АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН

ББК 53.53
УДК 616
А 59

Черешнев В. А., Родионов С. Ю., Черкасов В. А., Малютина Н. Н., Орлов О. А.
Альфа-фетопротеин. Екатеринбург: УрО РАН, 2004. – 376 с.

В монографии отражены современные данные о строении, биологической активности, механизмах действия сывороточного белка крови альфа-фетопротеина (АФП).

АФП является тонким регулятором гомеостаза в физиологических условиях и при развитии патологических процессов.

В книге представлены результаты экспериментальных и клинических исследований, посвященных изучению эффективности лекарственной формы АФП в терапии ряда аллергических, аутоиммунных, онкологических заболеваний. Освещены данные, характеризующие АФП как белок с выраженными иммуносупрессорными свойствами, реализующий свои эффекты на уровне комплексной регуляции процессов клеточной пролиферации, включения механизмов апоптоза, обеспечения клетки энергетическим и пластическим материалом и других механизмов.

Издание предназначено для широкого круга специалистов в области иммунологии, патофизиологии, терапии, хирургии, онкологии, реабилитологии, врачей других специальностей, студентов медицинских и биологических вузов, аспирантов, научных работников.

Ответственный редактор
д. м. н., профессор, заслуженный деятель науки РФ **Н. Н. Кеворков**

Рецензенты:
академик РАМН, д. м. н., профессор **Р. М. Хаитов**;
член-корреспондент РАМН, д. м. н., профессор **А. В. Караулов**

Авторский коллектив выражает искреннюю благодарность сотрудникам ГНЦ Института иммунологии МЗ РФ профессору И. Г. Сидоровичу и к. м. н. А. С. Ивановой за помощь в проведении исследований; сотрудникам Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН к. б. н. С. А. Замориной и к. м. н. Б. А. Бахметьеву за творческое участие как на этапе выполнения экспериментальной работы, так и в подготовке монографии к изданию.

Отдельная благодарность профессорам В. И. Масычевой и М. В. Черешневой за личный вклад в исследования и высказанные ценные критические замечания. Огромная благодарность всем специалистам, принявшим участие в работе.

Особая благодарность О. В. Коломейцу и М. П. Морозову за финансовую поддержку исследований и издания монографии.

А $\frac{22(04) - 104}{\text{ВП6(03) 1998}}$ БО

ISBN 5-7691-1498-3

© Авторский коллектив, 2004 .
Черешнев В. А.,
Родионов С. Ю.,
Черкасов В. А.,
Малютина Н. Н.,
Орлов О. А.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ И ФИЗИОЛОГИИ УрО РАН
ПЕРМСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ МЗ РФ
ЗАО «ИНСТИТУТ НОВЫХ МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ»

**В. А. ЧЕРЕШНЕВ, С. Ю. РОДИОНОВ,
В. А. ЧЕРКАСОВ, Н. Н. МАЛЮТИНА, О. А. ОРЛОВ**

АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН

ЕКАТЕРИНБУРГ, 2004

ЧЕРЕШНЕВ
Валерий Александрович

Доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор Института иммунологии и физиологии УрО РАН (Екатеринбург), председатель УрО РАН.

Автор научного открытия, 21 изобретения, более 500 научных работ, опубликованных в российских и зарубежных научных изданиях, в том числе 16 монографий и учебника для вузов «Патофизиология».

Область научных интересов – изучение функций иммунной системы в норме и при патологических состояниях.

РОДИОНОВ
Сергей Юрьевич

Доктор медицинских наук, руководитель лаборатории цитокинов и отделения клинической иммунологии Института иммунологии и физиологии УрО РАН (Екатеринбург), директор по научной работе и производству ЗАО «Институт новых медицинских технологий» (Пермь).

Автор научного открытия, 2 запатентованных лекарственных препаратов, 16 изобретений, 89 научных работ, опубликованных в российских и зарубежных научных изданиях, в том числе монографии «Гомеостатика живых и технических систем» (М.: Наука, 1990).

Область научных интересов – разработка, производство и клиническое изучение новых иммунотропных и противоопухолевых препаратов.

ЧЕРКАСОВ
Владимир Аристархович

Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой госпитальной хирургии с курсом анестезиологии, реаниматологии и онкологии, ректор Пермской государственной медицинской академии МЗ РФ.

Автор 25 изобретений, более 300 научных работ, опубликованных в российских и зарубежных научных изданиях, в том числе 7 монографий.

Область научных интересов – разработка новых методов хирургического и консервативного лечения в практике хирургических болезней.

МАЛЮТИНА
Наталья Николаевна

Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой профессиональных болезней и терапии с курсом профпатологии ФУВ Пермской государственной медицинской академии МЗ РФ.

Автор 5 изобретений, более 250 научных работ, опубликованных в российских и зарубежных научных изданиях.

Область научных интересов – изучение иммунологических и гемоциркуляторных нарушений при заболеваниях внутренних органов.

ОРЛОВ
Олег Алексеевич

Доктор медицинских наук, главный врач Пермского областного онкологического диспансера, заведующий курсом онкологии кафедры госпитальной хирургии Пермской государственной медицинской академии МЗ РФ.

Автор 5 изобретений, более 120 научных работ, опубликованных в российских и зарубежных научных изданиях.

Область научных интересов – органосохраняющее лечение рака молочной железы, реконструктивно-пластические операции, иммунотерапия в комплексном и комбинированном лечении онкопролиферативных заболеваний.

www.profetal.ru

Светлой памяти академика
Николая Владимировича ВАСИЛЬЕВА
посвящаем

Н. В. Васильев был ученым-мыслителем, сочетавшим глубокие научные познания с незаурядной общей культурой и высокой нравственностью. Широта его эрудиции способна была вызвать удивление: в своих исследованиях он поднимался до высочайших философских обобщений, оставаясь в то же время понятным для людей, далеких от науки и философии.

Ему были свойственны те качества, какими должны обладать ученые, возглавляющие фундаментальные научные направления. Прежде всего это последовательность научного поиска и подчиненность его сквозной стержневой идее – как первое условие успеха и залог подлинного прорыва в новый горизонт знаний. Движение научного направления не ограничено жизнью одного поколения ученых, поэтому закономерно формирование и развитие научных школ. Н. В. Васильев обладал обостренной интуицией, способностью к «голографическому» мышлению, что, как дар Божий, отличает гениального ученого от просто талантливого. У Н. В. Васильева этот дар проявлялся способностью воссоздавать целостную картину изучаемого явления, основываясь на крупицах исходной информации.

Общее количество трудов, написанных Н. В. Васильевым, превысило 600, в их числе опубликована 41 монография – почти по числу лет, отданных научному творчеству. Еще четыре остались незавершенными. В его научной деятельности главной целью было развитие общефизиологического эволюционного направления в естествознании. Об этом свидетельствуют выдающиеся исследования Н. В. Васильева в области изучения иммунной системы, опубликованные в ряде монографий: «Роль нервной системы в процессах инфекции и иммунитета» (1963); «Очерки о роли кроветворной ткани в антителообразовании» (1975).

Опыт изучения эволюции иммунитета иллюстрирует множественность ее функций, и не всегда иммунные процессы выполняют защитную функцию в узком смысле слова. Это позволило Н. В. Васильеву в 1982 году сформулировать положение о стратегиях функционирования иммунной системы. В его книге «Вопросы иммунологии опухолей» (1986)

описано, что при канцерогенезе иммунодепрессия не является тотальной, а многие звенья системы иммунитета сохраняют в этих условиях достаточно большую степень свободы реагирования на антигены. Предполагается, что раковая клетка, являясь трансформированным элементом самого организма и обладая способностью к выработке эмбриональных антигенов, использует феномен антигенной мимикрии, т. е. маскируется под эмбрион, и система иммунитета функционирует в режиме, объективно выгодном не организму хозяина, а необластоме. Там же Николай Владимирович писал: «Раковую болезнь в принципе невозможно понять, оставаясь на позициях антропоцентризма. Нужно овладеть технологией переключения программы «охраны чужого в своем» на программу «отторжения чужого». А о том, что такое переключение, возможно, имеет место, свидетельствует тот факт, что по окончании физиологической беременности система иммунитета быстро переходит на обычный традиционный режим».

Многие идеи, высказанные Н. В. Васильевым, нашли практическое подтверждение в дальнейших исследованиях, результаты которых частично представлены в данной книге.

Человек продолжает жить, пока о нем помнят и живут его дела. Николай Владимирович писал: «Для человека главная память – это не мемориальный металлолом и не цветы возле могильной ограды, а продолжение начатой им работы». Будем считать его слова завещанием.

Академик РАН В. А. ЧЕРЕШНЕВ
д. м. н. С. Ю. РОДИОНОВ
д. м. н. Т. И. КОЛЯДА

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие 11
Список сокращений 13
Введение 16

ГЛАВА 1. Структура, синтез, биологическая роль альфа-фетопротеина в условиях физиологической нормы и при патологии, перспективы использования в клинической практике

1.1. История открытия альфа-фетопротеина 20
1.2. Локализация, структура и механизмы синтеза АФП 20
1.3. Соматический эмбриогенез как возможная основа злокачественного роста и противоречия иммунитета 32
1.4. Свойства АФП в условиях нормы и патологии 40
1.5. Идентификация, эктопический синтез АФП, диагностические аспекты в норме и патологии 50
1.6. Клинико-экспериментальные подходы к использованию фетальных протеинов (АФП: генная терапия, апоптоз, иммунологическая толерантность и специфическая иммунотерапия) 58
1.7. Клинико-патогенетические аспекты применения АФП в комплексном лечении внутренних болезней, хирургической и онкологической патологии 68

ГЛАВА 2. Технологические аспекты выделения, очистки и производства лекарственных форм АФП

2.1. Способы выделения и очистки АФП 80
2.2. Контроль препарата АФП 99

ГЛАВА 3. Экспериментальное изучение влияния АФП на физиологические показатели в норме и на моделях патологических реакций

3.1. Первичная токсикологическая характеристика препарата АФП..... 106
3.2. Оценка местного раздражающего действия 107
3.3. Изучение острой токсичности препарата АФП 107
3.4. Токсикологическое изучение препарата АФП при подкожном введении на обезьянах 109
3.5. Изучение токсичности лекарственной формы препарата АФП в хроническом эксперименте на кроликах 115
3.6. Влияние препарата АФП на физиологические показатели крыс 129
3.7. Оценка влияния компонентов препарата АФП на мышечную силу и выносливость мышей 134
3.8. Изучение аллергизирующего действия препарата АФП..... 135
3.9. Изучение мутагенности и потенциальной канцерогенности препарата АФП 137
3.10. Оценка способности препарата АФП индуцировать хромосомные аберрации в клетках костного мозга млекопитающих 141

3.11. Оценка способности препарата АФП индуцировать ДНК-повреждающее действие в SOS-хромотесте 142
3.12. Исследование субстанции и лекарственной формы АФП на моделях патологических реакций 143
3.13. Исследование противоопухолевой активности препарата АФП в опытах *in vitro* 146
3.14. Исследование противоопухолевой активности препарата АФП *in vivo* 150
3.15. Исследование радиопротекторных свойств альфа-фетопротеина 155

ГЛАВА 4. Изучение эффективности препарата АФП в практике комплексного лечения внутренних болезней, хирургической и онкологической патологии
4.1. Применение препарата АФП в комплексном лечении хронических неспецифических заболеваний легких 163
4.2. Применение АФП в комплексной терапии заболеваний печени (хронические гепатиты и цирроз) 216
4.3. Применение АФП в комплексной терапии пациентов с тиреоидитом Хашимото 223
4.4. Применение препарата АФП в комплексном лечении неспецифического язвенного колита и гранулематозного энтерита (болезнь Крона)..... 239
4.5. Применение препарата АФП в комплексной терапии хронической ишемии сосудов нижних конечностей (ХИНК) 245
4.6. Применение препарата АФП у пациентов с ожоговой болезнью 253
4.7. Применение АФП в лечении онкологических заболеваний 273

Заключение 289
Приложение 299
Список литературы 333

Если исследования по изучению белковой структуры молекулы альфа-фетопротеина в целом завершены, то так или иначе в области функций предстоит еще большая и не вполне предсказуемая работа.

Академик РАН
Гарри Израилевич Абелев

ПРЕДИСЛОВИЕ

Потребность в специфически направленной регуляции защитных функций иммунной системы имеется в различных областях медицины. Однако наибольшую актуальность такой подход имеет в тех случаях, когда заболевания сопровождаются аллергическими реакциями и аутоиммунной агрессией. Актуальным является поиск биологически активных веществ и создание на их основе лекарственных препаратов, оказывающих свое воздействие как через стимуляцию, так и через подавление иммунных реакций организма. Во всем мире, и особенно в нашей стране, в последние годы появляются препараты, действие которых направлено на стимуляцию иммунной системы или замещение тех или иных ее мессенджеров и функциональных молекул. К первым относятся полиоксидоний, миелопид, ликопид, иммунофан и ряд других; ко вторым – ронколейкин и другие цитокины, препараты интерферонов и иммуноглобулинов. Номенклатура же препаратов, угнетающих функцию иммунной системы, практически не меняется, по крайней мере последние 10 лет. Это все те же глюкокортикоидные гормоны, их синтетические аналоги и циклоспорин А. При этом лечение больных, страдающих различными атопическими, иммунокомплексными и особенно аутоиммунными заболеваниями, невозможно без лекарственных средств, подавляющих избыточную реактивность иммунной системы.

По данным отечественных и зарубежных исследователей, наибольший интерес в этом отношении вызывает фетальный белок альфа-фетопротеин, который является тонким регулятором гомеостаза в физиологических условиях и при развитии патологических процессов. Альфа-фетопротеин известен как белок, который вырабатывается гепатоцитами эмбриона и выполняет в том числе защитную функцию в системе «мать – плод» в раннем эмбриогенезе, предохраняя эмбрион от развития иммунологического конфликта. Синтез этого белка прекращается после рождения ребенка и возобновляется при возникновении гепатоцеллюлярного рака клетками, потерявшими способность к дифференцировке. В работах профессоров Ю. С. Татаринова и Г. И. Абелева показано диагностическое значение определения данного белка при гепатобластоме. Последний из авторов получил за эту работу Рокфеллеровскую премию.

В представленной книге в эксперименте и клинике впервые изучена эффективность лекарственной формы альфа-фетопротеина в терапии ряда аллергических и аутоиммунных заболеваний. Показана перспективность использования альфа-фетопротеина в лечении некоторых видов опухолевой патологии. Обсуждаются механизмы противоопу-

холевого действия препарата альфа-фетопротеина через возможность запуска механизмов апоптоза и блокирования феномена экранирования антигенных опухолевых детерминант.

Авторами впервые сделана попытка практического использования альфа-фетопротеина в качестве лекарственного средства. Предварительные положительные результаты лечения аллергических, аутоиммунных и некоторых опухолевых заболеваний заслуживают самого пристального внимания.

Академик РАН, РАМН, РАСХН,
д. м. н., профессор Р. В. ПЕТРОВ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

А/Г – альбумин-глобулиновый коэффициент
АЛТ – аланинаминотрансфераза
АОК – антителообразующая клетка
АСТ – аспартатаминотрансфераза
АФК – активные формы кислорода
АФП – альфа-фетопротеин
АФЦ – ацетилфтолилцеллюлоза
БА – бронхиальная астма
БАВ – биологически активные вещества
БСА – бычий сывороточный альбумин
БЦЖ – бацилла Кальметта – Гарена
ВИДС – вторичные иммунодефицитные состояния
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
ВФС – временная фармакопейная статья
ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа
ГФ – государственная фармакопея
ДАМ – дактиномицин
Е-РОК – клетки, образующие «розетки» с эритроцитами барана (общее число Т-лимфоцитов)
ЖЕЛ – жизненная емкость легких
ИРИ – иммунорегуляторный индекс
ИСЛК – индекс сдвига лейкоцитов крови
ИФА – иммуноферментный анализ
КВВ – конденсат выдыхаемого воздуха
КЛ – кардиолипин
КОЕ – колониеобразующая единица
КонА – конканавалин А
КРФ – креатинфосфатаза
КРФ НК – кислоторастворимая фракция нуклеиновых кислот
ЛДГ – лактатдегидрогеназа
ЛИ – лимфоцитарный индекс
ЛИИ – лейкоцитарный индекс интоксикации
ЛП – липопротеиды
ЛПНП – липопротеиды низкой плотности
ЛПОНП – липопротеиды очень низкой плотности
ЛПС – липополисахарид
ЛТ – лейкотриены
ЛФХ – лизофосфатидилхолин
МВЛ – максимальная вентиляция легких
МкАТ – моноклональные антитела
МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза
МОС – мгновенная объемная скорость потока на уровне выдоха
мРНК – матричная РНК
М-РОК – клетки, образующие «розетки» с эритроцитами (число незрелых В1-лимфоцитов)
МФ – макрофаги

НСТ-сп – спонтанный вариант теста
НСТ-ст – стимулированный зимозаном вариант теста
НСТ-ст / НСТ-сп – индекс стимуляции фагоцитов
НСТ-тест – тест с восстановлением нитросинего тетразолия фагоцитами
НФ – нейтрофилы
НЯК – неспецифический язвенный колит
ОАК – общий анализ крови
ОАТ – общая антитрипсиновая активность
$ОФВ_1$ – объем форсированного выдоха за 1 секунду
ОФЛ – общие фосфолипиды
ПАФ – полный адъювант Фрейнда
ПГ – простагландины ($ПГЕ_2$ – простагландин $Е_2$ и т. д.)
ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты
ППСК – полипотентная стволовая клетка (stem cell)
ПСВ – пиковая скорость выдоха
ПЦР – полимеразная цепная реакция
Ранние Е-РОК – активные Т-лимфоциты с повышенной аффинностью CD2-рецептора
РБТЛ – реакция бластной трансформации лимфоцитов
РГНТ – реакция гиперчувствительности немедленного типа
РТМЛ – реакция торможения миграции лейкоцитов
РЭА – раково-эмбриональный антиген
СКК – стволовые клетки костного мозга
СКЛ – смешанная культура лимфоцитов
СОД – супероксиддисмутаза
СОЭ – скорость оседания эритроцитов
СРБ – С-реактивный белок
СФМ – сфингомиелин
СХ – свободный холестерин
$Т_3$ – трийодтиронин
$Т_4$ – тироксин
ТГ – триглицериды
Теоф. резистентные – Т-лимфоциты, которые после инкубации с теофиллином сохраняют экспрессию CD2-рецептора
Теоф. чувствительные – Т-лимфоциты, которые после инкубации с теофиллином снижают экспрессию CD2-рецептора
Термостабильные – незрелые, а также активированные Т-лимфоциты с пониженной скоростью синтеза и сбрасывания CD2-молекулы и высокой ее аффинностью
ТПО – тиреопероксидаза
ТСК – тиосемикарбазид
ТСХ – тонкослойная хроматография
ТТГ – тиреотропный гормон
ФГА – фитогемагглютинин
ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких
ФР – физиологический раствор (0,9%-ный NaCl, pH = 7,4)
ФС – фармакопейная статья
ФСП – фармакопейная статья предприятия

ФХ – фосфатидилхолин
ФЭА – фосфатидилэтаноламин
ХАТ – хронический аутоиммунный тиреоидит
ХГЧ – хорионический гонадотропин человека
ХИНК – хроническая ишемия сосудов нижних конечностей
ХНЗЛ – хронические неспецифические заболевания легких
цАМФ – циклический аденозин-монофосфат
цГМФ – циклический гуанозин-монофосфат
ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы
ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты
ЧДД – частота дыхательных движений
ЩФ – щелочная фосфатаза
ЭБ – эритроциты барана
Э-ФГА – эритрофитогемагглютинация

CD – claster of determination
CD3 – маркер зрелых Т-лимфоцитов
CD4 – маркер Т-лимфоцитов, обладающих хелперной активностью
CD8 – маркер Т-лимфоцитов, обладающих супрессорной активностью
CD11 – α-субъединица β2-интегринов
CD16 – маркер натуральных киллеров
CD19 – маркер В-лимфоцитов
CD21 – маркер зрелых В-лимфоцитов
CD22 – маркер зрелых В-лимфоцитов
CD29 – β1-цепь интегринов, представленная на лейкоцитах
CD72 – маркер В-лимфоцитов
CD95 – маркер апоптоза
EGF – эпидермальный фактор роста
G-CSF – колониестимулирующий фактор гранулоцитов
GM-CSF – колониестимулирующий фактор гранулоцитов-макрофагов
Hb – гемоглобин
HLA-DR – общий маркер моноцитов, В-лимфоцитов и активированных Т-лимфоцитов
IFN-α, β, γ – интерферон-альфа, бета, гамма
IgA, E, G и т. д. – иммуноглобулины класса А, Е, G и т. д.
IGF – инсулиноподобный ростовой фактор
IL-1, 2, 3 и т.д. – интерлейкин 1, 2, 3 и т. д.
M-CSF – колониестимулирующий фактор макрофагов
MHC – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex)
NK – натуральные киллеры
sIgA – секреторная форма IgA
SOS-хромотест – тест на комплементарность повреждений ДНК
TGF – трансформирующий фактор роста
Th – CD4-позитивные клетки, обладающие хелперной активностью
TNF-α – фактор некроза опухолей альфа
Тк – CD8-позитивные Т-лимфоциты, обладающие киллерной активностью
Ts – CD8-позитивные Т-лимфоциты, обладающие супрессорной активностью

ВВЕДЕНИЕ

Успехи молекулярной биологии, генетики, иммунологии, биохимии, биофизики и других наук приводят к тому, что арсенал клинических возможностей для лечения различных, ранее считавшихся «бесперспективными» заболеваний с каждым днем возрастает. Вместе с тем наличие «информационной интервенции» в различных биологических и медицинских дисциплинах приводит к тому, что даже специалистам все труднее быть в курсе последних достижений современной науки. Например, ускорение процесса накопления новых фактов в иммунологии приводит к тому, что один иммунолог не всегда понимает другого, даже если они работают в смежных областях [250]. Подавляющее большинство фактов различные исследователи оценивают по-разному. Это закономерно для любой быстро развивающейся науки, где различия во мнениях специалистов – одна из движущих сил научно-технического прогресса, формирующегося по законам противоречий. Новое всегда находится в меньшинстве. Общепризнанное – это уже старое.

В последнее время многочисленные исследовательские коллективы иммунологов, молекулярных биологов, а также клиницистов оказались заинтересованы в поиске, создании и практическом использовании биологических соединений природного происхождения, обладающих свойствами регуляторов иммунитета и обменных процессов организма [233]. Это и предопределило широкий поиск биологически активных веществ, оказывающих свое воздействие как через стимуляцию, так и через подавление иммунных реакций. В связи с этим возникла потребность в создании препаратов, осуществляющих специфически направленную регуляцию иммунитета. Особенно актуально это в случаях профилактики и лечения заболеваний, протекающих с проявлением аутоиммунных и аллергических заболеваний. При этих состояниях необходимо проводить комплекс мероприятий по снижению интенсивности иммунного ответа на определенную группу аутоантигенов, стараясь по возможности не подавлять кроветворение и противоинфекционный иммунитет [235]. Подобной иммунорегулирующей активностью обладает сывороточный белок альфа-фетопротеин (АФП) [2, 3].

По своей структуре АФП является гликопротеином с молекулярной массой 69 кD, состоящим из одной полипептидной цепи, включающей около 600 аминокислот и содержащей примерно 4% углеводов. Он входит в состав генетического семейства альбуминоидов, расположенного у человека в 4-й хромосоме [2, 397, 505]. Молекула АФП содержит различные функциональные последовательности и сайты связывания [555]. Уникальной особенностью структуры АФП является наличие полипептидных мотивов, опосредующих адгезивные функции, что объединяет его с семейством протеинов экстрацеллюлярного матрикса – коллагеном, фибронектином, ламинином, витронектином, тромбоспондином и др., выполняющими ключевую роль в эмбриогенезе.

В то время как изучение структуры АФП, по-видимому, завершено [397], этого нельзя сказать об изучении биологических свойств АФП. По данным, приведенным в монографиях Н. Н. Кеворкова с соавторами [110], С. В. Ширшева [253], К. В. Шмагеля и В. А. Черешнева [257], АФП является тонким регулятором гомеостаза в физиологических условиях и при развитии патологических процессов. АФП связывает и переносит такие лиганды, как билирубин, жирные кислоты, стероиды, ретиноиды, флавоноиды, фитоэстрогены, красители, тяжелые металлы, диоксин, а также различные лекарственные препараты [104, 138, 197, 220, 554].

Эффекты АФП реализуются на уровне комплексной регуляции процессов клеточной пролиферации, включения механизмов апоптоза, обеспечения клетки энергетическим и

пластическим материалом, индукции регуляторных сигналов через усиление экспрессии рецепторов и обеспечения синтеза простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов, взаимодействия со структурами экстрацеллюлярного матрикса, иммуномодулирующих эффектов [57, 58, 255–257, 352, 433, 497, 647]. АФП обладает исключительно высоким сродством к полиненасыщенным жирным кислотам и простагландинам [276, 335, 579, 702], вследствие чего участвует в регуляции синтеза $ПГЕ_2$ [285].

Экспериментальные исследования свидетельствуют об иммуносупрессорной активности этого белка [2, 251, 255, 256, 333, 372, 554, 556, 563]. В частности, АФП подавляет синтез антител и созревание цитотоксических Т-лимфоцитов [601]; снижает пролиферативный ответ лимфоцитов на митоген [344]; повышает активность специфических Т-супрессоров [564, 688]; снижает активность натуральных киллеров [317]; угнетает фагоцитарную активность макрофагов [591] и уменьшает продукцию активированными моноцитами TNF-α и IL-1 [714]. Обнаруженную способность АФП снижать реакции клеточно-опосредованного иммунного ответа *in vitro* уже успешно использовали для предотвращения развития аутоиммунных процессов у иммунодефицитной линии мышей New-Zeland [393]. Отмечается регулирующая роль альфа-фетопротеина в метаболизме стероидных гормонов; его способность блокировать связывание антител с ацетилхолиновым рецептором и клетками щитовидной железы, что препятствовало развитию экспериментального аутоиммунного тиреоидита и *miastenia gravis* [307, 537].

Приведенные данные характеризуют АФП как белок с выраженными иммуносупрессорными свойствами, которые целесообразно использовать для лечения аллергических и аутоиммунных заболеваний.

В постановлениях IV и V Всероссийских съездов онкологов было определено, что одним из перспективных научных направлений в онкологии является поиск веществ, обладающих апоптотическим действием в отношении опухолевой клетки.

Экспериментально показано, что АФП может связывать цитоплазматические белки, которые в норме доставляют ядерные факторы или транскрипционные кофакторы к поверхности органелл клеток. Этим подтверждается тесная связь АФП с клеточной пролиферацией и дифференцировкой [454]. Работая как транспортный белок, АФП способен направленно доставлять регуляторные сигналы в клетки, имеющие рецепторы к нему, усиливая информационный контроль за правильностью реализации генетической программы пролиферирующих клеток и в значительной мере влияя на уровень их функциональной активности [554].

Исследованиями Ю. Л. Волянского с соавторами (1994) [57]; E. Dudich et al. (1999, 2000) [352, 353]; Koide N. et al. (1999) [484] показано, что обработка опухолевых клеток человеческим АФП *in vitro* приводит к значительному торможению роста клеток с морфологическими изменениями, характерными для апоптоза. Более того, обнаружено, что предварительное введение АФП высокораковой линии мышей (карцинома молочных желез) в опытной группе более чем на 60% тормозит образование опухоли [44]. Это объясняется тем, что под влиянием АФП происходит снятие широко известного феномена иммунологического усиления (enhancing-effect) роста опухоли [196], а также активация механизмов апоптоза [104]. В то же время, являясь транспортным белком, АФП способен адресно доставлять к очагам опухолевого роста противоопухолевые химиопрепараты, искусственно с ним связанные [85, 122, 138].

Следует отметить, что АФП блокирует синтез эстрогенов [22, 101], что также позволяет использовать его в качестве средства профилактики и лечения мастопатий и злока-

чественных опухолей молочных желез (гормонозависимые механизмы стимуляции пролиферативных реакций).

Таким образом, анализ литературных данных свидетельствует об исключительной перспективности использования АФП для профилактики и лечения аллергических, аутоиммунных и опухолевых заболеваний. Актуальность изучения АФП на настоящем этапе развития знаний об этом белке сформулирована академиком Г. И. Абелевым: «Если исследования по изучению белковой структуры молекулы альфа-фетопротеина в целом завершены, то так или иначе в области функции АФП предстоит еще большая и не вполне предсказуемая работа. Проблема рецептора АФП представляется наиболее важной для понимания любых функций АФП, включая транспортную и иммуносупрессорную» [2].

В данной монографии приведены результаты масштабных исследований терапевтической эффективности нового препарата на основе человеческого АФП. Изначально препарат был разработан в рамках темы 82/1 ГКНТ РФ «Создание новых лекарственных средств методами химического и биологического синтеза» и разрешен к применению ГФК РФ (решение от 27.02.1997 г.) под названием «Альфетин» (приказ МЗ РФ № 129 от 15.09.1999 г.). Однако в дальнейшем, в связи с новыми положениями ВОЗ от 26.11.2001 г., касающимися вирусологической безопасности продуктов плазмы крови человека, был создан более технологически совершенный препарат АФП «Профеталь» (решение комитета МИБП МЗ РФ, протокол № 5 от 26.06.2003 г.). Исследования проведены с использованием обоих препаратов.

ГЛАВА 1

Структура, синтез, биологическая роль альфа-фетопротеина в условиях физиологической нормы и при патологии, перспективы использования в клинической практике

1.1. ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА

АФП был открыт в 1944 году, на заре исследования белков, когда шведский биохимик Педерсен обнаружил в сыворотке крови телят массивную белковую фракцию, полностью отсутствующую в крови взрослых животных. Белок был назван фетуином (от лат. *fetus* – плод). Продолжая эти исследования, С. Бергстранд и В. Цар в 1956 и 1957 годах, сравнивая составы сыворотки крови человеческого плода и взрослых людей, нашли белковую фракцию, специфичную для эмбриональной сыворотки, и назвали ее α-фетопротеином (т. е. белком плода). Предполагалось, что это человеческий аналог телячьего фетуина. Впоследствии выяснилось, что это совершенно различные белки [2]. Поскольку АФП обнаруживался только у эмбриона, можно было думать, что он синтезируется в плаценте, которая после родов упраздняется вместе со специфическими белками, ею синтезируемыми [2, 3, 4].

В середине 50-х годов Грабар, Буртен и Зелинман из Института Пастера в Париже и группа ученых под руководством Г. И. Абелева из лаборатории Л. А. Зильбера в Москве активно разрабатывали методологические подходы сравнительного анализа нормальных и опухолевых тканей с использованием иммунохимических методов [269]. В результате этих исследований был обнаружен специфический антиген, присутствовавший в гепатоме и отсутствовавший в нормальной печени человека и взрослых мышей [270]. В ходе другого исследования этот антиген был обнаружен в мышином эмбрионе, где присутствовал не только в печени, но и во всех органах плода. Стало понятно, что данное вещество является основным компонентом эмбриональной сыворотки – эмбриональным сывороточным глобулином.

Было показано, что тканевые культуры мышиной гепатомы синтезируют и секретируют в среду этот белок, позже названный альфа-фетопротеином. АФП, продуцируемый плодом и мышиными гепатомами в тканевой культуре, был идентичен. Тогда же было обнаружено, что продукция АФП временно возобновляется после частичной гепатэктомии [269]. На этом основании было высказано предположение о том, что синтез данного белка связан с активной пролиферацией клеток печени любого генеза и вряд ли сможет быть использован в качестве специфического маркера злокачественных новообразований этого органа.

1.2. ЛОКАЛИЗАЦИЯ, СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМЫ СИНТЕЗА АФП

В начале 70-х годов было предложено несколько методов эффективной очистки АФП: А. И. Гусевым с соавторами [78], а также S. Nishi в Японии [574], E. Alpert et al. в США [279], E. Ruoslahti et al. в Финляндии [620]. Это привело к быстрому прогрессу в изучении структуры АФП, его физико-химических свойств, состава и гетерогенности.

АФП – гликопротеин с молекулярной массой 69–70 kD, состоящий из одной полипептидной цепи, включающей 600 аминокислот и содержащей около 4% углеводов. По структуре и физико-химическим свойствам АФП близок к основному белку сыворотки крови взрослых особей – сывороточному альбумину; до 38% молекулы АФП идентично молекуле сывороточного альбумина [397].

АФП входит в состав генетического семейства альбуминоидов, расположенного у человека в 4-й хромосоме. Известны 4 продукта этого семейства: альбумин, АФП, витамин D-связывающий протеин и афамин (α-альбумин). Общность их белковой структуры характеризуется наличием 3 доменов, образованных петлеобразными кластерами, стабилизированными дисульфидными связями через остатки цистеина [257].

Молекула АФП содержит различные функциональные последовательности и сайты связывания:

- актинсвязывающий сайт (II домен);
- апоптозиндуцирующие последовательности (I, III домены);
- билирубинсвязывающий сайт (II домен);
- эстрогенсвязывающий сайт (II домен);
- сегмент, подобный EGF (I домен);
- сайты, связывающие свободные жирные кислоты (I, II, III домены);
- пептид, ингибирующий рост (III домен);
- сегмент, подобный антигенам гистосовместимости II класса (III домен);
- инсулиноподобный сегмент (I домен);
- кинезиноподобные сегменты (I, II, III домены);
- ламининоподобные сегменты (II домен);
- сегмент, подобный казеину молока (II домен);
- плазминогенактивирующий сайт (III домен);
- сайт связывания с АФП-рецептором (III домен).

Уникальной особенностью структуры АФП является наличие полипептидных мотивов, опосредующих адгезивные функции. Это свойство объединяет АФП с семейством протеинов экстрацеллюлярного матрикса – коллагеном, фибронектином, ламинином, витронектином, тромбоспондином и др., выполняющими ключевую роль в эмбриогенезе [257].

АФП является физиологическим продуктом желточного мешка, печени и желудочно-кишечного тракта плода. С помощью моноклональных антител (МкАТ) на молекуле АФП идентифицируется от 3 до 8 различных эпитопов, причем только 2 из них являются видоспецифическими, остальные имеют перекрест с аналогами АФП одного или нескольких видов животных (мыши, крысы, телята, свиньи, собаки, кошки). АФП представляет собой гликозилированный белок, причем гликозидная часть имеет непостоянную структуру и состав. При определенных физиологических и патологических состояниях антигенная и гликозидная гетерогенность АФП начинает проявляться особенно ярко. Так, сывороточный АФП при хроническом гепатите содержит 4–6% фракции АФП с моносиаловым остатком, а АФП из крови больных гепатоцеллюлярной карциномой – до 30%. Очевидно, особенности метаболизма разных по происхождению клеток обусловливают различное представление ими структурных эпитопов АФП. По присутствию фракций АФП с определенными антигенными или биохимическими характеристиками можно четко выделить ряд онкологических заболеваний [2, 3, 499].

K. Taketa et al. [675] из Университета Окаямы (Япония) в 1993 г. методом перекрестной эритрофитогемагглютинации (Э-ФГА) изучили качественный состав человеческого АФП, выделенного из крови пуповины. При анализе его углеводных структур методом перекрестного электрофореза с Э-ФГА, объединенного с продленным электрофорезом на геле агарозы или с электрофорезом сродства с конканавалином и лектином, было выявлено от 2 до 6 изоформ АФП.

G. J. Mizejewski в 2001 г. [555] в исследовании «Структура и функция альфа-фетопротеина: соотношение изоформ, эпитопов и конформационных вариантов» классифицирует АФП как структуру белкового суперсемейства, состоящего из белка АФП, витамина D и β-альбумина. О молекулярных вариантах АФП много сообщалось в биомедицинской литературе. Предшествующие исследования идентифицировали изоэлек-

трические pH-изоформы и лектин-аггрегирующие варианты АФП, которые отличались по физико-химическим свойствам, но не по аминокислотному составу. Генетические варианты АФП, отличающиеся по длине мРНК, позже были экстенсивно описаны у грызунов при развитии плодных/перинатальных стадий онтогенеза, онкогенеза и регенерации органов.

С появлением МкАТ в 1980 г. были обнаружены и охарактеризованы множественные антигенные детерминанты в нативном АФП. Установлено, что белки, являющиеся производными АФП, ингибировали некоторые аутоиммунные реакции.

Как только аминокислотный состав молекулы АФП человека и грызунов стал известен, появилась возможность идентификации ферментативных фрагментов, что позволило начать синтез и исследования ее синтетических пептидных сегментов. Открытие и описание пространственной конфигурации самой молекулы АФП в 1981 г. и ее переходных форм позволило начать изучение физиологической функции белка в свете его потенциальной биологической роли.

В лаборатории иммунохимии Института онкогенеза ОНЦ РАМН под руководством Г. И. Абелева была изучена структура эпитопов человеческого АФП с использованием более чем 50 различных МкАТ, полученных из разных лабораторий мира. Иммуноаффинной электрохроматографией на мембранах из нитроцеллюлозы были проанализированы комплексы АФП с антителами, где установлены пять типов взаимодействий: 1) завершенная нейтрализация; 2) частичная нейтрализация; 3) однонаправленная нейтрализация; 4) увеличенное закрепление; 5) несостоятельность взаимодействия. Выявлены 23 различных эпитопа в молекуле АФП. На основе полученных результатов характеристика каждого эпитопа АФП была представлена восемью участками в виде блоков (узлов), местоположение которых рассматривалось относительно конформационного состояния молекулы АФП [726].

Y. Fujii et al. в 1993 г. [384] при помощи продленного электрофореза на геле агарозы проанализировали АФП, полученный из крови пуповины и от пациентов с гепатитом, циррозом, гепатоцеллюлярным раком, желудочно-кишечными опухолями и опухолью желточного мешка. Было зарегистрировано несколько вариантов изучаемого белка по структуре полисахаридных цепей.

При сравнительном изучении полисахаридных цепей человеческого АФП, выделенного из амниотической жидкости или пуповинной крови, и серологического АФП, N. Kawahara et al. [469] пришли к заключению об идентичности структур белка, полученного из разных источников. Исследованию структуры полисахаридных последовательностей АФП посвящена работа L. M. Wright et al. [723]. K. Taketa et al. [674] сообщают о том, что химическая реактогенность различных изоформ АФП зависит от количества остатков галактозы.

О различии изоформ человеческого АФП, выделенного из пуповинной крови и сыворотки больных различными неонкологическими заболеваниями печени, а также при гепатоцеллюлярном раке сообщают независимые исследователи [461, 550, 566, 645, 673]. Все изученные изоформы АФП отличались полисахаридными последовательностями [730].

При биохимическом сравнении бычьего сывороточного и человеческого АФП, выделенного из пуповинной крови, установлено, что молекулярная масса бычьего АФП составляет 81 kD, человеческого – 69 kD. Были обнаружены, по крайней мере, 7 изоформ бычьего и 3 изоформы человеческого АФП. Они имели 50–98%-ную гомологичность структуры [427].

Однако при изучении химической структуры сахарных цепей человеческого АФП, полученного от пациентов, страдающих гепатоцеллюлярным раком и раком желчного пузыря, полисахаридные последовательности в обоих случаях совпали, что может свидетельствовать о способности АФП образовывать одинаковые углеводные связи в случае одной органной локализации злокачественного процесса [282]. Углеводная структура гликопротеидов, в частности АФП, является, как полагают, тканеспецифичной. Однако в доступной литературе до последнего времени не было никаких отчетов относительно различий углеводных структур альфа-фетопротеина, произведенного гистологически идентичными опухолями в различных тканях. Электрофорез АФП гепатоидных аденокарцином и опухолей желточного мешка из различных органов выявил гетерогенность их полисахаридных цепочек [729]. Влияние полисахаридного лиганда на структурные свойства и конформационную стабильность человеческого АФП и его гомолог, человеческий сывороточный альбумин, было продемонстрировано В. Н. Юверским с соавторами [267]. Показано, что денатурация АФП, вызванная повышением температуры или гипертоническим раствором, необратима. Установлено, что это связано с отделением лиганда от молекулы АФП. Форма АФП без полисахаридной основы не имеет твердой третичной структуры, но показывает реальную вторичную структуру и высокую уплотненность. Это означает, что твердая третичная структура АФП косвенно управляется лигандами, в то время как их отделение приводит к образованию очень устойчивого («литого, подобного сфере») промежуточного звена. Напротив, процессы денатурации альбумина полностью реверсивны. Отделение лигандов от альбумина заканчивается только уменьшением в стабильности, но не переходом в устойчивое сферическое состояние. Аналогичные результаты были получены H. Ishikawa et al. [448, 449] и H. Mazume et al. в 1999 г. [539] при изучении механизма денатурации альбумина и АФП.

В норме АФП может обнаруживаться в сыворотке плода начиная с 4-й недели беременности. Его концентрация достигает пика между 12-й и 16-й неделями и затем постепенно снижается вплоть до рождения. В возрасте 1 года нормальный уровень АФП в сыворотке такой же, как у взрослых, т. е. менее 15 нг/мл [212]. У взрослых людей АФП был обнаружен при исследовании нормальной печеночной ткани методом иммуноблоттинга [641], а также в фолликулярной жидкости [458]. Так как АФП проникает через плаценту, он может обнаруживаться в довольно высокой концентрации в сыворотке крови матери, достигая максимума между 32-й и 36-й неделями беременности. Это служит важным показателем при мониторинге антенатального периода.

При изучении уровней и мест локализации АФП в крови и различных органах у плода человека 14–33-недельного срока развития и новорожденных установлено, что АФП присутствует во всех органах и тканях первых, а также в сыворотке крови новорожденных детей. С увеличением сроков беременности и у детей в раннем послеродовом периоде уровень АФП падает [383].

Исследование количественного содержания АФП в амниотической жидкости и в сыворотке крови у женщин с нормально протекающей 16–18-недельной беременностью выявило резкое снижение уровня амниотического АФП в зависимости от увеличения срока беременности, что свидетельствует об отсутствии диффузии этого белка через плодную оболочку в поздние сроки развития плода [437].

Регуляция синтеза АФП – наиболее интересное и многообещающее направление в исследовании онтогенеза и причин возобновления синтеза АФП в опухолях [2]. В этой связи были высказаны три гипотезы.

Первая – синтез АФП связан с определенной стадией клеточного цикла гепатоцита, например с поздней G1- или S-фазой. Таким образом, пролиферация нормальных или злокачественно перерожденных гепатоцитов должна сопровождаться синтезом АФП.

Вторая – АФП является эмбриоспецифическим антигеном гепатоцитов, и его синтез полностью или почти полностью подавляется в зрелых клетках. Регенерация печени ведет к временной, тогда как злокачественные новообразования – к постоянной «дедифференцировке» гепатоцитов до АФП-синтезирующей стадии [700, 701]. В связи с этим следует отметить, что регенерация печени у человека сопровождается гораздо более низкими уровнями АФП, чем у мышей, в то время как человеческие гепатоцеллюлярные карциномы носят более злокачественный характер и среди них АФП-положительные встречаются в 2–3 раза чаще, чем среди более доброкачественных опухолей печени у мышей. Это довольно редкий случай, при котором клиническая ситуация более благоприятна для исследователя, чем ситуация в экспериментальной модели.

Также была предложена гипотеза, что АФП продуцируется дифференцированными клетками, возникшими из эмбриональных клеток-предшественников и функционирующими лишь в эмбриогенезе. Стволовые клетки опухолей, согласно этой гипотезе, сохраняют, по крайней мере частично, способность дифференцироваться в эмбриоспецифические, где их последующие взаимодействия, очевидно, ответственны за подавление синтеза АФП во взрослой печени [399]. Из этой гипотезы следует, что полная диссоциация печени на единичные клетки должна привести к реэкспрессии синтеза АФП во всех гепатоцитах. Действительно, первичные культуры гепатоцитов взрослых крыс обнаруживали четкую, хотя и слабовыраженную индукцию реэкспрессии АФП [509]. Гораздо более сильная индукция наблюдалась в культурах гепатоцитов мышей, полученных B. de Nechaud et al. [348]. А. С. Глейберман [64] подтвердил и расширил эти данные. После перфузии печени раствором коллагеназы и эксплантации в культуру гепатоциты, начиная со второго дня, возобновляли активный синтез АФП: подавляющее большинство гепатоцитов обнаруживало АФП-положительное иммунопероксидазное окрашивание.

Рост клеточной популяции гепатоцитов в присутствии сульфата декстрана приводил к сильному и избирательному подавлению синтеза АФП [65]. Этот эффект был четко ассоциирован с возрастающей клеточной плотностью культур и формированием структур, подобных печеночным балкам.

A. S. Gleiberman et al. в 1989 г. [400, 401] при помощи ротации чашек Петри с суспензией клеток получили культуры с плотным монослоем клеток в центре и с редкими клетками по периферии. Исследователями был обнаружен «градиент» синтеза АФП: от АФП-положительных клеток на периферии до АФП-отрицательных в плотном слое клеток в центре чашек.

Стало очевидно, что клеточные контакты подавляли синтез АФП. За этот эффект могли отвечать различные факторы: формирование щелевых контактов между клетками, контакт мембранных рецепторов с внеклеточным матриксом или форма индивидуальных клеток. Оказалось, что все три компонента вовлечены в этот процесс. Так, установлена обратная связь между формированием щелевых контактов и синтезом АФП во время образования монослоя гепатоцитов. Та же закономерность проявлялась в одной и той же чашке – в плотной центральной части монослоя по сравнению с единичными клетками на периферии. Более того, когда клетки мышиной печени выращивались в трехмерном коллагеновом геле, они сохраняли характерную для них кубоидальную форму и нормальные размеры, формировали островковую и балочную структуры, объединенные щелевыми контактами. Кроме того, они образовывали типичные желч-

ные капилляры, экспрессирующие соответствующие маркерные антигены, и совсем не продуцировали АФП [401].

Следующий шаг в анализе регуляции АФП был направлен уже на биологию клетки, где прежде всего необходимо было установить, какие события ведут ко включению или выключению гена АФП. Один из главных механизмов регуляции тканеспецифических генов, в числе которых находится и ген АФП, основан на межклеточных взаимодействиях.

В лаборатории Г. И. Абелева при изучении затухания синтеза АФП в первые недели после рождения мышей обнаружено, что оно сопровождает строительство печеночных балок – характерных гистологических структур печени взрослых особей. Разрушение балок при отравлении печени (например, четыреххлористым углеродом) вело к реэкспрессии синтеза АФП в клетках именно тех участков печени, где балка была разрушена. Отсюда ясно следовало, что угасание синтеза АФП в зрелых гепатоцитах обратимо и контролируется клеточными взаимодействиями в печеночной балке (рис. 1.2.3).

Если главное в контроле работы гена АФП – межклеточные или клеточно-матриксные взаимодействия, то диссоциация взрослой печени на отдельные гепатоциты должна привести к возобновлению работы этого гена, что и происходит в действительности. Перфузия печени раствором протеолитического фермента, разрушающего межклеточный белковый матрикс, и помещение гепатоцитов в питательную среду вне организма привели к возобновлению синтеза АФП почти во всех клетках (рис. 1.2.2а). А заключение их в простой по составу, но обязательно трехмерный внеклеточный матрикс или совместное культивирование с клетками, строящими такой матрикс вокруг клеток печени, восстанавливало клеточные структуры, типичные для взрослой печени, в которых к тому же полностью подавлялся синтез АФП (рис. 1.2.2б). Таким образом, клеточно-матриксные отношения вели к подавлению активности гена АФП, которое происходило наряду с восстановлением формы клеток и специфических межклеточных контактов между соседними клетками печени.

Ген АФП, нормально выраженный в плодной печени, трансгенно отключен во взрослой ткани, однако может быть активизирован вирусом герпеса [528]. При изучении поврежденной (GalN) печени крысы установлено, что восстановление гепатоцитов и непаренхиматозных эпителиоцитов происходит в результате экспрессии мРНК АФП в интервале 2–5 суток, когда интенсивно происходит пролиферация регенерирующих (эмбрионализированных) гепатоцитов, сопровождающаяся активным синтезом АФП. После дифференцировки гепатоцитов синтез АФП прекращается. Эти результаты указывают, что после GalN-повреждения печень отвечает активацией клеток-предшественников, которые распространяются и затем дифференцируются в зрелые гепатоциты [345]. Эти исследования сходны с результатами изучения регенерации печени крыс при А-витаминной недостаточности, когда после резекции участка печени регистрируется резкое повышение уровня мРНК АФП [439].

N. L. Lazarevich [505] в своей работе «Молекулярные механизмы экспрессии гена альфа-фетопротеина» подробно рассматривает ситуации синтеза АФП в постнатальном развитии организма, которые возникают при опухолевом процессе в печени и герминомных тератобластомах, в меньшей степени после химических и механических повреждений печени, сопровождаемых регенерацией (в частности, при остром вирусном гепатите). На различных моделях показано, что экспрессия регулируется главным образом на уровне транскрипции гена АФП. Известно, что в регулирующей области этого гена имеется тканеспецифический промотор, три независимых энхансера, ядерный фактор гепатоцита (HNFs) и специфический супрессор, которые определяют функциональный статус гена АФП. Однако механизмы, отвечающие за изменение уровня синтеза АФП в ходе онтоге-

неза и онкогенеза, остаются не вполне определенными. Исследованиями отдела лекарств медицинской школы Университета Нагасаки установлено, что обработка клеток гепатомы человека *in vitro* бутиратом натрия ведет к переключению гена-продуцента альбумина на синтез АФП, причем переход на синтез АФП тормозит образование РНК в клетках гепатомы [697].

Таким образом, регуляция синтеза АФП осуществляется на генетическом уровне. Регуляторный район гена АФП занимает протяженный участок в 7 тысяч пар нуклеотидов (7 кВ), и его структура отражает специфику регуляции гена, то есть его экспрессию только в определенных тканях. Тканеспецифическая экспрессия гена АФП определяется наличием трех энхансеров – коротких участков ДНК, расположенных в отдалении от промотора, участка гена, с которого начинается его транскрипция (рис. 1.2.1). Взаимодействие энхансеров со специфическими ядерными факторами (трансфакторами) в сотни раз увеличивает интенсивность транскрипции и тем самым определяет тканевую специфичность экспрессии этого гена. Установлено, что экспрессия гена АФП регулируется на тканевом уровне и может быть ограничена производными энтодермальных клеток (контактное ингибирование). Исследование на собранных матрицах ДНК *in vitro* показало, что составляющие хроматина определяют экспрессию/репрессию гепатоцитами гена АФП. Реэкспрессия гена АФП в клетках печени осуществляется при участии ядерного фактора 3 [339]. Известно также, что репрессия гена АФП в печени после рождения осуществляется при участии так называемого регулятора альфа-фетопротеина 1 (Afr1) [603]. Специфические для экспрессии АФП трансфакторы имеются только в печени и желточном мешке – в органах, где АФП синтезируется. Эффективное выключение гена АФП определяется другим участком ДНК – сайленсером, расположенным в начальном районе промотора. Взаимодействие соответствующего негативного трансфактора с сайленсером ведет к полному и немедленному прекращению транскрипции гена АФП.

Благодаря проведенным исследованиям структура гена АФП у крыс, мышей и человека, а также регуляторные районы этих генов известны. В эмбриогенезе и канцерогенезе не происходит каких-либо реорганизаций этого гена, а регуляция его экспрессии имеет место на транскрипционном уровне. На фланкирующем участке выше гена АФП обнаружены три регуляторных сайта. Два из них ведут себя как типичные энхансеры, и для их работы требуется присутствие ядерных тканеспецифических факторов. Третий, находящийся в районе промотора, нуждается в репрессоре – специфическом факторе, который выключает транскрипцию гена АФП в зрелом гепатоците. Интересно, что в этом районе также присутствуют последовательности, чувствительные к ингибирующему действию глюкокортикоидного рецептора. Исследованиями отдела биохимии и генетики Техасского медицинского университета установлено, что в условиях *in vitro* и *in vivo* в клетках плодной печени мышей дексаметазон тормозит синтез мРНК АФП-пула [610, 611]. В то же время обработка клеток $HepG_2$ гидрокортизоном *in vitro* приводила к увеличенной экспрессии рецепторов глюкокортикоида и повышала продукцию АФП [524].

Достаточно изучен механизм экспрессии/депрессии гена АФП в ДНК клеток плодной печени крыс *in vitro* [299, 598, 638]. В частности, показано, что дискретная активация регуляторного домена происходит при непосредственном участии глюкокортикоидных гормонов, что лишний раз подчеркивает взаимосвязь метаболизма АФП и стероидов [412].

(цит. по Г. И. Абелеву)

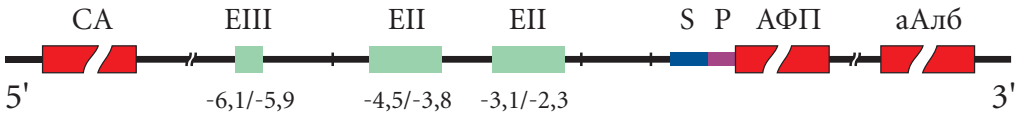


Рис. 1.2.1. **Схема регуляторного района гена АФП и расположения соседних генов:**
СА, АФП, аАлб – гены сывороточного альбумина, АФП и α-альбумина; EI–EIII – энхансеры I, II, III; S – район сайленсера; P – район промотора. Цифры – расстояние от начала гена АФП в тысячах пар оснований; 5', 3' – начало и конец соответствующих генов.

а **б**

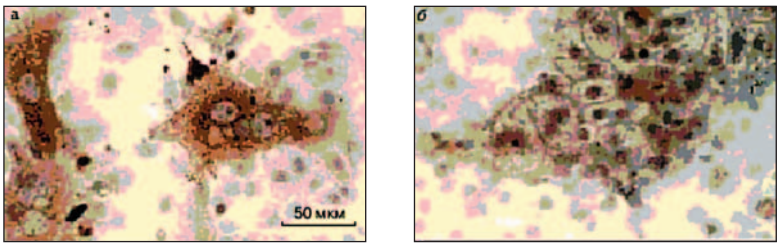


Рис. 1.2.2. **Реэкспрессия АФП в зрелых гепатоцитах и ее подавление в органоспецифических островках:**
а – культура зрелых гепатоцитов мыши вне организма. Коричневая окраска: АФП, выявленный иммуноэнзиматическим методом; б – органотипический островок гепатоцитов в смешанной культуре с клетками, образующими матрикс. Окраска как в (а), АФП отсутствует (препарат Е. И. Кудрявцевой)

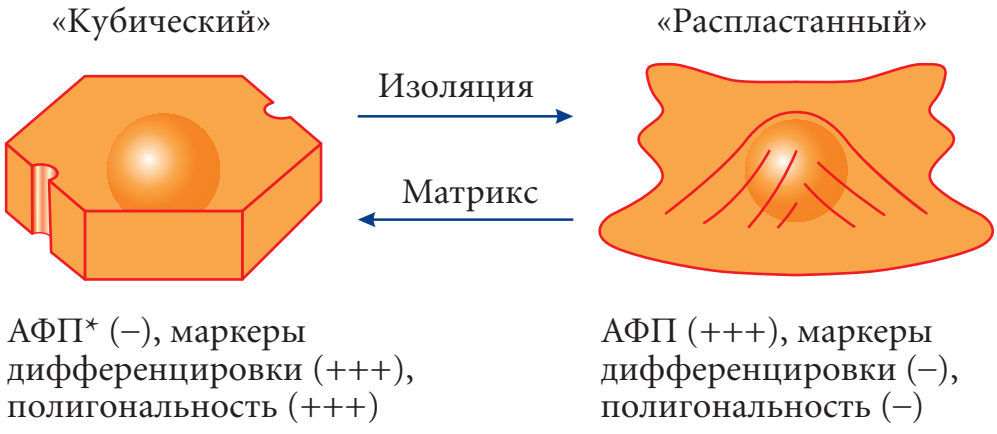


Рис. 1.2.3. **Два состояния зрелого гепатоцита**
*АФП(+/–) – экспрессия/подавление гена АФП

При изучении образцов нормальной печеночной ткани и биоптатов гепатоцеллюлярной карциномы учеными из отдела патологии Нью-Йоркского медицинского университета установлено участие белка p53 в синтезе АФП гепатоцитами и клетками гепатоцеллюлярной карциномы. Белок p53 является репрессором синтеза АФП [355, 508, 584, 607]. Ядерные белки, связанные с энхансерами и сайленсерами, изучаются весьма интенсивно, и уже идентифицирован один такой белок. Предполагается, что для этой цели могли бы быть полезны варианты гепатомы Morris 7777 [265]. Это клональные варианты, селекционированные *in vitro*, различающиеся лишь способностью продуцировать АФП. Синтез других белков, специфичных для печени, в них не меняется. Более того, различия между клонами объясняются изменениями в регуляции, но не в структуре АФП-гена. И наконец, эти различия связаны с эпигенетическими механизмами, а не с мутацией. Таким образом, использование клонов в трансфекционном тесте и в качестве источника для идентификации регуляторных белков является, по-видимому, многообещающим.

Наибольшую трудность в этой области составляет разработка системы *in vitro* для оценки стадиеспецифического фактора, участвующего в регуляции АФП-гена. Культура гепатоцитов с контролируемой продукцией АФП, связанной с межклеточными взаимодействиями, представляется наиболее простой и вполне адекватной моделью для изучения онтогенетической регуляции гена АФП *in vitro*. Описанная система позволяет идентифицировать трансфакторы в сочетании с регуляторными элементами АФП-гена, а также факторы, определяющие специфическую картину хроматиновой структуры в этом районе.

Введение в гепатоцит гена АФП (трансгенные животные), содержащего соответствующие энхансеры, но лишенного сайленсера, приводит к неугасающей тканеспецифической работе гена как в период эмбрионального развития, так и во взрослом организме. Отсюда ясно, что в печени специфические для экспрессии гена АФП трансфакторы присутствуют с самого возникновения этого органа и сохраняются в зрелых, полностью дифференцированных клетках. В то же время негативный фактор появляется только на более поздних стадиях развития, обычно после рождения.

Положительные трансфакторы гепатоцита, активирующие энхансеры, образуют семейство, многие члены которого идентифицированы и в большей или меньшей степени изучены. Негативные же трансфакторы изучены значительно меньше, неясны ни их природа, ни механизм действия.

«Энхансерно-сайленсерная» регуляция гена, по-видимому, универсальный механизм тканеспецифической экспрессии генов, т. е. избирательной активации набора генов, характерного для той или иной ткани. Известно, что в основе этого механизма лежат другие, не менее загадочные процессы, такие как определение синтеза тканеспецифического набора трансфакторов и доступность тканеспецифических энхансеров и промоторов, плотно упакованных в хромосоме, соответствующим трансфакторам. Ясно, что при закладке определенной ткани гены, определяющие ее физиологию, обнажаются, становятся доступными трансфакторам и ферменту, синтезирующему мРНК по матрице ДНК [2].

При изучении смешанной культуры клеток печени обнаружено, что гепатоциты крыс с эпителиальными клетками печени негепатоцитарного происхождения сохраняют свое дифференцированное состояние и функции. В это время гепатоциты активно продуцировали АФП и в них отсутствовал антиген желчных капилляров. В дальнейшем, однако, гепатоциты собирались в островки, становились кубоидальными, формировали

желчные протоки и «устанавливали» щелевые контакты. Следует подчеркнуть, что островки гепатоцитов были всегда окружены внеклеточным матриксом и как бы погружались в него. В таких островках синтез АФП полностью подавлялся. Таким образом, здесь наблюдалась та же ситуация: гепатоциты, объединенные в структуры, подобные балкам печени, прекращают продукцию АФП [400].

Другое важное наблюдение сделано T. Kitagawa [480] и T. Onoe [594]. Они установили, что существует четкая корреляция между продукцией АФП в острой фазе канцерогенеза у крыс и пролиферацией так называемых овальных клеток, которая «вспыхивает» в печени на ранней стадии действия канцерогена. Овальные клетки считаются предшественниками гепатоцитов. S. Sell [644] показал с помощью иммунофлуоресценции наличие АФП в овальных клетках. Таким образом, установлено, что синтез АФП в «предраковой» печени имеет место в определенных «переходных» клетках и что АФП может рассматриваться как стадиеспецифический антиген в процессе созревания гепатоцита. С тех пор внесено сравнительно мало нового в понимание природы этих клеток. Остаются неясными как их происхождение, так и жизненный цикл. Вполне возможно, что они возникают из клеток канальцев Геринга и трансформируются в незрелые гепатоциты.

Весьма многообещающим является обнаружение аналогичных овальных клеток в регенерирующей печени мышей. Эти клетки несходны с гепатоцитами, холангиоцитами и клетками протоков Геринга. Они синтезируют сывороточный альбумин, но у них отсутствуют мембранные маркеры, характерные для зрелых гепатоцитов. Они неидентичны гепатоцитам фетальной печени, но активно продуцируют АФП. Их происхождение в регенерирующей печени мышей, а также дальнейшая трансформация в зрелые клетки не изучены, так как нет возможности наблюдать за этими процессами в нормальной печени. Неизвестно также, является ли синтез АФП в этих клетках конститутивным или индуцибельным. В будущем очень важно будет установить, имеются ли злокачественные аналоги овальных клеток в опухолях печени.

G. I. Abelev и T. L. Eraiser [271] в аналитическом обзоре обсуждают вопросы клеточной основы синтеза АФП при нормальном развитии, при регенерации печени, гепатокарциногенезе и в опухолях. Высказано предположение, что продукция АФП зародышевыми клетками и опухолями печени является следствием их происхождения от единых типов клеток в нормальных условиях. Наличие продукции АФП опухолью зародышевого желточного мешка объясняется тем, что висцеральная энтодерма является первым местом клеточного синтеза АФП в эмбрионе. Следующее место продукции АФП – эмбриональный гепатобласт, а, как известно, гепатобластомы – максимальные производители АФП среди различных видов раковых опухолей. Причина возобновления синтеза АФП в гепатоцеллюлярных раках еще недостаточно понятна. Эта проблема обсуждена авторами в свете возможной роли овальных клеток в гепатоцеллюлярном раке, в происхождении и понятии двух состояний зрелого гепатоцита, связанных и не связанных с продукцией АФП. Ключевая роль в обзоре отводится внеклеточной матрице, участвующей в контроле состояния гепатоцита и экспрессии гена АФП. В частности, в эксперименте установлено влияние фибронектина на процесс дифференцировки гепатобласта в зрелый гепатоцит с депрессией гена АФП и экспрессией гена альбумина [418].

Роль овальных клеток печени в реализации процессов пролиферации и экспрессии синтеза АФП обсуждается в экспериментальных исследованиях S. Matsusaka et al. [536]; T. Sakamoto et al. [626]; C. J. Vessey et al. [707]; B. I. Yoo et al. [736]. Однако следует подчеркнуть, что овальные клетки не являются единственными клетками, ответственными

за синтез АФП в печени. Более того, при регенерации печени они составляют меньшинство АФП-продуцирующих клеток.

Главным источником АФП в регенерирующей печени мышей, по-видимому, являются зрелые гепатоциты. Этот неожиданный результат был получен в иммуногисто- и иммуноцитохимических исследованиях. Тщательное изучение особенностей АФП-синтезирующих гепатоцитов показало, что они являются типичными зрелыми клетками печени, которые начинают синтезировать АФП еще до вступления клетки в S-фазу. Весьма интересным оказалось наблюдение, что пролиферация клеток печени не является обязательным условием индукции синтеза АФП в этих клетках, вместе с тем пролиферирующие гепатоциты могли не продуцировать АФП (рис. 1.2.3). Эти исследования показали, что практически каждый зрелый гепатоцит способен возобновлять экспрессию АФП при наличии достаточных стимулов, например в случае, если регенерация печени индуцирована смешанным воздействием: гепатэктомией и отравлением четыреххлористым углеродом [2].

Если рассмотреть вопрос синтеза АФП как часть общей проблемы биологии раковой клетки, то на первый план выступает основной принцип, который заключается в том, что опухоли сохраняют направление и уровень дифференцировки той клетки, из которой они возникли. Опухоли в большей или меньшей мере тканеспецифичны – эта их особенность не стирается сотнями и тысячами генераций, проходимых ими *in vivo* или *in vitro*. Это обнаруживается зачастую в самых неожиданных формах: применение некоторых универсальных индукторов дифференцировки выявляет в самых безликих клеточных линиях, прошедших тысячи генераций, отлично сохранившуюся способность выходить в дифференцировку – например, у одной такой линии – в сторону образования непосредственных предшественников эритроцитов, у другой – дифференцировку в МФ, а у перевиваемой опухоли яичка (эмбрионального рака) – способность дифференцироваться в 14 различных тканей, так же как у полипотентных эмбриональных клеток [2]. Такая возможность следует и из опытов B. Mintz и K. Illmensee (1975), где в экспериментах клетки злокачественной тератокарциномы, полученные от мышиных эмбрионов, при пересадке им другого генотипа (оба генотипа фенотипически отличались по окрасу шерсти) теряли злокачественные свойства и превращались в нормальные клетки: после рождения у этих мышей появлялась мозаичная черно-белая окраска, опухоли не развивались [549]. Так было доказано, что в организме эмбриона можно дифференцировать опухолевую клетку в нормальную.

В эмбриональных опухолях яичка или яичников АФП – наиболее характерный маркер, встречающийся в крови в подавляющем большинстве (> 80%) случаев. Эти опухоли, как уже говорилось выше, сохраняют способность дифференцироваться в полноценные тканевые структуры, в том числе и в клетки желточного мешка, синтезирующие АФП при нормальном развитии. Таким образом, синтез АФП в этих опухолях имеет вполне логичное объяснение, четко подтвержденное экспериментально. В случае опухолей печени, развивающихся в самые первые годы жизни у детей, ситуация еще более простая, чем при эмбриональных опухолях. Детские опухоли (гепатобластомы) развиваются из клеток эмбриональной печени, являющихся самыми мощными продуцентами АФП в нормальном эмбрионе.

Высокодифференцированные гепатомы – очень плохие продуценты АФП как по частоте его выявления, так и по уровню синтеза этого белка. И это закономерно, так как зрелые гепатоциты АФП не образуют вовсе. Наиболее характерен АФП при умереннодифференцированных опухолях печени, обычно встречающихся у человека. Эти опухоли состоят из клеток, напоминающих клетки взрослой печени, не вырабатывающие в

нормальных условиях АФП. Почему же они синтезируют его в опухоли? Второй трудно-объяснимый факт – громадный разброс в уровнях АФП у отдельных больных, достигающий 100-тысячекратных различий, и это при одном и том же уровне дифференцировки опухолей. При этом всегда имеются клетки, продуцирующие и не продуцирующие АФП в одной и той же опухоли, возникшей из одной клетки-предшественницы. Образование АФП в опухолях печени «взрослого» типа не имеет пока точно установленной причины, но мы склонны объяснить этот факт исходя из данных по обратимости подавления синтеза АФП в зрелых гепатоцитах.

В опухолях, как известно, нарушаются межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия. Клетки как бы изолируются от печеночной балки, что ведет к снижению уровня их дифференцировки, включая и возобновление синтеза АФП. Таким образом, можно предположить, что в основе реэкспрессии гена АФП в гепатомах «взрослого» типа лежит сдвиг равновесия в системе. Причинами его могут быть утрата опухолевой клеткой рецепторов к внеклеточному матриксу, дефектный матрикс и рост опухоли в условиях клеточного стресса, снижающего или полностью подавляющего синтез АФП. Каждая из этих возможных причин имеет экспериментальные обоснования или, вернее, аргументы в пользу ее реального существования. Так, трехмерный матрикс, организующий гепатоциты в культуре, не влияет на поведение клеток гепатомы. Очевидно, что либо они лишены рецепторов к матриксу, либо дефектна цепь, ведущая от рецептора к реагирующим внутриклеточным системам. Нарушение образования матрикса клетками, контактирующими с гепатоцитами, можно воспроизвести в культуре гепатоцитов и получить высокий синтез АФП.

И наконец, клеточный стресс. Известно, что при клеточном стрессе, вызванном тепловым шоком, действием тяжелых металлов, снижением pH-среды, гипоксией или недостатком глюкозы, клетки отвечают снижением или прекращением синтеза «нормальных белков» и индукцией белков клеточного стресса. Один из таких белков оказался антагонистом по отношению к синтезу АФП в гепатоме. Синтез обоих белков в одной клетке не встречался ни в естественных, ни в экспериментальных условиях. Пока неясно, насколько общим является этот феномен, но ясно, что он может находиться среди тех факторов, которые влияют на уровень продукции АФП гепатомами.

Таким образом, при рассмотрении различных ситуаций, связанных с возобновлением синтеза АФП опухолями, можно утверждать, что во всех случаях и даже в частных особенностях такого возобновления проявляется один и тот же принцип: опухоли сохраняют и проявляют черты дифференцировки и дифференцировочные потенции, свойственные их нормальным предшественникам. И эта особенность – одна из проблем их природы, еще до конца не понятых.

Итак, клетки опухоли не утрачивают полностью способности к дифференцировке в те клетки (и не только), из которых они произошли. Почему это происходит – далеко не простой и не вполне ясный вопрос. Очевидно, что такое сохранение необходимо для поддержания свойств, характерных для опухоли. Тогда вполне естественно, что тканеспецифические гены, к которым относится и ген АФП, в опухоли продолжают находиться в активном состоянии. Этот вопрос будет детально рассмотрен с общебиологических позиций в следующем разделе.

1.3. СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ КАК ВОЗМОЖНАЯ ОСНОВА ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО РОСТА И ПРОТИВОРЕЧИЯ ИММУНИТЕТА

Существующие концепции злокачественного роста, при всем их многообразии (физико-химическая, вирусно-генетическая, дисонтогенетическая, полиэтиологическая [99]), объясняют, как правило, лишь отдельные стороны проблемы онкогенеза, не охватывая всех ее многочисленных граней. В частности, отсутствуют пока ответы на три ключевых вопроса, от решения которых зависит, возможно, дальнейшее развитие проблемы, а именно: 1) функции, пути активации и программы функционирования онкогенов; 2) причина отмены контактного ингибирования; 3) роль нарушений иммунологического надзора в патогенезе злокачественного роста. Все они тесно связаны друг с другом, а второй и третий, скорее всего, представляют собой две плоскости одного явления.

В числе свойств необластомы, обусловливающих ее высокую приспособляемость, следует, прежде всего, назвать интенсивную митотическую активность клеток и их способность ускользать из-под иммунологического контроля даже в случае наличия у опухолевой ткани резкого антигенного контраста (аллогенные перевивные системы).

С учетом общего положения, согласно которому патологические явления представляют собой гипертрофированные проявления физиологических процессов, перспективен поиск физиологических аналогов, напоминающих по тем или иным параметрам злокачественный рост. Таких феноменов известно два. Это регенерация и эмбриогенез, на сходство которых с онкогенезом обращалось внимание неоднократно, начиная со времен Вирхова и Конгейма. Регенерация, в свою очередь, тесно связана с воспалением, взаимосвязь же хронического воспалительного процесса с канцерогенезом клиницистам известна давно. Формируется, таким образом, четырехкомпонентная система, составные части которой явно взаимосвязаны, хотя дешифровка этих связей является делом будущего. Ниже излагаются соображения, свидетельствующие о наличии общих черт у эмбриогенеза, канцерогенеза и репаративной регенерации, и предпринимается попытка обоснования подходов к пониманию механизмов развития злокачественного роста как общебиологического явления.

В основе каждой болезни, как правило, лежит повреждение структуры [15, 16]. Термин «структура» используется здесь расширенно, объединяя устройство живой материи от молекулярного до организменного уровней. Принятое в литературе деление повреждений на обратимые и необратимые, специфические и неспецифические хотя и не лишено условности, однако достаточно четко отражает ситуацию, поэтому проявление повреждения на любом уровне прямо или косвенно связано с особенностями повреждающего этиологического фактора [37, 51].

Вне зависимости от того, каким фактором вызвано повреждение и на каком уровне оно реализуется, всегда и везде оно связано исходно с нарушением макромолекулярных структур, входящих в состав клетки, межклеточного вещества. Это относится к белкам, нуклеиновым кислотам и, вероятно, к высокомолекулярным полисахаридам. В первую очередь речь идет о нарушении упорядоченности пептидной структуры белка, дестабилизации и раскручивании пептидных цепей, изменении их пространственной конфигурации [15, 35], а также о деградации ядерной ДНК. Последнее наиболее характерно для воздействия мутагенных факторов, таких как канцерогенные вещества, ионизирующая радиация, онковирусы. Важная роль в указанных явлениях принадлежит активации и синтезу новых нуклеаз [60].

Повреждения любых субклеточных структур немедленно вызывают реактивные изменения состояния клетки, направленные на замещение и восстановление дефекта. Определяющим звеном этих процессов является усиление анаболизма ДНК, РНК и протеинов, представляющее собой биохимическую основу запуска процессов регенерации [15, 35, 59]. Указанные явления входят как органическая составная часть в понятие реактивности, так как последняя включает в себя не только способность организма воспринимать то или иное раздражение, но и готовность отвечать на него комплексной реакцией. Такая трактовка реактивности, смещая акцент на защитно-приспособительную ее суть, позволяет утверждать, что характер и итог компенсаторно-защитных реакций организма зависит в конечном счете от исходного состояния биосистемы [66]. Реактивность биосистемы оказывается органически сомкнутой с понятием резистентности, находящейся в большинстве случаев в обратном соотношении со степенью сложности организации индивидуума и его положением в эволюционном ряду. Стратегия адаптации низших организмов ориентирована преимущественно на приспособление к жизни во вредной среде, а не на борьбу с создавшимися условиями [66]. Напротив, у высших организмов в процессе эволюции формируется система приспособлений для защиты от изменений условий внешней среды. Становление этой системы тесно связано с эволюцией реактивности организма [15, 16], а следовательно, и с эволюцией регенерации [168].

Регенерация представляет собой, в широком смысле слова, восстановление структурных элементов и отражает принцип ауторегуляции жизненных процессов [79]. Она всегда локальна, т. е. связана с местом повреждения [225], и включает в себя восстановление структуры и функций на всех уровнях организации биосистемы. Преобладание той или иной формы регенерации (например, клеточной или внутриклеточной) в различных органах и тканях определяется их структурно-функциональной специализацией. В конечном счете способностью к регенерации обладают все органы и ткани. Филогенез регенерации происходит поэтапно, и каждому этапу присущи свои специфические черты. Общий регенерационный потенциал организма, судя по всему, в филогенезе уменьшается [15, 35, 77, 223, 225], хотя в литературе высказано и противоположное мнение [105, 136]. То же, и в еще более отчетливой форме, имеет место и в онтогенезе [223, 224, 229].

Регенерация представляет собой частный случай процесса развития. Это обстоятельство сближает ее с эмбриогенезом. Наиболее отчетливо это сходство прослеживается на относительно ранних этапах эволюции – до уровня земноводных включительно, у которых в ходе регенерации утраченных структур наблюдается закладка новых органов и их дифференцировка [80, 81]. Полноценный регенерационный процесс непременно подразумевает наличие двух фаз: пролиферации и дифференцировки. Если период фазы пролиферации характеризуется размножением клеток-предшественников, то сущность фазы дифференцировки состоит в их структурно-функциональной специализации. Следовательно, регенерация есть ответ на повреждение, состоящий в полном либо частичном восстановлении утраченных структур и функций, представляющий собой механизм вторичного развития, входящего в общий адаптационный синдром [105].

Сходство процессов эмбрионального развития и регенерации очевидно. При эмбриональном развитии и при регенерации образуются одни и те же органы [177]. Это имеет место, например, у губок, кишечнополостных, планарий, а также амфибий (регенерация конечности и хвоста).

Сложнее обстоит дело с сопоставлением регенерации, эмбрионального и постнатального развития паренхиматозных органов у высших организмов, однако и здесь отчетливо прослеживаются параллели, хотя в этом случае регенерация повторяет не столько эмбриональное, сколько постнатальное развитие [204]. Таким образом, хотя знака равенства между эмбриогенезом и регенерацией ставить нельзя (главное отличие регенерации от эмбриогенеза состоит в повторном протекании процессов), явления эти имеют много общего, в особенности если принять во внимание такой биологический феномен, как соматический эмбриогенез. Последний отличается от обычной регенерации тем, что в этом случае имеет место образование целого организма из его фрагмента, сопровождающееся нередко существенной перестройкой организации с закладкой новых осей симметрии и полярности, в то время как регенерация представляет собой восстановление, протекающее с сохранением прежней организации. Регенерация и соматический эмбриогенез – явления близкие, но не идентичные [136, 204, 225]. Обстоятельство это исключительно важно, как мы увидим, для понимания проблемы онкогенеза. Характерно, что в онтогенезе способность к соматическому эмбриогенезу и регенерации меняется прямо противоположным образом: если первая возрастает, то вторая, как уже говорилось, резко уменьшается. Так, у *D. Tigrina Girard*, размножающейся бесполым путем, при вырезании фрагмента тела происходит не регенерация, а соматический эмбриогенез, который выражен тем лучше, чем старше животное. У *Dendraenoculum Lacteum*, напротив, наблюдается не соматический эмбриогенез, а регенерация, и с возрастом она падает [249].

И эмбриогенез, и регенерация представляют собой сложноорганизованные, строго регулируемые процессы. Регуляция их осуществляется, во-первых, генетическими механизмами, на основе принципа репрессии/дерепрессии; во-вторых, системами межклеточных, межтканевых и межорганных корреляций, осуществляемых путем обмена биохимическими и, возможно, биофизическими сигналами; в-третьих, путем нейроэндокринной и иммунной регуляции [13, 15, 35, 168]. Ни о какой автономии эмбриогенеза и регенерации не может, следовательно, быть и речи. В полной мере это относится и к соматическому эмбриогенезу, протекающему в физиологических условиях.

Итак, регенерация и эмбриогенез имеют общие корни. Соматический эмбриогенез представляет собой промежуточное звено, сближающее оба эти явления. Основой их служат сменяющие друг друга процессы пролиферации и дифференцировки, контролируемые рядом механизмов слежения. Нарушение этого контроля не только изменяет естественный ход регенерации и морфогенеза, но и способно вывести клетку в режим «пролиферативного взрыва». Следствием этого может быть ускорение соматического мутагенеза и в конечном счете развитие злокачественной опухоли.

Мнение о том, что злокачественный рост представляет собой патологический вариант эмбриогенеза, высказывалось неоднократно [705, 724]. Исторически оно восходит к теории «зародышевых зачатков» Конгейма. В 70-е годы был создан большой задел в этом направлении. Концепция активно развивалась в работах Б. П. Токина [225], Л. Б. Меклера [148], А. С. Шевелева [250], В. Б. Винницкого [51]. Л. Б. Меклер в 1977 г. прямо пишет о том, что «злокачественная опухоль представляет собой патологический, диссеминированный, встроенный в ткани плод, возникший в результате слияния ядер соматических клеток на основе партеногенеза» [148]. Представляется необходимым рассмотреть вопрос о наличии сходства и различия между процессами регенерации и эмбриогенеза с одной стороны и онкогенезом – с другой.

Сходство регенерации, эмбриогенеза и онкогенеза состоит прежде всего в том, что в основе трех названных состояний лежит интенсивный пролиферативный процесс. Итог же пролиферации оказывается совершенно различным: в первых двух случаях имеет место отмена ее дифференцировкой, при онкогенезе – неограниченное ее продолжение. Все три процесса имеют, таким образом, единый исток, но прямо противоположный финал. И для онкогенеза, и для регенерации свойственна дедифференцировка (эмбрионализация) клеток. Будучи документирована увеличением ядра и ядрышка, образованием свободных рибосом, уменьшением числа митохондрий [123], она является непременной предпосылкой регенерации, обеспечивая выход клеток из-под коррелятивного «замка» [136]. Например, регенерация немертин, в ходе которой клетки утрачивают свою характерную структуру и преобразуются в клетки, сходные с эмбриональными [148]. Ряд морфологических и функциональных особенностей сближает анаплазированные, опухолевые и эмбриональные клетки. Им присущ атипизм ультраструктур (увеличение количества рибосом, изменение формы, величины и расположения митохондрий, увеличение количества лизосом, появление многочисленных и тесных контактов ядра, митохондрий и эндоплазматической сети). Морфологические признаки, присущие опухолевой клетке (атипичные митозы, гиперхромия ядер и т. д.), наблюдаются также при регенерации тканей, воспалении, что затрудняет дифференциальный диагноз [7, 15]. В отличие от дедифференцировки при злокачественном росте, дедифференцировка при регенерации обратима.

Сближает с эмбриональной тканью злокачественную опухоль и ряд биохимических особенностей. В опухолевой ткани, как и в эмбриональной, гликолитические процессы преобладают над окислительными, что приводит к накоплению молочной кислоты [7, 15, 250]. Изоэнзимный спектр ряда ферментов (пируваткиназы, лактатдегидрогеназы, глутаминазы, ДНК-полимеразы и др.) опухолевых и эмбриональных клеток сходен [291, 313, 374]. В злокачественных опухолях синтезируются эмбриональные белки, появляющиеся также при беременности и на фоне регенерации [6, 13, 375, 404]; здесь же синтезируется и ряд других биологически активных веществ, вырабатываемых в тканях эмбриона [456].

Наконец, сходство опухолевой и эмбриональной ткани состоит в их иммунологической неотторгаемости. Механизмы, обеспечивающие эти эффекты, имеют много общего [13, 250, 705]. Есть основания полагать, что они имеют отношение к обеспечению контроля за процессом регенерации [13, 15]. В пользу неформального сходства канцерогенеза и эмбриогенеза свидетельствует также эктопическая продукция некоторыми злокачественными опухолями гормонов беременности [6, 646] и наличие у эмбриональных антигенов иммунодепрессивных свойств [583, 606].

Для более наглядного отображения самых общих черт в сходстве эмбриогенеза, онкогенеза, репаративной регенерации приведена таблица 1.3.1.

Таблица 1.3.1

Взаимосвязь этапов эмбриогенеза, канцерогенеза и репаративной регенерации (по В. Б. Винницкому, 1981)

Этап	Эмбриогенез	Канцерогенез	Репаративная регенерация
I	Оплодотворение. Появление зародышевой клетки, отличающейся от материнского организма по составу трансплантационных и эмбриональных антигенов. Нарушение генного гомеостаза организма матери	Действие канцерогенного фактора. Трансформация клеток, их размножение, появление опухолевых трансплантационных и эмбриональных антигенов. Нарушение генного гомеостаза организма	Действие повреждающего фактора. Размножение незрелых клеток, появление эмбриональных антигенов. Нарушение генного гомеостаза взрослого организма
II	Образование «критической» массы зародышевых клеток. Развитие иммунологической толерантности к зародышевым клеткам, которая обусловливается блокирующими факторами сыворотки крови, трофобласта и плода, экспрессией эндогенных вирусов типа С, гормонально-метаболическими сдвигами	Образование «критической» массы опухолевых клеток. Развитие иммунологической толерантности к злокачественным клеткам, которая обусловливается появлением фибриноидного слоя на этих клетках, блокирующими факторами сыворотки крови, блокирующими факторами опухоли, экспрессией эндогенных вирусов типа С, гормонально-метаболическими сдвигами	Образование «критической» массы регенерирующих клеток. Развитие иммунологической толерантности к регенерирующим клеткам, которая обусловливается появлением фибриноидного слоя на этих клетках, блокирующими факторами незрелых клеток, экспрессией эндогенных вирусов типа С, антителами к клеткам частично удаленного органа, гормонально-метаболическими сдвигами
III	Роды. Изгнание плода и плаценты из организма матери. Сенсибилизация организма к трофобластическим клеткам и элиминация их из организма, обусловливаемая уменьшением массы этих клеток; гормонально-метаболическими сдвигами, способствующими сенсибилизации; деблокирующими факторами сыворотки крови	Прогрессирующее развитие опухоли. Гибель организма	Восстановление целостности ткани, дифференцировка клеток, исчезновение эмбриональных антигенов, нормализация гормонально-метаболического фона, восстановление генного гомеостаза организма

Из всего сказанного можно сделать вывод о том, что физиологическими прототипами злокачественного роста являются эмбриогенез и репаративная регенерация, располагающие потенциально всеми механизмами, необходимыми для выхода в необластомогенез.

В основе опухолевого развития лежит хроническое раздражение и повреждение клетки различными средовыми факторами. Детали этого процесса не выяснены, однако в качестве одного из возможных вариантов может быть предложена представленная ниже гипотетическая схема.

В результате хронически наносимого повреждения наступает истощение регенеративной способности клетки, а иногда и полное ее угнетение. В районе повреждения начи-

нают действовать специфические и неспецифические механизмы стимуляции регенерации. В частности, появляются вещества, стимулирующие клеточное деление. Их количество значительно увеличивается по отношению к веществам, ингибирующим клеточное деление. В том числе речь может идти о цАМФ и цГМФ. В случае невосстановления размножения, а именно так бывает при глубоком угнетении у клетки способности к регенерации, положительное изменение «индекса регенерации» достигает определенного пикового значения, что и ведет в конечном счете к переходу протоонкогена в онкоген. Последний включает репрессированную до этого в геноме программу соматического эмбриогенеза. Дальнейший ход событий определяется далеко идущим сходством эмбриональной и опухолевой ткани, общностью метаболизма и антигенного состава. В частности, экспрессия эмбриональных антигенов обеспечивает, по-видимому, опухолевой клетке возможность «ускользать» из-под иммунного надзора по законам «антигенной мимикрии». Одновременно происходит переключение системы иммунитета с программы «отторжения чужого» на программу «охраны чужого в своем», состоящее в частичном ингибировании киллинга с одновременным сохранением и даже активацией трофической функции системы иммунитета.

Выше уже шла речь о снижении репаративной способности и, наоборот, о повышении способности к соматическому эмбриогенезу по мере увеличения возраста животных. В результате повышения роли соматического эмбриогенеза по отношению к регенерации, наступающей к середине жизни организма, создаются условия, способствующие возникновению злокачественных новообразований. Согласно этой концепции опухоль рассматривается как популяция клеток, образующихся из онкогерминативной клетки путем соматического эмбриогенеза [169]. При этом «озлокачествление» клетки сопровождается ее эмбрионализацией с экспрессией фетальных белков.

Известно, что возникновение в организме клона малигнизированных клеток неизменно сопровождается включением гомеостатических механизмов защитно-регуляторного характера [76, 160, 213]. Однако особенность злокачественного опухолевого процесса состоит в том, что, однажды начавшись, он продолжает свое неудержимое развитие бесконтрольно, автономно. Этим отличается рост опухоли от развития тканей при регенерации, воспалении, гипертрофии, когда созревание и дифференцировка клеток координируются с состоянием и функцией окружающих тканей и всего организма [74, 108, 146, 176, 209]. Причины этого явления кроются как в свойствах самой злокачественной клетки, так и в парадоксальных особенностях взаимодействия опухоли с иммунной системой организма.

Многочисленными исследованиями показано, что по антигенному профилю опухолевые клетки значительно отличаются от клеток нормальной ткани [44, 73, 76, 100]. Однако весь накопленный до настоящего времени экспериментальный материал свидетельствует о том, что специфические антигены опухолевых клеток не представляют собой какого-либо нового класса маркеров, а появляются вследствие дедифференцировки опухоли и возврата ее к эмбриональному фенотипу [52, 266, 482]. Гипотеза о «фетализме» опухолевых клеток была высказана Конгеймом свыше 100 лет назад. Более того, было показано, что сходные механизмы индукции клеточной пролиферации обусловливают антигенное сходство гликопротеинов опухолевых и бактериальных клеток [24, 97].

Следует подчеркнуть, что, несмотря на огромный фактический материал о генетических нарушениях, ассоциированных с неоплазиями [551], проблема возникающего

вследствие этого антигенного своеобразия опухолевой клетки и антигенной характеристики опухолей еще очень далека от своего решения. Но уже сейчас можно утверждать, что использование антигенного сходства опухолевых и эмбриональных тканей может оказаться весьма плодотворным для поиска путей иммунологического воздействия на злокачественные клетки.

Взаимодействие опухоли с иммунной системой сопровождается реакцией с обеих сторон. Это показали многочисленные динамические исследования иммунного статуса онкологических больных [134, 144]. Отмечена зависимость состояния некоторых показателей клеточного звена иммунитета от распространенности процесса [58, 227]. Иммунный статус больных зависит как от типа опухоли, стадии процесса, так и от индивидуальных особенностей организма [45, 72, 134]. Однако применяемые в клиниках методы иммунологического анализа позволяют зафиксировать лишь общие изменения в иммунном статусе, что мало характеризует специфический процесс, а скорее зависит от типа лечения. Такое состояние дел не удовлетворяет и заставляет вести разработку чувствительных тестов для оценки реактивности организма на антигены, в том числе и онкофетальные, растущей в нем опухоли [45, 72]. Эта задача приобретает особое значение в свете результатов многочисленных исследований последних десятилетий, показавших, что развивающаяся в организме опухоль обладает целым спектром возможностей активного воздействия на все звенья иммунитета [133].

Основными клетками, способными осуществлять неспецифическую защиту, являются макрофаги и натуральные киллеры. Они способны быстро уничтожать клетки, несущие признаки чужеродности, причем этот процесс не зависит от антигенов МНС и не требует предварительной иммунизации. В различных экспериментальных системах показана барьерная роль этих клеток на начальных этапах злокачественного процесса. Рассмотрение проблемы противоопухолевой защиты в эволюционном аспекте подтверждает, что фагоцитирующие клетки способны противостоять опухолевому росту у наиболее древних в филогенетическом аспекте форм живого, не имеющих иммунных лимфоцитов [106].

При введении агентов, стимулирующих МФ и NK: БЦЖ, мурамилпептида, INF и т. д. – значительно удлиняется латентный период возникновения экспериментальных опухолей [36]. Введение животным антимакрофагальной сыворотки усиливает рост и метастазирование опухолей [604]. У мышей с врожденной аплазией тимуса (nude) спонтанные опухоли развиваются не чаще, чем у нормальных мышей [145].

Арсенал противоопухолевых реакций NK разнообразен. Они узнают на поверхности опухолевой клетки определенные гликопротеиды, связываются с ними и образуют литический комплекс, посредством которого в клетку-мишень вводятся протеазы и другие цитотоксические факторы [258, 463]. Этот процесс активируется интерфероном, IL-2 и другими цитокинами [683]. МФ способны фагоцитировать опухолевые клетки, оказывать антителозависимое и антителонезависимое цитотоксическое действие, продуцировать активные формы кислорода и фактор некроза опухолей (TNF-α) [36, 273, 382].

Однако при длительном контакте (более 48 ч) с клетками опухоли роль МФ может меняться [36]. Известно, что опухолевые клетки выделяют широкий спектр биологически активных веществ, изменяющих иммунологическую реактивность организма [160]. Под действием факторов опухолевых клеток МФ теряют цитотоксические и иммуностимулирующие свойства и превращаются в сателлитные клетки, роль которых сводится к продукции ростовых факторов для опухоли [213]; синтезу $ПГЕ_2$, подавляющего противоопу-

холевые иммунные реакции лимфоцитов [161]; синтезу протеаз (трипсина, эластазы, коллагеназы и др.), которые разрушают матрикс опухоли и слущивают с поверхности опухолевых клеток фибронектин. Это приводит к нарушению контактного торможения роста клеток и усилению метастазирования [146].

Таким образом, на основании анализа литературных данных можно сделать вывод о двойственной роли факторов неспецифической резистентности – от активной противоопухолевой защиты на ранних стадиях формирования злокачественного заболевания до прометастатических и иммуносупрессирующих функций в очаге прогрессирующей опухоли.

Роль гуморального и клеточного звеньев иммунитета в развитии онкопатологии различается. Изучение гуморального противоопухолевого иммунитета показало, что наличие в сыворотке крови больного антител к опухолеассоциированным антигенам далеко не всегда приводит к стимуляции механизмов антителозависимого лизиса опухолевых клеток. При определенных условиях антитела могут способствовать росту опухоли, связывая и экранируя ее антигенные детерминанты [636].

Доказано, что главную роль в элиминации из организма малигнизированных клеток играют клеточно-опосредованные реакции [76]. При этом специфический цитолиз злокачественных клеток осуществляют цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), несущие на своей поверхности рецепторы к опухолевому антигену [160]. В организме больного эти клетки присутствуют практически при всех онкозаболеваниях, о чем свидетельствует положительная реакция ГЗТ на опухолеассоциированные антигены и онкофетальные белки [44, 147, 704].

Однако динамическое изучение иммунологического статуса больных показывает функциональную несостоятельность ЦТЛ на начальных этапах болезни и значительное угнетение Т-клеточного звена по мере нарастания тяжести процесса [44, 147]. Для того чтобы яснее представить инвертированность специфического клеточного ответа, необходимо обозначить главные этапы его формирования и особенности влияния опухолевой клетки на этот процесс.

I. В качестве запускающего сигнала отмечается экспрессия на клетке-мишени специфических опухолевых антигенов (в т. ч. и онкофетальных белков) совместно с антигенами MHC-I. Этот комплекс узнается предшественниками ЦТЛ. Для дальнейшего созревания этих клеток необходимы цитокины (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, INF-γ и др.), которые продуцируются Th. При анализе большого количества первичных и вторичных опухолей человека была показана полная или частичная супрессия синтеза белков MHC-I, вследствие чего на этом этапе опухолевая клетка часто оказывается «неузнаваемой» [196, 504, 586, 628, 672].

II. Ряд событий, приводящих к появлению активированных Th, начинается с взаимодействия опухолеассоциированного антигена и вспомогательной клетки, в роли которой могут выступать МФ, дендритные и эндотелиальные клетки. Переработанный этими клетками антиген презентируется на их поверхности в комплексе с антигеном MHC-II и узнается специфическими Th [57, 58]. Параллельно с процессом специфического узнавания происходит активация Th_1 при помощи IL-1, продуцируемых теми же МФ [196, 289]. Th_1 выделяют цитокины (IL-2, INF-γ, IL-5 и др.), определяющие созревание ЦТЛ. Опухоль угнетает функции Th_1, секретируя ПГ, TGF, различные протеазы [160]. Клетки опухоли и резидентные МФ нарабатывают значительные количества TNF-α, что тоже приводит к стимуляции иммуносупрессорных факторов [346]. В результате подавляется синтез необходимых цитокинов (IL-2) и снижается наработка ЦТЛ [364].

Таким образом, можно утверждать, что опухоль обладает широким арсеналом средств воздействия на иммунокомпетентные клетки. Этот фактор необходимо учитывать при проведении любой противоопухолевой терапии. Поэтому в настоящее время все большее значение приобретают методы воздействия на организм, стимулирующие как общую резистентность, так и специфический противоопухолевый иммунный ответ.

1.4. СВОЙСТВА АФП В УСЛОВИЯХ НОРМЫ И ПАТОЛОГИИ

На уровне организма АФП – многофункциональный белок с селективной клеточной стимулирующей и ингибирующей активностью. Многие растущие эмбриональные и неопластические клетки не только продуцируют, но и поглощают большое количество АФП. Связывание АФП с определенными рецепторами на мембране запускает рост и пролиферацию клеток или воздействует на процесс клеточной дифференцировки. В зависимости от стадии дифференцировки или активации клетки начинают делиться или супрессируются.

В аналитическом обзоре «Альфа-фетопротеин: строение, функции и роль в эмбриогенезе» К. В. Шмагель и В. А. Черешнев подробно освещают свойства АФП в условиях нормы и патологии [255]. Авторы считают, что большое число функциональных последовательностей в молекуле АФП свидетельствует о высоком регуляторном потенциале данного белка и широком спектре его биологической активности. АФП связывает и переносит такие лиганды, как билирубин, жирные кислоты, стероиды, ретиноиды, флавоноиды, фитоэстрогены, красители, тяжелые металлы, диоксин, а также различные лекарственные препараты. При этом некоторые гидрофобные лиганды, например жирные кислоты или эстрогены, вызывают конформационные изменения третичной структуры белка. В обзоре отражены свойства АФП, заключающиеся в комплексной регуляции процессов клеточной пролиферации, включения механизмов апоптоза, обеспечения клетки энергетическим и пластическим материалом, индукции регуляторных сигналов через усиление экспрессии рецепторов и обеспечения синтеза ПГ, тромбоксанов и ЛТ, взаимодействия со структурами экстрацеллюлярного матрикса, иммуномодулирующих эффектов.

В эмбриональном развитии АФП, очевидно, играет важную роль в регуляции роста и дифференцировки тканей плода, в защите плода и матери от встречной атаки иммунных систем, в ограничении влияния стероидных гормонов, в частности эстрогенов матери, на плод. По мере завершения органогенеза синтез АФП снижается [255]. L. Sanchez-Palazon и A. Rodriguez-Burgos детально проследили роль АФП в формировании и дифференцировке центральной нервной системы у цыпленка и пришли к заключению о главенствующей роли АФП в нейроорганогенезе [630]. Недавно появились сообщения о том, что АФП играет важную роль в формировании плодного эритропоэза [292].

Важная роль АФП в эмбриональном периоде подтверждается результатами экспериментальных исследований. Так, введение беременным мышам очищенного кроличьего препарата IgG, содержащего антитела к мышиному АФП, приводило, в зависимости от дозы препарата, к аборту (5–10 мг) или внутриутробной гибели плодов (1 мг). Аборты происходили в течение 24 ч, внутриутробная гибель плодов наступала в течение 48–72 ч после инъекции IgG. Контрольный раствор иммуноглобулина, не содержащий антител к АФП, не обладал таким действием. Кроме того, после иммуноадсорбционного удаления специфических антител из препарата IgG, направленного против АФП, он терял свои фетотоксические свойства [556]. В другом исследовании этих авторов мышей до спаривания

иммунизировали крысиным АФП в полном адъюванте Фрейнда. Активная иммунизация приводила к резкому торможению развития плодов, но не вызывала абортов. В тех случаях, когда отмечалась гибель плодов, гистологически было выявлено наличие субплацентарных кровоизлияний [553]. Однако эти данные не согласуются с результатами, полученными другими авторами. Антисыворотки (кроличья, козья, лошадиная) против крысиного АФП, введенные внутрибрюшинно беременным крысам на 9, 11 и 13-й день гестации, не вызвали каких-либо патологических изменений у 472 выживших плодов. Иммунологические исследования показали, что гетерологичные антитела находились только в желточном мешке: ни в хориоаллантоисной оболочке, ни в собственно эмбрионах они не обнаружены [511]. Эти данные вряд ли ставят под сомнение важную роль АФП в эмбриогенезе. Вместе с тем можно предположить, что крысы менее чувствительны по сравнению с мышами к действию антител к АФП: введение мышам кроличьего IgG против АФП мыши приводило к абортам, у крыс инъекции кроличьего IgG против крысиного АФП сопровождались лишь слабым фетотоксическим эффектом [554]. Внутримышечная иммунизация крыс-самок мышиным АФП (5 инъекций до и одна после спаривания) не приводила к достоверному изменению количества живых и мертвых эмбрионов в расчете на один помет по сравнению с аналогичными показателями неиммунизированных животных. В то же время уровни аутоантител к АФП в материнской крови прямо коррелировали с числом мертвых плодов в помете.

В сетчатке куриного эмбриона АФП обнаруживается с 4-го дня развития. 7-дневная сетчатка, инкубированная в органной культуре в течение 3 дней в присутствии антител против АФП, претерпевала нарушения в своем развитии. Последующими гистологическими исследованиями в ней не были обнаружены сетчатые слои, отсутствовали зачатки фоторецепторных клеток. Формирование сетчатки в культуральной среде без антител к АФП не отличалось от аналогичного процесса, происходящего в яйце [255]. При раке активация онкогенов, являющихся по сути заблокированными в норме эмбриональными генами, приводит к продукции эмбриональных форм ферментов, других белковых факторов, обеспечивающих аутокринную регуляцию роста и пролиферации клеток. Экспрессия АФП раковыми клетками – хороший пример действия такого механизма. Подобная активация синтеза АФП, очевидно, происходит и при физиологической регенерации. У взрослых людей без онкологических заболеваний фоновые значения АФП, по-видимому, объясняются именно репаративными процессами в организме. Однако большая часть АФП при этом, вероятнее всего, быстро расходуется в тканях и не поступает в кровоток.

К числу вероятных функций АФП относится иммуносупрессорная, т. е. подавление иммунных реакций на антигены у развивающегося плода. Поскольку в процессе развития появляются новые белки (антигены), будут возникать и антитела к ним, что приведет к серьезным осложнениям. Поэтому в эмбрионе собственная иммунная система подавлена, и это подавление, возможно, осуществляет АФП [255].

Разнообразные проявления активности АФП отчасти можно связать с его свойствами транспортного белка, способного образовывать нековалентные комплексы с полиненасыщенными жирными кислотами, билирубином, лектинами, некоторыми стероидными гормонами и другими биологически активными лигандами. АФП осуществляет транспорт через мембраны, взаимодействуя с высокоаффинными АФП-рецепторами клеток-мишеней или клеток-экспортеров биологически активных веществ.

Оригинальные наблюдения, касающиеся иммуносупрессивной функции АФП, проведенные в 1975 г. R. Murgita и T. Tomasi [563] в США, вызвали лавину противоречивых

исследований, посвященных роли АФП в созревании иммунной системы. Они не завершены и по сей день. Наиболее интересные и убедительные из них выявили роль АФП в экспрессии MHC-II на поверхности МФ. Согласно этим работам, АФП подавляет экспрессию MHC-II и тем самым препятствует презентации антигенов макрофагами мышей. Это является одним из главных механизмов, обеспечивающих иммунологическую некомпетентность развивающегося плода.

Установлено влияние АФП на специфический иммунитет:

1. АФП подавляет выработку антител и созревание ЦТЛ на Т-зависимые антигены, не влияя на активность зрелых Т- и В-лимфоцитов. Основная мишень фетального белка – пролиферирующие Th, соответствующие ЦТЛ по главному комплексу гистосовместимости [601].

2. АФП подавляет пролиферативный ответ лимфоцитов на митоген [344].

3. АФП повышает активность специфических Т-супрессоров (Ts) [564, 688].

4. АФП снижает фагоцитирующую способность макрофагов [591].

5. В зависимости от условий эксперимента АФП может повышать или снижать продукцию $ПГЕ_2$ в МФ, в то время как индометацин совместно с АФП теряет способность подавлять синтез $ПГЕ_2$ [285].

6. Следствием стимулирующего влияния АФП на продукцию моноцитами $ПГЕ_2$ является то, что АФП значительно супрессирует синтез TNF-α активированными моноцитами (на 58%) и IL-1β (на 67%). Индометацин – циклооксигеназный ингибитор – в значительной мере (на 78%) отменяет этот эффект [714].

7. АФП снижает активность NK [317].

Таким образом, АФП обладает иммуномодулирующими эффектами. В высоких дозах, сопоставимых с концентрациями в фетальной крови, он подавляет пролиферацию лимфоцитов, что продемонстрировано в культурах, стимулированных как аутологичными клетками, так и КонА [433]. При этом не было выявлено каких-либо взаимодействий АФП с IL-2, поддерживающим пролиферацию Т-клеток, что позволило сделать вывод о непосредственном воздействии АФП на Т-клетки. У здоровых людей, мышей, крыс, хомячков было также обнаружено угнетающее влияние АФП на пролиферативную активность стимулированных ФГА лимфоцитов, которое реализовалось на уровне Th, но, как и в предыдущем исследовании, не было связано с блокированием IL-2-опосредованных механизмов. В опытах на мышах CBA/J, беременных сингенными (генетически тождественными) плодами, показано, что их Т-спленоциты, в отличие от Т-клеток девственных самок, активно развивали иммунный ответ на тимоциты собственных эмбрионов. Данная аутореактивность блокировалась как антителами к MHC-II, так и добавлением в культуру АФП. Прямое подавление АФП экспрессии MHC-II на мембране МФ мышей было доказано C. Y. Lu et al. [523]. Приведенные данные свидетельствуют, с одной стороны, об участии иммунной системы матери в контроле за беременностью даже в случае полной генетической совместимости матери и плода, а с другой – о важной роли АФП в этом процессе [255].

При рассмотрении АФП с позиций его иммуносупрессорных свойств G. F. Clark et al. выдвинули фетоэмбриональную гипотезу защиты организма от аутоиммунных воздействий [333]. Суть предположения заключается в том, что развивающийся человек и гаметы защищены растворимыми иммунодепрессивными гликопротеинами, найденными в амниотической жидкости и эргастоплазме, известными как glycodelin-A (GdA) и glycode-

lin-S (GdS) соответственно. Структурный анализ их нуклеоолигосахаридных последовательностей говорит о том, что GdA и GdS имеют очень необычные последовательности углеводов как функциональных групп, которые позволяют им проявить иммунодепрессивные свойства. АФП имеет в своей структуре аналогичные GdA и GdS последовательности. Поразительно то, что те же самые необычные последовательности углеводов и связанные с этим иммунодепрессивные свойства так же определенно выражены у гельминтов, геликобактерий, в человеческих опухолевых клетках и ВИЧ.

