

На правах рукописи

КАРПОВА РЕГИНА ВАСИЛЬЕВНА

**ИММУНОАДГЕЗИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ В РАЗВИТИИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва – 2021 год

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор - академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Стилиди Иван Сократович).

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Матвеев Всеволод Борисович

доктор биологических наук, профессор

Бочарова Ольга Алексеевна

Официальные оппоненты:

Боженко Владимир Константинович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий научно-исследовательским отделом 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, профессор кафедры терапии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского».

Титов Константин Сергеевич, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой хирургии и онкологии факультета непрерывного медицинского образования Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова».

Защита состоится «_3_» февраля 2022 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01 (Д 001.017.01), созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «.....» 2021 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Особенности адгезионных взаимодействий опухолевых клеток обуславливают основные свойства опухоли: потерю местного (тканевого) контроля пролиферации, анаплазию, ускользание опухоли от иммунологического надзора, инвазию и метастазирование (Васильев Ю.М., 2007; Wong S. et al., 2018).

Ослабление взаимной адгезивности клеток ткани на первых этапах неоплазии, запуская каскад патологических реакций, приводит к более сложным нарушениям адгезии. В том числе, недостаток гистонеспецифических молекул адгезии ICAM (intercellular adhesion molecules) на опухолевых клетках приводит к снижению экспрессии функционально гомологичных молекул β 2-лейкоцитарных интегринов, например, LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen) и Mac-1 (monocyte adhesion complex), ослабляя их взаимодействия и ограничивая элиминацию клеток-мишеней эффекторами иммунитета, в том числе цитотоксическими лимфоцитами. Это вносит определенный вклад в экранирование опухоли от иммунологического надзора (Барышников А.Ю., 2008; Бочарова О.А., 2014; Harjunpää H., 2019; Corso G. et al., 2020).

Ингибирование цитолитических потенций иммунных эффекторов в отношении опухолевых клеток может быть связано не только с нарушением рецепторного ансамбля, отвечающего за формирование конъюгатов с клетками-мишенями, но и с активностью некоторых цитокинов. В частности, повышенный уровень интерлейкинов 6 и 10 вместе с ослабленной экспрессией молекулы адгезии ICAM-1 сопровождается подавлением иммунных функций (Pop V., 2017; Micheli D.S., 2020).

Известна прямая зависимость частоты возникновения опухолей от скорости старения популяции. Учитывая, что ключевым механизмом процессов старения и опухолеобразования может быть нарушение адгезионных взаимодействий (и как следствие - дисдифференцировка), рак можно рассматривать как стремительное старение клеток органа. В то же время процесс старения можно характеризовать показателями хронического стресса, такими как иммунодепрессия и гиперкортицизм, снижение пищеварительной, репродуктивной, когнитивной функций, подавление уровня эндогенных антидепрессантов. В свою очередь, хронический стресс часто приводит к возникновению онкологических заболеваний (Анисимов В.Н., 2017).

Основой центрального механизма старения считают функциональное угасание дофаминергической системы головного мозга с потерей численности дофаминергических нейронов (ДА-нейронов) и, соответственно, уровня дофамина. Отметим, что потеря ДА-нейронов происходит не только при старении, но и при хроническом стрессе. Дофамин синтезируется как в центральной нервной системе, так и в периферическом организме. Прямая связь центрального и периферического дофамина имеет решающее значение в модуляции функций иммунитета. Дофамин способствует дифференцировке цитотоксических CD8+лимфоцитов, контролирует их киллерную активность при конъюгации с клетками-мишенями, участвуя в активных фазах реакций иммунитета против опухоли (Альперина Е.Л., 2014; Matt S. et al., 2020).

Однако проблема значимости иммуноадгезионных взаимодействий эффекторов иммунитета и клеток-мишеней для уровня опухолеобразования и продолжительности жизни при этом остается открытой.

В связи с этим, целесообразным является изучение нарушений иммуноадгезионных механизмов, а также показателей хронического стресса при опухолевом процессе – на модели мышей-самцов линии СВА, генетически предрасположенных к гепатоканцерогенезу, имеющих 100% частоту опухолеобразования в позднем онтогенезе. Важной при этом представляется оценка изменений параметров с учетом продолжительности жизни при воздействии нетоксичного агента на примере комплексного фитоадаптогена (КФА), который ранее проявил иммуномодулирующие, в том числе адгезиогенные и интерферогенные, а также антиоксидантные, антимуtagenные, гормонотомулирующие, нейропротекторные свойства. Для повышения статистической достоверности результатов целесообразным может быть проведение исследований с использованием не только жидкой, но и сухой формы (практически субстанции) КФА, которые не отличаются друг от друга по адаптогенной активности (Бочарова О.А. и др., 2020).

В связи с вышеизложенным, актуальным является изучение экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1, сывороточного уровня цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-10, стресс-гормона кортикостерона и анаболического тестостерона, численности ДА-нейронов головного мозга при развитии экспериментальных опухолей, а также определение значимости коррекции выявленных нарушений с помощью КФА для

снижения уровня опухолеобразования и повышения продолжительности жизни.

Цель исследования

Изучение роли иммуноадгезионных механизмов взаимодействия эффекторов иммунитета и клеток-мишеней в контроле уровня опухолеобразования и продолжительности жизни животных на примере развития экспериментальных опухолей.

Задачи исследования

У мышей-самцов линии СВА в онтогенезе:

- 1) изучить экспрессию лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках периферической крови;
- 2) исследовать изменение концентрации в сыворотке крови интерлейкинов 6 и 10;
- 3) определить концентрацию стресс-гормона кортикостерона и анаболического гормона тестостерона в сыворотке крови;
- 4) проанализировать морфологические особенности спонтанных гепатокарцином;
- 5) иммунофенотипировать опухоль-инфильтрирующие лимфоциты в ткани печени;
- 6) оценить численность ДА- и молодых нейронов в головном мозге;
- 7) определить частоту, количество и размеры спонтанных опухолей;
- 8) оценить продолжительность жизни и соматический статус (по двигательной активности, массе тела, состоянию шерстного покрова) животных;
- 9) выявить возможность коррекции показателей при профилактическом и лечебном воздействии комплексного фитоадаптогена в форме жидкого и сухого экстрактов;
- 10) провести корреляционный анализ численности ДА-нейронов головного мозга, частоты опухолеобразования и продолжительности жизни животных.

Методы и методология исследования

Работу проводили на мышях-самцах инбредной линии СВА (сублиния СВА/Лас Y), генетически предрасположенных к развитию спонтанных гепатокарцином. В исследование было включено 997 мышей. Режимы воздействия КФА в двух формах (жидкой и сухой): профилактический – кратковременно (в ранний период онтогенеза); лечебный - длительно, с шестимесячного возраста (время появления первых опухолей), до естественной гибели животного. КФА - фармацевтическая композиция с компонентами экстрактов сорока растений, в том числе соединений фенольной

природы, эфирных масел, витаминов (Бочарова О.А. и др., 2020).

Экспрессию CD11a и CD11b антигенов (лейкоцитарные β 2-интегрины LFA-1 и Mac-1, соответственно) на клетках периферической крови (методом непрямой иммунофлуоресценции), концентрацию интерлейкинов 6 и 10, а также гормонов кортикостерона и тестостерона в сыворотке крови (методом иммуноферментного анализа), массу тела оценивали у мышей СВА в возрасте 4, 8, 22 мес. В возрасте 4 и 22 мес определяли численность ДА-нейронов (иммуногистохимическим методом в среднем мозге), уровень пролиферирующих нейронов (иммуногистохимическим методом в субгранулярном слое зубчатой фасции гиппокампа). В возрасте 8 и 22 мес оценивали частоту, количество и объем гепатокарцином. Показатели двигательной (поведенческой) активности животных (в тесте "открытое поле"), а также состояние шерстного покрова оценивали у мышей СВА в позднем онтогенезе (в 22 мес). Проводили морфо-иммуногистохимическое исследование ткани печени животных. Экспрессию CD8, CD11a, CD11b антигенов на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах оценивали с использованием авидин-биотинового иммунопероксидазного метода. Определяли среднюю продолжительность жизни животных. Выживаемость животных анализировали по методу Kaplan-Meier с определением достоверности различий между группами по критерию F-Кокса.

Статистический анализ результатов проводили с использованием программы «STATISTICA 6.0», применяя дисперсионный анализ ONE-WAY ANOVA с последующим оценкой достоверности различий по критерию Newman-Keuls.

Научная новизна

Установлено, что развитие опухолей у генетически предрасположенных мышей-самцов СВА сопровождается снижением экспрессии лейкоцитарных β 2-интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках периферической крови, численности ДА-нейронов и пролиферирующих нейронов головного мозга, концентрации анаболического гормона тестостерона в сыворотке крови, а также повышением концентрации ИЛ-6, ИЛ-10 и стресс-гормона кортикостерона в сыворотке крови животных.

Получены новые данные, характеризующие инфильтрацию и деструкцию опухолей цитотоксическими CD8+лимфоцитами, экспрессирующими LFA-1 и Mac-1 лейкоцитарные интегрин.

В результате профилактического и лечебного воздействия нетоксичного КФА с адгезиогенными свойствами при спонтанном гепатоканцерогенезе у мышей-самцов линии СВА установлено снижение частоты опухолеобразования, уменьшение количества и объема опухолей, повышение продолжительности жизни при сохранении удовлетворительного соматического статуса, сочетающиеся с инфильтрацией опухолей цитотоксическими CD8+лимфоцитами, экспрессирующими LFA-1 и Mac-1 лейкоцитарные β 2-интегрины, при коррекции экспрессии лейкоцитарных интегринов на лимфоцитах периферической крови, численности ДА-нейронов головного мозга, концентрации ИЛ-6, ИЛ-10, тестостерона и кортикостерона в сыворотке крови.

Впервые выявлена положительная корреляция численности ДА-нейронов головного мозга в позднем онтогенезе и продолжительности жизни мышей-самцов СВА. Впервые показана отрицательная корреляция численности ДА-нейронов и частоты спонтанных гепатокарцином, а также частоты спонтанного опухолеобразования и продолжительности жизни мышей-самцов СВА.

Теоретическая и практическая значимость

Учитывая возможность регуляции численности ДА-нейронов головного мозга при коррекции иммуноадгезионного взаимодействия эффекторов иммунитета и клеток-мишеней с участием β 2-лейкоцитарных интегринов и сигнальной реактивности цитокинов, сывороточного содержания стресс-гормона кортикостерона и тестостерона, а также частоты опухолеобразования, выживаемости и соматического статуса мышей-самцов СВА, генетически предрасположенных к развитию гепатокарцином, можно полагать роль центральных нейрональных (при участии дофаминергической системы) и периферических иммуноадгезионных механизмов в контроле злокачественного опухолеобразования и увеличения продолжительности жизни.

Связь нарушения иммуноадгезионного взаимодействия эффекторов иммунитета и клеток-мишеней с потерей ДА-нейронов головного мозга детализирует механизм опухолеобразования в результате хронического стресса.

Инфильтрация спонтанных гепатокарцином мышей-самцов СВА цитотоксическими CD8+лимфоцитами, экспрессирующими лейкоцитарные β 2-интегрины LFA-1 и Mac-1, может иметь значение для подавления опухолевого процесса и увеличения продолжительности жизни животных.

Тест-система с использованием мышей СВА, генетически предрасположенных к развитию гепатокарцином, и учитывающая иммуноадгезионные параметры периферической крови, фенотип опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, численность ДА-нейронов головного мозга, уровень опухолеобразования, а также выживаемость и соматический статус экспериментальных животных рекомендуется для исследования препаратов, перспективных в качестве компонентов профилактических и терапевтических воздействий у лиц с повышенным риском развития злокачественных новообразований и с целью замедления процесса, особенно при гепатокарциномах.

КФА как нетоксичный модификатор защитных систем организма может быть перспективным для изучения в онкологии в качестве профилактического, а также иммуно- и биотерапевтического агента при включении в комплексное лечение, а также при реабилитации для повышения продолжительности и качества жизни онкологических больных.

Личный вклад

Личный вклад автора состоит в анализе научной литературы по проблеме механизмов ускользания опухоли от иммунологического надзора и противоопухолевой иммунореактивности организма; разработке дизайна исследования и планировании этапов работы; проведении экспериментов с применением иммунобиологических, морфологических, поведенческих, статистических методов исследования; анализе и интерпретации полученных данных; публикации результатов исследования и их представлении на российских и международных научных конференциях.

Соответствие паспорту специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия («биологические науки»).

Положения, выносимые на защиту

1. Усиление экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на цитотоксических CD8⁺лимфоцитах может иметь значение для миграции последних в опухоль, элиминации опухолевых клеток и увеличения продолжительности жизни животных.

2. Связь нарушения периферических иммуноадгезионных взаимодействий эффекторов иммунитета и клеток-мишеней с потерей ДА-нейронов головного мозга

детализирует стрессорный механизм опухолеобразования.

3. Возможность регуляции численности ДА-нейронов головного мозга при коррекции периферических иммуноадгезионных взаимодействий эффекторов иммунитета и клеток-мишеней с участием экспрессии β 2-лейкоцитарных интегринов и сигнальной реактивности цитокинов, а также сывороточного содержания стресс-гормона кортикостерона и тестостерона полагает роль центральных нейрональных и периферических иммуноадгезионных механизмов в контроле злокачественного опухолеобразования и увеличения продолжительности жизни.

