарные интегрины, а также деструкцию опухолей.

5. Увеличение продолжительности жизни высококорковых мышей-самцов СВА на 17% при кратковременном применении в раннем постнатальном онтогенезе и на 22% при длительном применении сухого экстракта фитоадаптогена сочетается с повышением в онтогенезе гормона тестостерона и подавлением стресс-гормона кортикостерона.

6. Повышение выживаемости животных под влиянием сухой формы фитоадаптогена выявлено вместе с хорошим соматическим состоянием мышей обеих опытных групп, которое характеризовали удовлетворительным шёрстным покровом без алопеций и потери веса в отличие от контрольных животных.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бочарова, О.А. Снижение возникновения гепатом при воздействии фитоадаптогена у высококоракowych мышей СВА. / О.А. Бочарова, Е.В. Бочаров, Р.В. Карпова, **А.А. Вершинская**, Ю.Н. Соловьев // Российский биотерапевтический журнал. — 2014.—Т. 13. — № 2. — С. 73-76.
2. Бочаров, Е.В Лимфоцитарная инфильтрация гепатокарцином мышей высококораковой линии СВА при воздействии мультифитоадаптогена в раннем постнатальном онтогенезе. / Е.В. Бочаров, Р.В. Карпова, **А.А. Вершинская**, В.Г. Кучеряну, О.А. Бочарова // Российский биотерапевтический журнал. — 2015. — Т. 14. — № 2 . — С. 85-90.
3. Bocharova, O.A. Preventive use of multiphytoadaptogene complex reduced frequence and sizes of tumours in CBA mice genetically predisposal to hepatocarcinomas. / O.A. Bocharova, R.V. Karpova, E.V. Bocharov, **A.A. Vershinskaya** // Abstr. of the 17th International Congress «Phytopharm—2013». Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. — 2013. — Т. 11. — С. 20.
4. Карпова, Р.В. Применение мультифитоадаптогена в лечебном режиме повышает выживаемость мышей высококораковой линии СВА. / Р.В. Карпова, Е.В. Бочаров, В.А. Ильенко, **А.А. Вершинская**, Н.Н. Касаткина, О.А. Бочарова // Материалы XXI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». — 2014. — С. 258.
5. Karpova, R.V. Long-term therapeutic administration of multiphytoadaptogene complex reduced incidence and sizes of tumours in CBA highly carcinogenic mice. / R.V. Karpova, O.A. Bocharova, E.V. Bocharov, **A.A. Vershinskaya** // Abstr. of the 18th International Congress «Phytopharm—2014». Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. — 2014. — Т. 12. — С. 11.
6. Карпова, Р.В. Повышение выживаемости мышей высококораковой линии СВА при лечебном воздействии комплексного фитоадаптогена. / Р.В. Карпова, Е.В. Бочаров, В.А. Ильенко, **А.А. Вершинская**, Н.Н. Касаткина, О.А. Бочарова // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Отечественные противоопухолевые препараты" — Российский биотерапевтический журнал. — 2014. — Т. 13. — № 2 . — С. 10.
7. Карпова, Р.В Экспрессия лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 при профилактическом воздействии сухого экстракта мультифитоадаптогена на модели спонтанного гепатоканцерогенеза. / Р.В. Карпова, Е.В. Бочаров, О.А. , **А.А. Вершинская**, И.В. Казеев // Материалы XXII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». — 2015. — С. 213-214.

8. Bocharov, E.V. Phytomix-40 dry extract under preventive application provides immunomodifying effect on LFA-1 and Mac-1 leukocyte integrins expression in CBA mice with spontaneous hepatomas. / E.V. Bocharov, O.A. Bocharova, R.V. Karpova, **A.A. Vershinskaya**, V. G. Kucheryanu // Abstr. of the 19th International Congress «Phytopharm-2015». Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. — 2015. — Т. 13. — С. 17.
9. Karpova, R.V. Phytomix-40 dry extract under preventive application reduced IL-6 and IL-10 serum levels in CBA mice with spontaneous hepatomas. / R.V. Karpova, E.V. Bocharov, O.A. Bocharova, A.A. Vershinskaya, V.G. Kucheryanu // Abstr. of the 19th International Congress «Phytopharm—2015». Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. — 2015. — Т. 13. — С. 17-18.