Существуют как минимум три аспекта защиты от иммунной системы:

1. Иммунологическая мимикрия, которая используется в этой защитной системе патогенами (вирусами, бактериями, паразитами, опухолевыми клетками), иммунотолерантные системы (эмбрион, яйцеклетка, сперматозоид и др.). Например, опухоли могут ниспровергать или неверно направлять человеческий иммунный ответ за счет увеличения своей патогенности (феномен иммунологического усиления роста опухоли).

2. Свойства гликопротеинов (их особенная углеводная последовательность) в системе нормальных клеток и тканей, вне репродуктивной системы, могут защитить их от иммунных ответов, особенно в тех случаях, где главную роль определяет тканевая совместимость.

3. АФП может препятствовать связыванию вирусов с мембранами лимфоцитов, а в ряде случаев способен ограничивать атаку аутоантител на специфические сайты и рецепторы клетки.

X. Filella et al. в 2001 г. провели исследование, направленное на выяснение роли АФП в активации синтеза цитокинов *in vitro*. Была изучена продукция IL-1β, IL-6 и TNF-β в клеточных культурах цельной крови 10 здоровых субъектов после поликлональной активации ЛПС в присутствии АФП. В результате проведенных экспериментов оказалось, что АФП интактен по отношению к изучаемым цитокинам [369].

E. Matsuura et al. из отдела биохимии Университета Хоккайдо проводили наблюдения за трансгенными мышами (TG-3, наличие гена-продуцента АФП человека) с аутоиммунным тиреоидитом. Контрольным мышам с аутоиммунным тиреоидитом вводили свиную пероксидазу щитовидной железы. Развитие тиреоидита, сопровождающееся мононуклеарной инфильтрацией клеток щитовидной железы, было зарегистрировано у 75% пролеченных контрольных мышей. Напротив, развитие аутоиммунных реакций значительно подавлено в опытной группе (у TG-3 мышей), с умеренными гистологическими изменениями ткани щитовидной железы в 12,5% наблюдений. Титры антител против ТПО в сыворотке у мышей контрольной группы достоверно были выше. В системе *in vitro* пролиферативная активность спленоцитов от TG-3 мышей была ниже, чем у контрольных животных. Зарегистрировано значительное снижение количества $CD4^+$- и $CD8^+$-спленоцитов, зрелых тимоцитов и $CD4^+$-тимоцитов у TG-3 мышей по сравнению с теми же показателями у мышей контроля [537]. Эти результаты свидетельствуют о перспективности использования АФП в качестве иммуномодулятора при развитии иммунопатологических состояний (например, болезнь Хашимото).

Большое внимание уделяется воздействию АФП на митотический цикл клеток. В работах 70–80-х годов исследовано антипролиферативное действие этого белка. Авторы отмечают зависимость эффекта от дозы АФП, степени очистки, типа клеток и состава среды [344]. В работах 90-х годов большое внимание уделяется синергетическим (усиливающим) свойствам АФП. Показано, что, не обладая митотическим действием, АФП значи-

тельно, в 2–3 раза, повышает эффект EGF [470], IGF и TGF-β [506]. Из других свойств АФП отмечается его регулирующая роль в метаболизме стероидных гормонов [286] и способность блокировать связывание антител с ацетилхолиновым рецептором, что препятствовало развитию экспериментального аутоиммунного заболевания miastenia gravis [307].

Экспериментально показано, что АФП может взаимодействовать и связывать цитоплазматические белки, которые в норме эскортируют ядерные факторы или транскрипционные кофакторы к поверхности органелл клеток. Имеющиеся на поверхности мембран АФП рецепторы служат для связывания ядерных факторов или иных кофакторов/ингибиторов [454, 553].

L. Sanches-Palazon et al. [630, 631] изучали локализацию АФП во время нормального формирования невральной трубки и сомитов у эмбриона овцы. Так, выяснено, что клетки миотома и склеротома являются АФП-позитивными, в то время как клетки дерматома – АФП-негативными. По мере развития клетки склеротома также становятся АФП-негативными. Эти данные в значительной мере подтверждают тесную связь АФП с клеточной пролиферацией и дифференцировкой.

Доказано, что АФП имеет на своей поверхности специальные сайты для связывания карбоксильных групп жирных кислот [575]. Таким образом, АФП обладает способностью связывать специфическим образом и полиненасыщенные жирные кислоты, в частности арахидоновую. Последняя, как известно, является основным предшественником для синтеза ПГ и ЛТ.

Цитохимическим методом доказано, что в лимфоцитах, стимулированных ФГА и инкубируемых с АФП и арахидоновой кислотой *in vitro* при 37 °С, значительно возрастает концентрация АФП, меченного пероксидазой хрена и нековалентно связанного с арахидоновой кислотой [394, 395]. Это, по мнению авторов, может быть доказательством того, что физиологическая роль АФП заключается в участии этого белка в переносе жирных кислот в цитоплазму клетки.

Также установлено, что АФП обладает регуляторным действием на концентрацию различных веществ – жирных кислот, эстрогенов, кортикостероидов, а жирные кислоты, особенно полиненасыщенные, модулируют эффекты различных стероидов и активность многих ферментов, вовлеченных в трансмембранную передачу сигнала [251, 579]. Предполагается также взаимодействие АФП с другими регуляторными белками, такими как факторы роста. В результате этого взаимодействия происходит ориентация клетки на пролиферацию или дифференцировку [578].

Работая как транспортный белок, АФП способен направленно доставлять регуляторные сигналы в клетки, имеющие рецепторы к АФП. Поскольку такие рецепторы обнаруживаются у делящихся клеток (в т. ч. опухолевых, клеток кроветворения, иммунитета и др.), то АФП фактически усиливает информационный контроль за правильностью реализации генетической программы пролиферирующих клеток и в значительной мере влияет на уровень их функциональной активности.

Обнаружено, что *in vitro* АФП обладает способностью ингибировать экспрессию MHC-II на поверхности МФ мышей, причем ингибирующий эффект не зависит от наличия в культуре Т-клеток [523]. В экспериментах на животных установлено, что многократное введение АФП или мышиной амниотической жидкости в общей дозе соответственно 8, 55 и 3 мг значительно угнетает как генерацию антителообразующих клеток (АОК) к эритроцитам барана (ЭБ), так и уровень анти-ЭБ-антител. Внесение АФП (12 мкг/мл) в культуру трансформированных ФГА лимфоцитов здоровых людей достоверно снижало уровень IgG и IgA в супернатантах этих культур [523].

Гетерогенный АФП, полученный из асцитной жидкости больных гепатомой, достоверно ингибировал СКЛ и РБТЛ на КонА лейкоцитов периферической крови человека. АФП из пуповинной крови так же достоверно угнетал ФГА-трансформацию лимфоцитов и СКЛ. Отмечено, что АФП, выделенный из амниотической жидкости, подавляет пролиферативный ответ лимфоцитов на ЛПС, не оказывая при этом митогенного влияния на интактные клетки. В культуре клеток АФП подавляет как первичный, так и вторичный ответы на ЭБ [600].

В отличие от данных по цитотоксическим лимфоцитам АФП не влиял на развитие цитотоксических реакций, индуцированных КонА, но стимулировал генерацию клеток-супрессоров, подавляющих однонаправленную СКЛ. Индуцированные Ts были способны угнетать генерацию ЦТЛ. Установлено, что под воздействием АФП моноциты продуцируют супрессорный фактор, который активировал Ts в СКЛ. Мышиный АФП в физиологических концентрациях угнетал как первичный, так и вторичный ответы тимоцитов в ауто-СКЛ [110].

Приведенный перечень данных характеризует АФП как белок с выраженными иммуносупрессорными свойствами. Видимо, поэтому в первую очередь его попытались применить для лечения аутоиммунных заболеваний. Так, способность АФП *in vitro* снижать реакции Т-зависимого гуморального и клеточного иммунитета успешно использовали для предотвращения развития аутоиммунных процессов у иммунодефицитной линии мышей New-Zeland [393].

Ряд работ посвящен взаимосвязи метаболизма стероидов, жирных кислот и АФП. Регулирующее влияние дексаметазона на экспрессию гена АФП было выявлено *in vivo* и *in vitro* в культурах клеток печени мышиных эмбрионов [610]. В то же время отмечена регулирующая роль АФП в метаболизме стероидных гормонов [286]. Выявлено ингибирующее влияние очищенного человеческого АФП на продукцию эстрадиола при стимуляции последнего фолликулостимулирующим гормоном, железистыми клетками свиней в монослойной культуре клеток [471].

В работах E. Nunez и J. Uriel сначала были обнаружены эстрогенсвязывающие функции АФП, а позднее – связывание с ним ненасыщенных жирных кислот, что, наряду с открытием рецепторов для АФП в различных клетках, создало основу для изучения транспортной функции АФП [579, 702]. АФП, выделенный из крови пуповины иммуноаффинной хроматографией, связывает ряд эндогенных жирных кислот и осуществляет их транспорт [276, 335]. Результаты исследований [575] указывают, что карбоксильная группа связанной жирной кислоты расположена близко к Lys223 человеческого АФП.

B. Bois-Joyeux et al. [302] экспериментально установили, что АФП плода не только связывает полиненасыщенные жирные кислоты, управляет их метаболизмом, но и сам подвергается их регуляторному влиянию на уровне транскрипции мРНК. Связь синтеза АФП с местами эмбрионального кроветворения, т. е. с желточным мешком и фетальной печенью, указывает на то, что он может участвовать в процессах дифференцировки клеток крови. Имеются данные, которые делают обоснованными поиски специфических АФП-рецепторов в эритробластах, а также изучение возможной роли АФП в переносе ненасыщенных жирных кислот в эритробласт.

Функция сывороточного альбумина у взрослых – транспортная, перенос низкомолекулярных веществ в ткани. АФП как бы заменяет сывороточный альбумин у эмбриона (его часто называют эмбриональным сывороточным альбумином), и его функция скорее

всего тоже транспортная. АФП обладает исключительно высоким сродством к полиненасыщенным жирным кислотам (ПНЖК), веществам, необходимым для построения клеточных мембран и особого класса биологически активных веществ – эйкозаноидов. Наиболее вероятная функция АФП – избирательное связывание ПНЖК в плаценте и перенос их из крови матери в кровь и клетки эмбриона. ПНЖК не синтезируются ни эмбрионом, ни взрослым организмом и являются незаменимым фактором питания. Поэтому должна быть специальная система их переноса из крови матери в эмбрион.

Сродство АФП к ПНЖК в 105 раз выше, чем у альбумина. Следует отметить, что ПНЖК входят в состав клеточных мембран, реализуются в синтезе ПГ и особенно важны для формирования нервной ткани. Транспортировка ПНЖК посредством связи с АФП происходит с изменением заряда и антигенных характеристик протеина, обусловленным конформационной перестройкой его третичной структуры. На модели переноса радиоактивно меченных ПНЖК в Т-лимфоциты показано, что в присутствии АФП их транспорт в клетки достоверно усиливался. АФП-опосредованное поступление ПНЖК в активированные Т-лимфоциты было достоверно более интенсивным по сравнению с таковым, установленным для покоящихся Т-клеток [691]. В культуре миобластов было также установлено связывание и поглощение меченного золотом АФП. В процессе дифференцировки миобластов в мышечные трубочки взаимодействие клеток с АФП и эндоцитоз белка значительно ослабевали. Предполагается, что развитие и дифференцировка мышечной ткани ведут к утрате рецепторов против АФП. В работе отмечено, что внесенный в культуру АФП связывался не только с клетками, но и со структурами экстрацеллюлярного матрикса [255].

Для выполнения транспортной функции в клетках эмбриона должны быть рецепторы к АФП-ПНЖК, с помощью которых доставка ПНЖК осуществляется в клетки плода. Однако такие рецепторы изучены еще очень мало. Проблема рецепторов для АФП представляется ключевой для понимания не только транспортной, но и других возможных функций АФП. Это одна из «горячих точек» исследования роли АФП в процессе развития.

Известно 4 вида мембранных рецепторов для АФП с молекулярными массами 18, 31, 60 и 62–67 kD [671, 69]. Первые два являются «рецепторами-мусорщиками» (scavenger receptors) и располагаются преимущественно на клетках сосудистого эндотелия. Их роль состоит в удалении из кровотока денатурированных и модифицированных молекул АФП и альбумина. Третий также обнаружен на поверхности эндотелия. Он является сиалогликопротеином и по своим свойствам приближается к четвертому, классическому АФП-рецептору, который выявлен на моноцитах, лимфоцитах, клетках репродуктивного тракта и ряда опухолей [671]. Кроме того, из эмбриональных тканей был выделен АФП-связывающий белок с молекулярной массой 320–380 kD. Помимо участка, взаимодействующего с АФП (аналог АФП-рецептора?), этот белок содержит IgG-связывающий сегмент. К настоящему времени получены МкАТ класса М (167Н.1 и 167Н.4) к АФП-рецептору, которые направлены непосредственно против сайта связывания АФП [255].

В. Ю. Каневский с соавторами [107] выделили рецептор АФП из опухоли молочной железы с высокой степенью пролиферации. По молекулярной массе, субъединичному составу и иммунологическим характеристикам рецептор опухоли совпадал с ранее выделенным эмбриональным рецептором АФП.

В исследованиях *in vitro* на культуре плодных клеток печени мышей, после обработки их трийодтиронином (T_3), установлено, что гормон принимает участие в транскрипции мРНК, переключая синтез АФП на синтез альбумина в гепатоцитах в процессе разви-

тия плода. Этот механизм может дать объяснение высокому уровню АФП при врожденном гипотиреозе [398]. В ходе исследований *in vitro* также установлено, что ретинойная кислота вызывает экспрессию гена АФП, а гормоны щитовидной железы обладают высоким сродством к АФП и способностью образовывать с ним комплексы [571]. Однако, по данным L. Falasca et al., ретинойная кислота, напротив, снижала синтез АФП в клетках гепатомы $HepG_2$ *in vitro* [363]. M. Zhang et al. в 2000 г. при изучении механизмов регуляции синтеза АФП указывают, что гамма-аминомасляная кислота способна ингибировать экспрессию мРНК АФП и пролиферацию клеток линии злокачественной гепатомы $HepG_2$ [743].

К настоящему моменту накопилось достаточное количество данных, демонстрирующих способность АФП отрицательно влиять на метаболизм и свойства эстрогенов. По данным B. A. Keel et al., АФП, выделенный из пуповинной крови или амниотической жидкости, дозозависимо, начиная с концентрации 313 нг/мл, ингибировал *in vitro* продукцию эстрадиола клетками фолликула, стимулированную комбинацией фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и IGF. Кроме того, в концентрации 125 нг/мл АФП ингибировал *in vitro* продукцию эстрадиола, стимулируемую токсином холеры. Продукция прогестерона была при этом нечувствительна к действию АФП [471]. Интересно, что АФП также может непосредственно влиять на экспрессию IGF [746].

S. H. Allen et al. из медицинского колледжа Олбани показывают антиэстрогенную активность АФП человека на мышах с активностью, не уступающей мышиному АФП, несмотря на только 66%-ную структурную гомологию между этими двумя белками [278]. Эти данные ставят под сомнение точку зрения о падении биологических эффектов АФП по критерию гетерогенности.

S. M. Festin et al. в своих исследованиях показали, что АФП связывает эстроген, который стимулирует рост клеток гормонозависимых форм рака молочной железы [366]. Авторы с помощью генно-инженерных методов воссоздали участок молекулы человеческого АФП. Полученная 1/3 С-конца (200 аминокислот) человеческого АФП была идентифицирована как домен III. Очищенный рекомбинантный домен III был функционально подобен целой молекуле естественного АФП, выделенного из сыворотки пуповинной человеческой крови или от культивируемых клеток гепатомы ($HepG_2$). Рекомбинантный (домен III) и естественный АФП ингибировали эстрадиолзависимую стимуляцию роста матки мыши. Следует отметить, что профили, реакции и дозы рекомбинантного домена III и полноценного АФП были идентичны. Эти результаты указывают, что антиэстрогенная активность АФП находится в пределах третьего домена молекулы АФП, что имеет очевидное значение для продукции биологически активных пептидов, производных от этой части молекулы АФП.

При изучении рекомбинантного (*E. coli*) и серологического (амниотического и пуповинного) АФП J. A. Bennett et al. пришли к заключению, что оба белка идентичны и в одинаковой степени проявляют антиэстрогенные свойства, которые определяют их терапевтическую значимость для лечения гормонозависимых раков молочной железы [298]. D. Vakharia et al. в 2000 г. экспериментально показали, что пептиды человеческого АФП (варианты P149) связывают рецепторы эстрогена и эстрадиол, а также *in vitro* подавляют рост раковых клеток молочной железы человека (6WI-101). Кроме того, P149 также подавляет *in vitro* рост опухолевых клеток MKF-7, MDA-MB-231, MDA-MB4-35 больше чем на 75% [703].

Согласно экспериментальным исследованиям F. B. Mesfin et al., АФП обладает антиэстрогенной активностью. С этим связано предположение о возможности создания на его основе лекарственного препарата для лечения эстрогензависимых опухолей молочной железы, а также для «экранирования» перехода доброкачественных гормонозависимых состояний, например мастопатии, в злокачественные формы [545]. Как сообщают авторы, антиэстрогенная активность АФП локализована в 34-мерной пептидной структуре молекулы АФП, состоящей из 447–480 аминокислот (P447). Исследователи путем замен парсингов и аминокислот в P447 попытались идентифицировать самую короткую аминокислотную последовательность для создания аналога, который сохранял бы антиэстрогенную активность. Было синтезировано несколько более коротких пептидов, включая октапептидный аналог, названный P472-2 (472–479 аминокислот, последовательность пептида EMTPVNPG). Пептиды короче 8 аминокислотных остатков эту активность теряли. Антиэстрогенная активность производных от молекулы АФП пептидов была протестирована на модели стимуляции роста матки мышей эстрадиолом. В результате исследований эстроген-подавляющие эффекты, показанные пептидом P472-2, составили 49%, пептидом P447 – 45% и полноценной молекулой АФП – 35–45%. Оказалось, что P472-2 был так же активен против стимулируемого эстрадиолом роста T47D человеческих клеток рака молочной железы в культуре. По этим данным, пептид P472-2 – минимальная последовательность в молекуле АФП, которая сохраняет антиэстрогенную активность. Синтетическая природа и определенная структура этого пептида с 8 аминокислотными остатками может быть использована в качестве нового лекарственного средства, которое будет способно блокировать последствия эстрадиола в развитии человеческого рака молочной железы.

L. E. Eisele et al. в 2001 г. создали синтетический пептид с 34 аминокислотами, полученный из третьего домена человеческого АФП и показавший ингибирующие свойства в отношении стимулированного эстрогеном роста клеток [358]. Уровень ингибирующего влияния пептида, по мнению исследователей, напрямую зависел от наличия двух его цистеинов в аминокислотной последовательности.

В аналитическом обзоре «Биологическая роль альфа-фетопротеина в эндокринологической области: данные и гипотезы» E. A. Nunez из Парижского университета UFR Xavier-Bichat утверждает, что АФП, в зависимости от окружающих условий, модулирует различные функции разнообразными механизмами [580]:

1. Регулирующее влияние АФП оказывает на концентрацию различных лигандов, например жирных кислот, эстрогенов, стероидов. Многочисленные исследования демонстрируют, что жирные кислоты, особенно полиненасыщенные, модулируют положительные или отрицательные сигналы для реализации различных биохимических программ стероидов и многих ферментов, вовлеченных в трансдукцию запущенных мембраной клетки сигналов.

2. Различные конформации (изоформы) АФП, в зависимости от природы и концентрации связанных лигандов, могли бы влиять на закрепление белка на удельных рецепторах мембран клеток и, как следствие, способствовать реализации его биологических свойств (интернализация, действие на мембранном пути трансдукции сигналов).

3. Независимо от механизмов, предложенных в п. 1 и 2, белок АФП может быть индуктором последствий, связанных с другими сигналами, например такими, как факторы роста. Природа связанных факторов роста и лигандов АФП может ориентировать клетки либо к пролиферации, либо к дифференцированию.

АФП, сывороточный альбумин и витамин D-связывающий белок – члены одного мультигенного семейства белков – показывают высокую структурную гомологию [661]. АФП и сывороточный альбумин взаимно соотносятся в течение развития организма: транспортируют главным образом жирные кислоты и вместе с витамин D-связывающим белком относятся к плазменным белкам. С помощью цитохимических исследований и электронной микроскопии установлено, что для трансферина – железосвязывающего белка плазмы (использован в качестве контроля), АФП, сывороточного альбумина и витамин D-связывающего белка на мембранах Т-лимфоцитов имеются сквозные одинаковые рецепторы, через которые осуществляется внутриклеточный эндоцитоз этих белков. Трансферин и АФП поступают в клетки через мембраны эндоцитозом и двигаются в мультивезикулярные тела и трубчатые везикулярные элементы. АФП, нековалентно сопряженный с 3Н-арахидоновой кислотой, легко проникает в ФГА-стимулированные лимфоциты. Сывороточный альбумин, который конкурирует с АФП за общее аггрегирующее местообитание на поверхности активированных Т-лимфоцитов, также проникает в клетки эндоцитозом. Витамин D-связывающий белок проникает в клетки более медленно и затем подвергается лизосомальному расщеплению. В связи с изложенным физиологическая роль АФП и сывороточного альбумина сводится к транспортировке жирных кислот в клетки, в то время как витамин D-связывающий белок способствует внутриклеточному катаболизму витамина D [394]. Аналогичный механизм внутриклеточного проникновения АФП и альбумина через везикулярную систему продемонстрирован M. A. Alava et al. на клетках гепатомы Morris 7777 у крыс [277].

G. J. Mizejewski (лаборатория человеческой генетики Нью-Йоркского отдела здоровья, Олбани) в аналитическом обзоре (1994) и в материалах «Слушания Общества экспериментальной биологии и медицины США» в 1997 г. обобщил современные представления о структуре и биологической роли АФП, где он представлен как онкофетальный белок, состоящий из трех доменов, классифицированный в суперсемействе вместе с альбумином, глобулярными белками и витамином D [554, 556]. Несколько областей субдомена АФП предположительно служат внутренними поверхностями для димеризации ядерных рецепторов или, возможно, являются кофакторами/ингибиторами.

Большое число научных работ появилось в связи с обнаружением, идентификацией и характеристикой различных аггрегирующих белков, связанных с АФП в различных клетках. Однако нет никаких попыток подвести итог, систематизировать и связать эти белки с различными физиологическими активностями, приписанными плодному белку АФП. На первый взгляд кажется сомнительным, что АФП в состоянии взаимодействовать и/или связать эндоплазматические белки, которые обычно сопровождают ядерные структуры или кофакторы транскрипции, осуществить их транспортирование сквозь цитоплазму к внутренним поверхностям органелл. Тем не менее концепция биологической роли АФП включает в себя возможность связывания и эскорта белковых структур на внутренних поверхностях субдомена молекулы АФП. Этот механизм наиболее вероятен для объяснения свойства АФП регулировать пролиферацию клеток, что стало уже аксиомой в течение последнего десятилетия. Таким образом, АФП мог быть модулятором процессов пролиферации и дифференцировки различных клеток в течение внутриутробного развития плода у позвоночных животных.

G. J. Mizejewski делает акцент на характеристике отрезков гомеодомена последовательности белка, так как АФП – эмбриональный, стадиоспецифический белок, найден-

ный в эмбриогенезе, гистогенезе, органогенезе, онкогенезе, а также при реализации программы репаративной регенерации (эпиморфоз, морфолаксис, регенерационная гипертрофия) [556]. В соответствии с гистогенезом доказана роль АФП в развитии склер и хрусталика глаза. Наконец, свойства АФП, представленные в свете членов суперсемейства иммуноглобулинов, по утверждению автора, являются тем фактором, который способен блокировать различного рода аутоиммунные нарушения. Структура АФП рассматривается с учетом положения в белковом семействе супергена относительно других членов семейства. В процессе онтогенеза ген АФП экспрессируется в различные временные промежутки в разных тканях, что выявлено путем идентификации мРНК АФП. На поверхности клеток имеются специфические рецепторы к различным молекулярным формам АФП. Потенциальная модель АФП представлена модульным/кассетным вариантом, где его последовательности сравниваются с фрагментами прогормонов и биологических модификаторов. Эти фрагменты могут потенциально участвовать в реализации сосудистых, нейроэндокринных и пищеварительных биологических взаимодействий. АФП, по-видимому, принимает участие в процессах закрепления фибрина, функционирования протеаз. Также АФП рассматривается как транспортный белок. Его функции основаны на структурных отношениях его с различными лигандами. Установлено, что АФП связывает тяжелые металлы и свободные радикалы, обладая свойствами антиоксиданта. Рассмотрев аминокислотные последовательности белковой структуры АФП и проанализировав факторы транскрипции и гомеодомены белка, автор сообщает о роли АФП в запуске реакций апоптоза опухолевых клеток.

L. Halme et al. считают, что повышение уровня сывороточного АФП у больных с хроническими неонкологическими заболеваниями печени или в случаях механических повреждений печени (включая травмы и ятрогенные вмешательства) свидетельствует о наличии процессов репаративной регенерации [416]. Эта точка зрения подтверждена B. T. Spear в 1999 г. в экспериментах на трансгенных мышах [664].

Еще одним важным аспектом АФП, на котором необходимо остановиться подробнее, является его значение в серологической диагностике опухолей.

1.5. ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ЭКТОПИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ АФП, ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

АФП стал одним из первых серологических маркеров опухолей, вошедших в широкую клиническую практику. В 1964 г. Ю. С. Татаринов обнаружил, что сыворотка крови больных первичным раком печени содержит эмбриональный сывороточный β-глобулин, что и положило начало иммунодиагностике гепатоцеллюлярной карциномы [217]. Несколько лет спустя наблюдения Ю. С. Татаринова были подтверждены и расширены, и, кроме того, впервые обнаружен сывороточный АФП у значительной части больных с тератобластомой яичка, что вскоре приобрело серьезное клиническое значение [270]. В 1968 г. Г. И. Абелев выдвинул гипотезу об АФП-синтезирующих клетках. Наиболее привлекательным в этой гипотезе было то, что для синтеза АФП в зрелой печени не требовалось дедифференцировки зрелых гепатоцитов, что представлялось маловероятным [8, 270]. В действительности картина оказалась сложнее, чем предполагали все эти гипотезы, хотя каждая из них была верной в определенных ситуациях.

Первый вопрос, который был решен, касался мест синтеза АФП в нормальном организме. Было показано, что основными участками синтеза АФП в эмбриогенезе являются

энтодерма желточного мешка и фетальная печень. Это обнаружено Н. В. Энгельгардтом с соавторами в 1973 г. [360]. Выводы были подтверждены различными способами; пожалуй, наиболее демонстративный из них – гибридизация *in situ*. В этом методе мРНК АФП выявляется гибридизацией на срезе ткани, комплементарной ДНК, обнаруживая тем самым истинные места синтеза АФП. Метод был модифицирован таким образом, что срез «отпечатывается» непосредственно на нитроцеллюлозную мембрану, где и проводится гибридизация. Проведение гибридизации на нитроцеллюлозе имеет серьезные преимущества перед другими поддерживающими средами, благодаря чему этот вариант превосходит обычные варианты гибридизации [109].

Тот факт, что АФП в раннем эмбриогенезе продуцируется в желточном мешке, обнаружил G. Teilum [685]. Н. В. Энгельгардт подтвердил это [360]. Поскольку обычным элементом тератокарцином является энтодерма желточного мешка, возникло предположение о продукции АФП в тератокарциномах, являющихся аналогом энтодермы желточного мешка. Таким образом, была выявлена причина реэкспрессии АФП в эмбриональных опухолях и показано, что конечные эмбриоспецифические структуры ответственны за продукцию АФП и в нормальных, и в опухолевых клетках. Можно было думать о том, что синтез АФП в энтодерме желточного мешка является конститутивным, всегда присутствующим в клетках этого типа. Однако очень тонкие исследования, проведенные M. Dziadek [356] в Оксфорде, показали, что синтез АФП в энтодерме желточного мешка регулируется контактом с экстраэмбриональной эктодермой. Такой контакт полностью, хотя и обратимо, подавляет синтез АФП. Это было исключительно важным выводом, впервые указавшим на возможную роль межклеточных взаимодействий в контроле синтеза АФП.

Способностью связывать и поглощать АФП обладает большинство фетальных клеток. Вместе с тем не все органы и ткани плода могут вырабатывать АФП. Как уже отмечено, его интенсивный синтез в эмбриогенезе отмечается в печени и желточном мешке. Необходимо отметить, что мРНК, кодирующие АФП, обнаружены также в энтодерме желудочно-кишечного тракта и мезонефросе плода; транзиторно они экспрессируются в клетках поджелудочной железы. После рождения продукция АФП в организме резко снижается [603]. Однако в различных популяциях лимфоцитов (кроме покоящихся Т-клеток) периферической крови здоровых людей обнаружены как мРНК для АФП, так и сами молекулы АФП. У взрослых мышей синтез АФП отмечен в спленоцитах на фоне развития реакции трансплантат против хозяина, а также при стимуляции селезеночных клеток в смешанной культуре лимфоцитов. Следует отметить, что основная часть лимфоцитов, продуцирующих АФП, имеет мембранные АФП-рецепторы. На основании этого факта выдвинута концепция об аутокринной регуляции пролиферации и созревания иммуноцитов. Суть ее состоит в том, что клетки, синтезирующие АФП, одновременно обеспечивают себя рецепторами для захвата извне собственного белка, нагруженного свободными жирными кислотами и ПНЖК. Физиологический смысл такой регуляции заключается, по мнению авторов, в самообеспечении клетки энергетически богатыми жирными кислотами. Примечательно, что АФП-синтезирующие клоны крысиной гепатомы McA-RH 7777 по сравнению с клонами, полученными из того же источника, но не продуцирующими АФП, обладали повышенной пролиферативной активностью и чувствительностью к инсулину. Также показано, что уровень экспрессии инсулиновых рецепторов на эмбриональных гепатоцитах и клетках McA-RH 7777 с АФП$^+$-фенотипом в 4 раза выше такового на гепатоцитах взрослых крыс и опухолевых клетках с АФП-фенотипом. Поступление

АФП в клетку обычно реализуется посредством пиноцитоза после связывания белка с мембранным рецептором [691]. Кроме того, в порядке дискуссии можно предположить, что АФП, имея в своем составе инсулиноподобный сегмент, в состоянии самостоятельно проводить сигнал через индуцированные им рецепторы для инсулина [255].

В 1967 г. J. Uriel et al. в Париже тщательно изучили АФП на крысах [701] и показали большую диагностическую значимость АФП-теста на очень большой группе пациентов из Западной Африки с первичным раком печени. Таким образом, к середине – концу 60-х годов как основные, так и клинические аспекты АФП-феномена были уже четко обозначены. Клинические исследования очень быстро продвигались вперед, особенно после того, как в 1969–1970 гг. АФП-тест был широко опробован в международном эксперименте, проведенном по инициативе Лионского агентства по изучению рака [582], а также после внедрения радиоиммунологического теста для изучения сывороточного АФП. Эта методика была разработана E. Ruoslahti и M. Seppala [620].

К концу 70-х годов успешно завершилось изучение клинических аспектов проблемы, включая специфичность и эффективность теста, его использование для контроля над лечением опухолей и для их ранней диагностики [5, 9, 109, 262, 608, 665]. В последнее время появились чувствительные методики идентификации АФП, основанные на иммуноферментном анализе, диск-электрофорезе, иммуноблоттинге, гибридизации, радиоиммунодиффузии, иммунофлуоресценции и полимеразной цепной реакции (ПЦР) на мРНК АФП.

Измерение уровня серологического АФП имеет как минимум два основных клинических применения: во-первых, выявление и мониторинг первичной гепатоцеллюлярной карциномы, которая возникает, как правило, в цирротической печени; во-вторых, мониторинг эффективности терапии и, в некоторой степени, диагностика гермином. Повышенный уровень АФП определяется также приблизительно у 9% пациентов с метастатическим поражением печени [501]; при злокачественных опухолях молочной железы [490], бронхов и колоректальной карциноме, однако, уровень АФП у таких пациентов редко превышает 100 нг/мл и практически никогда – 500 нг/мл [481]. С целью диагностики используют измерения уровня серологического АФП при гепатоцеллюлярном раке печени [338, 408, 409, 417, 452, 457, 459, 460, 531, 540, 643, 699, 711, 733, 734]. Помимо непосредственного измерения сывороточного АФП у обследуемых на наличие гепатоцеллюлярного рака печени, внепеченочных метастазов рака печени, прогрессирования хронических гепатитов, тестикулярных раков, гермином, наиболее перспективным методом оказалась ПЦР на определение мРНК АФП [425, 475, 521, 534, 535, 548, 552, 680, 722, 741]. После выполнения оперативных вмешательств на печени по поводу гепатоцеллюлярного рака [510, 721], тестикулярного рака [724] для определения вероятности метастазирования так же успешно был использован метод количественного определения мРНК АФП в ПЦР как интегрального показателя наличия гематогенных метастазов. X. M. Zhang et al. [744] удалось на основе принципа плазмиды создать очень чувствительный метод идентификации сывороточного АФП. Для определения АФП в биологических субстратах может быть использован метод иммунофлуоресценции в различных модификациях [442, 461, 468, 659, 731, 740].

Так как тесты на определение АФП обладают высокой чувствительностью, они также пригодны для раннего выявления гепатоцеллюлярной карциномы в группах риска, т. е. у пациентов с циррозом печени, хроническим HBs-позитивным гепатитом или у пациентов с дефицитом альфа-1-антитрипсина. Повышенный уровень АФП обнаруживается и при таком доброкачественном заболевании, как гепатит, однако повышение, как правило, носит

временный характер и находится в области низких значений патологического диапазона (очень редко превышает 500 нг/мл). У таких АФП-позитивных пациентов существует большая вероятность возникновения гепатоцеллюлярной карциномы, и они имеют худший пятилетний прогноз выживания [230]. В исследованиях J. R. Germa et al. установлено, что усиление синтеза АФП печенью возникает не только в процессе онкогенеза, но и в результате химического отравления, применения анестезирующих средств, антиэпилептиков, вирусной инвазии или хронического алкоголизма [391]. При развитии цирроза печени уровень АФП в сыворотке крови пациентов повышен [376] и является одним из показателей возможности перерождения цирроза в злокачественную гепатому [320, 336, 572, 632, 693]. D. S. Weinberg и P. F. Malet установили, что применение INF-β при лечении хронического гепатита С вызывает увеличение содержания АФП в сыворотке крови больных [716]. Кроме того, наличие хронического гепатита В и С сопровождается активным синтезом АФП в печени [331, 403, 407, 421, 473, 612, 692]. Ранее, в 1993 г., K. Nakamura et al. из отдела рентгенорадиологии Токийского университета *in vitro* доказали возможность усиления синтеза АФП при действии INF-β на гепатоциты мышей [567].

В исследованиях с использованием видоспецифичных антисывороток установлено, что при развитии у собак злокачественных новообразований печени или неонкологической патологии печени регистрируется повышенный синтез АФП [727]. Многочисленными исследованиями установлено увеличение синтеза АФП при развитии гепатоцеллюлярного рака [332, 337, 361, 489, 599, 668, 710]. Показано, что АФП-тест дает положительные результаты при 70–80% гепатоцеллюлярного рака и более чем в 80% случаев тератобластом яичка и яичника. В больнице педиатрической хирургии Тайваня из 30 обследованных детей, больных тестикулярными раками, в 89% случаев обнаружено повышенное содержание АФП в сыворотке крови [513]. Это подтверждают многочисленные наблюдения [341, 389, 390, 414, 491, 577, 609, 621, 640, 671, 717, 718]. Повышенный уровень синтеза АФП зафиксирован при тестикулярной опухоли у 3-месячного младенца и 3-летнего ребенка [386], а также у детей в предпубертатном периоде [413].

Чтобы понять гистогенез АФП (его эктопическую продукцию), срезы секретирующих тканей 148 опухолей различных органов были исследованы в отделении патологии Национальной больницы Фукуяма (Япония) на наличие АФП. Тип АФП, свойственный опухолям желточного мешка, был найден в эмбриональных раках, твердых тератомах, энтодермальных опухолях яичников, аденокарциномах желудка, яичников, легкого и метастатического рака печени. Печеночный тип АФП выявлен в гепатоцеллюлярных раках, гепатобластомах, твердых тератомах и раке желудка [377, 492, 589, 696, 698]. Увеличение уровня АФП в сыворотке крови зарегистрировано при колоректальных раках [694], а в моче пациентов – при развитии рака мочевого пузыря [633].

При изучении в условиях *in vitro* клеток гепатоцеллюлярного рака, полученных от 18 пациентов, установлено, что из общего количества клеток в G1-G2 и M-фазе в 2,24 раза было больше АФП-позитивных, чем АФП-негативных клеток, кроме этого также зарегистрировано больше окрашенных анаплоидных АФП-позитивных структур [483]. Для ответа на вопрос о непосредственной мутации в месте промотора гена АФП при возникновении гепатоцеллюлярного рака методом ПЦР изучена ДНК, полученная из клеток онкологических больных и пациентов, страдающих циррозом печени. Установлено, что экспрессия гена АФП не связана с мутацией в области промотора [444].

L. Arnould et al. [283] сообщают о достаточно редком явлении – эктопической продукции АФП злокачественной опухолью легкого. Еще более необычная локализация (ин-

траперикардиально) эмбриональной злокачественной АФП-позитивной опухоли зарегистрирована L. E. Bath et al. [294], M. Graf et al. [406], M. C. Sicari et al. [656]. Также описаны случаи синтеза АФП экстрагонадными энтодермальными синусовыми опухолями гениталий у женщин [373, 650]. Предпубертатные тератомы яичка входят в группу опухолей, способных к эктопическому синтезу АФП [405]. Есть сообщения о раке поджелудочной железы, способной синтезировать АФП [681]. О повышении уровня АФП у больных панкреонекрозом сообщают В. Т. Зайцев с соавторами [96]. Описаны случаи печеночной рабдомиосаркомы, связанной с синтезом АФП [275].

Как пишут в своем исследовании M. St. Laurent et al., АФП – клинически полезный маркерный белок для выявления гепатоцеллюлярного рака, гепатобластомы и несеминомных тестикулярных опухолей [667]. Сыворотка крови с повышенным содержанием АФП может также встречаться при наличии опухолей желудочно-кишечного тракта, поджелудочной железы, легкого, почки и мочевого протока. Сыворотка крови может содержать увеличенные количества АФП и в доброкачественных условиях, включая острый и хронический гепатиты, цирроз и беременность. Сообщения о раке желчного пузыря, который синтезирует АФП, чрезвычайно редки, и почти все характеризуют сосочковые раки. До сих пор в мировой литературе известны только два отчета, которые описывают недифференцированный рак желчного пузыря с сывороткой, имеющей повышенный уровень АФП. Авторы представляют два наблюдения: один случай недифференцированного рака желчного пузыря и другой – низкодифференцированного рака желчного пузыря с увеличенным содержанием АФП в сыворотке крови больных.

Особенно высока частота АФП-положительных случаев при детских гепатобластомах. Ложноположительные случаи встречались при беременности, остром гепатите, реже при циррозах печени и метастатических опухолях печени, причем низкие уровни АФП в этих случаях или его перемежающаяся динамика помогают в постановке дифференциального диагноза. Оценка эффективности лечения АФП-положительных опухолей рутинно применяется в клинике и позволяет установить радикальность операции или химиотерапии и, что особенно важно, выявить рецидивы и метастазы задолго до появления клинических симптомов. Использование АФП-теста особенно плодотворно при терминальных тератобластомах. Сотрудниками Университетской медицинской школы Iwate (Япония) описан случай эктопической продукции АФП опухолью пинеальной железы [478]. Аналогичные наблюдения зарегистрировали и другие исследователи [451, 624]. Обнаружена эктопическая продукция АФП герминомой [303, 424, 430, 538, 593, 614]. Повышенное содержание АФП регистрируется при эмбриональных карциномах, тератомах [328, 342, 573, 576] и нейрогерминомах [429] врожденных и приобретенных [329, 596, 658].

Что касается использования АФП в ранней диагностике опухолей, то главное здесь – выделение группы высокого риска. Там, где она может быть выделена, например в районах Китая с высокой частотой гепатоцеллюлярного рака, АФП-тест позволяет выявить больных с еще операбельным раком печени. Коллектив исследователей из медицинского колледжа Фучжоу (Китай) показал высокую диагностическую ценность теста на определение АФП в слюне больных гепатоцеллюлярным раком, не уступающего иммуноферментному анализу АФП в сыворотке крови пациентов [737]. В целях проведения дифференциальной диагностики между злокачественными новообразованиями и другими заболеваниями, способными спровоцировать появление асцита в брюшной полости (кардиогенный, туберкулезный, панкреатитный, в случае портальной артериальной гипертензии и др.), целесообразно также тестирование на наличие АФП, т. к. иные тесты,

используемые в этих целях (фибронектин, холестерин), дают ложноположительные результаты [618]. Не менее полезным оказалось измерение сывороточного АФП при проведении дифференциальной диагностики между доброкачественными и малигнизированными аденомами, забрюшинными эмбриональными опухолями [381] .

Весьма полезно с диагностической точки зрения было использование тестирования сывороточного АФП при метастатическом поражении печени опухолями внепеченочного происхождения, при выявлении аденокарциномы прямой кишки [485, 595], при гепатопанкреатогенном раке [522, 597], раке желудка [586, 306]. A. Aydiner et al. показали диагностическую значимость теста на индикацию АФП при костных метастазах рака молочной железы [287], Y. Sadamoto et al. – при костных метастазах гепатоцеллюлярного рака [623].

Исходя из известного факта – наличия рецепторов к АФП на мембранах клеток эстроген-позитивных злокачественных опухолей молочной железы, была показана диагностическая возможность использования меченного Tc-99m нативного и рекомбинантного АФП для верификации диагноза [515].

Установлена диагностическая ценность измерения уровня АФП при аденокарциноме желудка [281, 561, 570, 653, 695, 725], причем измерение АФП целесообразно для дооперационного определения стадийности желудочного рака [465, 732], рака яичников [304, 496, 558, 613, 669]. K. Iwai et al. [450] и N. Eriguchi et al. [362] описаны наблюдения эктопической продукции АФП при аденокарциноме поджелудочной железы. В аналитическом обзоре, посвященном роли индикации онкофетальных антигенов, в частности АФП, в раннем выявлении опухолевой патологии, оценке лечения рака и своевременном выявлении рецидивов и метастатического процесса, M. K. Schwartz приводит неопровержимые аргументы в пользу информативной ценности АФП-мониторинга [637].

По снижению уровня АФП определяют эффективность специфической терапии и оперативных вмешательств у пациентов с гепатоцеллюлярным раком [311, 330, 371, 419, 420, 445, 474, 516, 518, 519, 527, 557, 587, 590, 627, 651], эффективность проводимой лучевой, химиотерапии и хирургического лечения при опухолях яичка [305, 357, 380, 446, 486, 494, 565, 684, 709, 728], а также при иных формах онкопатологий [322, 323, 324, 507, 559, 560, 569]. По увеличению уровня сывороточного АФП у больных, оперированных по поводу гепатоцеллюлярного рака, определяют своевременность проведения активных лечебных мероприятий [387, 435, 652, 655, 679, 745].

На первый взгляд парадоксальные результаты получены специалистами Китайского университета Гонконга, когда при весьма эффективном лечении неоперабельных раков печени селективной интраартериальной радиотерапией I^{131} у больных, ответивших на лечение более чем 50%-ным уменьшением опухолевой массы, отмечено резкое увеличение уровня сывороточного АФП, тогда как в группе больных, не ответивших на лечение, или при регрессии опухолевой массы менее 20% уровень АФП в сыворотке крови сохранялся на прежнем уровне [511]. Эти результаты свидетельствуют о связывании АФП с рецепторами клеток гепатоцеллюлярного рака (феномен иммунологического усиления роста опухоли) и его освобождении при гибели опухолевых клеток под воздействием радиотерапии.

Разнообразие свойств и особенности проявлений функциональной активности АФП привлекают к нему все большее внимание, как диагностическому маркеру в неонатологии и ряде неонкологических заболеваний, а также физиологических состояний организма. Наибольшее распространение получили иммуноферментные методы определения АФП в сыворотке крови и амниотической жидкости у беременных. Главные направления

АФП-диагностики – это, во-первых, мониторинг беременности и выявление генетических и соматических пороков развития плода, во-вторых, выявление и контроль эффективности лечения некоторых онкологических заболеваний.

Независимый практический аспект использования АФП был открыт D. Brock и R. Sutcliffe в 1972 г. [309]. Они продемонстрировали резкое повышение уровня АФП в амниотической жидкости при дефектах нервной трубки у плода. Эти исследования позволили развить очень плодотворную область пренатальной диагностики некоторых врожденных дефектов развития [649].

Изучению возможностей АФП-диагностики в акушерстве посвящено достаточно много работ. Наиболее подробно этот вопрос освещен в аналитическом обзоре К. В. Шмагеля и В. А. Черешнева «Альфа-фетопротеин: диагностическое значение в акушерстве» [256]. В амниотической жидкости концентрация АФП достигает максимума обычно на 10-й неделе беременности. В крови здоровых беременных женщин повышение уровня АФП наблюдается с 11–14-й до 31–32-й недели, а затем постепенно снижается. Через несколько недель после родов АФП в сыворотке крови матери определяется в очень малых количествах.

Известно, что сформированная плацента не позволяет свободно диффундировать АФП в амниотическую жидкость [310]. Высокие показатели АФП в амниотической жидкости беременных со сроком развития плода от 16 недель с большой долей вероятности могут свидетельствовать о внутриутробных аномалиях [319, 378, 379, 440, 502, 514, 615, 657]. Значения АФП, существенно превышающие нормальный уровень для конкретного периода беременности, могут быть обусловлены, наряду с другими причинами, дефектами нервной трубки. Аномально низкий уровень АФП после 10-й недели беременности может рассматриваться как свидетельство синдрома Дауна. Для мониторинга антенатального периода также важно тестирование АФП в амниотической жидкости. Как правило, выявление существенно повышенного уровня АФП в амниотической жидкости (при единичной беременности) говорит о весьма высокой вероятности дефекта нервной трубки [500].

I. M. Penttila et al. [602] из отделения клинической химии больницы Университета Куопио (Финляндия) считают, что высокие уровни АФП в материнской сыворотке связаны с отклонениями плодных структур подобно нейральным дефектам трубки, передней брюшной стенки и врожденному нефрозу. Тест имеет очень высокую степень обнаружения, когда используется для выявления таких аномалий развития [295, 296, 370, 379, 396, 423, 441, 462, 488, 520, 712]. Эти результаты тестирования имеют принципиальное значение в экономически развитых странах для принятия решения родителями о сохранении беременности и судьбе будущего ребенка [410, 530]. Однако по наблюдениям R. Ryty et al. повышение серологического АФП у женщин во втором триместре периода вынашивания может быть связано с наличием мультиплодной беременности [622]. Также известно, что при внезапном повышении уровня сывороточного АФП во втором триместре беременности (в норме АФП уменьшается с увеличением срока беременности) возникает реальная угроза невынашивания плода и досрочных родов [541].

Есть данные о возможности пренатальной диагностики трисомии 21-й хромосомы [616, 648], в том числе монозиготных двойников [666, 706], пре- и постнатальной диагностики трисомии 18 [295, 367, 666], связанной с множественными гепатобластомами [686], трисомии 8 [546], анэнцефалии и нарушения структуры 13-й хромосомы с учетом ориентации на количество сывороточного АФП [297, 312, 479]. L. J. Williams et al. описывают

случаи увеличения серологического АФП при развитии врожденных носоглоточных тератом [720].

С другой стороны, низкие уровни материнского сывороточного АФП рассматриваются как маркерный фактор многих плодных хромосомных аберраций [288]. В частности, неоценимую роль играет АФП-мониторинг в «экранировании» аутосомных нарушений, касающихся синдрома Дауна [274, 300, 347, 438, 477, 547, 581, 629, 682, 713].

M. Nesin et al. [571] сообщают, что, несмотря на отсутствие у плода 33-недельного срока развития каких-либо аномальных отклонений по данным ультразвукового обследования, в амниотической жидкости был высокий уровень АФП, который свидетельствовал о наличии атриовентрикулярного буллезного эпидермолиза и пилорической атрезии. Аналогичные результаты АФП-мониторинга при выявлении буллезного эпидермолиза с пилорической атрезией приводят ряд исследователей [293, 318, 350, 464, 526, 654].

Y. Dror et al. установили, что повышенный уровень серологического и амниотического АФП может свидетельствовать об аномалиях развития опорно-двигательного аппарата плода и даже о возможной внутриутробной мумификации плода после его гибели (плацентарный тромбоз) [351]. О связи плацентарных дефектов и высоких показателях амниотического и сывороточного АФП сообщают J. G. Rodriguez et al. [617] и A. Jaffa et al. [455].

Одной из итоговых работ, послужившей систематизации мониторинга внутриутробных аномалий, является исследование тайваньских специалистов по стандартизации нормальных уровней материнского сывороточного АФП во всех триместрах беременности [324]. О высокой диагностической ценности измерения АФП даже при отсутствии ультразвуковой верификации сообщается при наличии внематочной беременности [453]. T. Ishiguro и Y. Tsuchida из Университета медицинской науки (Ohtsu, Япония) детально изучили клиническое значение определения серологического подфракционирования АФП в педиатрических болезнях [447].

Вопросы физиологии беременности естественным образом перекликаются с проблемами трансплантологии. В отделении урологии клиники Университета Осаки (Япония) проведен мониторинг сывороточного АФП у 36 пациентов, перенесших трансплантацию почки. В результате исследования установлено, что при угрозе отторжения пересаженных почек уровень серологического АФП был значительно повышен. При приживлении органа или отсутствии его отторжения уровень АФП снижался до нормальных показателей. Это может свидетельствовать о защитной (иммуносупрессорной) роли АФП при развитии угрозы иммунологического конфликта между донорским органом и организмом реципиента [641].

Таким образом, идентификация АФП, практическое определение его в качестве маркера в онкологии, неонатологии и других заболеваниях, является незаменимым информационным источником, позволяющим на ином, более высоком уровне оценивать суть биологических явлений, протекающих в организме при физиологических и патологических состояниях.

1.6. КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ФЕТАЛЬНЫХ ПРОТЕИНОВ (АФП: генная терапия, апоптоз, иммунологическая толерантность и специфическая иммунотерапия)

Первые научные сообщения об опыте лечения различных заболеваний эмбриональными субстанциями относятся к началу прошлого века. Гомогенаты, мази и экстракты из эмбриональных тканей применялись для лечения экспериментальных инфицированных ран у крыс, в геронтологической практике, для лечения трофических язв у человека [30].

В 1944 г. Д. И. Гольдберг применил 10%-ную мазь из эмбрионов животных для лечения плохо заживающих ран и получил выраженный противовоспалительный и десенсибилизирующий эффект [69]. В 30-х годах гомогенаты и экстракты из эмбриональных тканей и органов были применены в противоопухолевой терапии. Теоретической предпосылкой этих работ явилась гипотеза G. Ficher о том, что причиной злокачественного роста является нарушение в организме «онкогенного равновесия» и законов, управляющих клеточным размножением [368]. G. Ficher и его последователи [529] наблюдали, как под влиянием введенных гомогенатов эмбриональных селезенки и тимуса у онкологических больных происходило замедление роста опухолей, а в некоторых случаях даже рассасывание новообразований. Затем они применили экстракты из этих тканей и убедились, что их действие не менее эффективно. При введении эмбриональных экстрактов непосредственно в опухоль наблюдалось более интенсивное разрушение трансформированных клеток, нежели при внутримышечных инъекциях. При обратном развитии опухолей шел диффузный цитолиз неопластических элементов, развивалась мелкоклеточная инфильтрация вокруг сосудов, появлялись гигантские клетки, наблюдалась замена опухолевых элементов рубцующейся соединительной тканью.

Тормозящие злокачественный рост факторы вырабатываются плацентой и тканями эмбриона. Поэтому появились исследования опухолевого роста во время беременности. В экспериментах на крысах продемонстрировано, что при беременности рост карциномы задерживается на 33%, а рост саркомы – на 75%. После родов, во время лактации, рост опухолей у этих животных ускорялся [154]. Проведенный анализ статистических данных также свидетельствовал о крайне редком сочетании беременности и рака у женщин [68, 263]. Известно, что у женщин, имевших неоднократные полноценные роды, снижен риск заболевания раком молочной железы. Напротив, рак молочной железы, сопровождающийся беременностью, зачастую приводит к быстротечному прогрессу онкозаболевания [436]. Исследования на большой выборке родивших женщин привели к неожиданным результатам. Так, достоверно установлено, что женщины, рожавшие преимущественно детей мужского пола, были менее подвержены онкологическим заболеваниям молочных желез [436].

M. Melbye et al. обращают внимание на то, что беременность полного срока связана со снижением риска заболевания раком молочной железы, однако основной механизм подобного феномена не был объяснен [543]. Как считают авторы, в течение беременности материнские серологические уровни АФП (эстрадиол-аггрегирующего белка) резко повышаются. В культуре АФП ингибирует рост чувствительных к эстрогену клеток, включая чувствительные к нему клетки рака молочной железы. Таким образом, исследователи попытались ответить на вопрос, связан ли высокий уровень АФП в материнской сыворотке в течение беременности со сниженным риском грудного рака. Под наблюдением в Дании с 1978 г. по 1996 г. состояло 42 057 беременных женщин, у которых удалось проследить ре-

продуктивную историю, витальный статус и возможный диагноз рака молочной железы (в 117 случаях) до конца 1998 г. В течение беременности женщины с уровнем АФП, большим или равным срединному физиологическому значению, имели на 41% более низкий риск заболеваемости раком молочных желез, чем женщины с уровнем АФП ниже срединного значения. Проанализированные случаи заболевания раком молочной железы позволили сделать следующие заключения. Женщины, имевшие во время беременности более высокие уровни серологического АФП, заболевали менее злокачественными и медленно прогрессирующими формами рака молочных желез. Напротив, у женщин с быстро прогрессирующими и более злокачественными формами рака молочной железы в анамнезе предыдущих беременностей уровень сывороточного АФП был несколько ниже средних физиологических значений. Также отмечено, что эта зависимость особенно характерна для женщин, у которых беременность протекала в молодом возрасте.

Возвращаясь к исследованиям 30-х годов, необходимо остановиться и на попытках использования эмбриональных экстрактов в качестве вакцин. Именно тогда было впервые показано, что введение крысам эмбриональной ткани за 2–3 недели до пересадки саркомы Иенсена приводит к отторжению опухолевых клеток. Тогда же была замечена и неоднозначность эффекта: одновременное введение экстракта и опухоли приводило в некоторых случаях к ускорению роста саркомы [167].

В исследованиях Р. Л. Ольшанецкой при лечении опухолей крыс (саркомы Иенсена, саркомы Синельникова – Кричевского и карциномы Флекснера – Джоблинга) экстрактами из эмбриональных тканей были получены следующие результаты: 1) заметное уменьшение опухоли либо торможение ее роста во время инъекций и возобновление роста после прекращения лечения; 2) удлинение продолжительности жизни подопытных крыс даже при наличии большой массы опухоли; 3) отсутствие метастазов у крыс, леченных эмбриональным экстрактом; 4) резкое снижение прививаемости опухоли у крыс, которым ранее вводился экстракт [167].

При проведении экспериментов замечено, что гетерогенные экстракты (человеческие, применяемые на крысах) дают значительно меньший эффект. Более выраженное действие наблюдалось у самок, нежели у самцов. Наиболее целесообразным оказывалось применение экстракта при небольшой массе опухолей.

Сходные результаты получены и при лечении группы больных. В период проведения лечения наблюдалась регрессия опухолей и улучшалось самочувствие пациентов. Результаты контрольной биопсии показали наличие дегенеративно-экссудативных процессов в виде некроза и некробиоза, отека и лейкоцитарной инфильтрации. Однако в ряде случаев по окончании лечения рост опухоли возобновлялся. В процессе терапии наблюдалось нарастание гемоглобина и эритроцитов, уменьшалось количество эозинофилов, отмечалась нейтрофилия. Автор делает вывод о том, что экстракты влияют на общую сопротивляемость организма.

В 50–60-х годах велись исследования противоопухолевого действия плацентарных и эмбриональных экстрактов. В результате было показано, что препараты эмбриональных и плацентарных тканей задерживают рост и метастазирование опухолей, вызывают рассасывание опухолевых очагов.

Анализ современных литературных данных и патентной документации свидетельствует о том, что в настоящее время во многих странах мира делаются попытки применения препаратов из эмбриональных тканей в противоопухолевой терапии. При приготовлении препаратов используют эмбрионы животных, птиц, абортивный материал челове-

ка. Во Франции, Германии, США, Японии для лечения опухолей, болезней крови, иммунных расстройств, ожогов, хирургических ран с успехом применяются экстракты, эмульсии, лиофилизаты из органов эмбрионов различных животных, из материнской и плодной части плаценты [41, 542, 660].

Основными компонентами эмбриональных экстрактов являются онкофетальные белки. Помимо онкофетальных белков препараты из эмбриональных и плацентарных тканей, несомненно, несут в себе комплекс биологически активных веществ: ростовых факторов, интерлейкинов, интерферонов, макрофаг-стимулирующих факторов и др. [32, 251, 321, 588]. Высокий уровень достижений на всех направлениях противоопухолевой терапии не обеспечивает, к сожалению, удовлетворительных результатов. Именно поэтому все чаще говорят о «технологиях лечения», вкладывая в это понятие представления о комплексном подходе, предусматривающем воздействие как на опухоль, так и на организм в целях стимуляции противоопухолевых реакций или иммунореабилитации больного [719].

Методы лечения опухолевых заболеваний, имеющие целью стимуляцию противоопухолевых иммунных реакций, стали развиваться еще в начале прошлого века. Однако отсутствие ясности в механизмах действия фетальных субстанций тормозит работы по широкому применению этих методов в клинике, хотя исследования в этой области не прекращаются. Попытки теоретического осмысления полученных результатов делались, несомненно, в правильном направлении, но были затруднены отсутствием фактов о молекулярных, генетических и клеточных механизмах регенерации и злокачественного роста и, в соответствии с этим, реакции организма-опухоленосителя на эмбриональный имплантат.

Данные научных исследований последнего десятилетия позволяют предположить, что фетальную терапию следует рассматривать как активную специфическую иммунотерапию, направленную на стимуляцию в организме, пораженном злокачественным процессом, реакций против антигенов опухолевой клетки, относящихся к группе онкофетальных белков.

В результате исследования генетических событий, приводящих к экспрессии в опухоли фетальных белков, установлено, что существует по крайней мере несколько механизмов туморогенеза, каждый из которых имеет аналогию с эмбриогенезом. Например, активация ростостимулирующих генов, большинство из которых относятся к онкогенам [642]. Конкретные пути включения этих, по сути, эмбриональных и в норме зарепрессированных структур могут быть самыми разными. Например, химические канцерогены реализуют свой потенциал путем гипометилирования ДНК, амплификации онкогенов [544]; радиоактивное воздействие может приводить к индукции мутаций и хромосомных аберраций; онкогенные вирусы могут встраиваться в геном, включая «молчащие» гены своими сильными промоторами [63, 290]. В результате этих событий в клетке вырабатываются белковые продукты онкогенов. Это, как правило, или эмбриональные формы ферментов, отвечающих за активацию клетки, или факторы роста, что обеспечивают аутокринную регуляцию клеточной пролиферации [94, 388]. Сходная картина активации клеток наблюдается при репаративной регенерации [74, 124]. Принципиальным отличием является то, что опухолевая клетка не воспринимает регулирующие сигналы и пролиферирует бесконтрольно.

В настоящее время разработана достаточная методологическая база и накоплены знания, позволяющие сформулировать основные теоретические подходы к сознательному вмешательству во взаимоотношения, складывающиеся между организмом и опу-

холью. Пассивная иммунотерапия нацелена на повышение защитных возможностей пораженного опухолью организма путем введения специфических противоопухолевых субстанций извне. В таком качестве могут быть использованы сыворотки от онкобольных [216] и отдельные сывороточные фракции. Несмотря на то что в литературе имелись публикации о клиническом эффекте при использовании этих методов, широкому распространению их препятствуют ряд причин: трудности получения высокого титра антисыворотки, быстрая элиминация из организма введенных антител, кратковременный эффект, зарегистрированная в некоторых случаях стимуляция опухолевого роста [605].

Методы общестимулирующего воздействия на иммунитет хотя и приводят к положительным результатам, но имеют много противопоказаний и осложнений. Наиболее адекватными представляются пути активации узконаправленных противоопухолевых клонов иммунокомпетентных клеток. Именно к этому типу активной специфической иммунотерапии относятся попытки применения лизатов и аутолизатов опухолевых тканей. Анализ отдаленных результатов этой терапии показал, что количество больных, проживших более 10 лет, почти в 2 раза больше, чем при других видах лечения (51,2% против 28,7%) [45]. Однако широкому применению этих методов препятствуют такие факторы, как слабая антигенность клеток спонтанных опухолей, опасность приживления опухолевых клеток, технические проблемы получения стандартных препаратов [44]. Эти недостатки можно устранить, применяя отдельные белки опухолевых клеток, на роль которых вполне подходят онкофетальные протеины, выделяемые из эмбрионов животных или абортивного материала человека [87]. В настоящее время невозможно не принимать во внимание накопленный материал по позитивному эффекту противоопухолевой терапии фетальными субстанциями, явно содержащими антигенный комплекс, включающий и онкофетальные белки.

Дальнейший прогресс экспериментальной и клинической иммунологии позволил выяснить некоторые аспекты реакции организма-опухоленосителя на введение эмбрионального экстракта и АФП. Вклад в развитие этого направления внесен научной школой под руководством академика АМН СССР, профессора Н. В. Васильева [23, 44–47, 170, 180–188].

Онкофетальные поверхностные белки малигнизированных клеток рассматриваются в противоопухолевой терапии в качестве мишени для МкАТ. В связи с развитием технологии получения гибридов появилась реальная надежда на появление высокоспецифичных МкАТ, пригодных для клинического использования [512]. Однако пока преждевременно делать какие-либо заключения об успехах или неудачах данного подхода, в котором технические трудности получения МкАТ соседствуют с теоретическими проблемами антигенной специфичности опухолевых клеток. Практически все антигены, описанные как специфичные для меланомы, рака кишечника, легкого, яичника, печени и ряда других опухолей, при дальнейшем исследовании определены как нормальные дифференцировочные маркеры определенных стадий клеточного цикла [487]. Впрочем, это не является непреодолимым препятствием, так как опухолевые клетки экспрессируют эти маркеры в гораздо большем количестве, чем здоровые клетки взрослого человека. В полной мере все это касается и АФП, на примере которого можно проследить основные принципы применения МкАТ.

Понятно, что именно опухоли с эктопическим синтезом АФП стали объектом внимания в плане лечения анти-АФП-антителами [495]. Результаты первых опытов показа-

ли, что эффективность применения антител против АФП, полученных путем гиперимунизации обезьян, лошадей, кроликов, коз, баранов, оказалась недостаточной, поэтому в настоящее время пытаются использовать для терапии опухолей конъюгаты антител с токсинами и цитостатиками (рицин, дифтерийный токсин, дауномицин, митомицин С, 5-FU) [327, 466, 467]. При этом достигаются следующие цели: повышение эффективности противоопухолевой терапии и снижение токсичности за счет адресной доставки токсина к опухолевой клетке-мишени.

Неоднократные попытки лечения гепатоцеллюлярного рака антителами против АФП изолированно [476] и в сочетании с цитостатиками, токсинами и цитокинами [365] наталкивались на проблему увеличения сывороточного АФП. В исследованиях на мышах линии Nude, несущих клетки HuH-7 человеческой гепатомы, K. Masuda et al. в 1993 г. пришли к аналогичным результатам, когда на введение антител против АФП уровень серологического АФП неизменно поднимался [532, 533]. Авторы предлагают с осторожностью оценивать результаты лечения, ориентируясь на титр сывороточного АФП. Как отмечает большинство авторов, при терапии МкАТ токсичность остается высокой и проявляется лихорадкой, сыпью, артралгией.

Сдерживают широкое внедрение в клинику этих методов следующие причины:

1. По окончании введения МкАТ заболевания, как правило, прогрессируют. Снижение эффекта может быть связано с явлением антигенной модуляции, которое заключается в исчезновении с поверхности клеток антигенов в результате действия на них специфическими антителами [636].

2. Опасность развития в ходе терапии гломерулонефрита вследствие связывания МкАТ с опухолевыми антигенами, свободно циркулирующими в крови [10].

3. До настоящего времени остается не вполне понятным и вопрос о механизме противоопухолевого действия МкАТ. Наиболее обосновано предположение, что антитела включают клеточно-опосредованную деструкцию опухоли [428].

С учетом того, что одним из экспрессируемых опухолью белков служил АФП, были предприняты попытки лечения неоплазм с использованием антител к нему как в чистом виде, так и в конъюгате с токсинами. Однако эффективность такого лечения была признана не вполне удовлетворительной [327, 466, 467, 495].

Одним из путей преодоления негативных последствий от введения экзогенных иммунорегуляторов является генная терапия – бурно развивающееся в настоящее время направление, ставящее своей задачей селективное воздействие на опухоль агентами, полученными генно-инженерным путем. Цель генной терапии – удаление дефектных генов, замена их нормально функционирующими участками, привнесение в клетку новой генетической информации. В качестве мишеней используются опухолевые клетки, лейкоциты, кроветворные клетки, эндотелиальные клетки, эпителий воздухопроводящих путей. Нужные гены доставляются в клетку различными путями: 1) прямым введением ДНК, которая очень легко проникает через мембрану и может либо экспрессироваться, либо деградировать; 2) ретро- или аденовирусными векторами; 3) введением липосом с ДНК; 4) введением искусственных хромосом и т. д. [715]. В литературе есть сообщения об успешном применении этого метода в онкологии [340]. Генетической модификации подвергались опухолевые клетки и $CD8^+$-резидентные ЦТЛ, полученные из биоптата опухоли. После соответствующей подготовки в клетки вводили гены TNF, IFN-γ или IL-2, затем сами клетки вводили обратно в организм, повышая иммунные реакции в опухолевом очаге [334].

Широкие возможности открываются и в плане генетической реконструкции малигнизированной клетки. Так, известно, что злокачественный рост часто сопровождается утратой гена P53, который является супрессором неконтролируемой пролиферации. Введение этого гена в опухоль ретровирусным вектором приводило к деструкции клеток путем апоптоза [386].

В качестве одного из перспективных направлений рассматривается применение генно-инженерных методов в сочетании с фетальной терапией [130]. R. Bilbao et al. [301], A. Ido et al. [443], T. Hirano et al. [432] для лечения гепатоцеллюлярного рака *in vitro* и *in vivo* предложили использовать рекомбинантные векторы, несущие ген киназы тимидина вируса простого герпеса, и целенаправленно доставлять их в опухолевые клетки посредством АФП. R. Gerolami et al. [392] предложили использовать аденовирусные векторы. Аналогичные исследования по разработке методов генной терапии рака были предприняты и другими авторами [316, 411, 415, 449, 585, 592, 625, 676]. Попытки генной терапии злокачественных гепатом включали создание на основе технологии плазмиды АФП-IL-2 комплекса [426].

Y. Murayama et al. [562] и M. Kunitomi et al. [493], развивая направление генной терапии рака, с целью селективной доставки цитотоксических агентов к опухолевым клеткам, имеющим рецепторы к АФП, создали плазмиду, содержащую фрагмент токсина дифтерии, сопряженный с человеческим АФП, и провели тестирование на предмет эффективности лизиса опухолевых клеток таким комплексом. A. A Savitsky et al. применяли ковалентно связанные конъюгаты АФП и EFR с фотогемом, хлорами и фталоцианинами для «адресной» доставки к опухолевым клеткам соединений, обладающих цитотоксическим действием [635]. Аналогичные исследования противоопухолевых свойств конъюгата карминомицина с АФП и эпидермальным фактором роста были выполнены *in vitro* на культурах MCF-7, SKOV3, QOS, P388 и B16 опухолевых клеток. *In vivo* противоопухолевая активность конъюгата изучена на перевивных моделях B16 и P388 у мышей с подкожными опухолями [525]. Авторы отмечают усиление противоопухолевого действия соединений в предлагаемой композиции. Есть сообщения об эффективном противоопухолевом влиянии нековалентного комплекса между 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) и человеческим АФП на опухолевые клетки (CEM, MCF-7, $HepG_2$) *in vitro* [662].

L. H. Butterfield et al. [314] из отделения хирургической онкологии Медицинского центра Калифорнийского университета (Лос-Анджелес, США) в своем исследовании сделали попытку рассмотреть АФП с позиций точки приложения иммунотерапии при гепатоцеллюлярном раке. Как известно, синтез АФП часто сопровождает развитие гепатоцеллюлярного рака. Фрагменты пептида АФП, представленные в контексте основных комплексов гистосовместимости, могли бы, как считают авторы, служить потенциальными целями узнавания $CD8^+$ Т-лимфоцитами, если эти лимфоциты не были клонально удалены в онтогенезе. В своей работе авторы поставили задачу определить, может ли человеческий Т-лимфоцитарный клеточный спектр распознать АФП-производные эпитопы пептида в контексте общего класса I-аллель, HLA-A2.1. Дендритные клетки, генно-инженерно измененные для закрепления наследственного признака эктопического синтеза АФП, были культивированы в аутогенных человеческих культурах лимфоцита и в HLA-A2.1. Эти Т-лимфоциты распознавали пептид из 9 аминокислот, производный от белка АФП hAFP (542–550) (GVALQTMKQ). Авторы полагают, что наличие распознанного признака ясно демонстрирует онтогенетическое присутствие Т-клеток, способ-

ных идентифицировать один ограниченный эпитоп. Эти результаты ясно свидетельствуют и о том, что АФП может быть потенциальной целью для Т-лимфоцитарной иммунотерапии.

К сожалению, выводы исследователей могут свидетельствовать только о том, что возможность Т-клеточной идентификации хотя бы одного фрагмента молекулы АФП неизбежно приведет к выработке специфических антител, которые вступят в связь с антигеном, образуя комплекс антиген – антитело. Итогом этих событий станет закрепление иммунного комплекса на рецепторах опухолевых клеток с развитием феномена «экранирования» опухоли от иммунной системы, в результате чего будет достигнута цель, противоположная исходной, т. е. усиление опухолевого роста, но никак не его торможение. Эти же исследователи в своей дальнейшей работе используют две генетические стратегии иммунизации [708]. Поскольку АФП на основе плазмиды явился слабым антигенным стимулом для производящих цитокины Т-лимфоцитов, авторы считают, что более перспективным для генной иммунотерапии может оказаться раково-эмбриональный антиген (РЭА). Возможно, в сочетании АФП и РЭА смогут стать эффективным антигеном, позволяющим вызвать выраженный иммунный противоопухолевый ответ. Параллельно с этим выделяют отдельные фетальные протеины, в частности АФП, для приготовления различных лекарственных форм. Однако и в отечественной, и в зарубежной литературе практически отсутствуют сведения о клиническом применении самих онкофетальных белков. По-видимому, это происходит в результате того, что экспериментальные данные свидетельствуют в основном об иммуносупрессорной активности этого класса протеинов, поддерживающих иммунологическую толерантность в системе «мать – плод» [68, 252]. Наиболее полно в этом отношении изучен АФП, на примере которого мы и попытаемся проиллюстрировать свой взгляд на парадоксальную роль онкофетальных белков.

Приведенный в обзоре перечень данных характеризует АФП как белок с выраженными иммуносупрессивными свойствами. Видимо, поэтому в первую очередь его попытались применить для блокирования аутоиммунных реакций в экспериментальных системах *in vitro* и *in vivo*, где установлена способность АФП снижать реакции Т-зависимого гуморального и клеточного иммунитета [22, 101, 102, 188, 393].

Фетальная терапия находит применение и при лечении неонкологических заболеваний. В литературе есть сообщения об опыте успешного применения методов трансплантации фетальных аллогенных и ксеногенных тканей для лечения таких заболеваний, как сахарный диабет [142, 204], болезнь Паркинсона, болезнь Дауна у детей [172], в гематологии [215].

Количество сообщений о применении АФП в качестве лекарственного препарата для лечения заболеваний, протекающих с наличием аутоиммунных реакций, в доступной литературе пока ограничено. Установлено, что применение АФП в комплексном лечении органических поражений центральной нервной системы, обусловленных резидуальными, гипоксическими, дегенеративными, токсическими, инфекционными, травматическими и опухолевыми факторами (эпилепсия, рассеянный склероз, арахноидит, миастения и др., резистентные к традиционным видам лечения), позволяет добиться стойкой ремиссии, объективизированной улучшением неврологической симптоматики, лабораторных показателей, ЭЭГ, вызванного потенциала, ЭМГ, картины по ЯМР, нормализацией холинэстеразного обмена [186].

При рандомизированном, «плацебоконтролируемом» исследовании применения АФП в комплексной терапии хронических неспецифических заболеваний легких (бронхиальная астма, пневмокониозы, хронический бронхит) отмечено увеличение вентиляционных по-

казателей легких на фоне снижения показателей аллергии, в т. ч. IgE [173, 187, 243, 247]. Получены убедительные данные о целесообразности использования АФП в комплексном лечении инфильтративного туберкулеза легких [173, 242], тиреоидита Хашимото [185] и у больных дистальным поражением артерий конечностей [18].

Неослабевающий интерес к АФП был также обусловлен тем, что данный белок – транспортный, с выраженными конъюгатными свойствами. И поскольку АФП является лигандом к эмбриональным рецепторам опухолевых клеток [691], то достаточно успешно были предприняты попытки целенаправленной доставки к злокачественным клеткам цитостатиков, цитотоксинов и гормонов [104, 138, 197, 220, 343]. Так, в сообщении большой группы исследователей из Японии и Израиля в эксперименте и в клинике подтверждена высокая эффективность лечения гепатоцеллюлярных злокачественных новообразований очищенным АФП, антителами к АФП, конъюгатами антител к АФП с противоопухолевыми веществами (адриамицин, митомицин) [432].

В постановлениях IV и V Всероссийских съездов онкологов было определено, что одним из перспективных направлений практической онкологии является поиск веществ, обладающих апоптотическим воздействием на опухолевую клетку. В работах D. C. Hooper et al. [433] и J. Laborda et al. [497] показана способность АФП индуцировать апоптоз опухолевых клеток в условиях *in vitro*.

Возможный механизм девитализации опухолевых клеток при фетальной терапии – апоптоз, т. е. включение запрограммированной клеточной гибели. Признаки апоптотической клетки описаны: это характерная фрагментация ДНК, конденсация цитоплазмы и др. Такая клетка поглощается МФ или соседними клетками при отсутствии воспалительного процесса, характерного для некроза [57]. Показано, что многие противоопухолевые химиопрепараты, TNF, лучевое воздействие элиминируют опухоль путем запуска апоптоза [687]. Картина распада небольших по объему опухолей под действием фетальных протеинов дает основания предполагать наличие неиммунных механизмов клеточной элиминации и в этом случае. Помимо противоопухолевого аспекта проблема включения апоптоза исследовалась и при аутоиммунных заболеваниях. Показано, что и в этом случае успех терапии может объясняться включением апоптотической гибели аутореактивных клеток [634].

Одной из причин неукротимого роста опухолевых клеток является утрата генов, контролирующих пролиферацию. Таких антионкогенов в настоящий момент известно немного. Большинство их картировано на 17-й хромосоме [642]. Наиболее изученными являются функции гена P53. Именно с его отсутствием связывают нерегулируемость опухолевого роста. С функционированием P53 связано явление апоптоза [57]. Показано, что введение P53 в малигнизированные клетки легких приводило к разрушению опухоли именно путем апоптоза [385]. L. N. Semenkova с соавторами исследовали влияние очищенного человеческого АФП на рост человеческих клеток гепатокарциномы $HepG_2$ *in vitro* [647]. Синтезированный опухолевыми клетками АФП и АФП, выделенный из сыворотки пуповинной крови, вызвали выраженное дозозависимое ингибирование пролиферации клеток $HepG_2$, вплоть до полной остановки деления в концентрации белка (больше чем 0,1 мг/мл). Чтобы проверить, может ли АФП вызывать эндогенную программу самоубийства в клетках гепатомы, авторы исследовали, предшествовала ли фрагментация ДНК смерти клетки. После обработки клеток гепатомы высокой дозой АФП (1,0 мг/мл) фрагментация ДНК была обнаружена уже через 2 ч после этого. Определено, что 70% клеток подверглись апоптозу в течение 24 ч от начала эксперимента. Фрагмента-

ция ДНК являлась предшественником других признаков смерти клеток в течение нескольких часов. Типичные морфологические изменения, характерные для апоптоза, были отмечены в течение 4 ч после обработки клеток высокими дозами АФП. Низкие концентрации опухолевого и эмбрионального АФП (меньше чем 0,1 мг/мл) были не в состоянии индуцировать торможение роста $HepG_2$ клеток, скорее демонстрируя бифазную активность АФП. Предварительная обработка клеток актиномицином – ингибитором транскрипции – не влияла на цитотоксичность АФП. Без лиганда он имел дозозависимую, но менее интенсивную активность, подавляющую пролиферацию. Сходные эффекты торможения пролиферации опухолевых клеток эмбриональным и опухолевым АФП и его безлигандной формой, по-видимому, свидетельствуют в пользу того, что основная роль в регулировании роста клетки может быть отнесена к белковой половине полной молекулы АФП, но не к ее лигандам. Лишение фактора роста отчетливо усиливало цитостатическую активность высоких концентраций очищенного АФП, а также увеличивало митогенную активность низких концентраций, показывая взаимозависимость регулятивной активности пролиферации под влиянием АФП и факторов роста. Результаты этого исследования и дальнейших экспериментов [353] демонстрируют то, что АФП, непосредственно попавший во внутриклеточное пространство, индуцирует запрограммированную смерть опухолевой клетки. АФП индуцирует апоптоз посредством активации каспазы-3 (но не каспаз-1, 8, 9), минуя известные пути программированной гибели клеток, опосредованные через мембранные рецепторы для TNF-α или $CD95^+$ [352, 353].

Дальнейшие исследования [354] безлигандной формы АФП, подвергнутого гидролизу, позволили выделить два основных фрагмента с молекулярными массами 38 и 32 kD, расщепление которых было произведено до положения молекулы Leu(312)-Asn(313). Более длительный протеолиз вел к дальнейшему разложению фрагментов молекулы АФП и появлению протеолитически устойчивых фрагментов с молекулярной массой 23 kD (P23) и 26 kD (P26), соответствующих N- и C-концевым участкам молекулы АФП. Сравнительное изучение интактных, не содержащих лигандов молекул АФП и выделенных устойчивых фрагментов P23 и P26 дифференциальной сканирующей калориметрией и методами иммунопреципитации демонстрировало, что эти фрагменты сохраняли нативную вторичную структуру, третичную и антигенную структуру интактной молекулы АФП. Из этого следовало, что не содержащую лигандов молекулу АФП можно было бы рассматривать как молекулу с тремя доменами, из которых два – плотные домены (домен I N-конца и домен III C-конца), связанные относительно лабильным доменом II. Структура домена II характеризовалась отсутствием твердой третичной структуры, но имела вторичную структуру.

Авторы изучили способность изолированных протеолитически устойчивых фрагментов АФП индуцировать апоптоз на чувствительной к АФП линии клеток Raji и попытались определить возможную локализацию активной зоны, ответственной за передачу сигналов апоптоза. В отличие от интактного АФП, ни изолированные фрагменты (38 и 32 kD), ни их эквимолекулярная смесь не были способны стимулировать апоптоз в клетках человеческой лимфомы Raji. Однако было продемонстрировано, что оба фрагмента P23 или P26 и их эквимолекулярная смесь P23 + P26 синергично с интактным АФП подавляли пролиферацию в клетках Raji. Эти данные свидетельствуют о том, что для опосредованного АФП триггерного запуска апоптоза необходимы два условия: 1) димеризация АФП для формирования гетеродимерного комплекса C- и N-концевых доменов [57]; 2) участие центральной части молекулы АФП (домен II). Эти же исследователи продемон-

стрировали в эксперименте, что АФП вызывает апоптоз в опухолевых клетках через путь, не зависящий от CD95, TNF-R1 и TNF-R2 (рецепторы для TNF) [352].

N. Koide et al. изучили потенциальные возможности апоптоза АФП-синтезирующих клеток рака желудка человека [484]. С этой целью гистохимическими методами с использованием радиоизотопной метки Ki-67 оценен индекс апоптоза в клетках рака желудка, способных и неспособных к продукции АФП. Достоверно установлено, что индекс апоптоза у АФП-позитивных клеток рака желудка был ниже, чем у АФП-негативных.

C. L. Yu и M. H. Tsai в эксперименте изучили свойства белка, очищенного от плодной бычьей сыворотки, с молекулярной массой 60 kD, вызывающего апоптоз [738]. Аминокислотная последовательность N-конца этого белка (IPLDPVAGYK) показывает, что это бычий фетуин – плодный белок, участвующий в управлении эмбриогенезом. Как оказалось, вызывающая апоптоз активность фетуина полностью зависит от цинка. Отделение цинкового иона от фетуина или замена цинка ионом бария полностью отменяли вызывающую апоптоз активность. Интересно следующее: в то время как фетуин, выделенный из плодной сыворотки, выборочно стимулирует апоптоз в раковых клетках, не повреждая нормальных клеточных элементов, фетуин, выделенный из зрелой сыворотки, является полностью бездействующим. *In vivo* фетуин на модели лейкоза Р-388 увеличивал выживаемость животных до 41%. Фетуин был так же активен и в отношении ингибирования развития рака простаты в модели рака простаты РС-3 у мышей.

Итак, полученные *in vitro* данные в основном объясняют отмеченные в эксперименте факты стимуляции специфической противоопухолевой клеточной защиты, приводящей к торможению пролиферативной активности опухолевых клеток в ответ на введение фетальных протеинов (АФП) и к нормализации реакций при аутоиммунных состояниях *in vivo*. Однако в доступных литературных источниках сведения о клиническом изучении АФП, к сожалению, практически отсутствуют. В тех экспериментах, где эффект АФП получен, авторы всегда делают оговорку, что механизм этого явления не вполне понятен. Например, это касается результатов экспериментов *in vitro*, показавших, что АФП останавливает рост клеток эстрогензависимых опухолей [663], и *in vivo*, когда в экспериментальных условиях была получена регрессия эстрогензависимой опухоли молочной железы после применения комплекса АФП с эстрадиолом [454].

В ряде случаев при использовании АФП в качестве иммунотропного препарата у онкологических больных мы наблюдали развитие тотального и быстрого некроза основных опухолевых очагов и метастазов [182, 183, 195]. Однако исключительно с позиций индукции апоптоза довольно трудно объяснить «лавинообразный» распад опухолей после введения АФП. Нам представляется, что здесь задействован еще один механизм.

Одной из возможных причин наблюдаемого явления может быть феномен снятия так называемого иммунологического усиления (enhancing-effect) [196]. Давно известно, что антитела против поверхностных антигенов опухолевых и эмбриональных клеток не активируют лизис клеток известными механизмами (системой комплемента, МФ, ЦТЛ и пр.), а зачастую служат факторами усиления опухолевого роста и метастазирования [160, 503]. Это объясняется тем, что по мере роста опухоли происходит постоянная иммунизация организма и наработка некоторого количества антител. Связываясь с опухолевыми антигенами, они экранируют соответствующие детерминанты от воздействия цитотоксических лимфоцитов. Возникает эффект иммунологического усиления роста клеток, отмеченный впервые в экспериментах по трансплантации [47]. Введение в кровь эмбриональных протеинов, в частности АФП, вероятно, приводит к связыванию блокирующих

опухолевые клетки антител и открытию антигенных детерминант для действия иммунных механизмов элиминации клетки (NK, МФ и т. д.). Поэтому, независимо от индивидуальных свойств белка в системе *in vitro*, АФП может быть использован для специфической иммунотерапии широкого спектра злокачественных заболеваний.

Очевидно, что объяснение этого явления следует искать на уровне организма, исходя из специфических взаимоотношений опухоли и системы иммунной защиты. В данном случае представляется плодотворной точка зрения некоторых исследователей, определяющих роль иммунологически активных веществ как факторов, приводящих к норме иммунный гомеостаз вне зависимости от направленности первоначального отклонения [98].

1.7. КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ АФП В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ВНУТРЕННИХ БОЛЕЗНЕЙ, ХИРУРГИЧЕСКОЙ И ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ

В результате проведенного анализа научной литературы, затрагивающего проблемы синтеза, биологической роли АФП, а также в связи с накопленной «критической массой» экспериментальных данных о свойствах АФП впервые встает вопрос о возможности использования этого белка в качестве патогенетического корректора иммуногенных нарушений при развитии заболеваний различного генеза в клинической практике. Из представленных публикаций следует, что, действуя на уровне организма, определенные белки могут восстанавливать иммунный гомеостаз вне зависимости от направления первоначального отклонения. По-видимому, это в полной мере можно отнести и к АФП.

В заключительной части нашего аналитического исследования мы еще раз обратим внимание на ключевые аспекты АФП в контексте возможностей практического его использования для лечения терапевтической, хирургической и онкологической патологии.

Итак, в эмбриогенезе АФП синтезируется главным образом клетками печени и желточного мешка плода. Из тканей плода АФП проникает в амниотическую жидкость и через плаценту – в кровь матери. У здорового взрослого человека АФП может присутствовать в крови вследствие активизации каких-то репаративных процессов и связанной с ними клеточной пролиферации. Отчасти сходная картина наблюдается и при онкозаболеваниях, когда с возникновением в организме клона малигнизированных клеток немедленно включаются гомеостатические механизмы защитно-регуляторного характера. Однако во многих случаях главную роль в увеличении уровня АФП в организме играют сами раковые клетки, «озлокачествление» которых в той или иной мере всегда сопровождается возвратом к своего рода эмбриональному фенотипу с экспрессией фетальных белков. Особенно характерна гиперпродукция АФП для гепатоцеллюлярного рака и эмбрионально-клеточных опухолей, когда концентрация его может достигать десятков тысяч МЕ/мл [179].

Установлено, что АФП оказывает влияние на активность клеток иммунной системы, причем он воздействует, как правило, на пролиферирующие клетки, не затрагивая их зрелых форм, в частности Т- и В-лимфоцитов. В зависимости от активации клеток АФП стимулирует или супрессирует определенные клоны специфических Th (прежде всего, видимо, Т-хелперов первого типа (Th1), но не второго – Th2) и Ts, подавляет синтез антител и созревание ЦТЛ, а также пролиферацию лимфоцитов в ответ на митоген. АФП модулирует фагоцитирующую активность МФ, оказывает влияние на синтез цитокинов моноцитами и другими клетками. *In vitro* АФП снижает активность NK. Показано его стимулирующее воздействие на рост и пролиферацию фибробластов.

Регулирующее влияние АФП на синтез в организме ряда факторов дополняется его синергизмом по отношению к некоторым из них. Например, он способен значительно усиливать активность эпидермального, трансформирующего и инсулиноподобного факторов роста. Установлено, что АФП оказывает влияние на метаболизм стероидных, половых, тиреоидных гормонов и простагландинов. Он напрямую связан с транспортом полиненасыщенных жирных кислот, проявляет антиоксидантные свойства и способность к связыванию тяжелых металлов. Наконец, АФП, так же как и TNF, способен запускать механизм запрограммированной гибели раковой клетки. Эта активность не связана напрямую с его транспортной функцией и опосредуется образованием комплекса АФП с особыми рецепторами на поверхности чувствительной клетки. Вместе с тем при развитии необластомогенеза АФП может осуществлять деблокировку рецепторов опухолевых клеток экранирующими антителами с запуском механизма противоопухолевого трансплантационного иммунитета (реакция ГЗТ).

Для осознанного использования АФП в практике хирургических, внутренних и онкологических болезней нам представляется целесообразным обратить внимание на ключевые моменты иммунных нарушений, связанных с развитием конкретных заболеваний, где гипотетически использование АФП в комплексном лечении будет обоснованным и, возможно, позволит добиться качественно новых позитивных результатов.

Нарушения иммунного ответа являются важнейшим патогенетическим звеном *хронических гепатитов различной этиологии,* во многом определяющим прогрессирование этого заболевания, вплоть до трансформации в цирроз печени.

При хроническом активном гепатите В снижение функции Ts приводит к высокой сенсибилизации Т-лимфоцитов к вирусным антигенам, антигенам мембраны печени и печеночному специфическому липопротеину, гиперпродукции к ним антител и развитию активного иммуновоспалительного процесса в печеночной ткани. Повышение активности Т-киллеров и NK обусловливает развитие выраженного синдрома цитолиза. Внепеченочные проявления заболевания развиваются по иммунокомплексному механизму [164]. У больных хроническим гепатитом В наблюдается повышение уровня В-лимфоцитов, экспрессирующих CD21, и снижение количества Т-лимфоцитов, в частности $CD8^+$-клеток. Вследствие этого и происходит интенсификация гуморальных реакций, особенно при гаплотипе DR3 [38].

При хронических формах гепатита С высокая изменчивость вируса приводит к «ускользанию» его из-под иммунологического надзора, что влечет за собой прогрессирование заболевания, развитие цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [164].

Развитию осложнений при хронических вирусных гепатитах В и С способствует повышение в сыворотке крови TNF-α, являющегося индуктором апоптоза [43, 103, 137]. Повышение в сыворотке крови больных хроническим гепатитом В индуцирующих апоптоз $CD95^+$-клеток отмечали З. Г. Апросина и В. В. Серов [20]. Изменения в балансе иммунорегуляторных медиаторов в пользу цитокинов Th2-типа (IL-4) при хронических формах гепатита С, а также при микст-формах (В и С) свидетельствуют о преобладании гуморального звена иммунитета [42, 43, 132]. При хроническом алкогольном гепатите, наряду с прямым токсическим действием на гепатоциты алкоголя и его метаболита ацетальдегида, развивается повреждающая иммунная цитотоксическая реакция в ответ на отложение в печени алкогольного гиалина [164].

В патогенезе циррозов печени ключевая роль также принадлежит иммунным расстройствам. Так, в развитии вирусного цирроза печени основополагающее значение име-

ют обусловленный персистированием вирусной инфекции иммуновоспалительный процесс, гепатотоксическое действие вирусов В и С, аутоиммунные реакции. В патогенезе аутоиммунного цирроза печени иммуногенным нарушениям принадлежит основная роль.

Несмотря на это, иммунокорригирующая терапия в патогенезе гепатитов и цирроза печени различной этиологии имеет ограниченное применение и сводится в основном к использованию иммунодепрессантов (глюкокортикоидов и цитостатиков) при высокой степени активности процесса [164]. Применение нуклеината натрия и препаратов тимуса не дает существенного клинического улучшения, независимо от того, что использование тималина ведет к нормализации уровня $CD3^+$, $CD8^+$, 0-клеток, а также иммунорегуляторного индекса $CD4^+/CD8^+$ [38–40].

Наиболее перспективным направлением в гепатологии в настоящее время признано использование INF-α [162]. При использовании INF-α_2 в комплексном лечении хронического вирусного гепатита отмечается уменьшение повышенного изначально уровня ЦИК [117]. Применение неовира, являющегося синтетическим индуктором интерферонов, приводит к повышению уровня INF-α, а также IL-1 и IL-2 [56].

Таким образом, ключевая роль в патогенезе гепатитов и циррозов печени принадлежит нарушениям иммунного ответа, а недостаточная эффективность использования при этой патологии традиционных иммунотропных средств диктует необходимость дальнейшего поиска новых эффективных и лишенных побочного действия лекарственных препаратов.

В настоящее время не вызывает сомнения большая значимость состояния иммунной системы в патогенезе наиболее распространенных *заболеваний щитовидной железы* (тиреотоксикоз, некоторые виды тиреоидита и др.). Так, у больных с хроническим аутоиммунным тиреодитом (ХАТ) отмечается снижение уровня Т-лимфоцитов в сочетании с увеличением числа В-лимфоцитов и гиперактивацией гуморального звена иммунитета, представленной повышением уровня сывороточных IgM и IgG, ЦИК и антител к тиреоглобулину [90]. Считается, что в условиях подавления Т-супрессорной функции лимфоцитов активируются Th, под влиянием которых В-лимфоциты трансформируются в плазматические клетки и начинается гиперпродукция антител к вышеуказанным тиреоидным антигенам. Кроме того, дефицит $CD8^+$-клеток (Ts) способствует появлению «запретных» клонов Т-лимфоцитов, органоспецифичных к щитовидной железе. Эти клоны, взаимодействуя с тканями щитовидной железы по типу ГЗТ, оказывают на них цитотоксический эффект, способствуя выходу в кровь органных антигенов. Последние индуцируют продукцию к ним антител. Различают антитела к тиреоглобулину, микросомальной фракции фолликулярного эпителия, тиреопероксидазе, рецепторам тиреотропина, T_3, T_4 и др. Цитотоксическое действие антител определяется их кооперацией с Т-киллерами и высвобождением лимфокинов (TNF-α, TNF-β и др.) [165]. Положительны тесты цитотоксичности, РБТЛ и РТМЛ с тканью щитовидной железы, отмечается увеличение числа лимфоцитов с рецепторами к тиреоглобулину [90]. Длительная аутоагрессия приводит к деструктивным изменениям в тиреоцитах и снижению функции железы. Тяжесть гипотериоза находится в прямой зависимости от выраженности иммунных нарушений [89, 90]. Компенсаторное (по типу обратной связи) повышение выброса гипофизом тиреотропного гормона провоцирует усиление роста сохранившегося эпителия (с последующей инфильтрацией лимфоцитами). Считается, что гипертрофическая форма аутоиммунного тиреоидита сочетается с антигенами HLA-DR5, тогда как атрофическая форма – с антигеном HLA-DR3 [26]. Иммуносупрессивная терапия глюкокортикоидами при этом

заболевании проблематична, т. к. эффект появляется лишь при высоких дозах и длительном применении, при этом велика вероятность побочного действия. С иммунокорригирующей целью при ХАТ применялись продигиозан, Т-активин, тималин, левамизол, зимозан, спленин и диуцифон. А. В. Епишин с соавторами [90–93] отмечали улучшение показателей иммунитета при включении в схему лечения этого заболевания сочетания спленина с преднизолоном и нуклеинатом натрия.

Несмотря на ведущую роль иммунных факторов в патогенезе ХАТ, иммунокоррекция применяется нечасто ввиду ее слабой эффективности и побочных эффектов, с чем связана необходимость поиска новых подходов к патогенетическому лечению этого заболевания.

Роль иммунных факторов в развитии и прогрессировании *хронических неспецифических заболеваний легких,* и особенно хронического бронхита, не подлежит сомнению. Для хронического бронхита наиболее характерны такие изменения иммунитета, как снижение числа $CD3^+$-клеток (Т-лимфоцитов), $CD4^+$-клеток (Th), угнетение фагоцитоза [260]. При этом заболевании функция Ts и NK как в местной бронхопульмональной системе, так и в целом существенно снижена, что способствует развитию аутоиммунных реакций. При хроническом бронхите наблюдается снижение в бронхиальном содержимом гуморальных защитных факторов – секреторного иммуноглобулина А (sIgA), компонентов комплемента, лизоцима, лактоферрина, фибронектина, интерферонов, протеаз и их ингибиторов, а также нарушение функции альвеолярных МФ [165, 166].

Некоторые авторы отмечают зависимость течения хронического бронхита от количества Th. При так называемом вялом течении хронического бронхита отмечается снижение $CD4^+$-лимфоцитов крови и уменьшение sIgA в бронхиальном секрете. Напротив, гнойно-обструктивная форма заболевания характеризуется повышением числа $CD4^+$-клеток крови и sIgA бронхиального секрета [260].

Иммунокорригирующая терапия хронического бронхита имеет давнюю историю. В комплексном лечении этого заболевания использовались практически все известные на современном этапе развития фармакологии группы иммуномодулирующих препаратов. В частности, широко применяются препараты тимуса – Т-активин, тималин и др. Показаниями к их назначению являются все случаи снижения Th и/или избыточная активация Ts. У больных с торпидным течением хронического бронхита, выраженной дисфункцией всех звеньев иммунитета применение препарата иммунофана приводит к значительному положительному клиническому эффекту, к восстановлению показателей иммунного и интерферонового профилей [260].

Использование левамизола и диуцифона – препаратов с преимущественным влиянием на клеточное звено иммунитета – ограничено побочными эффектами. Преимущественным воздействием на В-клеточное звено иммунитета характеризуются бактериальные полисахариды – пирогенал, продигиозан и др. Перспективным направлением является использование нового класса иммуномодуляторов – мурамилпептидов (гликопептидов клеточной стенки бактерий). Так, препарат ликопид оказывает влияние практически на все популяции иммунных клеток, стимулирует поглощение микробов и антителообразование.

При хроническом бронхите возможно использование нового рибосомального препарата бактериального происхождения – рибомунила. Он состоит из компонентов рибосомальных фракций 4 бактерий, наиболее часто вызывающих инфекции бронхолегочной системы. Включение препарата в схему комплексного лечения приводит к нормализации числа Th, позитивно влияет на систему фагоцитоза, уменьшает частоту обострений заболевания.

Препараты с преимущественным влиянием на систему фагоцитоза (производные пиримидина – пентоксил, метилурацил, нуклеинат натрия) большого самостоятельного значения не имеют и назначаются обычно в сочетании с препаратами тимуса. Новый иммуномодулятор этой группы, оксиметацил, обладающий противовоспалительной активностью и антиоксидантным эффектом, применяется у больных хроническим бронхитом в фазе как обострения, так и ремиссии. Для коррекции фагоцитарного звена можно использовать также IL-1, арбидол. При хронических неспецифических заболеваниях широкое использование нашли также растительные иммуномодуляторы – эхинацин и др.

В настоящее время неоспорима ведущая роль иммунологических (аллергических) реакций в патогенезе развития бронхоспастического синдрома при основных клинико-патогенетических вариантах *бронхиальной астмы*. В большинстве исследований при этом заболевании отмечается изменение субпопуляционного состава лимфоцитов, представленное снижением иммунорегуляторного индекса CD4/CD8 [61]. Развитие атопической бронхиальной астмы обусловлено аллергической реакцией I типа, в ходе которой активированная фракция Th2 продуцирует в избытке IL-4, 5 и 6, которые, в свою очередь, стимулируют пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов, переключая синтез иммуноглобулинов этими клетками на IgE и IgG_1, которые, фиксируясь на эозинофилах, тучных клетках, базофилах и др., приводят к их дегрануляции и переходу в патохимическую и патофизиологическую стадии [166]. Превалирование у пациентов с бронхиальной астмой Th2-типа (при относительном снижении Th1) генетически детерминировано. Важным условием для формирования Th2-типа является присутствие IL-4. Снижение уровня Th1 закономерно приводит к уменьшению в сыворотке крови больных IFN-γ [139].

Аллергические реакции III типа (иммунокомплексный тип) также имеют определенное значение в патогенезе заболевания. При этом образуются антитела классов G и M, формируются комплексы антиген – антитело, патофизиологическое влияние которых реализуется через активацию комплемента, высвобождение лизосомальных протеолитических ферментов и медиаторов из МФ, НФ, тромбоцитов, активацию кининовой и свертывающей систем [165]. В результате этого включается каскад клеточных реакций, способствующих дальнейшему отложению иммунных комплексов и повреждению тканевых структур.

При бронхиальной астме с ведущей ролью в патогенезе инфекционного агента большое значение принадлежит ГЗТ. При этом Т-лимфоциты выделяют избыточное количество факторов хемотаксиса нейтрофилов, эозинофилов и др. Медиаторы замедленного действия вызывают в клетках-мишенях – МФ, тучных клетках, базофилах – освобождение $ПГД_2$ и $ПГF_{2\alpha}$, ЛТ и др., вследствие чего развивается бронхоспазм. Аутоиммунные реакции при бронхиальной астме развиваются только при тяжелом ее течении. В этом случае синтезируются антитела (противоядерные, противолегочные, к гладкой мускулатуре легких, к β-адренорецепторам мышц бронхов) [165, 166].

В комплексной ступенчатой терапии бронхиальной астмы в настоящее время широко используется иммуносупрессивная терапия глюкокортикоидами. Имеются сведения о целесообразности использования в некоторых случаях цитостатиков (имурана, меркаптопурина). Есть данные об эффективности некоторых иммуномодуляторов (Т-активина и др.), экстракорпоральной иммуносорбции, моноклональной анти-IgE иммуносорбции, плазмафереза, лимфоцитофереза, лазерного и ультрафиолетового облучения крови [165, 166].

Перспективным направлением в лечении бронхиальной астмы на современном этапе является использование препаратов, воздействующих на лейкотриеновый механизм

путем как торможения их биосинтеза (зилеутон), так и блокирования активности рецепторов I типа лейкотриенов (аколат, сингуляр). Отмечено позитивное влияние препаратов этого класса при многих формах бронхиальной астмы [260].

Показана хорошая эффективность использования при атопической бронхиальной астме комбинированной специфической иммунотерапии [21]. Ряд авторов считают, что в дальнейшем аллерговакцинам будет принадлежать значительная роль в лечении этого варианта заболевания [234].

Перспективным направлением в лечении бронхиальной астмы со временем могут стать лекарственные препараты, предотвращающие синтез цитокинов (анти-CD4-терапия, антагонисты цитокинов IL-4 и IL-5, уменьшающие хроническое воспаление), антагонисты нейрокинина и фактора активации тромбоцитов. Проводятся клинические испытания рекомбинантных человеческих МкАТ против IgE, антагонистов селектина и других ингибиторов клеточной адгезии, ингибитора триптазы (фермента тучных клеток) и др. [246].

Между тем лечение бронхиальной астмы на настоящем этапе остается глобальной общемировой проблемой. Несмотря на значительные успехи в этой области, разработку целого ряда групп препаратов, позволяющих в известной мере контролировать течение этого заболевания у большинства больных, имеют место и вынужденная полипрагмазия, и необходимость использования системных глюкокортикоидов, что крайне неблагоприятно из-за побочных эффектов. Поэтому весьма актуальным является апробирование и внедрение в клиническую практику новых патогенетических препаратов, воздействующих на ключевые звенья этого тяжелого недуга.

Большинство авторов [116, 239, 240] отмечают нарастание IgG и IgA при активном инфильтративном *туберкулезе легких* в фазе распада. М. М. Абашев с соавторами выявили, что у больных туберкулезом легких в сочетании с хроническим бронхитом содержание IgA и IgG в сыворотке крови в значительной мере зависит от степени активности как специфического процесса (резко повышается при обострении туберкулеза), так и неспецифической патологии (нарастает при обострении хронического бронхита) [1]. Данные о содержании при туберкулезе IgM противоречивы.

Защитная роль образующихся при развитии специфического процесса антител четко не определена. Кроме того, при туберкулезе, особенно при его деструктивных формах, имеют место аутоиммунные процессы, индуцированные антигенным воздействием некротизированной легочной ткани и стимулированные адъювантным влиянием микобактерий туберкулеза. В то же время хронически текущий туберкулезный процесс сопровождается длительной антигенемией [11, 12]. Все эти факторы являются условием для возможного формирования иммунных комплексов, которые могут обладать как позитивным действием (нейтрализация антигена и элиминация его из организма), так и негативным (повреждающее действие на ткани) [245].

Содержание ЦИК при инфильтративном туберкулезе, по данным В. Н. Адамович, повышено [14]. З. И. Костина с соавторами сообщают, что уровень ЦИК достигает высоких значений лишь при выраженном экссудативном компоненте, в то время как при округлых инфильтратах не превышает нормальных показателей [125]. Н. Н. Середа и Е. Н. Шапошник отмечали, что повышение ЦИК сопровождается нарастанием IgG и IgA и более частой деструкцией легочной ткани [205]. М. М. Савула наиболее высокий уровень ЦИК наблюдал при распространенных деструктивных формах туберкулеза легких [201].

Изменения фагоцитарной активности лейкоцитов крови при туберкулезе легких носят фазовый характер: на ранних этапах происходит активация поглотительной способности, на последующих, по мере развития интоксикации, – подавление фагоцитоза [248].

В свете современных представлений основными патогенетическими факторами *неспецифического язвенного колита* являются: дисбактериоз кишечника, оказывающий местное токсическое и аллергизирующее действие, а также способствующий развитию воспаления; нарушение нейрогуморальной регуляции функции кишечника, обусловленное дисфункцией нейровегетативной, гастроинтестинальной и эндокринной систем; повышенная проницаемость слизистой оболочки толстого кишечника для молекул белка и бактериальных антигенов; повреждение кишечной стенки и образование аутоантигенов с последующим синтезом аутоантител; образование иммунных комплексов, локализующихся в стенке толстого кишечника с развитием в ней иммунного воспаления; развитие внекишечных проявлений болезни, обусловленное многогранной иммунной патологией [164, 231].

И. М. Менджерицкий решающее значение в патогенезе придает дисфункции гипофизарно-адреналовой системы, повреждающему действию на кишечную стенку продуктов метаболизма кишечной флоры (в частности, антигенов некоторых штаммов *E. coli*), синтезу аутоантител к эпителию толстой кишки [149]. Таким образом, неоспорима роль изменений иммунного ответа в развитии некротизирующего воспалительного процесса слизистой кишечника при этом заболевании.