Внедрение результатов исследования

Разработанная тест-система на модели мышей СВА, генетически предрасположенных к спонтанному гепатоканцерогенезу, с учетом иммуноадгезионных показателей периферической крови и фенотипа опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, численности ДА-нейронов головного мозга, уровня опухолеобразования, а также выживаемости и соматического статуса экспериментальных животных внедрена в практику лаборатории иммунофармакологии НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России для изучения *in vivo* веществ, перспективных в качестве компонентов профилактических и терапевтических воздействий при онкологических заболеваниях.

Разработаны 2 методических руководства: 1) - способ оценки противоопухолевой активности иммуномодуляторов *in vivo* на модели спонтанного гепатоканцерогенеза; 2) - способ оценки профилактической активности иммуномодуляторов в отношении опухолей на модели спонтанного гепатоканцерогенеза у мышей, предназначенные для специалистов в области иммунофармакологии, проводящих исследования веществ, перспективных в качестве компонентов профилактических и терапевтических воздействий при онкологических заболеваниях.

Апробация

Апробация диссертации состоялась 9 апреля 2021 года на совместной научной конференции лабораторий иммунофармакологии, экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, клеточного иммунитета, разработки лекарственных форм, биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза, комбинированной терапии опухолей, рекомбинантных опухолевых антигенов, фармакологии и токсикологии НИИ

экспериментальной диагностики и терапии опухолей, патологоанатомического отделения отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей НИИ клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Результаты работы доложены на 22 научных конференциях: Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием "Отечественные противоопухолевые препараты" (2013-2017 гг.); Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» (2012-2017 гг.); Международный конгресс «Phytopharm» (2013-2019 гг).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 70 печатных работ, из них 28 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ. Результаты работы поддержаны двумя патентами Российской Федерации.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 216 страницах машинописного текста, включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, 9 глав результатов собственных исследований с их обсуждением, заключение, выводы, список сокращений и список литературы. Работа иллюстрирована 29 таблицами и 27 рисунками. Содержит ссылки на 499 источников литературы, в том числе 76 - отечественных и 423 - зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследование включено 997 мышей-самцов высокогепатомной инбредной линии СВА (сублиния СВА/Lac Y).

КФА - фармацевтическая композиция, содержащая компоненты экстрактов сорока официальных растений, в том числе адаптогенов. Методами физико-химического анализа в КФА определены гинзенозиды, аралозиды, элеутерозиды, флавоноиды, эфирные масла, витамины и др. КФА сертифицирован в качестве парафармацевтика. Предыдущие исследования показали отсутствие токсичности, антимуtagenные, антиоксидантные, иммуномодулирующие, в том числе адгезиогенные и

интерферогенные свойства, а также противоопухолевое действие КФА. Сухой экстракт КФА был получен при сублимировании жидкой формы по соответствующей технологии (Бочарова О.А. и др., 2020).

Жидкий и сухой экстракты КФА применяли в двух режимах: профилактическом - в течение первого месяца жизни, включая период (5-15-й дни постэмбрионального онтогенеза), соответствующий завершению дифференцировки нормальной ткани печени, и лечебном - с шестимесячного возраста (время появления первых опухолей) курсами до естественной гибели животного. Курс применения препарата - 3 недели, интервал между курсами - 1 неделя.

Интактные контрольные мыши ($n = 209$) получали только воду в качестве питья. Поскольку жидкая форма КФА является водно-спиртовым экстрактом, мыши дополнительных контрольных групп получали 3% раствор этанола в профилактическом ($n = 90$) и лечебном ($n = 90$) режимах.

Значения изучаемых параметров в трех контрольных группах не имели статистически достоверных различий, поэтому мыши этих групп были объединены в одну контрольную группу (группу I, $n = 389$). Мыши 2 группы ($n = 158$) получали 10% водно-спиртовый раствор жидкого КФА в профилактическом режиме. Мыши 3 группы ($n = 150$) - аналогичный раствор жидкого КФА в лечебном режиме. Мыши 4 группы ($n = 147$) - 0,3% водный раствор сухого экстракта в профилактическом режиме. Мыши 5 группы ($n = 153$) - аналогичный раствор сухого экстракта в лечебном режиме.

У животных в возрасте 4, 8, 22 мес исследовали экспрессию CD11a и CD11b антигенов (лейкоцитарные интегрины LFA-1 и Mac-1, соответственно) на клетках периферической крови, концентрацию интерлейкинов 6 и 10, а также гормонов кортикостерона и тестостерона, массу тела. В возрасте 4 и 22 мес определяли численность ДА-нейронов, а также количество молодых пролиферирующих нейронов. В возрасте 8 и 22 мес оценивали число животных с опухолями, количество и объем гепатокарцином. Показатели двигательной (поведенческой) активности животных, а также состояние шерстного покрова оценивали у мышей СВА в позднем онтогенезе (в 22 мес). Проводили морфо-иммуногистохимическое исследование ткани печени животных. Выявляли экспрессию CD8, CD11a, CD11b антигенов на опухолеинфильтрирующих лимфоцитах. Оценивали выживаемость животных.

Экспрессию CD11a (LFA-1) и CD11b (Mac-1) антигенов на клетках периферической крови изучали методом непрямой иммунофлуоресценции.

Концентрацию ИЛ-6 и ИЛ-10, а также гормонов кортикостерона и тестостерона в сыворотке крови мышей определяли с помощью иммуноферментного анализа.

Численность ДА-нейронов в базальных ганглиях головного мозга определяли путем подсчета тирозингидроксилаза-позитивных клеток при иммуногистохимическом анализе. При малом увеличении микроскопа получали обзорное изображение участка среза с комплексом ядер среднего мозга, содержащих тирозингидроксилаза-позитивные клетки (Рисунок 1). Затем подсчитывали количество тирозингидроксилаза-позитивных клеток в тестовом квадрате (Рисунок 2), который перемещали, отслеживая его траекторию на обзорном изображении.



Рисунок 1 - Обзорное изображение вентральной части среза среднего мозга, использованное для отслеживания перемещения тестового квадрата

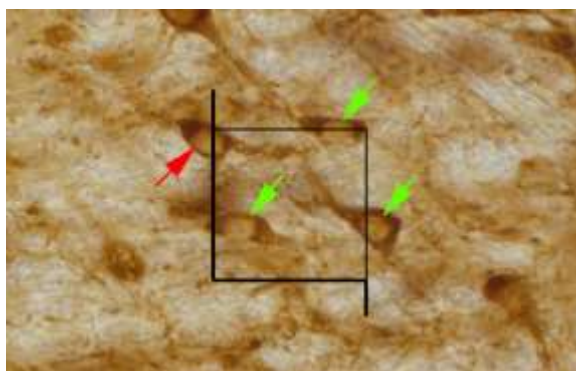


Рисунок 2 - Репрезентативная микрофотография среза мозга мыши, окрашенного на тирозингидроксилазу, с наложенным тестовым квадратом. Зеленые стрелки - ядра клеток, включенные в подсчет, красная стрелка - ядро исключенной клетки. Размер рамки – 50x50 мкм

Поскольку тирозингидроксилаза преобразует тирозин в L-ДОФА, который далее в нейронах превращается в дофамин, то этот фермент считают маркером дофаминергических нейронов.

Количество молодых пролиферирующих нейронов в зубчатой фасции гиппокампа головного мозга исследовали при иммуногистохимическом окрашивании на маркер пролиферации Ki67 (Рисунок 3).

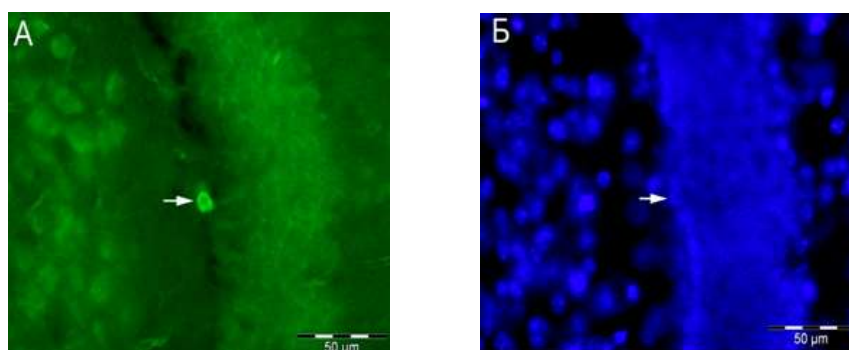


Рисунок 3 - Микрофотография участка зубчатой фасции гиппокампа, содержащего клетку с Ki67-иммунопозитивным ядром (А, белая стрелка) в субгранулярном слое. То же ядро (Б) в свете люминесценции бисбензимида при ультрафиолетовом освещении

Выявление CD8, CD11a, CD11b антигенов на лимфоцитах, инфильтрирующих гепатокарциномы, проводили с помощью иммуногистохимического анализа на парафиновых срезах гепатокарцином мышей СВА.

Для исследования двигательной (поведенческой) активности животных применяли автоматизированный аналог теста "открытое поле" с использованием системы Opto-Varimex-3. Оценивали горизонтальную двигательную активность (пройденный путь, см); вертикальную двигательную активность (число стоек); время передвижения животных (с); время без движения (время "отдыха", с); число мелких движений, скорость движения животных.

Статистический анализ результатов проводили с использованием программы «STATISTICA 6.0», применяя дисперсионный анализ ONE-WAY ANOVA с последующим оценкой достоверности различий по критерию Newman-Keuls. Выживаемость животных анализировали по методу Kaplan-Meier с определением достоверности различий между группами по критерию F-Кокса.

Результаты исследования

Статистический анализ показал отсутствие различий профилактического воздействия жидкого и сухого КФА, а также лечебного воздействия КФА на изучаемые параметры. В связи с этим представляем обобщенные данные по профилактической II (2 + 4), и лечебной III (3+5) группам.

Данные по количеству клеток крови с экспрессией **CD11a антигена** у мышей СВА в онтогенезе при профилактическом и лечебном воздействии КФА приведены в таблице 1.

Таблица 1 – CD11a антиген на клетках крови мышей СВА в онтогенезе при профилактическом и лечебном воздействии КФА

Группы животных	CD 11a+клетки, % (M±m) ¹		
	4 мес	8 мес	22 мес
I. Контроль (n = 66)	47,8±2,7	44,1±2,5	35,5±1,72 ^{2,3}
II. КФА, профилактическое воздействие (n = 78)	51,3±3,5	48,6±3,2	42,9±2,2 ⁴
III. КФА, лечебное воздействие (n = 78)	48,5±2,6	47,5±2,5	42,9±1,9 ⁵

¹ - M±m – среднее арифметическое значение ± ошибка среднего арифметического; ² - p < 0,01 – достоверность различий показателя в 8 и 22 мес; ³ - p < 0,001 – достоверность различий показателя в 4 и 22 мес; ⁴ - p = 0,01 – достоверность различий в сравнении с контрольными животными в 22 мес; ⁵ - p = 0,01 - достоверность различий в сравнении с контрольными животными в 22 мес

Из таблицы 1 видно, что у мышей контрольной группы в возрасте от 4 до 8 мес уровень экспрессии CD11a антигена не изменялся. К 22-х месячному возрасту экспрессия CD11a антигена достоверно снизилась (p < 0,01).

Вместе с тем, учитывая результаты эксперимента, можно полагать, что как профилактическое, так и лечебное воздействие КФА препятствует снижению числа лимфоцитов, экспрессирующих молекулы LFA-1 (CD11a/CD18) в позднем онтогенезе на фоне спонтанного гепатоканцерогенеза у мышей-самцов линии СВА (по сравнению с контрольной группой животных).

В таблице 2 представлены обобщенные результаты профилактического и

лечебного воздействия КФА на уровень экспрессии **CD11b** антигена клетками периферической крови у мышей-самцов СВА.

Таблица 2 – Экспрессия CD11b антигена на клетках периферической крови у мышей СВА в онтогенезе при профилактическом и лечебном воздействии КФА

Группы животных	CD 11b+ клетки, % (M±m) ¹		
	4 мес	8 мес	22 мес
I. Контроль (n = 66)	15,7±1,2	13,6±1,2	7,8±1,0 ^{2,3}
II. КФА, профилактическое воздействие (n = 78)	18,1±1,3	16,5±1,2	11,8±0,7 ^{2,3,4}
III. КФА, лечебное воздействие (n = 78)	15,7±1,4	19,1±1,3 ⁴	13,0±1,1 ^{2,4}

¹ - M±m – среднее арифметическое значение ± ошибка среднего арифметического; ² - p < 0,01 – достоверность различий между средними значениями показателя в 8 и 22 мес в I, II и III группах; ³ - p < 0,01 – достоверность различий между средними значениями показателя в 4 и 22 мес в I и II группах; ⁴ - p < 0,01 – достоверность различий с контрольными животными

Из таблицы 2 следует, что у мышей контрольной группы число клеток крови, экспрессирующих CD11b антиген, в возрасте 8 мес не отличается от такового 4-х месячных животных. В возрасте 22 мес этот показатель достоверно снижен (p < 0,01).

Результаты эксперимента показали, что как профилактическое, так и лечебное воздействие КФА, предупреждает падение числа лимфоцитов, экспрессирующих Mac-1 (CD11b/CD18) в позднем онтогенезе на фоне спонтанного гепатоканцерогенеза у мышей-самцов линии СВА.