В патогенезе другого заболевания кишечника с неуточненной этиологией – *болезни Крона* – ведущая роль также отводится аутоиммунному процессу, при котором вырабатываются IgG к антигенам клеток желудочно-кишечного тракта (прежде всего толстого кишечника), появляются лимфоциты, сенсибилизированные к антигенам слизистой оболочки толстой кишки. Высокая частота внекишечных проявлений также обусловлена аутоиммунными механизмами [164].

О. С. Шифрин отмечает в иммунопатогенезе значимость следующих факторов: активацию местной выработки антител с изменением соотношения секреции IgG и IgA в сторону повышения IgG, что приводит к активации комплемента и клеточной цитотоксичности; региональную супрессию Т-лимфоцитов [254].

Медикаментозная терапия болезни Крона и неспецифического язвенного колита сводится к назначению сульфаниламидных (сульфосалазина, месалазина и др.), антибактериальных, ферментных, антидиарейных средств, эубиотиков и др.; при неэффективности встает вопрос о назначении стероидных гормонов или цитостатиков [149]. Однако возможности фармакологической иммуносупрессии глюкокортикоидами и цитостатиками (азатиоприном, 6-меркаптопурином, метотрексатом и др.) резко ограничены ввиду обилия побочных эффектов и незначительной эффективности стероидов в поддержании клинической ремиссии. При болезни Крона для оптимизации состояния иммунитета рекомендовано использование инфликсимаба – иммуноглобулина, обладающего способностью связывать циркулирующий и фиксированный на мембранах TNF-α, ингибиторов липоксигеназы, талидомида [254]. Однако проблема иммунокоррекции при этих тяжелых заболеваниях кишечника остается и требует разработки новых эффективных препаратов.

Нарушения иммунобиологического гомеостаза являются одним из важнейших звеньев патогенеза *ожоговой болезни* [92, 93, 129, 157]. Для нарушений иммунитета при термической травме характерна фазность течения. На ранних этапах закономерно его подавление [158]. В частности, в ранний посттравматический период, вне зависимости от

тяжести повреждения, активность Т-системы иммунитета падает, в последующие периоды, после сравнительно легких травм, она восстанавливается до нормы или возрастает. После тяжелых повреждений формируется стойкий Т-иммунодефицит. У ожоговых больных различными исследователями наблюдались изменения концентрации иммуноглобулинов разной направленности и величины. Наиболее часто отмечается снижение в первые дни после травмы уровня IgG, реже – других классов иммуноглобулинов. При благоприятном течении содержание иммуноглобулинов восстанавливается, при наличии осложнений дефицит гуморального иммунитета стойко сохраняется [86]. По мере восстановления иммунокомпетентных клеток формируются аутоаллергические рекции – синтез «ожоговых» антител в ответ на поступление в кровяное русло ожоговых антигенов – продуктов термической денатурации нормальных тканевых белков. Именно аутоантителам приписывают участие в развитии таких осложнений, как аутоиммунный гломерулонефрит, анемия и др. [128]. Отмечается повышение активности нейтрофилов (НФ) [86], возрастает концентрация ЦИК [218].

В литературе можно встретить данные об использовании в комбустиологии таких средств и способов иммунокоррекции, как тималин, пентоксил, метилурацил, глюкокортикоиды, а также пассивной и активной иммунизации [86, 87, 128, 129]. В эксперименте доказана целесообразность использования при ожоговой травме нуклеината натрия, IL-2 и полиоксидония [33, 34, 70, 71, 86, 87]. Разработка и внедрение в клиническую практику новых иммуномодулирующих препаратов остается насущной проблемой современной комбустиологии.

Облитерирующие заболевания нижних конечностей (облитерирующий атеросклероз, тромбангиит и др.) ввиду ограниченных возможностей консервативных методов лечения и высокой инвалидизации остаются актуальной проблемой клинической медицины. Несмотря на различие патогенеза этих заболеваний, аутоиммунная компонента в них прослеживается, являясь либо основным патогенетическим звеном (как при системных васкулитах), либо одной из многих составляющих (атеросклеротическое поражение сосудов конечностей).

В 1986 г. А. Н. Климовым была выдвинута аутоиммунная концепция атерогенеза. В основе атеросклероза, согласно этой теории, лежит образование аутоиммунных комплексов сывороточные липопротеиды – антитела, которые сорбируются на сосудистой стенке. Развитие заболевания авторы рассматривают как цепь последовательных событий:

• появление у плазменных липопротеинов (ЛПОНП и ЛПНП) аутоантигенных свойств (доказано, что основным носителем антигенных детерминант липопротеина является их белковый компонент – апопротеин);

• образование аутоантител против указанных ЛП;

• формирование циркулирующего в крови иммунного комплекса ЛП – антитело при избытке антигена;

• фиксация комплекса на поверхности артериальной стенки при участии комплемента и нарушение целостности эндотелия под действием БАВ, способствующее проникновению как самого комплекса, так и ЛП в интиму артерий;

• захват иммунных комплексов макрофагами и трансформация последних в пенистые клетки;

• развитие очагового атеросклеротического повреждения с разрушением клеток и волокон, что стимулирует реакцию мезенхимы на повреждение вещества;

• образование к этим сосудистым антигенам антител, их фиксация на измененных сосудах и дальнейшее развитие атеросклероза.

Автор приводит многочисленные экспериментальные и клинические данные в подтверждение своей теории: в начальных стадиях атерогенеза отмечается фиксация иммуноглобулинов и комплемента в субэндотелиальном слое интимы артерий; атеросклеротические бляшки инфильтрированы моноцитами и лимфоцитами; в эксперименте на кроликах показано, что периоды прогрессирования атеросклеротических повреждений совпадают с очаговой инфильтрацией стенки сосудов как липопротеинами, так и иммуноглобулинами; у людей, больных атеросклерозом, отмечено параллельное увеличение в плазме крови атерогенных ЛП и IgG (аутоантитела к ЛП относятся к IgG); повышение уровня ЛП подавляет функцию Ts, что способствует синтезу аутоантител; при атеросклерозе в парааортальных лимфатических узлах развивается выраженный иммунный ответ В-типа (в В-зоне резко увеличивается количество плазмоцитов)[111].

Избыточное антителообразование приводит к повышению уровня ЦИК [175]. У пациентов с атеросклеротическим поражением сосудов нижних конечностей установлено увеличение содержания В-лимфоцитов и уменьшение количества Ts. В атеросклеротических бляшках присутствует большое число $CD4^+$ Т-клеток и МФ. В мононуклеарных клетках, фиксированных на эндотелии и мигрирующих в интиму, отмечается экспрессия CD40 [156].

Среди медиаторов воспаления в атеросклеротически измененных артериях в наибольшем количестве выявляется TNF-α. Этот цитокин запускает два важных цитотоксических механизма: 1) супероксидный путь, связанный с выработкой свободных радикалов (O_2, OH); 2) аргининзависимый путь образования NO. Свободные радикалы и NO вызывают перекисную модификацию ЛПНП в очагах атерогенеза [156]. У больных ИБС повышен уровень IL-2 и IL-8, отражая течение реакции гиперчувствительности замедленного типа в сосудистой стенке [141].

В. А. Нагорнев с соавторами [156] видят взаимосвязь между аутоиммунной и перекисной концепциями атеросклероза. Они доказали, что перекисное окисление в мембране приводит к нарушению белок-липидных взаимодействий, изменению нативной конформации белка, что, в свою очередь, нарушает антигенную специфичность липопротеина и может запустить аутоиммунные процессы. Установлено, что перекисно-модифицированные ЛП низкой плотности, образующиеся в крови и/или в сосудистой стенке, приобретают аутоантигенные свойства.

Новые данные о роли иммунных механизмов в патогенезе атеросклероза диктуют необходимость разработки и создания препаратов, влияющих на метаболизм клеток артериальной стенки, в частности на функцию клеточных рецепторов, а также на секрецию клетками цитокинов и факторов роста, с тем чтобы предупредить или задержать развитие атеросклеротического процесса [111, 219].

Из всех вопросов канцерогенеза наиболее сложным и запутанным является *иммунология рака.* В свою очередь в самой иммунологии эта область также является сложнейшей. В настоящее время ни у кого не вызывает сомнения существование иммунологической реакции в ответ на развитие опухоли. Объектом для иммунной атаки организма служат синтезируемые опухолью специфичные (хотя и условно) антигены. При этом решающая роль в формировании противоопухолевой резистентности принадлежит клеточным реакциям иммунитета, причем наибольшее значение имеют NK. Нарушение клеточной дифференцировки – неизбежное следствие опухолевой трансформации – является стимулом для аутоагрессивной деятельности NK. В обеспечении иммунной противоопухоле-

вой реакции решающая роль принадлежит сенсибилизированным ЦТЛ, Th и Т-эффекторам, а также МФ. Экспериментально доказано, что добавление в культуру опухолевых клеток иммунных лимфоцитов существенно подавляет их рост, а внесение иммунных лимфоцитов и противоопухолевых антител ослабляет или нивелирует их действие. Таким образом, в противоопухолевом иммунитете существует своеобразный антагонизм между факторами клеточного и гуморального иммунитета. Считается, что антитела, содержащиеся в крови организма с развивающейся опухолью, связываются с соответствующими антигенами, встроенными в мембрану опухолевой клетки, в результате чего нарушается распознавание клеток опухоли, т. е. создается ситуация, препятствующая индукции иммунного ответа. По-видимому, это является лишь одной из причин «ускользания» опухолевой клетки от действия иммунной системы организма. В процессе канцерогенеза повышается активность Т- и В-супрессоров. Кроме того, растущая опухоль вырабатывает вещества, обладающие иммунодепрессорным действием [126].

В настоящее время установлено, что состояние противоопухолевой защиты осуществляют многие системы иммунного гомеостаза. Деструкцию опухолей вызывают следующие иммунные факторы и механизмы:

1) лизис, опосредованный антителами и комплементом;
2) прямой клеточно-опосредованный лизис;
3) цитотоксические Т-лимфоциты;
4) лектинзависимая клеточная цитотоксичность;
5) натуральные (естественные) киллеры;
6) антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность;
7) лимфокин-активированные клетки;
8) лизис, опосредованный макрофагами;
9) токсичные медиаторы, выделяемые лимфоцитами, макрофагами и другими иммунными клетками (IFN, TNF-α и др.) [161].

Л. Ф. Чернецова с соавторами отмечали у больных раком легкого и желудочно-кишечного тракта снижение числа $CD4^+$, $CD16^+$, $CD4^+/CD8^+$, повышение уровня ЦИК, косвенные признаки преобладания Th2-ответа (проявления опухолевой супрессии) [244].

В основе канцерогенеза лежит ряд последовательных изменений генетического аппарата клетки, т. е. мутационные изменения, к которым можно отнести и явления его дерепрессии [55]. Злокачественные опухоли развиваются на фоне дефицита иммунного надзора, который обусловлен антигенным упрощением злокачественных клеток и/или недостаточно совершенной иммунной защитой, что необязательно сочетается с низкой реактивностью. Напротив, при небольшой опухолевой массе (для возникшего злокачественного новообразования) характерны реакции, протекающие по механизмам аллергических, но они неинтенсивные (хронические). При этих условиях они могут оказывать только стимулирующее влияние на развитие опухоли. Такое явление (о чем мы упоминали ранее) носит название аутоусиления роста опухоли. По мере развития опухоли угнетаются все компоненты иммунной реактивности, в том числе и лежащие в основе аутоусиления, чем в значительной мере можно объяснить постепенное замедление ее развития [55].

Е. Н. Кологривовой с соавторами в 2000 г. исследованы концентрации аутоантител у больных со злокачественными опухолями полости рта, легкого, желудка, а также у больных аутоиммунными заболеваниями [119]. Оказывается, интенсивность наработки ауто-

антител у пациентов с опухолевыми процессами значительно повышена и сравнима с интенсивностью антителопродукции у больных с аутоиммунными заболеваниями. Интенсивные аутоиммунные реакции вызывают деструкцию тканей и нарушение функционирования жизненно важных органов, что серьезно отягощает течение неопластического процесса.

В развитии многих опухолей существенную роль играет снижение способности к апоптозу. Наиболее хорошо изученным механизмом подавления апоптоза, лежащего в основе наработки опухолевого клона, является ауто- и паракринное повышение экспрессии ростовых факторов и рецепторов к ним, возникающее в опухолевых клетках вследствие активации онкогенов. Именно это свойство делает клетки опухолевого клона не зависящими от микроокружения и лежит в основе их метастазирования. Другим механизмом нарушения апоптоза в опухолевых клетках является мутация в генах, контролирующих суицидальную программу. Торможение апоптоза происходит и при нарушениях его эффекторных механизмов и путей передачи проапоптотических сигналов. Исследования последних лет выявили механизм подавления иммунного надзора за опухолевыми клетками, связанный с апоптозом. Экспрессия CD95 – одного из рецепторов к TNF-α – на опухолевых клетках часто бывает снижена, и/или нарушен механизм реализации поступающих с этого рецептора проапоптотических сигналов. Противоопухолевые препараты вызывают апоптоз. Однако большие дозы препаратов, например метотрексата, приводят к разрушению клеток путем некроза, что значительно более токсично для больного [54].

При опухолевом росте возможно развитие незавершенного апоптоза. Незавершенный апоптоз с последующим аутолизом апоптозных телец, приводящим к выходу клеточных онкогенов, факторов роста, цитокинов, может быть мощным источником митогенетических факторов, стимулирующих пролиферацию сохранных живых опухолевых клеток [115].

Конкретизация и классификация методов иммунотерапии опухолевых, хирургических и терапевтических заболеваний в обобщенном плане не входит в тематику настоящего исследования, касающегося конкретного использования АФП в практике хирургических, внутренних и онкологических заболеваний. И тем не менее некоторый анализ экспериментальных данных и фундаментальных позиций, связанных с ролью АФП в норме и при патологических состояниях, нами по возможности проведен. Также обозначены подходы практического использования АФП в лечении заболеваний, на первый взгляд отличающихся друг от друга, но имеющих общие патогенетические аспекты, подлежащие иммунокоррекции, где в качестве ключевого звена выступает АФП.

Следует сказать, что до настоящего времени клиническое исследование АФП было регламентировано отсутствием стандартизованной лекарственной формы белка, отсутствием изучения безопасности его применения и подтверждения его специфической активности на моделях патологических процессов в эксперименте. В настоящей монографии суммированы и впервые проанализированы результаты многочисленных экспериментов, проведенных с целью разрешить означенные выше вопросы, а также представлены результаты клинического изучения АФП в практике лечения некоторых хирургических, терапевтических и онкологических заболеваний.

ГЛАВА 2

Технологические аспекты выделения, очистки и производства лекарственных форм АФП

2.1. СПОСОБЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ АФП

В настоящее время существует несколько способов выделения и очистки АФП из различных биологических субстратов (опухолевая ткань, фетальные ткани, амниотическая жидкость). А. И. Томашевским и А. И. Юверским в 1999 г. [226] была предложена высокоэффективная схема выделения и очистки АФП человека из пуповинной крови, включавшая последовательную хроматографию на четырех колонках (голубая сефароза, два металлических хелата и одна обратная фаза), что способствовало эффективному выделению белка высокой чистоты при выходе целевого продукта около 85%. Методы выделения и очистки АФП постоянно модифицировались [189–192, 210, 211, 619, 684]. Эти методики позволяют получать определенные количества АФП, достаточные для использования в биотехнологических производствах по созданию диагностических тест-систем, но не позволяют разработать технологию для серийного его производства в качестве лекарственного средства, что связано в первую очередь с низким содержанием АФП в исходном сырье. В случае использования в качестве сырья пуповинной, плацентарной и абортной крови, содержащей значительные количества АФП, известные методы его выделения отличаются высокой трудоемкостью и низким выходом целевого продукта. Например, известен способ получения препарата АФП, включающий экстракцию последнего бутиловым спиртом из абортного материала человека (патент РФ № 2026688 от 1995 г.). Практически все известные методы выделения и очистки АФП ранее были отработаны для лабораторного производства в научно-исследовательских целях. При этом не всегда удавалось добиться высокой чистоты препарата (в основном за счет примесей сывороточных белков). В ряде методик для иммуносорбции использовались специфические МкАТ, что позволяло выделить из исходного биологического материала только единственную изоформу АФП.

В связи с изложенным мы попытались разработать методы выделения всех изоформ АФП с высокой степенью очистки белка и высоким выходом целевого продукта. Также необходимо было решить проблему стандартизации, вирусологической безопасности и стабилизации выделенного АФП безвредными для организма человека соединениями. Нами разработано несколько технологий, в которых мы попытались решить перечисленные проблемы.

Способ получения альфа-фетопротеина (патент на изобретение РФ № 2100031)

В качестве исходного биологического материала, содержащего АФП, используется пуповинная, плацентарная и абортная кровь человека, полученная из специализированных медицинских учреждений. Методом центрифугирования производится отделение форменных элементов и балластных белков. Полученный супернатант подвергается хроматографической очистке сначала на колонке с аффинным сорбентом, содержащим поликлональные антитела против АФП человека, а затем на колонке с сорбентом, содержащим комплекс антител против белков крови человека. В качестве сорбента используется Br-CN-сефароза с антителами против АФП человека в количестве 10 мг/мл (первая хроматография) и комплексом антител против белков крови человека в количестве 10 мг/мл (вторая хроматография). Далее раствор АФП подвергается диализу против дистиллированной и деионизированной воды. После стерилизующей фильтрации раствор АФП проверяется на чистоту иммунохимически и методом электрофореза в полиакриламидном геле. Выход целевого продукта составляет 60–72%. Чистота АФП 95–96%.

Определяющим отличием предложенного способа получения АФП является то, что его хроматографическую очистку проводят в две стадии: сначала на аффинном сорбенте с поликлональными антителами против АФП, а затем на сорбенте, содержащем антитела против белков крови человека. Это позволяет резко увеличить чистоту и качественный состав препарата, так как первый сорбент обладает аффинностью к различным изоформам АФП, а второй – максимально сорбирует весь спектр примесных белков (альбумин, гемоглобин и др.). Данная методика позволяет уменьшить длительность технологического процесса за счет сокращения количества стадий хроматографической очистки.

Пример технологического исполнения. Все технологические этапы выполняются при 4 °С. Кровь, содержащую АФП, в объеме 1 л центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин, осадок отбрасывают, а около 800 мл супернатанта наносят на хроматографическую колонку объемом 50 $см^3$ с аффинным сорбентом, содержащим 10 мг/мл поликлональных антител против АФП человека, ковалентно пришитых к Br-CN-сефарозе с помощью глутарового альдегида. Далее проводят отмывание колонки от несвязавшихся белков 200 мл 0,1 М раствора фосфатного буфера (pH 7,0).

Элюцию АФП проводят с помощью 0,1 М раствора HCl (pH 2,0), пропуская через колонку 50 мл элюента. Процесс элюции контролируют спектрофотометрически на длине волны 280 нм. Элюат, содержащий целевой продукт, нейтрализуют до pH 7,0 с помощью раствора NaOH и доводят до объема 100 мл. После этого проводят очистку полученного АФП на аффинном сорбенте, содержащем антитела (10 мг/мл) против белков крови человека. Элюат, полученный после первой хроматографии и содержащий АФП и примесные белки крови, наносят на колонку объемом 50 $см^3$ с вышеназванным сорбентом. Весь прошедший через колонку раствор, содержащий АФП, очищенный от балластных белков, подвергают диализу против деионизированной дистиллированной воды в течение 6 ч. Обессоленный после диализа раствор разбавляют 0,9%-ным раствором NaCl (pH 7,0) до концентрации АФП 100 мг/мл, замораживают при –18 °С до начала стерилизующей фильтрации. После ее проведения раствор АФП готов к этапу стабилизации и стандартизации в качестве субстанции для дальнейшего этапа получения лекарственного средства. Выход АФП 73%, чистота – 96%.

Способ получения альфа-фетопротеина (патент РФ № 2163139)

Пример технологического исполнения. Все этапы технологического цикла проводят при 4 °С. Выделение АФП из человеческой крови достигается при помощи хроматографической очистки целевого продукта на аффинном носителе. Для этого 1 л сорбента (Br-CN-сефароза), содержащего не менее 1 г/л поликлональных антител против АФП человека, смешивают с 2 л гипериммунной сыворотки крови крупного рогатого скота (содержащей антитела против белков сыворотки крови человека), осветленной центрифугированием и разбавленной в 4 раза дистиллированной водой. Экспонируют при 37 °С в течение 30 мин, а затем добавляют 10 л сыворотки крови человека, разбавленной в 4 раза дистиллированной водой. Смесь выдерживают, постоянно перемешивая, при 37 °С в течение 30 мин. Жидкость удаляют декантацией, а сорбент переносят в хроматографическую колонку и промывают раствором $MgCl_2$ (1,5 М) до исчезновения белка в промывочном растворе. АФП снимают с сорбента раствором $MgCl_2$ (4 М). Полученный раствор АФП подвергают ультрафильтрации и диализуют против 0,9%-ного раствора NaCl. В результате получают концентрат АФП с чистотой не менее 90%.

Способ получения альфа-фетопротеина
(патент РФ № 2169578)

Пример технологического исполнения. Все этапы технологического цикла проводят при 4 °С. Осветленную центрифугированием и разбавленную в 4 раза дистиллированной водой сыворотку абортной или пуповинной крови человека смешивают с аффинным сорбентом (Br-CN-сефароза), содержащим не менее 1 г/л поликлональных антител против АФП человека, и выдерживают при постоянном помешивании 30 мин при 37 °С (1 л сорбента + 10 л разбавленной сыворотки крови).

Жидкость удаляют декантацией, а сорбент переносят в хроматографическую колонку. Затем колонку промывают раствором $MgCl_2$ (1,5 М) до исчезновения белка в промывочном растворе. АФП снимают с колонки раствором $MgCl_2$ (4 М) в объеме, равном двум объемам сорбента в колонке. Полученный раствор подвергают ультрафильтрации с замещением 4 М раствора $MgCl_2$ на 0,1 М раствор $MgCl_2$. В полученный концентрат добавляют $CaCl_2$ до концентрации 0,1 М и трис-буфер (pH 7,5), а также трипсин из расчета 2 г на 10 л взятой в работу сыворотки крови. Доводят pH смеси до 7,5 и экспонируют при 37 °С в течение 2 ч. Производят повторную ультрафильтрацию и замену буфера на 0,9%-ный раствор NaCl. Полученный таким образом концентрат представляет собой раствор АФП с чистотой не менее 90%.

Способ получения альфа-фетопротеина
(патент РФ № 2170586)

Пример технологического исполнения. Все этапы технологического цикла проводят при 4 °С. Гипериммунную гетерогенную (кроличью, козью или др.) сыворотку крови, содержащую около 2 г/л антител против АФП человека, смешивают в соотношении 10 : 1 с нормальной человеческой сывороткой крови и в течение 30 мин выдерживают при 37 °С. Затем pH полученной смеси доводят до 11,0, после чего ее центрифугируют при 2500 об/мин в течение 20 мин. Осадок отбрасывают, а pH супернатанта доводят до 7,0 и смешивают с осветленной АФП-содержащей сывороткой крови человека в соотношении 1 : 10, после чего выдерживают в течение 30 мин при 37 °С. Далее pH полученной смеси доводят до 11,0 и смесь центрифугируют при 2500 об/мин в течение 20 мин. Супернатант отбрасывают, а осадок суспендируют в 0,9%-ном растворе NaCl в объемном соотношении 1 : 2, pH доводят до 2,0. Суспензию экспонируют при 37 °С в течение 30 мин и добавляют охлажденный до −30 °С этиловый спирт (1 : 1). Смесь центрифугируют при 5000 об/мин в течение 30 мин, после чего в надосадочную жидкость добавляют охлажденный до −30 °С этиловый спирт в соотношении 2 : 1 и центрифугируют при 5000 об/мин в течение 30 мин. Супернатант сливают, а полученный осадок представляет собой АФП с чистотой не менее 90%.

2.1.1. Способ стабилизации АФП

Известно, что водные и водно-солевые растворы АФП, полученные по различным технологическим схемам, в процессе хранения теряют стабильность, поэтому задача получения высокостабильных лекарственных форм является крайне актуальной. Известны различные способы повышения стабильности лекарственных средств и биопрепаратов. Наиболее эффективным способом стабилизации для длительного хранения является их лиофилизация с соответствующими добавками [159]. Поскольку эффективность стабилизации путем лиофилизации зависит от особенностей активного вещества (его устойчи-

вости к замораживанию, обезвоживанию, нагреву, регидратации, окислению и другим факторам), стабилизирующие составы являются, как правило, многокомпонентными и могут включать в себя различные углеводы, аминокислоты, белки и их гидролизаты, водорастворимые полимеры, антиоксиданты и т. д.

Одним из основных требований, предъявляемых к стабилизаторам лекарственных средств, является наличие у них структурообразующего свойства, которое необходимо для наилучшего сохранения активного вещества во время сублимационной сушки. Применение в качестве стабилизаторов АФП бычьего сывороточного альбумина и NaN_3 неприемлемо для фармацевтической промышленности из-за высокой антигенности первого и токсичности второго.

В связи с вышеизложенным наше внимание привлекли полисахариды, которые отвечают критериям стабилизации и структурообразования. Нами экспериментально установлено, что использование полисахаридов в количестве более 30 мг/мл нецелесообразно из-за высокой вязкости получаемого раствора АФП, который оказывается непригодным для создания инъекционной лекарственной формы. В то время как минимальное содержание полисахарида [155] для сохранения формы таблетки после лиофилизационной сушки составляет 4 мг/мл.

Для выбора оптимального стабилизатора нами проведены специальные исследования. В качестве стабилизаторов для создания инъекционной формы АФП использовались: 1) реополиглюкин – 6 мг/мл; 2) полиглюкин – 6 мг/мл; 3) декстран (мол. масса 100 kD) – 5 мг/мл; 4) сахароза (ХЧ) – 50 мг/мл; 5) глюкоза (фармацевтическая) – 50 мг/мл; 6) фосфатно-солевой раствор (ФСР) – 0,001 М Na-фосфатный буфер, 0,2 М NaCl (pH 7,2). В таблице 2.1.1 представлены экспериментальные данные по хранению, растворимости и стабильности АФП после лиофилизации с различными наполнителями.

Таблица 2.1.1

Применение различных стабилизаторов для создания инъекционной лекарственной формы АФП

Стабилизатор	1-е сут. после лиофилизации препарата АФП		Через 6 мес. хранения препарата АФП		Через 24 мес. хранения препарата АФП	
	Растворимость, мин	Кол-во АФП в ампуле, мкг	Растворимость, мин	Кол-во АФП в ампуле, мкг	Растворимость, мин	Кол-во АФП в ампуле, мкг
Реополиглюкин	0,5	75	1,0	75	1,0	75
Полиглюкин	0,5	75	1,0	75	1,0	75
Декстран 100	0,5	75	1,0	75	1,0	75
Сахароза	2,0	73	2,5	70	3,5	65
Глюкоза	1,5	73	2,0	70	3,0*	62
ФСР	1,0	65	1,5	65	5,0*	60

*Неполная растворимость.

Примечание. Содержание АФП во всех ампулах исходно – 75 мкг.

Как видно из данных таблицы 2.1.1, препараты АФП со стабилизаторами № 1–3 обладают хорошей повторной растворимостью и стабильностью в процессе хранения. Препараты со стабилизаторами № 4–6, где в качестве наполнителей использованы дисахариды и ФСР, обладают худшей растворимостью и стабильностью в процессе хранения.

Полученные нами данные явились определяющими при выборе стабилизатора и структурообразователя для создания лекарственной формы препарата АФП. Ими стали декстраны, использование которых в качестве наполнителей в технологии создания лекарственных форм явилось новаторским (патент РФ № 2121350).

Пример технологического исполнения. Для приготовления препарата АФП в 1 л дистиллированной воды растворяют при перемешивании 750 мг АФП и 50 г реополиглюкина, затем дистиллированной водой доводят объем до 10 л. Полученный раствор подвергают стерилизующей фильтрации через мембранный фильтр с размером пор не более 0,22 мкм, фасуют в 10 тысяч ампул или флаконов по 1 мл (разовая доза) и лиофильно высушивают в асептических условиях. Одна ампула (флакон) содержит 75 мкг АФП и 5 мг реополиглюкина.

Препарат полностью растворяется в 1 мл воды или 0,9%-ном растворе NaCl в течение 0,5 мин и сохраняет стабильность в течение 2 лет. Каждую партию препарата проверяют на соответствие требованиям к качеству целевого продукта.

2.1.2. Технологические аспекты производства инъекционного препарата АФП

В настоящем разделе мы представляем принципиальную технологическую схему производства инъекционной формы препарата АФП человеческого. Технология разработана на базе авторских решений, изложенных в патентах на изобретение РФ № 2100031 и 2121350 (способ получения альфа-фетопротеина и способ получения препарата альфа-фетопротеина).

Технология состоит из этапов фракционирования первичного биоматериала (отделение балластных белков и форменных элементов крови), постадийной хроматографической очистки – сначала на колонке с сорбентом, содержащим ковалентно пришитые антитела против АФП человека, а затем на колонке с антителами против белков крови человека.

Определяющим в технологии является то, что хроматографическую очистку целевого продукта проводят в две стадии. Это позволило резко увеличить чистоту и качество выделенного АФП (отделяют альбумин, гемоглобин и другие белки плазмы крови). Этапы технологического процесса получения препарата АФП представлены на рисунках 2.1.1 и 2.1.2, а также в таблицах 2.1.2 – 2.1.14.

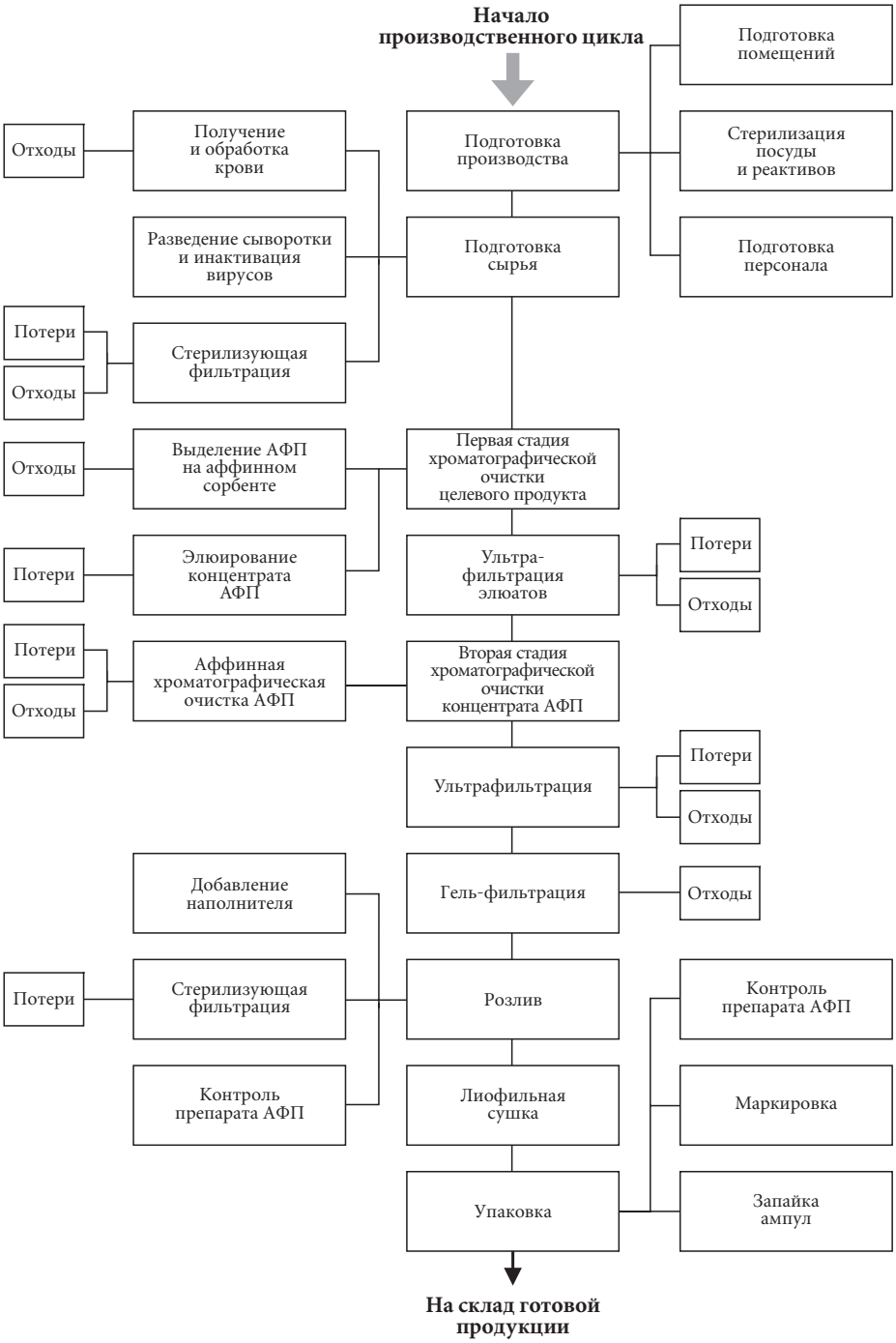


Рис. 2.1.1. **Технологическая схема производства препарата АФП**

Сбор крови. В качестве сырья для производства препарата АФП используется пуповинная, плацентарная и абортная кровь, полученная при медицинских абортах и родах, проверенная на отсутствие маркеров ВИЧ-1, 2 и гепатитов В и С. Кровь собирает медицинский персонал гинекологических и акушерских отделений, где имеются условия для ее хранения. Качество крови контролируется на соответствие требованиям, предъявляемым Инструкцией по сбору и контролю плацентарной и абортной крови для изготовления препаратов иммуноглобулинов человека нормального или Инструкцией по сбору и контролю плацентарной и абортной крови, утвержденной 24.03.2000 г. МЗ РФ. Кровь бракуют при наличии слизи, резкого гемолиза, зеленого окрашивания или гнилостного запаха. Забракованную кровь автоклавируют для инактивации патогенов, после чего она поступает в отходы.

Дальнейшие этапы технологического цикла производства препарата АФП будут рассмотрены на примере конкретного объема исходного сырья (3 л крови).

Получение сыворотки крови и ее стерилизация. Кровь забирается без антикоагулянта. Сгустки свернувшейся крови отделяют от сыворотки без центрифугирования. На каждом этапе количество АФП в образцах определяется методом иммуноферментного анализа (ИФА). Здесь и далее будут отображены потери АФП на каждом из этапов технологического цикла (табл. 2.1.2).

Таблица 2.1.2

Стадия получения сыворотки крови

Израсходовано	3 л абортной крови
Получено	2,5 л сыворотки, содержащей 250 мг АФП
Продолжительность стадии	1,5 сут.*
Потери	Нет
Отходы	0,5 л эритромассы

*Вспомогательные операции проводят одновременно с технологическими, поэтому в продолжительность стадии (здесь и далее) включено только время технологической операции.

Далее сыворотку разводят 0,9%-ным раствором NaCl в соотношении 1 : 3. Используемый на данной стадии и на всех остальных технологических стадиях 0,9%-ный раствор NaCl является стерильным и апирогенным (табл. 2.1.3). Здесь же проводятся мероприятия по инактивации вирусов.

Разведенную сыворотку центрифугируют в течение 20 мин при 2500 об/мин. Центрифугат собирают и стерилизуют фильтрацией на установке типа Ф-7, снаряженной стерильными фильтрами Millipor с порами диаметром 0,8 и 0,22 мкм или 0,435 и 0,22 мкм. Фильтрация проводится под давлением 0,04–0,05 МПа. По окончании фильтрации емкость герметично укупоривают и подают на стадию хроматографической очистки. Перед укупориванием из емкости берут пробу на стерильность.

Таблица 2.1.3

Стадия получения стерильной разведенной сыворотки крови

Израсходовано	2,5 л сыворотки, содержащей 250 мг АФП; 7,5 л 0,9%-ного раствора NaCl
Получено	9,7 л стерильной разведенной сыворотки, содержащей 242,5 мг АФП
Продолжительность стадии	0,5 сут.
Потери (при центрифугировании и стерилизующей фильтрации)	0,3 л разведенной сыворотки, содержащей 7,5 мг АФП
Отходы	0,1 кг балластного белкового осадка

Выделение АФП из сыворотки методом аффинной хроматографии. Аффинную сорбцию АФП проводят в стерильных условиях. Сорбент (Br-CN-сефароза), содержащий ковалентно пришитые антитела против человеческого АФП (2 мг/мл), объединяют со стерильным раствором сыворотки. Смесь оставляют в емкости, периодически перемешивая, при температуре 4 °С на 48 ч. Сорбент с аффиносвязанным АФП отделяют от раствора сыворотки декантированием, смешивают с раствором $MgCl_2$ (15%), переносят в хроматографическую колонку и отмывают от несорбированных сывороточных белков, пропуская через колонку сначала раствор $MgCl_2$, а затем 0,9%-ный раствор NaCl. Раствор $MgCl_2$ применяют для исключения неспецифического связывания белков крови с сорбентом.

Таблица 2.1.4

Стадия выделения АФП из сыворотки методом аффинной хроматографии

Израсходовано	9,7 л стерильной разведенной сыворотки, содержащей 242,5 мг АФП; аффинный сорбент — 1 л; спирт этиловый — 1 л; 0,9%-ный раствор NaCl — 4 л; 15%-ный раствор $MgCl_2$
Получено	Отмытый от несорбированных белков аффинный комплекс АФП — АТ на сорбенте — 1 л
Продолжительность стадии	1,5 сут.
Потери	Нет
Отходы	1) Декантат из сорбента — 4 л; 0,9%-ный раствор NaCl; 2) 1 л этилового спирта после промывки сорбента (на регенерацию); 3) декантат — 9,5 л стерильной сыворотки, содержащей 80 мг АФП; 4) декантат — 4 л 15%-ного р-ра $MgCl_2$

Сорбент с нанесенным продуктом переносят в стерильном 0,9%-ном растворе NaCl из хроматографической колонки в емкость, декантируют и заливают элюирующим раствором (0,9% NaCl, pH 2,3). Смесь при периодическом перемешивании выдерживают 1 ч при 4 °С, после чего отстаивают и декантируют. Сорбент вновь заливают элюирующим раствором и выдерживают 1 ч при температуре 4 °С, периодически перемешивая. Во время всех манипуляций pH поддерживают на уровне 2,3. Отстоявшийся раствор декантируют. Элюаты объединяют и передают на стадию ультрафильтрации.

Таблица 2.1.5

Стадия элюиции АФП

Израсходовано	Отмытый от несорбированных белков аффинный комплекс АФП — АТ на сорбенте — 1 л; элюирующий раствор — 4 л; изотонический 0,9%-ный раствор NaCl — 3 л
Получено	4 л элюата, содержащего 137,7 мг АФП; 1 л отмытого сорбента
Продолжительность стадии	4 ч
Потери	АФП на сорбенте — 24,8 мг
Отходы	Декантат из смолы — 3 л; 0,9%-ный раствор NaCl

Ультрафильтрация элюатов и получение первого концентрата АФП. Процесс ультрафильтрации осуществляется на ультрафильтрационной установке типа УПВ-6 на полых волокнах полиамида «фенилон» марки ВПУ-50. Процесс протекает при температуре 6 ± 2 °С в режиме рециркуляции концентрируемого раствора между емкостью, мерником и ультрафильтрационным аппаратом под давлением 0,05 ± 0,02 МПа.

Таблица 2.1.6

Стадия ультрафильтрации элюатов и получения первого концентрата АФП

Израсходовано	4 л элюата, содержащего 137,7 мг АФП; 2 л 0,9%-ного раствора NaCl
Получено	0,5 л концентрата, содержащего 124,3 мг АФП
Продолжительность стадии	1 ч
Потери	АФП при ультрафильтрации — 13,4 мг
Отходы	Пермеат — 5 л 0,9%-ного раствора NaCl

Второй этап очистки АФП. Сорбент, содержащий 2 мг/мл антител к белкам человеческой крови, помещают в хроматографическую колонку типа ХК-10. Концентрат АФП, полученный на предыдущей стадии, дважды пропускают через хроматографическую колонку для связывания белков крови, являющихся примесью к АФП. В концентрате АФП, очищенном от примеси белков, определяют количественное содержание АФП.

Таблица 2.1.7

Стадия очистки АФП

Израсходовано	0,5 л концентрата, содержащего 124,3 мг АФП; 3 л 0,9%-ного раствора NaCl
Получено	0,9 л очищенного от белков раствора АФП, содержащего 111,9 мг АФП
Продолжительность стадии	0,5 сут.
Потери	АФП, сорбированный неспецифично на смоле, — 12,4 мг
Отходы	Продукты промывки колонки — 2,5 л 0,9%-ного раствора NaCl с примесью белков

Гель-фильтрация. Гель-фильтрацию проводят в колонке размером 1500 × 80 мм на сефадексе G-100. Белковый концентрат, проходя через гель, разделяется на фракции – белковую (содержащую АФП) и фракцию веществ с молекулярной массой менее 5000 kD (низкомолекулярные белки крови человека, аминокислоты, соли). После подачи в колонку стерильного полуфабриката препарата АФП первоначально из колонки вытекает не содержащий белка раствор, который отбирают отдельно и после проверки на белок сливают. Далее следует белковая фракция, содержащая АФП. После белковой фракции элюируются низкомолекулярные вещества. Содержащую белок фракцию передают на следующую стадию.

Таблица 2.1.8

Стадия гель-фильтрации

Израсходовано	0,9 л очищенного от балластных белков раствора АФП, содержащего 111,9 мг АФП; растворы для промывки колонки
Получено	1 л очищенного от солей и примесей низкомолекулярных белков и аминокислот раствора, содержащего 105,1 мг АФП
Продолжительность стадии	0,5 сут.
Потери	АФП при фильтрации через колонку — 6,8 мг
Отходы	Продукты промывки колонки — 5 л 0,9%-ного раствора NaCl и 45 л воды с 0,5%-ным раствором формалина

Ультрафильтрация и получение второго концентрата АФП. Очищенный раствор АФП подвергают концентрированию с помощью ультрафильтрации по технологии, изложенной выше.

Таблица 2.1.9

Стадия ультрафильтрации и получения второго концентрата АФП

Израсходовано	1 л очищенного раствора, содержащего 95,1 мг АФП; 2 л 0,9%-ного раствора NaCl
Получено	0,5 л концентрата, содержащего 88,6 мг АФП
Продолжительность стадии	0,5 сут.
Потери	АФП (при ультрафильтрации) — 16,5 мг
Отходы	Пермеат – 2,5 л 0,9%-ного раствора NaCl

Получение субстанции препарата АФП. Для разведения концентрата АФП готовят 5%-ный раствор реополиглюкина на 0,9%-ном растворе NaCl. При изготовлении препарата необходимо учесть фактическое содержание АФП во втором концентрате: в 1 мл концентрата должно содержаться не менее 0,075 мг АФП.

Таблица 2.1.10

Стадия получения полуфабриката (субстанции) препарата АФП

Израсходовано	0,5 л концентрата, содержащего 88,6 мг АФП; 110 мл 5%-ного раствора реополиглюкина; 508 мл 0,9%-ного раствора NaCl
Получено	1,18 л полуфабриката препарата АФП, содержащего 88,6 мг АФП
Продолжительность стадии	2 ч
Потери	—
Отходы	—

Стерилизация субстанции препарата АФП фильтрованием. Полученный раствор препарата АФП стерилизуют путем фильтрования (фильтр с порами диаметром 0,22 мкм). Выемку из полученного раствора препарата АФП проверяют на стерильность. Стерильный раствор передают на розлив.

Таблица 2.1.11

Стадия стерилизации раствора препарата АФП фильтрованием

Израсходовано	1,18 л полуфабриката препарата АФП, содержащего 88,6 мг АФП
Получено	1,15 л стерильного раствора препарата АФП, содержащего 86,4 мг АФП
Продолжительность стадии	2 ч
Потери на стерилизующих пластинах и в шлангах	АФП — 2,2 мг
Отходы	Использованные фильтры

Контроль субстанции препарата АФП. Субстанция препарата АФП (ФСП 42-0244-09-86-01) представляет собой раствор АФП человеческого в 0,9%-ном растворе NaCl для инъекций (ВФС 42-3144-98) с содержанием белка АФП 1000 000 МЕ/мл (1250 мг/мл)*, стабилизированного реополиглюкином (ФС 42-2022-83). Содержание реополиглюкина – 1% в конечной концентрации. Спецификация и методы контроля субстанции препарата АФП представлены в таблице 2.1.12.

Таблица 2.1.12

Спецификация на субстанцию препарата АФП

Показатель	Метод контроля	Требования
Описание		В размороженном виде — прозрачная или слабо опалесцирующая, бесцветная или с желтоватым оттенком жидкость с характерным запахом растворов белка

*Международная единица (МЕ) — единица 1-го международного эталона ВОЗ 72/225 при определении АФП методом ИФА. 1 МЕ ≈ 1,25 нг.

Окончание таблицы 2.1.12

Показатель	Метод контроля	Требования
Подлинность	Иммунохимическая идентификация АФП: а) методом ИФА б) методом диск-электрофореза	 Положительная реакция Соответствие раствору стандартного образца
Белок	Метод Лоури	0,9 — 1,6 мг/мл
Прозрачность	ГФ XI, вып. 1, с. 198	Эталонный раствор № 1 (раствор в воде 1 : 10)
Цветность	ГФ XI, вып. 1, с. 194	Эталонный раствор № 6б (раствор в воде 1 : 10)
pH	ГФ XI, вып. 1, с. 113	5,0 — 7,5 (раствор в воде 1 : 10)
Стерильность	ГФ XI, вып. 2, с. 187	Стерильный
Токсичность	ГФ XI, вып. 2, с. 182	Тест-доза 300 МЕ/кг в/в
Пирогенность	ГФ XI, вып. 2, с. 183	Апирогенный
Молекулярная масса и электрофоретическая чистота	Метод диск-электрофореза	Молекулярная масса АФП 70 ± 2 кD; электрофоретическая чистота не менее 90%
Количественное определение АФП	АФП-ИФА тест-системы	750 000 — 1 250 000 МЕ/мл (± 25%)
Посторонние примеси: а) контроль на присутствие примесей белков крови б) иммуноглобулины козы	Метод дот-блоттинга: а) с антителами к белкам нормальной сыворотки крови человека; б) с антителами к иммуноглобулинам класса G козы	Должны отсутствовать — // —
Реополиглюкин	Спектрофотометрический, при длине волны 509 нм	8 — 12 мг/мл
Контроль на отсутствие антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1, 2)	ИФА-анализ	Должны отсутствовать
Контроль на отсутствие поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg)	— // —	— // —
Контроль на отсутствие антител к вирусу гепатита С	— // —	— // —

Примечание. Методы контроля подробно изложены в разделе 2.2.

Розлив субстанции препарата АФП в ампулы и лиофильная сушка. Для розлива полученного раствора субстанции препарата АФП используют ампулы или флаконы. Субстанцию препарата АФП разливают по 1 мл в ампулу, делают посев на стерильность раствора из ампул.

Таблица 2.1.13

Стадия розлива субстанции препарата АФП в ампулы

Израсходовано	1,15 л стерильного раствора субстанции препарата АФП, содержащего 86,4 мг АФП; 1150 стерильных ампул
Получено	1150 ампул, содержащих 86,4 мг АФП (по 75 мкг в ампуле)
Продолжительность стадии	2 ч
Потери	—
Отходы	—

Лиофильная сушка препарата АФП в ампулах. Раствор препарата АФП в ампулах замораживается в низкотемпературной камере при –45 °С. Возможна заморозка препарата сразу в сублимационном аппарате. Продолжительность заморозки не менее 8 ч. Сушка препарата АФП производится на сублимационных аппаратах. При температуре в препарате –40 °С и ниже включают вакуумный насос. Остаточный вакуум составляет 4–5 Па. Отрицательная температура поддерживается в течение 14–16 ч. Подогрев ведут постепенно до 30–35 °С. Положительная температура поддерживается в течение 10–12 ч. Конечная температура в препарате составляет 26–28 °С.

Таблица 2.1.14

Стадия лиофильной сушки препарата АФП в ампулах

Израсходовано	1150 ампул, содержащих 86,4 мг АФП (по 75 мкг в ампуле)
Получено	1150 ампул, содержащих 86,4 мг АФП (по 75 мкг в ампуле)
Продолжительность стадии	2 ч
Потери	—
Отходы	—

После того как процесс высушивания завершен, отключают нагрев и выключают вакуумный насос. После запаивания ампул препарат подлежит аттестации в соответствии с фармакопейной статьей предприятия.

СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА

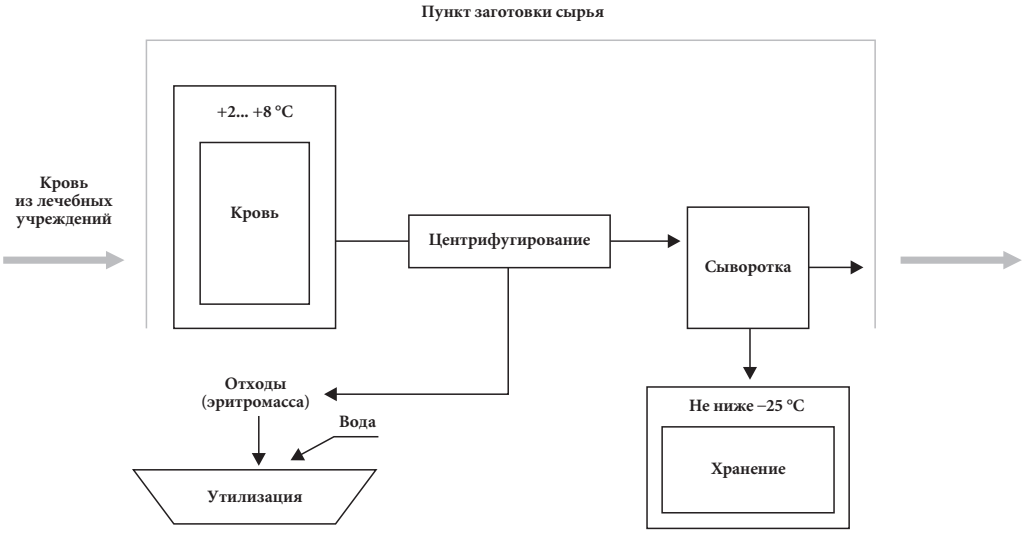


Рис. 2.1.2. **Схема производства. Получение сыворотки крови**

Рис. 2.1.2 (продолжение). **Получение разведенной стерильной сыворотки**

СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА

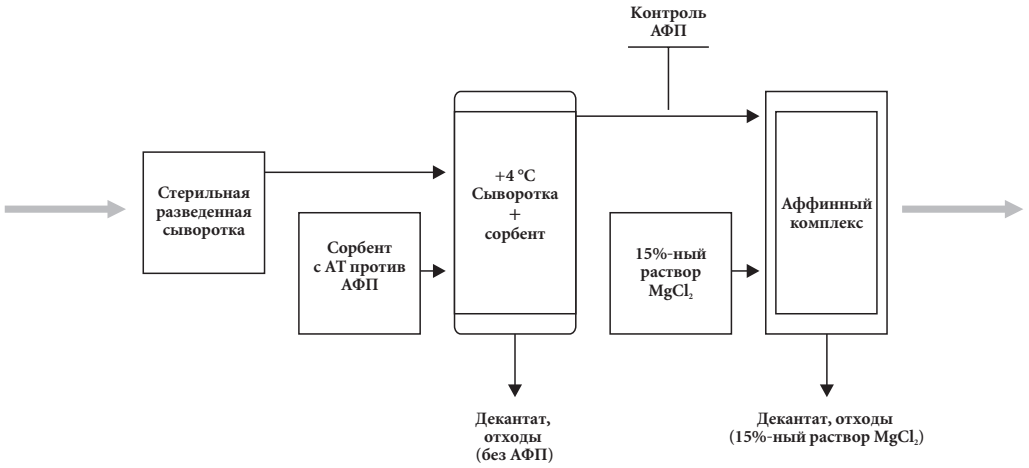


Рис. 2.1.2 (продолжение). **Выделение АФП из сыворотки методом аффинной хроматографии**

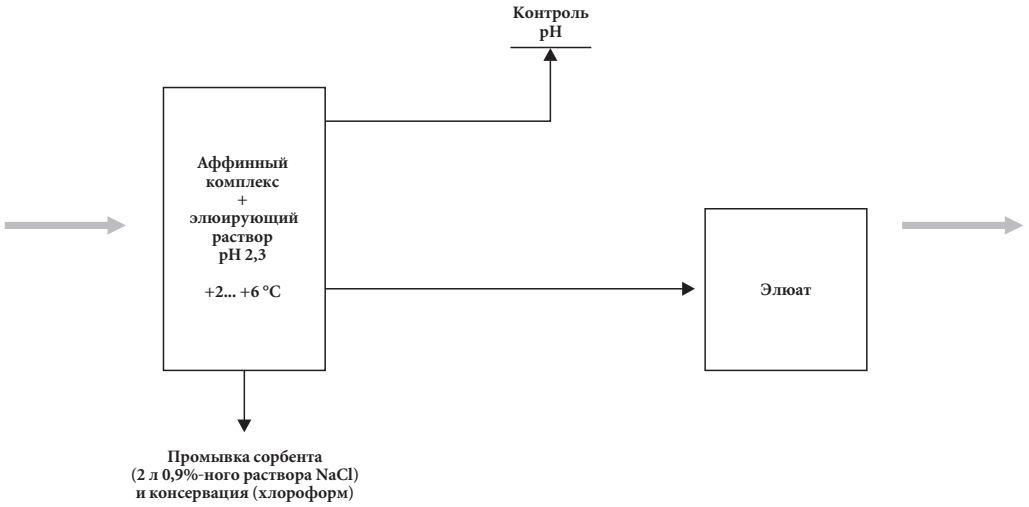


Рис. 2.1.2 (продолжение). **Элюирование АФП**

СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА

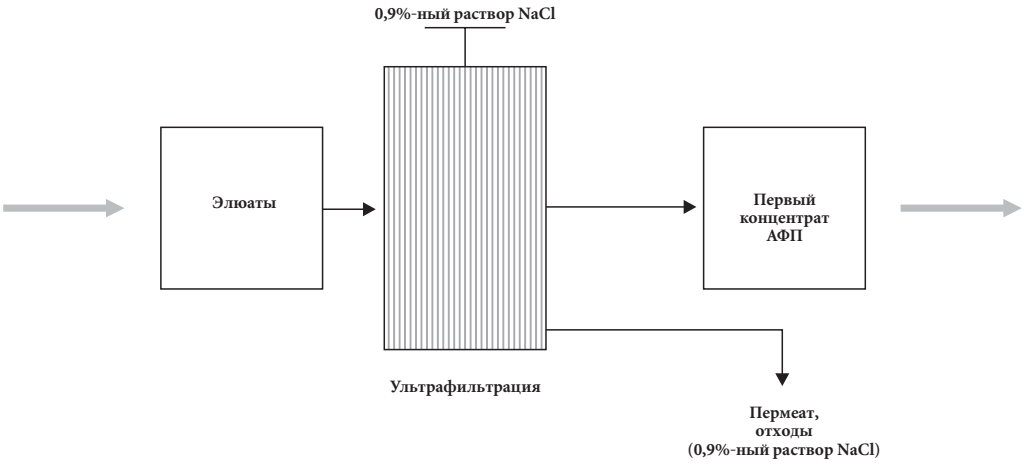


Рис. 2.1.2 (продолжение). **Ультрафильтрация, получение первого концентрата АФП**

Рис. 2.1.2 (продолжение). **Очистка АФП**

СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА

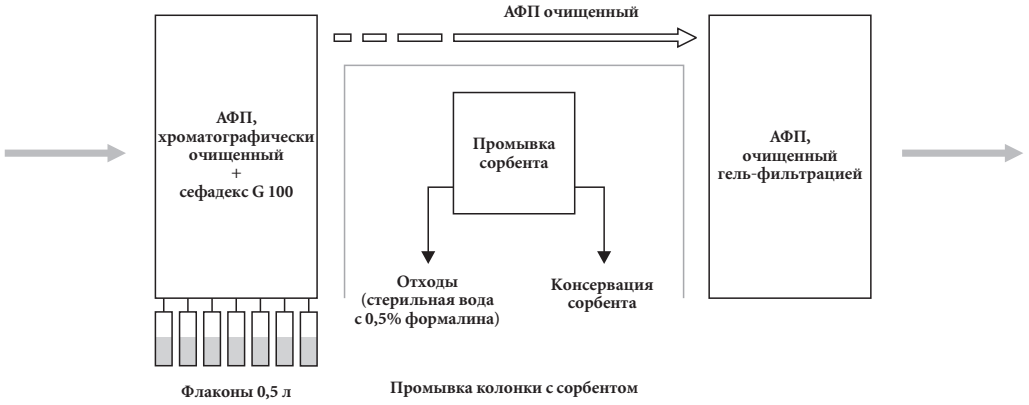


Рис. 2.1.2 (продолжение). **Гель-фильтрация**

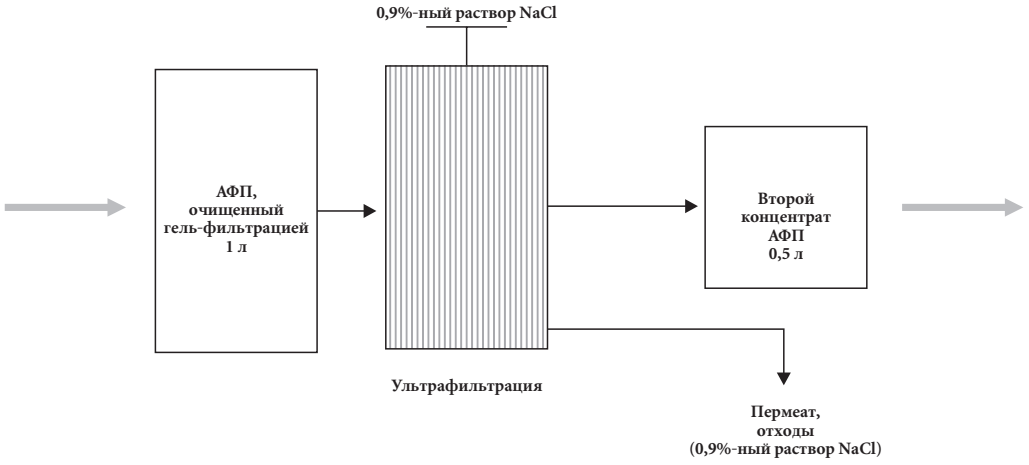


Рис. 2.1.2 (продолжение). **Ультрафильтрация, получение второго концентрата АФП**

СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА

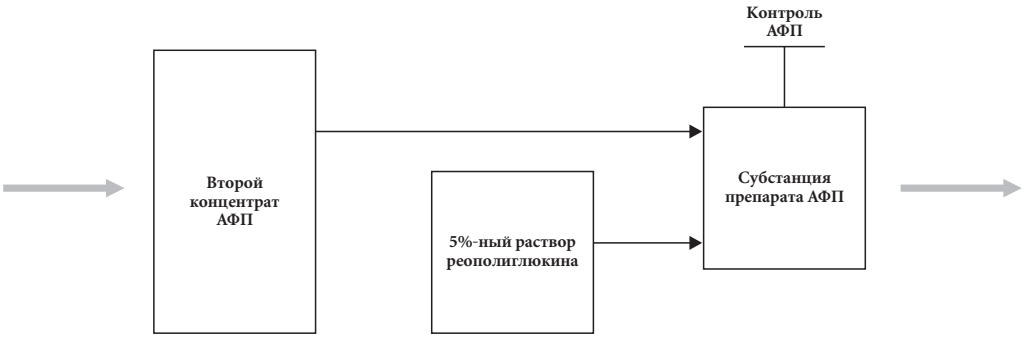


Рис. 2.1.2 (продолжение). **Получение субстанции препарата АФП**

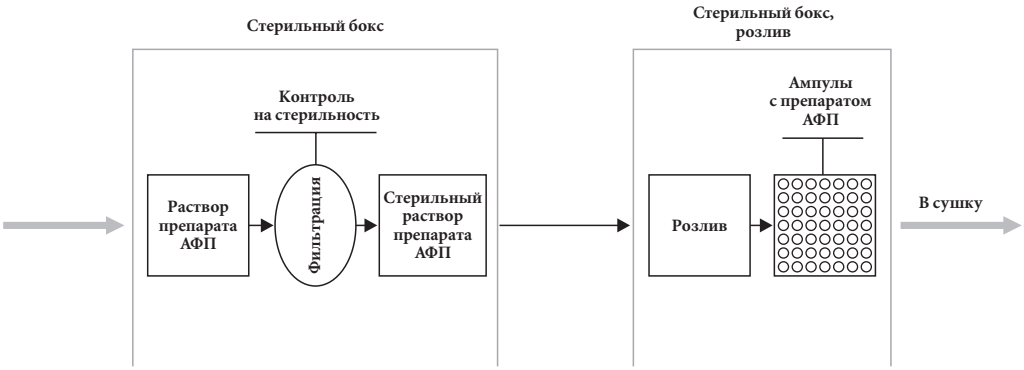


Рис. 2.1.2 (продолжение). **Стерилизация субстанции препарата АФП, розлив препарата АФП**

СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА

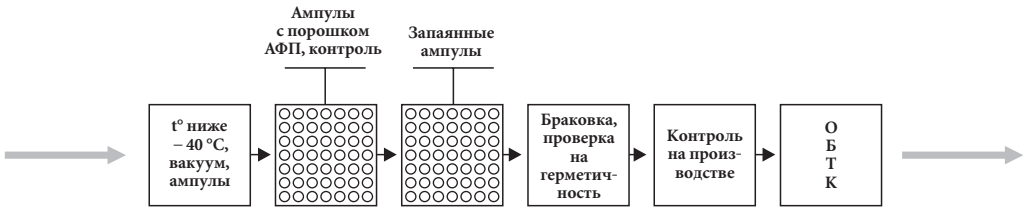


Рис. 2.1.2 (продолжение). **Сушка препарата АФП, запайка ампул, контроль препарата АФП**

Примечание. ОБТК – отдел биотехнологического контроля.

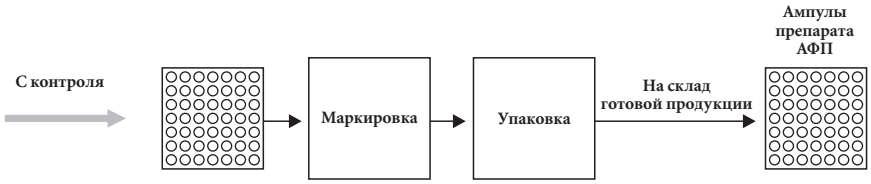


Рис. 2.1.2 (продолжение). **Маркировка и упаковка препарата АФП**

Согласно рекомендациям ВОЗ «Указания по методике инактивации и удалению вирусов, предназначенной для гарантированной безопасности от вирусов продуктов плазмы крови человека» от 26–30 ноября 2001 г. (Женева), в технологическую цепь производства препарата АФП, помимо неоднократных вирусологических контролей на разных этапах (донор, сырье, субстанция, готовая лекарственная форма, вводятся соответствующие вирус-инактивирующие мероприятия. Можно выделить пять этапов инактивации вирусов:

1) инактивация вирусов (растворитель/детергент типа TRITON-X100 или TWEEN-80) и осаждение белка на этапе разведения сыворотки;

2) нанофильтрация перед хроматографической очисткой;

3) хроматографическая очистка в три этапа (собственно выделение АФП, очистка от белков плазмы крови, гель-фильтрация), что позволяет эффективно очиститься от безоболочечных вирусов;

4) на этапе элюции pH элюирующего раствора равен 2,2–2,3, что эффективно для инактивации вирусов в оболочке (необходимо отметить, что такие значения pH намного эффективнее, чем рекомендуемые ВОЗ (4,0–5,0) для той же цели);

5) лиофилизация, эффективная по отношению к вирусам в оболочке и некоторым безоболочечным вирусам.

2.2. КОНТРОЛЬ ПРЕПАРАТА АФП

В результате осуществления вышеизложенного технологического процесса впервые была получена инъекционная лекарственная форма препарата АФП (патенты на изобретение РФ № 2100031 и 2121350), которая в дальнейшем была использована в доклинических и клинических испытаниях. Препарат АФП в 1999 г. приказом № 136 от 15.09.1999 г. зарегистрирован МЗ РФ под названием «Альфетин» (регистрационное удостоверение № 99/136/12 от 19.04.1999 г.).

Для контроля параметров инъекционной лекарственной формы препарата АФП нами разработана временная фармакопейная статья (ВФС), зарегистрированная Государственным фармакопейным комитетом при МЗ РФ под № ВФС 42–2889–97 в 1997 г.

Препарат АФП выпускается в ампулах или во флаконах в виде лиофилизированного порошка или лиофилизированной массы от белого до белого с сероватым оттенком цвета. Один флакон или ампула содержат 75 ± 15 мкг АФП и 5 ± 1 мг реополиглюкина (ФС 42–2022–83).

Подлинность препарата АФП определяют по результатам следующих тестов:

1. Иммунохимическая идентификация АФП, которая осуществляется методом иммуноферментного анализа. Препарат АФП должен давать положительную реакцию с высокоспецифичными антителами к АФП.

2. Электрофоретическая идентификация АФП по молекулярной массе и его электрофоретической чистоте.

Результаты электрофоретического анализа. Электрофоретическая идентификация АФП и определение электрофоретической чистоты препарата осуществляются по результатам визуальной оценки и денситометрии окрашенных гелей. Визуально на электрофореграмме препарата АФП должна обнаруживаться одна мажорная окрашенная зона АФП, совпадающая с зоной АФП-стандарта и располагающаяся несколько выше зоны бычьего сывороточного альбумина в препарате белков-стандартов (рис. 2.2.1 и 2.2.2). Кроме ма-

жорной окрашенной зоны допускается присутствие на электрофореграмме минорных окрашенных зон, доля которых не должна превышать 10% от общего количества белка на дорожке геля (по результатам денситометрии). Внутри зоны АФП допускается присутствие до четырех накладывающихся друг на друга или тесно расположенных подзон – признаков природной гетерогенности.

В отсутствие стандарта АФП допускается проведение электрофоретической идентификации действующего вещества в препарате по его молекулярной массе. Молекулярная масса АФП должна соответствовать 70 + 2 kD, электрофоретическая чистота должна быть не менее 90%.

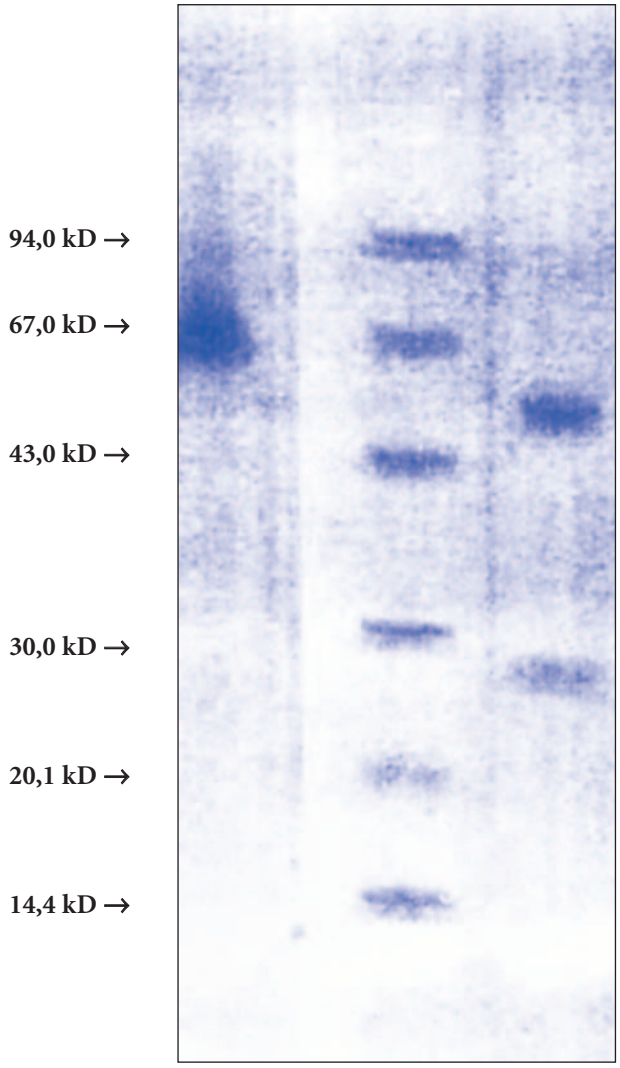


Рис. 2.2.1. **SDS-электрофорез препарата АФП в градиентном ПААГ с концентрацией 8–22% в присутствии 2-меркаптоэтанола**

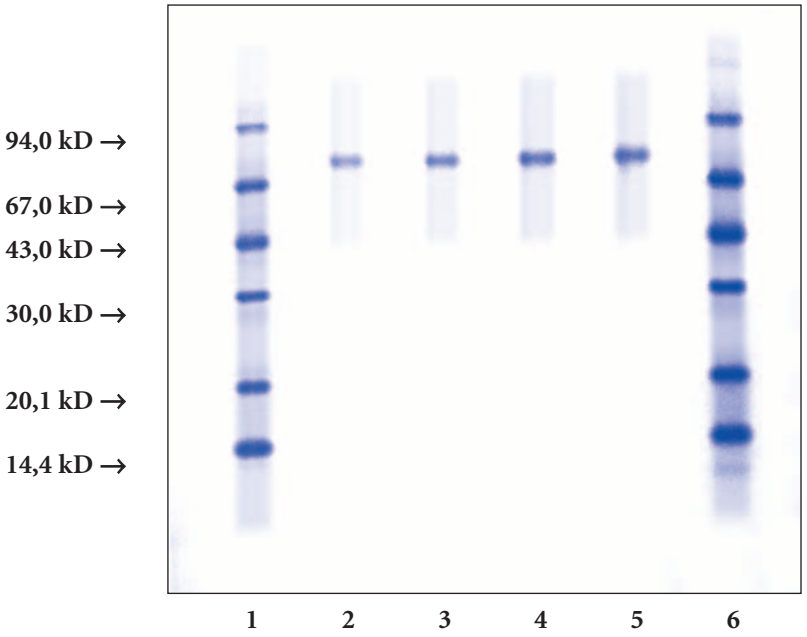


Рисунок 2.22. **Электрофорез серий препарата АФП («Профеталь») в ПААГ с SDS (по U. Laemli*).**

Разделяющий гель – 9%, концентрирующий гель – 5%, окраска – коллоидный кумасси (ICN). № 1, 6 – маркеры (Pharmacia); № 2, 3, 4 – серии препарата АФП («Профеталь»), содержание белка – 2–3 мкг/лунку; № 5 – стандарт АФП (ICN) – 2 мкг/лунку.

**Laemli U. K. // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.*

Заключение: серии препарата α-фетопротеина («Профеталь») соответствуют по молекулярной массе стандарту α-фетопротеина и отличаются очень высокой электрофоретической чистотой.

Содержание белка. Определение количества белка проводят по методу Лоури (согласно ГФ XI, вып. 2, с. 31). Образец для анализа готовят, растворив содержимое ампулы или флакона в 1 мл дистиллированной воды. Содержание белка в ампуле или флаконе должно быть 60–90 мкг.

Растворимость. Растворим в воде и в 0,9%-ном растворе NaCl (ГФ XI, вып. 1, с. 175).

Прозрачность. Раствор ампулы или флакона препарата в 5,00 ± 0,05 мл воды должен выдерживать сравнение с эталонным раствором № 1 (ГФ XI, вып. 1, с. 198).

Цветность. Раствор ампулы или флакона препарата в 5,00 ± 0,05 мл воды должен выдерживать сравнение с эталонным раствором № 6б (ГФ XI, вып. 1, с. 194).

Значение pH. В растворе ампулы или флакона препарата в 5,00 ± 0,05 мл воды должно составлять от 5,5 до 7,5. Исследуется потенциометрически (ГФ XI, вып. 1, с. 113).

Содержание воды. Определение количества воды в препарате проводят кулонометрическим методом в среде отработанного реактива Фишера (ТУ-6-09-1487-76) с биамперометрическим определением точки эквивалентности (ГФ XI, вып. 1, с. 176). Для анализа используют 4–5 мг препарата АФП. Содержание воды в препарате не должно превышать 10%.

Допускается проведение контроля содержания воды в препарате методом высушивания (ГФ XI, вып. 1, с. 176). Для этого 50–60 мг препарата сушат при 100–105 °С до постоянной массы. Потеря в массе не должна превышать 10%.

Механические примеси. Препарат должен соответствовать требованиям Инструкции по контролю на механические включения сухих лекарственных средств для инъекций, применяемых в виде растворов (РД 42-1-89 и И-42-3-85).

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Испытание на стерильность проводят методом мембранной фильтрации (ГФ XI, вып. 2, с. 187). Испытанию подвергается содержимое 5 ампул или флаконов препарата. Для фильтрации содержимое каждой ампулы или флакона предварительно растворяют в 5 мл 0,9%-ного раствора NaCl, затем объединяют. Допускается использование метода прямого высева.

Пирогенность. Препарат должен быть апирогенным. Испытание проводят на кроликах по методике, изложенной в ГФ XI (вып. 2, с. 183). Тест-доза 15 мкг/мл на 1 кг массы кролика. Для получения испытуемого раствора содержимое 1 ампулы или флакона растворяют в 5 мл 0,9%-ного раствора NaCl.

Токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Испытание проводят на мышах по методике, изложенной в «Сборнике инструкций», утвержденном приказом Минздрава СССР от 13.01.1983 г. № 31 и ГФ XI (вып. 2, с. 182). Тест-доза препарата соответствует 7,5 мкг АФП в 0,5 мл 0,9%-ного раствора NaCl на одну мышь (375 мкг/кг) внутрибрюшинно. Для получения испытуемого раствора содержимое 1 ампулы растворяют в 5 мл 0,9%-ного раствора NaCl.

Количественное определение АФП. Количественное определение препарата основано на реакции высокоспецифичного связывания АФП, содержащегося в препарате, с антителами к АФП методом ИФА. Определение АФП проводят с помощью набора реагентов «АФП-ИФА-Бест» (производство АО «Вектор-Бест» ГНЦВБ «Вектор», Новосибирск) с чувствительностью анализа 2,5 МЕ/мл (3,125 нг/мл) АФП и специфичностью более 95%, что удовлетворяет требованиям ТУ 42-3-56-91. Допускается использование наборов реагентов (тест-систем) аналогичного назначения, если они не уступают по своим характеристикам вышеназванному набору.

Контроль на отсутствие примесей белков крови и иммуноглобулинов козы. Контроль осуществляется методом дот-блоттинга с антителами к белкам нормальной сыворотки крови человека и IgG козы.

Посторонние примеси. В качестве наполнителя и стабилизатора в препарате присутствует реополиглюкин (ФС 42-2022-83) в количестве от 4 до 6 мг на 1 ампулу.

Количественное определение реополиглюкина. Определение проводят согласно методике определения сахаров с тимоловым реактивом. Перед определением образец препарата АФП разводят в 100 раз.

Тест-доза. Контролируют (согласно ГФ XI, вып. 2, с. 140) по результатам теста «Количественное определение АФП». Испытанию подвергают 3 ампулы или флакона. Содержание АФП в ампуле или флаконе препарата не должно отклоняться от номинального более чем на ± 20%.

ГЛАВА 3

Экспериментальное изучение влияния АФП на физиологические показатели в норме и на моделях патологических реакций

Оценка безопасности и биологической активности препарата АФП проведена *in vivo* на 779 мышах-гибридах (СВА × С57Bl/6) F1, 120 мышах СВА, 89 мышах С57Bl/6, 78 беспородных белых мышах, 132 крысах популяции Вистар, 34 морских свинках, 36 кроликах породы шиншилла, 12 яванских макаках (*Macaca fascicularis*); *in vitro* на бактериальных и тканевых культурах, с использованием рекомендаций и регламентирующих документов [25, 31, 62, 84, 150, 178].

Исследования проведены на базе лабораторий научно-исследовательских институтов: ГНЦ МЗ РФ Институт иммунологии, КНЦ РАМН (г. Москва); НПО «Вектор» (г. Новосибирск); НПО «Биомед», ПГМА (г. Пермь); НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН, НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН (г. Томск).

В экспериментах использовалась готовая лекарственная форма АФП, которая соответствовала требованиям ВФС 42-2889-97 (далее – препарат АФП). Контроль проведен в лабораториях отдела фармакологической экспертизы Государственного института доклинической и клинической экспертизы МЗ МП РФ (г. Москва), ОБТК Омского завода бактериальных препаратов (г. Омск) и ОБТК НПО «Биомед» (г. Пермь).

Оценивали общетоксическое [120, 202, 203, 228], аллергизирующее [158], мутагенное [143, 153], потенциально канцерогенное, иммуномодулирующее [235], радиопротекторное и противоопухолевое [95] свойства препарата АФП.

Острую токсичность лекарственной формы АФП изучали при внутривенном введении на мышах (самцах и самках) гибридах первого поколения (СВА × С57Bl/6) массой 18–20 г и морских свинках массой 280–350 г. Токсикологическое изучение препарата АФП при подкожном введении проведено на яванских макаках.

Опыт работы в области лекарственной токсикологии иммунопрепаратов и данные литературы [199] свидетельствуют о том, что традиционный вид животных для изучения хронической токсичности – крысы – малочувствителен, а потому малопригоден для изучения нетоксичных иммунобиологических препаратов, токсичность которых в основном обусловлена не собственно активной лекарственной субстанцией, содержащейся, как правило, в очень малых дозах, а примесями эндотоксинов и химических соединений, используемых при ее получении и очистке. Наиболее чувствительным видом животных для оценки действия как иммуноактивных протеинов, так и возможных эндотоксинов и других химических соединений являются кролики. Благодаря высокой чувствительности иммунной системы этот вид животных наиболее пригоден для оценки пирогенного действия различных веществ. С учетом вышесказанного хроническая токсичность препарата АФП также была изучена именно на этих животных. Длительность хронического токсикологического эксперимента определена сроком 4 месяца (3 месяца введения препарата и 1 месяц восстановительного периода) на основании предполагаемого курса лечения препаратом АФП у людей (3–4 недели) и представлена тестами, отраженными в таблице 3.1.

Таблица 3.1

Тесты, использованные в токсикологическом эксперименте

Исследуемая система	Использованный тест
Интегральные показатели и органы	Прирост массы тела, внешний вид, симптомы интоксикации
Кожа, слизистые оболочки	Местное раздражающее действие
Периферическая кровь	Количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов. Лейкоцитарная формула, гемоглобин, протромбиновый индекс
Костный мозг	Количество ядросодержащих клеток на одну бедренную кость. Миелограмма
Центральная и периферическая нервная система	Двигательная активность, ориентировочные реакции, мышечный тонус, координация движений
Сердечно-сосудистая система	ЭКГ, ритм сердечных сокращений, частота дыхания
Выделительная система	Суточный диурез, скорость диуреза, удельный вес, pH, общий белок, глюкоза, креатинин, натрий, калий в моче
Печень	Биохимические показатели сыворотки крови: глюкоза, мочевина, креатинин, общий белок, альбумин, α-, β- и γ-глобулин, ЩФ, АЛТ, АСТ, ЛДГ, общий билирубин, липопротеиды, холестерин, хлориды, натрий, калий
Эндокринная система	Трийодтиронин (T_3), тироксин (T_4), кортизол
Гистологические исследования внутренних органов	Световая микроскопия

Аллергизирующие свойства препарата АФП оценивались в реакции гиперчувствительности немедленного и замедленного типа (ГНТ и ГЗТ).

Для оценки мутагенных свойств АФП проведен анализ доминантных летальных мутаций зародышевых клеток мышей, генных мутаций микроорганизмов в тесте Эймса, хромосомных аберраций в клетках костного мозга мышей.

Для оценки потенциальных канцерогенных свойств препарата изучали ДНК-повреждающее действие в SOS-хромотесте.

Соотношение белковых фракций крови определяли методом электрофореза на ацетатцеллюлозных пленках [121], содержание ионов натрия и калия крови – методом пламенной фотометрии.

В моче подопытных животных измеряли уровень белка, глюкозы, содержание натрия и калия, оценивали показатели диуреза по общепринятым методам [140].

Обработка результатов исследования проведена методом вариационной статистики с оценкой достоверности по t-критерию Стьюдента.

3.1. ПЕРВИЧНАЯ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТА АФП

3.1.1. Оценка пирогенной активности АФП

Пирогенность АФП определяли на 6 кроликах породы шиншилла массой 2,2–2,3 кг. Препарат АФП вводили внутривенно из расчета 5 и 25 мкг/кг в объеме 5 мл физиологического раствора (ФР). После введения препарата трижды измеряли ректальную температуру кроликов с интервалом в 1 ч, а также через сутки. Полученные данные (табл. 3.1.1) свидетельствуют о том, что препарат АФП в дозах 5 и 25 мкг/кг, превышающих в 5 и 25 раз рекомендованную для человека дозу, не вызывает пирогенного эффекта.

Таблица 3.1.1

Температура тела кроликов после введения АФП

№ животного	Масса тела, г	Исходная температура тела, °С	Температура тела после введения АФП, °С			
			через 1 ч	через 2 ч	через 3 ч	через 4 ч
1	2 600	38,7	38,4	38,6	39,0	38,7
2	2 330	38,0	37,9	38,2	38,4	38,0
3	2 610	38,5	38,2	38,7	38,3	38,5
4	2 650	38,6	38,2	38,1	38,5	38,9
5	2 570	39,0	39,6	39,1	39,0	38,4
6	2 720	38,9	38,1	38,1	38,4	38,9

3.1.2. Определение примесей бактериальных эндотоксинов

Наличие примесей бактериальных эндотоксинов в препарате АФП оценивали в тесте с дактиномицином (ДАМ), который повышает чувствительность мышей к токсическому воздействию в 100 тысяч раз. Учитывали процент гибели мышей-самцов (СВА × С57BI/6) F1, которым вводили ДАМ (Sigma) в расчете 15 мкг на мышь массой 20 г в объеме 0,1 мл, а через 60 мин внутрибрюшинно – препарат АФП в дозах 125; 312,5; 625; 3125 мкг/кг. В качестве положительного контроля использовали 0,001 мкг ЛПС (*E.coli* 0,111 : B4, Sigma). В качестве отрицательного контроля служили животные, получавшие ФР. Учет гибели животных проводили в течение 48 ч. Полученные результаты представлены в таблице 3.1.2 и свидетельствуют, что примесей бактериальных эндотоксинов препарат АФП не содержит.

Таблица 3.1.2

Гибель мышей при введении АФП на фоне дактиномицина (*n* = 10)

№ группы	Наименование группы	Доза ДАМ, мкг/г	Доза АФП, мкг/кг	% гибели через 48 ч
1	ДАМ	0,75	–	0
2	ДАМ + ЛПС	0,75	–	40
3	ДАМ + АФП	0,75	125	0
4	ДАМ + АФП	0,75	312	0
5	ДАМ + АФП	0,75	625	0
6	ДАМ + АФП	0,75	3 125	0

3.2. ОЦЕНКА МЕСТНОГО РАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ

Для исследования раздражающего действия препарата АФП использовали метод оценки раздражения слизистой оболочки глаз кроликов породы шиншилла. В конъюнктивальный мешок правого глаза кроликов закапывали дважды (с интервалом в 40 мин) водный раствор препарата АФП активностью 25 000 Ед (30 мкг в 2 каплях), в левый глаз – воду для инъекций. Через 1,5; 4; 6 ч и в течение всего периода наблюдения (5 сут.) состояние слизистой оболочки правого глаза (опытный) не отличалось от контрольного. На основании этих данных можно сделать вывод об отсутствии раздражающего действия препарата АФП.

Местную реакцию на препарат АФП оценивали также при его внутрикожном введении в подушечку задней лапки беспородных мышей в дозе 25 000 Ед (30 мкг в объеме 50 мкл). В контралатеральную конечность вводили в том же объеме физиологический раствор. Индекс реакции определяли через 24 ч как отношение разницы объема стоп опытной и контрольной конечностей к массе контрольной и выражали в процентах. Полученные результаты свидетельствуют, что даже в дозе, значительно превышающей терапевтическую, препарат не вызывал местной реакции (индекс реакции не превышал 2,5%).

3.3. ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА АФП

3.3.1. Токсикологическое изучение препарата АФП при внутривенном введении на мышах и морских свинках

Изучение острой токсичности препарата АФП проведено на 24 мышах (СВА × С57Bl/6) F1 массой 18–20 г (12 самок, 12 самцов), 16 морских свинках (8 самок массой 230–250 г, 8 самцов массой 300–320 г).

Для оценки токсичности на мышах и морских свинках выбрана максимальная доза 10 мг/кг, что в 10 тысяч раз превышает дозу для человека.

Препарат АФП растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривенно мышам в концентрации 0,4 мг/мл и морским свинкам в концентрации 1 мг/мл однократно. В зависимости от массы тела каждого животного рассчитывали объем введенного раствора (конечная доза 10 мг/кг).

Наблюдения за животными осуществляли в течение 14 сут. Состояние животных оценивали по поведению, внешнему виду, пищевой активности, изменению массы тела. В таблицах 3.3.1 и 3.3.2 представлены данные по изменению массы тела мышей и морских свинок в течение всего периода наблюдения. Как видно из этих данных, препарат АФП при введении в дозе 10 мг/кг (эквивалент 10 тысяч терапевтических доз) не вызывает отставания в массе тела ни у мышей, ни у морских свинок; не было отмечено также и изменений относительной массы *($p > 0{,}05$)* жизненно важных органов (табл. 3.3.3).

Таблица 3.3.1

Масса тела мышей после однократного введения препарата АФП

№ группы	Препарат	Пол	Масса тела, г		
			Исходно	7-е сут.	14-е сут.
1	Контроль (ФР)	самцы	20,3 ± 0,62	21,5 ± 0,73	22,3 ± 0,54
2	АФП, 10 мг/кг	самцы	20,4 ± 0,71	21,7 ± 0,8	22,6 ± 0,63
3	Контроль (ФР)	самки	18,6 ± 0,55	19,5 ± 0,61	20,3 ± 0,63
4	АФП, 10 мг/кг	самки	18,5 ± 0,59	19,6 ± 0,72	20,5 ± 0,18

Таблица 3.3.2

Масса тела морских свинок после однократного введения препарата АФП

№ группы	Препарат	Пол	Масса тела, г		
			Исходно	7-е сут.	14-е сут.
1	Контроль (ФР)	самцы	317 ± 10,8	350 ± 13,2	412 ± 10,6
2	АФП, 10 мг/кг	самцы	320 ± 11,7	355 ± 12	408 ± 13,8
3	Контроль (ФР)	самки	241 ± 7,9	264 ± 10,1	308 ± 9,7
4	АФП, 10 мг/кг	самки	244 ± 9,6	270 ± 11,3	313 ± 12,4

Таблица 3.3.3

Коэффициенты массы внутренних органов (× 100) мышей-самок (СВА × С57BI/6) F1 на 14-е сутки после однократного введения АФП в дозе 10 мг/кг

Органы	Препарат	
	ФР	АФП
Печень	5,76 ± 0,166	5,84 ± 0,180
Почки	1,27 ± 0,038	1,26 ± 0,035
Сердце	0,48 ± 0,019	0,49 ± 0,021
Тимус	0,29 ± 0,018	0,29 ± 0,022
Селезенка	0,45 ± 0,021	0,46 ± 0,022
Надпочечники	0,04 ± 0,002	0,04 ± 0,002

3.4. ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА АФП ПРИ ПОДКОЖНОМ ВВЕДЕНИИ НА ОБЕЗЬЯНАХ

Эксперименты проведены на 18 самцах яванских макак (*Macaca fascicularis*) массой 3900–7900 г, содержавшихся одиночно в клетках в стандартных условиях питомника НПО «Вектор» (г. Новосибирск).

Препарат АФП вводили подкожно однократно в дозах 0,1 и 1 мг/кг массы тела, что соответственно в 100 и 1000 раз превышает рекомендуемую для человека дозу. Контрольные животные получали физиологический раствор. Обследование обезьян проводили под наркозом (0,1 мл/кг калипсола внутримышечно) до введения, через 1 и 7 сут. после введения препарата. В эти сроки животных взвешивали, определяли температуру тела (ректально), визуально определяли частоту дыхательных движений (ЧДД), регистрировали ЭКГ в стандартных отведениях [118]. Из вены забирали кровь для гематологического [127] и биохимического анализов [222]. Через сутки после взятия крови, в одно и то же время, собирали мочу для биохимического анализа.

Для оценки функционального состояния внутренних органов и интенсивности обменных процессов в эксперименте были использованы следующие биохимические показатели: уровень общего белка, холестерина, глюкозы, креатинина крови, кислоторастворимой фракции нуклеиновых кислот (КРФ НК), активность щелочной фосфатазы (ЩФ), аланин- и аспартатаминотрансфераз (АЛТ и АСТ). Соотношение белковых фракций крови определяли методом электрофореза на ацетатцеллюлозных пленках, содержание ионов натрия и калия крови – методом пламенной фотометрии [140]. В моче подопытных животных измеряли уровень белка, глюкозы, содержание натрия и калия, оценивали показатели диуреза.

Общее состояние животных, получавших препарат АФП (0,1 и 1 мг/кг), их внешний вид, индивидуальные колебания массы тела и температуры не выходили за пределы физиологической нормы и не отличались от аналогичных показателей у контрольных животных ($p > 0,05$). Препарат АФП не оказывал влияния на ректальную температуру, на частоту пульса и продолжительность сердечного цикла животных (табл. 3.4.1, 3.4.2). В месте введения препарата АФП не отмечено каких-либо признаков воспаления или раздражения в период наблюдения.

Препарат АФП (0,1 и 1 мг/кг) не оказывал существенного влияния ($p > 0,05$) на содержание эритроцитов и гемоглобина; не выявлено статистически значимых отличий количества лейкоцитов и тромбоцитов, лейкоцитарного состава периферической крови животных. Результаты гематологического анализа представлены в таблице 3.4.3.

Препарат АФП в обеих дозах не оказывал существенного влияния ($p > 0,05$) на биохимические показатели крови (табл. 3.4.4, 3.4.5), а также на количественный и качественный состав белкового спектра крови обезьян в период наблюдения (табл. 3.4.6).

Показатели, характеризующие функцию почек: диурез, pH, плотность мочи, показатели минерального обмена, соотношение креатинина в крови и моче – колебались в пределах границ физиологической нормы у животных обеих групп (табл. 3.4.7).

Таким образом, препарат АФП в дозах 0,1 и 1 мг/кг не оказывал влияния на общее состояние обезьян, на гематологические, биохимические показатели крови животных, а также на функцию почек.

Таблица 3.4.1

Значения физиологических показателей у обезьян при подкожном введении препарата АФП

Группа	Доза	Масса, г			Температура тела, °С		
		Исходно	1-е сут.	7-е сут.	Исходно	1-е сут.	7-е сут.
Контроль, ФР (n = 6)	1 мл	5 780 ± 1 164	5 603 ± 1 116	5 507 ± 1 125	38 ± 0,7	37,2 ± 0,8	37,6 ± 0,5
Препарат АФП (n = 6)	1 мг/кг	4 653 ± 472	4 643 ± 485	4 613 ± 547	7,8 ± 0,2	38 ± 0,2	37,6 ± 1,3
Препарат АФП (n = 6)	0,1 мг/кг	4 877 ± 523	4 893 ± 543	4 897 ± 543	8,5 ± 0,1	38,4 ± 0,3	37,9 ± 0,2
Группа	**Доза**	**ЧДД/30 с**			**Пульс, уд./мин**		
		Исходно	**1-е сут.**	**7-е сут.**	**Исходно**	**1-е сут.**	**7-е сут.**
Контроль, ФР (n = 6)	1 мл	18 ± 1,5	16,7 ± 1,3	14,3 ± 0,9	187 ± 36	180 ± 24	173 ± 22
Препарат АФП (n = 6)	1 мг/кг	16,7 ± 0,7	16,7 ± 1,3	17 ± 1,5	213 ± 33	207 ± 29	213 ± 22
Препарат АФП (n = 6)	0,1 мг/кг	18,7 ± 1,8	18 ± 2,3	16,7 ± 2,7	207 ± 29	173 ± 29	193 ± 29

Таблица 3.4.2

Значения времени сердечного цикла у обезьян после подкожного введения препарата АФП

Группа	Доза	Время сердечного цикла, с		
		Исходно	1-е сут.	7-е сут.
Контроль, ФР (n = 6)	1 мл	0,31 ± 0,04	0,39 ± 0,06	0,33 ± 0,04
Препарат АФП (n = 6)	1 мг/кг	0,37 ± 0,05	0,37 ± 0,08	0,45 ± 0,1
Препарат АФП (n = 6)	0,1 мг/кг	0,32 ± 0,04	0,32 ± 0,06	0,31 ± 0,04

Таблица 3.4.3

Значения гематологических показателей у обезьян в динамике после подкожного введения препарата АФП

Группа	Срок, сут.	Гемоглобин, г/л	Эритроциты $\times 10^{12}$	Тромбоциты $\times 10^{9}$	Лейкоциты $\times 10^{9}$	Лейкоцитарная формула, %				
						Эозинофилы	Нейтрофилы		Моноциты	Лимфоциты
							п/я*	с/я**		
Контроль, ФР ($n = 6$)	Исходно	151 ± 5	5,1 ± 0,2	256,7 ± 24,9	10,85 ± 1,6	–	0,3 ± 0,3	67 ± 7	3 ± 2,4	23 ± 3
Препарат АФП, 0,1 мг/кг ($n = 6$)	– // –	153 ± 1	4,7 ± 0,1	285 ± 19,9	9,93 ± 1,16	–	–	69 ± 7,6	2,3 ± 0,3	30,7 ± 7
Препарат АФП, 1 мг/кг ($n = 6$)	– // –	156 ± 4	5,3 ± 0,1	275,8 ± 56,1	8,40 ± 1,22	–	1,3 ± 0,7	78 ± 9,3	1 ± 0,6	20 ± 5
Контроль, ФР ($n = 6$)	1	159 ± 3	4,6 ± 0,1	200,8 ± 20,2	10,65 ± 0,3	–	0,3 ± 0,3	70,5 ± 6,5	3,5 ± 1,5	15,5 ± 1,5
Препарат АФП, 0,1 мг/кг ($n = 6$)	1	157 ± 4	4,0 ± 0,2	205 ± 34,3	6,53 ± 0,86	0,3 ± 0,3	–	79,3 ± 2,9	5 ± 1	16 ± 2,3
Препарат АФП, 1 мг/кг ($n = 6$)	1	158 ± 8	4,6 ± 0,4	263,3 ± 28	12,2 ± 2,2	0,7 ± 0,7	0,3 ± 0,3	80,5 ± 6,5	1,5 ± 0,5	16,5 ± 1,8
Контроль, ФР ($n = 6$)	7	144 ± 8	4,6 ± 0,2	223,3 ± 35,3	11,1 ± 1,7	0,7 ± 0,7	–	80,5 ± 0,5	6 ± 2	21,5 ± 1,5
Препарат АФП, 0,1 мг/кг ($n = 6$)	7	142 ± 4	4,7 ± 0,2	238,3 ± 27,7	9,87 ± 1	–	–	63,5 ± 13,5	5 ± 2	31,5 ± 15
Препарат АФП, 1 мг/кг ($n = 6$)	7	158 ± 8	4,4 ± 0,1	263,3 ± 28	12,2 ± 2,2	–	–	80,5 ± 6,5	2,5 ± 0,5	26,5 ± 1,8

*П/я – палочкоядерные нейтрофилы.

**С/я – сегментоядерные нейтрофилы.

Таблица 3.4.4

Значения биохимических показателей у обезьян при подкожном введении препарата АФП

Группа	Доза	Глюкоза, мМ/л			Холестерин, мкМ/л		
		Исходно	1-е сут.	7-е сут.	Исходно	1-е сут.	7-е сут.
Контроль, ФР (n = 6)	1,0 мл	4,9 ± 0,7	4,7 ± 0,3	5,2 ± 0,4	8,2 ±1,4	7,5 ± 2,2	9,2 ± 0,9
Препарат АФП (n = 6)	1,0 мг/кг	4,9 ± 0,2	4,8 ± 0,1	4,6 ± 0,3	10,5 ±2,9	9,9 ± 1,8	9,4 ± 2,3
Препарат АФП (n = 6)	0,1 мг/кг	4,9 ± 0,7	5 ± 0,3	5,6 ± 0,3	14 ± 4,2	14,1 ± 3,9	15,9 ± 4
Группа	**Доза**	**Креатинин, мкМ/л**			**КРФ НК, мкг/мл**		
		Исходно	**1-е сут.**	**7-е сут.**	**Исходно**	**1-е сут.**	**7-е сут.**
Контроль, ФР (n = 6)	1,0 мл	118 ± 20,9	96,3 ±12,7	99,9 ± 5,3	121 ± 9,4	96,4 ± 13	89,9 ± 5,4
Препарат АФП (n = 6)	1,0 мг/кг	118 ± 15	129 ± 45,5	97,4 ± 16	102 ± 16	103 ± 9,4	111 ± 1,8
Препарат АФП (n = 6)	0,1 мг/кг	103 ± 21	118 ±26	105 ± 9,3	88,1 ± 7,2	83,2 ± 3,3	80 ± 5,1
Группа	**Доза**	**Натрий, мМ/л**			**Калий, мМ/л**		
		Исходно	**1-е сут.**	**7-е сут.**	**Исходно**	**1-е сут.**	**7-е сут.**
Контроль, ФР (n = 6)	1,0 мл	149 ± 8	176 ± 10	161 ± 2	3,8 ± 0,4	6 ± 0,3	5,5 ± 0,7
Препарат АФП (n = 6)	1,0 мг/кг	155 ± 6,8	172 ± 1,4	139 ± 3,3	3,4 ± 0,2	5,8 ± 0,6	5,5 ± 0,1
Препарат АФП (n = 6)	0,1 мг/кг	147 ± 13	177 ± 7	162 ± 1,2	4,2 ± 0,4	5,7 ± 0,3	5,5 ± 0,6

Таблица 3.4.5

Значения показателей ферментативной активности крови обезьян после подкожного введения препарата АФП

Группа	Доза	АСТ, Ед/л			АЛТ, Ед/л			ЩФ, мкМ/мл. ч.		
		Исходно	1-е сут.	7-е сут.	Исходно	1-е сут.	7-е сут.	Исходно	1-е сут.	7-е сут.
Контроль, ФР ($n = 6$)	1 мл	4,8 ± 2,5	4,2 ± 1,9	2,5 ± 1,8	6,7 ± 0,2	5,2 ± 1,6	2,9 ± 1,8	1,8 ± 0,5	1,6 ± 0,3	1,2 ± 0,3
Препарат АФП ($n = 6$)	1 мг/кг	6,6 ± 1,4	4,3 ± 0,3	2,4 ± 1,7	8,3 ± 2,6	7,3 ± 4,3	4,8 ± 2,8	1,4 ± 0,4	0,9 ± 0,3	1,2 ± 0,3
Препарат АФП ($n = 6$)	0,1 мг/кг	2,4 ± 1,1	4,3 ± 0,8	3,6 ± 2,2	6 ± 0,6	4,9 ± 1,4	3,3 ± 0,6	1,1 ± 0,3	0,8 ± 0,1	0,96 ± 0,2

Таблица 3.4.6

Белковый спектр крови обезьян после подкожного введения препарата АФП

Группа	Доза	Белок, мг/мл			Альбумины, мг/мл			α-глобулины, мг/мл		
		Исходно	1-е сут.	7-е сут.	Исходно	1-е сут.	7-е сут.	Исходно	1-е сут.	7-е сут.
Контроль, ФР ($n = 6$)	1 мл	104,1 ± 9,5	112 ± 1,4	100,2 ± 8,4	61,7 ± 7,2	59,8 ± 4,2	57,8 ± 4,1	5,3 ± 1,5	6,3 ± 1,9	5,9 ± 0,3
Препарат АФП ($n = 6$)	1 мг/кг	105,1 ± 0,7	108 ± 0,7	97,5 ± 1,4	62,1 ± 2,4	56,7 ± 3,8	54,5 ± 1,6	6,3 ± 0,7	8,4 ± 0,4	5 ± 0,9
Препарат АФП ($n = 6$)	0,1 мг/кг	98,7 ± 3,6	115 ± 1,2	100,1 ± 1,8	64,4 ± 7,6	77 ± 1	84,4 ± 2,6	6,2 ± 0,7	5,4 ± 1,3	5,5 ± 0,7
Группа	**Доза**	**β-глобулины, мг/мл**			**β_2-глобулины, мг/мл**			**γ-глобулины, мг/мл**		
		Исходно	**1-е сут.**	**7-е сут.**	**Исходно**	**1-е сут.**	**7-е сут.**	**Исходно**	**1-е сут.**	**7-е сут.**
Контроль, ФР ($n = 6$)	1 мл	14,1 ± 6,9	11,9 ± 4	9,1 ± 0,7	12 ± 0,7	12,8 ± 1,7	12,9 ± 1,3	14,9 ± 0,7	15,4 ± 0,6	16,4 ± 2,1
Препарат АФП ($n = 6$)	1 мг/кг	14,8 ± 7,2	10,1 ± 1,7	9,5 ± 2	11,5 ± 1,5	15,3 ± 3,5	9,6 ± 3,4	14,7 ± 1,5	16,2 ± 2,6	13,7 ± 2,5
Препарат АФП ($n = 6$)	0,1 мг/кг	11,8 ± 1,3	10,7 ± 1,4	11,8 ± 0,6	10,2 ± 2,8	13 ± 0,3	10,1 ± 2,1	15,1 ± 2,2	16,6 ± 0,2	15,6 ± 0,4

Таблица 3.4.7

Значения показателей функции почек обезьян после подкожного введения препарата АФП

Группа	Доза	Диурез, мл/ч			pH мочи		
		Исходно	1-е сут.	7-е сут.	Исходно	1-е сут.	7-е сут.
Контроль, ФР ($n = 6$)	1 мл	14,9 ± 2,5	17,3 ± 6,1	12 ± 6	6,3 ± 0,4	7,7 ± 0,4	8,0 ± 0,6
Препарат АФП ($n = 6$)	1 мг/кг	23 ± 12,3	17,8 ± 3,3	16,2 ± 9,2	7,8 ± 0,5	8,0 ± 0,7	7,7 ± 0,4
Препарат АФП ($n = 6$)	0,1 мг/кг	11,3 ± 6,3	20,7 ± 11,3	17,8 ± 3,5	6,3 ± 0,4	7,0 ± 0,6	8,7 ± 0,4
Группа	**Доза**	**Удельный вес мочи**			**Калий, мМ/л**		
		Исходно	**1-е сут.**	**7-е сут.**	**Исходно**	**1-е сут.**	**7-е сут.**
Контроль, ФР ($n = 6$)	1 мл	1 020 ± 14,1	1 003 ± 14,7	1 030 ± 7,1	57,6 ± 17,7	55,8 ± 17,1	43,2 ± 4,6
Препарат АФП ($n = 6$)	1 мг/кг	1 005 ± 9,2	1 005 ± 14,1	1 024 ± 10,7	51,4 ± 12,3	48,2 ± 11,1	52,6 ± 8,9
Препарат АФП ($n = 6$)	0,1 мг/кг	1 016 ± 9,9	1 013 ± 9,9	1 031 ± 11,3	43,2 ± 11,8	39,9 ± 5,6	54,6 ± 7,5
Группа	**Доза**	**Белок, мг/мл**			**Креатин, мкМ/л**		
		Исходно	**1-е сут.**	**7-е сут.**	**Исходно**	**1-е сут.**	**7-е сут.**
Контроль, ФР ($n = 6$)	1 мл	0,033 ± 0,004	0,021 ± 0,003	0,029 ± 0,001	89,5 ± 24,3	105,8 ± 8,8	200 ± 79,7
Препарат АФП ($n = 6$)	1 мг/кг	0,023 ± 0,002	0,034 ± 0,004	0,019 ± 0,003	109,5 ± 31,2	125,4 ± 17,8	161,1 ± 49,2
Препарат АФП ($n = 6$)	0,1 мг/кг	0,057 ± 0,003	0,027 ± 0,003	0,017 ± 0,006	130,6 ± 44,8	137,1 ± 50,6	122,2 ± 13
Группа	**Доза**	**Глюкоза, мМ/л**			**Натрий, мМ/л**		
		Исходно	**1-е сут.**	**7-е сут.**	**Исходно**	**1-е сут.**	**7-е сут.**
Контроль, ФР ($n = 6$)	1 мл	1,43 ± 0,82	1,07 ± 0,07	1,07 ± 0,25	432,6 ± 54,7	429 ± 29,4	519,3 ± 65,1
Препарат АФП ($n = 6$)	1 мг/кг	1,54 ± 0,56	0,98 ± 0,31	0,84 ± 0,21	525,5 ± 46,7	501,4 ± 36,6	541,9 ± 55,3
Препарат АФП ($n = 6$)	0,1 мг/кг	1,62 ± 0,68	0,7 ± 0,21	0,78 ± 0,22	534,7 ± 52,9	421,4 ± 76	619 ± 73,5

3.5. ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ПРЕПАРАТА АФП В ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КРОЛИКАХ

3.5.1. Условия проведения эксперимента

Эксперимент проводился на 30 кроликах-самцах породы шиншилла, полученных из Центрального питомника лабораторных животных РАМН (Москва). Исходная масса кроликов составляла 2,54–2,57 кг. В работе использован препарат АФП в готовой лекарственной форме (62,5 мкг белка АФП и 5 мг декстрана в ампуле).

Кролики были разбиты на 3 группы по 10 животных в каждой: первая группа – контроль, вторая группа – препарат АФП в дозе 5 мкг/кг и третья группа – препарат АФП в дозе 25 мкг/кг. Выбранные дозы препарата АФП превышали соответственно в 5 и 25 раз предполагаемую для взрослого человека суточную дозу 60–80 мкг, т. е. 1 мкг/кг.

Препарат АФП вводили внутривенно в 5 мл физиологического раствора один раз в сутки в течение 3 месяцев. Кроликам контрольной группы вводили 5 мл ФР по аналогичной схеме.

У кроликов однократно до начала эксперимента (фон), а также через 1, 2 и 3 месяца назначения препарата и через 1 месяц восстановительного периода исследовали гематологические (количество эритроцитов, лимфоцитов, тромбоцитов, уровень гемоглобина, лейкоцитарная формула) и биохимические показатели крови (общий белок, глюкоза, холестерин, мочевина, креатинин, хлориды, активность ферментов сыворотки крови – АЛТ, АСТ, ЩФ, ЛДГ). Кроме того, через 1, 2 и 3 месяца введения препарата АФП у кроликов определяли содержание в сыворотке крови гормонов щитовидной железы – трийодтиронина и тироксина и гормона коры надпочечников – кортизола. Для исследования указанных показателей брали кровь из краевой вены уха кролика в объеме 7 мл. На протяжении всего эксперимента наблюдали за общим состоянием и поведением животных, каждые 10 сут. регистрировали массу тела.

После 3 месяцев введения АФП по 4 кролика из каждой группы забивали методом воздушной эмболии, остальных кроликов – через 1 месяц после воздействия. Их внутренние органы были подвергнуты микроскопическому исследованию.

3.5.2. Влияние препарата АФП на общебиологические показатели

В результате проведенных исследований установлено, что в условиях хронического эксперимента лекарственная форма препарата АФП при трехмесячном внутривенном введении в дозах 5 и 25 мкг/кг не влияет на общее состояние и поведение животных. На протяжении всего эксперимента не зарегистрировано статистически достоверных различий по сравнению с контролем в динамике прироста массы тела кроликов, получивших препарат. В то же время после восстановительного периода в 1 месяц некоторые подопытные кролики более активно прибавляли в массе, чем контрольные (табл. 3.5.2.1).

Таблица 3.5.2.1

Прирост массы тела кроликов при введении препарата АФП в течение 3 месяцев

Период наблюдения, сут.	Контроль (ФР)		АФП, 5 мкг/кг		АФП, 25 мкг/кг	
	г	%	г	%	г	%
10	60 ± 5		90 ± 9		95 ± 12	
20	296 ± 22	11,5	280 ± 26	11,0	284 ± 38	11,1
30	321 ± 30	12,5	294 ± 42	11,6	360 ± 34	14,1
40	346 ± 41	13,5	308 ± 68	12,1	448 ± 35	17,6
50	434 ± 49	16,9	409 ± 62	16,1	479 ± 48	18,8
60	554 ± 48	21,6	488 ± 76	19,2	694 ± 72	27,2
70	656 ± 67	25,5	638 ± 85	25,1	708 ± 68	27,8
80	758 ± 80	29,5	788 ± 103	31,0	757 ± 78	29,7
90	715 ± 90	27,8	868 ± 111	34,2	833 ± 63	32,7
100	592 ± 74	23,1	708 ± 74	28,8	730 ± 71	29,0
110	664 ± 88	25,8	886 ± 114	36,0	895 ± 103*	35,5*
120	680 ± 107	26,5	777 ± 78	31,6	939 ± 122*	36,9*

*Достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$).

3.5.3. Влияние препарата АФП на гематологические показатели

Периферическую кровь кроликов исследовали до начала введения препарата (фоновые значения), один раз в месяц в течение всего хронического эксперимента и по окончании восстановительного периода.

Число лейкоцитов подсчитывали с помощью счетчика микрочастиц «Пикоскель PS-4». Гемоглобин определяли спектрофотометрическим методом с помощью набора реактивов для определения содержания гемоглобина в крови человека «Диакон Гем» (Россия). Метод основан на регистрации изменения оптической плотности образца при 540 нм в результате превращения оксигемоглобина в окисленную форму-гемохром в присутствии додецилсульфата натрия в качестве трансформирующего реагента. Работа проводилась на спектрофотометре СФ-26 (Россия). Эритроциты подсчитывались в камере Горяева в 5 больших квадратах при разведении крови в 200 раз. Цветовой показатель рассчитывали по известным формулам [222].

В окрашенных по Романовскому мазках подсчитывали формулу крови и определяли на 1000 эритроцитов количество тромбоцитов в периферической крови. Протромбиновый индекс вычислялся по методике, рекомендованной Кировским НИИ гематологии и переливания крови: определение тромбопластинового времени (ФС 42-1786-82), которое фиксировалось в секунду от момента приливания в пробу реагента ($CaCl_2$) до образования сгустка. Чтобы выразить тромбопластиновое время в процентах, проводился расчет средних величин опытных групп по отношению к контрольной.

Полученные гематологические результаты сравнивали с фоном и показателями контрольных животных. Установлено, что в течение трех месяцев эксперимента имели место колебания исследуемых показателей. Однако достоверных отклонений от контрольных значений зарегистрировано не было ($p > 0,05$), что свидетельствует об отсутствии реакции системы крови на длительное введение препарата АФП (табл. 3.5.3.1 – 3.5.3.9).

Таблица 3.5.3.1

Фоновые гематологические показатели кроликов-самцов ($n = 10$, $M \pm m$)

Hb, г/л	Эритроциты $\times 10^{12}$/л	Цветной показатель	Лейкоциты $\times 10^9$/л
93,64 ± 2,27	4,45 ± 0,15	0,64 ± 0,02	10,9 ± 0,5

Таблица 3.5.3.2

Гематологические показатели кроликов-самцов ($n = 18$) после 1-го и 2-го месяцев введения препарата АФП ($M \pm m$)

1-й месяц				2-й месяц			
Hb, г/л	Эритроц. $\times 10^{12}$/л	Цветн. показ.	Лейкоц. $\times 10^9$/л	Hb, г/л	Эритроц. $\times 10^{12}$/л	Цветн. показ.	Лейкоц. $\times 10^9$/л
Контроль (ФР)							
123,1 ± 4,09	5,30 ± 0,29	0,71 ± 0,03	11,8 ± 0,06	129,8 ± 4,8	5,51 ± 0,36	0,71 ± 0,03	11,6 ± 0,7
АФП, 5 мкг/кг							
120,4 ± 4,3	5,81 ± 0,24	0,63 ± 0,02	12,7 ± 0,06	130,5 ± 2,9	5,54 ± 0,34	0,72 ± 0,03	12,1 ± 0,6
АФП, 25 мкг/кг							
122,5 ± 5,4	5,82 ± 0,19	0,64 ± 0,04	11,6 ± 0,08	126,8 ± 4,2	5,71 ± 0,28	0,67 ± 0,02	11,9 ± 0,7

Таблица 3.5.3.3

Гематологические показатели кроликов-самцов ($n = 18$) после 3 месяцев введения препарата АФП ($M \pm m$)

Hb, г/л	Эритроц. $\times 10^{12}$/л	Цветн. показ.	Лейкоц. $\times 10^9$/л	Тромбоц., тыс./мкл	Протромб. индекс, %
Контроль (ФР)					
128,8 ± 5,2	6,91 ± 0,34	0,57 ± 0,03	11,3 ± 0,4	210,4 ± 5,7	100,2 ± 4,6
АФП, 5 мкг/кг					
132,3 ± 3,36	6,27 ± 0,26	0,63 ± 0,03	10,1 ± 0,5	209,7 ± 7,8	101,6 ± 3,8
АФП, 25 мкг/кг					
127,4 ± 4,1	6,57 ± 0,23	0,58 ± 0,02	11,1 ± 0,7	204,8 ± 6,3	112 ± 5,2

Таблица 3.5.3.4

Гематологические показатели кроликов-самцов ($n = 18$) через 1 месяц после отмены препарата АФП ($M \pm m$)

Hb, г/л	Эритроц. $\times 10^{12}$/л	Цветн. показ.	Лейкоцит. $\times 10^9$/л	Тромбоц., тыс./мкл	Протромб. индекс, %
Контроль (ФР)					
127,1 ± 2,6	7,05 ± 0,3	0,54 ± 0,03	10,9 ± 0,6	206,3 ± 10,6	101,3 ± 3,4
АФП, 5 мкг/кг					
130,6 ± 4,7	6,46 ± 0,6	0,62 ± 0,03	10,5 ± 0,6	206 ± 7,7	100,6 ± 4,2
АФП, 25 мкг/кг					
128,2 ± 4,3	6,87 ± 0,4	0,56 ± 0,02	10,4 ± 0,7	209,8 ± 12,5	99,1 ± 3

Таблица 3.5.3.5

Фоновые показатели формулы крови кроликов, $n = 9$ (%, $M \pm m$)

Лимф.	Моноц.	П/я НФ	С/я НФ	Эозин.	Базоф.	Плазмоц.
55,6 ± 1,5	9,89 ± 0,36	3,22 ± 0,36	26,8 ± 1,93	3,33 ± 0,33	0,78 ± 0,27	0,27 ± 0,19

Таблица 3.5.3.6

**Показатели формулы крови кроликов ($n = 18$)
после 1-го месяца введения препарата АФП (%, $M \pm m$)**

Лимф.	Моноц.	П/я НФ	С/я НФ	Эозин.	Базоф.	Плазмоц.
Контроль (ФР)						
61,3 ± 1,6	6,8 ± 0,7	3,2 ± 0,5	24,0 ± 2,3	3,7 ± 0,7	0,33 ± 0,2	0,66 ± 0,3
АФП, 5 мкг/кг						
60,2 ± 2,9	6,7 ± 0,6	2,5 ± 0,8	26,3 ± 2,3	3,5 ± 0,7	0,17 ± 0,2	0,7 ± 0,3
АФП, 25 мкг/кг						
61,7 ± 2,8	5,8 ± 0,7	3,3 ± 0,9	26,0 ± 1,9	4,0 ± 0,9	0,33 ± 0,2	0,5 ± 0,3

Таблица 3.5.3.7

**Показатели формулы крови кроликов ($n = 18$)
после 2-го месяца введения препарата АФП (%, $M \pm m$)**

Лимф.	Моноц.	П/я НФ	С/я НФ	Эозин.	Базоф.	Плазмоц.
Контроль (ФР)						
56,5 ± 2,7	5,5 ± 0,8	3,7 ± 0,4	29,5 ± 2,2	4,2 ± 0,9	0,6 ± 0,4	0
АФП, 5 мкг/кг						
61,8 ± 3,7	3,7 ± 0,7	4,7 ± 1,2	25,0 ± 3,3	3,5 ± 0,6	0,5 ± 0,3	0,8 ± 0,4
АФП, 25 мкг/кг						
60,0 ± 3,8	5,0 ± 1,2	2,8 ± 1,2	27,8 ± 2,9	2,3 ± 1,1	0,7 ± 0,4	1,3 ± 0,6

Таблица 3.5.3.8

**Показатели формулы крови кроликов ($n = 18$)
после 3-го месяца введения препарата АФП (%, $M \pm m$)**

Лимф.	Моноц.	П/я НФ	С/я НФ	Эозин.	Базоф.	Плазмоц.
Контроль (ФР)						
55,7 ± 2,9	7,8 ± 1,3	2,8 ± 0,6	30,8 ± 2,3	2,2 ± 0,4	0,7 ± 0,3	0
АФП, 5 мкг/кг						
59,7 ± 3,7	5,8 ± 0,8	2,7 ± 0,6	28,5 ± 3,8	2,8 ± 0,5	0	0,5 ± 0,3
АФП, 25 мкг/кг						
63,2 ± 3,8	5,8 ± 1,4	2,6 ± 0,6	24,8 ± 2,9	2,3 ± 0,4	0,6 ± 0,3	0,5 ± 0,3

Таблица 3.5.3.9

Показатели формулы крови кроликов (n = 18) через 1 месяц после отмены препарата АФП (%, $M \pm m$)

Лимф.	Моноц.	П/я НФ	С/я НФ	Эозин.	Базоф.	Плазмоц.
Контроль (ФР)						
59,4 ± 2,7	5,4 ± 0,8	3,2 ± 0,9	27,4 ± 2,6	3,2 ± 0,6	0,6 ± 0,3	0,8 ± 0,5
АФП, 5 мкг/кг						
59,6 ± 2,4	5,8 ± 0,6	2,4 ± 0,9	26,6 ± 2,9	3,5 ± 0,6	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,4
АФП, 25 мкг/кг						
54,2 ± 3,4	5,8 ± 1,3	5,0 ± 0,7	30,4 ± 3,6	3,4 ± 1	0,4 ± 0,2	1 ± 0,4

3.5.4. Влияние препарата АФП на костный мозг

Костный мозг из бедренных костей извлекали пункцией у 11 кроликов и использовали для приготовления мазков с целью определить количество ядросодержащих клеток на 1 бедренную кость. Костный мозг из бедренной кости вымывали 5%-ным раствором уксусной кислоты, суспендировали при помощи шприца и игл разного диаметра. Количество ядросодержащих клеток (ЯСК) подсчитывали в камере Горяева и пересчитывали тотально на бедренную кость. Для окраски мазков костного мозга использовали May-Grunwald (Sigma) и азур-эозин по Романовскому. Подсчитывали миелограмму костного мозга (не менее 500 клеток на стекло), затем относительные значения показателей костного мозга пересчитывали в абсолютные на 1 бедренную кость. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента. Результаты представлены в таблицах 3.5.4.1, 3.5.4.2.

Статистический анализ относительных и абсолютных значений показателей костного мозга контрольных и подопытных кроликов не выявил достоверных различий в этих группах ($p > 0,05$).

Таблица 3.5.4.1

Миелограмма кроликов породы шиншилла, длительно получавших препарат АФП (*M* ± *m*)

Показатели, %	Контроль, ФР (*n* = 4)	АФП, 5 мкг/кг (*n* = 4)	АФП, 25 мкг/кг (*n* = 4)
Эритробласты	2,1 ± 0,21	2,62 ± 0,62	2,77 ± 0,37
Пронормоциты	2,5 ± 0,13	3,25 ± 0,83	2,8 ± 0,61
Нормоциты:			
базофильные	6,65 ± 0,66	5,75 ± 0,88	6,53 ± 0,47
полихроматофильные	15,25 ± 0,97	15,75 ± 1,16	16,3 ± 1,98
оксифильные	14,1 ± 0,91	12,37 ± 1,71	15,53 ± 1,81
Миелобласты	1,25 ± 0,26	1,25 ± 0,32	0,87 ± 0,13
Нейтрофилы:			
промиелоциты	1,15 ± 0,27	1,25 ± 0,32	0,83 ± 0,17
миелоциты	2,75 ± 0,51	2,5 ± 0,41	2,93 ± 0,4
метамиелоциты	5,45 ± 0,7	5,87 ± 0,52	5,1 ± 0,85
палочкоядерные	12,2 ± 0,45	15,0 ± 0,89	11,6 ± 0,18
сегментоядерные	12,5 ± 0,4	9,5 ± 1,19	9,87 ± 1,74
Эозинофилы:			
промиелоциты +			
миелоциты	0,95 ± 0,09	1,25 ± 0,24	0,83 ± 0,15
метамиелоциты	0,9 ± 0,17	1,0 ± 0,29	1,17 ± 0,34
палочкоядерные	1,5 ± 0,13	1,5 ± 0,35	1,3 ± 0,099
сегментоядерные	1,2 ± 0,24	0,75 ± 0,14	1,47 ± 0,27
Базофилы	1,4 ± 0,12	1,75 ± 0,24	1,73 ± 0,18
Лимфобласты	0,95 ± 0,33	1,12 ± 0,12	0,83 ± 0,34
Лимфоциты	9,3 ± 1,07	10,37 ± 1,66	10,2 ± 3,23
Плазмоциты	0,85 ± 0,1	0,75 ± 0,14	0,86 ± 0,13
Монобласты	0,35 ± 0,05	0,25 ± 0,14	0,07 ± 0,07
Моноциты	2 ± 0,22	1,75 ± 0,52	1,7 ± 0,45
Макрофаги	1,7 ± 0,31	1,13 ± 0,24	1,4 ± 0,5
Мегакариоциты	0,35 ± 0,05	0,5 ± 0,0	0,43 ± 0,03
Ретикулоэндотелиальные клетки	0,55 ± 0,09	0,5 ± 0,0	0,47 ± 0,27
Митозы общие	1,95 ± 0,25	2,12 ± 0,24	2,1 ± 0,26

Таблица 3.5.4.2

Миелограмма (бедренная кость) кроликов породы шиншилла, длительно получавших препарат АФП (*M* ± *m*)

Показатели, %	Контроль, ФР (*n* = 4)	АФП, 5 мкг/кг (*n* = 4)	АФП, 25 мкг/кг (*n* = 4)
ЯСК*	1,61 ± 0,04	1,6 ± 0,14	1,56 ± 0,25
Эритробласты	0,03 ± 0,003	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,009
Пронормоциты	0,04 ± 0,002	0,05 ± 0,016	0,04 ± 0,013
Нормоциты:			
базофильные	0,11 ± 0,013	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,012
полихроматофильные	0,24 ± 0,02	0,25 ± 0,039	0,25 ± 0,04
оксифильные	0,23 ± 0,02	0,2 ± 0,03	0,24 ± 0,04
Миелобласты	0,02 ± 0,004	0,02 ± 0,006	0,014 ± 0,004
Нейтрофилы:			
промиелоциты	0,018 ± 0,004	0,019 ± 0,005	0,013 ± 0,003
миелоциты	0,04 ± 0,007	0,04 ± 0,009	0,05 ± 0,013
метамиелоциты	0,09 ± 0,009	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,014
палочкоядерные	0,2 ± 0,006	0,24 ± 0,015	0,18 ± 0,03
сегментоядерные	0,2 ± 0,009	0,15 ± 0,026	0,16 ± 0,05
Эозинофилы:			
промиелоциты + миелоциты	0,016 ± 0,001	0,018 ± 0,003	0,013 ± 0,004
метамиелоциты	0,014 ± 0,002	0,015 ± 0,004	0,018 ± 0,005
палочкоядерные	0,024 ± 0,002	0,023 ± 0,005	0,02 ± 0,004
сегментоядерные	0,019 ± 0,004	0,012 ± 0,002	0,023 ± 0,006
Базофилы	0,022 ± 0,001	0,026 ± 0,003	0,026 ± 0,002
Лимфобласты	0,015 ± 0,005	0,018 ± 0,001	0,014 ± 0,006
Лимфоциты	0,15 ± 0,002	0,16 ± 0,015	0,16 ± 0,06
Плазмоциты	0,13 ± 0,002	0,012 ± 0,003	0,013 ± 0,003
Монобласты	0,004 ± 0,003	0,001 ± 0,001	0,006 ± 0,001
Моноциты	0,03 ± 0,004	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,009
Макрофаги	0,027 ± 0,006	0,018 ± 0,005	0,024 ± 0,01
Мегакариоциты	0,006 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,03 ± 0,01
Ретикулоэндотелиальные клетки	0,009 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,007 ± 0,004
Митозы общие	0,031 ± 0,003	0,034 ± 0,006	0,034 ± 0,008

*ЯСК – количество ядросодержащих клеток на 1 бедренную кость.

3.5.5. Влияние препарата АФП на биохимические показатели сыворотки крови кроликов

Биохимические исследования сыворотки крови у 30 кроликов проводили с помощью биохимического анализатора ФП-901 фирмы Labsystems (Финляндия) и спектрофотометра СФ-26 (Россия).

Активность АЛТ, АСТ, ЩФ, ЛДГ и содержание общего белка, креатинина, хлоридов, глюкозы, холестерина в сыворотке крови определяли с помощью диагностических наборов фирмы «Синтэко» (Россия), содержание мочевины – используя набор фирмы La-Chema (Чехия). Уровень гормонов в сыворотке крови кроликов определяли с помощью наборов РИА совместного белорусско-французского производства «Белориф» на приборе «Гамма-12» (Украина). Результаты исследований представлены в таблицах 3.5.5.1, 3.5.5.2.

Таблица 3.5.5.1

Биохимические показатели сыворотки крови кроликов, длительно получавших препарат АФП

Исследуемый показатель	Единицы измерения	Контроль, ФР (*n* = 10)	АФП, 5 мкг/кг (*n* = 10)	АФП, 25 мкг/кг (*n* = 10)
Фон				
АЛТ	Ед/л	77,7 ± 4,24		
АСТ	Ед/л	44,2 ± 4,05		
ЩФ	Ед/л	169,2 ± 9,59		
ЛДГ	Ед/л	344,3 ± 9,59		
Общий белок	г/л	27,61 ± 2		
Глюкоза	мМ/л	7,02 ± 0,19		
Холестерин*	мг%	43,31 ± 1,77		
Мочевина	мМ/л	5,55 ± 0,19		
Креатинин	мкМ/л	118,9 ± 4,64		
Хлориды	мМ/л	94,4 ± 1,65		
1 месяц введения				
АЛТ	Ед/л	73,5 ± 7,4	72 ± 6	79,9 ± 7,2
АСТ	Ед/л	39,1 ± 4,44	47 ± 5,83	40,1 ± 3,03
ЩФ	Ед/л	180,2 ± 14,89	214,5 ± 19,9	169,7 ± 14,79
ЛДГ	Ед/л	302,7 ± 27,69	343,7 ± 43,1	325,7 ± 30,66
Общий белок	г/л	31,97 ± 1,7	29,22 ± 1,07	27,12 ± 1,57
Глюкоза	мМ/л	6,95 ± 0,09	7,4 ± 0,18	7,29 ± 0,18
Холестерин*	мг%	38,61 ± 4,57	36,34 ± 2,07	35,49 ± 2,28
Мочевина	мМ/л	5,86 ± 0,44	5,6 ± 0,22	5,31 ± 0,26
Креатинин	мкМ/л	111,5 ± 4,29	124,2 ± 8,12	129 ± 4,11
Хлориды	мМ/л	97,4 ± 1,65	97 ± 1,8	96,6 ± 1,5
2 месяца введения				
АЛТ	Ед/л	46,4 ± 2,86	43,7 ± 1,89	47,5 ± 2,27
АСТ	Ед/л	41,9 ± 3,98	40,5 ± 3,67	37,3 ± 2,44
ЩФ	Ед/л	143,2 ± 7,94	150 ± 9,41	156,3 ± 10,45
ЛДГ	Ед/л	446,8 ± 18,68	398,1 ± 28,01	379,4 ± 24,17
Общий белок	г/л	29,58 ± 1,23	31,14 ± 0,64	28,45 ± 1,14
Глюкоза	мМ/л	6,16 ± 0,25	6,22 ± 0,19	6,38 ± 0,32
Холестерин**	мг%	6,69 ± 0,73	7,62 ± 0,91	6,01 ± 0,48
Мочевина	мМ/л	99,9 ± 7,35	96,5 ± 6	106,1 ± 5,73
Креатинин	мкМ/л	105,3 ± 2,1	102,4 ± 3,45	101,7 ± 2,7
Хлориды	мМ/л			
3 месяца введения				
АЛТ	Ед/л	46,4 ± 2,42	51 ± 2,87	48,5 ± 2,35
АСТ	Ед/л	41 ± 4,11	46,2 ± 4,06	43 ± 2,94
ЩФ	Ед/л	112,2 ± 10,9	122,9 ± 12,98	115,4 ± 9,8
ЛДГ	Ед/л	473,6 ± 36,46	461,8 ± 29,14	535,4 ± 39,64
Общий белок	г/л	29,16 ± 0,94	29,27 ± 1,09	27,74 ± 0,78
Глюкоза	мМ/л	6,5 ± 0,17	6,77 ± 0,26	5,98 ± 0,27
Холестерин**	мг%	65,6 ± 2,28	58,5 ± 3,39	62,7 ± 2,7
Мочевина	мМ/л	5,85 ± 0,3	5,88 ± 0,58	6,13 ± 0,42
Креатинин	мкМ/л	11,5 ± 3,55	115,3 ± 3,64	114,6 ± 5,46
Хлориды	мМ/л	104,7 ± 1,8	103,2 ± 2,1	105,3 ± 1,5

Окончание таблицы 3.5.5.1

Исследуемый показатель	Единицы измерения	Контроль, ФР (n = 10)	АФП, 5 мкг/кг (n = 10)	АФП, 25 мкг/кг (n = 10)
Через 1 месяц после отмены препарата				
АЛТ	Ед/л	61,3 ± 0,46	68,6 ± 0,42	61 ± 0,42
АСТ	Ед/л	80 ± 5,54	88 ± 5,6	76,6 ± 5,61
ЛДГ	Ед/л	341,8 ± 20,67	323,9 ± 24,18	261,7 ± 13,87
Общий белок	г/л	26,69 ± 1,06	28,39 ± 0,84	27,9 ± 0,55
Глюкоза	мМ/л	7,16 ± 0,31	7,99 ± 0,41	7,82 ± 0,27
Холестерин**	мг%	51 ± 1,44	49,3 ± 1,73	53 ± 3,08
Мочевина	мМ/л	8,63 ± 0,38	8,95 ± 0,32	9,57 ± 0,29
Креатинин	мкМ/л	112,4 ± 2,14	116,5 ± 3,46	116,3 ± 2,6
Хлориды	мМ/л	105,4 ± 2,08	104,8 ± 2,1	106 ± 2,86

*Содержание холестерина определяли ферментативным методом.

**Содержание холестерина определяли по методу Ильки.

Таблица 3.5.5.2

Содержание гормонов щитовидной железы и коры надпочечников в сыворотке крови кроликов при длительном введении препарата АФП

Наименование гормонов	Единицы измерения	Контроль, ФР (n = 10)	АФП, 5 мкг/кг (n = 10)	АФП, 25 мкг/кг (n = 10)
1 месяц введения				
Трийодтиронин (T_3)	нМоль/л	6,23 ± 0,42	6,51 ± 0,22	6,77 ± 0,21
Тироксин (T_4)	нМоль/л	78,2 ± 5,36	64,3 ± 3,1	67,4 ± 6,85
Кортизол	нМоль/л	366,6 ± 35,64	352,5 ± 40,96	341,7 ± 24,82
2 месяца введения				
T_3	нМоль/л	6,61 ± 0,36		6,81 ± 0,51
T_4	нМоль/л	65,8 ± 6		63,8 ± 3,94
Кортизол	нМоль/л	365,5 ± 35,33		340,7 ± 21,18
3 месяца введения				
T_3	нМоль/л	7,03 ± 0,51	7,04 ± 0,44	7,36 ± 0,45
T_4	нМоль/л	53,3 ± 6,63	48,4 ± 1,35	50,5 ± 5,67
Кортизол	нМоль/л	364,6 ± 35,02	396,2 ± 32,16	358,6 ± 32,4

Как видно из полученных данных, биохимический и гормональный спектры сыворотки крови опытных животных во все сроки обследования не отличались от контрольных. Таким образом, длительное (ежедневное в течение 3 месяцев) введение препарата АФП в дозах, превышающих рекомендуемую для человека в 5 и 25 раз, не влияет на общее состояние животных, показатели периферической крови и костного мозга, функции печени и почек, гормональный статус.

3.5.6. Патоморфологические исследования кроликов, получавших препарат АФП

Патоморфологические исследования проведены у 12 (по 4 из каждой экспериментальной группы) кроликов-самцов породы шиншилла.

Взятие материала для патоморфологического исследования производили, в соответствии с требованиями Фармкомитета МЗ РФ, на вторые сутки после окончания эксперимента по изучению хронической токсичности АФП. Эвтаназию кроликов осуществляли введением воздуха в ушную вену. Сразу после гибели животных производили вскрытие и осмотр внутренних органов и полостей тела. После изъятия органы взвешивали и погружали в фиксирующие смеси. Органы и фрагменты тканей (печень, почки, надпочечники, сердце, легкие, головной мозг, гипофиз, тимус, селезенка, брыжеечный лимфатический узел, семенники, щитовидная железа, поджелудочная железа, пищевод, желудок, тонкий и толстый кишечник) фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине и жидкости Буэна. Обезвоживание и проводку образцов, заливку в парафин с воском проводили ручным способом. Микротомирование парафиновых блоков для получения срезов толщиной 3–5 мкм осуществляли с помощью ротационного микротома Reichert Jung (Германия). После депарафинирования срезы окрашивали гематоксилином и эозином, азуром и эозином, заключали в пихтовый бальзам под покровные стекла для получения постоянных микропрепаратов. Микроскопирование гистологических препаратов проводили на микроскопе Opton (Германия) [50].

Вычисляли коэффициенты масс (масса органа: масса тела × 100) сердца, печени, почек, надпочечников, тимуса, селезенки, семенников, легких. Проводили статистический анализ коэффициентов масс внутренних органов, достоверность полученных результатов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Осмотр и вскрытие животных показали следующее. Внешний вид кроликов, состояние шерсти, кожных покровов и скелета в подопытных группах не отличались от контроля. Расположение внутренних органов животных контрольной и экспериментальных групп обычное. Органы гладкие, влажные, серозные оболочки серо-розоватые, отмечено отсутствие экссудата в полостях тела.

Головной мозг нормальной консистенции, мягкая оболочка без изменений. Борозды и извилины полушарий мозжечка и больших полушарий головного мозга нормального для кроликов вида. На срезе ткань головного мозга блестит, границы серого и белого вещества четкие.

Гипофиз округлый, инкапсулированный, сочный, бело-розоватый.

В трахее и главных бронхах слизистая оболочка гладкая бело-сероватая, отсутствует слизь.

Доли легких разделены, покрыты тонкой плеврой, без кровоизлияний.

Сердце нормальной консистенции, с полупрозрачными створками клапанов и эпикардом, гладким эндокардом, плотным миокардом, блестящей интимой ствола легочной артерии и аорты.

Пищевод сохранил проходимость, слизистая оболочка гладкая, нежно-розовая, с белесоватым налетом.

Желудок наполнен творожистыми пищевыми массами; после очищения были видны стенки нормальной толщины, с нежно-розовыми рельефными складками слизистой оболочки, без очаговых или иных изменений.

У животных контрольной и подопытных групп **желчный пузырь** наполнен темно-оливковой желчью, желчные пути проходимы, стенки желчного пузыря тонкие.

Печень красно-коричневая, равномерного кровенаполнения, умеренно плотная, с гладкой капсулой.

Поджелудочная железа в капсуле, плотноватая, розовато-серая.

Селезенка с гладкой капсулой, плотноватая, темно-красная.

Надпочечники неправильно-овальной формы, плотные, розово-желтые.

Почки плотноватые, с гладкой поверхностью, с легко снимающейся капсулой. На разрезе кора четко отличима от медуллы, равномерное кровенаполнение по всем зонам, слизистая лоханок гладкая, блестящая, стенки мочеточников и мочевого пузыря тонкие, розоватые.

Кишечник содержал окрашенные желчью химус и коричневые каловые массы. На разрезе стенки тонкой кишки как контрольных, так и подопытных кроликов – обычного вида. Стенки толстой кишки тонкие, без патологических изменений.

Средние значения коэффициентов масс внутренних органов кроликов шиншилла, забитых после трехмесячного внутривенного введения препарата АФП, приведены в таблице 3.5.6.1. Как видно из таблицы, трехмесячное внутривенное введение препарата АФП не вызвало достоверных ($p > 0{,}05$) изменений массы исследованных внутренних органов кроликов.

Таблица 3.5.6.1

Коэффициенты массы (% от массы тела) внутренних органов кроликов шиншилла, забитых после окончания введения препарата АФП ($M \pm m$)

Органы	Контроль, ФР (взвесь наполнителей), ($n = 4$)	АФП, 5 мкг/кг ($n = 4$)	АФП, 25 мкг/кг ($n = 4$)
Печень	3,64 ± 0,23	3,69 ± 0,42	3,34 ± 0,58
Почки: левая правая	 0,34 ± 0,015 0,33 ± 0,018	 0,36 ±0,03 0,35 ± 0,03	 0,32 ± 0,01 0,32 ± 0,01
Надпочечники: левый правый	 0,007 ± 0,002 0,007 ± 0,002	 0,009 ± 0,0008 0,011 ± 0,001	 0,008 ± 0,0003 0,009 ± 0,0007
Семенники: левый правый	 0,121 ± 0,008 0,12 ± 0,01	 0,127 ± 0,009 0,13 ± 0,013	 0,12 ± 0,007 0,12 ± 0,008
Сердце	0,3 ± 0,03	0,28 ± 0,013	0,33 ± 0,07
Легкие	0,395 ± 0,06	0,41 ± 0,07	0,39 ± 0,09
Тимус	0,11 ± 0,008	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,02
Селезенка	0,045 ± 0,005	0,063 ± 0,008	0,057 ± 0,017
Масса тела, г	3 415 ± 133,6	3 590 ± 195,2	3 590 ± 80

При гистологическом исследовании тканей органов у животных контрольной группы выявлено следующее.

Головной мозг. В полушариях видны послойно расположенные нейроны с четкой структурой ядра и перикариона, окруженные мелкими клетками глии и многочисленными пучками нервных волокон. Патологические изменения в сосудистом русле, клетки воспаления (поли- и мононуклеары) не регистрировались.

Гипофиз. В передней и средней долях наблюдались многочисленные синусоидные капилляры, окруженные ацидофильными и базофильными клетками без признаков дистрофии и некробиоза, в задней – пучки проводящих нервных волокон нормального рисунка.

Надпочечники. На срезах видны кора с железистыми клетками, расположенными послойно, окруженными радиально расходящимися капиллярами; медулла с большим количеством разнокалиберных клеток с цитоплазматическими гранулами; свободный центральный синус. Какие-либо признаки патологии сосудистой системы и клеток паренхимы отсутствовали.

Щитовидная железа. На срезах присутствовали нежноволокнистая строма, в интерстиции – немногочисленные светлые С-клетки, разнокалиберные фолликулы, выстланные эпителием кубической формы и равномерно заполненные гомогенным ацидофильным коллоидом. Тиреоциты и С-клетки без признаков дистрофии, некроза и усиленного разрастания. Патологические изменения в сосудистой системе и воспалительные реакции не регистрировались.

Тимус. В тимусе отсутствовали признаки нарушений в системе кровообращения, дистрофические, некробиотические и воспалительные реакции. Наблюдались структурные изменения, свидетельствующие о начале возрастной инволюции: увеличение площади, занимаемой соединительной и жировой тканью. Однако соотношение площадей коры и мозгового вещества, плотность лимфоцитов в них (приблизительно 3 : 1), а также количество бластов и митотических фигур свидетельствовали о достаточно высокой функциональной активности органа.

Селезенка. В паренхиме хорошо различимы красная и белая пульпы. Красная пульпа состоит из ретикуло-эндотелиальной ткани с расположенными в ней свободными клетками крови, соединительной ткани и кровеносных сосудов, в основном венозных синусов, в адвентиции которых наблюдаются очаги экстрамедуллярного кроветворения, незначительное количество плазматических клеток, поли- и мононуклеары, макрофаги. Белая пульпа представлена лимфоидными фолликулами со сложной структурой. В селезенке кроликов контрольной группы соотношения площадей белой и красной пульпы (герминативные центры, Т-зоны и маргинальные зоны) хотя и соответствовали общепринятой норме, однако сильно варьировали. В красной пульпе регистрировалось умеренное число очагов экстрамедуллярного (гранулоцитарного) кроветворения, незначительное количество плазматических клеток, в синусах – эритроциты и макрофаги. Капсула и трабекулы не утолщены.

Брыжеечные лимфатические узлы. В лимфатическом узле (брыжеечном) отсутствовали признаки нарушений в системе кровообращения, дистрофические, некробиотические и воспалительные реакции. Цитоархитектоника лимфоузла (соотношение площадей тимусзависимой и тимуснезависимых зон, площади герминативных центров), а также его активность (количество иммунологически активных клеток) сильно варьировали.

Легкие. В легких контрольных кроликов основное поле зрения занимали округлые, хорошо расправленные альвеолы с тонкими стенками, без инфильтрации поли- и мононуклеарами, и свободным просветом. В эпителии альвеол, бронхиол и бронхов отсутствовали признаки дистрофии и некробиоза. Лимфоидная ткань, ассоциированная с бронхами, умеренно активна. У животных контрольной группы наблюдались гиперемия, мелкие подкапсульные кровоизлияния со свежей кровью, что, скорее всего, есть результат манипуляций при эвтаназии кроликов (введение воздуха в вену уха).

Сердце. Миокард представлен правильно ориентированными пучками мышечных волокон. Поперечная исчерченность определяется на всех участках, кардиомиоциты без признаков дистрофии и некробиоза. Строма без патологии.

Почки. В почках не наблюдалось признаков нарушений в системе кровообращения. Структура почечных телец не изменена, эпителий проксимальных, дистальных каналь-

цев, а также петель Генле без признаков дистрофии и некробиоза, в просветах канальцев единичные слущенные клетки.

Печень. Признаки нарушений в системе кровообращения, дистрофические, некробиотические изменения гепатоцитов, воспалительные реакции стромы, реакции ретикулоэндотелиальной системы (клетки Купфера) не регистрировались.

Поджелудочная железа. Экскреторный отдел представлен базофильными железистыми клетками и ацидофильными клетками выводящих протоков. Инкреторные клетки сгруппированы в виде островков, отделенных от железистых клеток общей стромальной капсулой. Строма слабовыражена, без признаков воспаления.

Желудок. На срезах основную долю стенки занимает слизистая оболочка, выстланная неповрежденным железистым эпителием. Нормально развиты собственные железы слизистой. В подслизистой скопления железистых, лимфоидных клеток, густая сеть микроциркуляторного русла. Пучки гладкомышечных клеток ориентированы послойно, покрыты снаружи рыхлой соединительной тканью и мезотелием.

Тонкий кишечник. В норме стенка выстлана со стороны просвета каемчатым эпителием. Слизистая образует глубокие складки (ворсинки), в подслизистой – железистые структуры, скопления лимфоидных клеток, сосуды. В тонком кишечнике всех контрольных животных наблюдались признаки хронического поверхностного энтерита с утолщением, деформацией, склеиванием ворсинок – местами, вакуольной дистрофией, некротическими изменениями энтероцитов, усиленной десквамацией клеток эпителия, мононуклеарной инфильтрацией стромы ворсинок. Мышечная и подслизистая оболочки без патологии. В подслизистой оболочке крупные лимфоидные фолликулы (Пейеровы бляшки) с признаками активации (крупные герминативные центры, усиленный транзит лимфоцитов через эпителий купола бляшки).

Толстый кишечник. Стенка сохранила обычный рисунок строения. В слизистой оболочке много складок и крипт с большим количеством бокаловидных клеток. Эпителий однослойный цилиндрический. Клетки эпителия без признаков дистрофии и некробиоза. Между криптами тонкие прослойки волокнистой неоформленной соединительной ткани с мелкими группами лимфоидных клеток. Мышечная оболочка представлена циркулярно расположенными пучками гладких мышечных клеток без патологии. В подслизистой оболочке сосудистые сплетения и умеренное число мелких лимфоидных фолликулов.

Семенники. На срезе видны извитые канальцы, поделенные тонкими соединительнотканными перегородками на дольки. В перегородках немногочисленные крупные округлые железистые клетки (клетки Лейдига). Поддерживающие клетки (клетки Сертоли) и сперматогенный эпителий канальцев на разных стадиях созревания расположены на тонкой базальной мембране, окруженной снаружи пучками нежных коллагеновых и эластиновых волокон. Клетки Сертоли, сперматогенного эпителия и Лейдига без признаков дистрофии и некробиоза.

У животных, получавших препарат АФП в дозе 5 мкг/кг в течение 3 месяцев, обнаружена следующая микроскопическая картина.

Печень. В печени кроликов, получавших препарат в дозе 5 мкг/кг, гистоструктура ткани не нарушена. Отсутствовали признаки дистрофии и некробиоза в гепатоцитах, а также воспалительные реакции стромы. У 2 кроликов из 4 в данной экспериментальной группе наблюдались умеренная гиперемия сосудов портальных трактов, увеличение количества дву-

ядерных гепатоцитов тотально на срез, полиплоидных ядер и незначительные участки в основном центролобулярных гепатоцитов с тремя и более ядрами.

Легкие. В легких основное поле зрения занимали округлые, хорошо расправленные альвеолы с тонкими стенками без инфильтрации поли- и мононуклеарами и свободным просветом. В эпителии альвеол, бронхиол и бронхов отсутствовали признаки дистрофии и некробиоза. Лимфоидная ткань, ассоциированная с бронхами, умеренно активна. У животных этой группы, так же как и у контрольных, наблюдались гиперемия, мелкие подкапсульные кровоизлияния со свежей кровью, что, скорее всего, есть результат манипуляций при эвтаназии кроликов (введение воздуха в вену уха).

Тимус. В тимусе подопытных кроликов отсутствовали признаки нарушений в системе кровообращения, дистрофические, некробиотические и воспалительные реакции. Структурные изменения, свидетельствующие о начале возрастной инволюции (увеличение площади, занимаемой соединительной и жировой тканью), были такими же, как и у контрольных животных. Соотношение площадей коры и мозгового вещества, плотность лимфоцитов в них (приблизительно 3 : 1) не менялись в сравнении с контрольными. Отмечалась тенденция к увеличению количества бластов и митотических фигур в коре тимуса.

Селезенка. Структура вариабельна так же, как в контрольной группе. Патологических изменений в структуре фолликулов и красной пульпы не обнаружено.

Брыжеечные лимфатические узлы. Отмечались усиление транзита лимфоидных клеток по синусам паракортикальной зоны и накопление бластных клеток в центральных синусах мозгового вещества.

Тонкий кишечник. Препарат АФП в указанной дозе не влиял на состояние слизистой оболочки.

Во всех остальных исследованных органах отсутствовали признаки нарушений в системе кровообращения, дистрофические, некробиотические и воспалительные реакции.

В группе животных, получавших препарат АФП в дозе 25 мкг/кг в течение 3 месяцев, результаты микроскопии тканей были следующими.

Почки. Патологические изменения в системе кровообращения, признаки дистрофии и некробиоза клеток клубочкового и канальцевого нефротелия, воспалительные процессы не обнаружены. Отмечалось очаговое умеренное выбухание и усиление десквамации клеток нефротелия проксимальных и дистальных канальцев в просветы канальцев, появление в них гиалиноподобного вещества.

Печень. В печени всех кроликов этой группы регистрировалась незначительная гиперемия сосудов портальных трактов, а также реакция ретикулоэндотелиальной системы (увеличение количества и размеров клеток Купфера с клеточным детритом в цитоплазме). Признаки дистрофических, некробиотических и воспалительных изменений не обнаруживались.

Легкие. У животных данной подопытной группы наблюдаемые изменения аналогичны изменениям в контрольной группе и в группе, получавшей препарат АФП в дозе 5 мкг/кг.

Тимус. В тимусе кроликов, получавших препарат АФП в дозе 25 мкг/кг, отсутствовали признаки нарушений в системе кровообращения, дистрофические, некробиотические и воспалительные реакции. Структурные изменения, свидетельствующие о начале возрастной инволюции (увеличение площади, занимаемой соединительной и жировой тканью), были такими же, как и у контрольных животных. Соотношение площадей коры и мозгового вещества не менялось в сравнении с контролем. В коре и мозговом веществе

тимуса отмечалось увеличение количества бластов и митотических фигур, усиление внутриорганной миграции тимоцитов из коры в мозговое вещество, усиление транзита лимфоцитов по лимфатическим щелям юкстамедуллярной зоны, что свидетельствовало об усилении функциональной активности органа.

Селезенка. Структура вариабельна так же, как и в контрольной группе. Патологических изменений в структуре фолликулов и красной пульпы не обнаружено.

Брыжеечные лимфатические узлы. Наблюдали усиление транзита лимфоидных клеток по синусам паракортикальной зоны, накопление бластных клеток в центральных синусах мозгового вещества.

Тонкий кишечник. Препарат АФП в дозе 25 мкг/кг не влиял на состояние слизистой оболочки у подопытных кроликов.

Во всех остальных исследованных органах кроликов, получавших препарат АФП в дозе 25 мкг/кг, отсутствовали признаки нарушений в системе кровообращения, дистрофические, некробиотические и воспалительные реакции.

Таким образом, результаты патоморфологического исследования внутренних органов кроликов шиншилла, в течение 3 месяцев получавших препарат АФП в дозах 5 и 25 мкг/кг (5- и 25-кратное превышение рекомендуемой для взрослого человека дозы), показали следующее.

Трехмесячное внутривенное введение препарата АФП в дозе 5 мкг/кг не вызвало патологических нарушений в системе кровообращения, дистрофических, некробиотических изменений клеток рабочей паренхимы и стромы; воспалительные реакции во всех изученных внутренних органах отсутствовали.

При длительном введении препарата АФП в дозе 25 мкг/кг наблюдались:

• в тимусе умеренная активация внутри- и межорганной миграции тимоцитов;

• в брыжеечном лимфоузле усиленная миграция лимфоидных клеток по центральным синусам;

• в печени усиление функции ретикулоэндотелиальной системы.

Признаки патологических нарушений в системе кровообращения изученных внутренних органов кроликов, а также дистрофические, некробиотические и воспалительные реакции в рабочей паренхиме и строме внутренних органов отсутствовали.

3.6. ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА АФП НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРЫС

3.6.1. Влияние препарата АФП на центральную нервную систему

Исследование проведено на 52 крысах-самцах популяции Wistar массой 300–350 г. Препарат АФП вводили однократно внутрибрюшинно в дозах 0,008; 0,08; 0,8 мг/кг в расчете на 2 мл ФР. Контрольным животным вводили физиологический раствор в том же объеме. Физиологические исследования проводили через 2, 24 ч и 7 сут. после введения препарата.

При оценке состояния центральной нервной системы (ЦНС) изучали следующие реакции [27]:

• спинномозговой рефлекс «tail-flick», характеризующий болевую чувствительность животного, а также возбудимость спинномозговых нейронов и скорость проведения воз-

буждения. Фиксировался латентный период отдергивания хвоста у крысы при его нагревании инфракрасной лампой при помощи анальгезиметра (Rema, ФРГ);

• вертикальный двигательный компонент ориентировочной реакции, основанный на подсчете количества вставаний животных на задние лапы («вертикальные» стойки) за 2 мин в ограниченном пространстве – высокостенном ведре;

• метод открытой площадки, в основу которого положен норковый рефлекс грызунов. Животное помещалось в центр горизонтально установленной на высоте 20 см площадки размером 60 х 60 см с 16 равномерно расположенными отверстиями диаметром 4 см, и в течение 2 мин визуально подсчитывалось количество заглядываний в отверстия – «норки»;

• количество умываний крыс за время проведения тестов открытой площадки и вертикального двигательного компонента, которое суммировалось и в качестве интегрального показателя использовалось для оценки двигательной активности животных;

• суммационно-пороговый показатель (СПП), с помощью которого возможна оценка функционального состояния центральной нервной системы, способность ее к суммации подпороговых раздражений, генерируемых источником импульсного тока при нарастающем напряжении.

Результаты исследований представлены в таблицах 3.6.1.1 – 3.6.1.5. Анализ данных с помощью общепринятых статистических методов с использованием t-критерия Стьюдента позволил сделать вывод, что однократное внутрибрюшинное введение препарата АФП в дозах 0,008; 0,08; 0,8 мг/кг (что превышает терапевтические дозы в 8, 80 и 800 раз) не вызывает достоверного отклонения изучаемых показателей функционального состояния ЦНС.

В дополнение к проведенным исследованиям для изучения влияния препарата АФП на ЦНС использована экспериментальная модель судорожной пробы с тиосемикарбазидом (ТСК). Судорожный эффект ТСК обусловлен его способностью ингибировать декарбоксилазу глютаминовой кислоты. Использование указанной модели позволяет выявить возможные воздействия испытываемого препарата на процессы возбуждения и торможения, что будет проявляться в ускорении или замедлении гибели животных после введения ТСК.

В эксперименте использовано 63 крысы-самца популяции Wistar. Препарат АФП вводили крысам однократно внутрибрюшинно в дозах 0,08 и 0,8 мг/кг в 2 мл физиологического раствора на крысу массой 400 г. Контрольные животные получали эквивалентное количество физиологического раствора. Нагрузка ТСК проводилась через 1 и 8 сут. после введения АФП. ТСК вводили внутрибрюшинно в дозе 35 мг/кг в объеме 1,5 мл ФР на крысу массой 400 г и регистрировали время гибели животных от судорожных приступов. Полученные данные отражены в таблице 3.6.1.6.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что препарат АФП в дозах, превышающих терапевтическую для человека в 80 и 800 раз, не оказывает влияния на ЦНС крыс. Время гибели подопытных и контрольных животных во все сроки исследования при разных дозах препарата практически не различалось.

Таблица 3.6.1.1

Вертикальная двигательная активность (стойки) крыс-самцов (n = 13) после однократного введения препарата АФП ($M \pm m$)

Контроль (ФР)				АФП, 0,008 мг/кг			
Фон	**а**	**б**	**в**	**Фон**	**а**	**б**	**в**
3,3 ± 0,69	4,23 ± 0,81	2,30 ± 0,64	3,85 ± 0,86	3,38 ± 0,72	3,85 ± 0,79	3,23 ± 0,66	2,85 ± 0,71
АФП, 0,08 мг/кг				**АФП, 0,8 мг/кг**			
Фон	**а**	**б**	**в**	**Фон**	**а**	**б**	**в**
2,92 ± 0,69	4,66 ± 0,75	3,83 ± 0,69	3,23 ± 0,67	3,42 ± 0,72	4,58 ± 0,72	3,17 ± 0,71	2,75 ± 0,62

Примечание. Здесь и далее (в табл. 3.6.1.2 – 3.6.1.5): а – через 2 ч после введения, б – через 24 ч, в – через 7 сут. после введения ($p > 0,05$).

Таблица 3.6.1.2

Норковый рефлекс после однократного введения крысам-самцам (n = 13) препарата АФП ($M \pm m$)

Контроль (ФР)				АФП 0,008 мг/кг			
Фон	**а**	**б**	**в**	**Фон**	**а**	**б**	**в**
2,92 ± 0,58	3,15 ± 0,63	3,33 ± 0,59	4,36 ± 0,82	3,15 ± 0,63	2,69 ± 0,6	2,77 ± 0,5	3,67 ± 0,66
АФП 0,08 мг/кг				**АФП 0,8 мг/кг**			
Фон	**а**	**б**	**в**	**Фон**	**а**	**б**	**в**
3,16 ± 0,44	4,25 ± 0,49	3,83 ± 0,58	3,08 ± 0,75	2,45 ± 0,58	3 ± 0,38	2,83 ± 0,51	2,66 ± 0,5

Таблица 3.6.1.3

Рефлекс «tail-flick» после однократного введения крысам-самцам (n = 13) препарата АФП ($M \pm m$)

Контроль (ФР)			АФП, 0,008 мг/кг		
а	**б**	**в**	**а**	**б**	**в**
121 ± 7,66	137 ± 4,41	134 ± 5,31	112,8 ± 8,44	135,2 ± 3,56	135,8 ± 6,98
АФП, 0,08 мг/кг			**АФП, 0,8 мг/кг**		
а	**б**	**в**	**а**	**б**	**в**
99,7 ± 7,52	134 ± 3,29	136,8 ± 2,95	11 ± 6,02	137,2 ± 2,82	135,6 ± 5,35

Таблица 3.6.1.4

Суммационно-пороговый показатель крыс-самцов (n = 13) после однократного введения препарата АФП ($M \pm m$)

Контроль (ФР)			АФП, 0,008 мг/кг		
а	б	в	а	б	в
8 ± 0,37	8,17 ± 0,6	8,16 ± 0,79	8,67 ± 0,33	8,67 ± 0,67	8,5 ± 0,43
АФП, 0,08 мг/кг			**АФП, 0,8 мг/кг**		
а	б	в	а	б	в
7,5 ± 0,62	9,33 ± 0,49	8,67 ± 0,71	9,33 ± 0,33	7,67 ± 0,76	8,5 ± 0,56

Таблица 3.6.1.5

Количество умываний за 2 мин крыс-самцов (n = 13) после однократного введения препарата АФП ($M \pm m$)

Контроль (ФР)			АФП, 0,008 мг/кг		
а	б	в	а	б	в
1,42 ± 0,36	0,75 ± 0,13	1,5 ± 0,41	1,08 ± 0,33	0,96 ± 0,26	0,83 ± 0,18
АФП, 0,08 мг/кг			**АФП, 0,8 мг/кг**		
а	б	в	а	б	в
1,37 ± 0,37	1,25 ± 027	1,23 ± 0,37	1,38 ± 0,49	0,96 ± 0,23	1,08 ± 0,16

Таблица 3.6.1.6

Время гибели крыс-самцов после введения препарата АФП на фоне тиосемикарбазида

Группа животных	Доза препарата	n	Длительность жизни, мин
Через 1 сут.			
Контроль, ФР АФП АФП	0,2 мл 0,08 мг/кг 0,8 мг/кг	14 13 12	85,2 ± 3,6 89,8 ± 3,6 87,3 ± 2,88
Через 8 сут.			
Контроль, ФР АФП	0,2 мл 0,8 мг/кг	12 12	86 ± 4,08 90,2 ± 5,58

3.6.2. Влияние препарата АФП на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы

Функциональное состояние сердечно-сосудистой системы (ССС) оценивалось с помощью электрокардиографии. Измерения осуществлялись электрокардиографом ЭК1Т-03М во II стандартном отведении со скоростью ленты 40 мм/с и усилением 1 мВ = 1 см. Электродами служили стальные иглы, вводимые под кожу конечностей крыс соответственно расположению электродов на теле человека при снятии ЭКГ. Исследование проводилось на

64 крысах популяции Wistar массой 280–350 г. Крысы-самцы, по 6 животных в каждой группе, фиксировались в пластиковых камерах. Регистрация ЭКГ производилась через 2, 24 ч и 7 сут. после однократного внутрибрюшинного введения препарата АФП в дозах 0,008; 0,08; 0,8 мг/кг, разведенного в 2 мл физиологического раствора из расчета на белок. Контрольным животным вводили физиологический раствор в объеме 2 мл.

Оценивались: продолжительность комплекса Q-R-S, характеризующего состояние миокарда и скорость распространения биоэлектрического потенциала в желудочках (внутрижелудочковая проводимость); продолжительность комплекса Q-T; вольтаж зубца R, отражающий распространение возбуждения по желудочкам; частота сердечных сокращений; изменение конфигурации зубцов, наличие экстрасистолий.

Из данных электрокардиографии, представленных в таблице 3.6.2.1, видно, что достоверных изменений в миокарде и сердечно-сосудистой системе крыс после однократного внутрибрюшинного введения препарата АФП не произошло. АФП не оказывает воздействия на ССС в дозах 0,008; 0,8 мг/кг, что соответственно в 8 и 800 раз превышает эквивалентную терапевтическую дозу для человека.

Таблица 3.6.2.1

Данные электрокардиографии крыс-самцов ($n = 64$) после однократного введения препарата АФП ($M \pm m$)

Время введения препарата	Продолжительность комплекса Q-R-S, м/с	Продолжительность комплекса Q-T, м/с	Вольтаж зубца R, мВ	Частота сердечных сокращений / мин
Контроль (ФР)				
а	10 ± 0,6	62,5 ± 2,1	0,62 ± 0,04	510 ± 10,9
б	9,35 ± 0,3	58,3 ± 3,8	0,6 ± 0,03	580 ± 12,2
в	9,5 ± 0,4	63,3 ± 2,8	0,63 ± 0,02	492,7 ± 35,4
АФП, 0,008 мг/кг				
а	9,76 ± 0,4	60,8 ± 3,5	0,61 ± 0,05	496,6 ± 38,4
б	9,33 ± 0,6	61,6 ± 3,8	0,61 ± 0,02	441,7 ± 29
в	10 ± 0,3	60 ± 3,6	0,63 ± 0,03	480 ± 33,4
АФП, 0,08 мг/кг				
а	9,66 ± 0,4	60,8 ± 3	0,61 ± 0,03	481,6 ± 36,7
б	9,67 ± 0,3	58,3 ± 4	0,6 ± 0,04	482,7 ± 31,5
в	9,83 ± 0,3	57,5 ± 2,1	0,59 ± 0,03	481,7 ± 32,9
АФП, 0,8 мг/кг				
а	9,88 ± 0,3	60,8 ± 3	0,6 ± 0,04	483,3 ± 37,4
б	9,83 ± 0,5	61,7 ± 2,7	0,63 ± 0,04	477 ± 33,3
в	9,33 ± 0,3	60,8 ± 4,9	0,59 ± 0,04	478 ± 28

Примечание. Введенные в таблицу буквенные символы обозначают: а – через 2 ч после введения, б – через 24 ч, в – через 7 сут. после введения ($p > 0,05$).

3.7. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КОМПОНЕНТОВ ПРЕПАРАТА АФП НА МЫШЕЧНУЮ СИЛУ И ВЫНОСЛИВОСТЬ МЫШЕЙ

Как следует из материалов научных исследований, отраженных в обзоре литературы (глава 1), установлено, что сывороточный альфа-фетопротеин обладает широким спектром биологической активности в отношении регуляции функций различных органов и систем.

Учитывая это обстоятельство, мы поставили перед собой задачу оценить биологическую активность компонентов, входящих в состав препарата АФП, относительно мышечной работоспособности. Для подтверждения наличия в препарате АФП предполагаемых активностей нами был проведен ряд экспериментов на животных.

Животных разделили на три группы: первая группа – контрольная; вторая группа – реополиглюкин; третья – АФП. В каждой группе было по 5 беспородных белых мышей. Всего в эксперименте задействовали 15 животных массой 18–20 г.

Лиофилизированные АФП и реополиглюкин вводили внутрибрюшинно в дозах по 0,004 и 0,07 мг/кг массы тела в сутки соответственно, предварительно разведя все компоненты в 0,3 мл ФР. Контрольным животным вводили эквиобъемное количество физиологического раствора. Инъекции делали в течение 7 сут. Мышечная работоспособность оценивалась в следующих тестах [62, 88]:

- тест плавания;
- тест с подвисанием;
- тест с поднятием грузиков.

Для проведения пробы с плаванием использовали аквариум с водой (столб воды 20–25 см, температура 22 °С). Каждому животному давали нагрузку – 7% от массы тела (груз привязывали к хвосту). Учитывалось время плавания. Животных извлекали из воды после первого погружения.

В пробе с подвисанием животные удерживались на горизонтальном стержне передними лапами. Учитывалось время удержания на стержне.

В пробе с поднятием грузиков к пластинке, сделанной из мелкой металлической сетки, привязывали несколько грузиков. Масса пластинки без грузиков – 19 г. Мышь сажали на сетчатую пластинку, затем поднимали за хвост вверх (мышь поднимала сетку за собой). Учитывали массу грузиков, которые смогла поднять и удержать мышь.

Таблица 3.7.1

Уровень работоспособности мышей в исследуемых группах

Показатель работоспособности	Группы животных		
	1-я	2-я	3-я
Время плавания, с	465,6 ± 73,9	392,2 ± 95	778,2 ± 158,7*
Время удерживания на стержне, с	9,2 ±1,7	10,5 ± 3,4	16,5 ± 3,8*
Масса поднятых грузиков, г	26 ± 2,5	30,2 ± 1,3	40,2 ± 2,2*

*Достоверность различий при $p < 0,01$ по сравнению с контролем (1-я группа).

Как видно из таблицы 3.7.1, АФП (опытная группа 3) достоверно, во всех исследованных тестах, способствует увеличению мышечной силы и выносливости экспериментальных животных. Реополиглюкин не влияет на эти показатели.

3.8. ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕРГИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА АФП

Возможность индукции аллергической реакции немедленного типа (РГНТ), сопряженной с появлением гомоцитотропных антител в ответ на введение препарата АФП, оценивали на морских свинках в системной анафилактической реакции, развивающейся, как известно, при повторном введении лекарственных веществ, содержащих аллерген.

Сенсибилизацию пестрых морских свинок массой 200–220 г (питомник «Столбовая», г. Москва) проводили по схеме, оптимальной для выявления способности лекарственных средств индуцировать реакции гиперчувствительности немедленного типа, – трехкратно через сутки (первая инъекция подкожно, две последующие – внутримышечно в область бедра). Препарат АФП вводили животным в дозах 0,01 мг/кг (1500 МЕ, первая группа) и 0,1 мг/кг (15 000 МЕ, вторая группа) на одну инъекцию, что соответствовало 10 и 100 эффективным терапевтическим дозам для человека (10 и 100 ЭД).

Разрешающее введение препарата производили внутрисердечно на 23-е сутки после сенсибилизации. У части животных обеих групп, в соответствии с «Методическими рекомендациями по оценке аллергенных свойств фармакологических средств» МЗ РФ [52], дозы препарата АФП были равны суммарной сенсибилизирующей (4500 МЕ для первой группы и 45 000 МЕ для второй группы).

Известно, что модель системной анафилактической реакции на морских свинках, как один из наиболее чувствительных методов, позволяет выявить ничтожно малое содержание аллергена в препарате и достигается разными путями, в том числе увеличением дозы препарата АФП для разрешающей инъекции. Ввиду этого (для выявления аллергизирующего потенциала препарата АФП в лекарственной форме) при разрешающей инъекции его дозы в 10 раз (для первой группы) и в 7 раз (для второй группы) превышали сенсибилизирующую дозу (15 000 и 100 000 МЕ).

Оценку реакции проводили на основании принятой 4-балльной системы, регистрируя различную степень проявления возможной шоковой реакции (от почесывания мордочки, кашля, судорог до смерти животного) с вычислением анафилактического индекса. Условия эксперимента и результаты представлены в таблице 3.8.1.

Наблюдение за реакцией животных обеих групп в первые 5–10 мин после разрешающей инъекции в дозе, равной суммарной сенсибилизирующей, не выявило ни у одной морской свинки никаких значимых признаков анафилактического шока. У трех животных из 10 наблюдались лишь отдельные слабовыраженные начальные проявления (редкие почесывания мордочки и «жевание»).

Таблица 3.8.1

Исследование способности препарата АФП индуцировать аллергические реакции немедленного типа

№ группы	Сенсибилизация, доза АФП, МЕ	Разрешение, доза АФП, МЕ	Анафилактический индекс	Количество животных
1	1 500 × 3	4 500	0	5
	1 500 × 3	15 000	0	4
2	15 000 × 3	45 000	0	5
	15 000 × 3	100 000	0,8	4

При увеличении разрешающей дозы до 10-кратной сенсибилизирующей (для первой группы животных) интенсивность проявления этих симптомов была чуть более выражена, но реакция не могла быть оценена даже на 1 балл.

В группе животных, сенсибилизированных препаратом АФП в дозе, эквивалентной 100 эффективным терапевтическим, где для разрешающей инъекции использовалась доза препарата 60 ЭД/кг (100 000 МЕ), анафилактический индекс на группу был равен 0,8.

Учитывая высокие дозы препарата при сенсибилизации и для разрешения, а также тот факт, что человеческий АФП был для морских свинок аллогенным белком, можно констатировать, что в столь жестких условиях эксперимента аллергизирующий потенциал препарата АФП крайне низок. По результатам этого исследования возможность развития анафилактической реакции немедленного типа при повторном введении препарата АФП можно считать маловероятной.

3.8.1. Исследование аллергизирующего действия препарата АФП в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)

Способность препарата АФП вызывать реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) при повторном введении оценивали в плантарном тесте. В эксперименте были использованы мыши-гибриды (СВА × С57Bl/6) F1 массой 19–21 г (питомник «Столбовая», г. Москва).

Сенсибилизацию производили в полном адъюванте Фрейнда (ПАФ) подкожно при соотношении 1 : 1 с вводимым препаратом. Препарат АФП вводили в 0,2 мл ФР двум группам животных – по 0,001 мг/кг (150 МЕ) и 0,01 мг/кг (1500 МЕ), что соответствовало 10 и 100 ЭД для человека. Контрольным животным вводили ПАФ с ФР в эквивалентном объеме.

Через 5 сут. производили разрешающую инъекцию под апоневроз задней конечности, в контралатеральную конечность вводили равный объем ФР. Рассчитывали индекс воспаления (ИВ) – относительное увеличение массы опытной стопы по сравнению с контрольной:

$$[(\mathbf{m}_{\text{опыт}} - \mathbf{m}_{\text{контроль}}) / \mathbf{m}_{\text{контроль}}] \times \mathbf{100\%},$$

где $\mathbf{m}_{\text{опыт}}$ – масса опытной стопы, $\mathbf{m}_{\text{контроль}}$ – масса контрольной стопы.

Для определения разрешающей дозы АФП, не вызывающей неспецифического отека лапок, был проведен эксперимент по оценке местного раздражающего действия препарата, введенного под апоневроз лап интактных мышей в дозе 2500 МЕ в объеме 50 мкл ФР. ИВ, установленный вышеописанным способом, через 24 ч после инъекции свидетельствовал о том, что даже в такой высокой концентрации (500 000 МЕ/мл) препарат АФП не оказывал раздражающего действия (табл. 3.8.1.1). Увеличение массы лапок составило всего 2,62%. Для разрешения использовали дозу 2500 МЕ.

Результаты оценки реакции ГЗТ у сенсибилизированных и контрольных животных после проведения разрешающей инъекции (табл. 3.8.1.1) указывают, что индекс реакции у животных, получивших препарат АФП в обеих исследуемых дозах, не отличался от контрольных значений и не превышал значения реакции у интактных мышей. Полученные данные свидетельствуют, что даже в условиях интенсивной сенсибилизации животных препаратом АФП в дозах, эквивалентных 10 и 100 ЭД, реакции ГЗТ не зарегистрировано.

Таким образом, проведенные на экспериментальных животных исследования по оценке аллергизирующих свойств препарата АФП позволили установить, что введение

препарата АФП не предполагает индукции реакций ГЗТ, а реакция РГНТ с развитием анафилаксии представляется маловероятной.

Таблица 3.8.1.1

Исследование способности препарата АФП индуцировать аллергические реакции замедленного типа у мышей

Группа животных	Доза АФП, МЕ	ИВ, $M \pm m$	Масса лапок, мг $M \pm m$		n
			Опыт	Контроль	
Интактные	2 500	2,62 ± 0,57	116,8 ± 1,68	113,9 ± 2,19	9
Контроль (ФР)	–	2,95 ± 0,74	128,7 ± 2,38	125,1 ± 2,69	10
Препарат АФП	150	1,93 ± 0,33	133,3 ± 3,34	130,8 ± 3,39	10
Препарат АФП	1 500	2,51 ± 0,51	127,4 ± 2,68	124,4 ± 2,71	10

Примечание: 1. Показана достоверность по t-критерию Стьюдента в группах сравнения $p > 0,05$.
2. ИВ – индекс воспаления.

3.9. ИЗУЧЕНИЕ МУТАГЕННОСТИ И ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ КАНЦЕРОГЕННОСТИ ПРЕПАРАТА АФП

В систему исследования лекарственных и биологически активных препаратов для выявления среди них потенциальных мутагенов включен набор методов, с помощью которых можно зарегистрировать мутации различных типов: хромосомные аберрации, генные мутации, а также суммарно все типы повреждений в половых клетках млекопитающих. При изучении мутагенности и потенциальной канцерогенности препарата АФП был проведен ряд исследований:

1. Оценка способности препарата АФП индуцировать доминантные летальные мутации в зародышевых клетках мышей.

2. Оценка способности препарата АФП индуцировать генные мутации у микроорганизмов в тесте Эймса.

3. Оценка способности препарата АФП индуцировать хромосомные аберрации в клетках костного мозга млекопитающих.

4. Оценка способности препарата АФП индуцировать ДНК-повреждающее действие в SOS-хромотесте.

3.9.1. Оценка способности препарата АФП индуцировать доминантные летальные мутации в зародышевых клетках мышей

Доминантные летальные мутации – генетические изменения, индуцированные в родительских зародышевых клетках и приводящие к гибели первое поколение потомков на эмбриональных стадиях развития. Большая часть доминантных леталей представляет собой численные и структурные аберрации хромосом, которые частично могут быть представлены генными мутациями. Мутагенный эффект проявляется в виде повышенной эмбриональной смертности. Если яйцеклетка оплодотворена сперматозоидом, несущим доминантную леталь, то смерть развивающегося эмбриона может произойти как до, так и после имплантации.

Для оценки мутагенных свойств препарата АФП учитывали постимплантационную смертность – показатель, характеризующий постимплантационную выживаемость. Обычная схема проведения эксперимента включает проверку лекарственного препарата на самцах с последующим спариванием обработанных самцов с интактными самками.

Исследование проводили в течение 3 недель на постмейотических стадиях сперматогенеза.

Препарат АФП вводили мышам-самцам F1 (СВА × С57Bl/6) однократно внутривенно, в хвостовую вену, в дозах 0,01 и 0,1 мг/кг, что соответственно в 10 и 100 раз превышает рекомендуемую для взрослого человека терапевтическую дозу, в объеме 0,3 мл ФР. Контрольной группе мышей вводили однократно внутривенно ФР в объеме 0,3 мл. К каждому обработанному самцу сразу подсаживали по 3 виргинные самки. Подсадки самок проводились еженедельно в течение 3 недель, чтобы вести анализ доминантной летальности соответственно стадиям сперматогенеза обработанных самцов. Эмбриональная смертность плодов у самок, забеременевших в первую неделю после введения препарата, свидетельствует о мутационных событиях, произошедших в зрелых сперматозоидах; вторая неделя соответствует поздним сперматидам, третья – ранним и средним сперматидам. Большая часть доминантных леталей вызывает смерть эмбрионов при или вскоре после имплантации. Отсаженных от самцов самок вскрывали на 15–17-й день беременности. При вскрытии регистрировали количество живых и мертвых эмбрионов у каждой самки отдельно.

Всего в эксперименте было использовано 48 самцов и 432 самки мышей F1 (СВА × С57Bl/6).

Результаты эксперимента представлены в итоговой таблице 3.9.1.1. Основным показателем уровня доминантных летальных мутаций служит уровень постимплантационных потерь. Как видно из таблицы, постимплантационная смертность в подопытных группах не отличается достоверно от таковой в контрольной группе ($p > 0,05$). Препарат АФП в дозах 0,01 и 0,1 мг/кг, что соответственно в 10 и 100 раз превышает рекомендуемую для человека терапевтическую дозу, не индуцирует доминантные летальные мутации в зародышевых клетках мышей. При статистической обработке результатов не обнаружено различий между подопытными и контрольными группами мышей ($p > 0,05$).

Таблица 3.9.1.1

Учет доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей

Стадия сперматогенеза	Препарат, мг/кг	Число беременных самок	Фертильность, %	Постимплантационная смертность, %
1-я неделя – зрелые спермии	Контроль АФП (0,01) АФП (0,1)	45 47 46	93,8 97,9 95,8	7,1 ± 1,52 8,7 ± 1,77 8,5 ± 1,92
2-я неделя – поздние сперматиды	Контроль АФП (0,01) АФП (0,1)	40 42 40	83,3 87,5 83,3	6,4 ± 1,85 6,5 ± 1,68 5,6 ± 1,49
3-я неделя – ранние и средние сперматиды	Контроль АФП (0,01) АФП (0,1)	45 45 46	93,8 93,8 95,8	5,3 ± 1,36 6,4 ± 1,78 6,9 ± 1,72

3.9.2. Оценка способности препарата АФП индуцировать генные мутации у микроорганизмов в тесте Эймса

Изучение мутагенной активности препарата АФП проведено методом, учитывающим способность альфа-фетопротеина индуцировать генные мутации у индикаторных микроорганизмов в системе метаболической активации *in vitro*. Использован метод учета мутаций в чашках Петри.

В качестве индикаторных микроорганизмов использовали ауксотрофные по гистидину штаммы *Salmonella typhimurium* ТА 98, ТА 100, ТА 1537. О наличии мутагенного действия препарата АФП судили по индукции обратных мутаций – от ауксотрофности по гистидину к прототрофности. Штамм ТА 98 несет мутацию his D 3052, фреймшифт-мутацию типа 1. Реверсия к дикому типу происходит за счет делеции 2 Ц-Г в последовательности (Г–Ц, Ц–Г–Ц–Г–Ц–Г–Ц–Г, Г–Ц–Г–Ц–Г–Ц–Г–Ц), находящейся недалеко от сайта мутации. Мутация his D 3052 использована в тесторном штамме для доказательства способности изучаемого вещества индуцировать мутации типа сдвига рамки считывания. В качестве позитивного контроля на мутацию his D 3052 использовали 2-нитрофлуорен или ДДДТДП.

Мутация his C 3076 – это мутация сдвига рамки считывания штамма ТА 1537. Последовательность ДНК мутанта his C 3076 не определена, однако известно, что она содержит один добавленный цитозин к ряду из трех цитозинов и подавляется супрессором suf B. В качестве позитивного контроля на мутацию his C 3076 использовали 9-аминоакридин.

Штамм ТА 100 несет мутацию his G 46, миссенс-мутацию, ревертирующую под действием многих мутагенов, индуцирующих замены пар оснований. В качестве положительного контроля на эту мутацию использовали азид натрия и 2-нитрофлуорен. Перед работой штаммы были проверены на ауксотрофность к гистидину, на наличие плазмиды pKM 101 у штаммов ТА 98 и ТА 100 и мутации rfa.

Метод позволяет изучить как прямое действие исследуемого вещества на тесторные штаммы, так и действие его метаболитов, образующихся под влиянием микросомальной фракции (S 9) индуцированной печени крысы.

В связи с тем что на этапах технологического производства препарата АФП в качестве консерванта применялся NaN_3 (являющийся, как известно, прямым мутагеном в тесте Эймса) в концентрации 1,5 мкг/чашку, мы провели исследование готовой лекарственной формы препарата АФП в тесте Эймса. В целях выявления мутагенности АФП одну ампулу стерильного препарата АФП (1 терапевтическая доза активностью 50 000 МЕ), содержащую 62,5 мкг белка альфа-фетопротеина, 9 мг NaCl и 5 мг декстрана в качестве наполнителя, растворяли в 1 мл дистиллированной воды и вносили на чашки Петри в объеме 100 мкл. Концентрация белка альфа-фетопротеина в этом случае составляла 6,25 мкг на чашку. Также на предмет мутагенности была исследована субстанция препарата АФП с растительной белка АФП 0,5; 5,0; 50,0; 250,0 и 500,0 мкг/чашку Петри.

Селективный полуобогащенный агар в объеме 2 мл в пробирках плавили на водяной бане при температуре 100 °С, затем охлаждали в термостатируемой водяной бане до 44–45 °С. В пробирки с агаром вносили 100 мкл раствора препарата АФП, 100 мкл суспензии ночной культуры бактерий, 100 мкл фракции S 9 печени крысы и кофакторы.

Микросомальную фракцию печени крысы, индуцированную Aroclor, получали в виде лиофилизата у фирмы Labsystems (Финляндия). Опыт проводили как с полной активирующей микросомальной смесью (ПАМС), так и с неполной активирующей микросомальной смесью (НАМС). Смеси вносили в пробирки после извлечения их из термо-

статирующей бани и тут же наносили полужидкий агар на слой минимального агара на чашках Петри. После полного застывания агара чашки переносили в термостат при температуре 37 °С. На каждую дозу препарата делали по три дубля с ПАМС и по три – с НАМС. Через 48 ч инкубации при температуре 37 °С производили учет прототрофных ревертантов.

Оценку результатов проводили по алгоритму, где для каждого варианта рассчитывали геометрическое число ревертантов с определением:

$$X_i = N \times X_i1 \times X_i2 \times X_i3,$$

где X_i – число ревертантов в чашках Петри 1, 2, 3 на дозе *i*.

Для каждого опытного варианта находили кратность превышения среднего геометрического числа ревертантов в опыте над контролем и сравнивали с критическим значением для штаммов ТА 1537, ТА 98 и ТА 100.

Как следует из данных, представленных в таблице 3.9.2.1, бактериальные штаммы увеличивали число ревертантов под действием веществ, взятых в качестве положительных контролей, что отражает объективность экспериментальных данных. В то же время препарат АФП не вызывал достоверного увеличения числа ревертантов ($p > 0,05$). На основании этого можно сделать вывод, что субстанция препарата АФП в концентрациях 0,5–500 мкг/чашку не обладает мутагенным действием.

Лекарственная форма препарата АФП в концентрации 62,5 мкг/чашку также не вызывает увеличения спонтанных реверсий в тесте Эймса. Следовательно, белок АФП не является потенциально мутагенным соединением.

Таблица 3.9.2.1

Результаты изучения мутагенного действия препарата АФП на индикаторные штаммы *Salmonella typhimurium* в тесте Эймса

Препарат, доза, мкг/чашку	Среднее геометрическое число ревертантов на чашку					
	Штамм ТА 98		Штамм ТА 100		Штамм ТА 1537	
	НАМС	ПАМС	НАМС	ПАМС	НАМС	ПАМС
Лек. форма АФП, 62,5	76,9	24,4	77,0	58,0	4,4	4,0
Субстанция АФП, 0,5	70,2	67,2	71,4	82,0	4,2	2,3
Субстанция АФП, 5,0	72,0	82,5	76,6	68,8	5,5	3,6
Субстанция АФП, 50,0	79,3	82,0	108,1	37,8	2,5	4,4
Субстанция АФП, 250,0	60,3	56,9	80,7	17,0	2,8	3,5
Субстанция АФП, 500,0	70,0	37,9	79,0	72,4	2,4	2,4
Контроль, H_2O	92,5	73,9	63,8	64,0	3,9	7,5
Контроль, 2-аминантрацен, 10		143,0		100,0		17,3
Контроль, 2-нитрофлуорен, 0,2	1500,0		500,0			
Контроль, NaN_3, 1,5			107,5			
Контроль, 9-аминоакридин, 10					563,0	

3.10. ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ ПРЕПАРАТА АФП ИНДУЦИРОВАТЬ ХРОМОСОМНЫЕ АБЕРРАЦИИ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Эксперименты проведены на мышах-гибридах (СВА × С57BI/6) F1 массой 18–20 г. В каждом варианте опыта (опытном и контрольном) использовано по 5 животных. Рабочие растворы готовили путем разведения препарата АФП в дистиллированной воде. Препарат АФП в остром эксперименте вводили внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл однократно в дозах, равных 66 700 МЕ/кг, т. е. из расчета 100-кратной терапевтической дозы. Животных выводили из эксперимента через 24 ч. Параллельно проводили подострый эксперимент путем введения препарата АФП внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл в дозе 33 350 МЕ/кг, т. е. из расчета 50 терапевтических доз, ежедневно на протяжении 5 дней. Животных выводили из эксперимента через 6 ч после последнего введения препарата АФП. Контрольной группе животных вводили дистиллированную воду в объеме 0,5 мл по той же схеме. За 1 ч до забоя мышам внутрибрюшинно вводили колхицин (Serva) в дозе 4,8 мкг/г массы тела животного.

Методика приготовления хромосомных препаратов из клеток костного мозга использована нами с некоторыми модификациями. Суспензию клеток костного мозга, полученную из бедренных костей, ресуспендировали в растворе Хенкса, центрифугировали 7 мин при 1000 об/мин, затем надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали в теплом (37 °С) гипотоническом растворе 0,075 М KCl и инкубировали в нем 50 мин, затем вновь центрифугировали, удаляя супернатант. К осадку осторожно добавляли холодный фиксатор Карнуа (смесь абсолютного метилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1). Суспензию помещали на 30 мин в холодильник при –4 °С, после чего ресуспендировали, центрифугировали и удаляли надосадочную жидкость. Клетки трехкратно отмывали новыми порциями фиксатора Карнуа. После этого весь супернатант удаляли, в 0,2–0,5 мл осадка (в зависимости от объема клеточной суспензии) добавляли свежий фиксатор и наносили суспензию на предметные стекла с высушиванием их над пламенем горелки. Препараты окрашивали азур-эозином. Метафазы анализировали на наличие в них хромосомных аберраций по рекомендациям ВОЗ. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента.

В таблице 3.10.1 представлены данные по воздействию препарата АФП на хромосомы костного мозга мышей линии F1 (СВА × С57BI/6).

Таблица 3.10.1

Учет структурных нарушений хромосом в клетках костного мозга мышей F1 (CBA × C57BI/6) при воздействии препарата АФП

Вариант опыта	Контроль	АФП, 66 700 МЕ/кг, однократно	АФП, 33 350 МЕ/кг, 5-кратно
Экспозиция, ч	х–6*	24	24; х–6*
Число метафаз	500	500	500
Аберрации			
Одиночный фрагмент	5	6	7
Парный фрагмент	–	–	–
Обмены	–	–	–
Клетки с множеством аберраций	–	–	–
Клетки с пробелами	–	–	–
Доля клеток с аберрациями	1,0 ± 0,3	1,4 ± 0,5	1,8 ± 0,3

*х–6 ч – выведение из эксперимента после заключительного введения препарата.

Как следует из приведенных экспериментальных данных, статистически достоверных различий в уровне хромосомных аберраций в клетках костного мозга мышей, подвергшихся воздействию препарата АФП, по сравнению с контролем нет ($p > 0,05$). Следовательно, согласно примененному тесту учета хромосомных аберраций в клетках костного мозга млекопитающих, препарат АФП не обладает мутагенными свойствами.

3.11. ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ ПРЕПАРАТА АФП ИНДУЦИРОВАТЬ ДНК-ПОВРЕЖДАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ В SOS-ХРОМОТЕСТЕ

Одним из тестов, отражающих повреждение ДНК, является определение индукции SOS-ответа бактериальной клетки на воздействие испытуемого агента, так называемый SOS-хромотест. Он основан на знаниях о SOS-ответе на ДНК-повреждения. Основой теста является штамм *E. coli* PQ 37, сконструированный посредством lac Z, отвечающего за синтез фермента β-галактозидазы, с геном sfi A, контролируемым генеральным репрессором SOS-системы. Экспрессия sfi A индуцируется после повреждения ДНК как часть SOS-ответа. В этом тесте SOS-экспрессия измеряется по количественному определению ферментной активности β-галактозидазы, которая может быть количественно измерена в цветной реакции. Маркером роста клеток в этом штамме является ЩФ, которую также можно количественно измерить в цветной реакции.

В результате анализа получают кривые зависимости синтеза β-галактозидазы от концентрации исследуемого вещества и кривые, характеризующие динамику роста бактерий в этих условиях. По этим показателям определяется SOS-индуцирующая потенция, отражающая способность вещества индуцировать экспрессию гена sfi A.

Мы проводили этот тест с помощью автоматического микробиологического анализатора Bioskrin фирмы Labsistems (Финляндия), управляемого ЭВМ Olivetti M24 по разработанной фирмой прикладной программе «SOS-хромотест, версия 1.2». Исследовали спо-

собность препарата АФП активировать SOS-систему как в условиях метаболической активации микросомальной фракцией печени крысы (S 9), так и без нее.

Препарат АФП вносили в инкубационную смесь, содержащую бактерии, питательную среду, диметилсульфоксид и S 9. Реакция шла в объеме 230 мкл. Время инкубации составило 2 ч при температуре 37 °С. Исследовали 10 концентраций препарата АФП. Наибольшая концентрация АФП в пробе 1000 мкг/мл, наименьшая – 1,9 мкг/мл. После 2-часовой инкубации при температуре 37 °С в пробах определяли активность ЩФ, являющейся маркером роста бактерий, в цветной реакции с p-nitrophenyl-phosphat, disodium; β-галактозидазы – в реакции с O-nitrophenyl-d-galactopyranoside, измеряя динамику развития цветной реакции при 420 нм/мин. Обработка результатов проведена по программе, предложенной фирмой Labsystems и дающей возможность определить для каждой концентрации исследуемого вещества отношение активности β-галактозидазы к активности щелочной фосфатазы и вычислить фактор индукции. Затем автоматически с помощью ЭВМ строилась кривая фактора индукции от концентрации исследуемого вещества, определялся наклон кривой в ее линейной части и таким образом определялся SOS IP и делался вывод о степени мутагенности исследуемого вещества.

Для проверки адекватности работы бактериальных штаммов, микросомальной активирующей смеси и красителей в каждом опыте использовали позитивные контроли – вещества, вызывающие активацию SOS-системы: 4-nitroginolin-N-oxid (прямой мутаген) и 2-aminoantracen (мутаген, вызывающий активацию SOS-функции только в присутствии S 9).

Данные, полученные в ходе экспериментов, показали, что препарат АФП ни в одной из исследованных концентраций не вызывает активации системы репарации ДНК у *E. coli* PQ 37, т. е. не обладает ДНК-повреждающим действием.

Таким образом, в результате исследований установлено, что субстанция препарата АФП в концентрациях 0,5–500 мкг/чашку не увеличивает числа обратных реверсий в тесте Эймса. Лекарственная форма АФП в концентрации 6,25 мкг/чашку также не увеличивает числа обратных реверсий.

Препарат АФП при однократном введении внутрибрюшинно самцам мышей-гибридов F1 (СВА × С57BI/6) в 100-кратной терапевтической дозе 66 700 МЕ/кг, а также в подостром опыте при ежедневном введении в течение 50 дней в 50-кратной терапевтической дозе 33 350 МЕ/кг внутрибрюшинно не вызывает увеличения числа хромосомных аберраций в костном мозге мышей.

Препарат АФП в дозах 1,9–1000 мкг/мл и его возможные метаболиты, возникающие под воздействием микросомальной фракции печени крысы, не вызывают повреждений ДНК в SOS-хромотесте.

3.12. ИССЛЕДОВАНИЕ СУБСТАНЦИИ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ АФП НА МОДЕЛЯХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

3.12.1. Экспериментальное изучение иммунотропных свойств препарата АФП

В целях изучения иммуномодулирующих свойств препарата АФП исследовали:

1. Воздействие препарата АФП на реакцию отторжения аллогенного кожного трансплантата у мышей.

2. Воздействие препарата АФП на пролиферацию стволовых кроветворных клеток при трансплантации сингенного и аллогенного костного мозга.

При изучении воздействия препарата АФП на реакцию отторжения аллогенного кожного трансплантата опыт проводили на мышах линии СВА (реципиент), которым пересаживали кожный лоскут от мышей аллогенной линии С57Bl/6 (донор). Проведено две серии экспериментов.

1-я серия. Одновременно с трансплантацией кожного лоскута животным-реципиентам однократно внутрибрюшинно вводили препарат АФП (в 0,3 мл физиологического раствора) в следующих дозах:

1-я группа (10 мышей) – контрольная, введен ФР 0,3 мл;

2-я группа (10 мышей) – 50 мкг/кг;

3-я группа (10 мышей) – 500 мкг/кг.

2-я серия. Препарат АФП (в 0,3 мл ФР) животным-реципиентам вводили внутрибрюшинно по следующей схеме:

4-я группа (10 мышей) – контрольная, вводили ФР 0,3 мл;

5-я группа (10 мышей) – препарат АФП вводили в день операции и затем один раз в трое суток до момента отторжения в дозе 50 мкг/мышь;

6-я группа (10 мышей) – препарат АФП вводили в день операции и затем один раз в трое суток до момента отторжения в дозе 200 мкг/мышь.

Результаты исследования представлены в таблице 3.12.1.

Таблица 3.12.1

Зависимость срока отторжения аллогенного кожного трансплантата у мышей от дозы и схемы введения препарата АФП

Группа	Доза препарата АФП, мкг/мышь	Схема введения	Срок отторжения, сут. $M \pm m$
1-я, $n = 10$ (контроль для 2-й и 3-й групп)	–	Однократно	11,8 ± 1,0
2-я, $n = 10$	50	– // –	16,2 ± 1,4*
3-я, $n = 10$	500	– // –	20,4 ± 0,9*
4-я, $n = 10$ (контроль для 5-й и 6-й групп)	–	Многократно	11,9 ± 0,8
5-я, $n = 10$	50	– // –	17,3 ± 0,9*
6-я, $n = 10$	200	– // –	18,1 ± 1,1*

*Показано достоверное отличие от соответствующего контроля ($p < 0,05$).

Как видно из таблицы 3.12.1, уже однократное введение препарата АФП подавляет реакцию отторжения кожного аллотрансплантата. Сравнение результатов исследования во второй и третьей группах позволяет предполагать дозовую зависимость этого эффекта.

При многократном введении препарата АФП отторжение кожного лоскута в подопытных группах также происходит достоверно позже, чем в контрольной. Следует отметить, что пролонгированное введение препарата АФП не приводит к значительному увеличению сроков отторжения кожного трансплантата по сравнению с его однократным введением. Причиной этого может быть тормозящее воздействие АФП исключительно на начальные стадии реакции отторжения.

Для изучения воздействия препарата АФП на пролиферацию стволовых кроветворных клеток проводили трансплантацию сингенного и аллогенного костного мозга у мышей линий СВА и С57Bl/6. Клетки костного мозга (ККМ) перед трансплантацией летально облученным мышам-реципиентам подвергали воздействию АФП в двух вариантах:

а) *in vitro:* клетки костного мозга мышей-доноров инкубировали с 500 мкг/мл препарата АФП в течение 1 ч при 37 °С перед трансплантацией;

б) *in vivo:* препарат АФП вводили внутрибрюшинно мышам-донорам в дозе 500 мкг/мышь за сутки до выделения костного мозга.

После обработки по схемам (а) и (б) ККМ трансплантировали летально облученным (850 рад) реципиентам сингенных линий, а также мышам (СВА × С57Bl/6) F1 (по 10 животных-реципиентов в основной и контрольной группах). Пролиферативную активность ККМ оценивали через 5 сут. по включению Н3-тимидина.

Контрольное исследование проводилось на клетках костного мозга, обработанных физиологическим раствором в аналогичном с опытом режиме. Результаты исследования представлены в таблице 3.12.2.

Таблица 3.12.2

Влияние препарата АФП на пролиферативную активность стволовых клеток костного мозга облученных мышей в сингенной ив полуаллогенной системах

Группа (донор/реципиент)	Доза АФП	Условия обработки ККМ	Пролиферативная активность (% к контролю, $M \pm m$)
СВА / СВА ($n = 20$)	500 мкг/мл	*in vitro*	106,2 ± 2,3
С57Bl/6 / С57Bl/6 ($n = 20$)	500 мкг/мл	*in vitro*	102,5 ± 0,9
СВА / F1 ($n = 20$)	500 мкг/мл	*in vitro*	120,1 ± 2,3*
С57Bl/6 / F1 ($n = 20$)	500 мкг/мл	*in vitro*	123,4 ± 0,5*
СВА / СВА ($n = 20$)	500 мкг/мышь	*in vivo*	101,3 ± 1,4
С57Bl/6 / С57Bl/6 ($n = 20$)	500 мкг/мышь	*in vivo*	100,7 ± 3,2
СВА / F1 ($n = 20$)	500 мкг/мышь	*in vivo*	107,5 ± 1,8
С57Bl/6 / F1 ($n = 20$)	500 мкг/мышь	*in vivo*	109,3 ± 2,0*

*Показано достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$).

Как видно из таблицы 3.12.2, препарат АФП незначительно повышает пролиферативную активность стволовых кроветворных клеток костного мозга в случае сингенных реципиентов.

При трансплантации в полуаллогенной системе обработка костного мозга препаратом АФП заметно снижала аллогенное ингибирование пролиферации стволовых кроветворных клеток, имевшее место в контроле ($p < 0,05$).

В результате проведенных экспериментов показано:

1. Препарат АФП тормозит отторжение аллогенного кожного трансплантата у мышей.

2. Препарат АФП снижает аллогенное ингибирование пролиферации стволовых кроветворных клеток в организме летально облученного реципиента, не влияя на данный показатель в сингенной системе.

Наши данные позволяют сделать вывод о перспективности дальнейших исследований препарата АФП в качестве специфического иммуномодулирующего агента, используемого для снижения реакции отторжения трансплантата при пересадках органов и тканей. Особое значение может иметь тот факт, что, оказывая достоверное воздействие на клеточный иммунитет в аллогенных системах, АФП не влияет на пролиферацию клеток костного мозга в сингенной системе. Этот феномен выгодно отличает данный препарат от синтетических иммунодепрессантов и может быть объяснен особой биологической ролью АФП.

3.13. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА АФП В ОПЫТАХ *IN VITRO*

3.13.1. Исследование влияния АФП на жизнеспособность опухолевых клеток

Мембранотоксическое действие АФП исследовали с использованием предварительно меченных С14-уридином клеток мастоцитомы линии Р-815 в присутствии РНК-азы (клетки поддерживали в асцитной форме у мышей DBA/2).

Метод основан на том, что фермент РНК-аза проникает в клетку через поврежденные участки плазматической мембраны и расщепляет предварительно меченную внутриклеточную РНК на короткие нуклеотидные последовательности, которые при отмывании клеток выходят с раствором. Таким образом, по остаточному изотопу можно оценить мембранотоксическое действие препарата. Включение радиоизотопной метки определяли на β-счетчике (Mark-3, Tracor Analytic).

Инкубацию клеток (40 000 на лунку) с изотопом С14-уридин (0,5 мкKu/лунку) проводили в 96 луночных планшетах при 37 °С в течение 24 ч. В качестве контроля служили клетки линии Р-815, меченные С14-уридином и инкубированные в аналогичных условиях в бессывороточной среде. В опытном исследовании клетки линии Р-815, меченные С14-уридином, инкубировали в присутствии АФП в разведении 1 : 2, начиная с 1,25 мг/мл (по АФП). Для сравнения к меченным С14-уридином клеткам мастоцитомы Р-815 добавляли белки сыворотки крови человека (Sigma, USA) в аналогичных с АФП дозах.

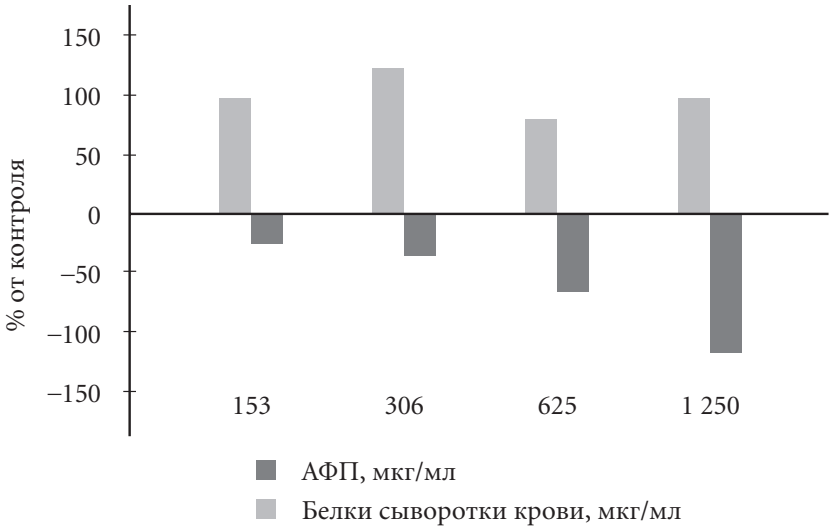


Рис. 3.13.1.1. **Влияние АФП на жизнеспособность клеток линии Р-815**
По оси абсцисс: разведение АФП и белков сыворотки крови, мкг/мл.
По оси ординат: жизнеспособность клеток в % от контроля (клетки без АФП и сывороточных белков).

Как следует из рис. 3.13.1.1, АФП в диапазоне концентраций от 153 до 1250 мкг/мл оказывает выраженное цитотоксическое воздействие на клетки мышиной мастоцитомы линии Р-815. Причем отчетливо прослеживается дозозависимый эффект. В то же время белки крови не оказывают никакого эффекта на жизнеспособность клеток линии Р-815.

С целью уточнения механизмов действия АФП на опухолевые клетки проведена серия экспериментов, направленных на изучение влияния АФП на синтез ДНК, РНК и белка в условиях *in vitro*.

3.13.2. Исследование влияния АФП на синтез ДНК, РНК и белка в опухолевых клетках

Влияние АФП на синтез ДНК, РНК и белка изучали на клетках эритромиелолейкоза человека К-562 и определяли радиоизотопным методом, по включению в клетки-мишени Н3-тимидина, Н3- или С14-уридина и С14-лейцина соответственно. Дополнительно, в целях усиления анаболических процессов, к культуральной среде RPMI-1640 добавляли 10%-ную эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС). Это не касалось контрольного эксперимента, где клетки линии К-562 находились в бессывороточной среде.

В эксперименте к клеткам эритромиелолейкоза К-562 помимо ЭТС добавляли АФП с разведением 1 : 2, начиная с 1250 мкг/мл, либо белки сыворотки крови человека (Sigma) в дозах, аналогичных дозам АФП по количественному содержанию белка.

Инкубацию клеток (40 000 на лунку) проводили в 96 луночных планшетах при 37 °С в течение 24 ч. Включение радиоизотопной метки определяли на β-счетчике (Mark-3, Tracor Analytic).

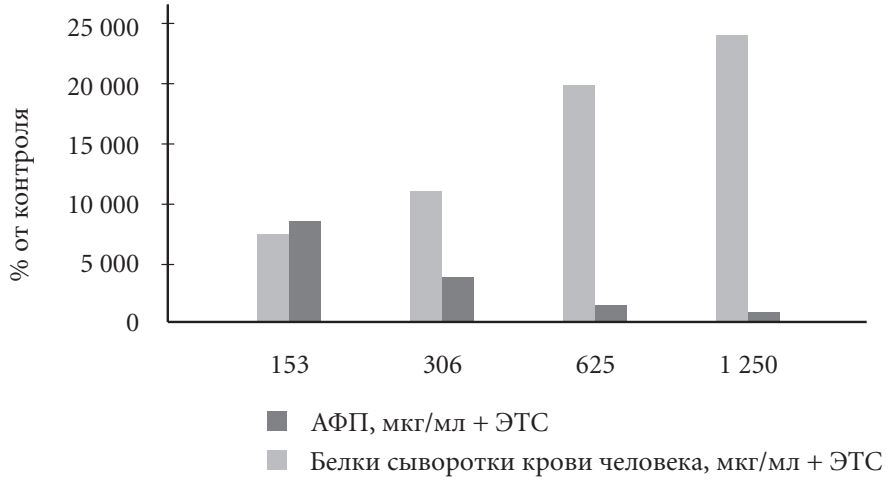


Рис 3.13.2.1. **Влияние АФП на синтез ДНК в клетках линии К-562.**
По оси абсцисс: *разведение АФП и белков сыворотки крови человека, мкг/мл.*
По оси ординат: *включение Н3-тимидина в клетки линии К-562 относительно контроля (клетки в бессывороточной среде), в %.*

Из рисунка 3.13.2.1 следует, что на фоне стимулирующего влияния ЭТС белки сыворотки крови значительно увеличивали синтез ДНК в клетках К-562. АФП, напротив, значительно подавлял этот процесс. Так же как и в предыдущих исследованиях по изучению мембранотоксичности, очевиден дозозависимый эффект АФП. Однако в концентрации 153 мкг/мл АФП не влиял на синтез ДНК.

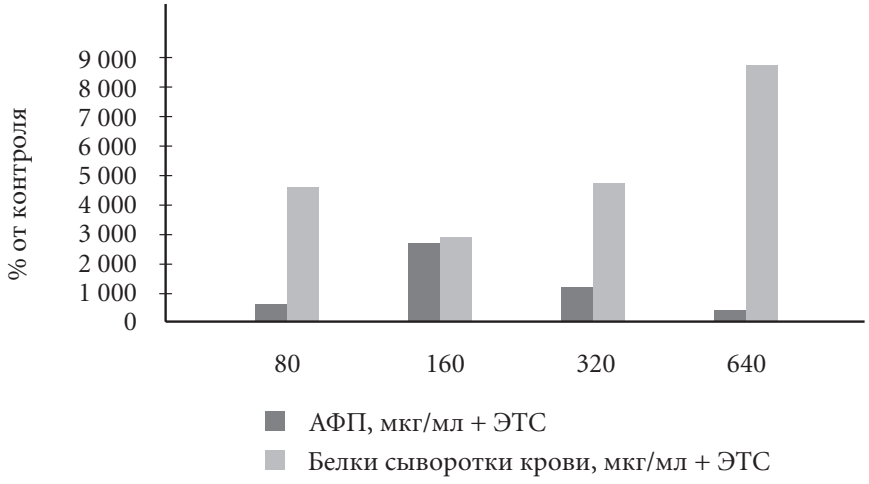


Рис. 3.13.2.2. **Влияние АФП на синтез РНК в клетках эритромиелолейкоза человека К-562**

По оси абсцисс: *разведение АФП и белков сыворотки крови человека, мкг/мл.*
По оси ординат: *включение Н3-уридина в клетки линии К-562 относительно контроля (клетки в бессывороточной среде), в %.*

Из приведенных на рисунке 3.13.2.2 данных следует, что на фоне стимулирующего влияния ЭТС белки сыворотки крови значительно увеличивали синтез РНК в клетках К-562. АФП, напротив, подавлял этот процесс. Однако в пробах, где концентрация АФП составила 160 мкг/мл, не отмечено выраженного ингибирования синтеза РНК.

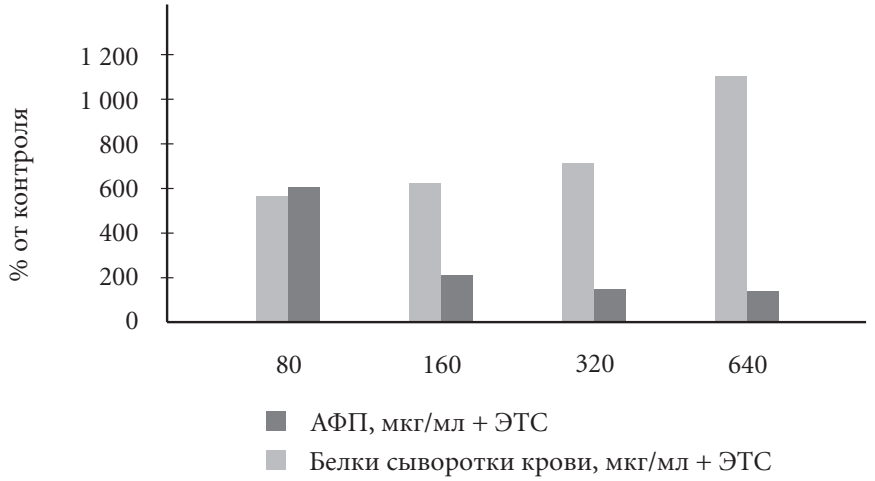


Рис. 3.13.2.3. **Влияние АФП на синтез белка в клетках эритромиелолейкоза человека К-562.**

По оси абсцисс: *разведение АФП и белков сыворотки крови человека, мкг/мл.*

По оси ординат: *включение С14-лейцина в клетки линии К-562 относительно контроля (клетки в бессывороточной среде), в %.*

Из приведенных на рисунке 3.13.2.3 данных следует, что АФП в концентрациях 160, 320, 640 мкг/мл существенно снижает уровень синтеза белка в клетках эритромиелолейкоза человека (К-562). При использовании концентрации АФП 80 мкг/мл подобного эффекта не наблюдается. Однако и в данном эксперименте сохраняется тенденция дозозависимости.

3.13.3. Изучение скорости синтеза РНК в клетках эритромиелолейкоза человека К-562 и мастоцитомы мышей Р-815 при воздействии различных доз АФП человека

В целях уточнения антипролиферативного эффекта АФП человека на опухолевые клетки в системе *in vitro* нами были поставлены дополнительные эксперименты. Это обусловлено тем, что в предыдущих исследованиях в культуры клеток добавляли, помимо АФП, стимулятор роста – 10%-ный раствор ЭТС, а в качестве эксперимента сравнения использовали клетки К-562, активированные белками сыворотки крови человека.

В данном эксперименте мы попытались исключить факторы, влияющие на объективность конечного результата. Влияние АФП человека на синтез РНК проводили на двух линиях опухолевых клеток: К-562 (клетки поддерживали в культуре на среде RPMI-1640 без ЭТС) и Р-815 (клетки поддерживали в асцитной форме у мышей линии DBA/2). Синтез РНК определяли радиоизотопным методом, по включению в клетки-мишени С14-уриди-

на. Инкубацию клеток (40 000 на лунку) с меткой (0,1 мкKu/лунку) проводили в 96 луночных планшетах при 37 °С в течение 24 ч в бессывороточной среде. Включение радиоизотопной метки в клетки определяли на β-счетчике (Mark-3, Tracor Analytic). Изменение скорости синтеза РНК при действии АФП выражали в процентах по отношению к скорости синтеза РНК в клетках без присутствия АФП.