Таким образом, спонтанный гепатоканцерогенез у мышей-самцов СВА характеризуется уменьшением экспрессии молекул лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1, что может приводить к снижению активности Т-лимфоцитов. В данном случае происходит уменьшение вероятности адгезионных взаимодействий эффекторов иммунитета с опухолевыми клетками, ограничивая киллинг последних. Это вносит свой вклад в ускользание опухоли от иммунологического надзора.

Длительное по времени повышение числа лимфоцитов с экспрессией лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 можно обеспечить кратковременным (в раннем периоде постнатального развития) и долговременным (начиная с периода

возникновения первых опухолей) воздействием КФА. Повышение уровня экспрессии CD11a и CD11b антигенов у мышей опытных групп под воздействием КФА может характеризовать усиление способности эффекторов иммунитета взаимодействовать с опухолевыми клетками, инфильтрировать опухоли, что способствует гибели последних (Sasada T., 2011).

В таблице 3 представлены обобщенные результаты при профилактическом (II группа) и лечебном (III группа) воздействии КФА на сывороточный уровень ИЛ-6 у мышей СВА в онтогенезе.

Таблица 3 – Динамика ИЛ-6 в сыворотке крови мышей СВА в онтогенезе при профилактическом и лечебном воздействии КФА

Группы животных	ИЛ-6, пг/мл ($M \pm m$) ¹		
	4 мес	8 мес	22 мес
I. Контроль (n = 66)	82,0 \pm 3,6	88,9 \pm 4,5	139,5 \pm 5,0 ²
II. КФА, профилактическое воздействие (n = 78)	80,4 \pm 3,7	82,8 \pm 3,3	115,5 \pm 4,7 ^{2,3}
III. КФА, лечебное воздействие (n = 78)	84,1 \pm 2,7	85,6 \pm 4,2	112,3 \pm 4,2 ^{2,3}

¹ - $M \pm m$ – среднее арифметическое значение \pm ошибка среднего арифметического; ² - $p < 0,001$ – достоверность различий показателя в 8 и 22 мес, а также в 4 и 22 мес в I, II и III группах; ³ - $p \leq 0,001$ – достоверность различий с контрольными животными

Как видно из таблицы 3, концентрация ИЛ-6 в сыворотке крови 4-х и 8-месячных контрольных животных практически одинакова. К 22 мес этот показатель в контроле повысился по сравнению с ранним онтогенезом ($p < 0,001$).

Кратковременное введение КФА в раннем онтогенезе мышам линии СВА может препятствовать усиленному образованию ИЛ-6 в сыворотке крови. Введение КФА, минуя «критический» период формирования ткани печени, на фоне возникших опухолей также может корректировать уровень сывороточного ИЛ-6 но при продолжительном применении.

Вероятно, снижение концентрации ИЛ-6 в сыворотке крови под влиянием КФА блокирует синтез антител, экранирующих антигены опухолевых клеток и рецепторы иммунных эффекторов. Таким образом нарушается защита клеток опухоли от

иммунологического киллинга. Вместе с тем известно, что при снижении в сыворотке крови ИЛ-6 сдерживается расщепление мышечных белков, что приводит к торможению развития анорексии и кахексии.

Обобщенные результаты, полученные при исследовании динамики ИЛ-10 в сыворотке крови мышей-самцов СВА при профилактическом (II группа) и лечебном (III группа) воздействии КФА, представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Динамика ИЛ-10 в сыворотке крови мышей СВА в онтогенезе при профилактическом и лечебном воздействии КФА

Группы животных	ИЛ-10, пг/мл (M±m) ¹		
	4 мес	8 мес	22 мес
I. Контроль (n = 66)	26,8±1,3	33,4±1,7	60,3±2,3 ²
II. КФА, профилактическое воздействие (n = 78)	22,8±1,3	27,3±1,9 ³	48,6±2,2 ^{2,4}
III. КФА, лечебное воздействие (n = 78)	22,6±1,2	24,5±1,3 ⁴	46,8±2,6 ^{2,4}

¹ - M±m – среднее арифметическое значение ± ошибка среднего арифметического; ² - p = 0,0001 - достоверность различий между средними значениями показателя в 8 и 22 мес, а также в 4 и 22 мес в I, II и III группах; ³ - p < 0,05 – достоверность различий в сравнении с контрольной группой; **** - p ≤ 0,001 – достоверность различий с контрольной группой

Как следует из таблицы 4, в онтогенезе контрольных мышей СВА, начиная с 8 мес и при достижении 22-х месячного возраста, концентрация ИЛ-10 в сыворотке крови увеличилась (p = 0,0001).

Также результаты показали, как кратковременное в раннем онтогенезе, так и продолжительное применение КФА (на фоне возникших опухолей), может способствовать торможению образования ИЛ-10 в сыворотке крови.

Принимая во внимание взаимосвязь цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-10, результаты подтвердили данные литературы о том, что при снижении концентрации ИЛ-10 в сыворотке крови подавляется и синтез ИЛ-6. При этом может восстанавливаться блокированная экспрессия адгезионных молекул ICAM-1 на опухолевых клетках, а также можно ожидать в данном случае повышения функциональной активности эффекторов иммунитета и синтеза ими реактивных интермедиатов кислорода и азота.

Вместе с тем, может усиливаться продукция ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-12 и ФНО в том числе Т-лимфоцитами, макрофагами, моноцитами, дендритными клетками, нейтрофилами, что также важно для реакций иммунитета против опухоли (Brady J. et al., 2010).

В таблице 5 представлены результаты профилактического и лечебного воздействия КФА на частоту опухолеобразования, число и объем гепатом у мышей-самцов СВА в возрасте 22 мес.

Таблица 5 – Частота опухолеобразования и объем гепатом у мышей-самцов СВА в возрасте 22 месяца при воздействии КФА

Группы животных	Количество мышей СВА с опухолями	Количество опухолей на одно животное (M \pm m) ¹	Объем одной опухоли, мм ³ (M \pm m) ¹	Объем опухолевой массы на одно животное, мм ³ (M \pm m) ¹
I. Контрольная (n = 38)	38 (100%)	2,8 \pm 0,3	387,0 \pm 58,3	1069,5 \pm 190,3
II. КФА, профилактическое воздействие (n = 28)	19 (67,9%) ²	1,3 \pm 0,2 ²	262,1 \pm 52,1	327,6 \pm 77,2 ²
III. КФА, лечебное воздействие (n = 21)	15 (71,4%) ²	1,5 \pm 0,3 ³	91,8 \pm 18,0 ³	153,3 \pm 38,8 ²

¹ - M \pm m – среднее арифметическое значение \pm ошибка среднего арифметического; ² - p \leq 0,001 – достоверность различий в сравнении с контрольной группой; ³ - p < 0,01 – достоверность различий с контрольной группой

Из результатов, представленных в таблице 5, следует, что частота опухолеобразования в 22 мес у мышей-самцов СВА контрольной группы составила 100%, число опухолей на мышь - 2,8 \pm 0,3, средний объем одной опухоли - 387,0 \pm 58,3 мм³, средний объем опухолевой массы на мышь - 1069,5 \pm 190,3 мм³.

При профилактическом воздействии КФА частота опухолеобразования снизилась на 32%. При этом отмечено уменьшение как числа опухолей, так и среднего объема опухолевой массы на мышь. При лечебном воздействии КФА частота опухолеобразования снизилась на 29% при уменьшении количества опухолей, объема одной опухоли, а также объема опухолевой массы на мышь.

Морфологические исследования показали, что у мышей всех групп в возрасте 4 мес при макроскопической ревизии опухолей в печени не обнаружено.

В возрасте 8 мес у мышей контрольной, 3 (лечебное воздействие жидкого КФА) и 5 (лечебное воздействие сухого КФА) групп выявлены умеренно дифференцированные трабекулярные гепатокарциномы. При этом опухоли мышей 3 и 5 групп инфильтрированы лейкоцитами. В ткани печени восьмимесячных мышей 2 и 4 групп при профилактическом воздействии жидкого и сухого КФА, соответственно, признаков опухолевого перерождения не найдено.

В позднем онтогенезе (в 22 месяца) у мышей выявлены низкодифференцированные трабекулярно-ацинарные гепатокарциномы. При этом опухоли опытных мышей в отличие от контрольных были инфильтрированы, вероятно, активированными лимфоцитами. Инфильтрация сопровождалась деструктивными процессами в опухолях.

На рисунке 4 представлены образцы гистологических препаратов ткани печени мышей СВА 4-х месячного возраста (а – контроль; б - опыт). Подобное морфологическое строение свойственно для нормальной ткани печени, что соответствует отсутствию опухолей у животных в этом возрасте.

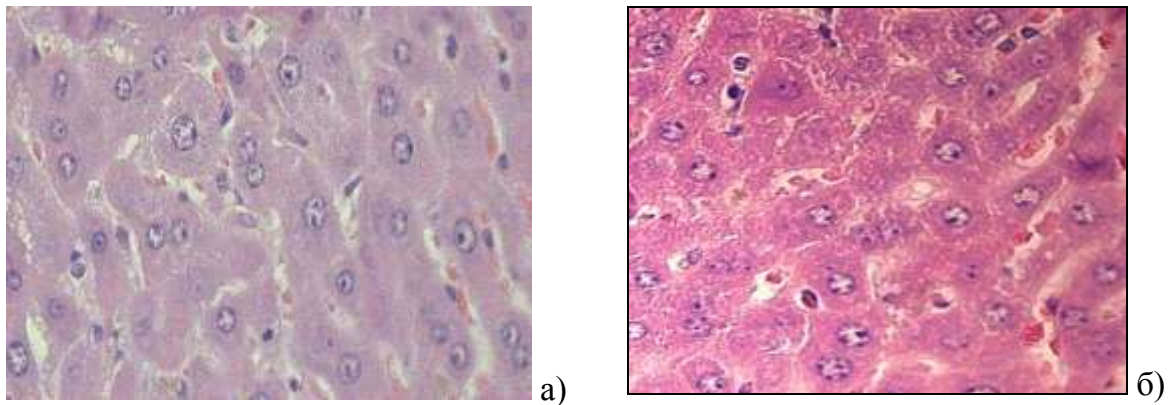


Рисунок 4 - Образцы гистологических препаратов ткани печени (а –контроль; б – опыт; мыши СВА 4-х месячного возраста (увеличение x 400, окраска гематоксилином и эозином)

Микропрепараты опухолей печени, выявленных у контрольных мышей в 22-х месячном возрасте, показаны на рисунке 5. В данном случае визуализированы

низкодифференцированные трабекулярно-ацинарные гепатокарциномы (пример опухоли смешанного строения).

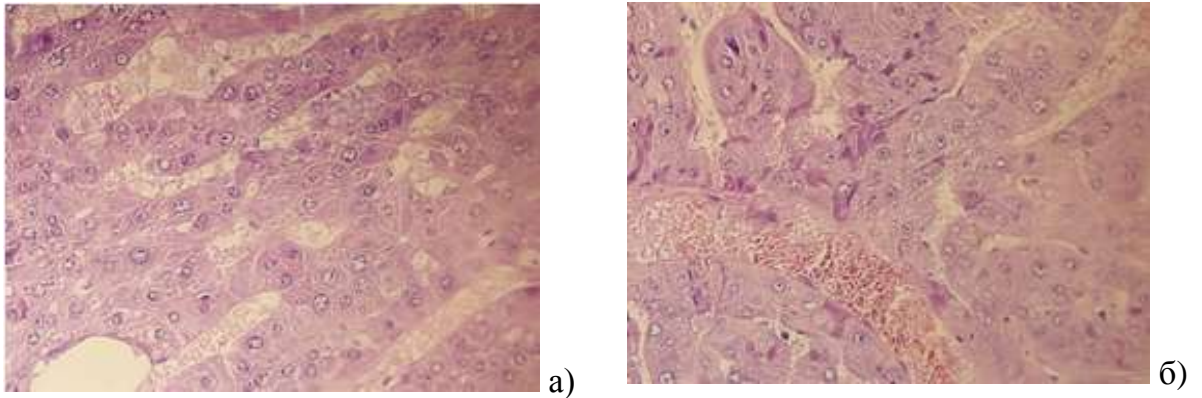


Рисунок 5 - Примеры трабекулярно-ацинарных гепатокарцином низкой дифференцировки у интактных мышей в возрасте 22 месяца (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$)

На рисунке 6 показаны микропрепараты гепатокарцином, выявленных в позднем онтогенезе у мышей 2 (профилактическое воздействие жидкого КФА) и 4 (профилактическое воздействие сухого КФА) групп.