Таблица 3.13.3.1

Изменение скорости синтеза РНК в клетках эритромиелолейкоза человека К-562 и мастоцитомы мышей Р-815 под влиянием АФП

АФП, мкг/мл	К-562		Р-815	
	Метка, cpm**	Активность, %	Метка, cpm**	Активность, %
Без АФП	14 881	100	24 309	100
165	2 880	19*	5 738	25*
82	6 733	45*	13 984	56*
41	13 982	94	5 834	23*
21	14 245	96	20 994	86*
10	15 045	101	23 674	97
5	15 945	107	25 033	103

*Показано достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$).
**Cpm (count per minute) – число импульсов в минуту.

Как видно из таблицы 3.13.3.1, присутствие АФП в культурах опухолевых клеток значительно влияет на синтез РНК. Так, АФП в дозах 82 и 165 мкг/мл достоверно задерживает синтез РНК в клетках эритромиелолейкоза на 81 и 55% соответственно. В клетках мастоцитомы мышей достоверное снижение синтеза РНК зарегистрировано при наличии в клеточной культуре АФП в концентрациях 21, 41, 82 и 165 мкг/мл.

Таким образом, нами показано, что АФП обладает способностью значительно снижать функциональную активность опухолевых клеток в культуре. Зафиксировано непосредственное цитостатическое действие АФП. При выяснении молекулярных механизмов эффекта оказалось, что АФП снижает синтез ДНК, РНК и белка в культурах клеток мастоцитомы и эритромиелолейкоза человека. Действие АФП проявлялось как при количественном, так и при кинетическом методе оценки синтетической функции клеток.

3.14. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА АФП *IN VIVO*

3.14.1. Влияние АФП на рост и метастазирование саркомы Плисса у крыс

Эксперименты выполнены на 52 крысах-самцах популяции Wistar с исходной массой 150–200 г. При исследовании противоопухолевого действия АФП на модели саркомы Плисса у крыс выделено 6 групп животных с опухолями: 4 опытные группы (первая –

четвертая) получали АФП; одна группа (пятая) – известный цитостатик циклофосфан (ЦФ); животные контрольной группы (шестая) препаратов не получали (табл. 3.14.1.1).

Прививка опухоли производилась путем введения крысе 0,1 мл 20%-ной (в среде 199) взвеси клеток саркомы Плисса подкожно в бок. Эксперимент длился 25 сут., после чего оставшихся в живых крыс выводили из эксперимента под эфирным наркозом. Всем животным, включенным в эксперимент, проводили полную ревизию внутренних органов с целью выявить метастазы. Развившееся на месте прививки опухолевое новообразование иссекали, определяли линейные размеры и массу. Образцы ткани опухоли и метастазов подвергали гистологическому исследованию.

Результаты оценивались по степени торможения роста опухоли, частоте метастазирования и показателю выживаемости на момент контрольного срока эксперимента.

Степень торможения роста опухоли рассчитывали по формуле:

$$[(\mathbf{M}_{\text{контр.}} - \mathbf{M}_{\text{сред.}}) / \mathbf{M}_{\text{контр.}}] \times \mathbf{100\%},$$

где $\mathbf{M}_{\text{сред.}}$ – среднее значение массы опухоли у животных данной группы,
$\mathbf{M}_{\text{контр.}}$ – среднее значение массы опухоли в группе контрольных животных.
Частоту метастазирования в % рассчитывали по формуле:

$$(\mathbf{K}_{\text{мет.}} / \mathbf{K}_{\text{общ.}}) \times \mathbf{100\%},$$

где $\mathbf{K}_{\text{мет.}}$ – количество крыс с достоверно выявленными метастазами,
$\mathbf{K}_{\text{общ.}}$ – общее количество крыс в данной группе.
Показатель выживаемости определяли в % согласно формуле:

$$(\mathbf{K}_{\text{выж.}} / \mathbf{K}_{\text{общ.}}) \times \mathbf{100\%},$$

где $\mathbf{K}_{\text{выж.}}$ – количество крыс, доживших до конца эксперимента,
$\mathbf{K}_{\text{общ.}}$ – общее количество животных в данной группе.

Таблица 3.14.1.1

Влияние АФП и ЦФ на выживаемость крыс Wistar с перевиваемой саркомой Плисса

Группа	Препарат	Доза, мкг/кг	Путь введения	Время введения	Отношение выживших животных к общему числу
1-я	АФП	4	Внутрибрюшинно	За 7 сут. до перевивки, ежедневно	8 / 8
2-я	АФП	4	Подкожно	Совместно с перевивкой опухоли, 1 раз	4 / 6
3-я	АФП	4	Внутрибрюшинно	Через 1 сут. после перевивки, ежедневно	5 / 6
4-я	АФП	4	Внутрибрюшинно	Через 2 сут. после перевивки, ежедневно	7 / 10
5-я	ЦФ	100	Внутримышечно	Через 1 сут. после перевивки, ежедневно	0 / 10
6-я	–	–	–	–	0 / 12

Данные, представленные в таблице 3.14.1.1, свидетельствуют о том, что АФП обеспечивает высокий уровень выживаемости во всех группах, где он применялся: в первой группе до конца эксперимента дожили все животные, во второй группе – 67%, в третьей – 83%, в четвертой – 70% животных. В пятой (ЦФ) и шестой (контрольные животные) группах к концу эксперимента погибли все животные.

Таблица 3.14.1.2

Влияние АФП на рост и метастазирование перевиваемой саркомы Плисса у крыс

Показатель	Группа					
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я
Общее кол-во животных / с привившейся опухолью	8 / 1	6 / 2	6 / 6	10 / 10	10 / 10	12 / 12
Масса опухоли, г ($M \pm m$)	26,03*	31,64*	14,0 ± 3,51*	21,1 ± 3,19*	49,24 ± 3,5*	70,33 ± 4,03
Торможение роста опухоли, %	63	45	80	70	30	–
Частота метастазирования, %	–	33	25*	45	30	48
Суммарная масса л/у**, пораженных метастазами, мг ($M \pm m$)	–	104,1 ± 9,14	95,58 ± 9,38	93,5 ± 6,6	98,7 ± 8,9	87,1 ± 6,7

*Показаны достоверные отличия от контроля (шестая группа) при $p < 0,05$.

**Л/у – лимфатические узлы.

В таблице 3.14.1.2 отчетливо прослеживается сдерживающее влияние АФП на рост опухоли. Введение препарата значительно замедляло рост опухоли у подопытных животных, причем в группах с ежедневным введением препарата (первая, третья и четвертая) этот эффект проявлялся ярче (рост опухоли подавлен на 63, 80 и 70% соответственно), чем в группе с однократным введением (во второй группе – на 45%). Подавление опухолевого роста ЦФ (пятая группа) значительно менее эффективно (на 30%).

Введение АФП животным-опухоленосителям не оказывало значимого влияния на возникновение метастазов: этот показатель был примерно одинаков у крыс во всех группах, кроме третьей. Обращает на себя внимание тот факт, что предваряющее пересадку опухоли введение АФП (первааяя группа) достоверно (в 90% случаев) предотвращало приживаемость саркомы Плисса у крыс (табл. 3.14.1.2).

Таким образом, сравнение результатов терапии АФП с результатами в группах животных, получавших ЦФ, показало, что АФП значительно эффективнее, чем ЦФ, подавляет рост и метастазирование саркомы Плисса у крыс.

Морфологическая характеристика образцов ткани, взятой с места пересадки опухоли. У крыс контрольной (шестой) группы наблюдалась характерная картина круглоклеточной саркоматозной опухоли. В отдельных случаях определялись небольшие зоны некроза, вокруг которых присутствовало некоторое количество макрофагов, лимфоцитов и плазматических клеток. По периферии редких очагов некроза просматривались плотно лежащие опухолевые клетки.

В опыте с циклофосфаном (пятая группа) при клинически регистрируемом торможении злокачественного роста у крыс, тем не менее, наблюдали саркоматозную опухоль с тенденцией прорастания в жировую клетчатку и мышечную ткань. Очагов некроза в изученных образцах не обнаружено. У всех животных, получавших ЦФ, при вскрытии обнаружен некроз кишечника.

Иная картина наблюдается у всех животных, получавших АФП: в срезах опухолевой ткани отмечаются обширные очаги некроза, в которых опухолевые клетки характеризуются выраженными дистрофическими изменениями. Зоны некроза, как правило, окружены и пронизаны обильно васкуляризированными соединительнотканными структурами. Отмечается тотальный или очаговый некроз с обильной инфильтрацией макрофагами, лимфоцитами, нейтрофилами, плазматическими клетками, тучными клетками, фибробластами и фиброцитами. Это может свидетельствовать о направленной стимуляции АФП преимущественно клеточных механизмов противоопухолевой резистентности.

3.14.2. Изучение противоопухолевой активности АФП человека на моделях аденокарциномы Эрлиха и карциномы легких Льюиса

Аденокарциному Эрлиха перевивали беспородным мышам обоего пола внутрибрюшинно (6–7 млн опухолевых клеток в 0,2 мл среды 199). АФП человека вводили внутрибрюшинно спустя 24 ч после трансплантации в течение 12 сут. в дозах 0,2 и 1,0 мг/кг. Контрольные животные получали инъекции физиологического раствора.

Карциному легких Льюиса мышам обоего пола линии C57BI/16 перевивали внутримышечно (1 млн клеток в 0,1 мл ФР). АФП вводили внутримышечно через 72 ч после трансплантации в дозах 0,2 и 1 мг/кг в течение 17 сут. Контрольные животные получали инъекции ФР.

По окончании экспериментов определяли массу первичного опухолевого узла (карцинома легких Льюиса) и объем опухолевых клеток и асцитной жидкости (аденокарцинома Эрлиха). Торможение роста опухоли рассчитывали по формуле:

$$\frac{\text{масса (или объем) опухоли в контрольной группе} - \text{масса (или объем) опухоли в опытной группе}}{\text{масса (или объем) опухоли в контрольной группе}} \times 100\%.$$

В экспериментах с использованием карциномы легких Льюиса определяли частоту метастазирования опухоли (отношение числа животных с метастазами к общему числу животных в группе, в %); также подсчитывали среднее число метастазов в легких каждого животного-опухоленосителя. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием t-критерия Стьюдента.

Таблица 3.14.2.1

Влияние внутрибрюшинного введения АФП на развитие аденокарциномы Эрлиха у мышей

Показатель	Контроль (ФР)	АФП, 0,2 мг/кг	АФП, 1,0 мг/кг
Количество животных в группе	11	11	11
Объем асцита, мл ($M \pm m$)	6,45 ± 0,28	5,89 ± 0,52	4,57 ± 0,58*
Объем опухолевых клеток, мл ($M \pm m$)	2,96 ± 0,18	2,65 ± 0,25	2,06 ± 0,23*
Торможение роста опухоли, %	–	10	30

*Показана достоверность относительно контроля при $p < 0,01$.

Примечание. Оценку эффективности лечения производили на 17-е сут. после перевивки опухоли.

На основании полученных результатов (табл. 3.14.2.1) установлено, что при внутрибрюшинном введении АФП человека в дозе 1 мг/кг беспородным мышам с аденокарциномой Эрлиха удалось добиться достоверного ингибирования опухолевого роста по следующим критериям: объем асцита, объем опухолевых клеток и процент торможения опухолевого роста.

Таблица 3.14.2.2

Влияние внутримышечного введения АФП на развитие и метастазирование карциномы легких Льюиса у мышей C57BI/6

Показатель	Контроль (ФР)	АФП, 0,2 мг/кг	АФП, 1,0 мг/кг
Количество животных в группе	9	10	10
Масса опухоли, г ($M \pm m$)	4,96 ± 0,54	3,13 ± 0,46	3,12 ± 0,52
Торможение роста опухоли, %	–	20	21
Частота метастазирования, %	60	50	33*
Количество метастазов на 1 мышь ($M \pm m$)	2,70 ± 1,34	1,10 ± 0,41	0,33 ± 0,11*

*Показано достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Примечание. Оценку эффективности лечения производили на 17-е сутки после перевивки опухоли.

Из представленных в таблице 3.14.2.2 данных следует, что введение животным-опухоленосителям (карцинома легких Льюиса) АФП человека в дозе 1 мг/кг способствует снижению частоты метастазирования. Несмотря на позитивные тенденции по остальным критериям оценки, результат находится в пределах ошибки эксперимента.

3.15. ИССЛЕДОВАНИЕ РАДИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА

Радиопротекторные свойства АФП изучали на 30 белых беспородных мышах массой 22–24 г, облученных сублетальной дозой (4 Гр). Препарат АФП в дозе 1 мг/кг (в 0,3 мл ФР) вводили внутрибрюшинно на 6-е, 7-е и 8-е сут. после облучения. Контролем служили интактные животные, получавшие соответствующее количество ФР по аналогичной схеме.

В экспериментах учитывали биохимические, физиологические, гематологические показатели, а также массу органов и фагоцитарную активность перитонеальных МФ. Об иммунореактивности судили по изменению количества гемолитических антител в сыворотке животных, иммунизированных через 10 сут. после облучения. Физиологические показатели (мышечная сила) оценивали через 9 сут., биохимические показатели, массу органов и фагоцитарную активность МФ – через 10 сут. после облучения.

Эксперименты показали, что АФП (1 мг/кг) приводит к усилению фагоцитарной активности МФ облученных животных, увеличивая процент фагоцитирующих клеток (табл. 3.15.1). Введение АФП (1 мг/кг) облученным животным восстанавливало показатели гуморального иммунитета, сниженные облучением (табл. 3.15.2).

Биохимические исследования сыворотки крови показали, что после облучения мышей наблюдалось резкое снижение количества глюкозы, снижение общей антитрипсиновой активности (ОАТ) и повышение активности АЛТ, что свидетельствует о нарушениях функции печени, в углеводном обмене и системе ингибиторов протеаз (табл. 3.15.3). Введение АФП (1 мг/кг) приводило к повышению количества глюкозы и ОАТ, нормализуя эти показатели, но не влияя на активность АЛТ.

Из данных, представленных в таблице 3.15.4, видно, что после облучения наблюдается снижение массы селезенки и тимуса. АФП способствовал нормализации массы селезенки.

Гематологический анализ выявил, что облучение животных приводит к снижению количества гемоглобина, эритроцитов и лейкоцитов в крови, а введение АФП – к нейтрализации лейкопении (табл. 3.15.5).

В результате проведенных физиологических исследований было установлено, что облучение не вызывает существенных изменений массы тела, температуры с увеличением мышечной силы в опытной группе (табл. 3.15.6).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что введение АФП облученным животным в дозе 1 мг/кг приводит к усилению фагоцитарной активности МФ, восстановлению гуморального звена иммунореактивности, восстановлению углеводного обмена и системы ингибиторов протеаз, а также к увеличению массы селезенки и мышечной силы, т. е. является радиопротекторным веществом.

Таблица 3.15.1

Влияние АФП (1 мг/кг) на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов беспородных мышей, облученных в дозе 4 Гр

Группа	Показатели фагоцитоза	
	%**	ФИ***
Интактные, контроль ($n = 10$)	8,3 ± 1,1	1,4 ± 0,1
Облученные, контроль ($n = 10$)	12,9 ± 1,3	1,6 ± 0,06
Облученные + АФП ($n = 10$)	32,3 ± 5,9*	2,1 ± 0,09

*Достоверно к облученному контролю ($p < 0,05$).
**Процент фагоцитоза.
***ФИ – фагоцитарный индекс.

Таблица 3.15.2

Влияние АФП (1 мг/кг) на гуморальный иммунный ответ беспородных мышей, облученных в дозе 4 Гр

Группа	Гемолизы, светопоглощение × 100
Интактные, контроль ($n = 10$)	12 ± 0,6
Облученные, контроль ($n = 10$)	6 ± 0,6*
Облученные + АФП ($n = 10$)	10,1 ± 0,9**

*$p < 0,05$ относительно интактных животных.
**$p < 0,05$ относительно облученных животных.

Таблица 3.15.3

Влияние АФП на биохимические показатели крови беспородных мышей, облученных в дозе 4 Гр

Показатель	Интактные, контроль ($n = 10$)	Облученные, контроль ($n = 10$)	Облученные + АФП, 1 мг/кг ($n = 10$)
Глюкоза, мМ/л	3,87 ± 0,43	1,06 ± 0,27*	7,09 ± 0,88**
Белок, мг/мл	72 ± 5,4	69,4 ± 1,7	72,7 ± 2,8
Холестерин, мМ/л	2,58 ± 0,27	2,32 ± 0,34	2,07 ± 0,39
КРФ, мкг/мл	88 ± 32,1	125,8 ± 5,9	144,7 ± 26,7
Мочевина, мМ/л	22,2 ± 1,6	18,6 ± 2,5	15,4 ± 1,98*
АЛТ, Ед./л	16,5 ± 1,1	23,7 ± 2,7*	22,4 ± 5,1
ОАТ, мкМ/мл	304,4 ± 11,8	214 ± 11,7*	276,2 ± 19,7**

*Достоверно к интактному контролю ($p < 0,05$).
**Достоверно к облученному контролю ($p < 0,05$).

Таблица 3.15.4

Влияние АФП на массу органов у беспородных мышей, облученных в дозе 4 Гр

Орган	Интактные, контроль ($n = 10$)	Облученные, контроль ($n = 10$)	Облученные + АФП, 1 мг/кг ($n = 10$)
Относительная масса органов, весовые индексы			
Печень	510,16 ± 12,2	587,03 ± 39,5	581,22 ± 20,17
Селезенка	49,08 ± 4,03	32,1 ± 4,1*	46,94 ± 4,9**
Тимус	20,7 ± 1,3	12,19 ± 1,15*	15,23 ± 2,64
Надпочечник	1,01 ± 0,05	0,87 ± 0,08	0,74 ± 0,17

*Достоверно к интактному контролю ($p < 0,05$).

**Достоверно к облученному контролю ($p < 0,05$).

Таблица 3.15.5

Влияние АФП на показатели крови беспородных мышей, облученных в дозе 4 Гр

Показатели	Интактные, контроль ($n = 10$)	Облученные, контроль ($n = 10$)	Облученные + АФП, 1 мг/кг ($n = 10$)
Гемоглобин, г/л	183 ± 0,2	157 ± 0,37*	155,2 ± 0,3
Эритроциты × 10^{12}/л	6,2 ± 0,1	5,3 ± 0,17*	5,3 ± 0,1
Тромбоциты × 10^9/л	354,6 ± 18,9	340,0 ± 22,8	305,0 ± 24,5
Лейкоциты × 10^9/л	7,1 ± 0,2	5,8 ± 0,4*	8,59 ± 0,8**
Лейкоцитарная формула			
Эозинофилы	2,5 ± 0,6	2,6 ± 0,6	4,5 ± 0,7
Палочкоядерные НФ	0,5 ± 0,03	0,26 ± 0,02	0,3 ± 0,02
Сегментоядерные НФ	26,5 ± 1,6	26,3 ± 1	24,5 ± 1,6
Моноциты	5,8 ± 0,6	6,3 ± 1,1	7,3 ± 0,9
Лимфоциты	64,6 ± 1,5	63,8 ± 1,4	63,3 ± 0,9

*Достоверно к интактному контролю ($p < 0,05$).

**Достоверно к облученному контролю ($p < 0,05$).

Таблица 3.15.6

Влияние АФП на физиологические показатели беспородных мышей, облученных в дозе 4 Гр

Показатель	Интактные, контроль (n = 10)	Облученные, контроль (n = 10)	Облученные + АФП, 1 мг/кг (n = 10)
Температура, °С			
Исходно	36,7 ± 0,2	36,9 ± 0,1	36,5 ± 0,1
После 3 введений	36,7 ± 0,1	36,3 ± 0,3	36,7 ± 0,2
Масса, г			
Исходно	27,1 ± 0,5	24,6 ± 0,8	25,1 ± 0,7
После 3 введений	27,3 ± 0,7	25,8 ± 0,6	27,1 ± 0,8
Мышечная сила			
Время удержания на стержне, сек	10,1 ± 1,5	10,9 ± 3,6	15,8 ± 1,6*

*Достоверно к облученному контролю ($p < 0,05$).

* * *

Изучение биологических свойств препарата АФП, основой которого является белок альфа-фетопротеин, проведенное в условиях *in vitro* и *in vivo* на грызунах (мыши, крысы, морские свинки, кролики) и приматах, позволяет сделать вывод о безопасности препарата при его использовании в условиях физиологической нормы.

АФП (субстанция и готовая форма) обладает огромной широтой терапевтического индекса – 10 000, а в дозе 10 мг/кг (10 000-кратное превышение терапевтической дозы) не вызывает у животных при однократном введении каких-либо признаков интоксикации.

При подкожном однократном введении приматам препарата АФП в дозах 0,1 и 1 мг/кг (100- и 1000-кратное превышение терапевтической дозы) не удалось обнаружить изменений в периферической крови, в функции сердечно-сосудистой системы, печени, почек, щитовидной железы и коре надпочечников, а также в метаболизме минералов, углеводов, белков и липидов.

Трехмесячное ежедневное внутривенное введение кроликам АФП в готовой лекарственной форме в дозах 0,005 и 0,025 мг/кг (5- и 25-кратное превышение терапевтической дозы) также не выявило каких-либо патологических отклонений от нормы при общебиологических, гематологических, биохимических патоморфологических исследованиях. Гистологический анализ внутренних органов кроликов показал умеренную активацию внутри- и межорганной миграции лимфоцитов тимуса, эмиграцию лимфоидных клеток через центральные синусы брыжеечных лимфоузлов и ретикулоэндотелиальной системы печени. Установленные структурные признаки усиления функциональной активности иммунокомпетентных органов (тимус, лимфоузлы, ретикулоэндотелиальная система печени) являются, по-видимому, отражением специфической активности препарата АФП.

В проведенных исследованиях не выявлено аллергизирующих, мутагенных и потенциально канцерогенных свойств АФП. Установлено, что АФП в дозе 0,004 мг/кг способствует увеличению мышечной силы и выносливости мышей.

Таким образом, экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что препарат АФП является высокоочищенным, безопасным биологически активным соединением, не вызывающим у животных каких-либо токсических реакций при длительном введении и больших дозах.

В результате проведенных исследований влияния альфа-фетопротеина человеческого на опухолевый процесс на моделях злокачественных опухолей в условиях *in vitro* и *in vivo*, а также на течение лучевой болезни установлено следующее:

• АФП в диапазоне концентраций от 153 до 1250 мкг/мл оказывает выраженное цитотоксическое воздействие на клетки мышиной мастоцитомы Р-815;

• препятствует синтезу ДНК в клетках эритромиелолейкоза К-562 при концентрациях 625, 306 и 153 мкг/мл;

• препятствует синтезу РНК в клетках эритромиелолейкоза при концентрациях 640, 320 и 80 мкг/мл;

• снижает уровень синтеза белка в клетках эритромиелолейкоза К-562 при концентрациях 640, 320 и 160 мкг/мл;

• в дополнительных исследованиях при концентрациях 165 и 82 мкг/мл задерживает синтез РНК в клетках эритромиелолейкоза человека К-562, а при концентрациях 165, 82, 41, 21 мкг/кг – в клетках мастоцитомы мышей Р-815;

• в условиях *in vivo* на модели саркомы Плисса АФП в дозе 4 мкг/кг способствует выживаемости животных в диапазоне 67–83%, замедлению опухолевого роста от 45 до 80%, снижению прививаемости опухоли;

• в дозе 1 мг/кг на модели аденокарциномы Эрлиха достоверно уменьшает объем асцита и опухолевых клеток (30%-ное торможение опухолевого роста);

• в дозе 1 мг/кг на модели карциномы легких Льюиса в два раза снижает степень метастазирования опухоли;

• в дозе 1 мг/кг обладает выраженными радиозащитными свойствами.

Таким образом, нам удалось показать высокую эффективность препарата АФП в терапии раковых заболеваний и лучевой болезни в модельных экспериментах, что безусловно заслуживает самого пристального внимания клиницистов. Безопасность препарата, наряду с его иммуномодулирующей активностью, свидетельствует о перспективности использования АФП для лечения широкого спектра заболеваний, в патогенезе которых отмечаются нарушения иммунного статуса. Проведенные исследования заложили прочный фундамент для дальнейшего исследования терапевтической эффективности лекарственного препарата на основе человеческого АФП в условиях клинической практики.

ГЛАВА 4

Изучение эффективности препарата АФП в практике комплексного лечения внутренних болезней, хирургической и онкологической патологии

Результаты доклинических исследований препарата АФП позволили начать первую фазу клинических испытаний, которые были выполнены в соответствии с постановлением ФГК МЗ РФ № 3 от 27.02.1997 г. Исследования препарата в качестве иммуномодулирующего средства в составе комплексной терапии больных с иммунопатологическими состояниями различного генеза проводились по согласованному протоколу и программе клинических испытаний у взрослых.

В результате предварительных исследований установлено, что препарат АФП при внутривенном, внутримышечном и подкожном введении в дозах 1–6 мкг/кг не вызывает токсических, аллергических, анафилактогенных, гипертермических, гипо- и гипертонических состояний и иных побочных эффектов. Введение препарата АФП не сопровождается болевым синдромом, в местах инъекций не отмечено гиперемии и инфильтративных изменений, а также не выявлено раздражающего действия препарата на стенки сосудов и мягкие ткани.

Для проведения второй фазы клинических испытаний был выбран перечень заболеваний, протекающих с различными иммунологическими нарушениями, а именно:

1. Внутренние болезни:

1.1. Хронические специфические и неспецифические заболевания легких (туберкулез, бронхиальная астма, пневмокониозы).

1.2. Заболевания печени (хронические гепатиты, цирроз печени).

1.3. Заболевания желез внутренней секреции (болезнь Хашимото).

2. Хирургические болезни (неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, облитерирующие заболевания сосудов, ожоговая болезнь).

3. Онкологические заболевания.

По решению ФГК МЗ РФ испытания препарата АФП проведены в лечебных учреждениях, перечень которых представлен в таблице 4.1.

Таблица 4.1

Клинические испытания препарата АФП

Название учреждения	Заболевание
Пермская государственная медицинская академия (ПГМА), 7 кафедральных клиник*: медицинские санитарные части № 1, 2, 11; областная клиническая больница; областной противотуберкулезный диспансер; областной онкологический диспансер; городская клиническая больница № 21	Туберкулез легких, хронические неспецифические заболевания легких (ХНЗЛ), хронические гепатиты, цирроз печени, болезнь Хашимото, ожоговая болезнь, онкологические заболевания
Институт иммунологии МЗ РФ (г. Москва)	ХНЗЛ
Научный центр хирургии РАМН (г. Москва)	Хроническая сосудистая ишемия нижних конечностей
Городская клиническая больница скорой помощи (г. Челябинск)	Хроническая сосудистая ишемия нижних конечностей
Центр комплексной медицины RAM-TAL (Израиль, г. Иерусалим)	Неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, хронические гепатиты, цирроз печени, болезнь Хашимото
Городская клиническая больница № 40 (г. Екатеринбург)	Неспецифический язвенный колит
Областная клиническая больница (г. Курган)	Неспецифический язвенный колит

*Иммунологические исследования выполнены на базе клинико-диагностической лаборатории ЗАО «Санаторий-профилакторий «Пермские моторы» (г. Пермь).

Из приведенных в таблице данных следует, что изучение препарата АФП в рамках второй фазы клинических испытаний по основным видам патологии, за исключением ожоговой травмы, сопоставимо и проведено не менее чем в двух независимых клинических учреждениях.

В соответствии с Поручением клинической базе № 211-15-1381 от 04.06.1998 г. ФГК МЗ РФ рекомендовал провести клинические испытания препарата АФП в каждом учреждении не менее чем на 20 пациентах. Общее количество пациентов, принявших участие в клинических испытаниях препарата АФП, составило 428 человек.

Все исследования выполнены в соответствии с Хельсинкской декларацией по протоколу двойного слепого контроля с использованием рандомизации и плацебо-контроля. Для проведения клинических испытаний на Омском государственном предприятии по производству бакпрепаратов было выпущено необходимое количество препарата АФП в ампулах, содержащих 75 мкг действующего вещества и 5 мг наполнителя – реополиглюкина. В качестве препарата «Плацебо» были произведены ампулы без действующего вещества (АФП), содержащие 5 мг реополиглюкина. Ампулы АФП и «Плацебо» в ходе клинических испытаний были маркированы идентификационными номерами пациентов. Всем пациентам, включенным в исследование, до начала лечения была представлена письменная информация о препарате и получено письменное согласие на добровольное участие в клинических испытаниях.

Иммунологическое обследование включало определение числа Т-лимфоцитов и их субпопуляций методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (Е-РОК), определение числа В-лимфоцитов (М-РОК) методом розеткообразования с эритроцитами мыши, а также определение количества 0-лимфоцитов. С помощью моноклональных антител оценивали содержание $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD11^+$, $CD16^+$, $CD72^+$, $CD95^+$, HLA-DR-клеток [28, 29, 232], а уровни IgE, IL-1β и IL-4 определяли иммуноферментным методом [235]. Количественное определение сывороточных иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgM) проводилось методом радиальной диффузии по G. Mancini; фагоцитарная активность лейкоцитов периферической крови оценивалась по методу Д. В. Белокрицкого в модификации В. Н. Каплина; для оценки бактерицидной активности применяли тест с восстановлением нитросинего тетразолия (НСТ-тест) в модификации С. М. Гордиенко [235].

Статистический анализ результатов клинических испытаний проведен с использованием специализированных программ Statistica for Windows и Excel. При сравнении результатов исследований использовали *t*-критерий Стьюдента, результаты считались достоверными при $p < 0{,}05$ [77].

4.1. ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТА АФП В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКИХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛЕГКИХ

Клинические испытания препарата АФП у больных хроническими неспецифическими заболеваниями легких (ХНЗЛ) были мотивированы тем, что при данной патологии нарушения функционирования иммунной системы являются неотъемлемой составляющей их патогенеза. Согласно классификации ВОЗ (1975 г.), в группу ХНЗЛ как самостоятельные нозологические единицы входят пневмокониоз, хронический обструктивный бронхит и бронхиальная астма (БА). Безопасность и эффективность препарата АФП была изучена в клиниках ГНЦ Института иммунологии МЗ РФ и ПГМА у больных с пневмокониозами и БА.

Как следует из таблицы 4.1.1, всего за период клинических испытаний препарата АФП обследовано 98 больных ХНЗЛ, из них 40 – в первой фазе и 58 – во второй фазе испытаний. Однако 7 больных БА и 10 больных хроническим обструктивным бронхитом были пролечены препаратом АФП с отступлением от Протокола (отсутствие рандомизации и плацебо-контроля). Это явилось основанием для исключения указанных пациентов из статистической обработки. Таким образом, общее количество пациентов, результаты лечения которых были подвергнуты статистическому анализу, составило 81 человек. Группы сравнения распределялись по нозологическим единицам.

Таблица 4.1.1

Распределение пациентов с хроническими неспецифическими заболеваниями легких по нозологическим единицам

Нозологическая единица	Первая фаза клинических испытаний		Вторая фаза клинических испытаний	
	Группа АФП	Группа плацебо	Группа АФП	Группа плацебо
Бронхиальная астма	10	10	18 (11 / 7*)	10
Пневмокониозы	10	10	10	10
Хронический бронхит	–	–	10	–
Всего больных	20	20	38 (21 / 17*)	20

*Без рандомизации и контроля с использованием препарата «Плацебо».

4.1.1. Применение препарата АФП в комплексном лечении бронхиальной астмы

F. Rackemann [260] предложил классификацию БА по основным клиническим проявлениям. Согласно этой классификации выделяют две формы БА: внешнюю (*extrinsic*), при которой есть очевидный внешний, провоцирующий удушье фактор, и внутреннюю (*intrinsic*), при которой такого фактора нет. Это деление положено и в основу рубрификации заболевания в Международной классификации болезней и причин смерти от 1975 г. с добавлением «неуточненной астмы». В России при определении БА наиболее часто используются понятия «экзогенная» и «эндогенная».

Поскольку современная концепция терапии БА подразумевает использование препаратов, влияющих на аллергический воспалительный процесс за счет иммуносупрессивного действия, то в свете этого представляется перспективным включение в схему комплексной терапии БА препаратов, обладающих иммуномодулирующим эффектом. Так, в частности, известные иммуносупрессорные свойства АФП, являющегося базисной основой препарата, позволяли надеяться на эффект от применения его в качестве патогенетического средства в комплексной терапии у больных БА.

В соответствии с решением Фармакологического государственного комитета Министерства здравоохранения РФ от 29 января 1998 г. (протокол заседания № 1) базой для проведения второй фазы клинических испытаний препарата АФП в комплексной терапии БА были утверждены кафедра терапии № 2 ПГМА (г. Пермь) и клиника ГНЦ Института иммунологии МЗ РФ (г. Москва).

Среди пациентов БА, включенных в клинические испытания препарата АФП, экзогенная форма заболевания наблюдалась у 48,7% больных, эндогенная – у 39,0% и неуточненная – у 12,3%.

В соответствии с рандомизацией больные были разделены на 2 группы, в которых половая принадлежность, возраст и продолжительность заболевания были близкими (табл. 4.1.1.1). Обследован 41 больной БА средней тяжести (19 мужчин и 22 женщины) в возрасте от 34 до 60 лет. Распределение по диагнозу было следующим:

• экзогенная БА – 20 больных (АФП – 12, препарат «Плацебо» – 8);

• эндогенная БА – 16 больных (АФП – 8, «Плацебо» – 8);

• неуточненная БА – 5 больных (АФП – 3, «Плацебо» – 2).

Фаза обострения имела место у 13 больных (АФП – 7, «Плацебо» – 6), фаза неполной ремиссии – у 3 (АФП – 1, «Плацебо» – 2).

В первой группе (АФП) и во второй (плацебо) курс лечения составил 30 сут. с однократным внутривенным введением препаратов АФП и «Плацебо» соответственно. АФП применяли в суточной дозе 1 мкг/кг массы.

Результаты исследований сопоставляли с показателями группы здоровых (n = 25), средний возраст которых составил 41,92 ± 2,36 лет, из них женщин – 44%, мужчин – 56%.

Таблица 4.1.1.1

Половая принадлежность пациентов, их возраст и продолжительность заболевания бронхиальной астмой

Показатель		Группа АФП (n = 21)	Группа плацебо (n = 20)
Пол	М	10	9
	Ж	11	11
Возраст	30–39	6	7
	40–49	11	9
	50 и старше	4	4
Продолжительность заболевания (годы)	1–4	14	13
	5–9	5	6
	10 и больше	2	1

Субъективная симптоматика отмечена у всех больных и включала наличие пароксизмов диспноэ чаще двух раз в неделю и еженедельных ночных симптомов у 30 пациентов. Одышка при физической нагрузке отмечена у 26 пациентов. Больные предъявляли жалобы на кашель (сухой у 25 больных, со слизистой мокротой – у 24, со слизисто-гнойной мокротой – у 21 больного). Заложенность носа отмечена у 28 пациентов, слизистые выделения из носовых ходов – у 26, приступы чихания – у 23. Зуд кожных покровов имел место у 12 больных, в одном случае он сопровождался уртикарными высыпаниями. Продолжительность заболевания составляла от 1 года до 18 лет.

При проведении объективного исследования у 22 больных выявлено жесткое дыхание, у 19 – сухие свистящие хрипы при обычном или форсированном дыхании. Со стороны других органов и систем при физикальном обследовании существенных изменений отмечено не было.

Особенности клиники заболевания в группах пациентов, обследованных до лечения, отражены в таблице 4.1.1.2.

Таблица 4.1.1.2

Симптоматика заболевания в группах обследованных пациентов с бронхиальной астмой

Симптом	Группа АФП (*n* = 21)	Группа плацебо (*n* = 20)
Пароксизмы диспноэ	15	15
Одышка при нагрузке	12	14
Кашель сухой	13	12
Кашель со слизистой мокротой	11	13
Кашель со слизисто-гнойной мокротой	11	10
Заложенность носа	13	15
Слизистые выделения из носовых ходов	14	12
Приступы чихания	11	12
Зуд кожных покровов	8	4
Жесткое дыхание	9	13
Сухие хрипы	8	8

Структура сопутствующих аллергических заболеваний в обеих группах до лечения была близкой (табл. 4.1.1.3).

Таблица 4.1.1.3

Структура сопутствующих аллергических заболеваний у пациентов с бронхиальной астмой

Заболевание	Группа АФП (*n* = 21)	Группа плацебо (*n* = 20)
Аллергический ринит	3	3
Аллергический конъюнктивит	4	3
Поллиноз	3	4
Риносинусопатия	3	4
Нейродермит	0	1
Дерматит	0	1
Лекарственная аллергия	3	2
Бытовая аллергия	8	9
Пищевая аллергия	3	1
Эозинофильный инфильтрат легких	0	1

Методы исследования включали оценку жалоб больных, анамнеза заболевания и объективного статуса. Для количественной характеристики тяжести приступов ис-

пользована их балльная оценка. При этом учитывали продолжительность и способ купирования приступа. Величина оценки колебалась от 1 до 10 баллов.

Комплекс параклинических исследований включал в себя анализ крови (общеклинический и биохимический), анализ мочи, иммунологическое исследование, спирографическое исследование, электрокардиографию, рентгенологическое исследование органов грудной клетки [113, 118, 140, 166, 248]. Обследование проводили до и после курса лечения. Балльная оценка приступов осуществлялась ежедневно. Введение АФП или «Плацебо» проводили на фоне базисной противовоспалительной терапии и ситуационных бета-адреномиметиков [166, 260].

При анализе клинической картины заболевания и параклинических данных до начала медикаментозного вмешательства принципиально существенных различий между группами обследованных не установлено (табл. 4.1.1.1, 4.1.1.2, 4.1.1.4, 4.1.1.5).

Однако следует отметить, что при сравнении иммунологических показателей пациентов группы АФП и группы плацебо с данными здоровых доноров выявлена картина выраженного вторичного иммунодефицитного состояния – ВИДС (табл. 4.1.1.4). Общие проявления нарушений в обеих группах – умеренная относительная и абсолютная эозинофилия, что весьма характерно для данной патологии. Для Т-клеточного звена иммунитета показано снижение содержания Т-лимфоцитов (Е-РОК, $CD3^+$), снижение абсолютного и относительного числа Th ($CD4^+$), а также уменьшение количества термостабильных (лимфоциты, способные к CD2–CD58-взаимодействию) и ранних (активных) Е-РОК. Более того, выявлено достоверное снижение как абсолютного, так и относительного содержания HLA-DR-позитивных клеток (MHC-II), характеризующих антигенпрезентирующие клетки и активированные Т-лимфоциты. Установлено также уменьшение относительного количества NK-клеток ($CD16^+$, $D11^+$) и достоверное повышение количества «нулевых», низкодифференцированных Т-клеток за счет снижения количества Т-лимфоцитов. В отношении В-клеточного звена установлено снижение абсолютного количества В-лимфоцитов ($CD72^+$), которое не влияло на количество незрелых и В1-клеток (М-РОК). Уровень IgM был достоверно ниже, чем в группе здоровых доноров; по отношению к IgA можно говорить лишь о видимой тенденции к понижению. Для групп АФП и плацебо был характерен высокий уровень IgE, что свойственно для БА, а также повышенные в сравнении с нормой уровни IL-1β и IL-4 (табл. 4.1.1.4). Таким образом, для пациентов с БА характерен вторичный комбинированный иммунодефицит, затрагивающий главным образом Т- и В-звенья иммунитета и, в меньшей степени, фагоцитарную активность клеток.

Существенных различий между вышеперечисленными показателями иммунной системы в группах АФП и плацебо нами не выявлено, за исключением повышения процента эозинофилов в группе плацебо и увеличения концентрации С-реактивного белка (СРБ) в группе АФП (табл. 4.1.1.4.).

В процессе динамического наблюдения за больными группы АФП наиболее значимым проявлением изменения состояния больных стало уменьшение тяжести приступов, о чем свидетельствует более низкий балл оценки приступа (табл. 4.1.1.6), в то время как в группе плацебо отмечено нарастание тяжести приступов.

Группа АФП:

• Тяжесть приступов: показана стойкая тенденция к уменьшению количества баллов за сутки, динамики не было лишь в одном случае ($p < 0{,}05$).

• Общий анализ крови (ОАК): отмечена тенденция к снижению содержания гемогло-

бина, эритроцитов, палочкоядерных нейтрофилов, уменьшение количества эозинофилов ($p < 0,05$).

• Установлена тенденция к увеличению содержания общего белка без достоверных различий в содержании белковых фракций.

• Дыхательные показатели: произошло достоверное увеличение как утренних, так и вечерних показателей пиковой скорости выхода (ПСВ): ФЖЕЛ, $ОФВ_1$, $ОФВ_1$ / ЖЕЛ, МОС ($p < 0,05$).

• Отмечена стойкая тенденция к уменьшению суточного разброса ПСВ.

Группа плацебо:

• Произошло достоверное увеличение количества баллов, характеризующих тяжесть приступов, по сравнению с группой АФП ($p < 0,05$).

• Показано повышение уровня глюкозы, но снижение содержания как общего белка, так и γ-глобулинов в сыворотке крови ($p < 0,05$).

• В отношении дыхательных показателей отмечена тенденция к увеличению ФЖЕЛ. Суточный разброс ПСВ практически не изменился, но заметна тенденция к уменьшению утренних показателей.

Сравнение иммунологических показателей в группе АФП до и после лечения показало достоверное повышение относительного и абсолютного количества моноцитов в лейкоцитарной формуле периферической крови (табл. 4.1.1.12). Применение АФП не затронуло соотношения основных субпопуляций лимфоцитов, однако позволило достоверно снизить относительное и абсолютное содержание клеток, несущих маркеры $CD11^+$ и $CD95^+$. В отношении иммуноглобулинов показано достоверное снижение уровня IgA, но не IgG и IgM. После лечения отмечено значительное уменьшение концентрации противоспалительного цитокина IL-1β (рис. 4.1.1.1). Важно отметить, что после лечения АФП концентрация IL-4 снижается в 4 раза, достигая нормального уровня (рис. 4.1.1.2), и почти в 2 раза уменьшается количество общего IgE (рис. 4.1.1.3). Под влиянием лечения с использованием препарата АФП в крови больных исчезает С-реактивный белок, маркер воспаления, и достоверно повышается бактерицидный потенциал фагоцитирующих клеток – НСТ-тест (табл. 4.1.1.12).

При сравнении показателей иммунного статуса группы АФП после лечения и объединенной группы до лечения выявлены следующие закономерности: достоверное повышение процента моноцитов, повышение до нормального уровня количества NK-клеток ($CD16^+$), уменьшение количества клеток с маркером апоптоза ($CD95^+$), понижение концентрации общего IgE почти в 2 раза, а концентрации IL-1β и IL-4 – до нормального значения (табл. 4.1.1.9).

Необходимо отметить, что при сохранении картины ВИДС после проведенного лечения часть показателей все же нормализовались (табл. 4.1.1.9). В частности, в группе АФП картина, характерная для иммунодефицита, была представлена сниженным уровнем Т-лимфоцитов (Е-РОК тотальные), Т-активин чувствительных лимфоцитов и CD4-позитивных клеток. Также отмечен более низкий в сравнении с нормой уровень В-лимфоцитов ($CD72^+$), NK-клеток ($CD11^+$), клеток с маркером апоптоза ($CD95^+$) и HLA-DR-позитивных клеток. Сохраняется довольно высокий уровень общего IgE, но в целом картина значительно лучше, чем в группе плацебо.

Таким образом, полученные результаты позволяют говорить о позитивном патогенетическом влиянии препарата АФП на течение бронхиальной астмы.

В группе пациентов, получавших «Плацебо», отмечено повышение абсолютного и отно-

сительного количества HLA-DR-позитивных клеток, характеризующих антигенпрезентирующие клетки и активированные Т-лимфоциты. Показаны негативные изменения иммунного статуса, такие как снижение концентрации IgM и депрессия стимулированной окислительной активности фагоцитов в НСТ-тесте (табл. 4.1.1.11). Нами также отмечено достоверное снижение количества Т-активин чувствительных (0,5 мг/мл) лимфоцитов. Важно отметить, что в группе плацебо за период лечения происходило достоверное увеличение концентрации IL-4 (табл. 4.1.1.11), являющегося одним из факторов, способствующих развитию аутоиммунных реакций, протекающих по гуморальному типу. Аналогичную картину мы наблюдали, сравнивая показатели иммунитета в группе плацебо после лечения с исходным статусом больных БА, объединенных в общую группу (табл. 4.1.1.10). Перечисленные изменения мы расцениваем как продолжение развития патогенетических реакций при бронхиальной астме.

Таким образом, в группе плацебо картина, характерная для ВИДС, представлена сниженным уровнем Т-лимфоцитов (Е-РОК тотальные, $CD3^+$), В1-лимфоцитов (М-РОК), $CD4^+$- и $CD8^+$-лимфоцитов, а также NK-клеток ($CD11^+$). Сохраняется низкий запрос на гормоны тимуса (Т-активин чувствительные лимфоциты). Показано низкое содержание IgM, но высокий уровень IgE, IL-4, IL-1β и СРБ. В данной группе проявляется высокая, относительно нормы, фагоцитарная активность клеток (табл. 4.1.1.10).

При сравнении групп АФП и плацебо после курса лечения (табл. 4.1.1.13) установлены достоверные отличия, заключающиеся в снижении концентрации цитокинов и общего IgE под влиянием препарата АФП в 3,5 и 2 раза соответственно (рис. 4.1.1.5 – 4.1.1.7). Более того, в группе АФП показано достоверное увеличение абсолютного количества Т-лимфоцитов ($CD3^+$) в сочетании с нормализацией уровня эозинофилов и СРБ.

На основании вышеизложенного мы считаем, что использование в комплексной терапии препарата АФП у больных БА является обоснованной активной иммунотропной терапией, позволяющей добиться качественно новых положительных результатов лечения.

Таблица 4.1.1.4

Иммунологические показатели у больных бронхиальной астмой до начала лечения ($M \pm m$)

Показатели	Группа АФП до лечения ($n = 21$)	Группа плацебо до лечения ($n = 20$)	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения ($n = 41$)	Группа здоровых доноров ($n = 25$)
Лейкоциты, в 1 мкл	6 263,6 ± 349,1	6 080 ± 464	6 176,2 ± 280,1	6 256 ± 417
Палочкоядерные нейтрофилы, %	2,5 ± 0,6	3 ± 0,9	2,7 ± 0,5	2,8 ± 0,4
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	159,1 ± 39,2	169,8 ± 50	164,2 ± 30,7	175,2 ± 16,9
Сегментоядерные нейтрофилы, %	51,9 ± 2,8	48,7 ± 2,8	50,4 ± 1,9	50,6 ± 1,4
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	3 215,6 ± 219,4	2 904,4 ± 217,3	3 067,4 ± 154,7	3 165,5 ± 307,1
Базофилы, %	0,91 ± 0,1	0	0,05 ± 0,05	0
Базофилы, в 1 мкл	5,3 ± 5,3	0	2,8 ± 2,8	0
Моноциты, %	6,9 ± 0,53	7,9 ± 0,37	7,9 ± 0,8	7,7 ± 0,3

Продолжение таблицы 4.1.1.4

Показатели	Группа АФП до лечения (*n* = 21)	Группа плацебо до лечения (*n* = 20)	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения (*n* = 41)	Группа здоровых доноров (*n* = 25)
Моноциты, в 1 мкл	492,8 ± 73,9	488,6 ± 120,5	490,8 ± 67,4	481,7 ± 46,7
Лимфоциты, %	34,6 ± 3,2	33,7 ± 1,8	34,1 ± 1,8	35,2 ± 1,8
Лимфоциты, в 1 мкл	2 181,9 ± 250,7	2 093 ± 263	2 139,6 ± 177,4	2 185 ± 382
Эозинофилы, %	3,2 ± 0,8	6,7 ± 0,6*	4,9 ± 0,6	3,7 ± 0,3
Эозинофилы, в 1 мкл	209 ± 53,4	424,2 ± 68,9*	311,5 ± 48,4	231,5 ± 22,5
Е-РОК тотальные, %	56,9 ± 3,1	50,8 ± 3,7	54 ± 2,4	63,2 ± 1,9
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	1 251,1 ± 175,4	1 062,1 ± 148,9	1 161,1 ± 115,1	1 387 ± 114
Ранние Е-РОК, %	36,4 ± 3,4	35,1 ± 4,8	35,8 ± 2,8	47,7 ± 2,8
Термостабил. Е-РОК, %	24 ± 2,7	25,5 ± 2,7	24,7 ± 1,7	41,2 ± 3,1
Теоф. резистентные, %	39,2 ± 3,2	42,3 ± 4,8	40,7 ± 2,8	39,2 ± 8,1
Теоф. чувствительные, %	4,7 ± 3,2	0,5 ± 4,3	2,7 ± 2,6	9,8 ± 4,7
Теоф. рез. / теоф. чувствит.	8,8 ± 1	84,6 ± 2,3*	14,9 ± 1,3	4 ± 3,9
Т-активин чувствит. (5 мг/мл), %	36,5 ± 5,7	38,25 ± 2,1	37,4 ± 2,9	57,1 ± 3,7
Т-активин чувствит. (0,5 мг/мл), %	36,6 ± 6,2	40,38 ± 6,6	38,5 ± 4,4	58,9 ± 3,2
М-РОК, %	13,3 ± 1,8	9,9 ± 1	11,7 ± 1,1	11,9 ± 0,9
М-РОК, в 1 мкл	300,1 ± 57,6	197,816 ± 21,4	251,4 ± 33,1	260 ± 24
0-клетки, %	29,7 ± 3	39,3 ± 3,7	34,3 ± 2,5	24,8 ± 2,2
0-клетки, в 1 мкл	630,8 ± 88,9	833,02 ± 139,6	727,1 ± 82,2	0,5 ± 0,67
$CD3^+$, %	55 ± 3	48,38 ± 5,4	51,2 ± 3,4	69,3 ± 7,6
$CD3^+$, в 1 мкл	994,3 ± 139,1	982,6 ± 161,1	987,6 ± 105,7	1 514,2 ± 196,9
$CD4^+$, %	15 ± 2,9	21,6 ± 3,7	18,8 ± 2,5	39,8 ± 5,9
$CD4^+$, в 1 мкл	266,6 ± 71,4	387,8 ± 55	335,9 ± 45,3	869,6 ± 113,1
$CD8^+$, %	21 ± 2,5	22 ± 2,4	21,6 ± 1,68	28,5 ± 6,1
$CD8^+$, в 1 мкл	378 ± 62,9	463,8 ± 102,3	426,9 ± 63,4	622,7 ± 80,9
$CD16^+$, %	8,8 ± 2,7	8,9 ± 1,4	8,8 ± 1,4	13,2 ± 5,2
$CD16^+$, в 1 мкл	142,6 ± 44,6	166,7 ± 23	156,3 ± 22,4	288,4 ± 37,5
$CD72^+$, %	7,2 ± 1,8	8,4 ± 2,3	8,2 ± 1,4	12,1 ± 5,3
$CD72^+$, в 1 мкл	135,1 ± 47	148,6 ± 32,3	153,4 ± 34	264,6 ± 34,4
$CD11^+$, %	15,2 ± 2,4	9,4 ± 4,9	12,3 ± 2,8	21 ± 1,9
$CD11^+$, в 1 мкл	273,5 ± 41,6	148,8 ± 51,4	211,2 ± 37,5	458,9 ± 59,7
$HLA\text{-}DR^+$, %	15,3 ± 2,9	7 ± 2,9	10,7 ± 2,4	24,5 ± 2,3

Окончание таблицы 4.1.1.4

Показатели	Группа АФП до лечения (n = 21)	Группа плацебо до лечения (n = 20)	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения (n = 41)	Группа здоровых доноров (n = 25)
HLA-DR$^+$, в 1 мкл	282,9 ± 80,3	115,3 ± 29,4	189,8 ± 46,7	535,3 ± 69,6
CD 95$^+$, %	7,8 ± 2,6	4 ± 0,8	5,9 ± 1,4	6 ± 0,6
CD 95$^+$, в 1 мкл	164,4 ± 55,8	98,1 ± 25,9	131,2 ± 31,1	131,1 ± 0,1
IgG, г/л	10,3 ± 1,7	10,2 ± 1,1	10,2 ± 0,9	12,5 ± 1,07
IgA, г/л	1,5 ± 0,3	1,9 ± 0,3	1,71 ± 0,2	3,2 ± 1,07
IgM, г/л	1,4 ± 0,3	0,9 ± 0,2	1,23 ± 0,2	1,69 ± 0,21
Общий IgE, МЕ/мл	525,9 ± 147	446,5 ± 118,1	488,05 ± 93,4	60 ± 6
Процент фагоцитоза	66,9 ± 4,3	67,6 ± 6,1	67,2 ± 3,6	60,11 ± 3,05
Фагоцитарное число	1,8 ± 0,3	1,9 ± 0,5	2,62 ± 0,2	2,07 ± 0,91
Фагоцитарный индекс	2,6 ± 0,3	2,6 ± 0,3	1,88 ± 0,3	1,28 ± 0,11
НСТ-сп, опт. ед.	0,21 ± 0,09	0,21 ± 0,08	0,21 ± 0,06	0,16 ± 0,02
НСТ-ст, опт. ед.	0,23 ± 0,09	0,26 ± 0,09	0,25 ± 0,06	0,16 ± 0,02
НСТ-ст/НСТ-сп	1,16 ± 0,26	1,23 ± 0,99	1,71 ± 0,05	1,11 ± 0,14
ЦИК, усл. ед.	52,3 ± 6	38,6 ± 7,4	45,76 ± 4,9	46,4 ± 5,2
IL-1β, пкг/мл	11,2 ± 2,8	10,9 ± 3,3	11,05 ± 2,1	2,5 ± 2,1
IL-4, пкг/мл	131 ± 40,6	61,1 ± 29,3	99,9 ± 26,7	15 ± 3,3
СРБ, мг/мл	8 ± 5,3	0	4,4 ± 3	0

Примечание. Цветом выделены достоверные по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$) изменения параметра относительно показателей здоровых доноров.

*Отличия между группой АФП и группой плацебо по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

Таблица 4.1.1.5

Гематологические показатели у больных бронхиальной астмой до начала лечения ($M \pm m$)

Показатели	Группа АФП до лечения (n = 21)	Группа плацебо до лечения (n = 20)
Гемоглобин, г/л	138,7 ± 5,6	140,5 ± 5,4
Эритроциты × 10^{12}/л	4,68 ± 0,2	4,7 ± 0,2
Лейкоциты × 10^9/л	7,51 ± 0,9	5,9 ± 0,7
Палочкоядерные нейтрофилы, %	2,2 ± 0,5	10,1 ± 6,4
Сегментоядерные нейтрофилы, %	55,1 ± 2,8	48,3 ± 4,2
Лимфоциты, %	31,2 ± 3,3	27,8 ± 4,8

Окончание таблицы 4.1.1.5

Показатели	Группа АФП до лечения ($n = 21$)	Группа плацебо, до лечения ($n = 20$)
Базофилы, %	0	0
Эозинофилы, %	5,1 ± 1,7	7,3 ± 1,8
Моноциты, %	7,2 ± 1,4	6,3 ± 1,3
СОЭ, мм/ч	13,8 ± 3,9	9,3 ± 1,7

Таблица 4.1.1.6

Изменение тяжести приступов бронхиальной астмы под влиянием лечения препаратом АФП ($M \pm m$)

Показатель	Группа АФП ($n = 21$)		Группа плацебо ($n = 20$)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Тяжесть приступов по 10-балльной шкале, баллы	5,3 ± 1,31	3,2 ± 1,67*	6,3 ± 3,08	9,17 ± 5,15

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$ до и после лечения.

Таблица 4.1.1.7

Динамика показателей вентиляции легких у больных бронхиальной астмой ($M \pm m$)

Показатель	Группа АФП ($n = 21$)		Группа плацебо ($n = 20$)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
ЖЕЛ, %	101 ± 4,15	95 ± 5,57	94,67 ± 6,48	91,83 ± 6,2
ФЖЕЛ, %	59,9 ± 5,61	81,5 ± 9,55*	49,93 ± 6,53	78,53 ± 13,7
$ОФВ_1$, %	69 ± 6,23	93, ± 9,96*	58,19 ± 7,53	74,17 ± 11,2
$ОФВ_1$% ЖЕЛ	57,3 ± 4,16	82,23 ± 7,26*	51,6 ± 5,35	67,45 ± 10,17
МОС 75	29 ± 8,05	89,5 ± 15*	50 ± 8,15	61,33 ± 7,71
МОС 50	89,6 ± 9	103 ± 13,3	51,63 ± 9,3	64 ± 6,26
ПСВ утрен.	276 ± 14,73	314,4 ± 25,89*	304,86 ± 49,1	302,43 ± 33,3
ПСВ вечерн.	301,43 ± 29,64	323,17 ± 29,3	315,71 ± 56,7	322,43 ± 32,01
ПСВ суточн. разброс.	13,77 ± 2,73	11,42 ± 4,2	9,78 ± 2,11	10,73 ± 2,7

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$ до и после лечения.

Таблица 4.1.1.8

Динамика показателей клинического анализа крови у больных бронхиальной астмой ($M \pm m$)

Показатель	Группа АФП ($n = 21$)		Группа плацебо ($n = 20$)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Общий анализ крови				
Эритроциты × 10^{12}/л	4,71 ± 0,18	4,53 ± 0,14	4,78 ± 0,19	4,64 ± 0,11
Лейкоциты × 10^9/л	7 ± 0,82	5,75 ± 0,49	5,88 ± 0,66	5,39 ± 0,33
Палочкоядерные нейтрофилы, %	2 ± 0,46	1,5 ± 0,22	3,75 ± 1,1	2,13 ± 0,36
Сегментоядерные нейтрофилы, %	51,75 ± 2,23	52,83 ± 1,7	51,63 ± 0,02	49,38 ± 3,8
Лимфоциты, %	34,5 ± 2,88	34,33 ± 1,96	31,13 ± 2,82	36,75 ± 2,77
Базофилы, %	6,83 ± 1,91	3,5 ± 0,8*	7,25 ± 1,83	5,75 ± 1,3
Эозинофилы, %	6,63 ± 1,51	8,83 ± 3,6	6,25 ± 1,25	6,13 ± 0,89
СОЭ, мм/ч	12,13 ± 3,69	9 ± 2,86	9,25 ± 1,69	9,5 ± 1,71
Биохимический анализ крови				
Кальций, ммоль/л	2,44 ± 0,11	2,63 ± 0,19	2,71 ± 0,22	2,81 ± 0,11
Глюкоза, ммоль/л	4,33 ± 0,21	4,46 ± 0,33**	4,98 ± 0,21	5,37 ± 0,19
γ-ГГТ, Ед/л	20,22 ± 3,15	19,90 ± 3,48	19,65 ± 1,21	14,66 ± 1,9
АЛТ, Ед/л	17,37 ± 3,05	18,56 ± 4,93	13,24 ± 1,69	15,35 ± 0,88
АСТ, Ед/л	15,1 ± 1,04	21,85 ± 7,83	16,17 ± 1,32	15,38 ± 1,7
Общий белок, г/л	76,04 ± 3,24	79, 64 ± 2,36*	75,83 ± 2,84	71,78 ± 1,01
Альбумины, г/л	55,06 ± 1,4	48,33 ± 2,69	51,45 ± 1,88	53,2 ± 1,88
Глобулины: α_1, %	4,49 ± 0,28	6,02 ± 0,57*	5,34 ± 0,26	6,18 ± 0,32
α_2, %	9,04 ± 0,75	11,03 ± 1,25	11,47 ± 0,91	9,78 ± 0,69
β, %	12,74 ± 0,94	13,12 ± 1,13	14,43 ± 0,75	13,4 ± 1,05
γ, %	18,69 ± 1,39	21,5 ± 1,07	17,3 ± 1,05	17,38 ± 1,08
Мочевина, ммоль/л	5,54 ± 0,41	5,02 ± 0,25	5,43 ± 0,52	5,82 ± 0,71
Билирубин общий, ммоль/л	16,03 ± 0,7	16,13 ± 0,8	17,09 ± 0,52	17,08 ± 0,71
Креатинин, ммоль/л	74,76 ± 4,86	82,57 ± 3,45	77,69 ± 6,11	74,95 ± 4,1
ЩФ, Ед/л	95,44 ± 6,35	89,18 ± 10,19	112,46 ± 11,37	113,76 ± 7,19

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$) до и после лечения.

**Достоверно ($p < 0,05$) в сравнении с группой плацебо.

Таблица 4.1.1.9

Иммунологические показатели у больных бронхиальной астмой в группе АФП после лечения (*M* ± *m*)

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо), до лечения (*n* = 41)	ГруппаАФП после лечения (*n* = 21)	Группа здоровых доноров (*n* = 25)
Лейкоциты, в 1 мкл	6176,2 ± 280,1	5 775 ± 489,1	6 256 ± 417
Палочкоядерные нейтрофилы, %	2,7 ± 0,5	2 ± 0,8	2,8 ± 0,4
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	164,2 ± 30,7	112,8 ± 41,3	175,2 ± 16,9
Сегментоядерные нейтрофилы, %	50,4 ± 1,9	49,8 ± 2,1	50,6 ± 1,4
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	3 067,4 ± 154,7	2 880,8 ± 290,4	3 165,5 ± 307,1
Базофилы, %	0,05 ± 0,05	0	0
Базофилы, в 1 мкл	2,8 ± 2,8	0	0
Моноциты, %	7,9 ± 0,8	11,5 ± 1,5*	7,7 ± 0,3
Моноциты, в 1 мкл	490,8 ± 67,4	678 ± 114,7	481,7 ± 46,7
Лимфоциты, %	34,1 ± 1,8	33,9 ± 2,7	35,2 ± 1,8
Лимфоциты, в 1 мкл	2 139,6 ± 177,4	1 928,5 ± 192,3	2 185 ± 382
Эозинофилы, %	4,9 ± 0,6	2,9 ± 1	3,7 ± 0,3
Эозинофилы, в 1 мкл	311,5 ± 48,4	175 ± 63,6	231,5 ± 22,5
Е-РОК тотальные, %	54 ± 2,4	56,4 ± 4,5	63,2 ± 1,9
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	1 161,1 ± 115,1	1 053,8 ± 90,9	1 387 ± 114
Ранние Е-РОК, %	35,8 ± 2,8	40,3 ± 3,1	47,7 ± 2,8
Термостабил. Е-РОК, %	24,7 ± 1,7	30,8 ± 5,7	41,2 ± 3,1
Теоф. резистентные, %	40,7 ± 2,8	40,6 ± 2,4	39,2 ± 8,1
Теоф. чувствительные, %	2,7 ± 2,6	9 ± 4,4	9,8 ± 4,7
Теоф. резистент. / теоф. чувствит.	14,9 ± 1,3	4,5 ± 4,9	4 ± 3,9
Т-активин чувствит. (5 мг/мл), %	37,4 ± 2,9	39,5 ± 7,9	57,1 ± 3,7
Т-активин чувствит. (0,5 мг/мл), %	38,5 ± 4,4	41,5 ± 5,5	8,9 ± 3,2
М-РОК, %	11,7 ± 1,1	13 ± 2,3	11,9 ± 0,9
М-РОК, в 1 мкл	251,4 ± 33,1	255,9 ± 56,5	260 ± 24
0-клетки, %	34,3 ± 2,5	30,6 ± 5	24,8 ± 2,2
0-клетки, в 1 мкл	727,1 ± 82,2	618,8 ± 138,7	0,5 ± 0,67

Окончание таблицы 4.1.1.9

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения (*n* = 41)	Группа АФП после лечения (*n* = 21)	Группа здоровых доноров (*n* = 25)
$CD3^+$, %	51,2 ± 3,4	57,8 ± 4,1	69,3 ± 7,6
$CD3^+$, в 1 мкл	987,6 ± 105,7	1 104,5 ± 118,7	1 514,2 ± 196,9
$CD4^+$, %	18,8 ± 2,5	12,1 ± 1,9	39,8 ± 5,9
$CD4^+$, в 1 мкл	335,9 ± 45,3	249,7 ± 56,5	869,6 ± 113,1
$CD8^+$, %	21,6 ± 1,68	19 ± 1,97	28,5 ± 6,1
$CD8^+$, в 1 мкл	426,9 ± 63,4	385,5 ± 50,9	622,7 ± 80,9
$CD16^+$, %	8,8 ± 1,4	13 ± 2,4	13,2 ± 5,2
$CD16^+$, в 1 мкл	156,3 ± 22,4	236,4 ± 32,5*	288,4 ± 37,5
$CD72^+$, %	7,9 ± 1,5	8,2 ± 1,4	12,1 ± 5,3
$CD72^+$, в 1 мкл	142,7 ± 26,3	153,4 ± 34	264,6 ± 34,4
$CD11^+$, %	12,3 ± 2,8	9,5 ± 2,5	21 ± 1,9
$CD11^+$, в 1 мкл	211,2 ± 37,5	138,3 ± 43,7	458,9 ± 59,7
HLA-DR^+, %	10,7 ± 2,4	14,5 ± 2,5	24,5 ± 2,3
HLA-DR^+, в 1 мкл	189,8 ± 46,7	247,1 ± 64,9	535,3 ± 69,6
CD 95^+, %	5,9 ± 1,4	3,5 ± 0,5	6 ± 0,6
CD 95^+, в 1 мкл	131,2 ± 31,1	57,9 ± 2,8	131,1 ± 0,1
IgG, г/л	10,2 ± 0,9	11,8 ± 1,2	12,5 ± 1,07
IgA, г/л	1,71 ± 0,2	1,1 ± 0,28	3,2 ± 1,07
IgM, г/л	1,23 ± 0,2	0,82 ± 0,16	1,69 ± 0,21
Общий IgE, МЕ/мл	488,05 ± 93,4	285,07 ± 117,2*	60 ± 6
Процент фагоцитоза	67,2 ± 3,6	68,3 ± 7,7	60,11 ± 3,05
Фагоцитарное число	2,62 ± 0,2	2,6 ± 0,2	2,07 ± 0,91
Фагоцитарный индекс	1,88 ± 0,3	1,9 ± 0,3	1,28 ± 0,11
НСТ-сп, опт. ед.	0,21 ± 0,06	0,28 ± 0,12	0,16 ± 0,02
НСТ-ст, опт. ед.	0,25 ± 0,06	0,28 ± 0,099	0,16 ± 0,02
НСТ-ст / НСТ-сп	1,71 ± 0,05	1,11 ± 0,09	1,11 ± 0,14
ЦИК, усл. ед.	45,76 ± 4,9	50,62 ± 10,3	46,4 ± 5,2
IL-1β, пкг/мл	11,05 ± 2,1	5,33 ± 2,9*	2,5 ± 2,1
IL-4, пкг/мл	99,9 ± 26,7	28,1 ± 13,8*	15 ± 3,3
СРБ, мг/мл	4,4 ± 3	0	0

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$ до и после лечения.

Примечание. Цветом показаны достоверные изменения величины параметра относительно физиологической нормы.

Таблица 4.1.1.10

Иммунологические показатели у больных бронхиальной астмой в группе плацебо после лечения (*M* ± *m*)

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения (*n* = 41)	Группа плацебо после лечения (*n* = 20)	Группа здоровых доноров (*n* = 25)
Лейкоциты, в 1 мкл	6 176,2 ± 280,1	5 285,7 ± 471,8	6 256 ± 417
Палочкоядерные нейтрофилы, %	2,7 ± 0,5	2,9 ± 0,9	2,8 ± 0,4
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	164,2 ± 30,7	168,6 ± 53,8	175,2 ± 16,9
Сегментоядерные нейтрофилы, %	50,4 ± 1,9	47,6 ± 4	50,6 ± 1,4
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	3 067,4 ± 154,7	2 540,6 ± 364,0	3 165,5 ± 307,1
Базофилы, %	0,05 ± 0,05	0,14 ± 0,1	0
Базофилы, в 1 мкл	2,8 ± 2,8	7,4 ± 7,4	0
Моноциты, %	7,9 ± 0,8	9,9 ± 1,9	7,7 ± 0,3
Моноциты, в 1 мкл	490,8 ± 67,4	512 ± 101	481,7 ± 46,7
Лимфоциты, %	34,1 ± 1,8	34,4 ± 2,3	35,2 ± 1,8
Лимфоциты, в 1 мкл	2 139,6 ± 177,4	1 810,6 ± 202,8	2 185 ± 382
Эозинофилы, %	4,9 ± 0,6	5,1 ± 1,2	3,7 ± 0,3
Эозинофилы, в 1 мкл	311,5 ± 48,4	246,3 ± 46	231,5 ± 22,5
Е-РОК тотальные, %	54 ± 2,4	48 ± 4,4	63,2 ± 1,9
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	1 161,1 ± 115,1	863,6 ± 122	1 387 ± 114
Ранние Е-РОК, %	35,8 ± 2,8	40,7 ± 5,1	47,7 ± 2,8
Термостабил. Е-РОК, %	24,7 ± 1,7	21,3 ± 5,6	41,2 ± 3,1
Теоф. резистентные, %	40,7 ± 2,8	48,9 ± 4,8	39,2 ± 8,1
Теоф. чувствительные, %	2,7 ± 2,6	1 ± 5,4	9,8 ± 4,7
Теоф. резистент. / теоф. чувствит.	14,9 ± 1,3	48,9 ± 2,1	4 ± 3,9
Т-активин чувствит. (5 мг/мл), %	37,4 ± 2,9	54,8 ± 5,2*	57,1 ± 3,7
Т-активин чувствит. (0,5 мг/мл), %	38,5 ± 4,4	41,2 ± 2,2	58,9 ± 3,2
М-РОК, %	11,7 ± 1,1	10,3 ± 0,7	11,9 ± 0,9
М-РОК, в 1 мкл	251,4 ± 33,1	183,2 ± 19,5	260 ± 24
0-клетки, %	34,3 ± 2,5	41,7 ± 5,1	24,8 ± 2,2
0-клетки, в 1 мкл	727,1 ± 82,2	764,1 ± 126,1	0,5 ± 0,67
$CD3^+$, %	51,2 ± 3,4	49,8 ± 4,6	69,3 ± 7,6

Окончание таблицы 4.1.1.10

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения (*n* = 41)	Группа плацебо после лечения (*n* = 20)	Группа здоровых доноров (*n* = 25)
$CD3^+$, в 1 мкл	987,6 ± 105,7	836,3 ± 65,8	1 514,2 ± 196,9
$CD4^+$, %	18,8 ± 2,5	19,6 ± 3,7	39,8 ± 5,9
$CD4^+$, в 1 мкл	335,9 ± 45,3	359 ± 77,5	869,6 ± 113,1
$CD8^+$, %	21,6 ± 1,68	22 ± 4,9	28,5 ± 6,1
$CD8^+$, в 1 мкл	426,9 ± 63,4	367,2 ± 81,4	622,7 ± 80,9
$CD16^+$, %	8,8 ± 1,4	14,4 ± 2,8	13,2 ± 5,2
$CD16^+$, в 1 мкл	156,3 ± 22,4	251,9 ± 54,3	288,4 ± 37,5
$CD72^+$, %	7,9 ± 1,5	8,5 ± 1,96	12,1 ± 5,3
$CD72^+$, в 1 мкл	142,7 ± 26,3	156,2 ± 45,9	264,6 ± 34,4
$CD11^+$, %	12,3 ± 2,8	13 ± 5,7	21 ± 1,9
$CD11^+$, в 1 мкл	211,2 ± 37,5	231,8 ± 83,3	458,9 ± 59,7
$HLA\text{-}DR^+$, %	10,7 ± 2,4	26 ± 8,3*	24,5 ± 2,3
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	189,8 ± 46,7	472,5 ± 140,8*	535,3 ± 69,6
CD 95^+, %	5,9 ± 1,4	8,3 ± 4,1	6 ± 0,6
CD 95^+, в 1 мкл	131,2 ± 31,1	195,5 ± 131,4	131,1 ± 0,1
IgG, г/л	10,2 ± 0,9	13,2 ± 2,9	12,5 ± 1,07
IgA, г/л	1,71 ± 0,2	1,2 ± 0,13	3,2 ± 1,07
IgM, г/л	1,23 ± 0,2	0,78 ± 0,17*	1,69 ± 0,21
Общий IgE, МЕ/мл	488,05 ± 93,4	462 ± 164,3	60 ± 6
Процент фагоцитоза	67,2 ± 3,6	78,7 ± 5	60,11 ± 3,05
Фагоцитарное число	2,62 ± 0,2	3,1 ± 0,31	2,07 ± 0,91
Фагоцитарный индекс	1,88 ± 0,3	2,5 ± 0,38	1,28 ± 0,11
НСТ-сп, опт. ед.	0,21 ± 0,06	0,13 ± 0,02	0,16 ± 0,02
НСТ-ст, опт. ед.	0,25 ± 0,06	0,16 ± 0,01*	0,16 ± 0,02
НСТ-ст / НСТ-сп	1,71 ± 0,05	1,26 ± 0,2	1,11 ± 0,14
ЦИК, усл. ед.	45,76 ± 4,9	45,57 ± 10,9	46,4 ± 5,2
IL-1β, пкг/мл	11,05 ± 2,1	19,33 ± 5,3	2,5 ± 2,1
IL-4, пкг/мл	99,9 ± 26,7	144,19 ± 17,18	15 ± 3,3
СРБ, мг/мл	4,4 ± 3	1,67 ± 1,7	0

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$ до и после лечения.

Примечание. Цветом показаны достоверные изменения величины параметра относительно физиологической нормы.

Таблица 4.1.1.11

Изменение иммунологических показателей у больных бронхиальной астмой в группе плацебо в результате терапии (*M* ± *m*)

Показатели	Группа плацебо до лечения (*n* = 20)	Группа плацебо после лечения (*n* = 20)
Лейкоциты, в 1 мкл	6 080 ± 464	5 285,7 ± 471,8
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3 ± 0,87	2,9 ± 0,9
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	169,8 ± 50	168,6 ± 53,9
Сегментоядерные нейтрофилы, %	48,7 ± 2,8	47,6 ± 4,0
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	2 904,4 ± 217,3	2 540,6 ± 364
Базофилы, %	0	0,14 ± 0,14
Базофилы, в 1 мкл	0	7,43 ± 7,43
Моноциты, %	7,9 ± 1,57	9,86 ± 1,92
Моноциты, в 1 мкл	488,6 ± 120,5	512 ± 101
Лимфоциты, %	33,7 ± 1,8	34,4 ± 2,28
Лимфоциты, в 1 мкл	2 093 ± 263,9	1 810,6 ± 202,8
Эозинофилы, %	6,7 ± 0,6	5,14 ± 1,2
Эозинофилы, в 1 мкл	424,2 ± 68,9	246,29 ± 45,9
Е-РОК тотальные, %	50,8 ± 3,7	48 ± 4,43
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	1 062,2 ± 148,9	863,6 ± 122
Ранние Е-РОК, %	35,1 ± 4,8	40,7 ± 5,05
Термостабил. Е-РОК, %	25,5 ± 2,7	21,3 ± 5,6
Теоф. резистентные, %	42,3 ± 4,8	48,9 ± 4,8
Теоф. чувствительные, %	0,5 ± 4,3	1 ± 5,4
Теоф. резистент. / теоф. чувствит.	84,6 ± 2,3	48,8 ± 2,1
Т-активин чувствит. (5 мг/мл), %	38,3 ± 2,1	54,8 ± 5,2*
Т-активин чувствит. (0,5 мг/мл), %	40,4 ± 6,6	41,2 ± 2,2
М-РОК, %	9,9 ± 1,04	10,3 ± 0,7
М-РОК, в 1 мкл	197,8 ± 21,4	183,2 ± 19,5
0-клетки, %	39,3 ± 3,73	41,7 ± 5,08
0-клетки, в 1 мкл	833 ± 139,6	764,1 ± 126,1
$CD3^+$, %	48,4 ± 5,4	49,8 ± 4,6
$CD3^+$, в 1 мкл	982,6 ± 161,1	836,3 ± 65,8
$CD4^+$, %	21,6 ± 3,7	19,6 ± 3,7
$CD4^+$, в 1 мкл	387,8 ± 54,99	359,04 ± 77,5
$CD8^+$, %	22 ± 2,4	22 ± 4,9
$CD8^+$, в 1 мкл	463,7 ± 102,3	367,3 ± 81,4

Окончание таблицы 4.1.1.11

Показатели	Группа плацебо до лечения ($n = 20$)	Группа плацебо после лечения ($n = 20$)
$CD16^+$, %	8,9 ± 1,38	14,4 ± 2,9
$CD16^+$, в 1 мкл	166,7 ± 23	251,9 ± 54,2
$CD72^+$, %	8,4 ± 2,26	8,5 ± 1,96
$CD72^+$, в 1 мкл	148,6 ± 32,3	156,2 ± 45,9
$CD11^+$, %	9,4 ± 4,97	13 ± 5,69
$CD11^+$, в 1 мкл	148,84 ± 51,4	231,8 ± 83,3
$HLA\text{-}DR^+$, %	7 ± 2,9	26 ± 8,3*
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	115,32 ± 29,4	472,5 ± 140,8*
$CD95^+$, %	4 ± 0,82	8,33 ± 4,1
$CD95^+$, в 1 мкл	98,1 ± 25,9	195,5 ± 131,4
IgG, г/л	10,24 ± 1,15	13,3 ± 2,9
IgA, г/л	1,89 ± 0,33	1,2 ± 0,13
IgM, г/л	0,99 ± 0,2	0,78 ± 0,17
Общий IgE, МЕ/мл	446,46 ± 118,1	462 ± 164,3
Процент фагоцитоза	67,6 ± 6,13	78,7 ± 5
Фагоцитарное число	2,64 ± 0,3	3,1 ± 0,31
Фагоцитарный индекс	1,95 ± 0,45	2,5 ± 0,38
НСТ-сп, опт. ед.	0,21 ± 0,08	0,13 ± 0,02
НСТ-ст, опт. ед.	0,26 ± 0,09	0,16 ± 0,05
НСТ-ст/НСТ-сп	1,2 ± 0,99	1,26 ± 0,2
ЦИК, усл. ед.	38,6 ± 7,43	45,57 ± 10,9
IL-1β, пкг/мл	10,9 ± 3,35	19,33 ± 5,31
IL-4, пкг/мл	61,1 ± 29,25	144,2 ± 17,2*
СРБ, мг/мл	0	1,7 ± 1,7

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$ до и после лечения.

Таблица 4.1.1.12

Изменение иммунологических показателей у больных бронхиальной астмой в группе АФП в результате терапии ($M \pm m$)

Показатели	Группа АФП до лечения ($n = 21$)	Группа АФП после лечения ($n = 21$)
Лейкоциты, в 1 мкл	6 263,7 ± 349,1	5 775 ± 489,1
Палочкоядерные нейтрофилы, %	2,5 ± 0,55	2 ± 0,78
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	159,09 ± 39,27	112,8 ± 41,3
Сегментоядерные нейтрофилы, %	51,9 ± 2,8	49,8 ± 2,1
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	3 215,5 ± 219,4	2 880,8 ± 290,4
Базофилы, %	0,91 ± 0,09	0
Базофилы, в 1 мкл	5,3 ± 5,27	0
Моноциты, %	7,11 ± 0,87	11,1 ± 1,5*
Моноциты, в 1 мкл	419,222 ± 73,9	695,1 ± 114,7*
Лимфоциты, %	34,6 ± 3,2	33,9 ± 2,7
Лимфоциты, в 1 мкл	2 181,9 ± 250,7	1 928,5 ± 192,3
Эозинофилы, %	3,2 ± 0,77	2,9 ± 1
Эозинофилы, в 1 мкл	209 ± 53,4	175 ± 63,6
Е-РОК тотальные, %	56,91 ± 3,08	56,38 ± 4,5
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	1 251,05 ± 175,4	1 053,8 ± 90,9
Ранние Е-РОК, %	36,4 ± 3,4	40,25 ± 3,1
Термостабил. Е-РОК, %	24 ± 2,7	30,75 ± 4,5
Теоф. резистентные, %	39,2 ± 3,2	40,625 ± 2,4
Теоф. чувствительные, %	4,8 ± 3,15	9 ± 4,4
Теоф. резистент. / теоф. чувствит.	8,3 ± 0,98	4,514 ± 4,9
Т-активин чувствит. (5 мг/мл), %	36,5 ± 5,7	39,5 ± 7,9
Т-активин чувствит. (0.5 мг/мл), %	36,7 ± 6,17	41,5 ± 5,5
М-РОК, %	13,4 ± 1,8	13 ± 2,3
М-РОК, в 1 мкл	300,1 ± 57,6	255,9 ± 56,5
0-клетки, %	29,7 ± 3,05	30,6 ± 5
0-клетки, в 1 мкл	630,8 ± 88,88	618,8 ± 138,7
$CD3^+$, %	55 ± 3,01	57,8 ± 4,1
$CD3^+$, в 1 мкл	994,3 ± 139,05	1 104,5 ± 118,7
$CD4^+$, %	15 ± 2,9	12,1 ± 1,9
$CD4^+$, в 1 мкл	266,6 ± 71,4	249,7 ± 56,5
$CD8^+$, %	21 ± 2,45	19 ± 1,97
$CD8^+$, в 1 мкл	377,95 ± 62,9	385,5 ± 50,9

Окончание таблицы 4.1.1.12

Показатели	Группа АФП до лечения (n = 21)	Группа АФП после лечения (n = 21)
$CD16^+$, %	8,8 ± 2,7	13 ± 2,4
$CD16^+$, в 1 мкл	142,6 ± 44,6	236,4 ± 32,5
$CD72^+$, %	7,2 ± 1,8	8,1 ± 1,4
$CD72^+$, в 1 мкл	135,1 ± 47,02	153,4 ± 34
$CD11^+$, %	15,2 ± 2,35	9,5 ± 2,5*
$CD11^+$, в 1 мкл	273,5 ± 41,58	138,3 ± 43,7*
$HLA\text{-}DR^+$, %	15,3 ± 2,98	14,5 ± 2,5
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	282,97 ± 80,25	247,1 ± 64,9
$CD95^+$, %	7,8 ± 2,59	3,5 ± 0,5*
$CD95^+$, в 1 мкл	164,4 ± 55,84	57,9 ± 0,8*
IgG, г/л	10,2 ± 1,66	11,8 ± 1,2
IgA, г/л	1,8 ± 0,28	1,13 ± 0,29*
Ig M, г/л	1,44 ± 0,33	0,82 ± 0,17
Общий IgE, МЕ/мл	525,87 ± 146,99	285,1 ± 117,2*
Процент фагоцитоза	66,9 ± 4,27	68,3 ± 7,8
Фагоцитарное число	2,6 ± 0,29	2,6 ± 0,24
Фагоцитарный индекс	1,81 ± 0,27	1,9 ± 0,31
НСТ-сп, опт.ед.	0,21 ± 0,09	0,28 ± 0,12*
НСТ-ст, опт. ед.	0,23 ± 0,089	0,28 ± 0,1*
НСТ-ст / НСТ-сп	1,16 ± 0,26	1,11 ± 0,09
ЦИК, усл. ед.	52,3 ± 6,03	50,6 ± 10,2
IL-1β, пкг/мл	11,2 ± 2,6	5,3 ± 2,86
IL-4, пкг/мл	130,9 ± 40,6	28,1 ± 13,8*
СРБ, мг/мл	8 ± 5,3	0

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$ до и после лечения.

Таблица 4.1.1.13

Иммунологические показатели у больных бронхиальной астмой после лечения ($M \pm m$)

Показатели	Группа АФП после лечения ($n = 21$)	Группа плацебо после лечения ($n = 20$)	Группа здоровых доноров ($n = 25$)
Лейкоциты, в 1 мкл	5 775 ± 489,1	5 285,7 ± 471,8	6 256 ± 417,0
Палочкоядерные нейтрофилы, %	2 ± 0,78	2,9 ± 0,9	2,8 ± 0,4
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	112,8 ± 41,3	168,6 ± 53,8	175,2 ± 16,9
Сегментоядерные нейтрофилы, %	49,8 ± 2,1	47,6 ± 4	50,6 ± 1,4
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	2 880,8 ± 290,4	2 540,6 ± 364	3 165,5 ± 307,1
Базофилы, %	0	0,14 ± 0,1	0
Базофилы, в 1 мкл	0	7,4 ± 7,4	0
Моноциты, %	11,5 ± 1,5	9,9 ± 1,9	7,7 ± 0,3
Моноциты, в 1 мкл	678 ± 114,7	512 ± 101	481,7 ± 46,7
Лимфоциты, %	33,9 ± 2,7	34,4 ± 2,3	35,2 ± 1,8
Лимфоциты, в 1 мкл	1 928,5 ± 192,3	1 810,6 ± 202,8	2 185 ± 382
Эозинофилы, %	2,88 ± 1,0	5,1 ± 1,2	3,7 ± 0,3
Эозинофилы, в 1 мкл	175 ± 63,6	246,3 ± 46	231,5 ± 22,5
Е-РОК тотальные, %	56,4 ± 4,5	48 ± 4,4	63,2 ± 1,9
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	1 053,8 ± 90,9	863,6 ± 122	1 387 ± 114,0
Ранние Е-РОК, %	40,3 ± 3,1	40,7 ± 5,1	47,7 ± 2,8
Термостабил. Е-РОК, %	30,8 ± 4,5	21,3 ± 5,6	41,2 ± 3,1
Теоф. резистентные, %	40,6 ± 2,4	48,9 ± 4,8	39,2 ± 8,1
Теоф. чувствительные, %	9 ± 4,4	1 ± 5,4	9,8±4,7
Теоф. резистент. / теоф. чувствит.	9,2 ± 4,9*	48,9 ± 2,1	4 ± 3,9
Т-активин чувствит. (5 мг/мл), %	39,5 ± 7,88	54,8 ± 5,2	57,1 ± 3,7
Т-активин чувствит. (0,5 мг/мл), %	41,5 ± 5,5	41,2 ± 2,2	58,9 ± 3,2
М-РОК, %	13 ± 2,3	10,3 ± 0,7	11,9 ± 0,9
М-РОК, в 1 мкл	255,9 ± 56,6	183,2 ± 19,5	260 ± 24
0-клетки, %	30,6 ± 5,0	41,7 ± 5,1	24,8 ± 2,2
0-клетки, в 1 мкл	618,8 ± 138,7	764,1 ± 126,1	0,5 ± 0,67
$CD3^+$, %	57,75 ± 4,09	49,8 ± 4,6	69,3 ± 7,6
$CD3^+$, в 1 мкл	1 104,5 ± 118,7*	836,3 ± 65,8	1 514,2 ± 196,9
$CD4^+$, %	12,13 ± 1,88	19,6 ± 3,7	39,8 ± 5,9

Окончание таблицы 4.1.1.13

Показатели	Группа АФП после лечения ($n = 21$)	Группа плацебо после лечения ($n = 20$)	Группа здоровых доноров ($n = 25$)
$CD4^+$, в 1 мкл	249,67 ± 56,47	359 ± 77,5	869,6 ± 113,1
$CD8^+$, %	19 ± 1,97	22 ± 4,9	28,5 ± 6,1
$CD8^+$, в 1 мкл	385,5 ± 50,88	367,2 ± 81,4	622,7 ± 80,9
$CD16^+$, %	13 ± 2,37	14,4 ± 2,8	13,2 ± 5,2
$CD16^+$, в 1 мкл	236,4 ± 32,52	251,9 ± 54,3	288,4 ± 37,5
$CD72^+$, %	8,1 ± 1,4	8,5 ± 1,96	12,1 ± 5,3
$CD72^+$, в 1 мкл	153,4 ± 34	156,2 ± 45,9	264,6 ± 34,4
$CD11^+$, %	9,5 ± 2,5	13 ± 5,7	21 ± 1,9
$CD11^+$, в 1 мкл	138,3 ± 43,7	231,8 ± 83,3	458,9 ± 59,7
HLA-DR^+, %	14,5 ± 2,5	26 ± 8,3	24,5 ± 2,3
HLA-DR^+, в 1 мкл	247,1 ± 64,9	472,5 ± 140,8	535,3 ± 69,6
$CD95^+$, %	3,5 ± 0,5	8,3 ± 4,1	6 ± 0,6
$CD95^+$, в 1 мкл	57,9 ± 2,8	195,5 ± 131,4	131,1 ± 0,1
IgG, г/л	11,8 ± 1,2	13,2 ± 2,9	12,5 ± 1,07
IgA, г/л	1,1 ± 0,29	1,2 ± 0,13	3,2 ± 1,07
IgM, г/л	0,82 ± 0,17	0,78 ± 0,17	1,69 ± 0,21
Общий IgE, МЕ/мл	285,1 ± 117,2	462 ± 164,3	60 ± 6
Процент фагоцитоза	68,3 ± 7,8	78,7 ± 5	60,11 ± 3,05
Фагоцитарное число	2,6 ± 0,24	3,1 ± 0,31	2,07 ± 0,91
Фагоцитарный индекс	1,9 ± 0,31	2,5 ± 0,38	1,28 ± 0,11
НСТ-сп, опт. ед.	0,28 ± 0,12	0,13 ± 0,02	0,16 ± 0,02
НСТ-ст, опт. ед.	0,28 ± 0,1	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,02
НСТ-ст/НСТ-сп	1,11 ± 0,09	1,26 ± 0,2	1,11 ± 0,14
ЦИК, усл. ед.	50,63 ± 10,3	45,57 ± 10,9	46,4 ± 5,2
IL-1β, пкг/мл	5,3 ± 2,9*	19,33 ± 5,3	2,5 ± 2,1
IL-4, пкг/мл	28,1 ± 13,8*	144,19 ± 17,18	15 ± 3,3
СРБ, мг/мл	0	1,67 ± 1,7	0

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$ до и после лечения.

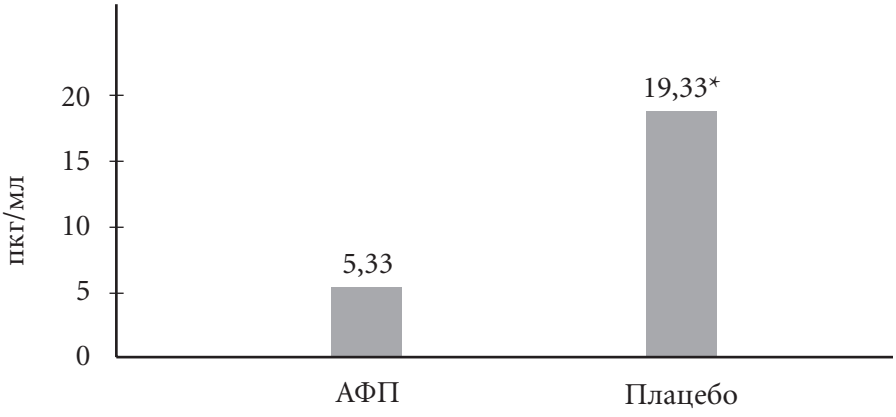


Рис. 4.1.1.1. **Уровень IL-1β у больных бронхиальной астмой после лечения в группах АФП и плацебо**

*$p < 0,05$ (сопоставление с АФП).

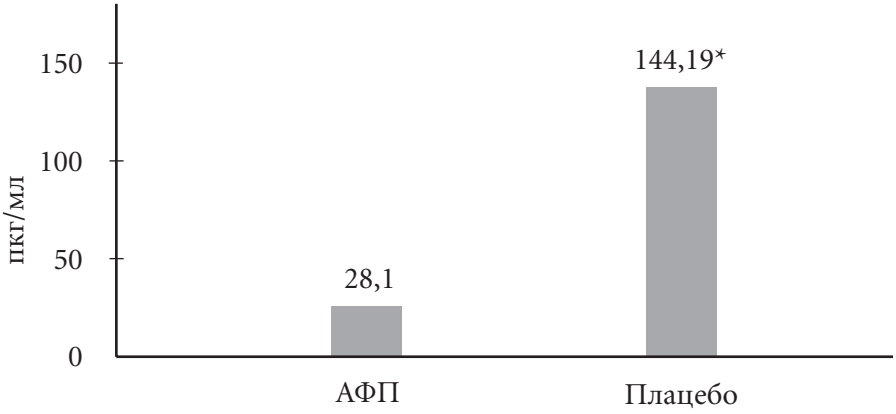


Рис. 4.1.1.2. **Уровень IL-4 у больных бронхиальной астмой после лечения в группах АФП и плацебо**

*$p < 0,05$ (сопоставление с АФП).

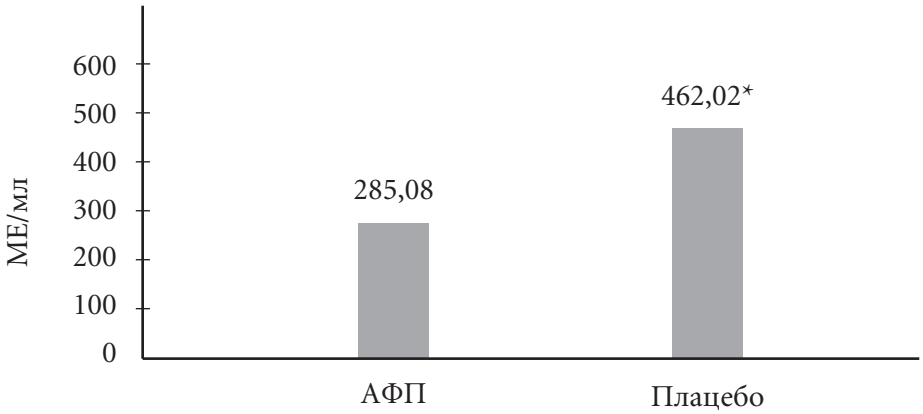


Рис. 4.1.1.3. **Уровень общего IgE у больных бронхиальной астмой после лечения в группах АФП и плацебо**

**p* < 0,05 (сопоставление с АФП).

4.1.2. Применение АФП в комплексной терапии пневмокониозов

Клинические испытания препарата АФП у больных с пневмокониозами проведены плацебоконтролируемым методом по протоколу двойного слепого контроля с использованием рандомизации. В испытаниях участвовали 40 больных (из них 20 человек составили группу АФП) в возрасте от 36 до 62 лет (средний возраст 41,31 ± 3,29 лет). Женщины составляли 22%, мужчины – 78%. Продолжительность трудового стажа в запыленных условиях составила в среднем 17,37 ± 3,25 лет, срок с момента прекращения работы в пылевых условиях – 3,21 ± 1,08 лет. Пациенты с силикозом и антракосиликозом составляли 48%, с пневмокониозами от воздействия токсико-аллергенного аэрозоля – 39%, с другими видами пневмокониозов – 13%. Рентгенологически у 57% больных выявлена интерстициальная форма заболевания, у 43% – узелковая; в 78% случаев – I стадия, в 22% случаев – II стадия.

Пациенты были разделены на две группы— группу АФП и группу плацебо, сравнимые по половому и возрастному составу. Средний возраст составлял 43,2 ± 3,4 лет в группе АФП и 42,5 ± 4,1 лет – в группе АФП. Симптомокомплексы у больных обеих групп до лечения не имели существенных различий. Больные предъявляли жалобы на вялость, повышенную утомляемость, снижение памяти, головокружения, кашель, одышку при физической нагрузке и в покое, нарушение сна. Общим признаком для всех больных являлись сниженные показатели вентиляционной способности легких, что характерно для данной патологии (рис. 4.1.2.3, табл. 4.1.2.13).

Патогенетические средства применялись в обеих группах, дозировка и кратность введения были сопоставимы [166, 248]. АФП вводился по 75 мкг внутримышечно и внутривенно (струйно или капельно) в 0,9%-ном растворе NaCl один раз в день в течение 30 сут. В группе плацебо 20 человек получали в составе комплексного лечения препарат «Плацебо», вводимый теми же путями в аналогичной дозе.

Общеклинические исследования включали гемограмму (с расчетом лейкоцитарного индекса интоксикации (ЛИИ), индекса сдвига (ИС), индекса сдвига лейкоцитов крови (ИСЛК) и лимфоцитарного индекса (ЛИ)), биохимическое исследование крови (протеи-

нограмма с расчетом альбумин-глобулинового коэффициента (А/Г) и коэффициента А/(α1 + α2), среднемолекулярные пептиды (средние молекулы, СМ), холестерин, тимоловая и сулемовая пробы, АЛТ, АСТ, билирубин (свободный и связанный), серомукоид, креатинин, мочевина, триглицериды (ТГ), общие фосфолипиды (ОФЛ) по Блюру [140], а также обзорную рентгенографию органов грудной клетки, рентгенотомографию легких [113], фибробронхоскопию, спирографию и пневмотахометрию [118].

Исследование состояния иммунитета больных пневмокониозами относительно условно здоровых людей выявило, что наиболее существенные изменения у пациентов происходят в клеточном звене иммунитета (рис. 4.1.2.1).

Нарушения популяционного состава лимфоцитов были представлены достоверным ($p < 0{,}01$) снижением содержания тотальных, ранних и термостабильных Е-РОК. Дискооперация основных субпопуляций иммунокомпетентных клеток проявилась снижением числа CD4-позитивных лимфоцитов и уменьшением иммунорегуляторного индекса.

Отмечено, что изменения клеточного звена иммунитета в большей степени выражены при силикозе и антракосиликозе, чем при пневмокониозе от воздействия токсико-аллергенного аэрозоля. Так, количество термостабильных Е-РОК при силикозе (антракосиликозе) в сравнении с показателем здоровых лиц существенно снижено – до $0{,}46 \pm 0{,}07 \times 10^9$/л при норме $0{,}89 \pm 0{,}09 \times 10^9$/л ($p < 0{,}01$). Достоверное уменьшение количества $CD4^+$-лимфоцитов выявлено только у больных со II стадией пневмокониоза, в то время как при I стадии этот показатель не отличался от аналогичного у группы здоровых лиц.

Угнетение клеточного звена также более выражено при узелковой форме заболевания, чем при интерстициальной. Содержание CD4-позитивных клеток при узелковой форме в сравнении со здоровыми лицами снижается достоверно ($p < 0{,}05$) до $0{,}34 \pm 0{,}097 \times 10^9$/л, при интерстициальной форме этого не происходит.

Нарушения гуморального звена иммунитета проявлялись у больных пневмокониозами значимым ($p < 0{,}01$) снижением содержания в сыворотке крови IgM.

Активацию фагоцитоза при этом заболевании можно объяснить тем, что поглотившие пылевые частицы альвеолярные макрофаги (кониофаги) выделяют фактор хемотаксиса для моноцитов с целью восполнить свои резервы. Повышение фагоцитарной функции было достоверным лишь в подгруппе с силикозом (антракосиликозом). Это может свидетельствовать о том, что наиболее агрессивные виды пыли приводят к более выраженной гиперпродукции альвеолярными макрофагами вышеупомянутого хемотаксического фактора.

В целом по группе содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) при пневмокониозе не было изменено ($58{,}36 \pm 6{,}43$ усл. ед.). Однако в подгруппе с силикозом и антракосиликозом этот показатель имел тенденцию к повышению, составляя $67{,}44 \pm 9{,}80$ усл. ед., что отражает более частую встречаемость при этом виде пневмокониоза III (иммунокомплексного) типа иммунопатологических реакций.

Выявленные нарушения иммунного ответа у пациентов с пневмокониозами подтверждаются данными других исследователей о главенствующей роли иммунопатологии в развитии и прогрессировании кониотического процесса, а также о настоятельной необходимости иммунокорригирующих воздействий при этом заболевании с учетом особенностей течения процесса.

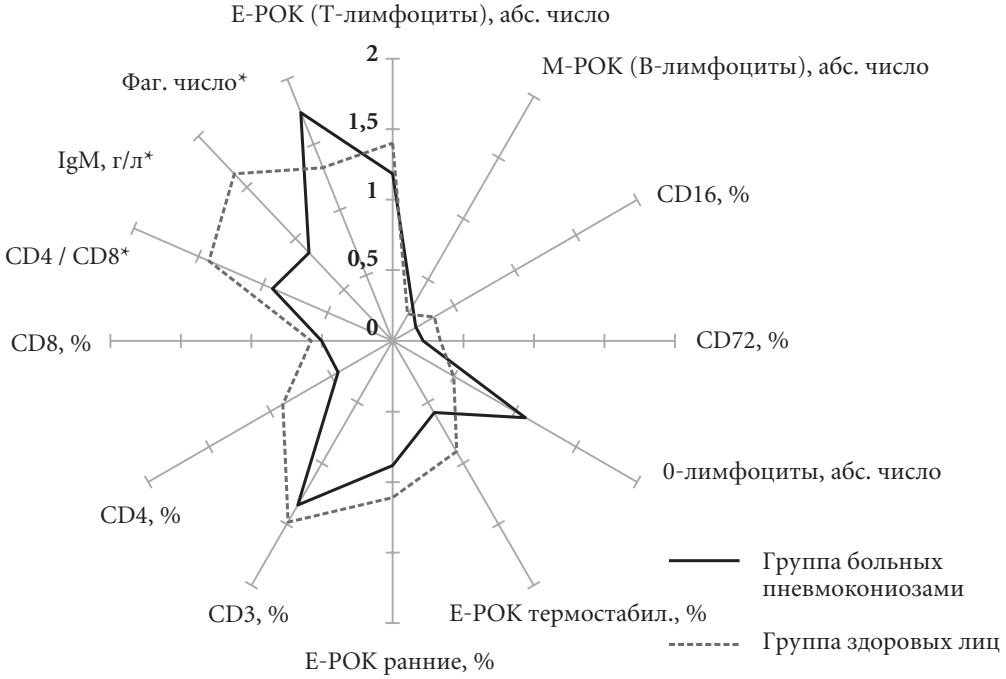


Рис. 4.1.2.1. **Некоторые показатели иммунитета у больных пневмокониозами в сравнении с группой здоровых доноров**

*Достоверные ($p < 0,05$) отличия между группами.

При сравнительном анализе иммунного статуса больных пневмокониозами до начала лечения отдельно в первой (АФП) и во второй (плацебо) группах выявлено достоверное увеличение концентрации IgM в группе АФП и повышенное содержание моноцитов в группе плацебо (табл. 4.1.2.1).

Из таблицы 4.1.2.1 следует, что общим для пациентов обеих групп являлось изменение иммунологических показателей, отражающее картину вторичного иммунодефицита. В частности, показано снижение количества Th ($CD4^+$), нарушение функциональной активности Т-лимфоцитов (снижение количества ранних и теофиллинрезистентных Е-РОК) и В-лимфоцитов с рецепторами для эритроцитов мыши (М-РОК), инверсия индекса метаболической активности фагоцитов. Также выявлено повышенное содержание ЦИК. Перечисленные нарушения иммунитета отражают общую картину развития иммунокомплексной патологии относительно показателей условной физиологической нормы. По гематологическим и биохимическим показателям достоверная разница в группах выявлена только в случае количественной оценки щелочной фосфотазы ($p < 0,05$), причем уровень последней был выше в группе АФП.

При анализе результатов иммунологического обследования пациентов в группе АФП до и после лечения нами установлено достоверное ($p < 0,05$) снижение и нормализация уровня циркулирующих иммунных комплексов после проведенного лечения (табл. 4.1.2.3, рис. 4.1.2.2а). В группе плацебо этот показатель не претерпел сколько-нибудь существенных изменений.

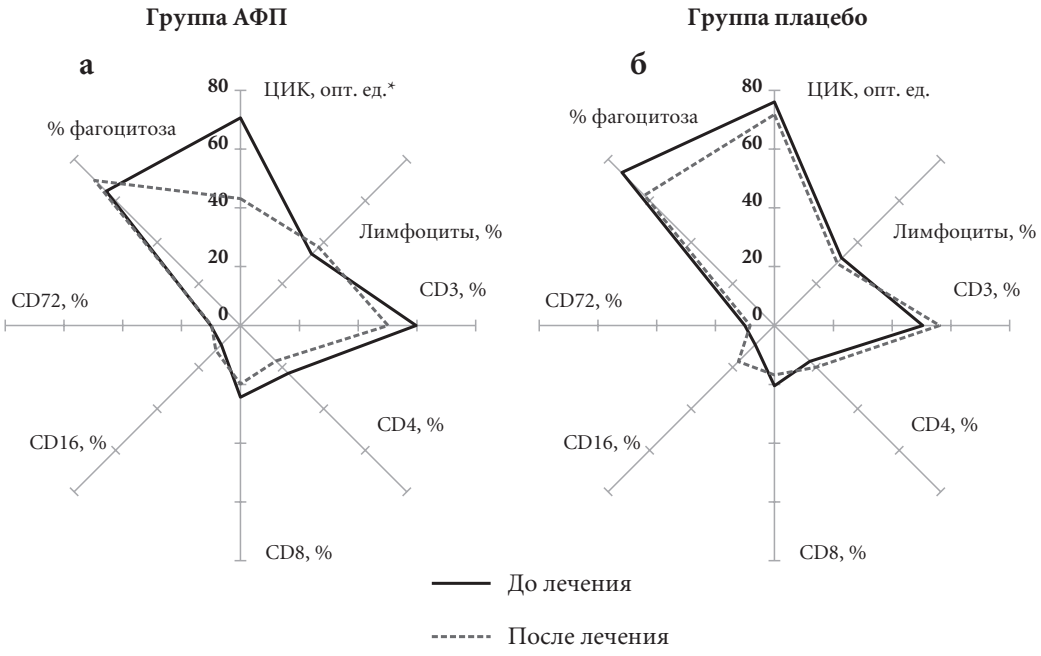


Рис. 4.1.2.2. **Иммунологические показатели у больных пневмокониозами до и после лечения**

*Опт. ед. – оптические единицы; достоверное отличие по t-критерию Стьюдента.

Поскольку III (иммунокомплексный) тип иммунопатологических реакций является одним из ведущих в развитии пневмокониозов, вызванных различными видами пыли, то снижение уровня ЦИК под влиянием АФП следует расценивать как воздействие препарата на одно из ключевых патогенетических звеньев заболевания.

После лечения АФП у больных отмечены некоторые позитивные изменения гемограммы венозной крови. В частности, достоверно увеличилось количество сегментоядерных нейтрофилов и возросла концентрация общего белка в сыворотке крови, отмечены достоверные изменения численности моноцитов – снижение их процентного и абсолютного содержания (табл. 4.1.2.4). Данные тестов, отражающих активность иммунной системы, фиксируют нормализацию концентрации ЦИК, и обращает на себя внимание тенденция к восстановлению индекса метаболической и функциональной активности фагоцитирующих клеток ($p > 0{,}05$).

При сравнении общих показателей до и после лечения в группе плацебо нами не установлено каких-либо отличий между исследуемыми параметрами иммунной системы (табл. 4.1.2.9). При этом после проведенного лечения отмечено достоверное ($p < 0{,}05$) увеличение процентного содержания моноцитов, а также количества тромбоцитов (табл. 4.1.2.10). Помимо этого показано усиление инверсии НСТ-теста за счет стимулированной редукции, увеличение количества моноцитов в капиллярной крови, а также рост числа Т-клеток, чувствительных к теофиллину.

Поскольку в настоящее время в развитии пневмокониоза доказана патологическая роль «дыхательного (или респираторного) взрыва», происходящего в альвеолярных макрофагах при поглощении пылевых частиц [48, 49], то вышеуказанные изменения иммунограммы и гемограммы следует расценивать как отражение непрерывного развития заболевания в контрольной группе и торможение его на уровне мононуклеарных клеток в основной группе.

Наряду с гематологическим и иммунологическим улучшениями отмечены положительные клинические сдвиги, выражающиеся в более быстром уменьшении таких проявлений заболевания, как одышка, кашель, слабость и недомогание. При спирографическом исследовании выявились объективные позитивные изменения вентиляционной функции легких, в основном за счет увеличения скоростных показателей ($ОФВ_1$/ЖЕЛ, МОС 25, МОС 50, МОС 75). Так, у больных в группе АФП число дыхательных движений в 1 мин в покое и при незначительной физической нагрузке снизилось в среднем на 21,3%. У 72% больных увеличилась жизненная емкость легких в среднем на 42,3% и повысился показатель пробы Тиффно на 37,4%, возросла мощность выдоха в среднем на 48,3%, улучшились показатели на уровне мелких, средних и крупных бронхов в среднем на 44,4% (рис. 4.1.2.3б, табл. 4.1.2.13). Последний факт, вероятно, объясняется не столько иммуномодулирующим эффектом АФП, сколько нормализующим воздействием препарата на простагландиновый обмен [284, 285]. Именно снижением уровня $ПГF_{2\alpha}$, способствующего развитию бронхоспастических явлений, и можно объяснить улучшение вентиляционной функции легких при лечении.

Достоверное ($p < 0,05$) нарастание общего белка сыворотки крови в основной группе (АФП) и отсутствие динамики этого показателя в контроле (плацебо) являются свидетельством анаболического эффекта препарата.

Таким образом, установлено положительное воздействие АФП на показатели иммунитета (снижение уровня ЦИК, нормализующее влияние на содержание моноцитов).

На основании полученных результатов мы пришли к следующим заключениям:

1. Нарушения иммунного ответа при пневмокониозах представлены угнетением Т-клеточного звена, снижением уровня IgM и активацией фагоцитоза. Вторичный иммунодефицит в большей степени выражен при силикозе (антракосиликозе), чем при пневмокониозе от воздействия токсико-аллергенного аэрозоля; он более глубок при узелковой форме, чем при интерстициальной, и нарастает при переходе из I во II стадию заболевания.

2. У больных пневмокониозами включение АФП в схему комплексного лечения способствует торможению иммунопатологических реакций I и III типов.

3. Улучшения вентиляционных показателей легких при лечении пневмокониозов АФП связаны, по-видимому, с нормализацией простагландинового обмена.

Таблица 4.1.2.1

Иммунологические показатели у больных пневмокониозами до начала лечения ($M \pm m$)

Показатель	Группа АФП до лечения ($n = 20$)	Группа плацебо до лечения ($n = 20$)
Лейкоциты, в 1 мкл	7 485,71 ± 736,7	7 800 ± 1 164,67
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,5 ± 0,75	3,6 ± 0,83
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	272,28 ± 68,45	267,2 ± 63,26
Сегментоядерные нейтрофилы, %	52,28 ± 3,161	52,7 ± 2,59
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	3 937,28 ± 487,79	4 101,8 ± 710,21
Моноциты, %	7,28 ± 0,99	11,3 ± 1,22*
Моноциты, в 1 мкл	571 ± 106,93	889,2 ± 143,51
Лимфоциты, %	33,64 ± 3,01	30,2 ± 2,17
Лимфоциты, в 1 мкл	2 445,57 ± 247,41	2 360,8 ± 408,04
Эозинофилы, %	3,29 ± 0,74	2,1 ± 0,69
Эозинофилы, в 1 мкл	259,57 ± 68,09	176 ± 74,69
Е-РОК тотальные, %	51,833 ± 2,93	47,4 ± 4,19
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	1 276,46 ± 187,86	1 063,16 ± 161,74
Ранние Е-РОК, %	34,75 ± 2,8 ↓	30,8 ± 4,53 ↓
Термостабил. Е-РОК, %	25,58 ± 3,1	22,5 ± 3,16
Теоф. резистентные, %	40,92 ± 3,862 ↓	39,9 ± 4,97 ↓
Е-РОК в контрол. пробе, %	44,58 ± 4,54	37,4 ± 5,67
Т-активин чувствительные (5 мг/мл), %	37,5 ± 6,59	42,78 ± 6,79
Т-активин чувствительные (0,5 мг/мл), %	29,25 ± 6,37	40,11 ± 5,14
М-РОК, %	11 ± 1,78	9,7 ± 1,19
М-РОК, в 1 мкл	279,61 ± 61,79 ↓	219,36 ± 40,86 ↓
0-клетки, %	37,17 ± 2,15	42,9 ± 4,46
0-клетки, в 1 мкл	931,76 ± 110,28	1 078,27 ± 251,74
$CD3^+$, %	60 ± 3,08	49,2 ± 4,55 ↓
$CD3^+$, в 1 мкл	1 405,91 ± 221,89	1 115,64 ± 191,42
$CD4^+$, %	21,7 ± 3,3 ↓	16,3 ± 4,53 ↓
$CD4^+$, в 1 мкл	530,68 ± 120,16	346 ± 79,79
$CD8^+$, %	26,33 ± 4,87	18,67 ± 3,56 ↓
$CD8^+$, в 1 мкл	612,34 ± 178,31	520,87 ± 172,21
$CD16^+$, %	10,67 ± 1,78	8,8 ± 1,89
$CD16^+$, в 1 мкл	212,56 ± 59,56	212,39 ± 58,18
$CD72^+$, %	10,7 ± 1,62	7,8 ± 1,06

Окончание таблицы 4.1.2.1

Показатель	Группа АФП до лечения ($n = 20$)	Группа плацебо до лечения ($n = 20$)
$CD72^+$, в 1 мкл	237,038 ± 45,93	158,08 ± 15,05
$CD11^+$, %	15,5 ± 4,17	11,9 ± 1,57 ↓
$CD11^+$, в 1 мкл	336,5 ± 157,05	280,19 ± 60,94
$HLA\text{-}DR^+$, %	9,75 ± 2,46	14,7 ± 2,18
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	159,5 ± 36,35	337,30 ± 67,32
IgG, г/л	13,55 ± 1,68	10,19 ± 2
IgA, г/л	2,35 ± 0,5	2,33 ± 0,48
IgM, г/л	1,14 ± 0,17	0,61 ± 0,07* ↓
Процент фагоцитоза	65,8 ± 3,86	69,73 ± 4,85
Фагоцитарный индекс	2,19 ± 0,15	2,56 ± 0,33 ↓
Фагоцитарное число	1,49 ± 0,17	1,91 ± 0,354 ↑
НСТ-сп, опт. ед.	0,169 ± 0,02	0,134 ± 0,017
НСТ-ст, опт. ед.	0,145 ± 0,02	0,119 ± 0,018
НСТ-ст / НСТ-сп	0,97 ± 0,14 инверсия ↓	0,951 ± 0,129 инверсия ↓
ЦИК, усл. ед.	68,58 ± 13,99 ↑	72,8 ± 7,08 ↑

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.
Примечание. Стрелками (↑↓) обозначены изменения величины параметра относительно физиологической нормы.

Таблица 4.1.2.2

Лабораторные показатели у больных пневмокониозами до лечения ($M \pm m$)

Показатели	Группа АФП до лечения $n = 20$)	Группа плацебо до лечения ($n = 20$)
Клинический анализ крови		
Гемоглобин, г/л	144,8 ± 5,379	146 ± 3,617
Эритроциты × 10^{12}/л	4,61 ± 0,135	4,556 ± 0,096
Лейкоциты × 10^9/л	5,35 ± 0,504	6,067 ± 0,612
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1,5 ± 0,477	1,111 ± 0,564
Сегментоядерные нейтрофилы, %	53,8 ± 2,687	58,667 ± 3,371
Лимфоциты, %	37,2 ± 1,867	32,778 ± 2,862
Эозинофилы, %	3,7 ± 1,239	2,222 ± 0,547
Моноциты, %	4,4 ± 1,024	5,222 ± 1,152
Тромбоциты × 10^9/л	263,75 ± 14,3	271,5 ± 38,5
Биохимический анализ крови		
СОЭ, мм/ч	5,1 ± 1,038	4,333 ± 0,764
Глюкоза, ммоль/л	5,82 ± 0,42	4,52 ± 0,43

Окончание таблицы 4.1.2.2

Показатели	Группа АФП до лечения ($n = 20$)	Группа плацебо до лечения ($n = 20$)
Биохимический анализ крови		
Общий холестерин, ммоль/л	18,14 ± 13,64	4,28 ± 0,12
АЛТ, ммоль/(ч. л.)	0,299 ± 0,03	0,29 ± 0,039
АСТ, ммоль/(ч. л.)	0,207 ± 0,02	0,203 ± 0,02
Общий белок, г/л	69,94 ± 3,24	65,88 ± 2,33
СРБ, мг/мл	0	0
Сулемовая проба, %	91,25 ± 2,43	86,28 ± 2,83
Тимоловая проба, ед.	2,75 ± 0,89	2,75 ± 0,56
Билирубин общий, ммоль/л	13,96 ± 0,84	13,78 ± 0,928
Креатинин, мкмоль/л	0,08 ± 0,011	0,06 ± 0,003
ЩФ, ммоль/(ч. л.)	2,2 ± 0,1	1,06 ± 0,237*

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 4.1.2.3

Изменение иммунологических показателей у больных пневмокониозами в результате применения АФП ($M \pm m$)

Показатели	Группа АФП до лечения ($n = 20$)	Группа АФП после лечения ($n = 20$)
Лейкоциты, в 1 мкл	7 485,71 ± 736,7	6 983 ± 798,66
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,5 ± 0,75	3 ± 0,58
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	272,29 ± 68,45	230,5 ± 63,71
Сегментоядерные нейтрофилы, %	52,29 ± 3,16	51,67 ± 2,58
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	3 937,29 ± 487,79	3 596,83 ± 444,6
Моноциты, %	7,29 ± 0,99	6 ± 0,82
Моноциты, в 1 мкл	571 ± 106,93	394,67 ± 56,37
Лимфоциты, %	33,64 ± 3,07	35,75 ± 2,66
Лимфоциты, в 1 мкл	2 445,57 ± 247,41	2 493,83 ± 289,02
Эозинофилы, %	3,29 ± 0,74	3,58 ± 0,94
Эозинофилы, в 1 мкл	259,57 ± 68,09	267,5 ± 103,76
Е-РОК тотальные, %	51,83 ± 2,93	54 ± 2,83
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	1 276,46 ± 187,86	1 353,67 ± 186,68
Ранние Е-РОК, %	34,75 ± 2,8 ↓	35,83 ± 4,56 ↓
Термостабил. Е-РОК, %	25,58 ± 3,1	24 ± 2,03
Теоф. резистентные, %	40,92 ± 3,86 ↓	41,92 ± 2,11 ↓

Окончание таблицы 4.1.2.3

Показатели	Группа АФП до лечения (n = 20)	Группа АФП после лечения (n = 20)
Е-РОК в контрольной пробе, %	44,58 ± 4,55	37,4 ± 5,67
Т-активин чувствит. (5 мг/мл), %	37,5 ± 6,59	32 ± 3,41
Т-активин чувствит. (0,5 мг/мл), %	29,25 ± 6,37	37,2 ± 6,35
М-РОК, %	11 ± 1,77	11 ± 1,29
М-РОК, в 1 мкл	279,61 ± 61,79 ↓	260,27 ± 35,49 ↓
0-клетки, %	37,17 ± 2,15	35 ± 2,64
0-клетки, в 1 мкл	931,76 ± 110,28	879,89 ± 134,18
$CD3^+$, %	60 ± 3,09	48,83 ± 6,27 ↓
$CD3^+$, в 1 мкл	1 405,91 ± 221,89	920,83 ± 150,13
$CD4^+$, %	21,7 ± 3,3 ↓	18,2 ± 6,29 ↓
$CD4^+$, в 1 мкл	530,68 ± 120,16	382,66 ± 127,55
$CD8^+$, %	26,33 ± 4,88	21 ± 4,99
$CD8^+$, в 1 мкл	612,34 ± 178,31	449,47 ± 69,63
$CD16^+$, %	10,67 ± 1,78	12 ± 0,91
$CD16^+$, в 1 мкл	212,56 ± 59,56	270,86 ± 37,29
$CD72^+$, %	10,7 ± 1,62	10,167 ± 2,99
$CD72^+$, в 1 мкл	237,04 ± 45,94	152,55 ± 39,27
$CD11^+$, %	15,5 ± 4,17	11 ± 4,45 ↓
$CD11^+$, в 1 мкл	336,5 ± 157,05	233,75 ± 74,22
$HLA\text{-}DR^+$, %	9,75 ± 2,46	9 ± 1,68
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	159,5 ± 36,35	220,25 ± 49,22
IgG, г/л	13,55 ± 1,68	9,96 ± 1,25
IgA, г/л	2,35 ± 0,5	1,96 ± 0,29
IgM, г/л	1,14 ± 0,17	1,15 ± 0,23
Процент фагоцитоза	65,8 ± 3,86	70,02 ± 2,87
Фагоцитарный индекс	2,19 ± 0,15	2,37 ± 0,17 ↑
Фагоцитарное число	1,49 ± 0,17	1,72 ± 0,17 ↑
НСТ-сп, опт. ед.	0,169 ± 0,024	0,198 ± 0,059
НСТ-ст, опт. ед.	0,145 ± 0,021	0,215 ± 0,048
НСТ-ст / НСТ-сп	0,98 ± 0,136 инверсия ↓	1,492 ± 0,379
ЦИК, усл. ед.	68,58 ± 13,99 ↑	41,85 ± 6,92*
НСТ-ст / НСТ-сп	0,98 ± 0,136 инверсия ↓	1,492 ± 0,379
ЦИК, усл. ед.	68,58 ± 13,99 ↑	41,85 ± 6,92*

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Примечание. Стрелками (↑↓) обозначены изменения величины параметра относительно физиологической нормы.

Таблица 4.1.2.4

Изменение лабораторных показателей у больных пневмокониозами в группе АФП ($M \pm m$)

Показатели	Группа АФП до лечения ($n = 20$)	Группа АФП после лечения ($n = 20$)
Клинический анализ крови		
Гемоглобин, г/л	144,8 ± 5,379	145,2 ± 3,741
Эритроциты х 10^{12}/л	4,61 ± 0,135	4,6 ± 0,088
Лейкоциты х 10^9/л	5,35 ± 0,504	4,98 ± 0,297
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1,5 ± 0,477	11 ± 0,298
Сегментоядерные нейтрофилы, %	53,8 ± 2,687	59,9 ± 1,479*
Лимфоциты, %	37,2 ± 1,867	33,6 ± 1,746
Эозинофилы, %	3,7 ± 1,239	1,8 ± 0,573
Моноциты, %	4,4 ± 1,024	3,7 ± 0,803
Тромбоциты × 10^9/л	263,75 ± 14,308	321,667 ± 37,676
СОЭ, мм/ч	5,1 ± 1,038	5,3 ± 0,731
Биохимический анализ крови		
Глюкоза, ммоль/л	5,822 ± 0,418	5,338 ± 0,225
Общий холестерин, ммоль/л	18,143 ± 13,644	4,28 ± 0,124
АЛТ, ммоль/(ч. л.)	0,299 ± 0,03	0,269 ± 0,034
АСТ, ммоль/(ч. л.)	0,207 ± 0,02	0,205 ± 0,029
Общий белок, г/л	69,938 ± 3,259	73,163 ± 2,911*
СРБ, мг/мл	0	0
Сулемовая проба, %	91,25 ± 2,428	86 ± 2,345
Тимоловая проба, ед.	2,75 ± 0,896	2,225 ± 0,764
Билирубин общий, ммоль/л	13,956 ± 0,835	14,963 ± 1,234
Мочевина, ммоль/л	6,4 ± 1,2	5,6 ± 1,3
Креатинин, мкмоль/л	0,081 ± 0,011	0,07 ± 0,02
ЩФ, ммоль/(ч. л.)	2,2 ± 0,1	1,9 ± 0,3

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 4.1.2.5

Изменение иммунологических показателей у больных пневмокониозами в группе плацебо ($M \pm m$)

Показатель	Группа плацебо до лечения ($n = 20$)	Группа плацебо после лечения ($n = 20$)
Лейкоциты, в 1 мкл	7 800 ± 1 164,67	6 971,43 ± 1 032,27
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,6 ± 0,83	3,14 ± 0,77
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	267,2 ± 63,26	186,57 ± 43,72
Сегментоядерные нейтрофилы, %	52,7 ± 2,59	56 ± 5,35
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	4 101,8 ± 710,21	3 911,43 ± 770,07
Моноциты, %	11,3 ± 1,22	11,57 ± 3,42
Моноциты, в 1 мкл	889,2 ± 143,51	834,29 ± 252,87
Лимфоциты, %	30,2 ± 2,17	27,43 ± 4,19
Лимфоциты, в 1 мкл	2 360,8 ± 408,04	1 905,43 ± 309,28
Эозинофилы, %	2,1 ± 0,69	1,86 ± 0,46
Эозинофилы, в 1 мкл	176 ± 74,67	133,71 ± 33,79
Е-РОК тотальные, %	47,4 ± 4,19	53,57 ± 2,09
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	1 063,168 ± 161,74	1 023,67 ± 169,84
Ранние Е-РОК, %	30,8 ± 4,53 ↓	35 ± 8,24 ↓
Термостабил. Е-РОК, %	22,5 ± 3,16	32,43 ± 5,74
Теоф. чувствительные, %	2,5 ± 4,97	7,43 ± 4,66*
Теоф. резистентные, %	39,9 ± 4,97 ↓	41,14 ± 5,974 ↓
Теоф. резистент. / теоф. чувствит.	15,96 ± 6,61 ↑	5,54 ± 5,83
Т-активин чувствительные (5 мг/мл), %	42,778 ± 6,79	51,43 ± 8,86
Т-активин чувствительные (0,5 мг/мл), %	40,11 ± 5,14	47,14 ± 5,47
М-РОК, %	9,7 ± 1,19	9 ± 0,44
М-РОК, в 1 мкл	219,36 ± 40,86 ↓	170,72 ± 30,81 ↓
0-клетки, %	42,9 ± 4,47	37,43 ± 2,01
0-клетки, в 1 мкл	1 078,27 ± 251,74	711,03 ± 121,78
$CD3^+$, %	49,2 ± 4,55 ↓	54 ± 3,53 ↓
$CD3^+$, в 1 мкл	1 115,64 ± 191,42	1 020,12 ± 173,05
$CD4^+$, %	16,3 ± 4,54 ↓	19,86 ± 2,52 ↓
$CD4^+$, в 1 мкл	346 ± 79,79	385,8 ± 91,85
$CD8^+$, %	18,67 ± 3,56 ↓	17,33 ± 3,23 ↓
$CD8^+$, в 1 мкл	520,87 ± 172,21	284,93 ± 72,26
$CD16^+$, %	8,8 ± 1,89	13,4 ± 5,51
$CD16^+$, в 1 мкл	212,39 ± 58,18	269,34 ± 117,48

Окончание таблицы 4.1.2.5

Показатель	Группа плацебо до лечения ($n = 20$)	Группа плацебо после лечения ($n = 20$)
$CD72^+$, %	7,8 ± 1,06	7,14 ± 1,1
$CD72^+$, в 1 мкл	158,08 ± 15,05	127,49 ± 26,36
$CD11^+$, %	11,9 ± 1,57 ↓	9,83 ± 1,05 ↓
$CD11^+$, в 1 мкл	280,19 ± 60,94	170,71 ± 35,28
CD 95^+, %	4,57 ± 1,23 ↑	2 ± 1
CD 95^+, в 1 мкл	128,7 ± 58,76	17,28 ± 3,06*
HLA-DR^+, %	14,7 ± 2,181	15,4 ± 2,8
HLA-DR^+, в 1 мкл	337,3 ± 67,32	234,36 ± 57,52
IgG, г/л	10,19 ± 2	10 ± 2,19
IgA, г/л	2,33 ± 0,49	1,92 ± 0,2
IgM, г/л	0,614 ± 0,076 ↓	0,63 ± 0,05 ↓
Процент фагоцитоза	69,73 ± 4,85	61,5 ± 7,31
Фагоцитарный индекс	2,56 ± 0,33 ↑	2,33 ± 0,26 ↑
Фагоцитарное число	1,91 ± 0,35 ↑	1,54 ± 0,36 ↑
НСТ-сп, опт. ед.	0,134 ± 0,017	0,122 ± 0,02
НСТ-ст, опт. ед.	0,119 ± 0,018	0,138 ± 0,018*
НСТ-ст / НСТ-сп	0,951 ± 0,129 инверсия ↓	1,26 ± 0,18
ЦИК, усл. ед.	72,8 ± 7,08 ↑	71 ± 9,45 ↑

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Примечание. Стрелками (↑↓) обозначены изменения величины параметра относительно физиологической нормы.

Таблица 4.1.2.6

Изменение лабораторных показателей у больных пневмокониозами ($M \pm m$)

Показатель	Группа плацебо до лечения ($n = 20$)	Группа плацебо после лечения ($n = 20$)
Клинический анализ крови		
Гемоглобин, г/л	146 ± 3,617	149,444 ± 4,747
Эритроциты $\times 10^{12}$/л	4,556 ± 0,096	4,678 ± 0,126
Лейкоциты $\times 10^9$/л	6,067 ± 0,612	6,344 ± 0,991
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1,111 ± 0,564	0,889 ± 0,309
Сегментоядерные нейтрофилы, %	58,667 ± 3,371	54,889 ± 3,155
Лимфоциты, %	32,778 ± 2,862	31,889 ± 2,214
Эозинофилы, %	2,222 ± 0,547	2,889 ± 1,218
Моноциты, %	5,222 ± 1,152	7,889 ± 0,484*
Тромбоциты $\times 10^9$/л	271,5 ± 38,5	394,0 ± 36

Окончание таблицы 4.1.2.6

Показатель	Группа плацебо до лечения ($n = 20$)	Группа плацебо после лечения ($n = 20$)
Клинический анализ крови		
СОЭ, мм/ч	4,333 ± 0,764	3,667 ± 0,687
Биохимический анализ крови		
Глюкоза, ммоль/л	4,517 ± 0,425	4,42 ± 0,335
АЛТ, ммоль/(ч. л.)	0,294 ± 0,039	0,336 ± 0,048
АСТ, ммоль/(ч. л.)	0,203 ± 0,021	0,213 ± 0,02
Общий белок, г/л	65,875 ± 2,334	69,629 ± 2,143
Сиаловые кислоты, мг/л	128,75 ± 5,154	140,667 ± 5,207
Сулемовая проба, %	86,286 ± 2,834	85 ± 2,204
Тимоловая проба, ед.	2,757 ± 0,564	3,414 ± 0,914
Билирубин общий, ммоль/л	13,783 ± 0,928	13,183 ± 1,042
Креатинин, мкмоль/л	0,06 ± 0,003	0,07 ± 0,01
ЩФ, ммоль/(ч. л.)	1,06 ± 0,237	0,775 ± 0,075

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 4.1.2.7

Иммунологические показатели больных пневмокониозами, пролеченных АФП ($M \pm m$)

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения ($n = 40$)	Группа АФП после лечения ($n = 20$)
Лейкоциты, в 1 мкл	762 ± 633,36	698 ± 798,66
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,54 ± 0,55	3 ± 0,58
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	270,17 ± 46,87	230,5 ± 63,71
Сегментоядерные нейтрофилы, %	52,46 ± 2,09	51,67 ± 2,58
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	4 005,83 ± 401,22	3 596,83 ± 444,6
Моноциты, %	8,96 ± 0,85	6 ± 0,82*
Моноциты, в 1 мкл	703,58 ± 90,54	394,67 ± 56,37*
Лимфоциты, %	32,21 ± 2,01	35,75 ± 2,65
Лимфоциты, в 1 мкл	2 410,25 ± 217,72	2 493,83 ± 289,02
Эозинофилы, %	2,79 ± 0,52	3,58 ± 0,94
Эозинофилы, в 1 мкл	224,75 ± 50,12	267,5 ± 103,76
Е-РОК тотальные, %	49,82 ± 2,47	54 ± 2,83
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	1 179,51 ± 125,37	1 353,67 ± 186,68
Ранние Е-РОК, %	32,96 ± 2,53 ↓	35,833 ± 4,56 ↓

Продолжение таблицы 4.1.2.7

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения (n = 40)	Группа АФП после лечения (n = 20)
Термостабильные Е-РОК, %	24,18 ± 2,19	24 ± 2,03
Термостабильные Е-РОК, %	24,18 ± 2,19	24 ± 2,03
Теоф. резистентные, %	40,46± 3,02 ↓	41,92 ± 2,12 ↓
Теоф. чувствит., %	46,8 ± 3,87 ↑	35,92 ± 1,02 ↑
Т-активин чувствительные (5 мг/мл), %	41,15 ± 5,01	32 ± 3,41
Т-активин чувствительные (0,5 мг/мл), %	36,77 ± 4,17	37,2 ± 6,35
М-РОК, %	10,41 ± 1,09	11 ± 1,29
М-РОК, в 1 мкл	252,22 ± 38,19 ↓	260,27 ± 35,49 ↓
0-клетки, %	39,77 ± 2,36	35 ± 2,64
0-клетки, в 1 мкл	998,36 ± 126,782	879,89 ± 134,18
$CD3^+$, %	54,6 ± 2,95 ↓	48,83 ± 6,27 ↓
$CD3^+$, в 1 мкл	1 260,78 ± 146,45	920,83 ± 150,13
$CD4^+$, %	19 ± 2,8 ↓	18,2 ± 6,29 ↓
$CD4^+$, в 1 мкл	438,34 ± 73,32	382,66 ± 127,55
$CD8^+$, %	21,73 ± 2,96	21 ± 4,99
$CD8^+$, в 1 мкл	557,46 ± 121,87	449,47 ± 69,63
$CD16^+$, %	9,5 ± 1,34	12 ± 0,91
$CD16^+$, в 1 мкл	212,46 ± 41,38	270,86 ± 37,29
$CD72^+$, %	9,25 ± 1	10,67 ± 2,99
$CD72^+$, в 1 мкл	197,56 ± 25,2	152,55 ± 39,27
$CD11^+$, %	12,93 ± 1,6 ↓	11 ± 4,45 ↓
$CD11^+$, в 1 мкл	296,28 ± 59,27	233,75 ± 74,22
$HLA\text{-}DR^+$, %	13,29 ± 1,71	9 ± 1,68
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	286,5 ± 53,15	220,25 ± 49,22
IgG, г/л	12,15 ± 1,31	9,96 ± 1,25
IgA, г/л	2,34 ± 0,35	1,96 ± 0,29
IgM, г/л	0,92 ± 0,12 ↓	1,15 ± 0,23
Процент фагоцитоза	67,44 ± 2,99	70,01 ± 2,86
Фагоцитарный индекс	2,35 ± 0,16 ↑	2,373 ± 0,17 ↑
Фагоцитарное число	1,67 ± 0,18 ↑	1,715 ± 0,17 ↑
НСТ-сп, опт. ед.	0,153 ± 0,015	0,198 ± 0,059
НСТ-ст, опт. ед.	0,134 ± 0,014	0,215 ± 0,048

Окончание таблицы 4.1.2.7

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения (n = 40)	Группа АФП после лечения (n = 20)
НСТ-ст/НСТ-сп	0,965 ± 0,093 инверсия ↓	1,49 ± 0,379
ЦИК, усл. ед.	55,3 ± 5,86	41,85 ± 6,92

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.
Примечание. Стрелками (↑↓) обозначены изменения величины параметра относительно физиологической нормы.

Таблица 4.1.2.8

Лабораторные показатели у больных пневмокониозами, пролеченных АФП ($M \pm m$)

Показатель	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения (n = 40)	Группа АФП после лечения (n = 20)
Клинический анализ крови		
Гемоглобин, г/л	145,368 ± 3,223	145,2 ± 3,741
Эритроциты × 10^{12}/л	4,584 ± 0,082	4,6 ± 0,088
Лейкоциты × 10^9/л	5,689 ± 0,391	4,98 ± 0,297
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1,316 ± 0,359	1 ± 0,298
Сегментоядерные нейтрофилы, %	56,105 ± 2,149	59,9 ± 1,479
Лимфоциты, %	35,105 ± 1,706	33,6 ± 1,746
Эозинофилы, %	3 ± 0,705	1,8 ± 0,573*
Моноциты, %	4,789 ± 0,752	3,7 ± 0,803
Тромбоциты × 10^9/л	266,333 ± 13,542	321,667 ± 37,676
СОЭ, мм/ч	4,737 ± 0,644	5,3 ± 0,731
Биохимический анализ крови		
Глюкоза, ммоль/л	5,3 ± 0,339	5,338 ± 0,225
АЛТ, ммоль/(ч. л.)	0,205 ± 0,014	0,269 ± 0,034
АСТ, ммоль/(ч. л.)	0,71 ± 0,008	0,205 ± 0,029
Общий белок, г/л	0,297 ± 0,024	73,163 ± 2,911
Сулемовая проба, %	77,906 ± 2,006	86 ± 2,345
Тимоловая проба, ед.	3,34 ± 0,814	2,225 ± 0,764
Билирубин общий, ммоль/л	20,205 ± 1,4	14,963 ± 1,234*
Сиаловые кислоты, мг/л	2,77 ± 0,457	2,225 ± 0,764
ЩФ, ммоль/(ч. л.)	1,386 ± 0,267	1,9 ± 0,3

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 4.1.2.9

Иммунологические показатели у больных пневмокониозами после лечения в группе плацебо

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения (*n* = 40)	Группа плацебо после лечения (*n* = 20)
Биохимический анализ крови		
Лейкоциты, в 1 мкл	762 ± 633,36	6 971,43 ± 1032,27
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,54 ± 0,55	3,14 ± 0,77
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	270,17 ± 46,87	186,57 ± 43,72
Сегментоядерные нейтрофилы, %	52,46 ± 2,09	56 ± 5,35
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	4 005,83 ± 401,22	3 911,43 ± 770,07
Моноциты, %	8,96 ± 0,85	11,57 ± 3,42
Моноциты, в 1 мкл	703,58 ± 90,54	834,29 ± 252,87
Лимфоциты, %	32,21 ± 2	27,43 ± 4,19
Лимфоциты, в 1 мкл	2 410,25 ± 217,72	1 905,43 ± 309,28
Эозинофилы, %	2,79 ± 0,52	1,86 ± 0,46
Эозинофилы, в 1 мкл	224,75 ± 50,12	133,71 ± 33,79
Е-РОК тотальные, %	49,82 ± 2,47	53,57 ± 2,09
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	1 179,51 ± 125,37	1 023,67 ± 169,84
Ранние Е-РОК, %	32,96 ± 2,53 ↓	35,0 ± 8,24 ↓
Термостабильные Е-РОК, %	24,18 ± 2,19	32,43 ± 5,74
Теоф. резистентные, %	40,46 ± 3,02 ↓	7,43 ± 4,66*
Теоф. чувствительные, %	46,80 ± 3,87 ↑	41,14 ± 5,97 ↓
Теоф. резистент. / Теоф. чувствит.	1,15 ± 0,74	5,54 ± 5,83
Т-активин чувствительные (5 мг/мл), %	41,15 ± 5,01	51,43 ± 8,86
Т-активин чувствительные (0,5 мг/мл), %	36,77 ± 4,17	47,14 ± 5,47
М-РОК, %	10,41 ± 1,09	9 ± 0,44
М-РОК, в 1 мкл	252,22 ± 38,19 ↓	170,72 ± 30,81 ↓
0-клетки, %	39,77 ± 2,36	37,43 ± 2,01
0-клетки, в 1 мкл	998,36 ± 126,782	711,03 ± 121,78
$CD3^+$, %	54,6 ± 2,95 ↓	54 ± 3,53 ↓
$CD3^+$, в 1 мкл	1 260,78 ± 146,45	1 020,12 ± 173,05
$CD4^+$, %	19 ± 2,8 ↓	19,86 ± 2,52 ↓
$CD4^+$, в 1 мкл	438,34 ± 73,32	385,8 ± 91,85
$CD8^+$, %	21,73 ± 2,96	17,33 ± 3,23 ↓

Окончание таблицы 4.1.2.9

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения ($n = 40$)	Группа плацебо после лечения ($n = 20$)
$CD8^+$, в 1 мкл	557,46 ± 121,87	284,93 ± 72,26
$CD16^+$, %	9,5 ± 1,34	13,4 ± 5,51
$CD16^+$, в 1 мкл	212,46 ± 41,38	269,34 ± 117,48
$CD72^+$, %	9,25 ± 1	7,14 ± 1,1
$CD72^+$, в 1 мкл	197,56 ± 25,2	127,49 ± 26,36
$CD11^+$, %	12,93 ± 1,6 ↓	9,83 ± 1,05 ↓
$CD11^+$, в 1 мкл	296,28 ± 59,27	170,71 ± 35,28
HLA-DR^+, %	13,29 ± 1,71	2 ± 1
HLA-DR^+, в 1 мкл	286,5 ± 53,15	17,28 ± 3,06*
IgG, г/л	12,15 ± 1,31	10 ± 2,19
IgA, г/л	2,34 ± 0,35	1,92 ± 0,2
IgM, г/л	0,92 ± 0,12 ↓	0,63 ± 0,05 ↓
Процент фагоцитоза	67,44 ± 2,99	61,5 ± 7,31
Фагоцитарный индекс	2,35 ± 0,16 ↑	2,33 ± 0,26 ↑
Фагоцитарное число	1,67 ± 0,18 ↑	1,54 ± 0,36 ↑
НСТ-сп, опт. ед.	0,153 ± 0,015	0,122 ± 0,02
НСТ-ст, опт. ед.	0,134 ± 0,014	0,138 ± 0,018*
НСТ-ст/НСТ-сп	0,965 ± 0,093 инверсия ↓	1,26 ± 0,18
ЦИК, усл.ед.	55,3 ± 5,86	71 ± 9,45 ↑

*Достоверность различий между группами по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.
Примечание. Стрелками(↑↓) обозначены изменения величины параметра относительно физиологической нормы.

Таблица 4.1.2.10

Лабораторные показатели у больных пневмокониозами после лечения в группе плацебо ($M \pm m$)

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения ($n = 40$)	Группа плацебо после лечения ($n = 20$)
Клинический анализ крови		
Гемоглобин, г/л	145,368 ± 3,223	149,444 ± 4,747
Эритроциты × 10^{12}/л	4,584 ± 0,082	4,678 ± 0,126
Лейкоциты × 10^9/л	5,689 ± 0,391	6,344 ± 0,991
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1,316 ± 0,359	0,889 ± 0,309
Сегментоядерные нейтрофилы, %	56,105 ± 2,149	54,889 ± 3,155
Лимфоциты, %	35,105 ± 1,706	31,889 ± 2,214

Окончание таблицы 4.1.2.10

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения (n = 40)	Группа плацебо после лечения (n = 20)
Клинический анализ крови		
Эозинофилы, %	3 ± 0,705	2,889 ± 1,218
Моноциты, %	4,789 ± 0,752	7,889 ± 0,484*
Тромбоциты × 10^9/л	266,333 ± 13,542	394 ± 36*
СОЭ, мм/ч	4,737 ± 0,644	3,667 ± 0,687
Биохимический анализ крови		
Глюкоза, ммоль/л	5,3 ± 0,339	4,42 ± 0,335
АЛТ, ммоль/(ч. л.)	0,297 ± 0,024	0,336 ± 0,048
АСТ, ммоль/(ч. л.)	0,205 ± 0,014	0,213 ± 0,02
Общий белок, г/л	67,906 ± 2,006	69,629 ± 2,143
Сулемовая проба, %	88,091 ± 2,069	85 ± 2,204
Тимоловая проба, ед.	2,755 ± 0,457	3,414 ± 0,914
Билирубин общий, ммоль/л	13,887 ± 0,602	13,183 ± 1,042
Сиаловые кислоты, мг/л	133,0 ± 5,831	140,667 ± 5,207
ЩФ, ммоль/(ч. л.)	1,386 ± 0,267	0,775 ± 0,075

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 4.1.2.11

Иммунологические показатели у больных пневмокониозами после лечения ($M \pm m$)

Показатели	Группа АФП после лечения (n = 20)	Группа плацебо после лечения (n = 20)
Лейкоциты, в 1 мкл	698 ± 798,66	6 971,43 ± 1032,27
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3 ± 0,58	3,14 ± 0,77
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	230,5 ± 63,71	186,57 ± 43,72
Сегментоядерные нейтрофилы, %	51,67 ± 2,58	56 ± 5,35
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	3 596,83 ± 444,6	3 911,43 ± 770,07
Моноциты, %	6 ± 0,82*	11,57 ± 3,42
Моноциты, в 1 мкл	394,67 ± 56,37*	834,29 ± 252,87
Лимфоциты, %	35,75 ± 2,65	27,43 ± 4,19
Лимфоциты, в 1 мкл	2 493,83 ± 289,02	1 905,43 ± 309,28
Эозинофилы, %	3,58 ± 0,94	1,86 ± 0,46
Эозинофилы, в 1 мкл	267,5 ± 103,76	133,71 ± 33,79
Е-РОК тотальные, %	54 ± 2,83	53,57 ± 2,09

Окончание таблицы 4.1.2.11

Показатели	Группа АФП после лечения (n = 20)	Группа плацебо после лечения (n = 20)
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	1 353,67 ± 186,68	1 023,67 ± 169,84
Ранние Е-РОК, %	35,833 ± 4,56 ↓	35 ± 8,24 ↓
Термостабильные Е-РОК, %	24 ± 2,03	32,43 ± 5,74
Теоф. резистентные, %	40,12 ± 3,86 ↓	41,14 ± 5,974 ↓
Е-РОК в контрол. пробе, %	44,58 ± 4,54	48,57 ± 6,964
Т-активин чувствительные (5 мг/мл), %	32 ± 3,41	51,43 ± 8,86
Т-активин чувствительные (0,5 мг/мл), %	37,2 ± 6,35	47,14 ± 5,47
М-РОК, %	11 ± 1,29	9 ± 0,44
М-РОК, в 1 мкл	260,27 ± 35,49 ↓	170,72 ± 30,81 ↓
0-клетки, %	35 ± 2,64	37,43 ± 2,01
0-клетки, в 1 мкл	879,89 ± 134,18	711,03 ± 121,78
$CD3^+$, %	48,83 ± 6,27 ↓	54 ± 3,53 ↓
$CD3^+$, в 1 мкл	920,83 ± 150,13	1 020,12 ± 173,05
$CD4^+$, %	18,2 ± 6,29 ↓	19,86 ± 2,52 ↓
$CD4^+$, в 1 мкл	382,66 ± 127,55	385,8 ± 91,85
$CD8^+$, %	21 ± 4,99	17,33 ± 3,23 ↓
$CD8^+$, в 1 мкл	449,47 ± 69,63	284,93 ± 72,26
$CD16^+$, %	12 ± 0,91	13,4 ± 5,51
$CD16^+$, в 1 мкл	270,86 ± 37,29	269,34 ± 117,48
$CD72^+$, %	10,67 ± 2,99	7,14 ± 1,1
$CD72^+$, в 1 мкл	152,55 ± 39,27	127,49 ± 26,36
$CD11^+$, %	11 ± 4,45 ↓	9,83 ± 1,05 ↓
$CD11^+$, в 1 мкл	233,75 ± 74,22	170,71 ± 35,28
$HLA\text{-}DR^+$, %	9 ± 1,68	2 ± 1
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	220,25 ± 49,22	17,28 ± 3,06
IgG, г/л	9,96 ± 1,25	10 ± 2,19
IgA, г/л	1,96 ± 0,29	1,92 ± 0,2
IgM, г/л	1,15 ± 0,23	0,63 ± 0,05 ↓
Процент фагоцитоза	70,01 ± 2,86	61,5 ± 7,31
Фагоцитарный индекс	2,373 ± 0,17 ↑	2,33 ± 0,26 ↑
Фагоцитарное число	1,715 ± 0,17 ↑	1,54 ± 0,36 ↑
НСТ-сп, опт. ед.	0,198 ± 0,059	0,122 ± 0,02
НСТ-ст, опт. ед.	0,215 ± 0,048	0,138 ± 0,018
НСТ-ст/НСТ-сп	1,49 ± 0,379	1,26 ± 0,18
ЦИК, усл. ед.	41,85 ± 6,92*	71 ± 9,45 ↑

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Примечание. Стрелками (↑↓) отмечены изменения величины параметра относительно физиологической нормы.

Таблица 4.1.2.12

Лабораторные показатели у больных пневмокониозами после лечения ($M \pm m$)

Показатели	Группа АФП после лечения ($n = 20$)	Группа плацебо после лечения ($n = 20$)
Клинический анализ крови		
Гемоглобин, г/л	145,2 ± 3,741	149,444 ± 4,747
Эритроциты × 10^{12}/л	4,6 ± 0,088	4,678 ± 0,126
Лейкоциты × 10^9/л	4,98 ± 0,297	6,344 ± 0,991
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1 ± 0,298	0,889 ± 0,309
Сегментоядерные нейтрофилы, %	59,9 ± 1,479	54,889 ± 3,155
Лимфоциты, %	33,6 ± 1,746	31,889 ± 2,214
Эозинофилы, %	1,8 ± 0,573	2,889 ± 1,218
Моноциты, %	3,7 ± 0,803*	7,889 ± 0,484
Тромбоциты × 10^9/л	321,667 ± 37,676	394 ± 36
СОЭ, мм/ч	5,3 ± 0,731	3,667 ± 0,687
Биохимический анализ крови		
Глюкоза, ммоль/л	5,338 ± 0,225	4,42 ± 0,335
АЛТ, ммоль/(ч. л.)	0,269 ± 0,034	0,336 ± 0,048
АСТ, ммоль/(ч. л.)	0,205 ± 0,029	0,213 ± 0,02
Общий белок, г/л	73,163 ± 2,911	69,629 ± 2,143
Сулемовая проба, %	86 ± 2,345	85 ± 2,204
Тимоловая проба, ед.	2,225 ± 0,764	3,414 ± 0,914
Билирубин общий, ммоль/л	14,963 ± 1,234	13,183 ± 1,042
ЩФ, ммоль/(ч. л.)	1,9 ± 0,3	0,775 ± 0,075

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

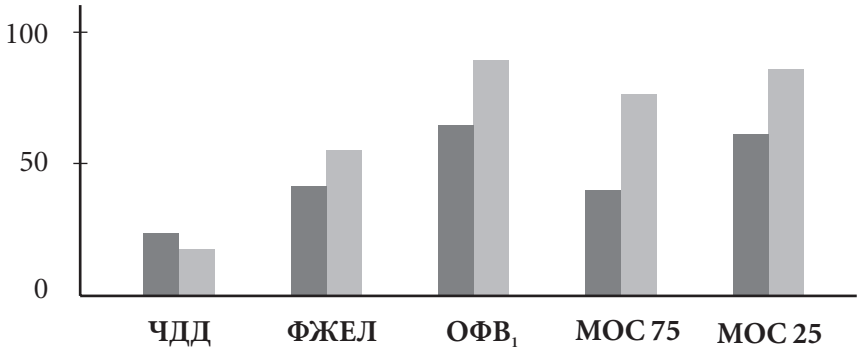
Таблица 4.1.2.13

Показатели вентиляции легких у больных пневмокониозами до и после лечения

Показатель	Группа АФП		Группа плацебо	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
ЧДД	24 ± 6	18 ± 3*, **	28 ± 7	26 ± 6
ФЖЕЛ, %	43,91 ± 8,54	62,48 ± 6,64*, **	51,46 ± 7,21	53,44 ± 5,37
$ОФВ_1$, %	68,2 ± 7,64	95,6 ± 6,36*, **	56,19 ± 7,34	72,21 ± 11,53
МОС 75	39 ± 7,05	82,5 ± 7,34*, **	52 ± 6,25	60,23 ± 7,34
МОС 25	69,6 ± 9,11	93,4 ± 7,31*, **	52,25 ± 6,13	62 ± 6,13

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$ после лечения.

**Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$ относительно Плацебо.



	ЧДД	ФЖЕЛ	ОФВ$_1$	МОС 75	МОС 25
До лечения	24	43,91	68,2	39	69,6
После лечения	18	62,48	95,9	82,5	93,4

Рис. 4.1.2.3. **Показатели вентиляции легких у больных пневмокониозами до и после лечения препаратом АФП**

4.1.3. Применение препарата АФП в комплексном лечении туберкулеза легких

Ущерб, приносимый туберкулезом обществу, усугубляется недостаточной эффективностью проводимой стандартной, формально полноценной туберкулостатической и патогенетической терапии [238]. Применение ставших традиционными иммунотропных препаратов не решает в полной мере проблему коррекции иммунных сдвигов при этом заболевании. Отмечено также, что наиболее часто используемые во фтизиатрической практике иммуностимуляторы (левамизол, Т-активин, тималин) могут привести к нарастанию экссудативно-некротических реакций в легких, чем и обусловлена необходимость осторожного подхода к назначению этой группы препаратов [214]. В связи с этим весьма актуальными являются как апробация, так и внедрение в практику комплексного лечения туберкулеза легких новых эффективных и лишенных побочных эффектов патогенетических иммунотропных средств.

Плацебо-контролируемое исследование эффективности препарата АФП с использованием рандомизации и двойного слепого контроля проводилось у больных инфильтративным туберкулезом в активной фазе – инфильтрации и распада. 23 пациента основной группы внутривенно получали в составе комплексного лечения АФП (75 мкг/сут. в течение 30 дней), 20 человек были включены в группу плацебо (5 мг лиофильного реополиглюкина, кратность и способ введения аналогичны). Группы были соотносимы по полу, возрасту, клинико-рентгенологической форме и активности туберкулезного процесса, частоте бактериовыделения, а также по частоте встречаемости множественной лекарственной устойчивости к антибактериальным препаратам и по схемам проводимой туберкулостатической терапии. Всего обследовано 43 пациента с инфильтративным туберкулезом легких в фазе распада (средний возраст 41,3 ± 2,3 лет).

Общеклинические исследования включали: гемограмму (с расчетом лейкоцитарного индекса интоксикации (ЛИИ), индекса сдвига (ИС), индекса сдвига лейкоцитов крови (ИСЛК) и лимфоцитарного индекса (ЛИ)); биохимическое исследование крови (протеинограмма с расчетом альбумин-глобулинового коэффициента (А/Г) и коэффициента А/(α1+α2), среднемолекулярные пептиды (средние молекулы, СМ), холестерин, тимоловая и сулемовая пробы, АЛТ, АСТ, билирубин (свободный и связанный), серомукоид, креатинин, мочевина, триглицериды (ТГ), общие фосфолипиды (ОФЛ) по Блюру); обзорную рентгенографию органов грудной клетки, рентгенотомографию легких (у больных туберкулезом) [113], фибробронхоскопию, спирографию и пневмотахометрию, простую и люминесцентную бактериоскопию мокроты, посев мокроты на питательные среды с последующим определением чувствительности МБТ к антибактериальным препаратам [118].

Состояние системы легочного сурфактанта у больных туберкулезом легких оценивали путем определения содержания в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) общего белка (ОБ), ТГ, ОФЛ и их отдельных фракций – фосфатидилхолина (ФХ), лизофосфатидилхолина (ЛФХ), сфингомиелина (СФМ), кардиолипина (КЛ) и фосфатидилсерина (ФС). Забор материала производили по методу Г. И. Сидоренко [206]. Определение триглицеридов осуществляли по унифицированной методике с набором реактивов La-Chema и энзиматическим методом при помощи набора Triglicerides E-D New (Olvex diagnosticum); общих фосфолипидов – по Блюру [174]; отдельных фракций фосфолипидов – при помощи тонкослойной хроматографии на пластинках с силикагелем сорбфил марки ПТСХ-ПВ.

Изменения клеточного звена иммунитета у пациентов с инфильтративным туберкулезом отличались высокой степенью их выраженности (рис. 4.1.3.1, 4.1.3.2). Достоверное ($p < 0,05$) уменьшение как относительного, так и абсолютного содержания Е-РОК (Т-лимфоцитов), ранних и термостабильных Е-РОК, а также $CD4^+$-лимфоцитов сопровождалось нарастанием количества 0-клеток. Иммунорегуляторный индекс был существенно ниже аналогичного показателя в группе здоровых лиц (0,92 ± 0,14 при норме 1,4 ± 0,08), что отражает дискооперацию основных лимфоцитарных субпопуляций при этой патологии.

Показатели гуморального звена иммунитета в целом по группе не пострадали, однако отличались значительными индивидуальными колебаниями. Отмечено, что у пациентов с осложнением туберкулезного процесса экссудативным плевритом наблюдается тенденция к нарастанию IgG (27,38 ± 6,26 г/л при показателе группы здоровых 12,51 ± 1,09 г/л) и достоверное нарастание количества ЦИК (рис. 4.1.3.3). Увеличение фагоцитарного индекса и спонтанного варианта НСТ-теста у больных инфильтративным туберкулезом убедительно доказывает нарастание бактерицидного потенциала фагоцитирующих клеток за счет усиления синтеза активных форм кислорода при этой бактериальной инфекции.

Выявленные нарушения иммунного ответа у фтизиатрических больных подтверждаются данными других исследователей о существенной роли иммунопатологии в развитии и прогрессировании специфического процесса, а также о настоятельной необходимости иммунокорригирующих воздействий с учетом особенностей течения заболевания.

При включении АФП в состав комплексного лечения больных инфильтративным туберкулезом легких отмечено изменение процентного содержания основных популяций иммунокомпетентных клеток (снижение удельного веса Т- и одновременное увеличение удельного веса В-лимфоцитов). Абсолютные показатели Т- и В-клеток остались без изменений. Обращает на себя внимание тот факт, что иммуносупрессивный эффект АФП был весьма избирательным: у пациентов со сниженным уровнем Т-лимфоцитов он повышался, а с повышенным – снижался, достигая нормальных величин.

Концентрации IgA, IgM и IgA не изменились за время лечения ни в одной из групп (рис. 4.1.3.3). Однако обращает на себя внимание значимое ($p < 0,05$) снижение уровня IgG с 30,08 ± 3,07 до 10,84 ± 5,42 г/л у пациентов группы АФП, имевших этот показатель повышенным (более 20 г/л) до лечения (рис. 4.1.3.4).

В литературе мы встретили данные, свидетельствующие о неблагоприятном влиянии интенсивного антителообразования на течение туберкулеза. Так, избыточная продукция IgG (II тип аллергических реакций) способствует прогрессированию специфического процесса и формированию полостей деструкции. Кроме того, IgG осуществляет блокаду эффекторных функций Т-лимфоцитов. Опираясь на эти данные, мы расцениваем снижение исходно повышенного уровня IgG под действием АФП как благоприятное. Интересно отметить, что изменение уровня IgG во всех случаях сопровождалось понижением количества эозинофилов периферической крови до нормального, что может указывать на угнетение АФП иммунопатологической реакции I (реагинового) типа. Как известно, этот тип реакций может быть опосредован не только иммуноглобулинами класса Е, но и некоторыми субклассами иммуноглобулинов класса G [83].

У пациентов группы АФП отмечена позитивная динамика ряда показателей:

1. У пациентов с изначальной эозинофилией наступила нормализация этого показателя (рис. 4.1.3.5). Причиной эозинофилии у пациентов с туберкулезом легких может

быть аллергизирующее воздействие таких препаратов, как стрептомицин, канамицин, рифампицин [237]. Будучи иммуносупрессором, АФП, по-видимому, угнетает иммунопатологическую реакцию I (реагинового) типа и тем самым уменьшает выброс тучными клетками и базофилами фактора хемотаксиса эозинофилов анафилаксии (последний является антагонистом аллергического воспаления и выделяет в ткани ферменты, расщепляющие медиаторы воспаления [17]).

2. В процессе лечения у пациентов с изначально высоким в абсолютных показателях уровнем моноцитов отмечена тенденция к его снижению (рис. 4.1.3.5). Моноцитоз при туберкулезе может быть и признаком свежей гематогенной диссеминации, и результатом побочного действия таких препаратов, как рифампицин, протионамид, этионамид [237]. Поэтому тенденция к нормализации показателя уровня моноцитов при введении в схему лечения АФП расценивается нами как факт позитивный.

3. При включении в схему комплексной терапии препарата АФП наблюдалось более быстрое снижение СОЭ у тех пациентов, у кого этот показатель был изначально повышен (рис. 4.1.3.5).

4. АФП препятствовало нарастанию абсолютного числа лимфоцитов периферической крови, подтверждая тем самым свои иммуносупрессивные свойства.

Кроме того, отмечено, что включение АФП в состав стандартной терапии способствует более быстрой коррекции имеющейся у больных инфильтративным туберкулезом диспротеинемии. Так, снижение уровня глобулинов с параллельным повышением коэффициента А/Г с 0,842 ± 0,035 до 0,946 ± 0,048 ($p < 0,05$), а также снижение содержания γ-глобулинов с 22,331 ± 0,950 до 19,338 ± 1,049 % ($p < 0,01$) наблюдалось только в группе пациентов, получающих АФП, и не отмечалось в группе плацебо. Еще одним свидетельством коррекции имеющихся у больных инфильтративным туберкулезом диспротеинемических сдвигов является снижение в сыворотке крови под влиянием АФП одного из белков острой фазы – серомукоида (рис. 4.1.3.6). Можно предположить, что противовоспалительный эффект препарата обусловлен его нормализующим синтез ПГ действием.

Помимо положительного влияния АФП на гематологические и биохимические показатели отмечено субъективное улучшение в виде уменьшения интоксикационного синдрома. Значительное улучшение аппетита и увеличение массы тела у части пациентов основной группы, а также упомянутое выше увеличение альбумин-глобулинового коэффициента позволяет предположить, что АФП обладает легким анаболическим эффектом.

Анализ рентгенологических изменений в группах за время лечения препаратом АФП (6–8 недель) показал несколько более частое рассасывание инфильтративных и очаговых теней в группе АФП (85% против 78% в группе плацебо) и более частое уменьшение размеров полости (полостей) деструкции (38% в группе АФП и 22% в группе плацебо). Абациллирование за тот же срок было достигнуто у 50% пациентов, получавших в составе комплексной терапии АФП, и лишь у 30%, получавших препарат «Плацебо».

У больных туберкулезом легких нарушения фосфолипидного обмена в целом носили дефицитный характер. Так, содержание ОФЛ в сыворотке крови было достоверно ($p < 0,05$) снижено до 6,594 ± 0,419 мг% в сравнении со здоровыми лицами (8,047 ± 0,999 мг%). В фосфолипидном спектре сыворотки крови отмечено достоверное ($p < 0,05$) уменьшение абсолютного содержания фосфатидилэтаноламина (ФЭА) до 0,245 ± 0,069 мг% в сравнении со здоровыми лицами (0,579 ± 0,141 мг%), что указывает на снижение ряда биоэнергетических процессов при этом заболевании (рис. 4.1.3.7).

В конденсате выдыхаемого воздуха у больных туберкулезом существенно ($p < 0,02$) повышено содержание общего белка (1,62 ± 0,272 при 0,747 ± 0,187 г/л в группе здоровых), что является признаком активного экссудативного воспалительного процесса. В КВВ при нормальном количестве общих фосфолипидов выявлено достоверное ($p < 0,05$) снижение как относительного, так и абсолютного содержания ФХ (лецитина) – фосфолипидной фракции с наиболее выраженными поверхностно-активными свойствами – до 21,571 ± 5,701 % (показатель группы здоровых 27,530 ± 3,887 %) (рис. 4.1.3.9). При этом отмечено достоверное ($p < 0,05$) повышение суммарного содержания в КВВ лизофосфатидилхолина и сфингомиелина (ЛФХ + СФМ) до 8,845 ± 3,847 % (в норме 0,866 ± 0,834 %). Нарастание уровня деградантной формы фосфолипидов – ЛФХ – подтверждает повреждение легочного сурфактанта у больных туберкулезом. Повышение уровня СФМ рассматривается нами как компенсаторное, т. к. эта фракция фосфолипидов, в отличие от ФХ, устойчива к действию фосфолипаз и способна в какой-то мере обеспечить основные свойства сурфактанта легких, не обладая, однако, эластичностью лецитина. Перечисленные факты указывают на снижение функций легочного сурфактанта (антиателектатической и противоотечной) у фтизиатрических больных.

При сравнении показателей фосфолипидного обмена у пациентов с различной распространенностью специфического процесса (первая подгруппа – 1–2 сегмента и вторая подгруппа – 3 и более) обращает на себя внимание отчетливая тенденция к нарастанию уровня триглицеридов по мере увеличения протяженности туберкулезного процесса по легочным полям (84,75 ± 15,282 мг % в первой подгруппе и 119 ± 10,392 мг % – во второй).

У больных, получавших АФП, содержание общих фосфолипидов до лечения не было изменено и не изменилось в ходе лечения. У них же обращают на себя внимание весьма позитивные сдвиги фракционного состава фосфолипидов (табл. 4.1.3.1).

Таблица 4.1.3.1

Фракционный состав фосфолипидов сыворотки крови больных туберкулезом ($M \pm m$)

Фосфолипиды, %	Группа АФП			Группа плацебо		
	До лечения ($M \pm m$)	p	После лечения ($M \pm m$)	До лечения ($M \pm m$)	p	После лечения ($M \pm m$)
ЛФХ + СФМ	20,88 ± 2,36	$p = 0,06$	14,44 ± 1,89	11,25 ± 1,63	$p > 0,05$	22,89 ± 8,99
ФХ	48,7 ± 3,02	$p = 0,06$	59,7 ± 4	42,95 ± 9,37	$p > 0,05$	38,9 ± 10,2
ФЭА	7,06 ± 1,39	$p < 0,05$	2,87 ± 1,56	3,82 ± 1,64	$p > 0,05$	0,51 ± 0,51
КЛ	22,94 ± 4,29	$p > 0,05$	25,52 ± 4,72	39,82 ± 11,88	$p > 0,05$	37,68 ± 14,45

Так, отмечены отчетливые тенденции к нарастанию содержания ФХ и к уменьшению суммарного содержания ЛФХ + СФМ. Достоверно ($p < 0,05$) снизилось содержание уровня фосфатидилэтаноламина (ФЭА) – с 7,066 ± 1,389 до 2,875 ± 1,560 %. Возможно, это связано с активацией фермента фосфатидилхолин-метилтрансферазы, который способствует синтезу ФХ из ФЭА. Позитивные изменения фосфолипидного спектра сыворотки крови при лечении АФП позволяют говорить о мембранопротекторном эффекте препарата.

Произошедшее в процессе лечения в обеих группах снижение в КВВ уровня общего белка не было достоверным, однако если до лечения этот показатель был достоверно выше, чем в группе здоровых лиц, то после лечения он уже не отличался от показателя группы здоровых. Это отражает уменьшение активности воспалительного процесса в легочной ткани в ходе лечения.

В основной группе содержание фосфатидилхолина колебалось в пределах нормальных значений. Однако в группе плацебо до лечения содержание ФХ было нормальным, а после лечения стало достоверно ($p < 0,05$) ниже показателя у здоровых лиц (5,68 ± 3,56 % при норме 27,53 ± 3,89 %), что подтверждает известное ранее токсическое действие на легочный сурфактант ряда туберкулостатических средств: изониазида, рифампицина и др. [236]. Отсутствие подобных изменений в группе пациентов, получавших в составе комплексного лечения АФП, позволяет предполагать протекторное действие препарата на сурфактант легких.

Таким образом, отмеченные при лечении АФП положительные сдвиги позволяют рекомендовать препарат к использованию в качестве патогенетического средства для лечения больных с активной фазой инфильтративного туберкулеза легких. У пациентов группы плацебо каких бы то ни было изменений в показателях иммунограммы по завершении терапии не отмечено.

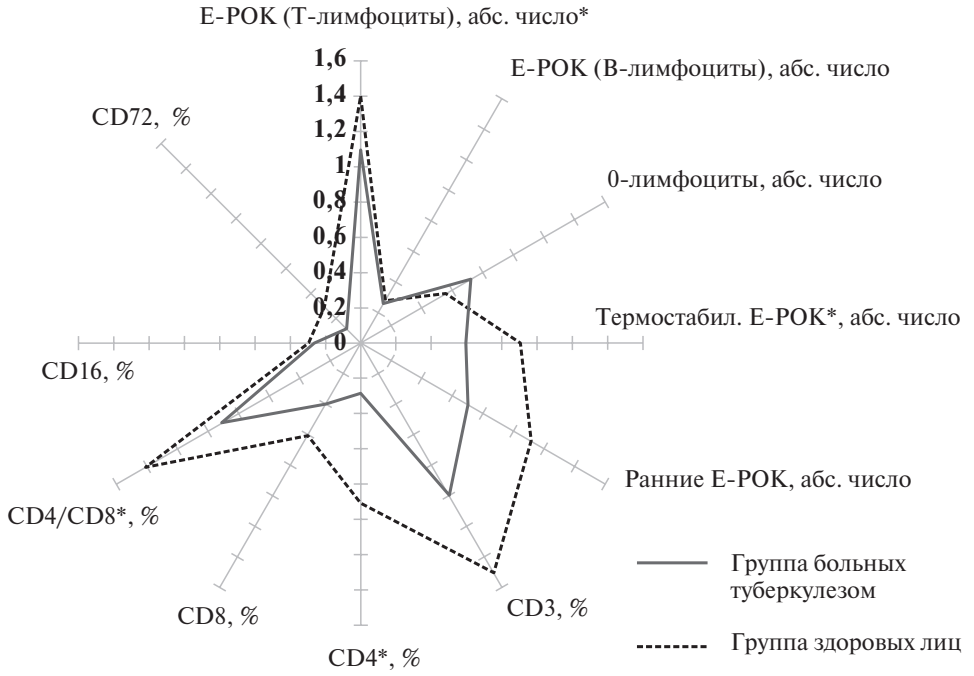


Рис. 4.1.3.1. **Некоторые показатели иммунного статуса у больных инфильтративным туберкулезом легких в сравнении с группой здоровых лиц**
*Достоверные различия между группами.

Рис. 4.1.3.2. **Содержание IgG и ЦИК у больных инфильтративным туберкулезом легких, осложненным и не осложненным экссудативным плевритом, до лечения**

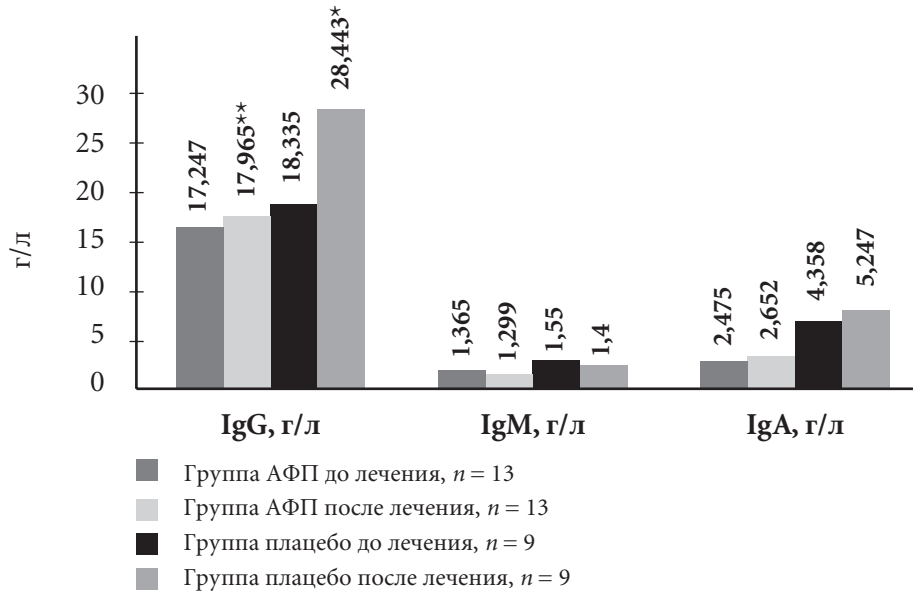


Рис. 4.1.3.3. **Изменение показателей гуморального звена иммунитета у больных инфильтративным туберкулезом при лечении препаратами АФП и «Плацебо»**

*Достоверное по t-критерию Стьюдента различие в динамике лечения.

**Различие между группами.

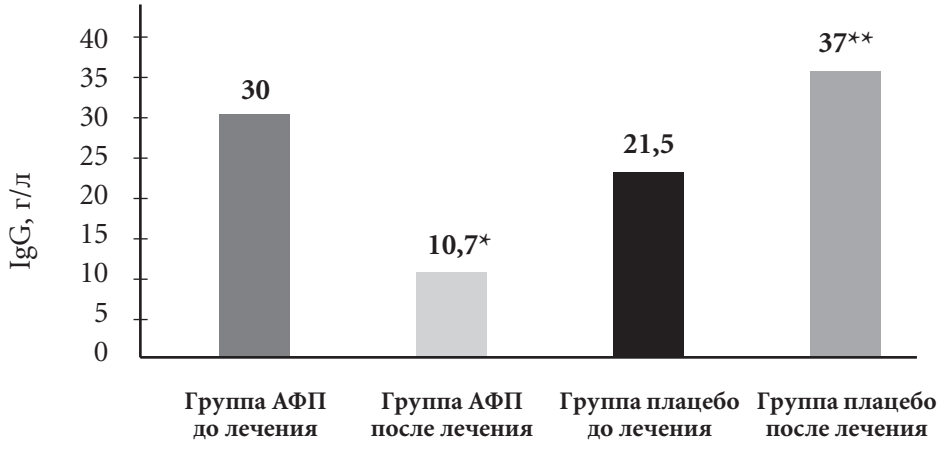


Рис. 4.1.3.4. **Изменение уровня IgG у больных инфильтративным туберкулезом при лечении препаратами АФП и «Плацебо»**

*Достоверное по t-критерию Стьюдента различие в динамике лечения.

**Различие между группами.

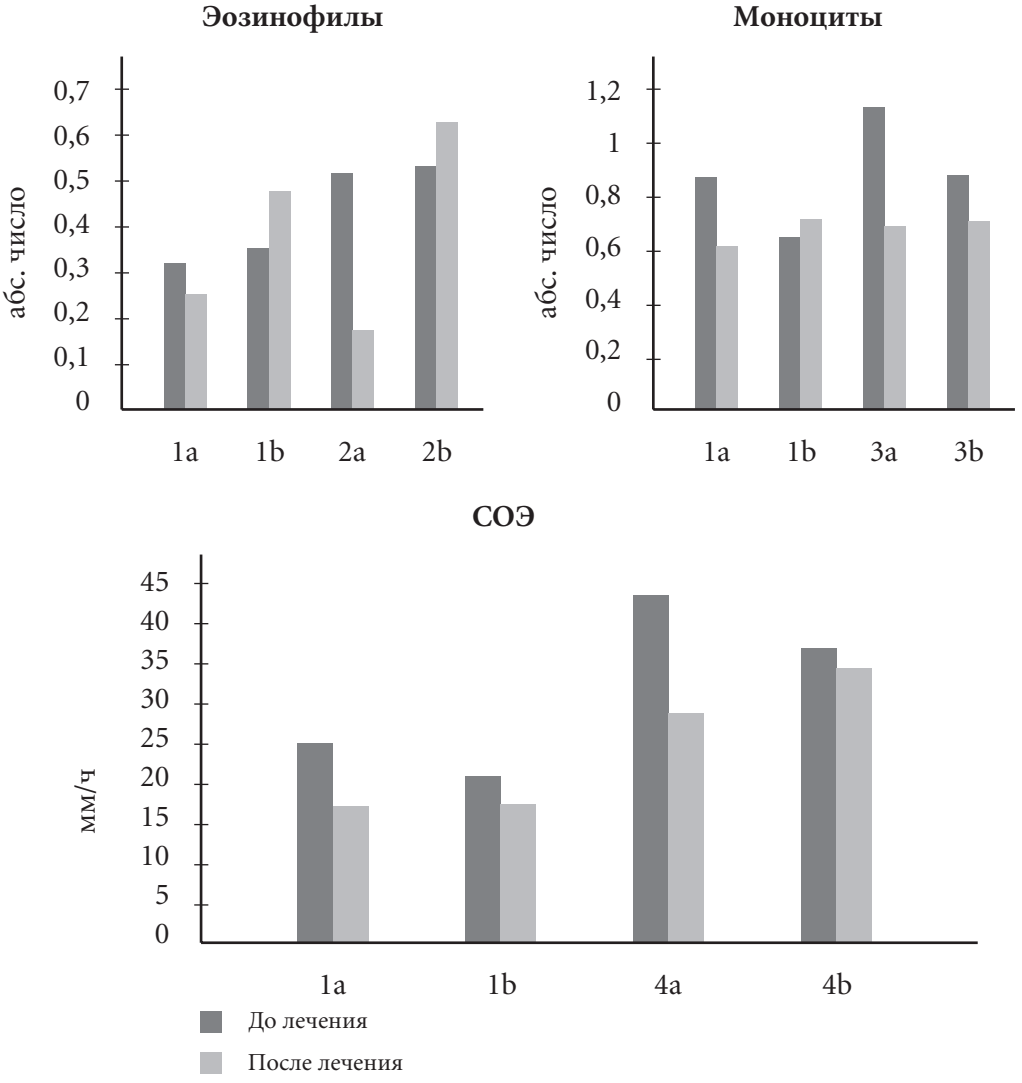


Рис. 4.1.3.5. **Изменение гематологических показателей у больных инфильтративным туберкулезом**

Примечание. В основной (a) и контрольной (b) группах, где a – АФП, b – плацебо, 1 – в целом по группе; 2, 3 и 4 – при изначальном повышении показателей.

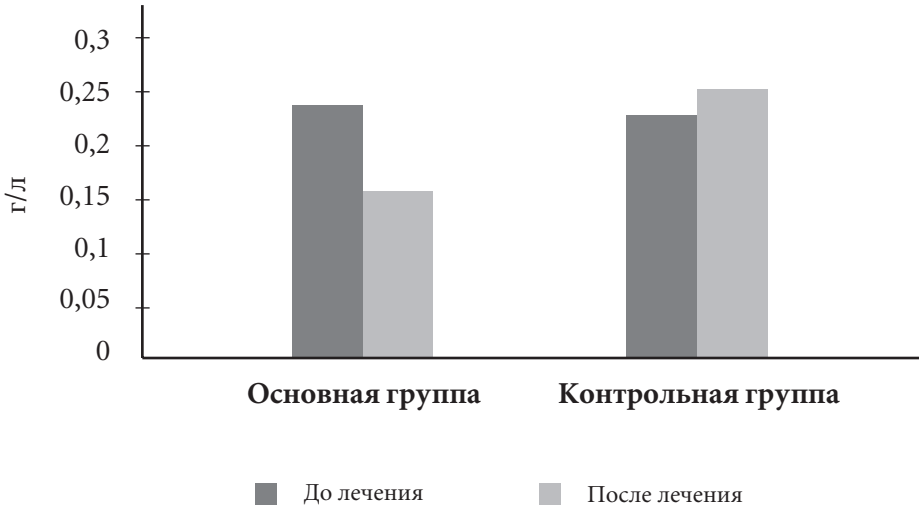


Рис. 4.1.3.6. **Динамика уровня серомукоида в сыворотке крови больных инфильтративным туберкулезом при лечении препаратами АФП (основная группа) и «Плацебо» (контрольная группа)**

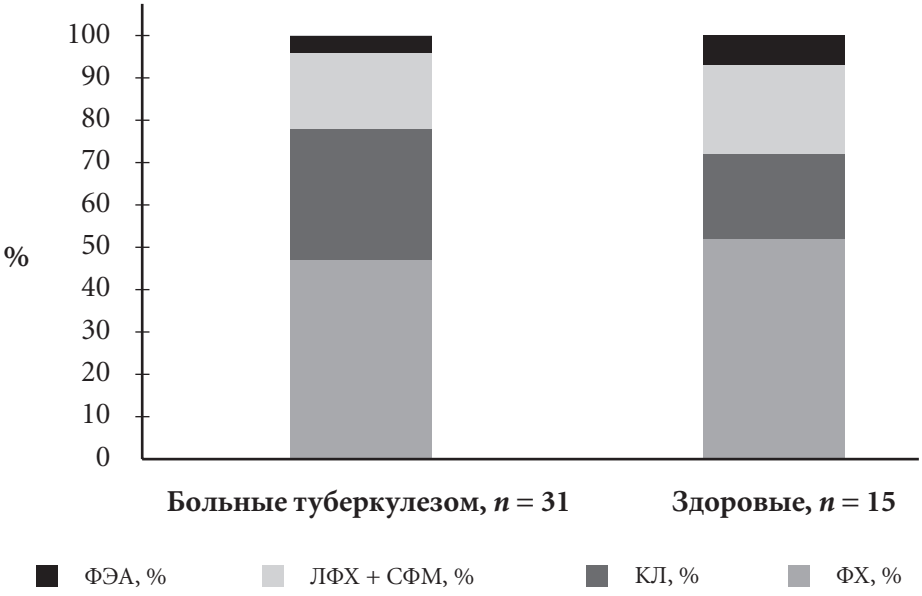


Рис. 4.1.3.7. **Содержание основных фракций фосфолипидов (в мг%) в сыворотке крови больных туберкулезом легких**

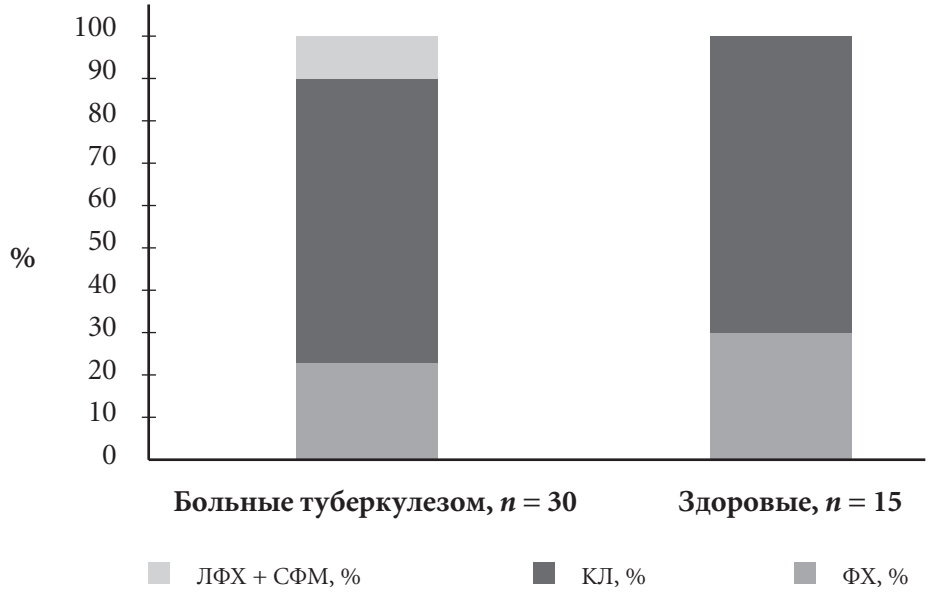


Рис 4.1.3.8. **Фракционный состав фосфолипидов в конденсате выдыхаемого воздуха (в %) у больных туберкулезом легких**

* * *

В результате проведенных клинических испытаний препарата АФП у больных ХНЗЛ и инфильтративным туберкулезом легких установлено:

1. При парентеральном введении препарат АФП не вызывает системных токсических проявлений, не обладает аллергизирующим, анафилактогенным, гипертермическим действием; не отмечено также раздражающего действия препарата на стенки сосудов и мягкие ткани. Введение препарата не сопровождается болевым синдромом, в местах инъекций не наблюдается гиперемии и инфильтративных изменений.

2. У больных ХНЗЛ после применения препарата АФП достоверно улучшаются вентиляционные показатели внешнего дыхания, что, по-видимому, связано с нормализацией простагландинового обмена и, как следствие, снятием бронхоспастических явлений.

3. Установлено, что применение АФП у больных ХНЗЛ способствует снижению повышенного уровня IgE, ЦИК, IL-1β, IL-4, мононуклеаров, эозинофилов, т. е. блокирует аллергические реакции I, II, III типа.

4. Для активного инфильтративного туберкулеза легких характерен выраженный дефицит Т-клеточного звена иммунитета. При осложнении специфического процесса экссудативным плевритом отмечена тенденция к нарастанию иммуноглобулинов класса G и достоверное увеличение содержания ЦИК.

5. Выявлено, что при активном инфильтративном туберкулезе легких иммуномодулирующий эффект препарата АФП заключается в угнетении избыточного антителообразования (в уменьшении гиперпродукции IgG) и нормализующем влиянии на Т-клеточное звено иммунитета. Отмечены также десенсибилизирующий и противовоспалитель-

ный эффекты АФП, что свидетельствует о целесообразности назначения препарата в активную фазу туберкулеза не только для коррекции Т-иммунодефицита, но и для устранения избыточной сенсибилизации и неспецифического компонента воспаления.

6. У больных активным туберкулезом легких выявлены изменения фракционного состава фосфолипидов сыворотки крови и конденсата выдыхаемого воздуха, подтверждающие нарушения в системе легочного сурфактанта и фосфолипидном обмене.

7. На основании позитивных сдвигов фосфолипидного спектра сыворотки крови (снижение суммарного содержания лизофосфатидилхолина и сфингомиелина и нарастание уровня фосфатидилхолина) при включении АФП в схему комплексного лечения больных инфильтративным туберкулезом установлен мембранопротекторный эффект препарата.

4.2. ПРИМЕНЕНИЕ АФП В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ (ХРОНИЧЕСКИЕ ГЕПАТИТЫ И ЦИРРОЗ)

Основной целью клинических испытаний являлась оценка безопасности и эффективности препарата АФП в комплексном лечении больных хроническими гепатитами и циррозом печени. Исследование проведено по протоколу двойного слепого контроля с использованием рандомизации и плацебоконтроля, где в первой группе больные получали в комплексной терапии препарат АФП, а во второй группе – препарат «Плацебо» (дозировки и пути введения были аналогичны). В исследование были вовлечены больные с гепатитами и циррозом печени, вызванными вирусными и химическими этиологическими факторами. Возраст больных варьировал от 36 до 72 лет. Общее количество пациентов составило 43 человека. В соответствии с целью проведения клинических испытаний препарата АФП использовались стандартные методы исследований до и после лечения, обобщенные в форме согласованного клинического протокола.

Все пациенты обследовались с применением физикальных, лабораторных (общеклинический анализ мочи; общеклинический и биохимический анализ крови; иммунограмма; вирусологическое обследование [140, 259]) и инструментальных (ультразвуковое обследование органов брюшной полости; электрокардиография; изотопное сканирование печени [19, 118]) методов до начала терапии и через 2 дня после ее завершения.

Больные с хроническими гепатитами и циррозом печени первой (основной) группы (22 человека) получали комплексную терапию, включавшую богатую белками диету, витамины группы В, никотинамид, фолиевую кислоту, витамин С, липоевую кислоту, легалон, спазмолитики, препараты, восстанавливающие флору кишечника, мочегонные средства и преднизолон, и в течение 30 дней дополнительно внутривенно – АФП в дозе 4 мкг/кг массы тела один раз в сутки. Во второй группе (21 человек) проведено аналогичное комплексное лечение в сочетании с «Плацебо», в качестве которого использован лиофильный препарат реополиглюкина, являющийся наполнителем в препарате АФП. «Плацебо» вводили по аналогичной схеме.

Всем больным лечение проведено по указанным схемам с использованием одинаковых ампул, содержащих по 75 мкг АФП либо по 5 мг реополиглюкина и сопровождаемых паспортами подлинности. Все полученные результаты занесены в карты пациентов. Исключенных из исследования по какой-либо причине не было.

В наших исследованиях были предприняты попытки выделить общие показатели состояния пациентов группы АФП и группы плацебо с целью оптимизировать оценку эф-

фективности использования препарата АФП в комплексном лечении хронических гепатитов и цирроза печени.

У всех больных хроническими гепатитами и циррозом печени, включенных в исследование, мы выделили несколько общих синдромов. У всех пациентов присутствовал болевой синдром, связанный с дискинезией желчных путей, некробиотическими изменениями в печени. Синдром желтухи был обусловлен как механическими нарушениями оттока желчи вследствие внутрипеченочного холестаза, так и некротическими изменениями паренхимы и всасыванием связанного билирубина в кровь. У всех больных присутствовали синдром гепато- и спленомегалии, синдром портальной гипертензии (у 30% обследованных имели место кровотечения из вен прямой кишки и пищевода). Кроме этого диагностировался гепатопанкреатический синдром, сопровождавшийся диспепсическими расстройствами. У большинства больных выявлены лейкопения, тромбоцитопения, анемия, гипопротеинемия, нарушения водно-солевого обмена, увеличение содержания аминотрансфераз, лактатдегидрогеназы и щелочной фосфатазы.

Как правило, печень при осмотре пациентов была плотной, бугристой. Более чем у половины больных обнаружены телеангиэктазии и пальмарная эритема, побледнение ногтей и развившиеся «барабанные палочки», а также умеренные явления геморрагического диатеза. Мануальным обследованием, верифицированным ультразвуковым обследованием, у всех больных выявлено наличие асцитической жидкости в брюшной полости (иногда в весьма значительных объемах). У всех пациентов отмечены изменения в сердечно-сосудистой системе, выражавшиеся в стойкой гипотонии и тахикардии.

У всех участников исследования (43 человека) этиологическая характеристика заболевания была представлена следующим образом: у 15 – хронический гепатит и цирроз печени в результате вирусной инвазии, у 18 – токсикогенный, у 6 – первичный биллиарный, у 2 – неясной этиологии. Пациенты на протяжении всего периода заболевания получали различное медикаментозное лечение без улучшения, а более чем в половине случаев был получен прогресс заболевания на фоне лечения. Характеристика групп участников исследования представлена в таблице 4.2.1.

Таблица 4.2.1

Характеристики групп участников исследования

Характеристики	Группа АФП (*n* = 22)	Группа плацебо (*n* = 21)
Пол: женский	8	8
мужской	14	13
Возраст, диапазон	42–72	36–60
Средний возраст, лет	56	46
Продолжительность лечения, сут.	30	30
Путь введения	Внутривенно	Внутривенно
Доза препарата (суточная), мкг/кг	4	4

Сравнительный анализ результатов обследования между группами не показал достоверных отличий.

При анализе иммунологических показателей у пациентов обеих групп до начала лечения нами выявлена картина выраженного вторичного иммунодефицитного со-

стояния, характерного для хронического воспалительного процесса [20, 42, 43, 132, 205]. Так, по отношению к показателям здоровых людей общим для обеих групп сравнения оказалось снижение общего количества Т-лимфоцитов ($CD3^+$ и Е-РОК) с нарушением их функциональных свойств и субпопуляционного состава, что проявлялось сниженным содержанием ранних (активных) и теофиллинрезистентных Е-РОК, а также уменьшением количества Th ($CD4^+$). Несмотря на высокий уровень сывороточного IgG, число В-лимфоцитов с рецепторами для эритроцитов мыши (М-РОК) было сниженным, а количество $CD72^+$-клеток не отличалось от нормальных значений. В то же время наблюдалось повышение активности фагоцитирующих клеток, а также увеличение количества $CD95^+$-лимфоцитов. Следует отметить, что перечисленные изменения иммунного статуса у больных хроническими гепатитами и циррозом печени до начала лечения в обеих группах достоверно не отличались (табл. 4.2.3).

Применение препарата АФП позволило выявить несомненные преимущества его включения в комплекс терапевтических мероприятий. В частности, использование АФП впервые за весь период развития болезни улучшало клинико-биохимические показатели, которые достоверно ($p < 0,05$) отличались от показателей в группе плацебо (табл. 4.2.2): зарегистрировано сокращение изначально повышенного времени свертывания крови до физиологических величин, снижение СОЭ до уровня субкомпенсации, уменьшение общего и прямого билирубина в среднем в 2,5 раза, АСТ – в 4 раза, АЛТ – в 3,5 раза, α-амилазы – в 5,4 раза. Включение в комплекс лечебных мероприятий препарата АФП позволило также добиться нормализации функциональных (сулемовой, тимоловой) проб печени. При анализе иммунологических показателей установлено достоверное ($p < 0,05$) снижение уровня IgG после проведенного лечения с использованием АФП (табл. 4.2.3).

В ходе лечения у больных группы АФП отмечена выраженная позитивная клиническая симптоматика. Так, в течение первой недели значительно уменьшились явления эндотоксикоза, болевой синдром и синдром желтухи. К третьей неделе у пациентов уменьшились размеры печени (рис. 4.2.1) и селезенки в среднем на 40%, прекратились венозные кровотечения. При контрольном ультразвуковом обследовании после завершения курса терапии у пациентов отмечено значительное уменьшение, а в четырех наблюдениях полное исчезновение асцита из брюшной полости, связанное с портальной гипертензией. Печеночная ткань стала приобретать более гомогенную и однородную структуру, уменьшились явления фиброза и очаги некробиоза.

Таким образом, если в группе пациентов, получавших в комплексном лечении препарат АФП, без сомнения, зарегистрирован положительный клинический эффект, коррелирующий с лабораторными и инструментальными данными, то в группе плацебо не отмечено никаких объективных и субъективных позитивных сдвигов (табл. 4.2.2 – 4.2.3, рис. 4.2.1). По-видимому, позитивный эффект препарата АФП в первую очередь связан с подавлением аутоиммунных реакций в печеночной ткани. Помимо этого следует учесть, что АФП является мощным индуктором регенерации гепатоцитов [3].

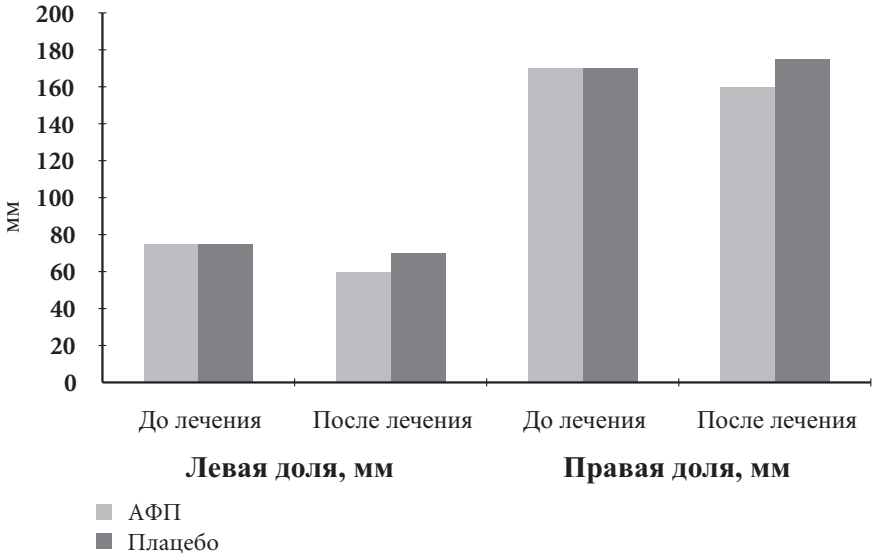


Рис. 4.2.1. **Изменение размеров печени у больных хроническими гепатитами и циррозом печени в результате лечения**

Таблица 4.2.2

Клинико-биохимические показатели у больных хроническими гепатитами и циррозом печени до и после лечения ($M \pm m$)

Показатели	Группа АФП ($n = 22$)		Группа плацебо ($n = 21$)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Клинический анализ крови				
Гемоглобин, г/л	147,7 ± 9,1	143,1 ± 7,1	136,9 ± 6,4	122,4 ± 8,6
Эритроциты $\times 10^{12}$/л	4,8 ± 0,26	4,7 ± 0,2	4,2 ± 0,6	3,9 ± 0,8
Лейкоциты $\times 10^{9}$/л	6,4 ± 0,7	6,2 ± 0,5	7,3 ± 1,4	6,9 ± 1,6
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,2 ± 0,9	3,5 ± 1,3	4,3 ± 0,6	3,7 ± 0,7
Сегментоядерные нейтрофилы, %	58 ± 4	57,5 ± 3,5	56,4 ± 5,3	54,7 ± 3,9
Лимфоциты, %	29 ± 3,9	29,2 ± 2,8	27,4 ± 3,3	28,5 ± 3,1
Эозинофилы, %	2,1 ± 0,2	2,7 ± 0,5	3,4 ± 0,7	2,9 ± 0,6
Моноциты, %	7,5 ± 1,4	6,8 ± 1,1	8,3 ± 2,2	7,6 ± 2,1
Время сверт. крови, мин	8,8 ± 1,7	5,1 ± 1,4*,**	9,1 ± 0,7	8,4 ± 0,7
Тромбоциты $\times 10^{9}$/л	185,5 ± 29,1	193,8 ± 16,8	214,6 ± 34,4	206,4 ± 29,7
СОЭ, мм/ч	51 ± 5,9	22 ± 8,1**	63 ± 11,4	54 ± 9,5

Окончание таблицы 4.2.2

Показатели	Группа АФП (n = 22)		Группа плацебо (n = 21)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Биохимический анализ крови				
АЛТ, нмоль/л	98 ± 16,2	27,6 ± 5,1*,**	64,3 ± 22,1	56,4 ± 19,9
АСТ, нмоль/л	157,4 ± 11,2	38,1 ± 11,1*	124,6 ± 30,4	154,2 ± 48,9
Общий белок, мг%	68,5 ± 2,8	72,1 ± 3,3	62,4 ± 5,3	64,4 ± 4,6
Альбумин, мг%	45,4 ± 6,5	48 ± 3,3	42,6 ± 5,8	40,3 ± 6,4
Сулемовая проба, %	57,8 ± 9,7	81,1 ± 6,4*,**	68,7 ± 8,8	62,4 ± 5,6
Тимоловая проба, ед.	8,9 ± 2,1	4,6 ± 1*,**	6,9 ± 3,3	7,4 ± 1,6
Билирубин общий, мг%	56,3 ± 8,7	22,3 ± 4,7*,**	48,4 ± 9,2	63,2 ± 8,8
Билирубин прямой, мг%	39,5 ± 9,8	14 ± 6,9*,**	29,5 ± 7,7	42,1 ± 6,4
α-амилаза, ед/л	365 ± 62,1	67,3 ± 32,6*	247,6 ± 37,5	264,4 ± 28,3
ЩФ, ед/л	122,1 ± 20,4	119 ± 21,3	126,3 ± 19,6	114,4 ± 22,9
Триглицериды, ммоль/л	1,05 ± 0,1	1,7 ± 0,3	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,4
Общие липиды, г/л	8,1 ± 0,9	9 ± 0,7	6,3 ± 2,1	7,7 ± 1,4
Холестерин общий, ммоль/л	4,9 ± 0,3	3,5 ± 0,1	4,63 ± 1,2	5,1 ± 1,4
Мочевина, мг%	5 ± 1	4 ± 1	8,2 ± 2,4	5,6 ± 1,6
Креатинин, мг%	102,2 ± 8,3	91,1 ± 4,3	144,6 ± 11,2	95,3 ± 6,4
Калий, мг%	4,7 ± 0,5	4,2 ± 0,2	4,4 ± 0,6	4,8 ± 0,4
Хлориды, ммоль/л	93,6 ± 7,2	78 ± 11,4	82,3 ± 9,3	72,1 ± 6,5
Кальций, мг%	2,1 ± 0,15	2,1 ± 0,3	2,6 ± 0,2	2,4 ± 0,4

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

**Достоверность различий между группами по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 4.2.3

Изменение иммунологических показателей у больных хроническими гепатитами и циррозом печени в результате лечения ($M \pm m$)

Показатели	Группа АФП (n = 22)		Группа плацебо (n = 21)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Лейкоциты, в 1 мкл	6 100 ± 71,5	5 218,1 ± 59,6	5 124,6 ± 69,5	6 114,7 ± 72,4
Палочкоядерные нейтрофилы, %	129,2 ± 28,6	104,3 ± 27,5	121,1 ± 25,6	136,4 ± 31,1
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	2 ± 0,3	2,1 ± 0,5	1,9 ± 0,7	2,2 ± 0,6
Сегментоядерные нейтрофилы, %	54,8 ± 3	49,5 ± 3	52,4 ± 4,5	54,3 ± 6,9
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	3 415,2 ± 50,5	2 638,7 ± 332,2	2 921,5 ± 154,3	3 211,3±96,4
Моноциты, %	9,2 ± 0,9	9,6 ± 1	8,8 ± 1,1	9,4 ± 0,8

Продолжение таблицы 4.2.3

Показатели	Группа АФП (n = 22)		Группа плацебо (n = 21)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Моноциты, в 1 мкл	550,3 ± 75,6	474,1 ± 39,4	496,3 ± 41,5	484,2 ± 36,4
Лимфоциты, %	30,9 ± 2,9	35 ± 2	29,3 ± 5,4	31,3 ± 4,8
Лимфоциты, в 1 мкл	1 803,6 ± 92,5	1 806,3±163,5	1 625,7±88,3	1 913,5 ± 142,1
Эозинофилы, %	2,9 ± 0,5	3,6 ± 0,5	2,3 ± 0,6	3,1 ± 0,4
Эозинофилы, в 1 мкл	201,5 ± 48,6	194,5 ± 37	184,9 ± 46,2	211,5 ± 56,3
Е-РОК тотальные, %	53,1 ± 2,7	48,8 ± 3,6	42,2 ± 6,4 ↓	57,1 ± 4,3
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	991,3 ± 134,7	923,5 ± 138,6	899,6 ± 95,4 ↓	1024 ± 167,3
Ранние Е-РОК, %	37 ± 4,1 ↓	33,8 ± 3,8 ↓	30,2 ± 5,1 ↓	36,9 ± 4,4 ↓
Термостабил. Е-РОК, %	30,2 ± 3,1	22,2 ± 3,1	25,3 ± 3,7	29,5 ± 2,9
Теоф. резистентные, %	43 ± 3,4 ↓	37,9 ± 3,2 ↓	41 ± 4,1 ↓	36,2 ± 2,8 ↓
Т-активин чувствительные (5 мг/мл), %	45,1 ± 4,7	35,4 ± 5,7	40,1 ± 8,4	34,3 ± 5,2
Т-активин чувствительные (0,5 мг/мл), %	46,1 ± 7,2	33,7 ± 4,4	42,3 ± 6,6	39,9 ± 0,9
М-РОК, %	13,3 ± 1,5	10,5 ± 1,4	11,2 ± 1,3	12,6 ± 1,7
М-РОК, в 1 мкл	223 ± 23,6 ↓	179,8 ± 22,5	165,4 ± 43,2 ↓	195,3 ± 36,6 ↓
0-клетки, %	33,4 ± 2,9	40,6 ± 3,1	38,3 ± 4,1	42,4 ± 3,7 ↑
0-клетки, в 1 мкл	589,2 ± 78,7 ↓	702,9 ± 54,7	629,1 ± 64,3	721,1 ± 50,4
$CD3^+$, %	51 ± 3,7 ↓	61,2 ± 2	69,4 ± 6,3	54,2 ± 4,3 ↓
$CD3^+$, в 1 мкл	1 152,9 ± 49,5	1 274,6 ± 167,7	1 311,7 ± 214,3	1 117,8 ± 96,5
$CD4^+$, %	19,1 ± 2,6 ↓	12,8 ± 3,1 ↓	18,4 ± 3,1 ↓	16,6 ± 3,8 ↓
$CD4^+$, в 1 мкл	435,9 ± 111,5	237,4 ± 19,1	391,9 ± 86,4	225,5 ± 71,2
$CD8^+$, %	24,2 ± 4,3	22 ± 2,1	31,9 ± 7,4 ↑	22,3 ± 4,7
$CD8^+$, в 1 мкл	592,9 ± 189,4	471,2 ± 91,8	421,3 ± 114,4	523,9 ± 156,7
$CD16^+$, %	11,8 ± 5,4	12 ± 3,7	10 ± 6,2	13,1 ± 4,6
$CD16^+$, в 1 мкл	293,5 ± 156,3	218,6 ± 50,5	264,5 ± 46,2	301,4 ± 143,6
$CD72^+$, %	11,8 ± 2,2	8,2 ± 2,3	7,7 ± 4,3	11,2 ± 4,3
$CD72^+$, в 1 мкл	269,1 ± 80,2	150,4 ± 36,6	177,8 ± 43,5	162,4 ± 32,1
$CD11^+$, %	11,5 ± 4,4	9,4 ± 1,9 ↓	12,1 ± 4,6	8,3 ± 4,7 ↓
$CD11^+$, в 1 мкл	322,2 ± 132,6	188,4 ± 42,5	225,5 ± 74,3	276,6 ± 111,3
$HLA\text{-}DR^+$, %	13,5 ± 3	10,8 ± 0,7	13,2 ± 2,7	12,4 ± 2,4
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	350,5 ± 142,4	222,9 ± 25,9	286,9 ± 55,4	274,1 ± 61,2
$CD95^+$, %	5,5 ± 1,8 ↑	9 ± 2,6 ↑	7,3 ± 3,8 ↑	8,4 ± 2,9 ↑
$CD95^+$, в 1 мкл	140,5 ± 66,1	188,6 ± 62,7	162,3 ± 57,2	136,7 ± 61,7
IgG, г/л	16,3 ± 1,2 ↑	12,7 ± 2,7*,**	16,9 ± 1,4 ↑	22,6 ± 2,3 ↑

Окончание таблицы 4.2.2

Показатели	Группа АФП (n = 22)		Группа плацебо (n = 21)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
IgA, г/л	2,1 ± 0,3	2,3 ± 0,6	1,9 ± 0,9	2 ± 0,4
IgM, г/л	1,2 ± 0,2	1,6 ± 0,6 ↑	1,7 ± 0,5 ↑	1,4 ± 0,5
Процент фагоцитоза	71,8 ± 4,4	62 ± 4,5	64,4 ± 5,6	68,7 ± 5,8
Фагоцитарное число	2,7 ± 0,2 ↑	2,5 ± 0,2 ↑	2,3 ± 0,8 ↑	2,6 ± 0,3 ↑
Фагоцитарный индекс	2,1 ± 0,2 ↑	1,6 ± 0,2 ↑	1,8 ± 0,3 ↑	1,5 ± 0,5 ↑
НСТ-сп, опт. ед.	0,1 ± 0,05	0,1 ± 0,04	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,05
НСТ-ст, опт. ед.	0,1 ± 0,07	0,1 ± 0,06	0,1 ± 0,07	0,1 ± 0,04
НСТ-ст / НСТ-сп	1,2 ± 0,1	1,6 ± 0,4	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,3
ЦИК, усл. ед.	56,9 ± 11,7	52 ± 8,2	62,7 ± 10,4	48,9 ± 12,7
IL-1β, пкг/мл	9,8 ± 3,3	10,2 ± 4	8,4 ± 4,6	11,3 ± 4,8
IL-4, пкг/мл	95,2 ± 62,3	151,7 ± 38,4	122,7 ± 62,5	143,9 ± 92,1
АФП, МЕ/мл	5,7 ± 0,7	24,3 ± 5,4*,**↑	6,4 ± 1,3	6,2 ± 0,9

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

**Достоверность различий между группами по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Примечание. Стрелками (↑↓) обозначено изменение величины параметра относительно условной физиологической нормы.

Таким образом, изучение эффектов препарата АФП в комплексном лечении пациентов с хроническими гепатитами и циррозом показало:

1. Препарат АФП в суточной дозе 4 мкг/кг массы тела, вводимый в организм человека внутривенно в течение 30 сут., отличается абсолютным отсутствием системных токсических проявлений, местно-раздражающего действия, не вызывает аллергических, анафилактогенных, гипертермических и других нежелательных реакций.

2. В процессе лечения больных хроническими гепатитами и циррозом печени, протекающими с иммунологическими нарушениями, отмечено выраженное положительное влияние АФП на течение и исход заболеваний, документированное клиническими, лабораторными, специальными и инструментальными методами контроля.

3. Препарат АФП является высокоэффективным средством для комплексного лечения хронических гепатитов и цирроза печени, а его включение в комплексную терапию этих заболеваний позволяет добиться качественно новых, более высоких результатов. Обладая ярко выраженными свойствами иммунотропного препарата, АФП, на наш взгляд, перспективен в качестве гепатопротекторного средства.

4.3. ПРИМЕНЕНИЕ АФП В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ С ТИРЕОИДИТОМ ХАШИМОТО

Основной целью проведенных клинических испытаний служила оценка безопасности и эффективности препарата АФП в комплексном лечении больных тиреоидитом Хашимото. Согласно протоколу заседания Фармкомитета № 1 от 29 января 1998 г. базой для проведения клинических испытаний препарата были утверждены Центр комплексной медицины RAM-TAL (Иерусалим, Израиль) и Пермская государственная медицинская академия.

Исследование проводилось по протоколу двойного слепого контроля с использованием рандомизации и плацебоконтроля. В первой группе пациенты получили в комплексной терапии АФП, в контрольной группах – «Плацебо». Дозировки и пути введения были аналогичны. В исследование были вовлечены больные тиреоидитом Хашимото. Возраст больных варьировал от 27 до 50 лет. Общее количество пациентов составило 53 человека.

В период проведения клинических испытаний препарата использовались стандартные методы исследований до и после лечения, формализованные в виде согласованного клинического протокола. Обследования пациентов имели целью оценку состояния органов и систем по комплексу физикальных (пол, масса, возраст, число дыхательных движений, пульс, температура тела, состояние слизистых оболочек и кожных покровов и др.), лабораторных (общеклинический анализ мочи, общеклинический и биохимический анализ крови, иммунограмма), специальных (определение уровня ТТГ, T_3, T_4 и антител к тиреопероксидазе) [112, 264, 261] и инструментальных показателей (ультразвуковое обследование щитовидной железы; электрокардиография; изотопное сканирование щитовидной железы) [118, 259, 260].

В ходе клинического исследования препарата АФП выделено 2 группы больных. Пациентам с тиреоидитом Хашимото (первая группа, 28 человек), получавшим комплексную терапию, включавшую витамины, препараты щитовидной железы, преднизолон, дополнительно в течение 30 дней внутривенно вводили (струйно) АФП (4 мкг/кг в 10,0 мл ФР один раз в сутки). Во второй группе (25 человек) проведено аналогичное комплексное лечение в сочетании с «Плацебо», в качестве которого использовался лиофильный препарат реополиглюкин, являющийся наполнителем в препарате АФП.

Всем больным лечение проведено под контролем врача по указанным схемам, с использованием одинаковых ампул, содержащих по 75 мкг альфа-фетопротеина и по 5 мг реополиглюкина и сопровождаемых паспортами подлинности. Все полученные результаты занесены в карты пациентов. Исключенных из исследования по какой-либо причине не было. Поставлено в известность Министерство здравоохранения Израиля об участии Центра комплексной медицины RAM-TAL в клинических испытаниях российского препарата. Этические вопросы согласованы с представителями религиозной общественности Израиля.

Пациенты, вовлеченные в исследование, предъявляли жалобы на вялость, повышенную утомляемость, снижение памяти, лабильность настроения, сонливость, отечность лица и конечностей, осиплость голоса, сухость кожи и слизистых, выпадение волос, боли в мышцах, нарастание массы тела при сниженном или обычном аппетите, запоры, снижение половой функции у мужчин, одышку, боли в области сердца, чувство давления за грудиной без связи с физической нагрузкой.