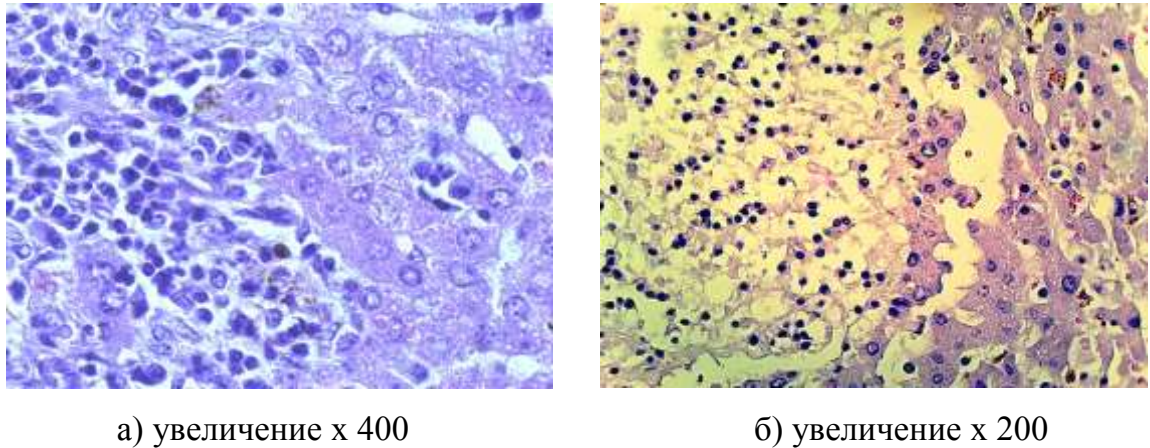
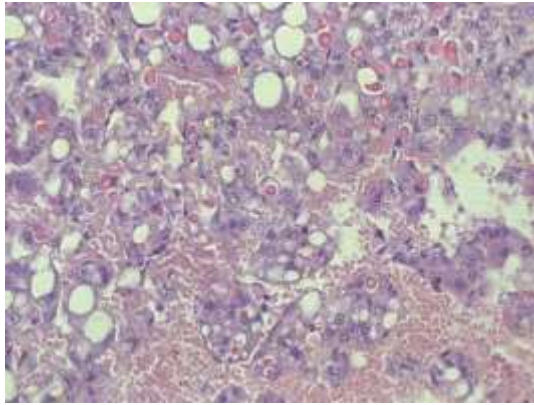


Рисунок 6 - Примеры инфильтрации трабекулярно-ацинарных гепатокарцином мышей СВА 22-х месячного возраста (а - при профилактическом воздействии жидкого КФА; б – при профилактическом воздействии сухого КФА; окраска гематоксилином и эозином)

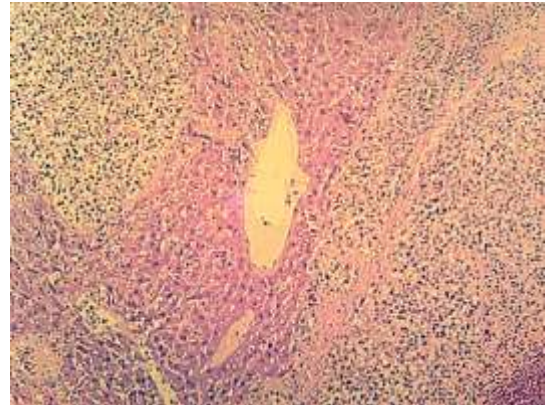
Видно, что гепатокарциномы инфильтрированы массой активированных

лимфоцитов, судя по однородным крупным клеточным ядрам. Выявляются также деструктивные участки гепатокарцином.

На рисунке 7 показаны опухоли печени мышей линии СВА в возрасте 22 мес под воздействием жидкого (а) и сухого (б) экстрактов КФА в лечебном режиме.



а) увеличение x 200



б) увеличение x 10

Рисунок 7 - Примеры трабекулярно-ацинарных гепатокарцином, инфильтрированных лимфоцитами, у экспериментальных мышей в возрасте 22 мес под воздействием жидкого (а) и сухого (б) экстрактов КФА в лечебном режиме (окраска гематоксилином и эозином, увеличение)

Микроскопически опухоль также представляет собой трабекулярно-ацинарную гепатокарциному. Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, располагаются группами и тяжами. Видно, что ткань опухоли также подвержена деструкции.

Иммуногистохимическое фенотипирование опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (**ОИЛ**) гепатокарцином мышей СВА проведено на примере влияния сухой формы КФА (4 и 5 группы мышей).

Результаты иммуногистохимического окрашивания гепатокарцином мышей СВА 4 группы (при профилактическом воздействии сухого КФА) в возрасте 22 мес представлены на рисунках 8-10.

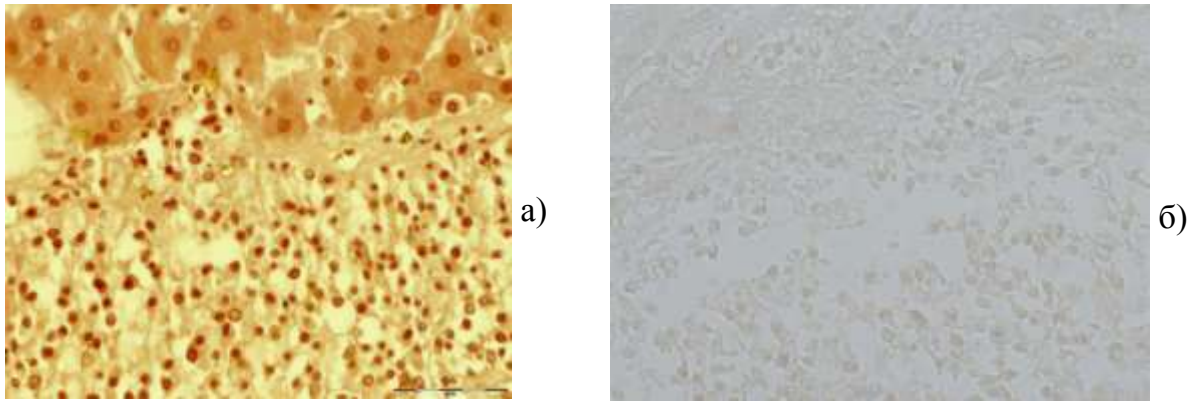


Рисунок 8 - Иммуногистохимическое окрашивание ткани печени мышей СВА на CD8 антиген (а – CD8-позитивные клетки; б – контрольный срез при отсутствии специфических антител)

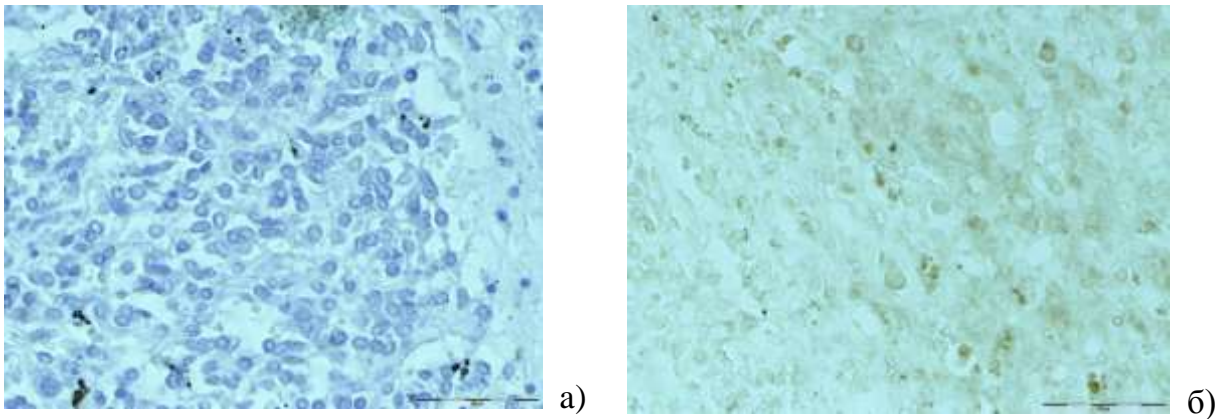


Рисунок 9 - Иммуногистохимическое окрашивание ткани печени мышей СВА на CD11a антиген (а – CD11a-позитивные клетки; б – контрольный срез при отсутствии специфических антител)

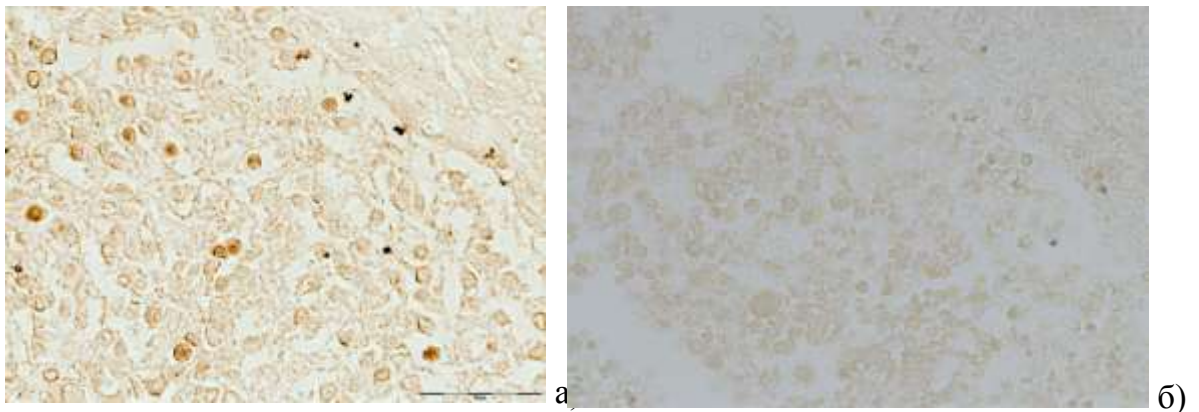


Рисунок 10 - Иммуногистохимическое окрашивание ткани печени мышей СВА на CD11b антиген (профилактическое воздействие КФА сухого: а – CD11b-позитивные клетки; б – контрольный срез при отсутствии специфических антител)

Таким образом, ОИЛ, выявленные в гепатокарциномах мышей СВА 4 группы (при профилактическом воздействии сухого КФА) в возрасте 22 мес, представляют собой CD8⁺цитотоксические лимфоциты, экспрессирующие CD11a и CD11b антигены (Рисунки 8-10).

ОИЛ в гепатокарциномах мышей СВА 5 группы в возрасте 22 мес при лечении сухим КФА в лечебном режиме также представляют собой CD8⁺цитотоксические лимфоциты, экспрессирующие CD11a и CD11b антигены (Рисунки 11-13).

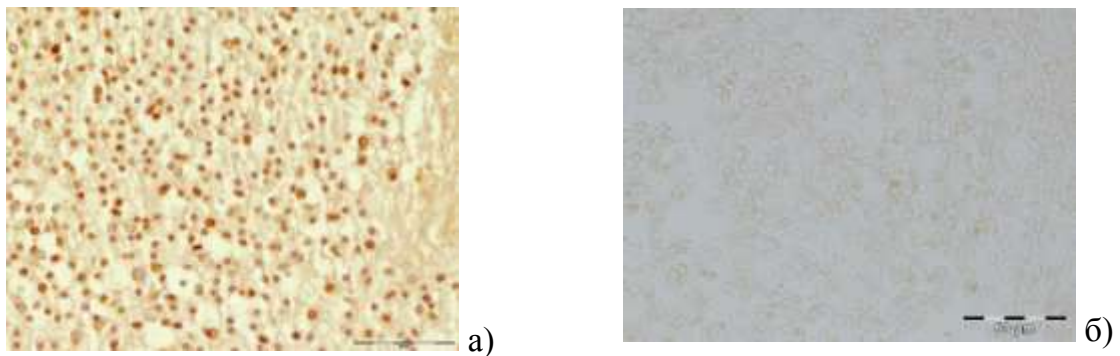


Рисунок 11 - Иммуногистохимическое окрашивание ткани печени мышей СВА на CD8 антиген (лечебное воздействие КФА сухого: а – CD8-позитивные клетки; б – контрольный срез при отсутствии специфических антител)

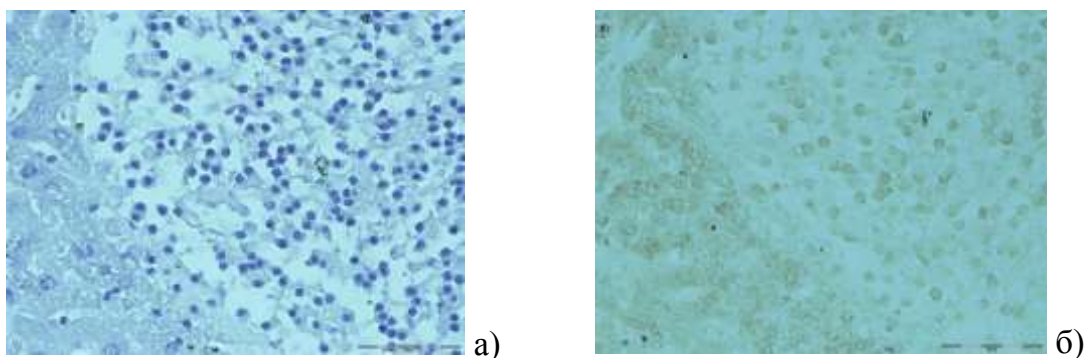


Рисунок 12 - Иммуногистохимическое окрашивание ткани печени мышей СВА на CD11a антиген (лечебное воздействие КФА сухого: а – CD11a-позитивные клетки; б – контрольный срез при отсутствии специфических антител)

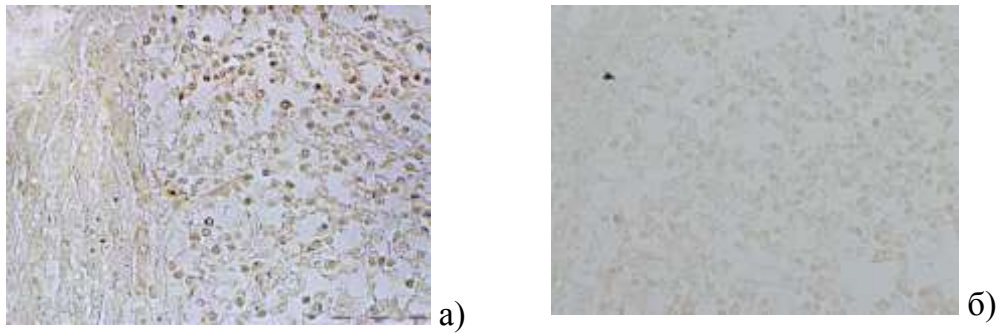


Рисунок 13 - Иммуногистохимическое окрашивание ткани печени мышей СВА на CD11b антиген (лечебное воздействие КФА сухого: а – CD11b-позитивные клетки; б – контрольный срез при отсутствии специфических антител)

Таким образом, эффекторы иммунитета, инфильтрирующие гепатокарциномы мышей, получавших КФА в разных режимах введения, представляют собой цитотоксические CD8+лимфоциты, экспрессирующие CD11a и CD11b лейкоцитарные интегрин. Поэтому с высокой долей вероятности можно заключить, что влияние КФА способствует инфильтрации спонтанных гепатокарцином цитотоксическими CD8+лимфоцитами, что обеспечивается адгезионными механизмами с участием CD11a и CD11b лейкоцитарных интегринов. Очевидно, это значимо для торможения роста опухолей.