Общими для всех больных являлись следующие признаки: брадикардия, низкий вольтаж зубцов при электрокардиографии, удлинение интервала P-Q, снижение сегмента

ST, уплощенный изоэлектрический или отрицательный зубец Т; нормо-, гипер-, гипохромная анемия, повышенная скорость оседания эритроцитов, диспротеинемия, гиперхолестеринемия, гипергликемия. Из 53 обследованных 25 пациентов были с первично выявленным заболеванием и 28 – с хронически протекающим (находились на заместительной терапии препаратами щитовидной железы в состоянии неполноценной компенсации).

Таблица 4.3.1

Распределение больных, страдающих тиреоидитом Хашимото, по группам

Характеристики	Группа АФП ($n = 28$)	Группа плацебо ($n = 25$)
Возраст, диапазон лет	27–50	31–48
Средний возраст, лет	39	42
Продолжительность лечения, сут.	30	30
Путь введения препарата	Внутривенно	Внутривенно
Доза препарата АФП (суточная), мкг/кг	4	—

Как следует из таблицы 4.3.1, по представленным характеристикам пациенты сравниваемых групп не отличались друг от друга. При изучении гематологических и биохимических показателей (табл. 4.3.2) также не обнаружено достоверных различий.

Анализ результатов иммунологического обследования пациентов до начала лечения установил достоверное увеличение относительного числа Т-лимфоцитов ($CD3^+$) и Th ($CD4^+$) и уменьшение абсолютного числа $CD11\beta^+$-клеток в группе АФП по отношению к группе плацебо, свидетельствующие о том, что перед началом лечения у пациентов последней группы изначально был более благоприятный иммунологический фон. До начала лечения у всех больных отмечалось снижение функции щитовидной железы (по типу гипопродукции T_3, T_4, ТТГ). Присутствие в обеих группах антител к тиреопероксидазе являлось интегральным показателем наличия аутоиммунного процесса, направленного против клеток щитовидной железы (табл. 4.3.3).

При сравнении показателей иммунитета объединенной группы до лечения с аналогичными показателями после проведенного лечения в группе плацебо обнаружено, что число В-лимфоцитов (М-РОК) достоверно снизилось ($p < 0{,}05$), в то время как количество NK-клеток ($CD16^+$, %) и эозинофилов, а также концентрация IgG достоверно увеличились. На фоне гипопродукции основных гормонов щитовидной железы (T_3, T_4) и гипофиза (ТТГ) в группах сравнения зарегистрировано достоверное ($p < 0{,}05$) нарастание титра антител к тиреопероксидазе относительно всех пациентов, включенных в исследование (табл. 4.3.4). Это свидетельствует о продолжении аутоиммунной агрессии против ткани щитовидной железы.

Исследование иммунологических показателей внутри группы плацебо до и после проведенного лечения (табл. 4.3.5) показало повышение содержания В-лимфоцитов (М-РОК, %) и концентрации IgG по окончании терапевтического курса. Более того, отмечено возрастание уровня антител к тиреопероксидазе. Таким образом, очевидна активизация гуморального звена иммунитета. В группе плацебо после лечения возросло также количество эозинофилов, NK-клеток ($CD16^+$, %, абс.) и теофиллинчувствительных Е-РОК. Анализ полученных результатов отражает типичную иммунологическую картину развития тиреоидита Хашимото [89] без признаков улучшения в группе плацебо.

Сравнивая результаты иммунологического обследования пациентов основной (АФП) группы после проведенного лечения с показателями объединенной группы до лечения (табл. 4.3.6), мы зарегистрировали достоверные ($p < 0,05$) отличия, заключавшиеся в увеличении продукции T_3, T_4 и ТТГ. Несмотря на тенденцию уменьшения антител к тиреопероксидазе, результат находился в пределах статистической ошибки ($p > 0,05$). С нашей точки зрения, это может быть объяснено тем, что после прекращения процессов антителообразования период полурезорбции антител может составлять несколько месяцев. Таким образом, в результате включения АФП в комплекс терапевтических мероприятий у больных тиреоидитом Хашимото удается улучшить функцию щитовидной железы.

У пациентов группы АФП (сравнение результатов внутри группы до и после лечения) восстановилось исходно сниженное количество Т-клеток ($CD3^+$), вследствие чего увеличилось содержание $CD8^+$-лимфоцитов и достоверно возросло абсолютное содержание $CD11^+$-клеток. В отношении гуморального звена иммунитета показано уменьшение количества активных В-лимфоцитов ($CD72^+$) и нормализация уровней иммуноглобулинов. В частности, повысился исходно сниженный уровень IgA и снизился уровень повышенных иммуноглобулинов класса М. Также исчез сдвиг лейкоцитарной формулы влево, увеличилась концентрация T_3, T_4 и ТТГ в сыворотке крови, снизился уровень антител к тиреопероксидазе (табл. 4.3.6 – 4.3.8, рис. 4.3.1). После проведенного лечения больные группы АФП отметили значительное улучшение общего самочувствия: уменьшение слабости, пастозности и сухости кожи, повышение активности, жизненного тонуса (рис. 4.3.2). Наряду с субъективными положительными ощущениями пациентов объективно зарегистрировано улучшение сердечной деятельности, документированное контрольными электрокардиограммами. Ультразвуковое обследование щитовидных желез у больных основной группы до и после лечения не выявило разницы, однако увеличение продукции общего тироксина и общего трийодтиронина, сниженных до лечения, является интегральным показателем успешной терапии.

Эффективность лечения больных тиреоидитом Хашимото мы напрямую связываем с использованием препарата АФП. Три пациента из основной группы после проведенного лечения отказались от приема препаратов щитовидной железы и находятся под нашим наблюдением без каких-либо признаков ухудшения самочувствия. С другой стороны, у больных тиреоидитом Хашимото, проходивших традиционное лечение с использованием «Плацебо», объективно и субъективно достоверной разницы до и после терапии не выявлено.

Таблица 4.3.2

Клинико-биохимические показатели у больных тиреоидитом Хашимото до и после лечения (*M* ± *m*)

Показатели	Группа АФП (*n* = 28)		Группа плацебо (*n* = 25)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Клинический анализ крови				
Гемоглобин, г/л	136,3 ± 8,23	129,14 ± 7,22	132,34 ± 6,74	141,61 ± 12,2
Эритроциты × 10^{12}/л	4,2 ± 0,7	4,6 ± 0,7	4 ± 0,5	4 ± 0,7
Лейкоциты × 10^{9}/л	7,1 ± 1,2	6,9 ± 1,4	6,3 ± 0,9	6,8 ± 1,1
Палочкоядерные нейтрофилы, %	5,3 ± 0,6	3,3 ± 0,9	6,3 ± 1,1	6,8 ± 0,8
Сегментоядерные нейтрофилы, %	62 ± 5,6	65,4 ± 4,9	58,9 ± 5,5	61,3 ± 4,9
Лимфоциты, %	28,3 ± 4,1	32,4 ± 5,4	25,3 ± 3,5	29,9 ± 3
Моноциты, %	11,4 ± 0,6	9,2 ± 0,5	8,3 ± 2,4	7,3 ±1,9
Тромбоциты × 10^{9}/л	220,56 ± 24,13	215,64 ± 27,31	186,09 ± 54,91	192,67 ± 44,24
СОЭ, мм/ч	11,3 ± 5,4	5,2 ± 2,3*	17,3 ± 6,7	21,5 ± 4,7
Биохимический анализ крови				
АЛТ, нмоль/л	41,2 ± 9,8	44,6 ± 11,4	61,3 ± 10,9	51,4 ± 9,2
АСТ, нмоль/л	46,4 ± 11,1	32,5 ± 12,8	36,7 ± 18,3	51,6 ± 16,1
Общий белок, мг%	64,4 ± 5,3	66,7 ± 7,1	70,2 ± 6,9	67,6 ± 5,5
Альбумин, мг%	36,7 ± 6,7	40,2 ± 5,9	34,9 ± 6,8	31,9 ± 7,1

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$ в динамике лечения.

Таблица 4.3.3

Иммунологические показатели у больных тиреоидитом Хашимото до начала лечения (M ± m)

Показатели	Группа плацебо (*n* = 25)	Группа АФП (*n* = 28)
Лейкоциты, в 1 мкл	6 400 ± 826,93	6 488,89 ± 690,5
Палочкоядерные нейтрофилы, %	2,14 ± 0,51	4,56 ± 1,35
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	145,14 ± 45,53	331,11 ± 117,49
Сегментоядерные нейтрофилы, %	56,14 ± 4,07	53 ± 2,87
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	3 508,29 ± 469,16	3 361,11 ± 325,65
Моноциты, %	10,27 ± 1,09	8,56 ± 1,03
Моноциты, в 1 мкл	668 ± 123,44	538,89 ± 85,23
Лимфоциты, %	29,57 ± 3,82	31,67 ± 3,57
Лимфоциты, в 1 мкл	1 955,14 ± 334,23	2 117,56 ± 342,81
Эозинофилы, %	1,86 ± 0,71	2,22 ± 0,52

Продолжение таблицы 4.3.3

Показатели	Группа плацебо ($n = 25$)	Группа АФП ($n = 28$)
Эозинофилы, в 1 мкл	123,43 ± 47,41	140,22 ± 37,37
Е-РОК тотальные, %	48,29 ± 5,11	54,86 ± 4,43
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	915,65 ± 137,61	1 399,77 ± 296,74
Ранние Е-РОК, %	34,29 ± 4,09	37,57 ± 5,58
Термостабил. Е-РОК, %	28 ± 2,47	31,43 ± 3,49
Теоф. резистентные, %	36,4 ± 4,05	46,00 ± 5,57
Теоф. чувствительные, %	7,33 ± 4,6	2,43 ± 4,75
Теоф. резистент. / Теоф. чувствит.	3,34 ± 0,33	6,14 ± 2,19
Т-активин чувствительные (5 мг/мл), %	46,71 ± 4,58	50 ± 6,66
Т-активин чувствительные (0,5 мг/мл), %	36,83 ± 4,58	24 ± 8,25
М-РОК, %	7,67 ± 0,88	10,57 ± 1,58*
М-РОК, в 1 мкл	200,74 ± 38,14	269,27 ± 64,32
$CD3^+$, %	48,57 ± 3,95*	66,25 ± 1,65
$CD3^+$, в 1 мкл	995,71 ± 212,83	1 256,19 ± 436,98
$CD4^+$, %	15,29 ± 1,258*	25,75 ± 4,05
$CD4^+$, в 1 мкл	303,37 ± 52,19	529,29 ± 215,63
$CD8^+$, %	19,43 ± 2,42	25 ± 2,91
$CD8^+$, в 1 мкл	384,85 ± 71,97	178,5 ± 98,01
$CD16^+$, %	11,43 ± 2,15	11,67 ± 2,03
$CD16^+$, в 1 мкл	213,05 ± 56,81	262,58 ± 108,02
$CD72^+$, %	10,43 ± 2,26	14 ± 0,91
$CD72^+$, в 1 мкл	166,18 ± 38,68	263,69 ± 81,80
$CD11^+$, %	11,33 ± 3,12	6 ± 4,03
$CD11^+$, в 1 мкл	216,14 ± 85,06*	42 ± 26,14
$HLA\text{-}DR^+$, %	13,83 ± 1,47	20 ± 6,67
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	240,57 ± 65,12	142 ± 95,12
IgG, г/л	8,36 ± 1,66	10,99 ± 1,25
IgA, г/л	1,12 ± 0,26	3,91 ± 0,81
IgM, г/л	1,31 ± 0,3	0,96 ± 0,16
Процент фагоцитоза	74,27 ± 2,85	67,59 ± 4,97
Фагоцитарное число	2,27 ± 0,09	2,4 ± 0,196
Фагоцитарный индекс	1,69 ± 0,099	1,68 ± 0,25
НСТ-сп, опт. ед.	0,23 ± 0,13	0,13 ± 0,028
НСТ-ст, опт. ед.	0,27 ± 0,14	0,149 ± 0,02

Окончание таблицы 4.3.3

Показатели	Группа плацебо ($n = 25$)	Группа АФП ($n = 28$)
НСТ-ст / НСТ-сп	2,95 ± 1,87	1,67 ± 0,35
ЦИК, усл. ед.	38,43 ± 13,25	37 ± 4,68
T_3, нмоль/л	0,98 ± 0,2	0,75 ± 0,05
T_4, мкг/дл	2,86 ± 1,29	3,23 ± 1,03
ТТГ, мЕ/л	0,86 ± 0,29	0,73 ± 0,47
Антитела к тиреопероксидазе, МЕ/дл	4,13 ± 2,6	6,88 ± 1,82

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 4.3.4

Иммунологические показатели у больных тиреоидитом Хашимото в группе плацебо после проведенного лечения ($M \pm m$)

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения ($n = 53$)	Группа плацебо после лечения ($n = 25$)
Лейкоциты, в 1 мкл	6 450 ± 512,67	6 567 ± 898,02
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,5 ± 0,83	1,833 ± 1,64
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	249,75 ± 71,22	272,571 ± 59,22
Сегментоядерные нейтрофилы, %	54,38 ± 2,35	55,5 ± 1,91
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	3 425,5 ± 265,88	3 175,143 ± 734,44
Моноциты, %	9,31 ± 0,76	9,333 ± 1,67
Моноциты, в 1 мкл	595,38 ± 71,55	571,667 ± 81,28
Лимфоциты, %	30,75 ± 2,54	29,333 ± 1,93
Лимфоциты, в 1 мкл	2 046,5 ± 235,02	1 958 ± 324,54
Эозинофилы, %	2,06 ± 0,41	6 ± 0,89*
Эозинофилы, в 1 мкл	132,88 ± 28,58	212,571 ± 50,99*
Е-РОК тотальные, %	51,57 ± 3,37	53,667 ± 6,14
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	1 157,71 ± 170,87	1 053,48 ± 213,95
Ранние Е-РОК, %	40 ± 3,5	37 ± 4,36
Термостабил. Е-РОК, %	2,08 ± 1,48	5,857 ± 4,79
Теоф. резистент. / Теоф. чувствит.	4,39 ± 0,9	8,963 ± 2,91
Т-активин чувствительные (5 мг/мл), %	47,13 ± 3,99	46,5 ± 9,56
Т-активин чувствительные (0,5 мг/мл), %	35 ± 4,28	41,833 ± 6,12
М-РОК, %	11,21 ± 0,91	11,857 ± 0,96
М-РОК, в 1 мкл	235,01 ± 37,16	141,02 ± 20,59

Окончание таблицы 4.3.4

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения (n = 53)	Группа плацебо после лечения (n = 25)
0-клетки, %	37,21 ± 3,63	38,667 ± 6,28
0-клетки, в 1 мкл	776,99 ± 121,99	763,500 ± 181,85
$CD3^+$, %	55 ± 3,67	50,333 ± 3,73
$CD3^+$, в 1 мкл	1090,42 ± 199,24	981,707 ± 163,49
$CD4^+$, %	19,09 ± 2,22	19,167 ± 3,49
$CD4^+$, в 1 мкл	385,52 ± 85,4	353,847 ± 80,09
$CD8^+$, %	20,13 ± 2,21	23,333 ± 4,43
$CD8^+$, в 1 мкл	359,05 ± 67,46	425,74 ± 78,73
$CD16^+$, %	11,5 ± 1,56	18 ± 2,58*
$CD16^+$, в 1 мкл	227,91 ± 48,39	365,493 ± 87,65
$CD72^+$, %	11,73 ± 1,53	7 ± 1,51
$CD72^+$, в 1 мкл	201,64 ± 39	150,167 ± 51,59
$CD11^+$, %	10,57 ± 2,74	11,667 ± 2,86
$CD11^+$, в 1 мкл	194,38 ± 76,82	114,593 ± 67,94
$HLA\text{-}DR^+$, %	14,71 ± 1,52	17,17 ± 2,06
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	228,25 ± 57,72	337,37 ± 60,02
IgG, г/л	9,76 ± 1,04	15,17 ± 2,82*
IgA, г/л	2,61 ± 0,57	1,38 ± 0,19
IgM, г/л	1,13 ± 0,17	0,95 ± 0,3
Процент фагоцитоза	70,52 ± 3,09	65,57 ± 7,18
Фагоцитарное число	2,34 ± 0,11	2,33 ± 0,19
Фагоцитарный индекс	1,68 ± 0,14	1,57 ± 0,32
НСТ-сп, опт. ед.	0,16 ± 0,05	0,27 ± 0,13
НСТ-ст, опт. ед.	0,19 ± 0,05	0,24 ± 0,09
НСТ-ст / НСТ-сп	2,13 ± 0,68	1,04 ± 0,17
ЦИК, усл. ед.	37,63 ± 6,11	58,83 ± 13,93
T_3, нмоль/л	1,10 ± 0,53	0,98 ± 0,22
T_4, мкг/дл	3,97 ± 0,57	2,66 ± 1,64
ТТГ, мЕ/л	0,92 ± 0,58	0,57 ± 0,32
Антитела к тиреопероксидазе, МЕ/дл	3,46 ± 1,5	6,66 ± 0,62*

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 4.3.5

Изменение иммунологических показателей у больных тиреоидитом Хашимото в группе плацебо в результате лечения (*M* ± *m*)

Показатели	Группа плацебо до лечения (*n* = 25)	Группа плацебо после лечения (*n* = 25)
Лейкоциты, в 1 мкл	6 400 ± 826,93	6 566,67 ± 898,02
Палочкоядерные нейтрофилы, %	2,14 ± 0,51	1,83 ± 1,64
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	145,14 ± 45,53	272,57 ± 59,22
Сегментоядерные нейтрофилы, %	56,14 ± 4,07	55,50 ± 1,91
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	3 508,27 ± 469,16	3 175,14 ± 734,44
Моноциты, %	10,27 ± 1,09	9,33 ± 1,67
Моноциты, в 1 мкл	668 ± 123,44	571,67 ± 81,28
Лимфоциты, %	29,57 ± 3,82	29,33 ± 1,93
Лимфоциты, в 1 мкл	1 955,14 ± 334,23	1 958,00 ± 324,54
Эозинофилы, %	1,86 ± 0,71	6 ± 0,89*
Эозинофилы, в 1 мкл	123,43 ± 47,41	212,57 ± 50,99*
Е-РОК тотальные, %	48,29 ± 5,11	53,67 ± 6,13
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	915,65 ± 137,61	1 053,48 ± 213,95
Ранние Е-РОК, %	34,29 ± 4,09	39 ± 2,95
Термостабил. Е-РОК, %	28 ± 2,47	29,67 ± 3,35
Теоф. резистентные, %	36,4 ± 4,05	37 ± 4,36
Теоф. чувствительные, %	7,33 ± 4,6	5,86 ± 4,78*
Теоф. резистент. / теоф. чувствит.	3,34 ± 0,33	8,96 ± 2,91
Т-активин чувствительные (5 мг/мл), %	46,71 ± 4,58	46,5 ± 9,56
Т-активин чувствительные (0,5 мг/мл), %	36,83 ± 4,58	41,83 ± 6,12
М-РОК, %	7,67 ± 0,88	11,86 ± 0,96*
М-РОК, в 1 мкл	200,74 ± 38,14	141,02 ± 20,59
0-клетки, %	39,86 ± 5,33	38,67 ± 6,28
0-клетки, в 1 мкл	838,76 ± 237,28	763,5 ± 181,85
$CD3^+$, %	48,57 ± 3,95*	50,33 ± 3,73
$CD3^+$, в 1 мкл	995,77 ± 212,83	981,71 ± 163,49
$CD4^+$, %	15,29 ± 1,25*	19,17 ± 3,49
$CD4^+$, в 1 мкл	303,37 ± 52,19	353,85 ± 80,09
$CD8^+$, %	19,43 ± 2,42	23,33 ± 4,43
$CD8^+$, в 1 мкл	384,85 ± 71,97	425,74 ± 78,73
$CD16^+$, %	11,43 ± 2,15	18 ± 2,58*, **

Окончание таблицы 4.3.5

Показатели	Группа плацебо до лечения (n = 25)	Группа плацебо после лечения (n = 25)
$CD16^+$, в 1 мкл	213,06 ± 56,81	365,49 ± 87,65*
$CD72^+$, %	10,43 ± 2,26	7 ± 1,5
$CD72^+$, в 1 мкл	166,18 ± 38,68	150,17 ± 51,59
$CD11^+$, %	11,33 ± 3,12	11,67 ± 2,86
$CD11^+$, в 1 мкл	216,14 ± 85,06*	114,59 ± 67,94
$HLA\text{-}DR^+$, %	13,83 ± 1,47	17,17 ± 2,06
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	240,57 ± 65,12	337,37 ± 60,02
IgG, г/л	8,36 ± 1,66	15,17 ± 2,82*
IgA, г/л	1,13 ± 0,26	1,38 ± 0,19
IgM, г/л	1,31 ± 0,3	0,95 ± 0,3
Процент фагоцитоза	74,29 ± 2,85	65,57 ± 7,18
Фагоцитарное число	2,27 ± 0,09	2,33 ± 0,19
Фагоцитарный индекс	1,67 ± 0,099	1,57 ± 0,32
НСТ-сп, опт. ед.	0,23 ± 0,135	0,27 ± 0,13
НСТ-ст, опт. ед.	0,27 ± 0,137	0,24 ± 0,09
НСТ-ст / НСТ-сп	2,95 ± 1,87	1,05 ± 0,17
ЦИК, усл. ед.	38,43 ± 13,25	58,83 ± 13,93
T_3, нмоль/л	0,98 ± 0,2	0,98 ± 0,22
T_4, мкг/дл	2,86 ± 1,27	2,67 ± 1,64
ТТГ, мЕ/л	0,86 ± 0,29	0,57 ± 0,32
Антитела к тиреопероксидазе, МЕ/дл	4,13 ± 2,6	6,66 ± 0,62*

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 4.3.6

Иммунологические показатели у больных тиреоидитом Хашимото после проведенного лечения с применением АФП (*M* ± *m*)

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения (*n* = 53)	Группа АФП после лечения (*n* = 28)
Лейкоциты, в 1 мкл	6 450 ± 512,67	8 160 ± 1 163,06
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,5 ± 0,83	3,1 ± 0,82
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	249,75 ± 71,22	271,2 ± 91,92
Сегментоядерные нейтрофилы, %	54,38 ± 2,35	53,1 ± 2,12
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	3 425,5 ± 265,88	4 410 ± 716,39
Моноциты, %	9,31 ± 0,76	8,6 ± 1,32
Моноциты, в 1 мкл	595,38 ± 71,55	696,4 ± 159,93
Лимфоциты, %	30,75 ± 2,54	32 ± 2,32
Лимфоциты, в 1 мкл	2 046,5 ± 235,02	2 536,4 ± 294,74
Эозинофилы, %	2,06 ± 0,41	3,2 ± 0,71
Эозинофилы, в 1 мкл	132,88 ± 28,58	146 ± 48,53
Е-РОК тотальные, %	51,57 ± 3,37	55,4 ± 2,5
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	1 157,71 ± 170,87	1 422,04 ± 176,22
Ранние Е-РОК, %	35,93 ± 3,36	37 ± 2,58
Термостабил. Е-РОК, %	29,71 ± 2,11	27,5 ± 3,19
Теоф. резистентные, %	40 ± 3,5	39,56 ± 3,89
Теоф. чувствительные, %	2,08 ± 1,48	6,6 ± 1,78
Теоф. резистент. / теоф. чувствит.	4,39 ± 0,9	7,79 ± 2,42
Т-активин чувствительные (5 мг/мл), %	47,13 ± 3,99	36,67 ± 10,89
Т-активин чувствительные (0,5 мг/мл), %	35 ± 4,28	27 ± 7,94
М-РОК, %	11,21 ± 0,91	10 ± 1,04
М-РОК, в 1 мкл	235,01 ± 37,16	214,07 ± 52,38
0-клетки, %	37,21 ± 3,63	32,5 ± 2,46
0-клетки, в 1 мкл	776,99 ± 121,99	800,29 ± 111,35
$CD3^+$, %	55 ± 3,67	59,5 ± 3,43
$CD3^+$, в 1 мкл	1 094,25 ± 199,24	1 087,76 ± 293,05
$CD4^+$, %	19,09 ± 2,22	21,75 ± 10,07
$CD4^+$, в 1 мкл	385,52 ± 85,4	328,09 ± 188,42
$CD8^+$, %	20,13 ± 2,21	18,67 ± 4,98
$CD8^+$, в 1 мкл	359,05 ± 67,46	262,45 ± 28,76
$CD16^+$, %	11,5 ± 1,56	10,67 ± 3,18

Окончание таблицы 4.3.6

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения (*n* = 53)	Группа АФП после лечения (*n* = 28)
$CD16^+$, в 1 мкл	227,91 ± 48,39	155,65 ± 38,32
$CD72^+$, %	11,73 ± 1,52	9,75 ± 1,25
$CD72^+$, в 1 мкл	201,64 ± 39	240,86 ± 70,34
$CD11^+$, %	10,57 ± 2,74	15,5 ± 0,5
$CD11^+$, в 1 мкл	194,38 ± 76,82	201,5 ± 42,5
$HLA\text{-}DR^+$, %	14,71 ± 1,52	14 ± 3
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	228,25 ± 57,72	283,5 ± 32,5
IgG, г/л	9,76 ± 1,04	11,11 ± 1,19
IgA, г/л	2,61 ± 0,57	2,13 ± 0,52
IgM, г/л	1,13 ± 0,17	0,85 ± 0,21
Процент фагоцитоза	70,52 ± 3,09	71,44 ± 4,42
Фагоцитарное число	1,68 ± 0,14	1,79 ± 0,23
Фагоцитарный индекс	2,34 ± 0,11	2,42 ± 0,17
НСТ-сп, опт. ед.	0,16 ± 0,05	0,128 ± 0,012
НСТ-ст, опт. ед.	0,19 ± 0,05	0,138 ± 0,017
НСТ-ст / НСТ-сп	2,13 ± 0,67	1,11 ± 0,113
ЦИК, усл. ед.	37,63 ± 6,11	39,9 ± 7,52
T_3, нмоль/л	1,1 ± 0,53	3,79 ± 0,21*
T_4, мкг/дл	3,97 ± 0,57	8,18 ± 2,44*
ТТГ, мЕ/л	0,92 ± 0,58	2,15 ± 0,32*
Антитела к тиреопероксидазе, МЕ/дл	3,46 ± 1,5	2,19 ± 1,49

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 4.3.7

Изменение иммунологических показателей у больных тиреоидитом Хашимото в группе АФП в результате лечения ($M \pm m$)

Показатели	Группа АФП до лечения ($n = 28$)	Группа АФП после лечения ($n = 28$)
Лейкоциты, в 1 мкл	6 488,89 ± 690,5	8 160 ± 1 163,06
Палочкоядерные нейтрофилы, %	4,56 ± 1,35	3,1 ± 0,82
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	331,11 ± 117,49	271,2 ± 91,92
Сегментоядерные нейтрофилы, %	53 ± 2,87	53,1 ± 2,12
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	3 361,11 ± 325,65	4 410 ± 716,39**
Моноциты, %	8,56 ± 1,03	8,6 ± 1,32
Моноциты, в 1 мкл	538,89 ± 85,23	696,4 ± 159,93
Лимфоциты, %	31,67 ± 3,57	32 ± 2,32
Лимфоциты, в 1 мкл	2 117,56 ± 342,81	2 536,4 ± 294,74
Эозинофилы, %	2,22 ± 0,52	3,2 ± 0,71
Эозинофилы, в 1 мкл	140,22 ± 37,37	146 ± 48,53
Е-РОК тотальные, %	54,86 ± 4,43	55,4 ± 2,5
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	1 399,77 ± 296,74	1 422,04 ± 176,22
Ранние Е-РОК, %	37,57 ± 5,58	37 ± 2,58
Термостабил. Е-РОК, %	31,43 ± 3,49	27,5 ± 3,19
Теоф. резистентные, %	46 ± 5,57	39,56 ± 3,89
Теоф. чувствительные, %	2,43 ± 4,75	6,6 ± 1,78
Теоф. резистент. / теоф. чувствит.	6,14 ± 2,19	7,79 ± 2,42
Т-активин чувствительные (5 мг/мл), %	50 ± 6,66	36,67 ± 10,89
Т-активин чувствительные (0,5 мг/мл), %	24 ± 8,25	27 ± 7,94
М-РОК, %	10,57 ± 1,59*	10 ± 1,04
М-РОК, в 1 мкл	269,27 ± 64,32	214,07 ± 52,38
0-клетки, %	34,57 ± 5,12	32,5 ± 2,46
0-клетки, в 1 мкл	715,24 ± 83,17	800,29 ± 111,35
$CD3^+$, %	66,25 ± 1,65	59,5 ± 3,43
$CD3^+$, в 1 мкл	1 256,19 ± 436,98	1 087,76 ± 293,06
$CD4^+$, %	25,75 ± 4,05	21,75 ± 10,07
$CD4^+$, в 1 мкл	529,29 ± 215,63	328,09 ± 188,42
$CD8^+$, %	25 ± 2,91	18,67 ± 4,98
$CD8^+$, в 1 мкл	508,5 ± 98,01	262,45 ± 28,76
$CD16^+$, %	11,67 ± 2,03	10,67 ± 3,18
$CD16^+$, в 1 мкл	262,58 ± 108,02	155,65 ± 38,32

Окончание таблицы 4.3.7

Показатели	Группа АФП до лечения (*n* = 28)	Группа АФП после лечения (*n* = 28)
$CD72^+$, %	14 ± 0,91	9,75 ± 1,25*
$CD72^+$, в 1 мкл	296,69 ± 81,8	240,86 ± 70,34
$CD11^+$, %	6 ± 4,03	15,5 ± 0,5*
$CD11^+$, в 1 мкл	42 ± 26,14	101,5 ± 42,5*
$HLA\text{-}DR^+$, %	20 ± 6,67	14 ± 3
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	142 ± 95,12	283,5 ± 32,5
IgG, г/л	10,99 ± 1,25	11,11 ± 1,19
IgA, г/л	3,91 ± 0,81	2,13 ± 0,52*
IgM, г/л	0,96 ± 0,16	0,85 ± 0,21
Процент фагоцитоза	67,59 ± 4,97	71,44 ± 4,42
Фагоцитарное число	2,4 ± 0,19	2,42 ± 0,17
Фагоцитарный индекс	1,68 ± 0,25	1,79 ± 0,23
НСТ-сп, опт. ед.	0,126 ± 0,028	0,128 ± 0,012
НСТ-ст, опт. ед.	0,149 ± 0,015	0,138 ± 0,017
НСТ-ст / НСТ-сп	1,67 ± 0,354	1,11 ± 0,11
ЦИК, усл. ед.	37 ± 4,68	39,9 ± 7,52
T_3, нмоль/л	0,75 ± 0,05	3,79 ± 0,21*
T_4, мкг/дл	3,23 ± 1,03	8,18 ± 2,44*
ТТГ, мЕ/л	0,73 ± 0,47	2,15 ± 0,32
Антитела к тиреопероксидазе, МЕ/дл	6,88 ± 1,82	2,19 ± 1,49*

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 4.3.8

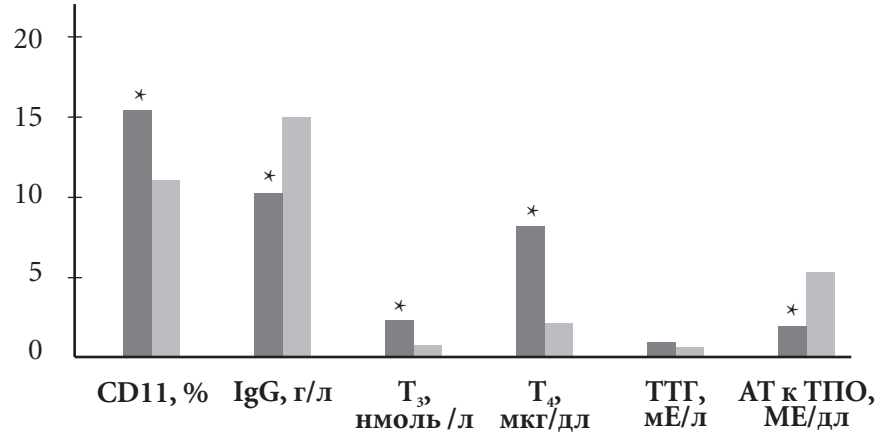
Иммунологические показатели у больных тиреоидитом Хашимото после проведенного лечения (*M* ± *m*)

Показатели	Группа плацебо после лечения (*n* = 25)	Группа АФП после лечения (*n* = 28)
Лейкоциты, в 1 мкл	6 566,67 ± 898,02	8 160 ± 1163,06
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1,83 ± 1,64	3,1 ± 0,82
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	272,57 ± 59,22	271,2 ± 91,92
Сегментоядерные нейтрофилы, %	55,5 ± 1,91	53,1 ± 2,12
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	3 175,14 ± 734,44	4 410 ± 716,39
Моноциты, %	9,33 ± 1,67	8,6 ± 1,32
Моноциты, в 1 мкл	571,67 ± 81,28	696,4 ± 159,93
Лимфоциты, %	29,33 ± 1,93	32 ± 2,32
Лимфоциты, в 1 мкл	1 958 ± 324,54	2 536,4 ± 294,74
Эозинофилы, %	53,67 ± 6,14	55,4 ± 2,5
Эозинофилы, в 1 мкл	1 053,48 ± 213,95	1 422,04 ± 176,22
Е-РОК тотальные, %	39 ± 2,96	37 ± 2,58
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	29,67 ± 3,35	27,5 ± 3,19
Ранние Е-РОК, %	37 ± 4,36	39,56 ± 3,89
Термостабил. Е-РОК, %	5,86 ± 4,79	6,6 ± 1,79
Теоф. резистент. / теоф. чувствит.	8,96 ± 2,91	7,79 ± 2,42
Т-активин чувствительные (5 мг/мл), %	46,5 ± 9,56	36,67 ± 10,89
Т-активин чувствительные (0,5 мг/мл), %	41,83 ± 6,12	27 ± 7,94
М-РОК, %	11,86 ± 0,96	10 ± 1,04
М-РОК, в 1 мкл	141,02 ± 20,59	214,07 ± 52,38
0-клетки, %	38,67 ± 6,28	32,5 ± 2,46
0-клетки, в 1 мкл	763,5 ± 181,85	800,29 ± 111,35
$CD3^+$, %	50,33 ± 3,73	59,5 ± 3,43
$CD3^+$, в 1 мкл	981,71 ± 163,49	1 087,76 ± 293,06
$CD4^+$, %	19,17 ± 3,49	21,75 ± 10,07
$CD4^+$, в 1 мкл	353,85 ± 80,09	328,09 ± 188,42
$CD8^+$, %	23,33 ± 4,43	18,67 ± 4,98
$CD8^+$, в 1 мкл	425,74 ± 78,73	262,45 ± 28,76
$CD16^+$, %	18 ± 2,58	10,67 ± 3,18
$CD16^+$, в 1 мкл	365,49 ± 87,65	255,65 ± 38,32
$CD72^+$, %	7 ± 1,51	9,75 ± 1,25

Окончание таблицы 4.3.8

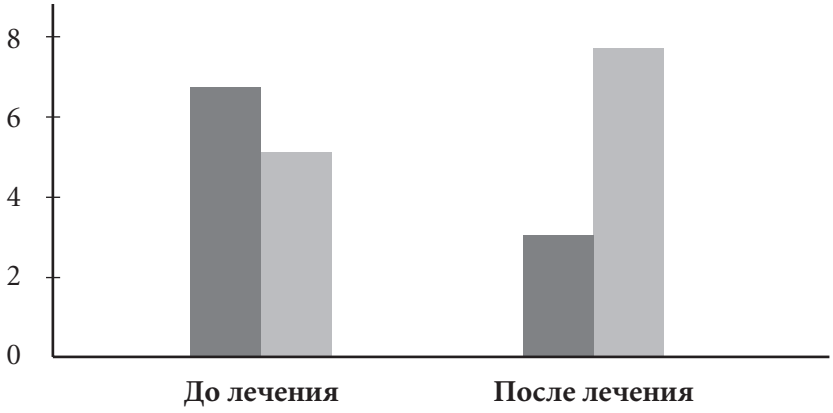
Показатели	Группа плацебо после лечения (*n* = 25)	Группа АФП после лечения (*n* = 28)
$CD72^+$, в 1 мкл	150,17 ± 51,59	240,86 ± 70,34
$CD11^+$, %	11,67 ± 2,86	15,5 ± 0,5*
$CD11^+$, в 1 мкл	114,59 ± 67,94	101,50 ± 42,5
$HLA\text{-}DR^+$, %	17,17 ± 2,06	14 ± 3
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	337,37 ± 60,02	283,5 ± 32,5
IgG, г/л	15,17 ± 2,82	11,11 ± 1,19*
IgA, г/л	1,38 ± 0,19	2,13 ± 0,52
IgM, г/л	0,95 ± 0,3	0,85 ± 0,21
Процент фагоцитоза	65,57 ± 7,18	71,44 ± 4,42
Фагоцитарное число	2,33 ± 0,198	2,42 ± 0,17
Фагоцитарный индекс	1,57 ± 0,32	1,79 ± 0,23
НСТ-сп, опт. ед.	0,27 ± 0,132	0,128 ± 0,012
НСТ-ст, опт. ед.	0,24 ± 0,09	0,138 ± 0,017
НСТ-ст / НСТ-сп	1,047 ± 0,172	1,111 ± 0,113
ЦИК, усл. ед.	58,83 ± 13,93	39,9 ± 7,52
T_3, нмоль/л	0,98 ± 0,22	3,79 ± 0,21*
T_4, мкг/дл	2,67 ± 1,64	8,18 ± 2,44*
ТТГ, мЕ/л	0,57 ± 0,32	2,15 ± 0,32
Антитела к тиреопероксидазе, МЕ/дл	6,66 ± 0,62	2,19 ± 1,49*

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.



АФП	15,5	11,1	2,7	8,17	1,15	2,19
Плацебо	11,6	15,1	0,9	2,66	0,57	6,66

Рис. 4.3.1. **Некоторые иммунологические и эндокринные показатели у больных тиреоидитом Хашимото после проведенного лечения**
*Достоверность при $p < 0,05$ (сопоставление между группами).



АФП	6,7	3,1
Плацебо	5,4	7,7

Рис. 4.3.2. **Изменение тяжести симптомов у больных тиреоидитом Хашимото под влиянием лечения (в баллах)**

4.4. ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТА АФП В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ЯЗВЕННОГО КОЛИТА И ГРАНУЛЕМАТОЗНОГО ЭНТЕРИТА (БОЛЕЗНЬ КРОНА)

Неспецифический язвенный колит (НЯК) и болезнь Крона протекают с поражением слизистого и подслизистого слоев толстой и тонкой кишки в результате аутоиммунного поражения [128, 171]. Нами проведено плацебоконтролируемое, с использованием рандомизации клиническое испытание препарата АФП у больных неспецифическими воспалительными заболеваниями кишечника в трех клиниках: в гастроэнтерологическом центре г. Екатеринбурга, в проктологическом отделении Курганской областной клинической больницы, в центре комплексной медицины RAM-TAL г. Иерусалима (Израиль).

Общее количество пациентов, вовлеченных в клинические испытания, составило 78 человек в возрасте 16–72 года. Из них с НЯК – 56 человек, с болезнью Крона – 22 человека. Пациенты основной группы (38 человек) в комплексном лечении в течение 30 сут. парентерально получали АФП в дозе 4 мкг/кг массы тела. Во второй группе (40 человек) проведено комплексное лечение с использованием «Плацебо» (5 мг лиофильного реополиглюкина) с аналогичной кратностью, курсом и путем введения.

Основной целью проведенных клинических испытаний являлась оценка безопасности и эффективности препарата АФП в комплексном лечении больных неспецифическим язвенным колитом и болезнью Крона.

В соответствии с целью проведения клинических испытаний препарата АФП использовались стандартные методы исследований до и после лечения, формализованные в виде согласованного клинического протокола. Пациенты были обследованы в начале испытания и на второй день после его окончания. В процессе обследования оценивалось состояние органов и систем по комплексу физикальных (пол, масса тела, возраст, число дыхательных движений, пульс, температура тела, состояние слизистых оболочек и кожных покровов и др.), лабораторных (общеклинический анализ мочи; общеклинический и биохимический анализ крови; иммунограмма), специальных и инструментальных показателей (ультразвуковое обследование органов брюшной полости, электрокардиография, ректороманоскопия, колоноскопия, фистулография, ирригоскопия, гистологическое исследование тканей толстого кишечника [114, 128, 171, 402]).

В ходе клинического исследования препарата АФП выделено несколько подгрупп больных:

1. Пациенты с болезнью Крона (10 человек), получавшие комплексную терапию, включавшую сульфаниламидные препараты, преднизолон, витамины и препараты, нормализующие микрофлору кишечника, и дополнительно. в течение 30 дней АФП по 4 мкг/кг массы в сутки внутримышечно.

2. Пациенты с неспецифическим язвенным колитом (28 человек), получавшие комплексную терапию, включавшую витамины (B_1, B_6, C), ε-аминокапроновую кислоту, 1%-ный раствор $CaCL_2$, 10%-ный раствор альбумина, кортикостероиды, антигистаминные препараты, сульфаниламиды и дополнительно в течение 30 дней внутривенно (струйно) АФП (4 мкг/кг в 10 мл ФР один раз в сутки).

В соответствующих группах сравнения (болезнь Крона – 12 человек; неспецифический язвенный колит – 28 человек) проведено аналогичное комплексное лечение в сочетании с «Плацебо», в качестве которого использовался лиофильный препарат реополиглюкин, являющийся наполнителем в препарате АФП. В контрольных группах «Плацебо» вводили по аналогичной схеме.

Всем больным лечение проведено по указанным схемам с использованием одинаковых ампул, содержащих по 75 мкг АФП и по 5 мг реополиглюкина и сопровождаемых паспортами подлинности. Полученные результаты занесены в карты пациентов. Исключенных из исследования по какой-либо причине не было. Всем участникам исследования до начала лечения была представлена письменная информация о препарате и получено письменное согласие на добровольное участие в клинических испытаниях препарата АФП.

Все больные, включенные в данное исследование, находились под длительным (5–15 лет) диспансерным наблюдением. При оценке эффективности препарата АФП использовался традиционный набор клинико-лабораторных и инструментальных параметров, выполненных по программе диспансерного наблюдения и специализированного лечения данной категории пациентов. На этапе отбора в исследование включались лица, подлежащие, с точки зрения колопроктологов, оперативной санации – колэктомии. Больные на протяжении всего периода заболевания получали различное патогенетическое медикаментозное лечение, однако улучшения не наблюдалось, а более чем в половине случаев на фоне проводимого лечения заболевание прогрессировало.

Общим для всех пациентов являлось длительное, хроническое, рецидивирующее течение заболевания, сопровождавшееся болевым синдромом различной локализации в области брюшной полости, вызываемым воспалительным процессом и нарушением моторики кишечника. Общие изменения состояния больных имели интоксикационно-аллергическую природу. К ним относились дистрофические процессы во внутренних паренхиматозных органах, изменение крови (анемия, лейкоцитоз, гипопротеинемия, диспротеинемия, уменьшение количества микроэлементов в крови, высокая скорость оседания эритроцитов и повышенная свертываемость крови), а также неспецифические поражения суставов конечностей и позвоночника, поражения глаз в виде кератитов, наличие гранулематозных процессов кожи.

Рентгенологическая картина кишечника при развитии болезни Крона и неспецифического язвенного колита не отличалась разнообразием и была представлена резким, неравномерным сужением пораженных участков кишки с неровностью контуров стенок, отсутствием гаустрации. Рельеф слизистой оболочки имел либо зубчатый, со спикулоподобными выступами, либо ячеистый характер. При эндоскопическом обследовании просвета кишечника традиционно присутствовала отечность слизистой, ее гиперемия, мелкие геморрагии, определялся в большом количестве фибринозный экссудат. Вследствие утолщения стенок кишки и сужения просвета пораженный участок кишки выглядел деформированным («симптом шланга»). Характерным признаком у всех обследованных являлось наличие продольных узких глубоких язвенных дефектов с поперечными щелевидными изъязвлениями, ограничивающими сохранившиеся участки слизистой оболочки кишки (картина булыжной мостовой). При гистологическом исследовании микроскопическая картина соответствовала неспецифическому воспалительному процессу, имеющему некоторые особенности: воспалительно-клеточная инфильтрация распространялась на все слои кишечной стенки, но более проявлялась в подслизистом слое с выраженным гранулематозным продуктивным процессом.

Следует отметить длительный терапевтический катамнез пациентов, не принесший сколько-нибудь значительных изменений в течение заболевания и общее состояние больных. У трех больных в результате самопроизвольной перфорации толстой кишки была сформирована длительно функционирующая фистула.

Сравнительный анализ результатов лечения пациентов с болезнью Крона и НЯК групп АФП и плацебо выявил следующие закономерности. Субъективно 100% больных, получавших препарат АФП в комплексном лечении болезни Крона и неспецифического язвенного колита, отметили несомненное улучшение общего самочувствия. Позитивные изменения состояния пациентов основных групп приходились ориентировочно на 10–14-е сутки лечения. По окончании курса лечения была достигнута компенсация и субкомпенсация практически всех исследуемых лабораторных показателей (табл. 4.4.1), объединенных в общую статистическую обработку по причине близости патогенетической картины при НЯК и болезни Крона, а также схожести симптомокомплексов и тяжести состояния при указанных заболеваниях [128, 171]. Установлено, что использование препарата АФП в комплексных схемах терапии способствует уменьшению воспалительно-пролиферативных процессов в слизистой оболочке кишечника за счет снижения уровней IgA и IgM, а также $CD71^+$-клеток, характеризующих активацию лейкоцитов (рис. 4.4.1, 4.4.2). Улучшение лабораторных данных в этой группе больных коррелировало с клиническими наблюдениями за состоянием пациентов.

У 18 (47,3%) больных, включенных в основные клинические группы, зарегистрировано увеличение массы тела, причем одна из тяжелобольных прибавила в весе 12 кг. В группах плацебо весовые характеристики до начала лечения и после его завершения не изменялись.

В ходе комплексного лечения в сочетании с препаратом АФП у больных неспецифическим язвенным колитом и болезнью Крона отмечено значительное уменьшение частоты диспепсических расстройств в виде кровавых поносов. У 30% больных болезнью Крона и у 32,1% больных НЯК к концу лечения мы добились полной нормализации стула (качественно и количественно).

Таблица 4.4.1

Изменения лабораторных показателей пациентов с НЯК и болезнью Крона в группах АФП и плацебо в результате лечения ($M \pm m$)

Показатель	Группа АФП ($n = 38$)		Группа плацебо ($n = 40$)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Общий анализ крови				
Гемоглобин, г/л	82,3 ± 12,4	129,5 ± 8*	96,6 ± 11,8	96,1 ± 12,4
Эритроциты × 10^{12}/л	2,8 ± 0,7	3,9 ± 0,7*	2,4 ± 1,1	2,8 ± 0,8
Лейкоциты × 10^{12}/л	13,6 ± 2,7	8,2 ± 3,4	12,5 ± 3,3	9,9 ± 1,6
Палочкоядерные нейтрофилы, %	9,7 ± 4,3	4,1 ± 2,2*	11,6 ± 3,3	9,4 ± 1,5
Сегментоядерные нейтрофилы, %	50 ± 9,4	31 ± 3,7*	49 ± 5,1	55,5 ± 5,2
Лимфоциты, %	20,2 ± 4,3	31 ± 2,2*	22,9 ± 4,6	24,7 ± 3,1
Эозинофилы, %	4,2 ± 1,4	2,1 ± 1,7	5,1 ± 0,6	4,5 ± 1,2
Моноциты, %	9,3 ± 1,1	6,3 ± 0,9	7,2 ± 2,1	11,3 ± 0,7
Тромбоциты × 10^9/л	177,5 ± 38,9	189,7 ± 26,1	205,3 ± 32,7	210,6 ± 21,2
СОЭ, мм/ч	33,7 ± 12,1	16,4 ± 7,2*	46,3 ± 14,3	39,8 ± 11,2

Окончание таблицы 4.4.1

Показатели	Группа АФП (n = 38)		Группа плацебо (n = 40)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Биохимический анализ крови				
Общий белок, мг%	53,5 ± 8,6	73,3 ± 2,2*	61,1 ± 12,1	58,4 ± 5,5
Альбумин, мг%	32,7 ± 11,6	45,2 ± 6,4	34,7 ± 7,1	36,9 ± 5,4
Билирубин общий, мг%	1,5 ± 0,9	1,9 ± 3,6	1,8 ± 0,4	1,9 ± 0,3
АСТ, ммоль/л	0,35 ± 0,06	0,47 ± 0,09	0,25 ± 0,02	0,46 ± 0,09
АЛТ, ммоль/л	0,37 ± 0,04	0,32 ± 0,06	0,23 ± 0,08	0,56 ± 0,05
Азот мочевины, мг%	43,5 ± 6,9	7,8 ± 3,5*	37,2 ± 4,2	41,6 ± 13,5
Мочевина, мг%	5,2 ± 1,1	1,6 ± 0,9*	4,4 ± 2,1	4,1 ± 1,3
Креатинин, мг%	1,2 ± 0,4	1,5 ± 0,15	0,9 ± 0,3	1,4 ± 0,3
K^+, мг%	10,2 ± 3,7	16,1 ± 2,4*	7,7 ± 2,1	9,4 ± 1,6
Na^+, мг%	260,3 ± 40,9	352,6 ± 25,7	310,1 ± 19,3	280,4 ± 31,4
Mg^{2+}, мг%	2,3 ± 0,6	3,9 ± 0,7	1,9 ± 0,7	2,9 ± 1,4
Иммунологический анализ крови				
$CD3^+$, %	46,3 ± 7,3	49,7 ± 8,7	40,2 ± 9,4	45,4 ± 9,7
$CD11\beta^+$, %	6,6 ± 3,2	25,6 ± 5,3*	9,8 ± 3,5	7,8 ± 4,1
$CD22^+$, %	13,7 ± 3,3	9,4 ± 2,7	18,3 ± 3,1	10,4 ± 7,9
$HLA\text{-}DR^+$, %	19,8 ± 4,4	16,3 ± 3,7	19,6 ± 5,4	22,4 ± 4,7
$CD71^+$, %	6,2 ± 2,4	0*	4,1 ± 1,5	5,3 ± 2,6
IgA, г/л	5,5 ± 2,1	1,4 ± 0,5*	7,8 ± 1,1	8,4 ± 1,3
IgM, г/л	4,6 ± 1,3	1,1 ± 0,9*	3,3 ± 1,2	6,9 ± 0,9

*Достоверные различия до и после лечения ($p < 0,05$).

Следует сказать о пациентке, страдающей НЯК (острая форма) и находившейся в угрожающей жизни ситуации, связанной с обильной, до 18 раз в сутки, геморрагической диареей, которая не купировалась никакими терапевтическими мероприятиями. Применение препарата АФП позволило достигнуть частичной ремиссии (стул 3 раза в сутки) с компенсацией общего состояния больной.

Среди интересных наблюдений за пациентами, страдающими болезнью Крона, следует отметить частичное, а у 20% больных полное восстановление конфигурации ранее деформированных суставов кистей рук и их функциональной способности (возобновление движений в полном объеме). К концу лечения у всех пациентов с болезнью Крона практически исчезли явления гранулематозных процессов на коже.

Рентгенологическими исследованиями у больных НЯК и болезнью Крона установлено, что контуры просвета толстой кишки стали более равномерными, уменьшились явления перепадов диаметров просвета кишечника, ускорился пассаж содержимого по кишечной трубке. При контрольном эндоскопическом обследовании отмечено уменьшение отечности слизистой кишки, гиперемии, количества фиброзного экссудата в ее просвете.

Количество язвенных дефектов значительно сократилось, поэтому поверхность слизистой оболочки толстой кишки стала более гладкой. При гистологическом исследовании установлено уменьшение воспалительно-пролиферативных процессов и лейкоцитарно-макрофагальной инфильтрации.

Следует отметить, что при использовании в комплексной терапии препарата АФП больные впервые за многие годы ощутили явное улучшение самочувствия, что позволило нам у 30% пациентов с болезнью Крона в 2 раза снизить дозы кортикостероидных препаратов, а у 20% – полностью их отменить. У 32,1% пациентов с неспецифическим язвенным колитом также удалось в 2–3 раза снизить дозы кортикостероидных препаратов, а у 7,1% больных – добиться полной их отмены. В контрольных группах пациентов, получавших в комплексном лечении «Плацебо», несмотря на проведенную активную современную лекарственную терапию, не удалось достичь сколько-нибудь значимых результатов.

Анализ эффективности препарата АФП в комплексном лечении больных неспецифическим язвенным колитом и болезнью Крона позволил выявить выраженное положительное влияние его на течение и ближайший исход заболеваний. Субъективно 100% больных отметили положительный эффект в результате использования препарата АФП, заключающийся в уменьшении качественных и количественных характеристик соответствующих симптомокомплексов. Указанные позитивные изменения верифицированы объективными исследованиями с помощью биохимических, гематологических и иммунологических тестов, а также рентгенологическими и эндоскопическими исследованиями.

Таким образом, при ежедневном применении препарата АФП в дозе 4 мкг/кг на протяжении 30 сут. не зарегистрировано каких-либо осложнений и нежелательных эффектов при внутримышечном и внутривенном его введении больным с неспецифическим язвенным колитом и болезнью Крона. Получены статистически достоверные клинические и параклинические данные, позволяющие судить о безопасности и эффективности включения препарата АФП в комплекс терапевтических мероприятий для лечения неспецифических воспалительных заболеваний кишечника.

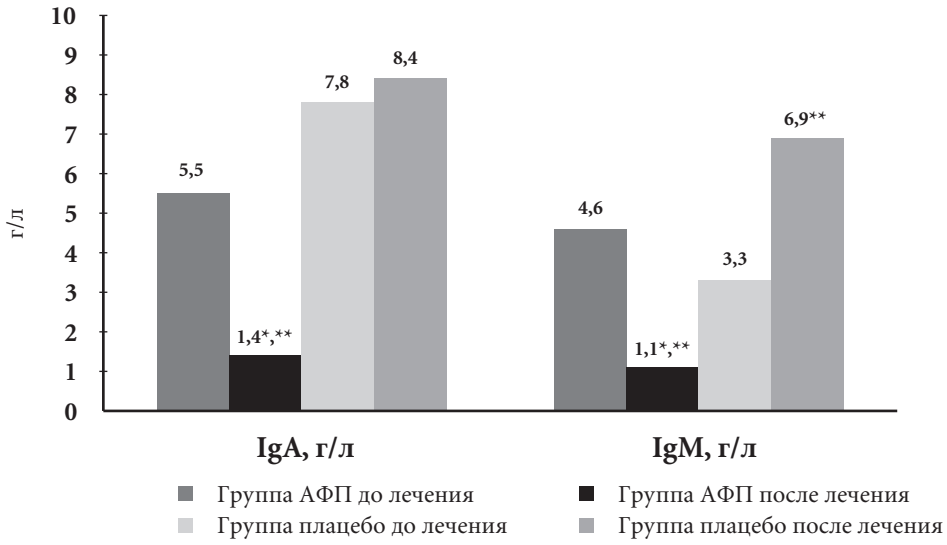


Рис. 4.4.1. **Влияние АФП на уровень IgA и IgM у пациентов с неспецифическим язвенным колитом**

*Достоверность при сопоставлении с группой плацебо.

**Сопоставление до и после лечения при $p < 0,05$.

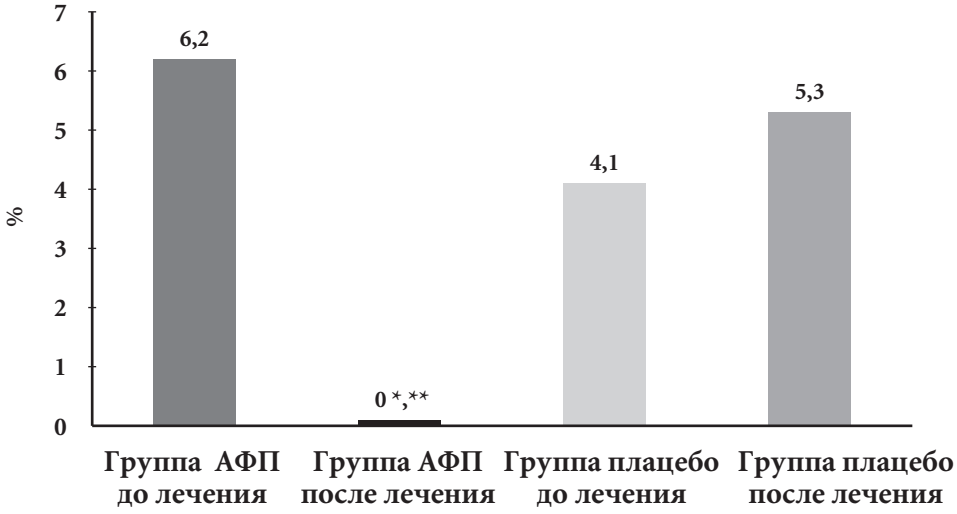


Рис. 4.4.2. **Влияние АФП на уровень CD 71^{+}-клеток у пациентов с неспецифическим язвенным колитом**

*Достоверность при сопоставлении с группой плацебо.

**Сопоставление до и после лечения при $p < 0,05$.

4.5. ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТА АФП В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ СОСУДОВ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ (ХИНК)

Исследования проведены на базе Центра сосудистой и коронарной хирургии Челябинской государственной медицинской академии (отделение сосудистой хирургии ЧГБСМП) и НЦХ РАМН по согласованному клиническому протоколу.

Для оценки безопасности и эффективности препарата АФП в комплексном лечении пациентов с ХИНК проведено плацебо-контролируемое исследование с использованием рандомизации и двойного слепого контроля. В исследование были вовлечены 100 пациентов от 18 до 72 лет с окклюзионными заболеваниями сосудов и ишемией конечностей 2Б-4-й стадии.

В ходе исследования больные ХИНК были разделены на 2 группы:

1. Больные тромбангиитом и облитерирующим эндартериитом инфекционно-аллергической и лекарственно-аллергической этиологии, находящиеся на консервативной терапии (32 человека).

2. Больные атеросклерозом и инфекционно-аллергическим артериитом, перенесшие оперативное вмешательство (68 человек).

Для проведения консервативного лечения отобраны больные первой группы (32 человека), страдающие тромбангиитом не менее 3 лет (характеристика групп участников исследования представлена в таблице 4.5.1), с поражением дистального артериального русла, подтвержденным ангиографией и ультразвуковыми методами исследования.

Первая подгруппа больных (16 человек) ежедневно в течение 30 сут. внутривенно (струйно) получала АФП в дозе 2 мкг/кг. Вторая подгруппа больных (16 человек) аналогично получала 2 мкг/кг реополиглюкина, являющегося наполнителем в препарате АФП. Всем больным (первой и второй подгрупп) была назначена традиционная, адекватная форме и тяжести заболевания терапия, которая включала назначение прямых и непрямых антикоагулянтов, дезагрегантов, средств, улучшающих реологические свойства крови, антибиотиков, антигистаминных препаратов и противовоспалительных средств.

Перед началом лечения было проведено комплексное обследование больных: общий анализ крови и мочи, биохимическое исследование, коагулограмма, иммунограмма, ангиография и допплеровское обследование. Контрольное обследование выполнено на вторые сутки после завершения терапии. Методы исследования, план, этические нормы, критерии отбора и исключения из протокола, а также обязательные критерии протокола исследования соответствовали утвержденному протоколу клинических испытаний.

Все больные, включенные в данное исследование, находились под диспансерным наблюдением. При оценке эффективности препарата АФП использовался набор традиционных клинико-лабораторных и инструментальных исследований, выполненных по программе диспансерного наблюдения и специализированного стационарного лечения данной категории пациентов. На этапе отбора в исследование включались лица с длительно протекающими, рецидивирующими дистальными тромбоваскулитами инфекционно-аллергической и лекарственной (непереносимость) этиологии, имеющие трофические поражения конечностей. При отборе отклонялись лица младше 18 лет и старше 40 лет, имеющие степень ишемии выше 3-й стадии, трофические, переходящие в гангрену поражения мягких тканей конечностей, окклюзию на уровне аортоподвздошного сегмента и перенесшие хирургическое лечение – симпатэктомию, эпинефрэктомию, реконструктивные операции.

Среди клинических симптомов у всех включенных в исследование преобладали аллергический анамнез (60% случаев), симметричное поражение ног (40% случаев), боли в покое и ночные боли в конечностях (30% случаев), перемежающаяся хромота (20 % случаев – низкая; 60% – судорожные боли при ходьбе), синюшная окраска кожных покровов стопы вследствие прекапиллярного флебита (80% случаев), отсутствие пульса на подколенной артерии (60% случаев) и над бедренной артерией (5% случаев), отсутствие систолического шума над бедренными артериями (100% случаев).

При ангиографии у 70% пациентов выявлен спазм проксимальных сегментов, равномерное сужение бедренных артерий отмечено в 90% наблюдений. У всех обследованных характер окклюзии носил диффузный характер с наличием мелких, извитых, множественных коллатералей.

Для более точной оценки ишемии мы использовали метод оценки состояния тканевого (мышечного) кровотока по клиренсу водорода ($T_{1/2}$). Больным устанавливали платиновые электроды в нижней трети мышц голени на стороне поражения. Контролем служили данные кровотока 10 условно здоровых добровольцев в аналогичных анатомических точках. Расчет проведен по формуле Ингвара – Лассена – Циллера, результат выражался в мл/100 г ткани/мин:

$$\varphi = 0{,}693 / T_{1/2} \times 100 \qquad (1),$$

$$\varphi = \lambda \times 2{,}3 \times D_0 \times 100 \text{ мл} / 100 \text{ г/мин} \qquad (2),$$

где λ – парциальный коэффициент кровь-ткань;

φ – скорость тканевого кровотока;

D_0 – числовое значение наклона кривой клиренса по шкале десятичных логарифмов за первую минуту, соответствующее значению 0,693 / $T_{1/2}$ в формуле (1);

$T_{1/2}$ – период полурезорбции H_2.

Расчет тканевого кровотока произведен путем перенесения кривой клиренса на полулогарифмическую бумагу с последующим определением $T_{1/2}$ методом начального наклона или методом двухминутного клиренса.

Как видно из рисунка 4.5.1, мышечный кровоток в пораженных конечностях у больных с тромбангиитами в первой подгруппе пациентов (АФП) составил 16,46 + 5,55 мл/100 г/мин; во второй (плацебо) подгруппе пациентов – 18,51 + 3,42 мл/100 г/мин при условной физиологической норме 44,25 + 4,29 мл/100 г/мин.

Таблица 4.5.1

Характеристика больных ХИНК в первой клинической группе

Характеристики	Подгруппа АФП (*n* = 16)	Подгруппа плацебо (*n* = 16)
Средний возраст, лет	36,7	23,5
Мужчины, %	75 (12)	68,7 (11)
Женщины, %	25 (4)	31,3 (5)
Курящие / некурящие, %	78 / 22	69 / 31
Средняя продолжительность заболевания, лет	3,8	4,2
Психические нарушения, %	62,5 (10)	56,2 (9)
Наркомания, %	12,5 (5)	43,7 (7)

Как видно из таблицы 4.5.1, клинические подгруппы были сопоставимы по основным критериям, характеризующим пациентов и длительность заболевания. Опираясь на данные подробного клинического обследования больных, мы проанализировали различные сопутствующие заболевания, не входящие в перечень раздела клинического протокола исключения пациентов из исследования. Сопутствующие заболевания пациентов представлены в таблице 4.5.2.

Таблица 4.5.2

Сопутствующие заболевания у пациентов с ХИНК в первой клинической группе

Сопутствующие заболевания	Подгруппа АФП (*n* = 16), %	Подгруппа плацебо (*n* = 16), %
Герпетические инфекции	25,0	31,2
Дисбактериоз кишечника	37,5	31,2
Воспалительные ЛОР-заболевания	50,0	56,2
Хронический гастрит, язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки	18,7	31,2
Астеноневротический синдром	87,5	75,0
Другие	43,7	25,0

Особенностью категории больных, вовлеченных в клиническое исследование препарата АФП, были некоторые характерные иммунологические показатели до начала лечения (табл. 4.5.3).

Таблица 4.5.3

Некоторые показатели иммунного статуса у больных ХИНК первой клинической группы до лечения ($M \pm m$)

ПоказателИ	Норма, единицы измерения	Подгруппа АФП ($n = 16$)	Подгруппа плацебо ($n = 16$)
Лейкоциты × 10^9/л	4–6	12,3 ± 4,2	10,6 ± 2,6
Эозинофилы %	0–2	8,4 ± 4,6	7,7 ± 3,1
γ-глобулины, %	12–22	46,8 ± 12,4	32,3 ± 8
$CD3^+$, кл/мкл	1 000–1 800	1 072,6 ± 11,1	1 426,5 ± 24,5
$CD4^+$, кл/мкл	600–1100	1 342,3 ± 44,8	1 213,9 ± 22,4
$CD8^+$, кл/мкл	400–800	904,6 ± 31,5	1 110,5 ± 52,9
IgM, мг%	40–230	144,6 ± 8,2	137,1 ± 8,3
IgA, мг%	60–280	152,8 ± 11,3	164,4 ± 13,7
IgG, мг%	720–2 000	1 394,5 ± 39,5	1 114,6 ± 21,2

Как видно из таблицы 4.5.3, пациенты первой и второй подгрупп, включенные в исследование, не имели достоверных отличий друг от друга в исследованных параметрах иммунного статуса. Тем не менее показатели клеточного звена иммунной системы отличаются у них от нормальных физиологических значений. В частности, у больных до начала лечения выявлены выраженная гамма-глобулинемия, лейкоцитоз и эозинофилия.

Таким образом, результаты клинико-лабораторных и иммунологических исследований позволяют нам отнести исследуемый контингент пациентов к группам риска по иммунной недостаточности. Это подтверждается и тем, что одним из ведущих механизмов в патогенезе дистальных поражений артерий являются иммунологические нарушения.

Анализ эффективности препарата АФП в комплексном лечении у больных ХИНК, получавших только консервативное лечение (первая клиническая группа), позволил выявить его несомненное позитивное влияние на течение заболеваний (тромбангиит, облитерирующий эндартериит).

Так, по критерию количественной оценки рассматриваемых симптомов у пациентов обеих подгрупп выявлены достоверные различия (рис. 4.5.3). График демонстрирует, что в первой подгруппе больных, получавших в комплексной терапии АФП, сумма баллов, отражающих тяжесть заболевания, достоверно ($p < 0,05$) ниже, чем во второй подгруппе (плацебо). Субъективно все больные отметили улучшение состояния, его качественное отличие от итогов ранее проводимой рутинной терапии, не приносившей существенных улучшений. У 8 (50%) больных первой подгруппы полностью удалось ликвидировать трофические язвы на стопах и голенях, в 12,5% наблюдений язвы на стопах уменьшились с 5 до 1 см в диаметре, стали менее глубокими и болезненными. Все пациенты отметили значительное уменьшение, а 6 человек (37,5% наблюдений) – полное исчезновение болей в конечностях, перемежающейся хромоты и судорожных болей при ходьбе.

При объективной оценке (ангиография, ультразвуковое исследование) у 6 больных первой подгруппы ишемия не превышала степень 2А, у остальных 10 пациентов кровообращение было близко к физиологической норме. При контрольном исследовании мышечного кровотока у больных первой подгруппы достоверно отмечено увеличение гемо-

перфузии мягких тканей (рис. 4.5.2) до 31,16 + 3,45 мл/100 г/мин относительно показателей во второй подгруппе (22,13 + 4,61 мл/100 г/мин).

В подгруппе пациентов, получавших традиционное лечение и препарат «Плацебо», достоверных результатов улучшения в течении заболеваний зарегистрировать не удалось.

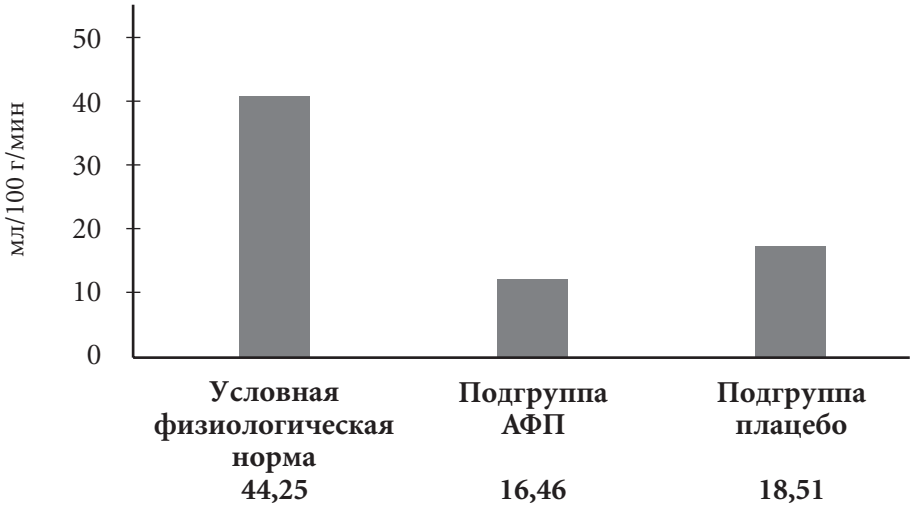


Рис. 4.5.1. **Величина тканевого кровотока у больных ХИНК первой клинической группы до начала лечения**

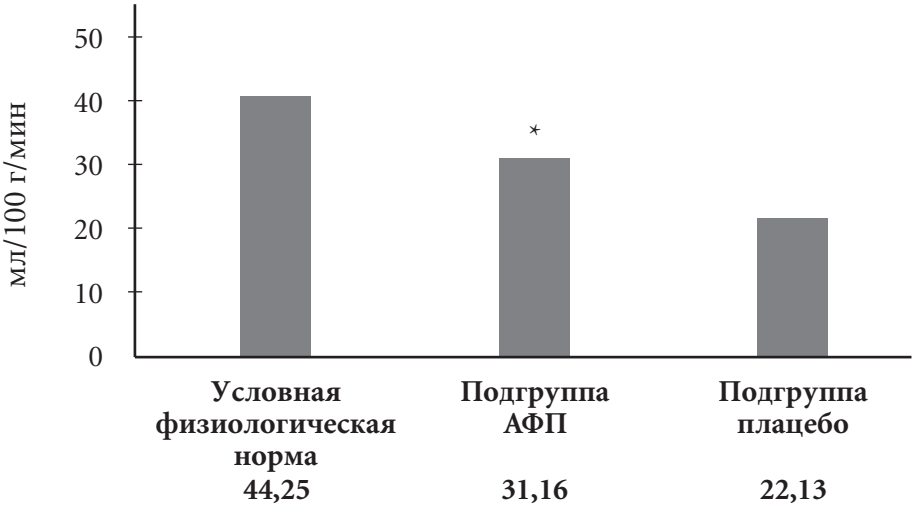


Рис. 4.5.2. **Величина тканевого кровотока у больных ХИНК первой клинической группы после проведенного лечения**

*Достоверное по t-критерию Стьюдента отличие между АФП и плацебо.

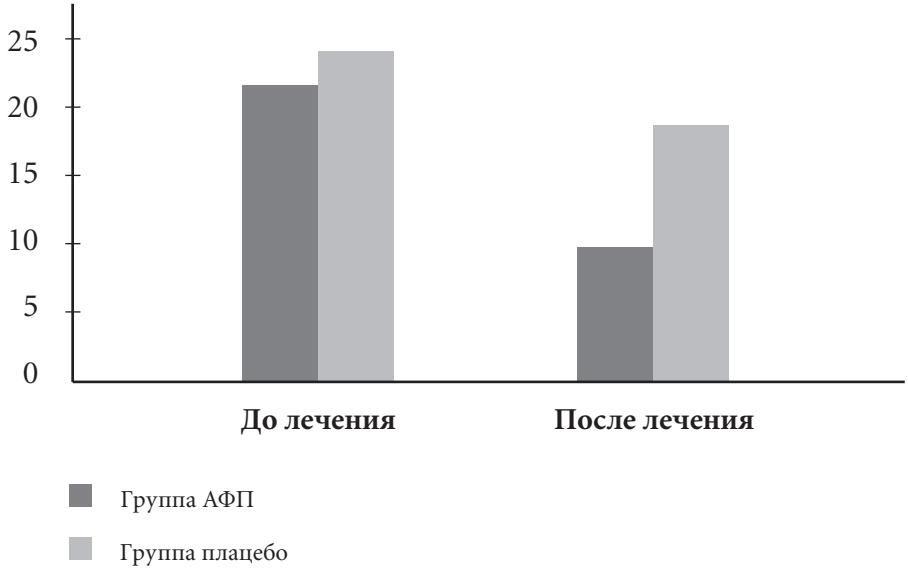


Рис. 4.5.3. **Динамика суммы баллов клинических симптомов у больных ХИНК первой клинической группы в процессе лечения**

Примечание. Бальная оценка каждого симптома оценивалась следующим образом: «0» – отсутствие симптома, «1», «2», «3» – легкое, среднее и тяжелое проявление симптома соответственно.

При изучении динамики некоторых иммунологических показателей у больных ХИНК первой клинической группы, где изначально были выявлены лейкоцитоз, эозинофилия, гамма-глобулинемия, установлено, что после завершения лечения происходит нормализация исходно нарушенных показателей до уровня компенсации и субкомпенсации. Помимо этого в результате терапии АФП достоверно снижается до нормального уровень $CD4^+$- и $CD8^+$-лимфоцитов (табл. 4.5.4). В то же время во второй подгруппе (плацебо) достоверных улучшений по лабораторным показателям не выявлено.

Таблица 4.5.4

Некоторые показатели иммунного статуса у больных ХИНК первой клинической группы после лечения ($M \pm m$)

Показатели	Норма, единицы измерения	Подгруппа АФП ($n = 16$)	Подгруппа плацебо ($n = 16$)
Лейкоциты × 10^9/л	4–6	8,6 ± 3,3	11,5 ± 2,2
Эозинофилы, %	0–2	3,4 ± 0,5*	8,2 ± 3,7
γ-глобулины, %	12–22	14,1 ± 4,5*	29,6 ± 5,3
$CD3^+$, кл/мкл	1 000–1 800	1 204,9 ± 23,4	1 314,1 ± 26,9
$CD4^+$, кл/мкл	600–1100	927,2 ± 13,3*	1 411,5 ± 31,8
$CD8^+$, кл/мкл	400–800	625,7 ± 24,2*	951,2 ± 33,6
IgM, мг%	40–230	143,3 ± 9,4	125,5 ± 6,5

Окончание таблицы 4.5.4

Показатели	Норма, единицы измерения	Подгруппа АФП (n = 16)	Подгруппа плацебо (n = 16)
IgA, мг%	60–280	165,1 ± 14,1	170 ± 15,3
IgG, мг%	720–2 000	1 214 ± 29,8	1 290,3 ± 31,4

*Достоверные ($p < 0,05$) различия по отношению к показателям до лечения (см. табл. 4.5.3).

Ни в одном случае применения препарата АФП мы не наблюдали каких-либо изменений гематологических, биохимических или других лабораторных параметров, что свидетельствует о его безвредности и хорошей переносимости. Вместе с тем нами получены убедительные объективные данные о целесообразности использования препарата в комплексной терапии больных ХИНК.

Больные ХИНК второй клинической группы, перенесшие оперативное лечение (68 человек), были также разделены на первую (АФП) и вторую (плацебо) подгруппы.

Первая подгруппа состояла из 30 пациентов, где 3-я степень ХИНК (по классификации Р. Фонтена – А. В. Покровского) определена у 22 пациентов, 4-я степень – у 8. Причиной окклюзионных поражений сосудов в 24 случаях был атеросклероз, в 6 – артериит. Все пациенты проходили курсы консервативного лечения, операций ранее не переносили. В отделении хирургии сосудов НЦХ РАМН пациентам этой подгруппы были выполнены 14 бедренно-подколенных шунтирований (БПШ) по методике *in situ*, 8 бедренно-подколенных шунтирований синтетическим протезом, 8 артериолизаций венозного кровотока голени и стопы. В комплекс консервативной терапии, включавшей антикоагулянты, антиагреганты, антибиотики, был введен курс АФП в суточной дозе 2 мкг/кг внутривенно (капельно). Продолжительность курса составила 14 сут.

Вторую подгруппу составили 38 человек с ХИНК, перенесшие операции по поводу этого заболевания. В этой подгруппе причинами окклюзионных поражений сосудов были атеросклероз – в 28 случаях и артериит – в 10; 3-я степень ХИНК имела место у 29 пациентов, 4-я – у 9. Пациентам второй подгруппы были выполнены 20 бедренно-подколенных шунтирований *in situ*, 6 бедренно-подколенных шунтирований синтетическим протезом, 12 артериализаций венозного кровотока. Пациенты второй подгруппы в послеоперационном периоде получали аналогичный основной группе стандартный комплекс консервативной терапии и препарат «Плацебо».

Перед началом лечения пациентов второй клинической группы, перенесших оперативное вмешательство, проводилось обследование, включавшее общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови с определением уровня электролитов, коагулограмму, ЭКГ, УЗ-допплерографию, дуплексное сканирование, ангиографию, изотопное сканирование (с целью выявить очаги некроза у пациентов с 4-й степенью ХИНК). Аналогичное обследование больные прошли после завершения курса лечения.

Основным критерием оценки эффективности включения АФП в комплекс терапевтических мероприятий у больных ХИНК, перенесших операции, служило количество послеоперационных осложнений в исследуемых подгруппах.

Структура послеоперационных осложнений у больных ХИНК во второй клинической группе, в подгруппах АФП и плацебо, представлена в таблице 4.5.5. Различия в частоте тромбозов вены *in situ*, а также тромбозов синтетического протеза в обеих подгруппах были недостоверными, в то время как по другим параметрам (инфицирование синтетического протеза,

нагноение послеоперационных ран, развитие реперфузионного синдрома) обнаружена достоверная разница в частоте развития ($p < 0,05$).

Таблица 4.5.5

Структура ранних послеоперационных осложнений во второй клинической группе пациентов с ХИНК

Вид осложнения	Подгруппа АФП ($n = 30$), %	Подгруппа плацебо ($n = 38$), %
Тромбоз вены *in situ*	7,1	5,0
Тромбоз синтетического бедренно-подколенного шунта	37,5	33,3
Инфицирование синтетического протеза	25,0*	66,7
Нагноение послеоперационных ран	10,0*	18,4
Реперфузионный синдром	13,3*	23,7

*Достоверные различия между группами ($p < 0,05$).

Настоящее исследование позволило выявить достоверное снижение у пациентов с критической ХИНК таких послеоперационных осложнений, как инфицирование синтетических протезов, нагноение послеоперационных ран, а также развитие реперфузионного синдрома.

Таким образом, в результате исследования эффективности препарата АФП в комплексном лечении пациентов с ХИНК установлено отсутствие осложнений, побочных реакций и нежелательных эффектов при внутривенном введении препарата АФП в суточной дозе 2 мкг/кг. Выявлена высокая терапевтическая эффективность АФП при консервативном лечении больных с ХИНК. Показано, что препарат АФП оказывает выраженное положительное влияние на уровни показателей гемоперфузии тканей, стимулирует заживление трофических тканевых дефектов сосудистого генеза, а также способствует нормализации некоторых звеньев иммунной системы; достоверно снижает количество послеоперационных осложнений у больных ХИНК.

4.6. ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТА АФП У ПАЦИЕНТОВ С ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Для изучения эффективности применения препарата АФП у пациентов с термической травмой было проведено плацебоконтролируемое исследование с использованием рандомизации и двойного слепого контроля на базе ожогового центра г. Перми (городская клиническая больница № 21). В исследование было вовлечено 30 человек в возрасте от 18 до 60 лет с площадью поражения кожных покровов от 20 до 50% и глубиной поражения II–IV степени.

В ходе клинического исследования препарата АФП было выделено 2 группы пострадавших:

1. Группа АФП – пациенты с ожоговой болезнью (15 человек), получавшие комплексное лечение, включавшее сбалансированную инфузионно-трансфузионную терапию, направленную на восстановление гомеостаза, антибиотики, анальгетики, кортикостероидные гормоны, диуретики и витамины и дополненное ежедневным в течение 14 сут. внутривенным введением АФП в дозе 8 мкг/кг.

2. Группа плацебо (15 человек) – пациенты, получавшие аналогичное комплексное лечение в сочетании с препаратом «Плацебо», который вводили по той же схеме, что и препарат АФП.

Всем больным лечение проведено по указанным схемам с использованием одинаковых ампул, содержащих по 75 мкг АФП и по 5 мг реополиглюкина и сопровождаемых паспортами подлинности. Все полученные результаты занесены в карты пациентов. Исключенных из исследования по какой-либо причине не было.

При проведении клинических испытаний препарата АФП использовались стандартные методы исследований до и после проведения лечения, обобщенные в форме согласованного клинического протокола. Обследования имели своей целью оценку состояния органов и систем по комплексу клинических, лабораторных, специальных и инструментальных показателей, включавших пол, массу тела, возраст, число дыхательных движений, пульс, артериальное давление, температуру тела, состояние слизистых оболочек и кожных покровов; общий анализ крови и мочи, биохимический анализ крови, иммунограмму, иммунохимическое определение биологически активных соединений; электрокардиографию и рентгенологическое исследование органов грудной полости.

Клиническая картина у групп пациентов, включенных в исследование, отличалась наличием многообразного симптомокомплекса, характерного для раннего проявления ожоговой болезни (ожоговый шок, ожоговая аутоинтоксикация, септикотоксемия, субкомпенсированная полиорганная недостаточность) [53, 163]. Характеристика групп-участников исследования по клиническим критериям оценки общего состояния пациентов не выявила достоверной разницы (в количественном и качественном отношении) в тяжести термических поражений у больных с ожоговой болезнью (табл. 4.6.1).

При сравнительной оценке основных гематологических и биохимических параметров (табл. 4.6.2) у пациентов с ожоговой болезнью групп АФП и плацебо существенных различий нами не выявлено. В то же время у всех пациентов с термической травмой отмечены характерные изменения лабораторных показателей (лейкоцитоз, сдвиг лейкоцитарной формулы влево, ускорение СОЭ и др.), соответствующие клиническому проявлению острого периода ожоговой болезни.

Изучение иммунологических показателей у пострадавших с ожоговой болезнью в сравниваемых группах до начала лечения позволило выявить следующие закономерности.

Так, нами установлено, что у пациентов группы АФП по отношению к группе плацебо было достоверно ($p < 0,05$) снижено количество Т- и В-лимфоцитов (Е-РОК и М-РОК соответственно), абсолютное содержание $CD4^+$- и $CD95^+$-лимфоцитов, а также абсолютное число $CD11^+$-лимфоцитов. В то же время у этих больных отмечались более высокая концентрация IgM и менее выраженный «запрос» на гормоны тимуса (увеличенное число Т-активин чувствительных лимфоцитов). Таким образом, можно заключить, что в группе АФП исходный иммунологический статус был подвержен более глубоким негативным изменениям по сравнению с группой плацебо.

В обеих группах выявлены общие закономерности нарушений иммунитета, характерные для острой воспалительной реакции и отличающиеся от показателей условной физиологической нормы [235] снижением уровня В-лимфоцитов (М-РОК) и концентрации IgM и значительным повышением уровней IL-4 и С-реактивного белка. Также отмечено снижение общего количества Т-клеток ($CD3^+$) и активных Т-лимфоцитов (ранние Е-РОК). Помимо этого установлено, что снижается индекс метаболической активности фагоцитов (НСТ-тест), отражающий их функциональный резерв, но в то же время повышается процент фагоцитирующих клеток и их поглотительная активность (табл. 4.6.3).

Таким образом, по результатам иммунологического исследования до начала лечения можно сделать заключение о наличии выраженных нарушений в клеточном и гуморальном звеньях иммунитета у больных в остром периоде ожоговой болезни, причем в основной группе выявлены более негативные изменения иммунной системы относительно группы плацебо.

При сравнении показателей в группе АФП после проведенного лечения с общими параметрами объединенной группы до лечения нами установлено достоверное ($p < 0,05$) снижение абсолютного числа лейкоцитов до уровня физиологической нормы, а также достоверное ($p < 0,05$) уменьшение ранее повышенного содержания палочкоядерных нейтрофилов в капиллярной и венозной крови пострадавших (табл. 4.6.4, 4.6.5). У них же выявлены достоверные изменения показателей иммунной системы, заключающиеся в снижении уровня Th ($CD4^+$), активированных Т-клеток ($HLA\text{-}DR^+$) и В-клеток ($CD72^+$). В то же время обнаружено достоверное ($p < 0,05$) увеличение содержания CD11-позитивных клеток и иммуноглобулинов классов А, М, G.

Наряду с обнаруженными достоверными ($p < 0,05$) изменениями иммунитета относительно условной физиологической нормы у больных сохранялась сниженная экспрессия CD2-рецепторов (ранние и тотальные Е-РОК) и рецепторов для эритроцитов мыши (М-РОК), увеличенное содержание ЦИК и лимфоцитов с маркерами апоптоза ($CD95^+$), повышенный уровень фагоцитарной активности, а также IL-4 и СРБ. На основании полученных результатов можно говорить об изменении реакций иммунитета, отражающих различные фазы течения ожоговой болезни (табл. 4.6.7 – 4.6.9). Так, в раннем остром периоде превалируют процессы компенсаторной гиперергии с последующим угнетением всех звеньев иммунной системы или начинают преобладать механизмы патологической защиты с развитием аутоиммунных реакций.

В то же время у больных группы плацебо после проведенного комплексного лечения по-прежнему сохранялся лейкоцитоз со сдвигом лейкоцитарной формулы влево и тенденцией ускорения СОЭ (табл. 4.6.6). Также нами показано достоверное ($p < 0,05$) снижение общего белка в крови пациентов (табл. 4.6.10).

При исследовании иммунологических показателей у больных группы плацебо после лечения нами обнаружено, в сравнении с общими показателями до лечения (табл. 4.6.7),

увеличение содержания Т- и В-клеток (Е-РОК, М-РОК), снижение уровня Th ($CD4^+$), повышениее числа CD95-позитивных лимфоцитов, увеличение концентрации циркулирующих иммунных комплексов и уровня IgM, возрастание активности фагоцитов, а также повышение концентрации IL-4 и СРБ. Указанные изменения показателей иммунитета относительно условной физиологической нормы сохранились и после лечения. Помимо этого у больных данной группы повышался уровень содержания В-клеток ($CD72^+$), общее количество лимфоцитов и фагоцитарный индекс, отражающий поглотительную активность фагоцитов ($p < 0,05$). Таким образом, в группе плацебо после проведенного лечения отмечалось продолжение реакций гиперэргического типа (табл. 4.6.11 – 4.6.13).

Очевидно, что использование АФП в комплексной терапии ожоговой болезни позволяет снизить интенсивность гиперэргических реакций (рис. 4.6.1) иммунной системы и способствует возникновению более благоприятного фона для последующей трансплантации кожи. В то же время весьма высокой остается реактивность гуморального звена иммунитета, защищающего организм от возникновения и развития септического процесса. Выявленные нами изменения на уровне лабораторных показателей нашли отражение в развитии клинической картины у пациентов групп сравнения.

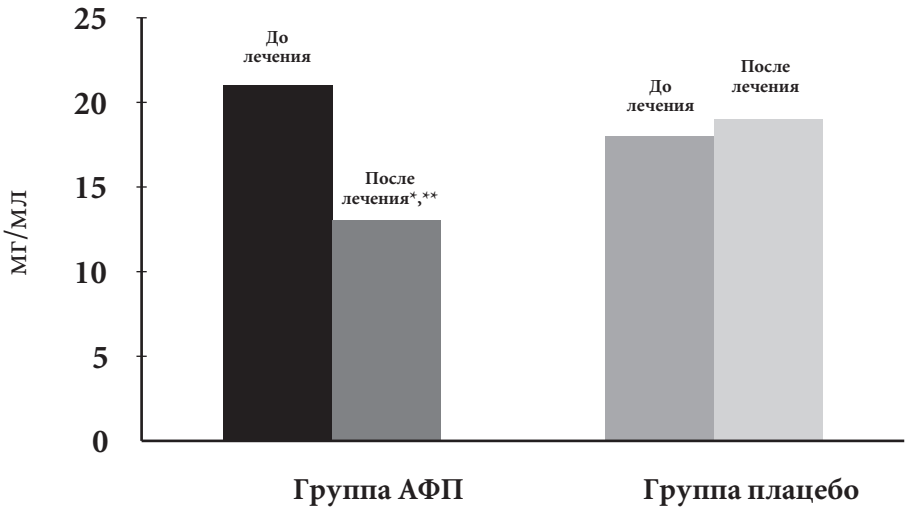


Рис. 4.6.1. **Влияние АФП на уровень СРБ у пациентов с термической травмой**
*Достоверное отличие от группы плацебо.
**Достоверное отличие до и после лечения при $p < 0,05$.

Как следует из таблицы 4.6.14, в катамнезе заболевания пациентов, получавших в комплексном лечении препарат АФП, отмечено уменьшение частоты септических осложнений, в том числе с летальным исходом. Ни в одном из наблюдений в основной группе пациентов не зарегистрировано отторжения кожного трансплантата. Также в период наблюдения у больных группы АФП отмечено отхождение некротического струпа в более ранние сроки и, как следствие, уменьшение явлений ожоговой аутоинтоксикации, с более ранней активизацией больных. Одно из наиболее интересных наблюдений: у больных основной группы отсутствовало формирование грубых келлоидных рубцов после произведенной трансплантации.

На основании полученных клинических и лабораторных данных мы считаем, что включение препарата АФП как иммунорегулирующего средства в комплекс терапевтических мероприятий позволяет улучшать течение, а следовательно, и исход ожоговой болезни.

Таблица 4.6.1

Характеристика клинических групп сравнения пострадавших в результате термических поражений

Характеристика	Группа АФП ($n = 15$)	Группа плацебо ($n = 15$)
Возраст, лет	42,4 ± 11,3	36,6 ± 9,4
Площадь ожоговой поверхности, %	31,3 ± 10,4	28,6 ± 9,5
Глубина ожоговой травмы, степень	II–IY	II–IIIБ
Индекс Франка	85 ± 22	79 ± 19
Время начала терапии АФП или «Плацебо» от момента получения травмы, сут.	5 ± 3	6 ± 3
Поражение органов дыхания (число пострадавших)	2	1

Таблица 4.6.2

Клинико-биохимические показатели у больных с ожоговой болезнью до начала лечения ($M \pm m$)

Показатели	Группа АФП до лечения ($n = 15$)	Группа плацебо до лечения ($n = 15$)
Клинический анализ крови		
Гемоглобин, г/л	140,5 ± 13,27	128,5 ± 10,04
Эритроциты × 10^{12}/л	4,42 ± 0,36	4,07 ± 0,209
Лейкоциты × 10^{9}/л	13,62 ± 2,93	13,175 ± 0,52
Нейтрофилы, %	73 ± 3,41	74,5 ± 3,17
Палочкоядерные, %	8,25 ± 1,31	10,25 ± 1,31
Сегментоядерные, %	64,75 ± 2,136	64,25 ± 3,9
Лимфоциты, %	21 ± 2,44	20 ± 3,89
Базофилы, %	0,25 ± 0,25	0
Эозинофилы, %	2 ± 1,08	1,00 ± 0,4
Моноциты, %	3,5 ± 0,64	4,25 ± 1,31
СОЭ, мм/ч	36 ± 10,07	51 ± 6,64
Биохимический анализ крови		
Общий белок, г/л	63,75 ± 4,71	70 ± 1,95
Общий билирубин, ммоль/мл	17,27 ± 8,34	14,15 ± 6,08
АЛТ, ммоль/л	0,35 ± 0,06	0,42 ± 0,06
АСТ, ммоль/л	0,28 ± 0,09	0,43 ± 0,07
Мочевина, ммоль/л	4,17 ± 0,49	4,52 ± 0,43
Креатинин, ммоль/л	0,074 ± 0,009	0,094 ± 0,008

Окончание таблицы 4.6.2

Показатели	Группа АФП до лечения (n = 15)	Группа плацебо до лечения (n = 15)
Биохимический анализ крови		
Ост. азот, мг/л	16,32 ± 1,03	16,87 ± 0,94
Сулемовая проба, %	71,66 ± 18,47	86 ± 5,33
Тимоловая проба, ед.	2,2 ± 0,26	2,02 ± 0,57

Таблица 4.6.3

Иммунологические показатели у больных с ожоговой болезнью до начала лечения ($M \pm m$)

Показатели	Группа АФП до лечения (n = 15)	Группа плацебо до лечения (n = 15)
Лейкоциты, в 1 мкл	7 000 ± 857,9	8 960 ± 1 295,22
Палочкоядерные нейтрофилы, %	12 ± 3,53 ↑	9,6 ± 3,27 ↑
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	870,4 ± 291,01	925,6 ± 371,25
Сегментоядерные нейтрофилы, %	65 ± 4,57	64,4 ± 3,27
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	4 637,2 ± 780,72	5 773,6 ± 867,85
Моноциты, %	8 ± 1,3	8,6 ± 2,06
Моноциты, в 1 мкл	568,8 ± 140,38	801,2 ± 265,49
Лимфоциты, %	14 ± 3,67	16,6 ± 2,86
Лимфоциты, в 1 мкл	862,4 ± 156,75	1 394,4 ± 225,64
Эозинофилы, %	1 ± 0,45	0,8 ± 0,37
Эозинофилы, в 1 мкл	61,2 ± 30,49	65,2 ± 29,77
Е-РОК тотальные, %	42 ± 5,51 ↓	57 ± 4,85
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	332,06 ± 51,51* ↓	810,02 ± 170,29 ↓
Ранние Е-РОК, %	24 ± 4,35 ↓	37,2 ± 4,51 ↓
Термостабил. Е-РОК, %	29,8 ± 6,11	19,6 ± 4,69
Теоф. резистентные, %	45,6 ± 10,05	60,8 ± 3,99
Теоф. чувствительные, %	15,2 ± 14,58	-7,8 ± 5,89 ↓
Т-активин чувствительные (5 мг/мл), %	56,2 ± 6,68*	24 ± 8,56
Т-активин чувствительные (0,5 мг/мл), %	54,6 ± 3,53*	35,25 ± 8,06
М-РОК, %	7 ± 1,05* ↓	12,6 ± 2,06
М-РОК, в 1 мкл	65,17 ± 16,37* ↓	192,32 ± 59,83 ↓
0-клетки, %	51 ± 4,6 ↑	30,4 ± 6,39
0-клетки, в 1 мкл	465,17 ± 101,48	392,06 ± 77,38 ↓
$CD3^+$, %	46,38 ± 6,53 ↓	48,80 ± 9,3 ↓
$CD3^+$, в 1 мкл	391,64 ± 83,47	711,86 ± 207,06
$CD4^+$, %	16,4 ± 4,35* ↓	34 ± 3,63

Окончание таблицы 4.6.3

Показатели	Группа АФП до лечения ($n = 15$)	Группа плацебо до лечения ($n = 15$)
$CD4^+$, в 1 мкл	155,09 ± 60,54* ↓	539,41 ± 113,81
$CD8^+$, %	22,4 ± 4,35	29,75 ± 4,77
$CD8^+$, в 1 мкл	191,23 ± 53,17	451,82 ± 103,61
$CD16^+$, %	16 ± 5,51	19,75 ± 4,66
$CD16^+$, в 1 мкл	147,33 ± 61,67	299,39 ± 86,65
$CD72^+$, %	12 ± 1,09	13,40 ± 1,87
$CD72^+$, в 1 мкл	105,88 ± 22,07	173,7 ± 21,17
$CD11^+$, %	14 ± 4,05	20 ± 0,11
$CD11^+$, в 1 мкл	112,4 ± 41,54*	287,33 ± 61,13
$HLA\text{-}DR^+$, %	18 ± 0,89	17,6 ± 2,04
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	153 ± 29,47	253,60 ± 64,54
$CD95^+$, %	2,5 ± 0,5* ↑	8 ± 0,12 ↑
$CD95^+$, в 1 мкл	17,75 ± 2,78*	123,5 ± 39,50
IgG, г/л	7,31 ± 1,18	7,8 ± 2,18
IgA, г/л	1,03 ± 0,45	0,84 ± 0,07 ↓
IgM, г/л	0,78 ± 0,12* ↓	0,46 ± 0,02 ↓
Процент фагоцитоза	60,12 ± 12,81	83,14 ± 4,59 ↑
Фагоцитарный индекс	2,96 ± 0,49 ↑	3,86 ± 0,51 ↑
Фагоцитарное число	1,98 ± 0,66 ↑	3,28 ± 0,59 ↑
НСТ-сп, опт. ед.	0,24 ± 0,05	0,24 ± 0,06
НСТ-ст, опт. ед.	0,19 ± 0,07	0,19 ± 0,04
НСТ-ст / НСТ-сп	0,94 ± 0,35 ↓	0,85 ± 0,13 ↓
ЦИК, усл. ед.	58,4 ± 13,71	96,4 ± 28,14 ↑
IL-1β, пкг/мл	9,60 ± 4,12	22,4 ± 9,68
IL-4, пкг/мл	153,28 ± 34,34 ↑	82,25 ± 24,99 ↑
СРБ, мг/мл	21 ± 1,87 ↑	18,00 ± 3,39 ↑

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Примечание. Стрелками (↑↓) обозначено изменение параметра относительно условной физиологической нормы.

Таблица 4.6.4

Клинико-биохимические показатели у больных с ожоговой болезнью после лечения АФП ($M \pm m$)

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения ($n = 30$)	Группа АФП после лечения ($n = 15$)
Клинический анализ крови		
Гемоглобин, г/л	134,5 ± 8,03	128,75 ± 9,19
Эритроциты × 10^{12}/л	4,25 ± 0,2	4,075 ± 0,2
Лейкоциты × 10^{9}/л	13,40 ± 1,38	6,70 ± 1,23*
Нейтрофилы, %	73,75 ± 2,17	70,25 ± 4,66
Палочкоядерные, %	9,25 ± 0,94	4,5 ± 0,95*
Сегментоядерные, %	64,5 ± 2,06	65,75 ± 4,87
Лимфоциты, %	20,5 ± 2,13	22,75 ± 4,49
Базофилы, %	0,125 ± 0,125	0
Эозинофилы, %	1,5 ± 0,56	2 ± 0,81
Моноциты, %	3,87 ± 0,69	5 ± 0,7
СОЭ, мм/ч	43,5 ± 6,26	29,75 ± 11,4
Биохимический анализ крови		
Общий белок, г/л	66,87 ± 2,64	64,75 ± 3,94
Общий билирубин, ммоль/мл	15,71 ± 4,81	12,05 ± 3,77
АЛТ, ммоль/л	0,39 ± 0,04	0,27 ± 0,09
АСТ, ммоль/л	0,361 ± 0,06	0,22 ± 0,03
Мочевина, ммоль/л	4,35 ± 0,3	4,65 ± 0,17
Креатинин, ммоль/л	0,083 ± 0,007	0,0705 ± 0,0029
Ост. азот, мг/л	16,6 ± 0,66	16,95 ± 0,77
Сулемовая проба, %	79,85 ± 8,08	86,33 ± 2,84
Тимоловая проба, ед.	2,1 ± 0,32	3,2 ± 1,45

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 4.6.5

Иммунологические показатели у больных с ожоговой болезнью после лечения АФП (*M* ± *m*)

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения (*n* = 30)	Группа АФП после лечения (*n* = 15)
Лейкоциты, в 1 мкл	7 980 ± 801,9	6 560 ± 1549,71
Палочкоядерные нейтрофилы, %	10,8 ± 2,3 ↑	3,2 ± 1,43*
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	898 ± 222,56	196,4 ± 91,07*
Сегментоядерные нейтрофилы, %	64,7 ± 2,65	64,60 ± 3,97
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	5 205,4 ± 581,97	4 316 ± 1153,93
Моноциты, %	8,3 ± 1,16	9,2 ± 1,53
Моноциты, в 1 мкл	685 ± 146,78	620,8 ± 211,66
Лимфоциты, %	15,3 ± 2,24	21,4 ± 3,66
Лимфоциты, в 1 мкл	1 128,4 ± 156,96	1 288,4 ± 289,56
Эозинофилы, %	0,9 ± 0,28	1,6 ± 0,75
Эозинофилы, в 1 мкл	63,2 ± 20,09	138,4 ± 77,37
Е-РОК тотальные, %	49,5 ± 4,27	48,2 ± 2,18
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	571,04 ± 115,67 ↓	606,01 ± 116,63 ↓
Ранние Е-РОК, %	30,6 ± 3,68 ↓	35,2 ± 5,39 ↓
Термостабил. Е-РОК, %	24,7 ± 4,01	31,4 ± 5,58
Теоф. резистентные, %	53,2 ± 5,69	49,2 ± 3,18
Теоф. чувствительные, %	3,7 ± 8,34	17,8 ± 5,59
Теоф. резистент. / теоф. чувствит.	14,53 ± 5,48	2,76 ± 0,57
Т-активин чувствительные (5 мг/мл), %	40,1 ± 7,42	54,2 ± 7,63
Т-активин чувствительные (0,5 мг/мл), %	46 ± 5,08	59,8 ± 2,42
М-РОК, %	9,8 ± 1,44 ↓	6,6 ± 1,29 ↓
М-РОК, в 1 мкл	128,75 ± 36,11 ↓	84,29 ± 25,76 ↓
0-клетки, %	40,7 ± 5,06 ↑	45,2 ± 2,29 ↑
0-клетки, в 1 мкл	428,61 ± 61,38 ↓	598,10 ± 162,65
$CD3^+$, %	47,8 ± 5,37 ↓	56,80 ± 7,68
$CD3^+$, в 1 мкл	551,75 ± 118	697,14 ± 142,35
$CD4^+$, %	25,2 ± 3,97 ↓	11,2 ± 3,2* ↓
$CD4^+$, в 1 мкл	325,9 ± 87,95	112,78 ± 20,05*
$CD8^+$, %	25,67 ± 3,27	26 ± 4,82
$CD8^+$, в 1 мкл	307,05 ± 68,34	288,37 ± 31,48
$CD16^+$, %	17,67 ± 3,54	11,6 ± 2,86
$CD16^+$, в 1 мкл	214,91 ± 54,97	150,32 ± 43,18

Окончание таблицы 4.6.5

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения (n = 30)	Группа АФП после лечения (n = 15)
$CD72^+$, %	12,7 ± 1,06	8,4 ± 1,83*
$CD72^+$, в 1 мкл	139,79 ± 18,32	108,26 ± 27,31
$CD11^+$, %	16,25 ± 2,66	18,66 ± 4,66
$CD11^+$, в 1 мкл	183,37 ± 4,18	240,42 ± 13,5
$HLA\text{-}DR^+$, %	17,8 ± 1,05	12,80 ± 3,56*
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	203,3 ± 37,41	136,40 ± 20,62
$CD95^+$, %	4,33 ± 1,2 ↑	5 ± 1 ↑
$CD95^+$, в 1 мкл	53 ± 24,58	87,5 ± 46,5
IgG, г/л	7,56 ± 1,17	14,26 ± 3,68*
IgA, г/л	0,93 ± 0,22	2,14 ± 0,56*
IgM, г/л	0,62 ± 0,08 ↓	1,12 ± 0,21*
Процент фагоцитоза	71,63 ± 7,48	71,2 ± 4,31
Фагоцитарный индекс	3,41 ± 0,37 ↑	3,26 ± 0,34 ↑
Фагоцитарное число	2,63 ± 0,47 ↑	2,38 ± 0,39 ↑
НСТ-сп, опт. ед.	0,24 ± 0,04	0,13 ± 0,04
НСТ-ст, опт. ед.	0,19 ± 0,04	0,12 ± 0,03
НСТ-ст / НСТ-сп	0,89 ± 0,16 ↓	1,04 ± 0,11
ЦИК, усл. ед.	77,4 ± 16,06 ↑	67,6 ± 12,26 ↑
IL-1β, пкг/мл	16 ± 5,39	18,4 ± 8,73
IL-4, пкг/мл	117,77 ± 23,26 ↑	187,9 ± 66,39 ↑
СРБ, мг/мл	19,5 ± 1,89 ↑	13 ± 3,74 ↑

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Примечание. Стрелками (↑↓) обозначено изменение параметра относительно условной физиологической нормы.