Инфильтрация опухолей Т-лимфоцитами может иметь как благоприятный (в случае регрессии опухоли), так и отрицательный прогноз заболевания при опухолевой прогрессии (Adams S., 2014). Вместе с тем, прогноз может зависеть и от характеристики отдельных субпопуляции лимфоцитов. Так, присутствие в инфильтрате CD4+лимфоцитов (Th2 фенотипа) и миелоидных клеток определено параллельно с прогрессированием заболевания. Выявление в опухолевом инфильтрате цитотоксических Т-лимфоцитов с фенотипом CD3+CD8+ способствует регрессии опухолевого очага (Li J., 2017). Однако лишь в некоторых исследованиях прослежена связь инфильтрации опухолей лимфоцитами с выживаемостью (Lo Presti E., 2014). В ряде работ показано, что условием регрессии опухоли при инфильтрации цитотоксическими CD8+лимфоцитами является конечная стадия их дифференцировки (CD8+CD57+лимфоциты), продукция гранзимов, перфорина и ИФН- γ . Данные события выявлены при ингибировании секреции опухолевыми клетками трансформирующих факторов роста, в частности, TGF- β и γ . Если все эти условия не соблюдаются, то клинический эффект подавления

опухолевого процесса может отсутствовать (Beatty P.L., 2011; Van der Horst, P.H., 2012; Wu R.C., 2012).

Учитывая данные литературы, а также полученные в нашей работе положительные клинические результаты снижения частоты опухолеобразования, числа и размеров гепатокарцином можно полагать, что мигрующие в опухоль цитотоксические CD8+лимфоциты, экспрессирующие на своей поверхности молекулы гетеропитической адгезии лейкоцитарные интегрины LFA-1 и Mac-1, обладают конечной степенью дифференцировки (CD57+лимфоциты), а также продуцируют порфирин, ИФН- γ , гранзимы. Вероятно, вместе с подавлением продукции таких цитокинов, как TGF- β и - γ , а также ИЛ-6 и -10, это позволяет противоопухолевым реакциям иммунитета реализоваться в большей мере: миграция лимфоцитов и их контакт с клетками-мишенями, перфорирование мембран последних, введение лизирующих агентов и, в результате, гибель опухолевых клеток и деструкция опухоли. Таким образом, можно полагать, что экспрессия β 2-лейкоцитарных интегринов, обеспечивающая адгезионные взаимодействия лимфоцитов и клеток опухоли, является существенным условием реализации иммунореактивности в цепочке событий, которые важны для ослабления механизмов ускользания опухоли от иммунологического надзора, подавления опухолевого процесса и увеличения продолжительности жизни.

Продолжительность жизни животных. На рисунке 14 представлены кривые выживаемости мышей СВА при профилактическом (II группа) и лечебном (III группа) применении КФА. Таблица 6 отражает значения средней продолжительности жизни (СПЖ) и медианы выживаемости животных.

СПЖ контрольных мышей-самцов СВА составила $671,2 \pm 13,8$ день (22 мес), а медиана выживаемости - 638 дней (21 мес). Профилактическое воздействие КФА увеличило СПЖ на 3 мес (всего 25 мес), а медиану выживаемости — на 4,5 мес (всего 25,6 мес). Лечебное применение КФА повысило СПЖ на 5,4 мес (всего 27,4 мес), а медиану выживаемости - на 6,5 мес (всего 27,5 мес).

Вместе с тем, на представленных графиках можно проследить, сколько экспериментальных мышей пережило 1000 дней (около 33 мес).

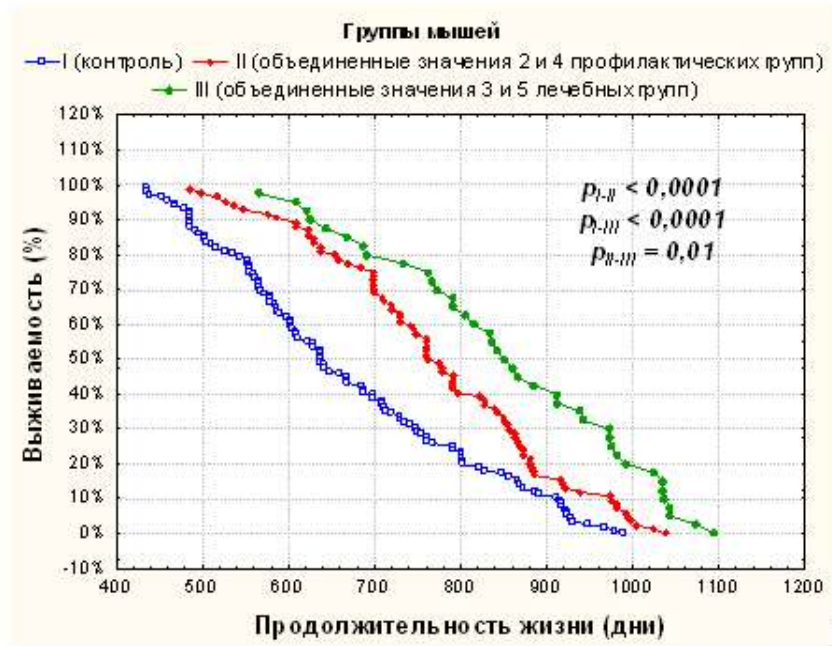


Рисунок 14 - Кривые выживаемости мышей СВА при профилактическом и лечебном применении КФА (обобщенные данные)

Таблица 6 – СПЖ и медиана выживаемости мышей СВА при воздействии КФА

Группы животных	СПЖ, дни (мес) $M \pm m^1$	Медиана выживаемости, дни (мес)	Количество мышей с ПЖ >1000 дней
I. Контроль (n = 116)	671,2 \pm 13,8 (22)	638 (21)	0
II. КФА, профилактическое воздействие (n = 84)	775,0 \pm 14,6 ² (25)	775 (25,6)	3 (3,6%) ²
III. КФА, лечебное воздействие (n = 81)	834,0 \pm 17,8 ^{2,3} (27,4)	829 (27,5)	15 (18,5%) ²

¹ - $M \pm m$ – среднее арифметическое значение \pm ошибка среднего арифметического; ² - $p < 0,0001$ – достоверность различий в сравнении с контрольными животными; ³ - $p = 0,01$ – достоверность различий в сравнении с II группой

В контрольной группе больше 1000 дней не прожило ни одно животное. При профилактическом воздействии КФА 1000 дней пережили 3,6 % животных (3 из 84), при лечебном - 18,5% мышей (15 из 81). СПЖ трех мышей при профилактике составила 1022 дня, а при лечении 15 животных - 1061 день. СПЖ этих 18 мышей равна 1054 дня, или 34,5 мес. Отметим, что максимальная продолжительность жизни определена у 3 мышей, получавших КФА в лечебном режиме – они прожили 1099 дней (36 мес), или 3 года. При хронобиологическом переносе возраста мышей на человека эти мыши прожили около 100 лет. У них было определено по одной опухоли объемом 520, 260 и 28 мм³. В то же время мыши в контрольной группе прожили около 62 «человеческих» лет, в профилактической группе – около 70, в лечебной – около 75 лет.

Таким образом, в данной работе получены результаты увеличения продолжительности жизни животных на 16% при введении КФА кратковременно в раннем онтогенезе и на 24% при введении КФА долговременно в зрелом и позднем онтогенезе. Оценив корреляцию продолжительности жизни мышей-самцов СВА и частоты спонтанного опухолеобразования, мы убедились в отрицательной зависимости этих параметров с коэффициентом корреляции $R = -0,92 \pm 0,01$.

Наши данные можно сопоставить с результатами, полученными при введении скрещенным инбредным мышам (C57Bl/6×BALB/c) ингибитора рапамицин-киназы, обладающего противоопухолевым действием. При этом выживаемость самок возрастала на 14%, а самцов – на 9% (Harrisson D., 2011). Полученные нами результаты, вероятно, имеют существенное значение, учитывая тот факт, что при этом выявлен противоопухолевый эффект.

Соматический статус мышей СВА контрольной и опытных групп оценивали по динамике массы тела, двигательной активности животных и качеству шерстного покрова.

На рисунке 15 представлены обобщенные средние значения массы тела мышей при профилактическом (II группа) и лечебном воздействии (III группа) КФА.

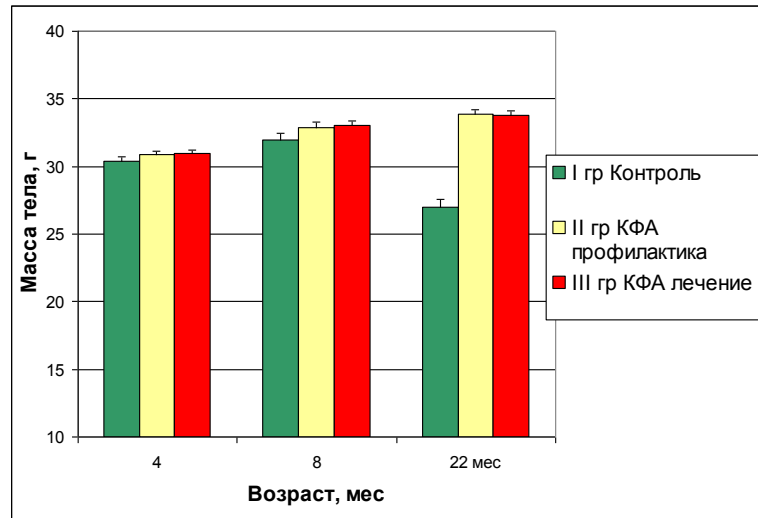


Рисунок 15 - Масса тела мышей СВА в онтогенезе при воздействии КФА

Из рисунка 15 следует, что в возрасте 4 и 8 мес масса тела животных всех групп была устойчивой. Масса тела контрольных мышей в возрастной период с 8 до 22 месяцев снизилась на 16%. При профилактическом (II группа) и лечебном (III группа) воздействии КФА масса тела животных оставалась стабильной к этому же возрасту.

Снижение массы тела контрольных животных может быть следствием кахексии, которая, очевидно, связана с возрастными изменениями и наличием опухолевого процесса у 100% животных этой группы. Вместе с тем у этих мышей 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 (Kim D., 2009).

У опытных животных стабильность массы тела определена параллельно с уменьшением концентрации ИЛ-6 и ИЛ-10 в сыворотке крови. Вероятно, КФА препятствует потере мышечной массы, уменьшая воспалительную реакцию и предотвращая распад белков.

На рисунке 16 представлены обобщенные результаты по состоянию шерстного покрова при профилактическом и лечебном воздействии КФА.



Рисунок 16 - Состояние шерстного покрова мышей СВА в позднем онтогенезе

Шерстный покров был полноценным у мышей обеих опытных групп. У животных контрольной группы признаки алопеции встречались в 18% случаев (у 8 из 45 животных).

Следует отметить, что состояние шерстного покрова без алопеции у мышей опытных групп согласуется с уменьшением ИЛ-6 в сыворотке крови. Это изменение может приводить к торможению воспалительного процесса и нормализации свойств волосяных фолликулов (Yu M., 2008).

Фотографии контрольных мышей в возрасте 30 и 32,5 мес представлены на рисунке 17.



Рисунок 17 - Фотографии мышей-самцов СВА контрольной группы с выраженными признаками алопеции (возраст 30 и 32,5 мес)

Среди контрольных мышей максимальная продолжительность жизни (у 1 животного) составила 990 дней (32,5 мес). У этих животных наблюдали шерстный покров с выраженными признаками алопеции. Вместе с тем среди мышей контрольной группы были животные и с полноценным шерстным покровом. Кроме того, как видно на рисунке 17, мыши имели сниженную массу тела, что характерно для кахектических состояний.

Внешний вид с полноценным шерстным покровом самого старого животного из 2 группы (профилактика жидким КФА) в возрасте 34 месяца показан на рисунке 18. У других опытных мышей мы наблюдали похожее состояние шерстного покрова. Мышей с дефектами шерстного покрова и похуданием здесь не наблюдали.



Рисунок 18 – Самец СВА в возрасте 34 месяца из 2 группы животных (профилактическое воздействие жидкого экстракта КФА)

На рисунке 19 продемонстрирован внешний вид самого старого самца из 3 группы (лечебное воздействие жидкого КФА) в возрасте 36 месяцев. Животное имеет полноценный шерстный покров.



Рисунок 19 – Самый старый самец СВА в возрасте 36 месяцев из 3 группы животных (лечебное воздействие жидкого экстракта КФА)

На рисунках 20 и 21 в качестве примеров представлены фотографии животных 4 и 5 групп (воздействие сухого экстракта КФА в профилактическом и лечебном режиме, соответственно). Один из двух самцов-долгожителей, проживший 36 месяцев, показан на рисунке 21. Качество шерстного покрова без алопеции и седины было отмечено и у других опытных животных.



Рисунок 20 - Самец СВА в возрасте 33 месяца из 4 группы животных (профилактическое воздействие сухого экстракта КФА)



Рисунок 21 - Самец СВА в возрасте 36 месяцев из 5 группы животных (лечебное воздействие сухого экстракта КФА)

Таким образом, у мышей-самцов линии СВА в позднем онтогенезе было отмечено достоверное снижение массы тела, а также в 18% случаев – нарушение шерстного покрова и наличие признаков алопеции. У животных опытных групп при сохранении стабильной массы тела признаков алопеции отмечено не было.

Показатели двигательной (поведенческой) активности мышей СВА при

воздействии сухого КФА представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Показатели двигательной (поведенческой) активности мышей СВА при воздействии сухого КФА

Группы животных	Возраст, мес ($M \pm m$) ¹	Пройденный путь, см ($M \pm m$) ¹	Время без движения, сек ($M \pm m$) ¹	Число «стоек» ($M \pm m$) ¹	Число мелких движений ($M \pm m$) ¹
1. Контрольная (n = 9)	22,7±0,5	1000,8±52,0	83,8±6,1	11,1±1,0	217,8±10,7
4. Сухой КФА, профилактическое воздействие (n = 9)	23,1±0,6	1230,1±88,5 ²	66,4±5,3 ²	14,6±1,2 ²	251,9±21,3 ²
5. Сухой КФА, лечебное воздействие (n = 9)	24,2±0,8	1313,6±96,5 ²	64,7±4,7 ²	16,2±2,0 ²	263,4±18,8 ²

¹ - $M \pm m$ – среднее арифметическое значение \pm ошибка среднего арифметического; ² - $p < 0,05$ – достоверность различий с контрольными животными

Результаты работы показали, что у мышей-самцов СВА к позднему онтогенезу наблюдали ослабление двигательной активности с учетом показателей пройденного пути, времени без движения, числа «стоек» и мелких движений (таблица 7).

Вместе с тем, сохранение двигательной активности мышей СВА под воздействием КФА (на примере сухого экстракта в двух режимах применения), без признаков похудения и аллопеции, согласуется с лучшей выживаемостью и снижением уровня опухолеобразования.

У мышей-самцов СВА в процессе онтогенеза выявлено уменьшение в крови концентрации **тестостерона** (Таблица 8). Это закономерно, поскольку известно, что процесс старения организма самца сопровождается снижением уровня данного гормона. Вместе с тем выявлено увеличение сывороточной концентрации **стресс-гормона кортикостерона**, который относят к гормонам старения (Таблица 9).

Анализ динамики концентрации анаболического гормона тестостерона и катаболического стресс-гормона кортикостерона позволяет говорить о гормональном

дисбалансе у мышей контрольной группы, который приводит к преобладанию катаболических реакций в организме, в том числе к нарушениям реакций иммунной системы.

Таблица 8 – Динамика тестостерона у мышей СВА при воздействии сухого КФА

Группы животных	Тестостерон (нг/мл) (M±m) ¹		
	4 мес	8 мес	22 мес
1. Контрольная (n = 66)	2,6±0,3	1,6±0,4	0,3±0,1 ²
4. Сухой КФА, профилактическое воздействие (n = 39)	3,6±0,4	2,8±0,2 ³	0,8±0,1 ^{2, 4}
5. Сухой КФА, лечебное воздействие (n = 39)	2,6±0,2	3,1±0,3 ³	1,8±0,2 ^{2, 5}

¹ - M±m – среднее арифметическое значение ± ошибка среднего арифметического; ² - p ≤ 0,01 – достоверность различий между средними значениями показателя в 8 и 22 мес, а также в 4 и 22 мес в 1, 4 и 5 группах; ³ - p = 0,01 – достоверность различий в сравнении с контрольными животными; ⁴ - p = 0,001 – достоверность различий в сравнении с контрольными животными; ⁵ - p = 0,0001 – достоверность различий с контрольными животными

Таблица 9 – Динамика кортикостерона у мышей СВА при воздействии сухого КФА

Группы животных	Кортикостерон (нг/мл) M±m ¹		
	4 мес	8 мес	22 мес
1. Контрольная (n = 66)	75,6±1,7	96,5±7,2	140,0±4,5 ^{2, 3}
4. Сухой КФА, профилактическое воздействие (n = 39)	69,2±2,9	79,1±3,6	105,0±1,9 ^{2, 3}
5. Сухой КФА, лечебное воздействие (n = 39)	70,9±3,8	81,3±3,9	60,5±2,4 ^{2, 3}

¹ - M±m – среднее арифметическое значение ± ошибка среднего арифметического; ² - p = 0,0002 – достоверность различий между средними значениями показателя в 8 и 22 мес, а также в 4 и 22 мес в 1, 4 и 5 группах; ³ - p = 0,0002 – достоверность различий в сравнении с контрольными животными

Процесс опухолеобразования вместе с тем представляется как хронический стресс, сопровождающийся выбросом кортикостерона в кровь. Действительно, у животных контрольной группы к 22 месячному возрасту концентрация кортикостерона в крови повысилась практически вдвое. Известно, что повышенный уровень кортизола может индуцировать апоптоз лимфоцитов крови, способствуя подавлению иммунореактивности организма (Сепиашвили Р.И., 2005). Также высокий уровень кортизола коррелирует с нарушением двигательной активности. Показано, например, чем выше уровень сывороточного кортизола у пациентов с болезнью Паркинсона, тем короче шаг (Soares N.M. et al., 2019). Выявленный гиперкортицизм, очевидно, является отрицательным фактором, способствующим образованию и развитию спонтанных гепатокарцином.

Анализ динамики тестостерона и кортикостерона у мышей опытных групп при профилактическом или лечебном воздействии сухого экстракта КФА позволяет говорить о гормонотропном действии препарата. Что касается тестостерона, то было показано предотвращение возрастного снижения гормона при воздействии КФА. Влияние КФА на кортикостерон выразилось в торможении образования гормона. Вместе с тем, коррекция концентрации гормонов сочеталась с усилением экспрессии β 2-лейкоцитарных интегринов, а также нормализацией концентрации ИЛ-6 и ИЛ-10, инфильтрацией и деструкцией опухолей, в результате – с увеличением продолжительности жизни опытных животных.

Проявление геропротекторных свойств КФА может быть обусловлено как противоопухолевым влиянием препарата, как ослаблением процессов старения, так и тем и другим одновременно.

В таблице 10 представлены результаты профилактического и лечебного воздействий КФА на количество ДА-нейронов среднего мозга мышей СВА.

Таблица 10 – Количество ДА-нейронов среднего мозга у мышей-самцов СВА при профилактическом и лечебном воздействии КФА (обобщенные результаты)

Группы животных	Количество ДА-нейронов ($M \pm m$) ¹	
	4 мес	22 мес
I. Контроль (n = 24)	11824,0 \pm 479,6 (n = 6)	8460,0 \pm 343,4 ² (n = 18)

Продолжение таблицы 10

Группы животных	Количество ДА-нейронов ($M \pm m$) ¹	
	4 мес	22 мес
II. КФА, профилактическое воздействие (n = 14)	-	11145,7 \pm 343,3 ³
III. КФА, лечебное воздействие (n = 11)	-	10674,9 \pm 461,2 ⁴

¹ - $M \pm m$ – среднее арифметическое значение \pm ошибка среднего арифметического; ² - $p = 0,0002$ - достоверность различий между средними значениями показателя в 3-4 и 21-22 мес в контрольной группе; ³ - $p = 0,0001$ – достоверность различий в сравнении с контрольными животными; ⁴ - $p = 0,0007$ – достоверность различий в сравнении с контрольными животными

Из таблицы 10 следует, что количество ДА-нейронов среднего мозга у мышей-самцов СВА контрольной группы при увеличении возраста статистически достоверно снизилось на 28,5%. Гибель ДА-нейронов в сочетании с выявленным гиперкортицизмом и иммунодепрессией может отражать хронический стресс, который является отрицательным фактором, способствующим образованию и развитию спонтанных гепатокарцином при вероятном снижении уровня периферического дофамина, подавлении киллерной активности цитотоксических CD8+лимфоцитов.

Как профилактическое, так и лечебное воздействие КФА предупреждало возрастное снижение ДА-нейронов. В данном случае мы имеем дело не только с процессом старения, но и со спонтанным гепатоканцерогенезом. Поэтому указанный эффект может быть опосредован влиянием КФА как на процессы старения, как на механизмы канцерогенеза, так и на то и другое одновременно.

В результате показана положительная корреляция между численностью ДА-нейронов в позднем онтогенезе и продолжительностью жизни мышей ($R = + 0,93 \pm 0,02$). Вместе с тем выявлена обратная зависимость между численностью ДА-нейронов и частотой спонтанных гепатокарцином у мышей-самцов СВА ($R = - 0,91 \pm 0,03$).

Количество молодых пролиферирующих нейронов, экспрессирующих Ki67, у старых мышей СВА с высокой частотой спонтанных гепатокарцином снижено по сравнению с молодыми животными (Таблица 11).

Таблица 11 – Количество молодых пролиферирующих нейронов (Ki67-позитивных клеток) у мышей-самцов СВА при профилактическом и лечебном воздействии КФА (обобщенные результаты)

Группы животных	Количество Ki67-позитивных клеток (M±m) ¹	
	4 мес	22 мес
I. Контроль (n = 24)	116,2±8,3 (n=6)	13,9±1,6 ² (n=18)
II. КФА, профилактическое воздействие (n = 12)	-	14,5±2,4
III. КФА, лечебное воздействие (n = 12)	-	20,1±3,7

¹ - M±m – среднее арифметическое значение ± ошибка среднего арифметического; ² - p = 0,0001 - достоверность различий между средними значениями показателя в 3-4 и 21-22 мес в контрольной группе

Профилактическое и лечебное воздействие КФА на нейрогенез не повлияло. Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что дофамин может ингибировать нейрогенез во взрослом гиппокампе. Предупреждение гибели ДА-нейронов под воздействием КФА может снижать необходимость их восполнения. Поэтому усиление пролиферации молодых нейронов не является оправданным, что и подтверждают полученные результаты (Egeland M., 2012).

Предотвращение потери уровня ДА-нейронов при воздействии КФА согласуется с ранее полученными данными у мышей C57BL с индуцированным паркинсоническим синдромом, где было выявлено, что КФА предотвращает гибель ДА-нейронов головного мозга по типу апоптоза, подавляя уровень каспазы 3. При этом нарушенная двигательная активность животных восстанавливалась (Бочаров Е.В., 2006).

С одной стороны, снижение численности ДА-нейронов у старых мышей СВА по сравнению с молодыми подтверждает данные литературы о возрастном уменьшении числа ДА-нейронов и, соответственно, уровня дофамина. С другой стороны, предупреждение гибели ДА-нейронов под воздействием КФА коррелирует со снижением уровня гепатокарцином, повышением жизнеспособности и качества жизни

высокогепатомных животных. Учитывая геропротекторные, антидепрессантные и противоопухолевые свойства дофамина, можно полагать единую логику событий (объединенную комплексом активности этого катехоламина), демонстрирующую протекторное действие КФА на дофаминергическую систему головного мозга.

Заключение. Особенности местной адгезионной дизрегуляции, обеспечивающей такие свойства опухоли, как потерю контроля пролиферации клеток ткани, анаплазию, метастазирование, дефицит иммунологического надзора, вероятно, находятся под наблюдением центральных механизмов с участием ДАергической системы. Последняя, используя иммуноадгезионные взаимодействия эффекторов иммунитета и клеток-мишеней, в состоянии участвовать в регуляции активной фазы реакций иммунитета против опухоли, вмешиваясь в патологический процесс и контролируя таким образом развитие злокачественного новообразования.

Можно полагать, что экспрессия $\beta 2$ -лейкоцитарных интегринов, обеспечивающая иммуноадгезионные взаимодействия эффекторов иммунитета и клеток опухоли, является существенным условием реализации иммунореактивности в цепочке событий, которые важны для ослабления механизмов ускользания опухоли от иммунологического надзора, подавления опухолевого процесса и увеличения продолжительности жизни.

Связь нарушений периферических иммуноадгезионных взаимодействий эффекторов иммунитета и клеток-мишеней с потерей ДА-нейронов головного мозга детализирует стрессорный механизм этиологии рака. Следовательно, важным выводом нашей работы может быть ответ на ранее открытый вопрос о подробностях механизма, приводящего к развитию злокачественного новообразования в результате хронического стресса.

Результаты работы показали (Рисунок 22), что профилактическое и лечебное воздействия КФА на мышей СВА, генетически предрасположенных к гепатокарциномам, обеспечивает долговременный эффект повышения на клетках периферической крови экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1, участвующих в контактных взаимодействиях эффекторов иммунитета с клетками-мишенями. Параллельно выявлено снижение концентрации ИЛ-6 и ИЛ-10 в сыворотке крови животных. Вероятно, это приводит к «снятию» ингибирования лигандов LFA-1 и Mac-1 - гистонеспецифических молекул адгезии ICAM-1, 2 на опухолевых клетках.

Таким образом может происходить восстановление регуляции гетеротипических адгезионных взаимодействий, обуславливающих прикрепление иммунных эффекторов к клеткам опухоли, способствуя элиминации последних.

Предотвращение потери дофаминергических нейронов головного мозга сопровождалось снижением уровня опухолеобразования, увеличением продолжительности жизни, сохранением соматического статуса при коррекции сывороточного уровня стресс-гормона кортикостерона. Следовательно, можно полагать контроль процесса гепатоканцерогенеза при усилении противоопухолевой защиты и ослаблении стрессорных механизмов в том числе с участием высокого содержания периферического дофамина, оправдывая известные из литературы свойства последнего как стресс-регулятора и противоопухолевого агента. При этом периферический дофамин может играть роль в созревании цитотоксических лимфоцитов, способствуя их конъюгации с опухолевыми клетками. Так дофамин, вероятно, участвует в активной фазе реакций иммунитета против опухоли, внося свой вклад в обеспечение адгезионных взаимодействий между эффекторами иммунитета и клетками-мишенями.

Эффекты КФА в отношении опухолей могут быть связаны с тем, что в его состав входят компоненты фенольной природы, в том числе флавоноиды, фенолгликозиды, тритерпеновые гликозиды (гинзенозиды, аралозиды, элеутерозиды, салидрозид, гиперозид, кверцетин, розавин, рутин, розиридин, родионин, схизандрин, схизантерин, лютеолин, апигенин, арбутин, глицирризиновая кислота и др.) (Шейченко О.П. и др., 2012; Карпова Р.В. и др., 2016; Казеев И.В. и др., 2020). Учитывая, что в качестве узкобороздочных лигандов последние могут оказывать прямое или опосредованное действие на процессы репарации ДНК, проявляя антиканцерогенные эффекты, данные соединения считают эффективными в составе препаратов для профилактической онкологии (Белицкий Г.А., и др., 2014; Nekkanti S. et al., 2017).

Вместе с тем, следует принять во внимание, что многие из подобных соединений, в том числе тритерпеновые гликозиды (гинзенозиды, аралозиды, элеутерозиды, глицирризиновая к-та и др.) способны атаковать мультирецепторные системы плазматических мембран, так же как и активировать внутриклеточные стероидные рецепторы. Это обусловлено структурной и функциональной связью этих соединений со стероидами. Многие из них принадлежат к семейству стероидных сапонинов (Shikov

A.N. et al., 2016). Последние, благодаря своей структуре, имеют множество физиологических активностей. В частности, стероидный скелет обеспечивает способность молекулы встраиваться в плазматические мембраны. стероиды могут связывать ядерные рецепторы, действуя непосредственно на транскрипцию мРНК и соответственно на синтез белка (Amsterdam J.D., Panossian A.G., 2016). Также они являются индукторами дифференцировки, корректорами гомо- и гетеротипических адгезионных взаимодействий, сочетая противоопухолевые эффекты вместе с усилением резистентности здоровых тканей к повреждению (Shanmugam M.K. et al., 2016; Wang C. et al., 2017). Обладают антипролиферативной и проапоптотической активностью в отношении опухолевых клеток (Xia T. et al., 2017).

Следовательно, разносторонний характер действия КФА, обеспечивая сочетанное влияние на патогенетические механизмы и коррекцию разных звеньев патологической системы при новообразованиях и процессах старения, вероятно, позволяет потенцировать эффекты, что может соответствовать принципу комплексных патогенетических воздействий.

Таким образом, полученные результаты о роли иммуноадгезионных механизмов взаимодействия эффекторов иммунитета и клеток-мишеней значимы для профилактики опухолеобразования, замедления роста опухолей и увеличения продолжительности жизни.

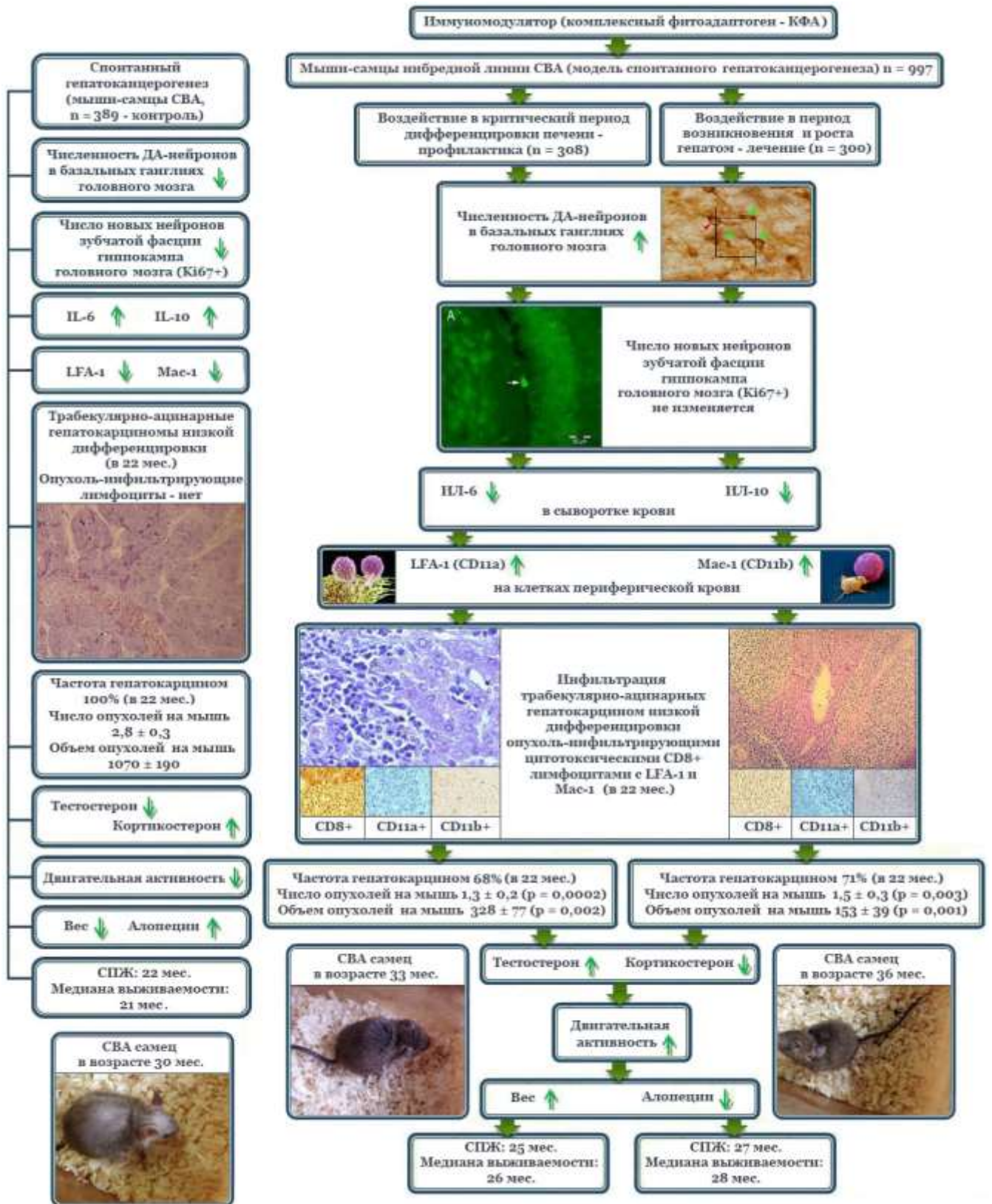


Рисунок 22 - Схема результатов исследования

ВЫВОДЫ

1. Экспрессия лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на лимфоцитах периферической крови, численность дофаминергических нейронов и пролиферирующих молодых нейронов в головном мозге, концентрация тестостерона в сыворотке крови снижаются, концентрации ИЛ-6, ИЛ-10 и кортикостерона в сыворотке крови повышаются в онтогенезе мышей-самцов СВА.
2. Частота опухолеобразования у мышей-самцов СВА в 22-х месячном возрасте составила 100%, по морфологическому строению опухоли представляют собой умеренно- и низкодифференцированные трабекулярные и трабекулярно-ацинарные гепатокарциномы.
3. Средняя продолжительность жизни мышей-самцов СВА составила 22 мес, что сопровождалось неудовлетворительным соматическим статусом животных (снижением двигательной активности и массы тела, нарушением шерстного покрова с признаками алопеции).
4. Профилактическое и лечебное воздействия комплексного фитоадаптогена приводило к повышению экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках периферической крови, уровня гормона тестостерона в сыворотке крови, к снижению сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10, стресс-гормона кортикостерона, частоты возникновения (на 32% и 29%, соответственно) и размеров генетически обусловленных гепатокарцином, увеличению продолжительности жизни (на 16% и 24%, соответственно) с сохранением у мышей-самцов СВА двигательной активности, массы тела и шерстного покрова без алопечий.
5. Наличие опухоль-инфильтрирующих CD8⁺лимфоцитов с экспрессией LFA-1 и Mac-1 лейкоцитарных интегринов в гепатокарциномах может иметь значение для снижения частоты опухолеобразования и увеличения продолжительности жизни животных.
6. Показана положительная корреляция количества ДА-нейронов в позднем онтогенезе и продолжительности жизни мышей-самцов СВА ($R = + 0,91$), отрицательная корреляция численности ДА-нейронов головного мозга и частоты спонтанных гепатокарцином ($R = - 0,90$), а также отрицательная связь частоты спонтанных гепатокарцином и продолжительности жизни высокогепатомных мышей СВА ($R = - 0,92$).

7. При разработке профилактических и лечебных средств в отношении опухолевых патологий представляется перспективным учитывать коррекцию иммуноадгезионных нарушений с участием $\beta 2$ -лейкоцитарных интегринов.
8. Учитывая возможность регуляции численности ДА-нейронов головного мозга, периферических иммуноадгезионных механизмов с участием $\beta 2$ -лейкоцитарных интегринов и сигнальной реактивности цитокинов, сывороточного содержания стресс-гормона кортикостерона и тестостерона, а также частоты опухолей, выживаемости и качества жизни мышей-самцов СВА, генетически предрасположенных к развитию гепатокарцином, можно полагать роль центральных нейрональных и периферических иммуноадгезионных механизмов в контроле развития злокачественных новообразований.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бочарова, О.А. Адгезия в биологии рака / О.А. Бочарова, **Р.В. Карпова** // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 3. – С. 55-60.
2. Шейченко, О.П. Возможность использования электронных спектров поглощения для стандартизации многокомпонентного препарата / О.П. Шейченко, О.А. Бочарова, В.И. Шейченко, О.Н. Толкачев, Е.В. Бочаров, **Р.В. Карпова**, В.А. Быков // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. – 2007. – Т. 5, № 2. – С. 20-25.
3. Бочаров, Е.В. Нейропротекторные свойства фитоадаптогенов / Е.В. Бочаров, В.Г. Кучеряну, О.А. Бочарова, **Р.В. Карпова** // Вестник РАМН. – 2008. – № 4. – С. 47-50.
4. Бочарова, О.А. Комплексные фитоадаптогены в онкологии и геронтологии / О.А. Бочарова, М.И. Давыдов, А.Ю. Барышников, А.А. Клименков, В.Б. Матвеев, М.М. Пожарицкая, И.А. Иванова-Смоленская, Р.В. **Карпова**, Э.Г. Горожанская, О.П. Шейченко, Б.П. Суханов, Г.Н. Крыжановский, Н.П. Бочков, В.А. Быков, В.А. Тутельян, А.А. Воробьев, В.А. Княжев // Вестник РАМН. – 2009. – № 8. – С. 21-25.
5. Бочарова, О.А. Экспрессия лейкоцитарных интегринов и некоторых цитокинов при использовании фитоадаптогена у высокоракковых мышей / О.А. Бочарова, **Р.В. Карпова**, В.А. Ильенко, Е.В. Бочаров, И.В. Казеев // Технологии живых систем. – 2012. – № 3. – С. 13-17.
6. Шейченко, О.П. Исследование комплексного фитоадаптогена методом ВЭЖХ / О.П.

- Шейченко, О.А. Бочарова, Б.А. Крапивкин, Е.В. Уютова, **Р.В. Карпова**, И.В. Казеев, Е.В. Бочаров, В.А. Быков // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. – 2012. – № 10. – С. 52-59.
7. Бочарова, О.А. Лейкоцитарные интегринны при гепатоканцерогенезе мышей высокоракковой линии СВА / О.А. Бочарова, **Р.В. Карпова**, В.А. Ильенко, Е.В. Бочаров, И.В. Казеев // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 3. – С. 53-56.
 8. Куренная, О.Н. Антимутагенез мультифитоадаптогена в клетках дрожжей-сахаромицетов / О.Н. Куренная, **Р.В. Карпова**, О.А. Бочарова, И.В. Казеев, Е.В. Бочаров, В.Г. Королев // Генетика. – 2013. – Т. 49, № 12. – С. 1364-1369.
 9. Бочаров, Е.В. Исследование радиозащитной активности мультифитоадаптогена в эксперименте на мышах / Е.В. Бочаров, **Р.В. Карпова**, И.В. Казеев, В.Г. Кучеряну, О.А. Бочарова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2013. – № 3. – С. 55-58.
 10. **Карпова, Р.В.** Радиозащитная эффективность мультифитоадаптогена в опытах на собаках / **Р.В. Карпова**, Е.В. Бочаров, И.В. Казеев, В.Г. Кучеряну, О.А. Бочарова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2013. – № 4. – С. 51-54.
 11. Бочарова, О.А. Интегринны LFA-1, Mac-1 и цитокины IL-6, -10 у высокоракковых мышей под воздействием фитоадаптогена / О.А. Бочарова, Е.В. Бочаров, **Р.В. Карпова**, В.А. Ильенко, И.В. Казеев, А.Ю. Барышников // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 157, № 2. – С. 223-226.
 12. Бочарова, О.А. Снижение возникновения гепатом при воздействии фитоадаптогена у высокоракковых мышей СВА / О.А. Бочарова, Е.В. Бочаров, **Р.В. Карпова**, А.А. Вершинская, Ю.Н. Соловьев // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Том 13, № 2. – С. 73-76.
 13. Бочарова, О.А. Воздействие фитоадаптогена на возникновение гепатом у высокоракковой линии мышей СВА / О.А. Бочарова, **Р.В. Карпова**, Е.В. Бочаров, Ю.Н. Соловьев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159, № 5. – С. 615-617.
 14. Бочаров, Е.В. Лимфоцитарная инфильтрация гепатокарцином мышей высокоракковой 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.
15. Бочаров, Е.В. Морфологические исследования гепатокарцином мышей-самцов высокоракковой линии СВА при воздействии фитоадаптогена / Е.В. Бочаров, О.А. Бочарова, Ю.Н. Соловьев, **Р.В. Карпова**, В.Г. Кучеряну // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 161, № 5. – С. 674-677.
16. **Карпова, Р.В.** Возможности использования высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией для количественного и качественного определения биологически активных веществ женьшеня в фитоэкстрактах / **Р.В. Карпова**, В.Е. Шевченко, Е.В. Бочаров, О.П. Шейченко, О.А. Бочарова, В.Г. Кучеряну, В.А. Быков // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 15, № 2. – С. 36-46.
17. Бочаров, Е.В. Воздействие мультифитоадаптогена в раннем постнатальном онтогенезе, улучшающее выживаемость и соматическое состояние мышей высокоракковой линии / Е.В. Бочаров, **Р.В. Карпова**, О.А. Бочарова, В.Г. Кучеряну, З.С. Шпрах // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – Т. 16, № 1. – С. 76-81.
18. Бочаров, Е.В. Продолжительность жизни и соматический статус высокоракковых мышей при воздействии фитоадаптогена в раннем онтогенезе / Е.В. Бочаров, **Р.В. Карпова**, О.А. Бочарова, В.Г. Кучеряну, З.С. Шпрах // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 163, № 6. – С. 755-758.
19. Бочаров, Е.В. Регуляция иммуноадгезивных взаимодействий мультифитоадаптогеном в профилактике спонтанных гепатокарцином / Е.В. Бочаров, О.А. Бочарова, **Р.В. Карпова**, В.Г. Кучеряну, И.В. Казеев, Е.С. Иноземцева, Ю.Н. Соловьев, З.С. Шпрах // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – Т. 17, № 2. – С. 69-78.
20. **Карпова, Р.В.** Влияние фитоадаптогена на лейкоцитарную инфильтрацию гепатокарцином мышей / **Р.В. Карпова**, Е.В. Бочаров, О.А. Бочарова, И.В. Казеев, В.Г. Кучеряну, Ю.Н. Соловьев // Российский биотерапевтический журнал. – 2019. – Т. 18, № 2. – С. 60-65.

21. Бочарова, О.А. Дофаминергическая система: стресс, депрессия, рак (часть 1) / О.А. Бочарова, Е.В. Бочаров, В.Г. Кучеряну, **Р.В. Карпова** // Российский биотерапевтический журнал. – 2019. – Т. 18, № 3. – С. 6-14.
22. Бочарова, О.А. Дофаминергическая система: стресс, депрессия, рак (часть 2) / О.А. Бочарова, Е.В. Бочаров, В.Г. Кучеряну, **Р.В. Карпова**, А.А. Вершинская // Российский биотерапевтический журнал. – 2019. – Т. 18, № 4. – С. 25-33.
23. Бочарова, О.А. β_2 интегрин LFA-1 и Mac-1 – мишень для усиления иммунитета против опухоли / О.А. Бочарова, **Р.В. Карпова**, Е.В. Бочаров, А.А. Вершинская, М.А. Барышникова, И.В. Казеев, Ю.Н. Соловьев, В.Г. Кучеряну // Российский биотерапевтический журнал. – 2020. – Т. 19, № 1. – С. 53-58.
24. Бочарова, О.А. Фитоадаптогены в биотерапии опухолей и гериатрии (Часть 1) / О.А. Бочарова, **Р.В. Карпова**, Е.В. Бочаров, А.А. Вершинская, М.А. Барышникова, И.В. Казеев, В.Г. Кучеряну, М.В. Киселевский // Российский биотерапевтический журнал. – 2020. – Т. 19, № 2. – С. 13-21.
25. Бочарова, О. А. Фитоадаптогены в биотерапии опухолей и гериатрии (Часть 2) / О.А. Бочарова, **Р.В. Карпова**, Е.В. Бочаров, А.А. Вершинская, М.А. Барышникова, И.В. Казеев, В.Г. Кучеряну, М.В. Киселевский // Российский биотерапевтический журнал. – 2020. – Т. 19, № 3. – С. 12–19.
26. Бочарова, О.А. Изыскание фитоадаптогенов и возможности использования фитоадаптогенов / О.А. Бочарова, **Р.В. Карпова**, Е.В. Бочаров, А.А. Вершинская, М.А. Барышникова, И.В. Казеев, В.Г. Кучеряну, М.В. Киселевский, В.Б. Матвеев // Российский биотерапевтический журнал. – 2020. – Т. 19, № 4. – С. 22-31.
27. Казеев, И.В. Тандемная масс-спектрометрия в технологии определения аралозидов композиции фитоадаптогенов / И.В. Казеев, О.А. Бочарова, В.Е. Шевченко, **Р.В. Карпова**, Е.В. Бочаров, Е.В. Уютова, О.П. Шейченко, В.Г. Кучеряну, М.А. Барышникова // Теоретические основы химической технологии. – 2020. - Т. 54, №6. – С. 733-737.
28. Бочарова, О.А. Возможности регуляции численности дофаминергических нейронов в профилактике гепатокарцином / О.А. Бочарова, А.В. Ревещин, Е.В. Бочаров, **Р.В. Карпова**, В.Г. Кучеряну, М.В. Уткина, В.Б. Матвеев, Г.В. Павлова. // Лабораторные животные для научных исследований. – 2021. – № 2. – С. 47-53.

<https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-02-06>.

29. Патент № 2481849 Российская Федерация: МПК А61К 36/00 (2006.01) А61Р 35/00 (2006.01). Способ лечения экспериментальных животных с высокой частотой спонтанного опухолеобразования: № 2012115907/15; заявл. 20.04.2012: опубл. 20.05.2013, Бюл. № 14 / Бочарова О.А., Барышников А.Ю., **Карпова Р.В.**, Бочаров Е.В., Ильенко В.А., Шевченко В.Е., Шейченко О.П., Давыдов М.И.; заявитель и патентообладатель Москва, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.
30. Патент № 2507599 Российская Федерация: МПК G09В 23/28 (2006.01). Способ профилактики развития опухолей у экспериментальных животных с высокой частотой спонтанного опухолеобразования: № 2012153533/14: заявл. 12.12.2012: опубл. 20.02.14, Бюл. № 5 / Бочарова О.А., Барышников А.Ю., **Карпова Р.В.**, Бочаров Е.В., Ильенко В.А., Шевченко В.Е., Шейченко О.П., Давыдов М.И.; заявитель и патентообладатель Москва, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Избранные тезисы, опубликованные в материалах конгрессов и конференций

31. Бочарова, О.А. Поиск путей коррекции лейкоцитарных интегринов и некоторых цитокинов при спонтанном гепатоканцерогенезе у мышей / О.А. Бочарова, В.А. Ильенко, **Р.В. Карпова**, Е.В. Бочаров, И.В. Казеев, А.Ю. Барышников // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – № 2. – С. 10.
32. Бочарова, О.А. Возникновение спонтанных гепатокарцином у высокоракковых мышей СВА снижается под воздействием фитоадаптогена в профилактическом режиме применения / О.А. Бочарова, **Р.В. Карпова**, Е.В. Бочаров, В.А. Ильенко, А.Ю. Барышников // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – № 2. – С. 14.
33. **Karpova, R.V.** Morphological changes of CBA mice liver tissue susceptible to spontaneous hepatomas using multiphytoadaptogene preventive application / **R.V. Karpova**, О.А. Bocharova, E.V. Bocharov, Y.N. Soloviev // XVIIth International Congress «Phytopharm-2013». - Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. – 2013. – Vol. 11. – P. 45.
34. **Карпова, Р.В.** Лимфоцитарная инфильтрация опухолей печени мышей высокоракковой линии СВА при профилактическом воздействии комплексного фитоадаптогена / **Р.В. Карпова**, О.А. Бочарова, В.А. Ильенко, Е.В. Бочаров, И.В.

- Казеев, А.Ю. Барышников // Материалы XX Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – 2013. – С. 349-350.
35. **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 // XVIIIth International Congress «Phytopharm-2014». - Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. – 2014. – Vol. 12. – P. 11.
36. **Karpova, R.V.** Phytomix-40 dry extract under preventive application reduced IL-6 and IL-10 serum levels in CBA mice with spontaneous hepatomas / **Karpova R.V.**, Bocharov E.V., Bocharova O.A., Vershinskaya A.A., Kucheryanu V.G. // XIXth International Congress «Phytopharm-2015». - Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. – 2015. – Vol. 13. – P. 17-18.
37. Bocharov, E.V. Effect of multiphytoadaptogene dry powder extract on serum corticosterone level in CBA highly carcinogenic mice / E.V. Bocharov, O.A. Bocharova, **R.V. Karpova**, V.G. Kucheryanu, N.E. Kushlinskiy // XXth International Congress «Phytopharm-2016». - Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. – 2016. – Vol. 14. – P. 12-13.
38. Bocharov, E.V. Effect of multiphytoadaptogene dry powder extract on serum testosterone level in highly carcinogenic CBA male mice / E.V. Bocharov, O.A. Bocharova, **R.V. Karpova**, V.G. Kucheryanu, N.E. Kushlinskiy // XXth International Congress «Phytopharm-2016». - Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. – 2016. – Vol. 14. – P. 12.
39. **Карпова, Р.В.** Воздействие нетоксичного иммуномодулятора в раннем онтогенезе снижает уровень спонтанного опухолеобразования / **Р.В. Карпова**, Е.В. Бочаров, О.А. Бочарова, В.Г. Кучеряну // Материалы XXIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – 2017. – С. 58.
40. **Карпова, Р.В.**, Бочаров Е.В., Бочарова О.А., Брусенцов Н.А., Кучеряну В.Г. Сухой экстракт мультифитоадаптогена способствует лимфоцитарной инфильтрации спонтанных гепатом / **Р.В. Карпова**, Е.В. Бочаров, О.А. Бочарова, Н.А. Брусенцов, В.Г. Кучеряну // Материалы XXIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – 2017. – С. 58.

41. **Карпова, Р.В.** Влияние жидкого экстракта мультифитоадаптогена на частоту мутаций в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / **Р.В. Карпова**, Е.В. Бочаров, О.А. Бочарова, И.В. Казеев, В.Г. Кучеряну // Материалы XXV Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – 2018. – С. 31.
42. **Karpova, R.V.** Multiphytoadaptogene complex antimutagenic effect in *Saccharomyces cerevisiae* / **R.V. Karpova**, E.V. Bocharov, O.A. Bocharova, I.V. Kazeev, V.G. Kucheryanu, M.V. Utkina // XXIIth International Congress «Phytopharm-2018». - Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. – 2018. – Vol. 16 (suppl. 2) – P. 17.
43. Bocharova, O.A. Immuno-adhesion markers of tumour-infiltrating CD8⁺ lymphocytes significant for a preventive effect as well as for increasing the lifespan and quality of life in mice with spontaneous hepatocarcinogenesis / O.A. Bocharova, A.V. Revishchin, E.V. Bocharov, **R.V. Karpova**, I.V. Kazeev, M.V. Utkina, G.V. Pavlova, V.G. Kucheryanu // 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry with international participants. MedChem Russia 2019. Abstract book – Ekaterinburg: Ural branch of the Russian Academy of Sciences. – P. 330
44. Bocharova, O.A. Prognostically relevant tumour infiltrating lymphocytes profile in CBA mice under multiphytoadaptogene complex dry powder preventive administration / O.A. Bocharova, A.V. Revishchin, E.V. Bocharov, **R.V. Karpova**, I.V. Kazeev, M.V. Utkina, Y.N. Soloviev, G.V. Pavlova, V.G. Kucheryanu // XXIIIth International Congress «Phytopharm-2019». - Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. – 2019. – Vol. 17 (suppl. 1) – P. 8.
45. Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V., Kazeev I.V., Utkina M.V., Kucheryanu V.G. Nontoxic plant immunomodifier under preventive administration extends longevity and healthspan in CBA mice / O.A. Bocharova, **R.V. Karpova**, E.V. Bocharov, I.V. Kazeev, M.V. Utkina, V.G. Kucheryanu // XXIIIth International Congress «Phytopharm-2019». - Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. – 2019. – Vol. 17 (suppl. 1) – P. 9.