Таблица 4.6.6

Клинико-биохимические показатели у больных с ожоговой болезнью в группе плацебо после лечения ($M \pm m$)

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения (n = 30)	Группа плацебо после лечения (n = 15)
Клинический анализ крови		
Гемоглобин, г/л	134,5 ± 8,03	126,75 ± 14,22
Эритроциты × 10^{12}/л	4,25 ± 0,2	4,1 ± 0,24
Лейкоциты × 10^9/л	13,4 ± 1,38	11,25 ± 1,03
Нейтрофилы, %	73,75 ± 2,17	72,25 ± 3,54

Окончание таблицы 4.6.6

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения (*n* = 30)	Группа плацебо после лечения (*n* = 15)
Клинический анализ крови		
Палочкоядерные, %	9,25 ± 0,94	10 ± 0,7
Сегментоядерные, %	64,5 ± 2,06	62,25 ± 3,56
Лимфоциты, %	20,5 ± 2,13	21,25 ± 3,3
Базофилы, %	0,125 ± 0,125	0
Эозинофилы, %	1,5 ± 0,56	1,25 ± 0,94
Моноциты, %	3,87 ± 0,69	4,75 ± 1,18
СОЭ, мм/ч	43,5 ± 6,26	55,5 ± 7,46
Биохимический анализ крови		
Общий белок, г/л	66,87 ± 2,64	64 ± 0,7
Общий билирубин, ммоль/мл	15,71 ± 4,81	15,35 ± 7,16
АЛТ, ммоль/л	0,39 ± 0,04	0,29 ± 0,07
АСТ, ммоль/л	0,36 ± 0,06	0,29 ± 0,1
Мочевина, ммоль/л	4,35 ± 0,3	4,4 ± 0,54
Креатинин, ммоль/л	0,083 ± 0,007	0,04 ± 0,01
Ост. азот, мг/л	16,6 ± 0,66	16,67 ± 1,21
Сулемовая проба, %	79,85 ± 8,08	71,75 ± 6,83
Тимоловая проба, ед.	2,1 ± 0,32	2,67 ± 0,49

Таблица 4.6.7

Иммунологические показатели у больных с ожоговой болезнью в группе плацебо после лечения (*M* ± *m*)

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения (*n* = 30)	Группа плацебо после лечения (*n* = 15)
Лейкоциты, в 1 мкл	7 980 ± 801,9	8 600 ± 0,87
Палочкоядерные нейтрофилы, %	10,8 ± 2,303 ↑	10,2 ± 2,94 ↑
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	898 ± 222,56	860,8 ± 233,19
Сегментоядерные нейтрофилы, %	64,7 ± 2,65	57,2 ± 5,32
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	5 205,4 ± 581,97	5 000 ± 822,36
Моноциты, %	8,3 ± 1,16	9 ± 2,76
Моноциты, в 1 мкл	685 ± 146,78	747,2 ± 200,82
Лимфоциты, %	15,3 ± 2,24	22,2 ± 2,06
Лимфоциты, в 1 мкл	1 128,4 ± 156,96	1 871,6 ± 160,49*
Эозинофилы, %	0,9 ± 0,28	1,4 ± 0,51

Продолжение таблицы 4.6.7

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения (*n* = 30)	Группа плацебо после лечения (*n* = 15)
Эозинофилы, в 1 мкл	63,2 ± 20,09	120,4 ± 41,12
Е-РОК тотальные, %	49,5 ± 4,27	45,80 ± 2,52 ↓
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	571,04 ± 115,67 ↓	865,02 ± 110,15 ↓
Ранние Е-РОК, %	30,6 ± 3,68	28,6 ± 4,12 ↓
Термостабил. Е-РОК, %	24,7 ± 4,01	16 ± 2,24 ↓
Теоф. резистентные, %	53,2 ± 5,69	41 ± 8,33
Теоф. чувствительные, %	3,7 ± 8,34	7 ± 4,85
Теоф. резистент. / теоф. чувствит.	14,53 ± 5,48 ↑	5,86 ± 1,72
Т-активин чувствительные (5 мг/мл), %	40,1 ± 7,42	37,2 ± 3,46
Т-активин чувствительные (0,5 мг/мл), %	46 ± 5,08	48,2 ± 9,11
М-РОК, %	9,8 ± 1,44 ↓	10,8 ± 0,92 ↓
М-РОК, в 1 мкл	128,75 ± 36,11 ↓	196,87 ± 6,1 ↓
0-клетки, %	40,7 ± 5,06 ↑	43,4 ± 2,58 ↑
0-клетки, в 1 мкл	428,61 ± 61,38 ↓	809,71 ± 76,85
$CD3^+$, %	47,8 ± 5,37 ↓	43,8 ± 6,25 ↓
$CD3^+$, в 1 мкл	551,75 ± 118	826,89 ± 166,34
$CD4^+$, %	25,2 ± 3,97 ↓	18,5 ± 3,09 ↓
$CD4^+$, в 1 мкл	325,9 ± 87,95	356,59 ± 75,21
$CD8^+$, %	25,67 ± 3,27	24,5 ± 5,91
$CD8^+$, в 1 мкл	307,05 ± 68,34	506,09 ± 164,49
$CD16^+$, %	17,67 ± 3,54	10,33 ± 4,98
$CD16^+$, в 1 мкл	214,91 ± 54,97	201,28 ± 90,51
$CD72^+$, %	12,7 ± 1,06	18 ± 2,68* ↑
$CD72^+$, в 1 мкл	139,79 ± 18,32	345,12 ± 67,42*
$CD11^+$, %	16,25 ± 2,66	15,50 ± 2,5
$CD11^+$, в 1 мкл	178 ± 45,18	196,25 ± 18,1
$HLA\text{-}DR^+$, %	17,8 ± 1,05	18,5 ± 4,72
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	203,3 ± 37,41	353,75 ± 78,93
$CD95^+$, %	4,33 ± 1,2 ↑	8 ± 1,83 ↑
$CD95^+$, в 1 мкл	53 ± 24,58	162,25 ± 46,68
IgG, г/л	7,55 ± 1,17	9,56 ± 2,05
IgA, г/л	0,93 ± 0,22	1,32 ± 0,1
IgM, г/л	0,62 ± 0,08 ↓	0,71 ± 0,06 ↓
Процент фагоцитоза	71,63 ± 7,48	93,64 ± 1,21 ↑

Окончание таблицы 4.6.7

Показатели	Объединенная группа (АФП + плацебо) до лечения ($n = 30$)	Группа плацебо после лечения ($n = 15$)
Фагоцитарный индекс	3,41 ± 0,37 ↑	4,98 ± 0,99* ↑
Фагоцитарное число	2,63 ± 0,47 ↑	4,64 ± 0,89 ↑
НСТ-сп, опт. ед.	0,24 ± 0,04	0,15 ± 0,03
НСТ-ст, опт. ед.	0,19 ± 0,04	0,22 ± 0,07
НСТ-ст / НСТ-сп	0,89 ± 0,16 ↓	1,7 ± 0,71
ЦИК, усл. ед.	77,4 ± 16,06 ↑	63,6 ± 5,34 ↑
IL-1β, пкг/мл	16 ± 5,39	17,6 ± 5,15
IL-4, пкг/мл	117,77 ± 23,26 ↑	188,62 ± 54,38 ↑
СРБ, мг/мл	19,5 ± 1,89 ↑	19 ± 5,09 ↑

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Примечание. Стрелками (↑↓) обозначено изменение параметра относительно условной физиологической нормы.

Таблица 4.6.8

Изменение клинико-биохимических показателей у больных с ожоговой болезнью в результате лечения АФП ($M \pm m$)

Показатели	Группа АФП до лечения ($n = 15$)	Группа АФП после лечения ($n = 15$)
Клинический анализ крови		
Гемоглобин, г/л	140,5 ± 13,27	128,75 ± 9,19
Эритроциты х 10^{12}/л	4,42 ± 0,36	4,07 ± 0,2
Лейкоциты х 10^9/л	13,62 ± 2,93	6,7 ± 1,23*
Нейтрофилы, %	73 ± 3,41	70,25 ± 4,66
Палочкоядерные, %	8,25 ± 1,31	4,5 ± 0,95
Сегментоядерные, %	64,75 ± 2,13	65,75 ± 4,87
Лимфоциты, %	21 ± 2,44	22,75 ± 4,49
Базофилы, %	0,25 ± 0,25	0
Эозинофилы, %	2 ± 1,08	2 ± 0,81
Моноциты, %	3,5 ± 0,64	5 ± 0,7
СОЭ, мм/ч	36 ± 10,07	29,75 ± 11,4
Биохимический анализ крови		
Общий белок, г/л	63,75 ± 4,71	64,75 ± 3,94
Общий билирубин, ммоль/мл	17,27 ± 8,34	12,05 ± 3,77
АЛТ, ммоль/л	0,35 ± 0,06	0,27 ± 0,09
АСТ, ммоль/л	0,28 ± 0,09	0,22 ± 0,03

Окончание таблицы 4.6.8

Показатели	Группа АФП до лечения (n = 15)	Группа АФП после лечения (n = 15)
Биохимический анализ крови		
Мочевина, ммоль/л	4,17 ± 0,49	4,65 ± 0,17
Креатинин, ммоль/л	0,074 ± 0,009	0,0705 ± 0,0029
Ост. азот, мг/л	16,32 ± 1,039	16,95 ± 0,77
Сулемовая проба, %	71,66 ± 18,47	86,33 ± 2,84
Тимоловая проба, ед.	2,2 ± 0,26	3,2 ± 1,45

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 4.6.9

Изменение иммунологических показателей у больных с ожоговой болезнью в результате лечения АФП ($M \pm m$)

Показатели	Группа АФП до лечения (n = 15)	Группа АФП после лечения (n = 15)
Лейкоциты, в 1 мкл	7 000 ± 857,9	6 560 ± 1549,71
Палочкоядерные нейтрофилы, %	12 ± 3,54 ↑	3,2 ± 1,43
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	870,4 ± 291,01	196,4 ± 91,08
Сегментоядерные нейтрофилы, %	65 ± 4,57	64,6 ± 3,97
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	4 637,2 ± 780,72	4 316 ± 1 153,93
Моноциты, %	8 ± 1,3	9,2 ± 1,53
Моноциты, в 1 мкл	568,8 ± 140,38	620,8 ± 211,66
Лимфоциты, %	14 ± 3,67	21,4 ± 3,66
Лимфоциты, в 1 мкл	862,4 ± 156,75	1 288,4 ± 289,56
Эозинофилы, %	1 ± 0,45	1,6 ± 0,75
Эозинофилы, в 1 мкл	61,2 ± 30,49	138,4 ± 77,37
Е-РОК тотальные, %	42 ± 5,51 ↓	48,2 ± 2,18 ↓
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	332,06 ± 51,51 ↓	606,01 ± 116,63 ↓
Ранние Е-РОК, %	24 ± 4,35 ↓	35,2 ± 5,39
Термостабил. Е-РОК, %	29,8 ± 6,11	31,4 ± 5,58
Теоф. резистентные, %	45,6 ± 10,05	49,2 ± 3,18
Теоф. чувствительные, %	15,2 ± 14,58	17,8 ± 5,59*
Теоф. резистент. /теоф. чувствит.	3 ± 0,69	2,76 ± 0,57 ↓
Т-активин чувствительные (5 мг/мл), %	56,2 ± 6,68	54,2 ± 7,63
Т-активин чувствительные (0,5 мг/мл), %	54,6 ± 3,53	59,8 ± 2,42
М-РОК, %	7 ± 1,05 ↓	6,6 ± 1,29* ↓

Окончание таблицы 4.6.9

Показатели	Группа АФП до лечения (*n* = 15)	Группа АФП после лечения (*n* = 15)
М-РОК, в 1 мкл	65,17 ± 16,37 ↓	84,29 ± 25,76 ↓
0-клетки, %	51 ± 4,6 ↑	45,2 ± 2,29 ↑
0-клетки, в 1 мкл	465,17 ± 101,48 ↓	598,1 ± 162,65
$CD3^+$, %	46,38 ± 6,53 ↓	56,8 ± 7,68
$CD3^+$, в 1 мкл	391,64 ± 83,47	697,14 ± 142,35
$CD4^+$, %	16,4 ± 4,35 ↓	11,2 ± 3,2* ↓
$CD4^+$, в 1 мкл	155,09 ± 60,54	112,78 ± 20,05*
$CD8^+$, %	22,4 ± 4,35	26 ± 4,82
$CD8^+$, в 1 мкл	191,23 ± 53,17	288,37 ± 31,49
$CD16^+$, %	16 ± 5,51	11,6 ± 2,86
$CD16^+$, в 1 мкл	147,33 ± 61,67	150,32 ± 43,18
$CD72^+$, %	12 ± 1,09	8,4 ± 1,83
$CD72^+$, в 1 мкл	105,88 ± 22,07	108,26 ± 27,31
$CD11^+$, %	14 ± 4,05	18,66 ± 4,66
$CD11^+$, в 1 мкл	112,4 ± 41,54	377,33 ± 70,15*
$HLA\text{-}DR^+$, %	18 ± 0,89	12,8 ± 3,56
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	153 ± 29,47	136,4 ± 20,62
$CD95^+$, %	2,5 ± 0,5 ↑	5 ± 1 ↑
$CD95^+$, в 1 мкл	17,75 ± 2,78	87,5 ± 46,2
IgG, г/л	7,31 ± 1,18	14,26 ± 3,68
IgA, г/л	1,03 ± 0,45	2,14 ± 0,57*
IgM, г/л	0,78 ± 0,12 ↓	1,12 ± 0,21*
Процент фагоцитоза	60,12 ± 12,8	71,2 ± 4,31
Фагоцитарный индекс	2,96 ± 0,49 ↑	3,26 ± 0,34 ↑
Фагоцитарное число	1,98 ± 0,66 ↑	2,38 ± 0,39 ↑
НСТ-сп, опт. ед.	0,24 ± 0,05	0,13 ± 0,04
НСТ-ст, опт. ед.	0,19 ± 0,07	0,12 ± 0,03
НСТ-ст / НСТ-сп	0,94 ± 0,35 ↓	1,04 ± 0,11
ЦИК, усл. ед.	58,4 ± 13,71	67,6 ± 12,26 ↑
IL-1β, пкг/мл	9,6 ± 4,12	18,40 ± 8,73
IL-4, пкг/мл	153,28 ± 34,34 ↑	187,9 ± 66,39 ↑
СРБ, мг/мл	21 ± 1,87 ↑	13 ± 3,74* ↑

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Примечание. Стрелками (↑↓) обозначено изменение параметра относительно условной физиологической нормы.

Таблица 4.6.10

Изменение клинико-биохимических показателей у больных с ожоговой болезнью в группе плацебо в результате лечения (*M* ± *m*)

Показатели	Группа плацебо до лечения (*n* = 15)	Группа плацебо после лечения (*n* = 15)
Клинический анализ крови		
Гемоглобин, г/л	128,5 ± 10,04	126,75 ± 14,22
Эритроциты × 10^{12}/л	4,07 ± 0,2	4,1 ± 0,24
Лейкоциты × 10^{9}/л	13,17 ± 0,52	11,25 ± 1,03
Нейтрофилы, %	74,5 ± 3,17	72,25 ± 3,54
Палочкоядерные, %	10,25 ± 1,31	10 ± 0,7
Сегментоядерные, %	64,25 ± 3,9	62,25 ± 3,56
Лимфоциты, %	20 ± 3,89	21,25 ± 3,3
Базофилы, %	0	0
Эозинофилы, %	1 ± 0,45	1,25 ± 0,94
Моноциты, %	4,25 ± 1,31	4,75 ± 1,18
СОЭ, мм/ч	51 ± 6,64	55,50 ± 7,46
Биохимический анализ крови		
Общий белок, г/л	70 ± 1,95	64 ± 0,7*
Общий билирубин, ммоль/мл	14,15 ± 6,08	15,35 ± 7,16
АЛТ, ммоль/л	0,42 ± 0,06	0,29 ± 0,07
АСТ, ммоль/л	0,43 ± 0,07	0,29 ± 0,1
Мочевина, ммоль/л	4,52 ± 0,43	4,4 ± 0,54
Креатинин, ммоль/л	0,097 ± 0,008	0,04 ± 0,01
Ост. азот, мг/л	16,87 ± 0,94	16,67 ± 1,21
Сулемовая проба, %	86 ± 5,33	71,75 ± 6,83
Тимоловая проба, ед.	2,02 ± 0,57	2,67 ± 0,49

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 4.6.11

Изменение иммунологических показателей у больных с ожоговой болезнью в группе плацебо в результате лечения (*M* ± *m*)

Показатели	Группа плацебо до лечения (*n* = 15)	Группа плацебо после лечения (*n* = 15)
Лейкоциты, в 1 мкл	8960 ± 1 295,22	8 600 ± 0,87
Палочкоядерные нейтрофилы, %	9,6 ± 3,27 ↑	10,2 ± 2,94 ↑
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	925,6 ± 371,25	860,8 ± 233,19
Сегментоядерные нейтрофилы, %	64,4 ± 3,27	57,2 ± 5,32
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	5 773,6 ± 867,85	5 000 ± 822,36
Моноциты, %	8,6 ± 2,06	9 ± 2,76
Моноциты, в 1 мкл	801,2 ± 265,49	747,2 ± 200,82
Лимфоциты, %	16,6 ± 2,86	22,2 ± 2,06
Лимфоциты, в 1 мкл	1 394,4 ± 225,64	1 871,6 ± 160,49*
Эозинофилы, %	0,8 ± 0,37	1,4 ± 0,51
Эозинофилы, в 1 мкл	65,2 ± 29,77	120,4 ± 41,12
Е-РОК тотальные, %	57 ± 4,85	45,8 ± 2,52 ↓
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	810,02 ± 170,29 ↓	865,02 ± 110,15* ↓
Ранние Е-РОК, %	37,2 ± 4,51	28,6 ± 4,12 ↓
Термостабил. Е-РОК, %	19,6 ± 4,69	16 ± 2,24 ↓
Теоф. резистентные, %	60,8 ± 3,99	41 ± 8,33
Теоф. чувствительные, %	7,8 ± 5,89	7 ± 4,85
Теоф. резистент. / теоф. чувствит.	7,79 ± 0,69	5,86 ± 1,72
Т-активин чувствительные (5 мг/мл), %	24 ± 8,56	37,2 ± 3,46*
Т-активин чувствительные (0,5 мг/мл), %	35,25 ± 8,06	48,2 ± 9,11
М-РОК, %	12,6 ± 2,06	10,8 ± 0,92*
М-РОК, в 1 мкл	192,32 ± 59,83 ↓	196,87 ± 6,1* ↓
0-клетки, %	30,4 ± 6,39	43,4 ± 2,58 ↑
0-клетки, в 1 мкл	392,06 ± 77,38 ↓	809,712 ± 76,85*
$CD3^+$, %	48,8 ± 9,3 ↓	43,8 ± 6,25* ↓
$CD3^+$, в 1 мкл	711,86 ± 207,06	826,89 ± 166,34
$CD4^+$, %	34 ± 3,63	18,5 ± 3,09 ↓
$CD4^+$, в 1 мкл	539,41 ± 113,81	356,59 ± 75,21
$CD8^+$, %	29,75 ± 4,77 ↑	24,5 ± 5,91
$CD8^+$, в 1 мкл	451,82 ± 103,61	506,09 ± 164,49
$CD16^+$, %	19,75 ± 4,661 ↑	10,33 ± 4,98

Окончание таблицы 4.6.11

Показатели	Группа плацебо до лечения (n = 15)	Группа плацебо после лечения (n = 15)
$CD16^+$, в 1 мкл	299,39 ± 86,65	201,28 ± 90,51
$CD72^+$, %	13,4 ± 1,89	18 ± 2,68* ↑
$CD72^+$, в 1 мкл	173,7 ± 21,17	345,12 ± 67,42*
$CD11^+$, %	20 ± 0,0 ↑	15,5 ± 2,5
$CD11^+$, в 1 мкл	287,33 ± 61,13	196,25 ± 18,1*
$HLA\text{-}DR^+$, %	17,6 ± 2,04	18,5 ± 4,72
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	253,6 ± 64,54	353,75 ± 78,93*
$CD95^+$, %	8 ± 0,9 ↑	8 ± 1,83 ↑
$CD95^+$, в 1 мкл	123,5 ± 39,5	162,25 ± 46,68*
IgG, г/л	7,8 ± 2,18	9,56 ± 2,05
IgA, г/л	0,84 ± 0,067	1,32 ± 0,1*
IgM, г/л	0,46 ± 0,02 ↓	0,71 ± 0,056 ↓
Процент фагоцитоза	83,14 ± 4,59 ↑	93,64 ± 1,21 * ↑
Фагоцитарный индекс	3,86 ± 0,51 ↑	4,98 ± 0,99 * ↑
Фагоцитарное число	3,28 ± 0,59 ↑	4,64 ± 0,89 ↑
НСТ-сп, опт. ед.	0,24 ± 0,06	0,15 ± 0,03
НСТ-ст, опт. ед.	0,19 ± 0,04	0,22 ± 0,07
НСТ-ст / НСТ-сп	0,85 ± 0,13 ↓	1,7 ± 0,71
ЦИК, усл. ед.	96,4 ± 28,14 ↑	63,6 ± 5,34 ↑
IL-1β, пкг/мл	22,4 ± 9,68	17,0 ± 5,15
IL-4, пкг/мл	82,25 ± 24,99 ↑	188,62 ± 54,38 ↑
СРБ, мг/мл	18 ± 3,39 ↑	19 ± 5,09 ↑

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Примечание. Стрелками (↑↓) отмечено изменение параметра относительно условной физиологической нормы.

Таблица 4.6.12

Клинико-биохимические показатели у больных с ожоговой болезнью после проведенного лечения ($M \pm m$)

Показатели	Группа АФП после лечения (n = 15)	Группа плацебо после лечения (n = 15)
Клинический анализ крови		
Гемоглобин, г/л	128,75 ± 9,19	126,75 ± 14,22
Эритроциты × 10^{12}/л	4,07 ± 0,2	4,1 ± 0,24
Лейкоциты × 10^9/л	6,7 ± 1,23*	11,25 ± 1,03

Окончание таблицы 4.6.12

Показатели	Группа АФП после лечения ($n = 15$)	Группа плацебо после лечения ($n = 15$)
Клинический анализ крови		
Нейтрофилы, %	70,25 ± 4,66	72,25 ± 3,54
Палочкоядерные, %	4,5 ± 0,95*	10 ± 0,7
Сегментоядерные, %	65,75 ± 4,87	62,25 ± 3,56
Лимфоциты, %	22,75 ± 4,49	21,25 ± 3,30
Базофилы, %	0	0
Эозинофилы, %	2 ± 0,81	1,25 ± 0,94
Моноциты, %	5 ± 0,7	4,75 ± 1,18
СОЭ, мм/ч	29,75 ± 11,4*	55,5 ± 7,46
Биохимический анализ крови		
Общий белок, г/л	64,75 ± 3,94	64 ± 0,7
Общий билирубин, ммоль/мл	12,05 ± 3,77	15,35 ± 7,16
АЛТ, ммоль/л	0,27 ± 0,09	0,295 ± 0,07
АСТ, ммоль/л	0,22 ± 0,03	0,29 ± 0,1
Мочевина, ммоль/л	4,65 ± 0,17	4,40 ± 0,54
Креатинин, ммоль/л	0,0705 ± 0,0029	0,0457 ± 0,0101
Ост. азот, мг/л	16,95 ± 0,77	16,67 ± 1,21
Сулемовая проба, %	86,33 ± 2,84	71,75 ± 6,83
Тимоловая проба, ед.	3,2 ± 1,45	2,67 ± 0,49

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 4.6.13

Иммунологические показатели у больных с ожоговой болезнью после проведенного лечения ($M \pm m$)

Показатели	Группа АФП после лечения ($n = 15$)	Группа плацебо после лечения ($n = 15$)
Лейкоциты, в 1 мкл	6 560 ± 1549,71	8 600 ± 0,87
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,2 ± 1,43	10,2 ± 2,94 ↑
Палочкоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	196,4 ± 91,08	860,8 ± 233,19
Сегментоядерные нейтрофилы, %	64,6 ± 3,97	57,2 ± 5,32
Сегментоядерные нейтрофилы, в 1 мкл	4 316 ± 1153,93	5 000 ± 822,36
Моноциты, %	9,2 ± 1,53	9 ± 2,76
Моноциты, в 1 мкл	620,8 ± 211,66	747,2 ± 200,82
Лимфоциты, %	21,4 ± 3,66	22,2 ± 2,06

Продолжение таблицы 4.6.13

Показатели	Группа АФП после лечения (*n* = 15)	Группа плацебо после лечения (*n* = 15)
Лимфоциты, в 1 мкл	1 288,4 ± 289,56	1 871,6 ± 160,49*
Эозинофилы, %	1,6 ± 0,75	1,4 ± 0,51
Эозинофилы, в 1 мкл	138,4 ± 77,37	120,4 ± 41,12
Е-РОК тотальные, %	48,2 ± 2,18 ↓	45,8 ± 2,52 ↓
Е-РОК тотальные, в 1 мкл	606,01 ± 116,63 ↓	865,02 ± 110,15* ↓
Ранние Е-РОК, %	35,2 ± 5,39	28,6 ± 4,12 ↓
Термостабил. Е-РОК, %	31,4 ± 5,58	16 ± 2,24 ↓
Теоф. резистентные, %	49,2 ± 3,18	41 ± 8,33
Теоф. чувствительные, %	17,8 ± 5,59*	7 ± 4,85
Теоф. резистент. / теоф. чувствит.	2,76 ± 0,57 ↓	5,86 ± 1,72
Т-активин чувствительные (5 мг/мл), %	54,2 ± 7,63	37,2 ± 3,46*
Т-активин чувствительные (0,5 мг/мл), %	59,8 ± 2,42	48,2 ± 9,11
М-РОК, %	6,6 ± 1,29* ↓	10,8 ± 0,92*
М-РОК, в 1 мкл	84,29 ± 25,76 ↓	196,87 ± 6,1* ↓
0-клетки, %	45,2 ± 2,29 ↑	43,4 ± 2,58 ↑
0-клетки, в 1 мкл	598,1 ± 162,65	809,712 ± 76,85*
$CD3^+$, %	56,8 ± 7,68	43,8 ± 6,25* ↓
$CD3^+$, в 1 мкл	697,14 ± 142,35	826,89 ± 166,34
$CD4^+$, %	11,2 ± 3,2* ↓	18,5 ± 3,09 ↓
$CD4^+$, в 1 мкл	112,78 ± 20,05*	356,59 ± 75,21
$CD8^+$, %	26 ± 4,82	24,5 ± 5,91
$CD8^+$, в 1 мкл	288,37 ± 31,49	506,09 ± 164,49
$CD16^+$, %	11,6 ± 2,86	10,33 ± 4,98
$CD16^+$, в 1 мкл	150,32 ± 43,18	201,28 ± 90,51
$CD72^+$, %	8,40 ± 1,83	18 ± 2,68* ↑
$CD72^+$, в 1 мкл	108,26 ± 27,31	345,12 ± 67,42*
$CD11^+$, %	18,66 ± 4,66	15,5 ± 2,5
$CD11^+$, в 1 мкл	377,33 ± 70,15*	196,25 ± 18,1*
$HLA\text{-}DR^+$, %	12,8 ± 3,56	18,5 ± 4,72
$HLA\text{-}DR^+$, в 1 мкл	136,4 ± 20,62	353,75 ± 78,93*
$CD95^+$, %	5 ± 1 ↑	8 ± 1,83 ↑
$CD95^+$, в 1 мкл	87,5 ± 46,2	162,25 ± 46,68*
IgG, г/л	14,26 ± 3,68	9,56 ± 2,05

Окончание таблицы 4.6.13

Показатели	Группа АФП после лечения (*n* = 15)	Группа плацебо после лечения (*n* = 15)
IgA, г/л	2,14 ± 0,57*	1,32 ± 0,1*
IgM, г/л	1,12 ± 0,21*	0,71 ± 0,056 ↓
Процент фагоцитоза	71,2 ± 4,31	93,64 ± 1,21* ↑
Фагоцитарный индекс	3,26 ± 0,34 ↑	4,98 ± 0,99* ↑
Фагоцитарное число	2,38 ± 0,39 ↑	4,64 ± 0,89 ↑
НСТ-сп, опт. ед.	0,13 ± 0,04	0,15 ± 0,03
НСТ-ст, опт. ед.	0,12 ± 0,03	0,22 ± 0,07
НСТ-ст / НСТ-сп	1,04 ± 0,11	1,7 ± 0,71
ЦИК, усл. ед.	67,6 ± 12,26 ↑	63,6 ± 5,34 ↑
IL-1β, пкг/мл	18,4 ± 8,73	17,6 ± 5,15
IL-4, пкг/мл	187,9 ± 66,39 ↑	188,62 ± 54,38 ↑
СРБ, мг/мл	13 ± 3,74* ↑	19 ± 5,09 ↑

*Достоверность различий по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.
Примечание. Стрелками (↑↓) обозначено изменение параметра относительно условной физиологической нормы.

Таблица 4.6.14

Критерий оценки	Группа АФП (*n* = 15)	Группа плацебо (*n* = 15)
Количество случаев септических осложнений	1	3
Количество случаев с летальным исходом	0	2
Количество случаев отторжения трансплантата	0	4
Количество случаев формирований келлоидных рубцов	0	6

Исходы ожоговой травмы у пациентов групп сравнения после лечения

4.7. ПРИМЕНЕНИЕ АФП В ЛЕЧЕНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Работа по изучению эффективности применения препарата АФП в комплексном лечении онкологических заболеваний была обусловлена положениями, отраженными в литературном обзоре, а также нашими экспериментальными данными, полученными при изучении влияния АФП на опухолевый рост в условиях *in vitro* и *in vivo* (см. главу 3). Основной целью исследования являлось изучение противоопухолевой эффективности препарата человеческого АФП на широком спектре онкологических заболеваний. Исследование планировалось как неконтролируемое, выполненное на больных с различными формами опухолевых заболеваний.

Клинические испытания эффективности препарата человеческого АФП осуществлялись на специально отобранных для этих целей группах онкологических больных с так называемыми «сигнальными» опухолями. В эти группы были включены пациенты с наличием злокачественного опухолевого роста различного гистогенеза и различной степени клеточной дифференцировки, с различными особенностями клинического течения и метастазирования.

Таким образом, задачи настоящего клинического исследования заключались в следующем:

1. Оценить уровень и спектр противоопухолевой активности человеческого АФП, а также продолжительность эффекта.
2. Определить показания и противопоказания к применению АФП в лечении онкологических заболеваний.
3. Определить побочные и токсические проявления АФП.
4. Изучить механизмы действия АФП на течение онкологического процесса.
5. Оценить терапевтическую эффективность препарата в зависимости от типа опухоли и стадии заболевания.

Клиническое исследование проведено в соответствии с критериями испытаний лекарственных средств в онкологии [82].

Критерии включения пациентов в исследование:

1. Гистологически подтвержденный рак.
2. Больные раком, выявленным первично, с метастазами или рецидивами заболевания, пролеченные без эффекта традиционными методами: хирургическим, химио- и лучевой терапией, гормонотерапией.
3. Письменное согласие больного.

Критерии исключения пациентов из исследования:

1. Локализация опухоли или метастазов в головном мозге.
2. Прорастание опухоли или метастазов в крупные кровеносные сосуды.
3. Наличие у больного острого инфекционного заболевания или психического заболевания, требующего интенсивного лечения.
4. Потеря больным более 20% исходной массы тела.
5. Большой опухолевый массив.
6. Прогресс заболевания на фоне лечения (в этом случае больного переводят на стандартную терапию).
7. Неприемлемая токсичность препарата, включая гематологическую.
8. Отказ пациента продолжить лечение.

9. Получение больным во время исследования противоопухолевой терапии другого типа.

Для оценки субъективного эффекта была использована следующая схема:

0 – эффект не подлежит оценке (например, у больного не было функциональных нарушений);

1 – полное исчезновение субъективных нарушений;

2 – частичное улучшение (выраженное);

3 – отсутствие эффекта или минимальный эффект;

4 – ухудшение.

Для оценки объективного эффекта лечения были осуществлены следующие необходимые операции:

1. Установлены критерии оценки результатов.
2. Стандартизировано определение результатов.
3. Унифицированы способы регистрации и измерения проявлений болезни.
4. Идентифицированы точки отсчета лечения (начало терапии и проявление эффекта).
5. Определено отношение к субъективному эффекту.
6. Установлены критерии оценки качества жизни.

Оценка консервативных методов лечения проводилась нами по следующим параметрам:

1. Объективный эффект.
2. Общее состояние больного.
3. Субъективный эффект.
4. Побочные и токсические проявления лечения.
5. Продолжительность эффекта.

При оценке эффекта лечения в практическом исследовании нами были проанализированы все виды и степень выраженности эффектов, а также случаи безуспешного лечения и разнообразные побочные явления, если даже они устранимы известными средствами.

Наиболее целесообразно производить оценку результатов, применяя сопоставление на трех этапах испытания:

1) в процессе лечения;

2) непосредственно после лечения;

3) в отдаленный период после лечения.

В отдаленный после лечения срок основным критерием оценки результатов терапии являлась продолжительность жизни. Наряду с грубым критерием «общей выживаемости» должны определяться продолжительность жизни без рецидивов и метастазов в случае солидных опухолей и продолжительность жизни в состоянии ремиссии при системных заболеваниях. При этом необходимо оценивать частоту возникновения отдаленных осложнений и степень трудовой, медицинской реабилитации больных.

Отсчет продолжительности эффекта при неконтролируемых исследованиях вели от даты начала лечения до даты прогрессирования болезни. Этот период называют общим эффектом (ремиссией).

На совещании по стандартизации оценки результатов лечения рака (Турин, Италия, 1977) было предложено использовать термин «эффект» для солидных опухолей, а «ремиссия» – для системных заболеваний. Термины «рецидив» и «метастазы» должны употребляться в том случае, если больной ранее радикально лечился по поводу локализированной формы болезни. После радикального лечения распространенных форм солидных опухолей и полной ремиссии при системных заболеваниях правильнее говорить о возврате болезни. Прогрессирование заболевания наступает после паллиативного лечения. Термин «излечение» допустимо употреблять по отношению к отдельным больным, у которых, судя по прогностическим факторам, вероятность умереть от злокачественного новообразования низка. Продолжительность полного эффекта (ремиссии) исчисляют от даты первой регистрации полного эффекта до даты впервые отмеченного прогрессирования заболевания. При частичном эффекте регистрируется лишь период общего эффекта.

Общая продолжительность жизни определяется до установленной даты завершения наблюдения или смерти больного, до даты исчезновения больного из-под наблюдения. Если критерием оценки эффекта лечения является продолжительность жизни без рецидива и метастазов, расчет ведется соответственно до даты их выявления.

В зависимости от возможности объективной оценки эффекта лечения выделяются следующие виды опухолевых поражений:

1. Измеряемые – могут быть непосредственно измерены в двух взаимно-перпендикулярных диаметрах. Для идентификации применяются КТ, ЯМР, УЗИ, рентгенологическое исследование и ряд других методов. Например: шарообразные метастазы в паренхиму легкого, маммография при опухоли молочных желез, подкожные метастазы и др.

2. Оцениваемые (измеряется только один параметр). Например, медиастинальные опухоли, эндоскопические данные или другие варианты нечеткого определения опухоли.

3. Ограниченно оцениваемые или неоцениваемые очаги поражения, определяемые при помощи специальных методов, но их регрессия не может быть достоверно измерена. Например, метастазы в кости, рак предстательной железы, инфильтрация почки, локализация опухоли в малом тазу, лимфогенные метастазы в легких и др.

В настоящем исследовании для нас наиболее актуальной являлась оценка эффекта непосредственно после лечения (выписки), т. к. больные, у которых не наблюдалось улучшения состояния в ходе лечения препаратом АФП, как правило, выписывались (переводились) для получения традиционной терапии в клинике или по месту жительства. Для конкретной оценки отдаленных последствий лечения материала пока что тоже недостаточно, т. к. основная масса успешно пролеченных больных наблюдается менее чем 2 года.

В соответствии с Руководством ВОЗ по отчету о результатах терапии рака [198] оценка объективного лечения, исключая критерий выживаемости, имеет свои особенности, обусловленные характером поражения. Наиболее выражены различия между оценками в случаях:

а) солидных опухолей, поддающихся измерению;

б) солидных опухолей, не поддающихся измерению;

в) поражения костей;

г) системных заболеваний.

С учетом этого сформулированы следующие критерии эффективности лечения злокачественных опухолевых заболеваний:

1. Полный эффект, т. е. подтвержденное объективными исследованиями отсутствие признаков злокачественного процесса или стойкой ремиссии со стабилизацией миелограммы в случае лимфопролиферативных заболеваний; определяется двумя обследованиями с интервалом не менее 4 недель.

2. Частичный эффект, т. е. уменьшение опухоли и метастазов не менее чем на 50%; определяется двумя обследованиями с интервалом не менее 4 недель.

3. Стабилизация процесса, т. е. незначительное уменьшение опухолевого очага или отсутствие динамики в протекании злокачественного процесса.

4. Прогрессирование, т. е. продолжение на фоне лечения роста опухоли и/или проявление новых метастазов.

Если при множественных поражениях количество полных и частичных эффектов равно или превышает количество случаев отсутствия эффекта, то эффект оценивается как частичный. При наличии прогрессирования хотя бы одного из множественных очагов эффект лечения оценивается как прогрессирование. Можно выделить две категории прогрессирования: смешанное – когда одни очаги реагируют на лечение, а другие прогрессируют или появляются новые поражения; неудачи лечения – когда наблюдается прогрессирование некоторых или всех поражений и/или появляются новые очаги, регрессии поражений не определяется.

В случаях опухолевых поражений, не поддающихся прямому измерению, оценка эффекта наиболее часто производится по рентгенограммам и фотографиям. Помимо состояния поражения должны определяться и косвенные показатели: ГЗТ, уровень опухолеассоциированных антигенов и антител к ним, уровень Ca^{2+}, щелочной фосфатазы крови при костных метастазах, уровень кислой фосфатазы у больных метастатическим раком предстательной железы и др.

Если у больного, имеющего поддающиеся измерению очаги и неизмеряемые поражения, нет эффекта со стороны неизмеряемых очагов, но есть частичный эффект со стороны измеряемых, то эффект оценивается как частичный. При соблюдении первого условия и полном эффекте со стороны измеряемых очагов эффект все равно оценивается как частичный.

Наличие компрессии или перелома кости и его срастания не должны рассматриваться как единственный признак результатов лечения. Если не используется лечение, меняющее кальциевый обмен, то устранение бывшей гиперкальциемии при остеолитическом поражении костей может служить косвенным показателем терапевтического эффекта. Оценку эффекта лечения костных метастазов следует проводить при остеобластических метастазах не менее 3 месяцев, а при остеолитических – 6 месяцев с момента завершения лечения.

Объективный эффект лечения больных с лимфомами следует оценивать так же, как и в случаях солидных опухолей. Как правило, размер опухоли оценивается по ее «площади», определяемой как произведение двух максимальных взаимно-перпендикулярных диаметров (d1, d2). Если опухолевых полей несколько, то сопоставляют их суммарную площадь до и после лечения. При опухолях, у которых измеряется один параметр, определяется уменьшение линейного размера более чем на 50% или менее чем на 50%. Все видимые поражения следует фотографировать, желательно на цветную пленку, и давать к ним четкие объяснения.

Дальнейшая обработка материала предусматривает:

1. Построение гистограммы распределения больных по видам рака.

2. Определение по каждому виду заболевания количества больных с положительным результатом лечения.

3. Определение по каждому виду заболевания количества умерших пациентов.

4. Определение по каждому виду заболевания количества больных, которым лечение препаратом не дало какого-либо положительного результата.

5. Выбор группы онкологических заболеваний, при которых препарат наиболее эффективен.

6. Тщательное патоморфологическое исследование (с гистологическим исследованием не пораженных опухолью органов) для определения степени воздействия препарата на опухоль и признаков возможного побочного действия препарата.

Помимо общей характеристики эффекта ставится задача обработки материала, для того чтобы дать ответ на вопросы:

1. Появляется ли толерантность у больных на введение препарата?

2. Как сказывается воздействие на иммунную систему больных?

3. Какое влияние оказывает препарат на системы и органы больного?

Результаты анализа используются для корректировки курса лечения.

Таблица 4.7.1

Индекс Карновского (качество жизни)

Баллы, %	Количественное и качественное описание симптомокомплекса
0 (100–90%)	У больного полностью сохранена активность, он способен выполнять все действия, которые выполнял до болезни, без ограничений. Снижение массы тела до 5%
1 (80–70%)	У больного ограничена способность к напряженной физической работе, но он может передвигаться и выполнять легкую работу или работу в положении сидя, например домашнюю работу, работу в учреждении. Снижение массы тела до 10%
2 (60–50%)	Больной способен передвигаться и ухаживать за собой, но не может работать. Больной ходит и чем-либо занимается в течение 50% периода бодрствования. Снижение массы тела до 15%
3 (40–30%)	Более 50% периода бодрствования, больной лежит в постели или сидит в кресле. Снижение массы тела до 20%
4 (20–10%)	Больной полностью обездвижен, не может ухаживать за собой, прикован к постели или креслу. Снижение массы тела более чем на 20%

Примечание. Если вынужденное пребывание больного в постели объясняется другой причиной (не основным заболеванием), то в категорию «4» он включаться не должен. Масса тела – характеристика, нередко более точно отражающая прогресс заболевания. Однако в исследование больной включается уже с массой тела, подверженной изменению под влиянием патологического процесса. Кроме того, при достижении объективного эффекта от лечения больной может худеть в связи с потерей аппетита во время лечения. Несмотря на это, регистрация массы тела является ценной количественной характеристикой улучшения состояния больного.

Методика проведения клинических испытаний для новых способов лечения предусматривает строгий подход к точности определения диагноза, к оценке состояния систем и органов пациента, а также эффективности лечения. Поэтому всех больных, поступивших на лечение, обследовали для выяснения состояния систем и органов, иммунного статуса, состояния опухолевого процесса.

Схема предварительного обследования включала в себя:

1) физикальные показатели: пол, массу тела, возраст, дыхание, температуру, состояние кожных покровов и т. д.;

2) общий анализ крови и мочи, биохимический анализ крови;

3) оценку состояния всех систем и органов в соответствии с требованиями ВОЗ [82];

4) определение иммунного статуса больного: оценку относительного и абсолютного количества Т-, В-, NK-клеток, $CD3^+$-, $CD4^+$-, CD8-, $CD22^+$-, $CD7^+$-, $CD16^+$-, $CD95^+$-клеток, РБТЛ; оценку уровня активности ФНО-α, тест-титра IFN-α и идентификацию антител к ДНК;

5) определение онкомаркеров в сыворотке крови иммуноферментным методом (АФП, CA 15-3, CA 19-9, CA 125);

6) гистологическое исследование опухолевой ткани;

7) измерение всех размеров опухоли;

8) инструментальное определение распространенности опухолевого и метастатического процессов (рентгенологические методы, ЯМР, КТ, УЗИ, эндоскопия и др.);

9) дневник (или медицинскую карту) больного.

Все пациенты независимо от стадии процесса и локализации опухоли получали препараты АФП внутривенно по схеме: один раз в сутки в течение 4–8 недель. На фоне основного лечения больные получали симптоматическую помощь, направленную на снижение токсикоза и облегчение состояния. Больные, у которых после окончания курса терапии не было обнаружено признаков опухоли, не получали специфического лечения.

Больные, у которых имелась остаточная масса опухоли, по окончании курса лечения находились под наблюдением и получали второй курс лечения через 4 недели. Больные, у которых на фоне лечения наблюдался прогресс опухолевого роста, выводились из исследования и получали стандартную противоопухолевую и симптоматическую терапию.

Терапия проводилась только в условиях клиники. В медицинскую карту заносились результаты ежедневного осмотра больного с указанием общего состояния, температуры и других важнейших параметров. Не реже одного раза в 2 недели проводилось промежуточное обследование, включавшее общий и биохимический анализ крови и мочи, осмотр специалистов и инструментальное обследование по показаниям. По окончании лечения осуществлялось полное обследование больного, соответствующее проведенному перед началом терапии, с обязательным документированием параметров и состояния опухоли, обязательным анализом возможных побочных эффектов и токсичности.

В клиническое исследование был вовлечен 51 онкобольной (III и IV стадии заболевания) с опухолями и системными поражениями различного гистогенеза. 7 человек получали профилактическое антиметастатическое и противорецидивное лечение препаратом АФП после радикального хирургического удаления опухоли. 13 условно здоровых (добровольцев) в течение 4 недель также получали препарат АФП для выяснения токсических и побочных эффектов. Доза и способ введения были аналогичны, при этом показатели иммунного статуса в этой группе не изменялись.

Оценка результатов лечения АФП проводилась по ранее описанным критериям с использованием КТ-контроля (General Electric). Дополнительно у 14 больных со злокачественными новообразованиями был проведен МРТ-контроль. Томографическое обследование у опухолевых больных проводилось до, во время и после лечения АФП на резистивном томографе Tomicon-1100 фирмы Bruker (ФРГ) с напряженностью поля 0,28 Т. Исследование проводилось в трех ортогональных анатомических проекциях, в режимах получения T_1 и T_2 взвешенных изображений (спин-эхо); в некоторых случаях применяли проекции и режимы градинт-эхо, а также методику миелографии. Оценка состояния органов в динамике при терапии препаратом АФП производилась по форме, размерам, интенсивности сигнала, времени релаксации T_2 и РД, протонной плотности.

По локализации и морфологии опухоли распределялись следующим образом: рак молочной железы – 4 случая, рак желудка – 2, рак почки – 4, рак языка – 1, рак дна полости рта – 1, рак толстой кишки – 2.

Для сравнения были выполнены МРТ-исследования у 14 больных с аналогичными заболеваниями, получавших традиционную полихимиотерапию и лучевую терапию.

На основании изложенных в главах 1 и 3 теоретических и экспериментальных данных о возможных механизмах противоопухолевого влияния АПФ через апоптоз и, не исключено, через эффект блокады антител к поверхностным рецепторам опухолевых клеток мы провели исследование, позволившее ответить на поставленные вопросы. В частности, одной из задач исследования являлось выяснение влияния АФП на специфическое звено противоопухолевого иммунитета через механизм снятия феномена иммунологического усиления роста опухоли.

В соответствии с поставленными задачами в ходе клинического исследования нами были выделены 4 группы: первая группа – больные, отреагировавшие на терапию препаратом АФП некрозом и лизисом основного опухолевого очага и метастазов; вторая группа – больные, не отреагировавшие на терапию; третья группа – больные, получавшие профилактическое противорецидивное и антиметастатическое лечение препаратом АФП после радикального удаления опухоли; четвертая (контрольная) – условно здоровые добровольцы (табл. 4.7.2).

Забор крови для иммунологического исследования в группах пациентов производили до, во время и после проведения курса терапии препаратом АФП. Количественные характеристики различных субпопуляций лимфоцитов изучали с использованием моноклональных антител [28, 29, 232]. Определяли: $CD7^+$, $CD3^+$ – зрелые Т-лимфоциты; $CD4^+$ – Th; $CD8^+$ – Ts и Tk; $CD22^+$ – В-лимфоциты; $CD16^+$ – NK-клетки; $CD95^+$ – лимфоциты с маркерами апоптоза.

Функциональную активность Т- и В-лимфоцитов изучали с помощью реакции бластной трансформации в радиометрическом варианте [200]. При определении цитолитической активности NK-клеток использовали в качестве мишеней культуру клеток К-562 [67]. Биологическую активность TNF-α исследовали на культуре клеток L-929 по цитолитическому действию. Титр сывороточного IFN-α измеряли по методике подавления действия тест-вируса [75]. Сыворотки титровали на культуре клеток L-929; в качестве тест-вируса использовали вирус энцефаломиокардита мышей.

Чтобы выяснить, участвует ли гуморальное звено иммунитета в противоопухолевых реакциях на фоне лечения препаратом АФП, мы попытались определить, вырабатываются ли в организме больных антитела к АФП, нативной ДНК, денатурированной ДНК и опухолеассоциированному антигену (ОАА).

Определение уровня АФП в сыворотке крови проводили прямым иммуноферментным анализом. Антитела к АФП определяли путем поперечного переноса их электрофорезом на нитроцеллюлозную мембрану. Полученную таким образом реплику инкубировали вначале в 0,5%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина, а затем в сыворотке онкологических больных и здоровых добровольцев, получавших терапию АФП. Для проявления иммунокомплексов реплику инкубировали в растворе кроличьих антител к иммуноглобулинам человека, конъюгированных с пероксидазой хрена. Обработанный таким образом иммуноблот выдерживали в растворе 3,3-диаминобензидина. Для оценки суммарного уровня антител к АФП мы использовали непрямой иммуноферментный анализ: в лунки планшета вносили по 10 и 100 нг АФП человека; после адсорбции добавляли по 200 мкл сыворотки больных и здоровых людей (начиная со второго разведения); образовавшиеся иммунокомплексы также проявляли конъюгатом кроличьих антител с пероксидазой хрена.

Определение антител к денатурированной или нативной ДНК в сыворотке крови больных проводили с помощью иммуноферментной тест-системы «ДНК-тест» (г. Новосибирск) на основе ДНК из селезенки крупного рогатого скота. Метод основан на реакции связывания антител к денатурированной ДНК из сыворотки крови больного с антигенными детерминантами, сорбированными на планшете. Далее комплекс антиген – антитело выявляли с помощью иммуноферментного конъюгата с пероксидазой хрена. При получении положительного результата делали вывод о наличии у пациента патологического процесса, связанного с распадом опухоли.

Определение антител к опухолеассоциированному антигену в сыворотке крови больных проводили с помощью иммуноферментной тест-системы на основе ОАА – гликопротеина *Bacillus megaterium*. Метод основан на реакции связывания антител к опухолеассоциированному антигену из сыворотки крови больного с антигенными детерминантами, сорбированными на планшете. Далее комплекс антиген – антитело выявляли с помощью иммуноферментного конъюгата с пероксидазой хрена.

Таблица 4.7.2

Характеристика онкологических больных по группам

Диагноз	Количество больных по группам				
	Первая группа	С клиническим эффектом		Вторая группа	Третья группа
		полным	частичным		
Рак молочной железы	7	3	4	10	1
Рак легкого	1 (плоскоклеточный)	1	–	2 (мелкоклеточный)	–
Рак желудка	2 (железистый, аденокарцинома)	1	1	2 (перстневидноклеточный, аденокарцинома)	2
Рак прямой кишки	5 (аденокарцинома)	1	4	1 (аденокарцинома)	1
Рак почки	4 (почечноклеточный)	–	4	1 (почечноклеточный)	3
Рак кожи, полости рта, языка	7 (плоскоклеточный)	3	4	–	–
Меланобластома верхнего неба и кожи	1	1	–	3	–
Рак простаты	1	–	1	1	–
Миеломонобластный лейкоз	2	1	1	–	–
Всего	**30**	**11**	**19**	**21**	**7**

Из приведенных в таблице 4.7.2 данных следует, что при довольно значительном разнообразии опухолевых заболеваний у пациентов, вовлеченных в исследование и получавших лечение препаратом АФП, явно выделились несколько групп, сходных по критерию ответа на лечение: первая группа – больные со злокачественными опухолями, у которых получен ответ на АФП; вторая группа – онкологические больные, у которых ответ на АФП не получен; третья группа – больные, радикально прооперированные по поводу рака, которым АФП вводился профилактически; четвертая группа – здоровые люди (контроль).

У 30 больных (первая группа) в ходе лечения АФП мы отметили единую для всех пациентов клиническую картину. Независимо от вида и локализации первичных опухолевых очагов и метастазов у всех больных в промежутке от 1 до 15 сут. отмечено усиление болевого синдрома в месте локализации новообразования после введения препарата. Также отмечено, что после введения АФП в интервале от 2 до 12 часов у больных наблюдал-

ся подъем температуры тела (максимально до 38 °С), который купировался самостоятельно, без использования антипиретиков. В период наблюдения за состоянием больных первой клинической группы отмечено усиление синдрома эндогенной токсемии. Она была более выражена у больных, имевших опухоли и метастазы во внутренних органах и тканях. У пациентов с локализацией очагов опухолевого роста снаружи эндотоксемия была более умеренной. Перечисленные явления были обусловлены тем, что под влиянием АФП очаги опухолевого роста подвергались тотальному некрозу через реакции острого иммунного воспаления. Это подтверждено динамическими гистологическими исследованиями (при возможности доступа к опухоли), когда картина на микроскопическом уровне выглядела как тотальный некроз с обильной макрофагально-лейкоцитарной инфильтрацией и соответствовала по окончании курса лечения II–IV степени терапевтического патоморфоза (см. Приложение).

У больных, у которых по техническим трудностям было невозможно произвести забор тканевого материала, критерием оценки служили данные специальных и инструментальных методов обследования. Так, данные рентгенографии, УЗИ, КТ, МРТ показали, что первоначальной реакцией опухолевых очагов на лечение АФП было снижение острого реактивного воспаления, которое впоследствии переходило в фазу некроза. Некроз характеризовался уменьшением плотности очагов (вплоть до превращения в жидкостный компонент) и далее образованием кавернозных полостей – «пустот» (см. Приложение) в местах локализации опухолевой ткани. В ряде наблюдений у больных с полным эффектом лечения мы наблюдали лизис опухолей с последующим замещением участков опухолевого распада соединительной тканью.

У больных, ответивших на лечение АФП, регистрировалось качественное и количественное уменьшение очагов, а в ряде наблюдений их полное исчезновение. Особенно детально процесс реверсии опухолевого роста (опухоль – некроз – тканевой детрит – каверна – соединительная ткань) был зафиксирован при возможности непосредственной визуализации. Следует отметить, что с уменьшением опухолевой массы у больных уменьшались явления гипертермических реакций и эндотоксемии.

По данным МРТ-исследования, в динамике у пациентов, получавших лечение АФП, отмечается более быстрая регрессия опухолевых очагов через элементы воспаления с последующим замещением фиброзной тканью и склерозированием. В условиях применения полихимиотерапии (ПХТ) и лучевого лечения также наблюдаются реактивные изменения, но не столь активно. При ПХТ и лучевой терапии нет реактивного увеличения очагов в паренхиматозных органах и лимфоузлах, но есть увеличение интенсивности и T_2, а также гетерогенности очагов. КТ- и МРТ-исследование при иммунотерапии позволяют, в отличие от других методов интроскопии, отметить характерные особенности регрессии и трансформации опухолевых очагов и выявить ряд новых критериев оценки, отличных от получаемых при лучевой и ПХТ-терапии.

В случаях, когда опухоль уже не определялась, при введении АФП не зарегистрировано усиления болевого синдрома, повышения температуры и не отмечено явлений токсемии.

У пациентов второй клинической группы за весь период наблюдения при лечении препаратом АФП мы ни в одном случае не отметили явлений гипертермических реакций. Фон эндотоксемии соответствовал уровню до начала лечения. К сожалению, у больных второй клинической группы не отмечено положительной динамики при оценке количественных и качественных характеристик опухолевых образований и метастазов.

При сравнении групп по критерию Карновского (табл. 4.7.1) следует отметить, что у пациентов первой группы положительная динамика до и после проведения лечения составляла 1–2, а в ряде наблюдений – 3 балла, тогда как у пациентов второй группы такой динамики не отмечено.

У больных третьей и четвертой групп (группы сравнения) при проведении терапии АФП ни в одном наблюдении не зарегистрировано никаких осложнений и побочных эффектов на введение препарата. Токсические проявления отсутствовали, т. к. не было точки приложения АФП (радикально прооперированные больные и здоровые добровольцы).

В связи с полученными клиническими результатами встал вопрос: почему при сходных локализациях злокачественных опухолей в первой и второй группах больных наблюдается диаметрально противоположная картина терапевтических эффектов? Оказалось, что у больных первой группы опухоли были высоко- и умереннодифференцированного гистогенеза (по-видимому, рецепторпозитивные к АФП), а у больных второй группы – низкодифференцированные или недифференцированные (рецепторнегативные к АФП).

Это обстоятельство крайне важно для понимания реализации противоопухолевых механизмов, когда известно, что наиболее иммуногенными являются высоко- и умереннодифференцированные опухоли, у которых на мембранах клеток сохранен рецепторный аппарат и главный комплекс гистосовместимости (MHC). Несмотря на то что рецепторы опухолевых клеток могут быть заняты «экранирующими антителами» (феномен иммунного усиления роста опухоли, существует возможность разблокировки рецепторов путем введения в организм опухоленосителя антигена, комплементарного к экранирующим антителам (в данном случае АФП). Наличие рецепторного аппарата на мембране опухолевой клетки необходимо также для индукции апоптоза. У низкодифференцированных опухолей крайне слабая иммуногенность, поэтому нет точек приложения для запуска иммунных механизмов противоопухолевого иммунитета и вовлечения механизмов апоптоза.

Перечисленные выше положения нашли свое подтверждение в результатах проведенного нами иммунологического мониторинга. До лечения показатели иммунного статуса пациентов достоверно отличались ($p < 0{,}05$) от аналогичных показателей здоровых людей (контрольная группа). В частности, относительное и абсолютное количество $CD7^+$- и $CD3^+$-клеток было понижено у всех больных, уровни $CD4^+$- и $CD8^+$-клеток – только у больных второй группы; количество В-лимфоцитов и NK-клеток было повышено во всех группах, а количество клеток с маркером апоптоза ($CD95^+$) – только во второй и третьей группах (табл. 4.7.3). В результате проведения курса терапии с использованием АФП не выявлено каких-либо изменений в показателях иммунного статуса у пациентов первой группы. В процессе лечения АФП во второй группе повысилось относительное количество цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD8^+$), а в третьей группе достоверно уменьшилось абсолютное количество В-лимфоцитов ($CD22^+$) и количество клеток с маркером апоптоза ($CD95^+$).

Таблица 4.7.3

Показатели иммунного статуса онкологических больных и условно здоровых добровольцев при терапии АФП *(M ± m)*

Показатель	Первая группа (*n* = 18)		Вторая группа (*n* = 22)		Третья группа (*n* = 7)		Четвертая группа (*n* = 13)
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	Контроль
$CD7^+$, % $\times 10^9$/л	38,44 ± 2,3# 0,67 ± 0,08#	40,25 ± 3,25 0,61 ± 0,07	36,5 ± 5,12# 0,56 ± 0,23#	45,33 ± 6,69 0,51 ± 0,07	42 ± 3,88# 0,88 ± 0,21#	39 ± 4,92 0,33 ± 0,25	62 ± 2,3 0,98 ± 0,09
$CD3^+$, % $\times 10^9$/л	39 ± 2,14# 0,68 ± 0,16#	38,5 ± 3,03 0,57 ± 0,1	35 ± 2,6# 0,51 ± 0,17#	45,33 ± 6,69 0,29 ± 0,06	42,4 ± 3,51# 0,87 ± 0,19#	39,5 ± 4,6 0,58 ± 0,21	58 ± 2,3 0,92 ± 0,08
$CD4^+$, % $\times 10^9$/л	25,78 ± 1,46 0,48 ± 0,05	27,25 ± 0,96 0,41 ± 0,09	22 ± 1# 0,29 ± 0,06#	29,33 ± 3,31 0,26 ± 0,03	29,2 ± 3,07 0,59 ± 0,13	26 ± 3,94 0,39 ± 0,17	32,2 ± 1,6 0,56 ± 0,04
$CD8^+$, % $\times 10^9$/л	22,89 ± 2,8 0,42 ± 0,08	23,5 ± 1,09 0,36 ± 0,08	15 ± 0,86# 0,21 ± 0,06#	24,6 ± 2,37* 0,26 ± 0,03	26 ± 3,84 0,48 ± 0,07	20,5 ± 4,02 0,31 ± 0,14	27,6 ± 1,3 0,44 ± 0,04
$CD22^+$, % $\times 10^9$/л	13,33 ± 1,69# 0,25 ± 0,04#	14,5 ± 1,29 0,2 ± 0,06	18 ± 1,22# 0,22 ± 0,06#	11,33 ± 2,37 0,14 ± 0,03	14,8 ± 2,75# 0,32 ± 0,03#	8,5 ± 1,09 0,1 ± 0,04*	5 ± 0,6 0,07 ± 0,01
$CD16^+$, % $\times 10^9$/л	18,22 ± 2,89# 0,27 ± 0,05#	18,5 ± 1,79 0,28 ± 0,07	17,75 ± 3,01# 0,23 ± 0,11#	17,33 ± 3,92 0,2 ± 0,03	17,4 ± 1,08# 0,25 ± 0,04#	17 ± 2,18 0,19 ± 0,07	13,4 ± 1,4 0,14 ± 0,02
$CD95^+$, % $\times 10^9$/л	7,33 ± 1,85 0,12 ± 0,03	7 ± 1,5 0,08 ± 0,07	12,5 ± 3,9# 0,37 ± 0,16#	6 ± 2,45 0,06 ± 0,02	13,2 ± 2,5# 0,22 ± 0,03#	9 ± 0,62 0,1 ± 0,03*	3,5 ± 0,8 0,05 ± 0,01

*Достоверные различия ($p < 0,05$) в динамике терапии АФП.

Примечание. Символом # обозначены различия с четвертой (контрольной) группой.

Таблица 4.7.4

Характеристика функциональной активности Т- и В-лимфоцитов (в РБТЛ), титра IFN-α и активности TNF-α у пациентов с онкологической патологией при терапии АФП ($M \pm m$)

Показатель	Контрольная группа ($n = 13$)	Первая группа ($n = 18$)		Вторая группа ($n = 22$)	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Индекс стимуляции В-лимфоцитов	4,8 ± 0,25	4,84 ± 0,29	4,83 ± 0,06	6,11 ± 1,74	4,75 ± 0,27
Индекс стимуляции Т-лимфоцитов	6,5 ± 0,7	5,07 ± 0,66	4,13 ± 0,71	4,82 ± 0,29	4,55 ± 0,42
Индекс цитотоксичности NK-клеток	27 ± 4,4	31,25 ± 1,26	34,43 ± 1,25	36,12 ± 3,06	35 ± 1,45
Титр INF-α, ед.	6,21 ± 0,74	22,44 ± 6,54#	28 ± 6,41#	23,67 ± 3,28#	20,62 ± 2,79#
Активность TNF-α, ед.	1,91 ± 0,64	6,44 ± 0,8#	13,25 ± 4,42#	10,59 ± 3,46#	13,83 ± 4,74#

Примечание. Символом # обозначены различия по t-критерию Стьюдента в сравнении с контрольной группой.

Установлено, что у пациентов первой и второй групп (табл. 4.7.4) титры сывороточного IFN-α и активность TNF-α значительно выше, чем в контрольной группе, в то время как индексы стимуляции Т- и В-лимфоцитов и показатели цитотоксичности NK-клеток не отличаются от аналогичных показателей контрольной группы. В процессе терапии статистически значимых изменений исследуемых показателей не выявлено, хотя необходимо отметить видимую тенденцию повышения титров сывороточного IFN-α и активности TNF-α в первой группе, что может свидетельствовать об активации Т-лимфоцитов и макрофагов, продуцирующих эти цитокины. Таким образом, для онкологических больных первой, второй и третьей групп характерен дефект Т-клеточного звена иммунитета, проявляющийся понижением относительного и абсолютного количества зрелых Т-лимфоцитов, что согласуется с литературными данными [76, 134, 135]. Однако относительное и абсолютное содержание В-лимфоцитов, NK-клеток и клеток с маркерами апоптоза у всех больных повышено.

Попытки обнаружить антитела к АФП ни в одной из исследуемых групп, включая контрольную, не увенчались успехом. Следовательно, гуморальное звено иммунитета при терапии АФП не играет существенной роли, даже в случае «лавинообразного» некроза опухолевой ткани у больных первой группы, где мы наблюдали резкий подъем концентрации АФП в сыворотке крови (до 9000 нг/мл). Поскольку во введенной дозе препарата с учетом периода полувыведения содержание чистого АФП не превышало 256 000 нг (в организме больного объем циркулирующей крови составляет предположительно 4–5 л), то становится очевидным, что уровень экзогенного АФП мог составить около 51,2 мкг/мл сыворотки крови, а это в 188 раз меньше определяемого нами количества. В других группах такого всплеска концентрации АФП не зарегистрировано. Источник подобного высокого уровня сывороточного АФП в первой группе, несомненно, эндогенный. Вероятнее всего, это разрушающиеся в ходе лечения опухолевые клетоки, маркированные АФП. Данное заключение подтверждено специальными инструментальными методами контроля за количественными и качественными характеристиками опухолевых очагов.

Из полученных нами результатов (рис. 4.7.1) следует, что терапия АФП даже при индуцированном активном некрозе опухолевой ткани не оказывает заметного влияния на иммунный статус больных первой группы. Во второй группе повышается относительное количество цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD8^+$). У больных первой группы, в отличие от больных второй и третьей групп, отмечена стабильность относительного и абсолютного количества апоптотических лимфоцитов (с эффектом от терапии АФП), уровень их близок к норме.

Уровень антител к опухолеассоциированному антигену *Bacillis megaterium* во всех группах больных, независимо от эффективности противоопухолевой терапии АФП, достоверно не отличался. Уровень антител к нативной ДНК в первой и второй группах онкобольных возрастал в 2–3 раза и не отражал эффективности лечения. Напротив, уровень антител к денатурированной ДНК значительно повышался только у больных первой группы, у которых был отмечен выраженный опухолевый некроз в результате лечения АФП, что однозначно свидетельствует в пользу запуска механизмов апоптоза.

Таким образом, отсутствие резких изменений показателей иммунного статуса в ходе лечения больных АФП заставляет искать причины некроза опухолевой ткани (в случае ответа на терапию) на уровне реализации эффекторных цитотоксических иммунных реакций непосредственно в очагах злокачественного роста. В то же время интегральным показателем эффективности противоопухолевого лечения как АФП, так и другими препаратами может служить уровень антител к денатурированной ДНК как маркер запуска апоптоза.

На основании полученных нами результатов сделаны следующие заключения:

1. Препарат АФП в дозе 4 мкг/кг, вводимый внутривенно в течение 4 недель, у здоровых людей не вызывает никаких побочных эффектов и осложнений.

2. Препарат АФП в дозе 4 мкг/кг, вводимый внутривенно в течение 4 недель, у больных, радикально прооперированных по поводу злокачественных новообразований, не вызывает никаких побочных эффектов и осложнений, а также не оказывает влияния на показатели клеточного и гуморального иммунитета.

3. Препарат АФП в дозе 4 мкг/кг, вводимый внутривенно в течение 4–8 недель, у больных с низкодифференцированными злокачественными опухолями не влияет на течение неопластического процесса и не включает иммунные механизмы противоопухолевой защиты.

4. Препарат АФП в дозе 4 мкг/кг, вводимый внутривенно в течение 4–8 недель, у больных с высоко- и умереннодифференцированными опухолями показал очень высокую эффективность через запуск специфических клеточных иммунных механизмов (гиперчувствительность замедленного типа), через снятие феномена иммунологического усиления роста опухоли и апоптоз опухолевых клеток.

5. На вводимый препарат АФП не синтезируются нейтрализующие антитела.

6. Препарат АФП защищает лимфоциты от цитотоксического влияния опухоли (блокада опухолевой иммуносупрессии).

7. Препарат АФП является индуктором сывороточного IFN-α и TNF-α.

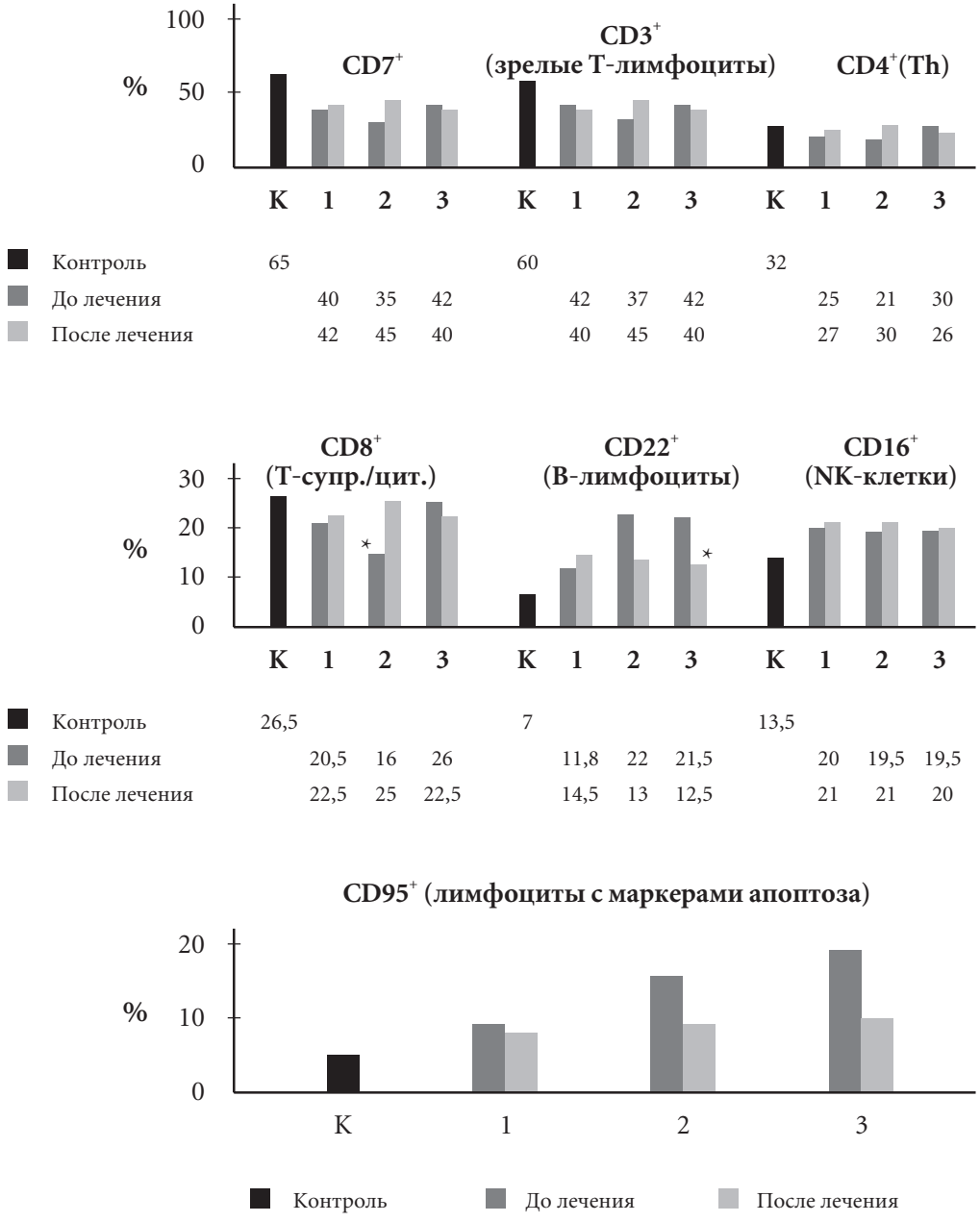


Рис. 4.7.1. **Показатели иммунного статуса больных с онкологической патологией при терапии АФП:** К – контроль; 1, 2 и 3 – соответственно 1, 2 и 3-я группы больных.
*Достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.
**Достоверное отличие до и после проведенного лечения при $p < 0,05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кратко резюмируя результаты исследования биологической роли АФП в норме и патологии, а также возможности использования данного белка в качестве лекарственного средства для лечения некоторых внутренних болезней, хирургической и онкологической патологии, следует отметить, что АФП проявил себя тонким регулятором гомеостаза в физиологических условиях и при развитии патологических процессов.

Из литературы известно, что АФП может связывать цитоплазматические белки, которые в норме эскортируют ядерные факторы или транскрипционные кофакторы к поверхности органелл клеток. Имеющиеся на поверхности мембран рецепторы к АФП служат для связывания ядерных факторов или иных кофакторов/ингибиторов. Эти данные в значительной мере подтверждают тесную связь АФП с клеточной пролиферацией и дифференцировкой. Предполагается также взаимодействие АФП с другими регуляторными белками, такими как факторы роста. В результате такого взаимодействия происходит ориентация клетки на размножение и дифференцировку.

Известно, что АФП способен регулировать концентрацию различных веществ, прежде всего полиненасыщенных жирных кислот, эстрогенов и стероидов. В свою очередь жирные кислоты, особенно полиненасыщенные, модулируют позитивно или негативно механизм действия различных стероидов и белков, вовлеченных в проведение мембранных триггерных сигналов.

Работая как транспортный белок, АФП способен направленно доставлять регуляторные сигналы в клетки, имеющие рецепторы к нему. Поскольку такие рецепторы обнаруживаются у делящихся клеток (в т. ч. опухолевых, клеток кроветворения, иммунитета и др.), то АФП фактически усиливает информационный контроль за правильностью реализации генетической программы пролиферирующих клеток и в значительной мере влияет на уровень их функциональной активности.

Отмечена также иммуномодулирующая активность альфа-фетопротеина. В частности, он обладает способностью ингибировать экспрессию макрофагами на их поверхности антигенов MHC II класса *in vitro*, причем ингибирующий эффект не зависит от наличия в культуре Т-клеток. В экспериментах на животных установлено, что многократное введение АФП (8 мг) значительно угнетает как генерацию антителообразующих клеток (АОК) к эритроцитам барана (ЭБ), так и уровень анти-ЭБ-антител. Внесение АФП (12 мкг/мл) в культуру трансформированных ФГА лимфоцитов здоровых людей достоверно снижало уровень иммуноглобулинов классов G и A в супернатантах этих культур.

Было установлено, что под воздействием АФП моноциты продуцируют фактор, активирующий Т-лимфоциты, обладающие супрессорной активностью. Приведенные данные характеризует АФП как белок с выраженными иммуносупрессивными свойствами, именно поэтому его целесообразно применять в качестве лекарственного средства для терапии аутоиммунных заболеваний. Способность АФП снижать реакции Т-зависимого гуморального и клеточного иммунитета *in vitro* успешно использована для предотвращения развития аутоиммунных процессов у иммунодефицитной линии мышей New-Zeland.

Экспериментально был обнаружен путь регуляции на уровне образования мРНК в синтезе трийодтиронина при участии АФП. Регулирующее влияние дексаметазона на экспрессию гена АФП выявлено *in vivo* и *in vitro* в культурах клеток печени мышиных эмбрионов. В то же время отмечена регулирующая роль АФП в метаболизме стероидных гормонов. Показано ингибирующее влияние очищенного человеческого АФП на продук-

цию эстрадиола железистыми клетками свиней в монослойной культуре клеток при стимуляции фолликулостимулирующим гормоном.

Предпосылкой возникновения повышенного интереса к АФП в онкологии явилось открытие явления экспрессии эмбриональных генов у опухолевых клеток с эктопической продукцией ими фетальных белков, экранирующих антигенные детерминанты раковых клеток. Этот феномен получил название «иммунологического усиления роста опухоли». Ввиду того что одним их экспрессируемых белков являлся АФП, были предприняты попытки лечения неоплазм с использованием антител как в чистом виде, так и в конъюгате с токсинами, что дало неудовлетворительные результаты. При дальнейшем изучении оказалось, что введенный в организм опухоленосителя АФП снимает феномен иммунологического усиления роста опухоли и запускает механизмы трансплантационного иммунитета с последующим некрозом опухоли.

Неослабевающий интерес к АФП был также обусловлен тем, что данный белок является транспортным и обладает выраженными конъюгатными свойствами. Поскольку лигандами АФП являлись эмбриональные рецепторы опухолевых клеток, весьма успешно были предприняты попытки целенаправленной доставки к злокачественным клеткам цитостатиков и цитотоксинов.

Одним из перспективных направлений практической онкологии является поиск веществ, обладающих апоптотическим воздействием на опухолевую клетку. В частности, исследованиями отечественных и зарубежных лабораторий показано, что обработка человеческой гепатомы и человеческой лимфобластомы человеческим АФП *in vitro* приводит к сильному торможению роста клеток, появлению морфологических изменений, характерных для апоптоза.

Перечисленные выше многогранные свойства белка (в очень кратком изложении) предопределили возможность создания и изучения лекарственной формы человеческого АФП.

Препарат человеческого АФП был создан в рамках темы 82/1 ГКНТ РФ «Создание новых лекарственных средств методами химического и биологического синтеза» и разрешен к применению ГФК РФ (решение от 27.02.1997 г.) под названием «Альфетин» (приказ МЗ РФ № 129 от 15.09.1999 г.). Однако в связи с новым постановлением ВОЗ (Комитет по стандартизации биологических веществ (Женева) 26–30 ноября 2001 г. издал «Указания по методике инактивации и удалению вирусов, предназначенной для гарантирования безопасности от вирусов продуктов плазмы крови человека») был разработан технологически более совершенный препарат «Профеталь».

Отличительной особенностью лекарственных форм АФП являлось то, что в качестве стабилизатора иммунобиологического средства в них впервые использован полисахарид (реополиглюкин). Это позволило увеличить вирусологическую безопасность препарата, так как ранее в качестве стабилизатора использовали сывороточный альбумин. Более того, поскольку биологические свойства АФП напрямую зависят от сохранения структуры полисахаридных последовательностей молекулы, техническое решение по стабилизации белка полисахаридом является вполне обоснованным.

Изучение препарата, основой которого является альфа-фетопротеин, проведенное в условиях *in vitro* и *in vivo* на грызунах (мыши, крысы, морские свинки, кролики) и приматах, дает основание считать препарат безопасным при его использовании в условиях физиологической нормы и при патологиях.

АФП (субстанция и готовая форма) обладает огромной широтой терапевтического индекса – 10 000. АФП в дозе 10 мг/кг (10-тысячекратное превышение терапевтической

дозы) не вызывает у животных при однократном введении каких-либо признаков интоксикации. При подкожном введении препарата приматам в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг (100- и 1000-кратное превышение терапевтической дозы) также не удалось обнаружить изменений в периферической крови, в функции сердечно-сосудистой системы, печени, почек, щитовидной железы и коры надпочечников, а также в минеральном, углеводном, белковом и липидном обменах. Трехмесячное ежедневное введение кроликам АФП в готовой лекарственной форме в дозах 0,005 и 0,025 мг/кг (5- и 25-кратное превышение терапевтической дозы) также не выявило каких-либо патологических отклонений от нормы при общебиологических, гематологических, биохимических и патоморфологических исследованиях. Гистологический анализ внутренних органов кроликов выявил только умеренную активацию внутри- и межорганной миграции лимфоцитов тимуса, эмиграцию лимфоидных клеток через центральные синусы брыжеечных лимфоузлов и в ретикулоэндотелиальной системе (клетки Купфера) печени. Установленные структурные признаки усиления функциональной активности иммунокомпетентных органов (тимус, лимфоузлы, ретикулоэндотелиальная система печени) являются, по-видимому, отражением специфической активности препарата АФП. В ходе исследования не выявлено аллергизирующих, мутагенных и потенциально канцерогенных свойств препарата.

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что препарат АФП является биологически активным соединением, высокоочищенным и безопасным, не вызывающим у животных каких-либо токсических реакций при длительном введении в очень значительных передозировках.

Установлено, что белок АФП в дозе 0,004 мг/кг способствует увеличению мышечной силы и выносливости мышей на фоне физических нагрузок. При трансплантации в полуаллогенной системе обработка костного мозга препаратом АФП заметно предотвращает аллогенную ингибицию пролиферации стволовых кроветворных клеток, имевшую место в контроле ($p < 0,05$). Также показано, что препарат АФП дозозависимым образом тормозит отторжение аллогенного кожного трансплантата у мышей и снижает аллогенную ингибицию пролиферации стволовых кроветворных клеток в организме летально облученного реципиента, не влияя на данный показатель в сингенной системе. Эти данные позволяют сделать вывод о перспективности дальнейших исследований препарата АФП в качестве специфического иммуномодулирующего средства, используемого для подавления реакции отторжения при пересадках органов и тканей. Особое значение может иметь тот факт, что, оказывая достоверное воздействие на клеточный иммунитет в аллогенных системах, АФП не влияет на пролиферацию клеток костного мозга в сингенной системе. Этот феномен выгодно отличает данный препарат от синтетических иммуносупрессоров и может быть объяснен биологической ролью белка АФП, составляющего основу лекарственной формы.

При изучении АФП в условиях *in vitro* и *in vivo* установлено, что он дозозависимым образом тормозит пролиферативную активность опухолевых клеток разных линий через подавление синтеза РНК, ДНК и белка, а также проявляет свойства радиопротектора у летально облученных животных.

Суммируя сказанное, механизмы воздействия АФП на рост злокачественных опухолей можно представить в виде схемы (рис. 4.8.2).

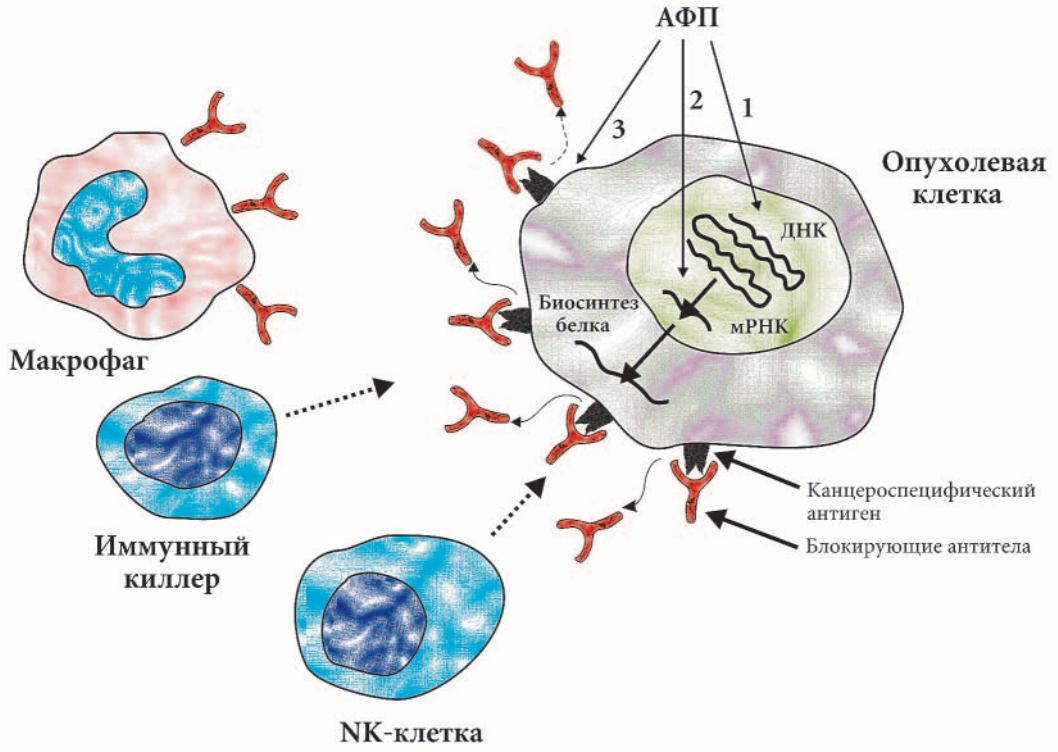


Рис. 4.8.2. **Возможные механизмы действия АФП:**

1. Блокада процессов репликации, ведущая к нарушению пролиферации и размножения опухолевых клеток через апоптоз.

2. Блокада процессов транскрипции, ведущая к нарушению биосинтеза белка и метаболизма клетки.

3. Отмена феномена «экранирующих антител», благодаря чему опухолевая клетка становится доступной для специфического лизиса через НК-клетки и макрофаги (антителозависимая цитотоксичность).

Для проведения клинических испытаний препарата АФП были выбраны заболевания, протекающие с различными иммунологическими нарушениями, а именно:

1. Внутренние болезни:

1.1. Хронические специфические и неспецифические заболевания легких (туберкулез, бронхиальная астма, пневмокониозы).

1.2. Заболевания печени (хронические гепатиты, цирроз печени).

1.3. Заболевания желез внутренней секреции (болезнь Хашимото).

2. Хирургические болезни (неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, облитерирующие заболевания сосудов, ожоговая болезнь).

3. Онкологические заболевания.

Все исследования, в соответствии с Хельсинкской декларацией, выполнены двойным слепым плацебоконтролируемым рандомизированным методом. Общее количество пациентов, принявших участие в клинических испытаниях препарата АФП, составило 428 человек.

Применение АФП в комплексном лечении **бронхиальной астмы** показало достоверное улучшение вентиляционных показателей легких. Уменьшилось повышенное содержание гемоглобина, эритроцитов, палочкоядерных нейтрофилов и эозинофилов ($p < 0,05$). Установлено достоверное снижение абсолютного количества нейтрофилов и NK-клеток ($CD16^+$), а также концентраций IL-1β, IL-4 и общего IgE. Помимо этого отмечена нормализация уровня зрелых Т-лимфоцитов. Под влиянием лечения с использованием препарата АФП показано полное исчезновение из плазмы крови С-реактивного протеина.

Нарушения иммунного ответа при **пневмокониозах** представлены угнетением Т-клеточного звена, снижением уровня IgM и активацией фагоцитоза, а также повышенным содержанием ЦИК. Вторичный иммунодефицит в большей степени выражен при силикозе (антракосиликозе), чем при пневмокониозе от воздействия токсико-аллергического аэрозоля; он более глубок при узелковой форме, чем при интерстициальной, и нарастает при переходе из первой во вторую стадию заболевания. Установлено, что у больных пневмокониозами включение АФП в схему комплексного лечения способствует торможению иммунопатологических реакций I и III типов. Улучшение вентиляционных показателей легких при лечении пневмокониозов АФП связано с нормализацией простагландинового обмена.

Для активного **инфильтративного туберкулеза легких** характерен выраженный дефицит Т-клеточного звена иммунитета. При осложнении специфического процесса экссудативным плевритом отмечена тенденция к нарастанию иммуноглобулинов класса G и достоверное увеличение уровня ЦИК. Выявлено, что при активном инфильтративном туберкулезе легких иммуномодулирующий эффект препарата АФП заключается в угнетении избыточного антителообразования (уменьшение гиперпродукции IgG), в снижении уровня ЦИК и нормализующем влиянии на Т-клеточное звено иммунитета. Отмечены также десенсибилизирующий и противовоспалительный эффекты АФП, что свидетельствует о целесообразности назначения препарата в активную фазу туберкулеза не только для коррекции Т-иммунодефицита, но и для устранения избыточной сенсибилизации и неспецифического компонента воспаления. У больных активным туберкулезом легких выявлены изменения фракционного состава фосфолипидов сыворотки крови и конденсата выдыхаемого воздуха, подтверждающие нарушения в системе легочного сурфактанта и фосфолипидном обмене. При включении препарата АФП в схему комплексного лечения больных инфильтративным туберкулезом легких на основании позитивных сдвигов фосфолипидного спектра сыворотки крови (снижение суммарного содержания лизофосфатидилхолина и сфингомиелина и нарастание уровня фосфатидилхолина) установлен мембранопротекторный эффект АФП.

Применение препарата АФП у пациентов с **хроническими гепатитами и циррозом печени** позволило выявить несомненные преимущества его включения в комплекс терапевтических мероприятий.

Применение АФП в основной группе пациентов существенно ($p < 0,05$) улучшало лабораторные показатели (впервые за весь период развития болезни). Так, в частности, зарегистрировано уменьшение изначально повышенного времени свертывания крови до физиологических величин, снижение СОЭ до уровня субкомпенсации, снижение общего и прямого билирубина в среднем в 2,5 раза, АСТ — в 4 раза, АЛТ — в 3,5 раза, α-амилазы — в 5,4 раза. Включение в комплекс лечебных мероприятий АФП позволило добиться нормализации функциональных (сулемовой, тимоловой) проб печени. При анализе иммунологических показателей нами установлено достоверное снижение уровня IgG после

проведенного лечения с использованием АФП. Данный факт можно расценивать как свидетельство снижения не только интенсивности воспалительной реакции, но и продукции аутоантител.

В ходе терапии АФП у больных отмечена выраженная позитивная клиническая симптоматика. Так, в течение первой недели лечения значительно сократились явления эндотоксикоза, болевой синдром, желтуха. К третьей неделе лечения у больных уменьшились размеры печени и селезенки в среднем на 40%, прекратились венозные кровотечения. При контрольном ультразвуковом обследовании после завершения курса терапии у пациентов отмечено значительное уменьшение, а в четырех наблюдениях — исчезновение асцита из брюшной полости, связанное с портальной гипертензией. Печеночная ткань стала приобретать более гомогенную и однородную структуру, уменьшились явления фиброза и очаги некробиоза.

При анализе лабораторных данных, полученных в процессе изучения влияния препарата АФП на течение **тиреоидита Хашимото**, нами установлено следующее. Включение препарата АФП в комплекс лечебных мероприятий способствует достоверному снижению антител к тиреопероксидазе, восстанавливает исходно сниженный уровень Т-клеток ($CD3^+$), а также увеличивает содержание CD8-позитивных Т-лимфоцитов. Показано, что препарат повышает исходно сниженный уровень IgA и снижает уровень повышенных иммуноглобулинов классов M и G. После проведенного лечения пациенты основной группы отметили значительное улучшение общего самочувствия: уменьшение слабости, пастозности и сухости кожи, повышение активности, жизненного тонуса.

Наряду с субъективными положительными ощущениями пациентов нами объективно зарегистрировано улучшение сердечной деятельности, документированное контрольными электрокардиограммами. Ультразвуковое обследование щитовидных желез у больных основной группы до и после лечения не выявило видимой разницы. Однако увеличение продукции сниженных до лечения общего тироксина и общего трийодтиронина является интегральным показателем успешной терапии.

В ходе комплексного лечения в сочетании с препаратом АФП у больных **неспецифическим язвенным колитом и болезнью Крона** отмечено значительное уменьшение частоты диспепсических расстройств в виде кровавых поносов. У 30% больных болезнью Крона и у 32,1% больных неспецифическим язвенным колитом к концу лечения мы добились полной нормализации стула (количественно и качественно).

Среди интересных наблюдений можно выделить следующие: у пациентов, страдающих болезнью Крона, отмечено частичное, а у 20% больных – полное восстановление конфигурации ранее деформированных суставов кистей рук и их функциональной способности в полном объеме движений; к концу лечения у всех пациентов с болезнью Крона практически исчезли явления гранулематозных процессов на коже.

Рентгенологическими исследованиями у больных неспецифическим язвенным колитом и болезнью Крона установлено, что контуры просвета толстой кишки стали более равномерными, уменьшились явления перепадов диаметров просвета, ускорился пассаж содержимого по кишечной трубке. При контрольном эндоскопическом обследовании отмечено уменьшение отечности слизистой кишки, гиперемии, количества фиброзного экссудата в просвете. Количество язвенных дефектов значительно снизилось, поэтому поверхность слизистой оболочки толстой кишки стала более гладкой. Гистологическое исследование показало уменьшение воспалительно-пролиферативных процессов и лейкоцитарно-макрофагальной инфильтрации.

Следует отметить, что при использовании в комплексной терапии препарата АФП больные впервые за многие годы отметили явное улучшение самочувствия. Улучшение в состоянии больных позволило нам у 30% пациентов с болезнью Крона и у 32,1% больных НЯК в 2–3 раза снизить дозы кортикостероидных препаратов, а у 20 и 7,1% соответственно полностью их отменить. При этом в контрольных группах пациентов, получавших в комплексном лечении препарат «Плацебо», несмотря на проведенную активную современную лекарственную терапию, не удалось достичь сколько-нибудь значимых результатов.

Таким образом, анализ эффективности препарата АФП в комплексном лечении больных с неспецифическим язвенным колитом и болезнью Крона позволил выявить его выраженное положительное влияние на течение и ближайший исход заболеваний. Субъективно в результате использования препарата АФП все пациенты отметили положительный эффект, заключавшийся в уменьшении качественных и количественных характеристик соответствующих симптомокомплексов. Указанные позитивные изменения верифицированы объективными исследованиями — биохимическими, гематологическими и иммунологическими, а также рентгенологическим и эндоскопическим обследованиями. Наряду с выраженным положительным терапевтическим влиянием препарата АФП ни в одном из наблюдений не отмечено ухудшения состояния пациентов или иных побочных эффектов, что свидетельствует о его хорошей переносимости.

Анализ эффективности АФП в комплексном лечении **больных ХИНК**, получавших только консервативное лечение, позволил выявить позитивное влияние препарата на течение заболеваний (тромбангиит, облитерирующий эндартериит).

Субъективно все больные отметили улучшение состояния, его качественное отличие от итогов ранее проводимой рутинной терапии, не приносившей существенных улучшений. У 50% больных удалось ликвидировать трофические язвы на стопах и голенях, в 12,5% наблюдений язвы на стопах уменьшились с 5 до 1 см и с 3 до 0,5 см в диаметре, стали менее глубокими и болезненными. Все пациенты отметили значительное уменьшение, а в 37,5% наблюдений — полное исчезновение болей в конечностях, перемежающейся хромоты и судорожных болей при ходьбе. При объективной оценке (ангиография, ультразвуковое исследование) у 37,5% больных ишемия не превышала 2А (до лечения – 2Б-4-й степени), у остальных пациентов кровообращение приблизилось к физиологической норме.

При контрольном исследовании мышечного кровотока у больных, получавших АФП в комплексном лечении, достоверно отмечено увеличение гемоперфузии мягких тканей до 31,6 ± 3,45 мл/100 г/мин относительно показателей в группе плацебо – 22,13 ± 4,61 мл/100 г/мин. У больных сосудистыми заболеваниями применение препарата АФП в раннем послеоперационном периоде позволило достоверно ($p < 0,05$) уменьшить число послеоперационных осложнений.

В группе пациентов, получавших традиционное лечение и препарат «Плацебо», достоверных результатов улучшения в течении заболеваний зарегистрировать не удалось.

Включение в комплекс терапевтических мероприятий препарата АФП у пациентов с **ожоговой болезнью** позволяет снизить уровень интенсивности гиперэргических реакций, способствующих развитию воспаления, а следовательно, создать более благоприятный фон для последующей трансплантации кожи.

Выявленные нами изменения на уровне лабораторных показателей нашли отражение в развитии клинической картины в группах сравнения. Среди пациентов, получав-

ших в комплексной терапии препарат АФП в катамнезе заболевания, отмечено уменьшение частоты септических осложнений, в том числе с летальным исходом. Ни в одном из наблюдений в основной группе пациентов не зарегистрировано отторжения кожного трансплантата. Также в период наблюдения у пациентов, получавших АФП, отмечено отторжение некротического струпа в более ранние сроки и, как следствие, уменьшение явлений ожоговой аутотоксикации и более ранняя активизация больных. Одним из наиболее интересных наблюдений явилось отсутствие формирования келоидных рубцов после произведенной трансплантации.

Полученные нами клинические и лабораторные данные дают основание полагать, что включение препарата АФП в комплекс терапевтических мероприятий в качестве иммунорегулирующего средства улучшает течение и исход ожоговой болезни.

Результаты применения препарата АФП у **онкологических больных** позволяют сделать следующие заключения. Препарат АФП в дозе 4 мкг/кг, вводимый внутривенно в течение 4 недель, у больных, радикально прооперированных по поводу злокачественных новообразований, не вызывает никаких побочных эффектов и осложнений и не оказывает влияния на показатели клеточного и гуморального иммунитета. Препарат АФП в дозе 4 мкг/кг, вводимый внутривенно в течение 4–8 недель больным с низкодифференцированными опухолями, не оказывает влияния на течение неопластического процесса и не включает иммунные механизмы противоопухолевой защиты. Напротив, у больных с умеренно- и высокодифференцированными опухолями АФП показал очень высокую эффективность через запуск специфических клеточных иммунных механизмов (гиперчувствительность замедленного типа), снятие феномена иммунологического усиления роста опухоли и апоптоз опухолевых клеток. На вводимый препарат не образуются нейтрализующие антитела, и АФП защищает лимфоциты от цитотоксического влияния опухоли (блокада опухолевой иммуносупрессии). Препарат АФП является индуктором сывороточного α-IFN и TNF-α.

Таким образом, на основании проведенных экспериментальных исследований и полученных результатов клинических наблюдений можно сделать вывод о наличии у АФП выраженной иммунорегуляторной функции. При этом данный белок функционирует скорее как тонкий модулятор процессов дифференцировки ключевой регуляторной системы Th1 и Th2, контролируя переключение клеточно-опосредованного ответа в гуморальный иммунный ответ и наоборот, в зависимости от избыточности реагирования иммунной системы в том или ином направлении. С позиций иммуносупрессии можно трактовать позитивные эффекты АФП в терапии больных с классическими аутоиммунными болезнями (тиреоидит Хашимото, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит), с нозологическими формами, в патогенезе которых аутоиммунный компонент играет существенную роль (ожоговая болезнь, хронические гепатиты и цирроз печени, хроническая ишемия нижних конечностей), с атопическими заболеваниями (бронхиальная астма). При этом включение АФП в лечение больных туберкулезом легких и пневмокониозом не только дает выраженный клинический эффект, но и нормализует показатели иммунограммы, которые до начала терапии характеризовали эти заболевания как протекающие на фоне выраженного вторичного иммунодефицитного состояния.

Очень своеобразен механизм действия данного белка при онкологической патологии. Этому вопросу мы уделили достаточное внимание выше.

Суммируя все сказанное, можно сделать вывод о том, что АФП через физиологические регуляторные механизмы блокирует развитие избыточного реагирования иммунной системы, угнетая избыточные и активируя угнетенные ее реакции. Как уже упоминалось, подобный двойной эффект наиболее реально может быть объяснен за счет контроля над переключением дифференцировки предшественников Т-хелперов в Th1 или Th2 со всеми вытекающими отсюда последствиями. Все это позволяет рассматривать АФП не в качестве иммуносупрессанта, а как «иммунорегулятор», нормализующий измененные функции иммунной системы.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Клинические примеры применения препарата альфа-фетопротеина человеческого при лечении онкологических заболеваний

ПРИМЕР 1

Больная П., 84 года.

Диагноз: рак кожи правой щеки III степени ($T_3N_1M_0$).

Жалобы на наличие опухоли на коже правой щеки, боли в области опухоли.

Гистологический диагноз: плоскоклеточный, с тенденцией к ороговению рак кожи правой щеки (рис. 2–4).

Локальный статус: на правой щеке определяется выступающее над поверхностью кожи опухолевое образование размерами 3,5 × 4,5 см в виде «цветной капусты» (рис. 1). Окружающие опухолевый очаг мягкие ткани отечные. Опухоль болезненна, спаяна с окружающими мягкими тканями правой щеки. Видимого прорастания опухоли в полость рта не наблюдается. Подчелюстные лимфатические узлы увеличены до размеров 1–2 см, при пальпации слегка болезненны. При цитологическом исследовании аспирата – метастаз плоскоклеточного рака в лимфоузел.

Вследствие запущенности процесса близкофокусная лучевая терапия нецелесообразна, а гамма-терапия и операция Вапаха невозможны из-за возраста больной. По просьбе пациентки нами начато лечение препаратом АФП. Препарат вводился в дозе 4 мкг/кг внутривенно один раз в сутки в течение 60 дней. Дополнительные лечебные мероприятия не проводились.

Лечение сопровождалось этапным патогистологическим исследованием биоптатов опухоли. Динамика и исходные данные микро- и макроскопической картины опухоли показаны в серии иллюстраций (рис. 1–14).

В течение первой недели лечения были отмечены следующие явления. Марлевая салфетка, прикрывавшая опухоль, обильно пропитывалась серозным отделяемым. Ощущался резкий, зловонный запах некротических тканей. На поверхности опухоли определялся лизис и исчезновение поверхностного слоя клеток, похожего на некротический струп. Поверхность опухоли слегка кровоточила по типу «кровяной росы». Субъективно больная отметила уменьшение локальных болей.

В ходе последующего наблюдения (30–60 дней лечения) отмечалась позитивная динамика, характеризовавшаяся постепенным лизисом опухолевой ткани. Опухоль стала заметно уменьшаться, уплощаться (рис. 5, 8). Отечность окружающих тканей исчезла. Субъективно больная отметила значительное уменьшение болевого синдрома.

После проведенного лечения визуально опухоль не определялась (рис. 11). При выполнении этапного патогистологического исследования биоптатов из зоны локализации опухолевого очага выявить злокачественные клетки не удалось. Кожа имела обычные для нее в данном возрасте характеристики (рис. 11–14).

Непосредственный результат лечения расценен как полный эффект.

Рис. 1. **Больная П., вид опухоли кожи до начала лечения**

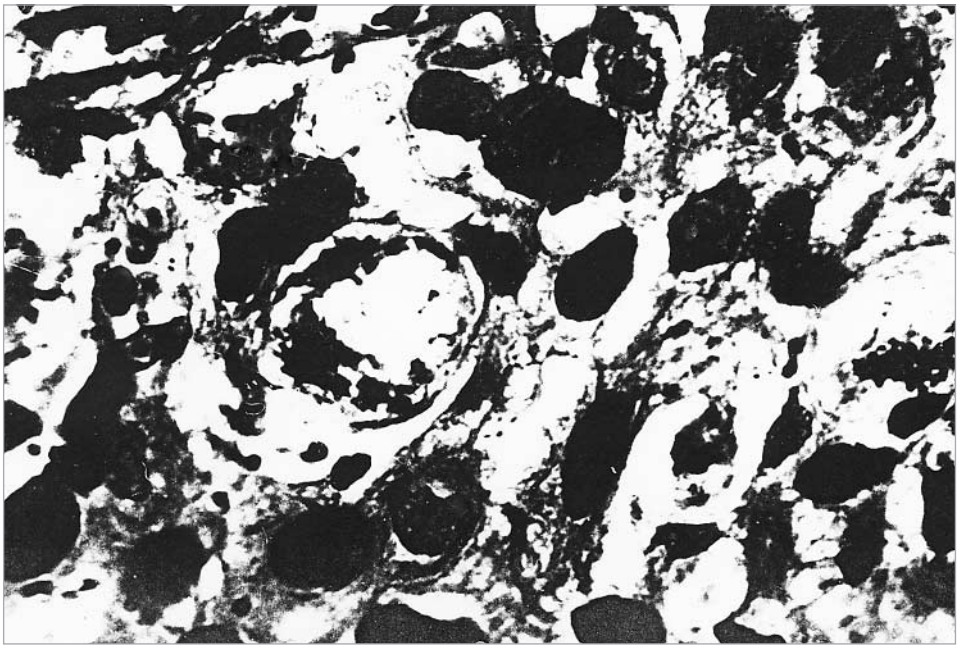


Рис. 2. **Больная П. Микроскопическая картина до начала лечения. Плоскоклеточный, с тенденцией к ороговению рак, раковая «жемчужина». Увеличение × 500. Окрашивание: гематоксилин, эозин**

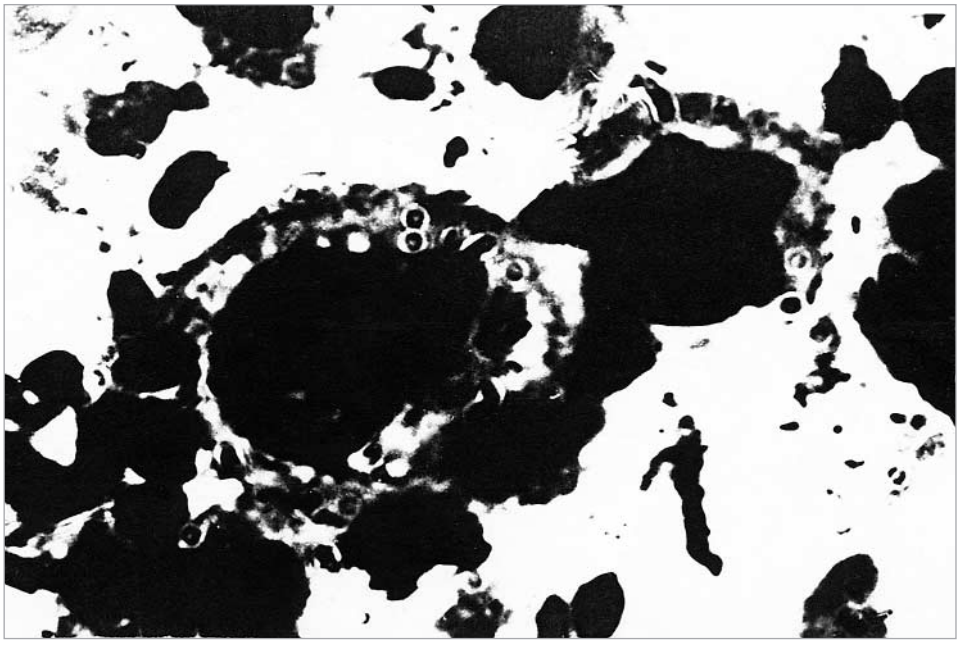


Рис. 3. **Больная П. Микроскопическая картина до лечения. Плоскоклеточный, с тенденцией к ороговению рак, раковая «жемчужина». Увеличение × 800. Окрашивание: гематоксилин, эозин**

Рис. 4. **Больная П. Микроскопическая картина до лечения. Плоскоклеточный, с тенденцией к ороговению рак, незрелый кератиноцит. Увеличение × 800. Окрашивание: гематоксилин, эозин**

Рис. 5. **Больная П., вид опухоли кожи через 20 сут. лечения АФП**

Рис. 6. **Микроскопическая картина биоптата опухоли кожи больной П. через 20 сут. лечения АФП. Увеличение × 250. Окрашивание: гематоксилин, эозин. Уменьшение количества опухолевых клеток. Формирование нормального плоского эпителия**

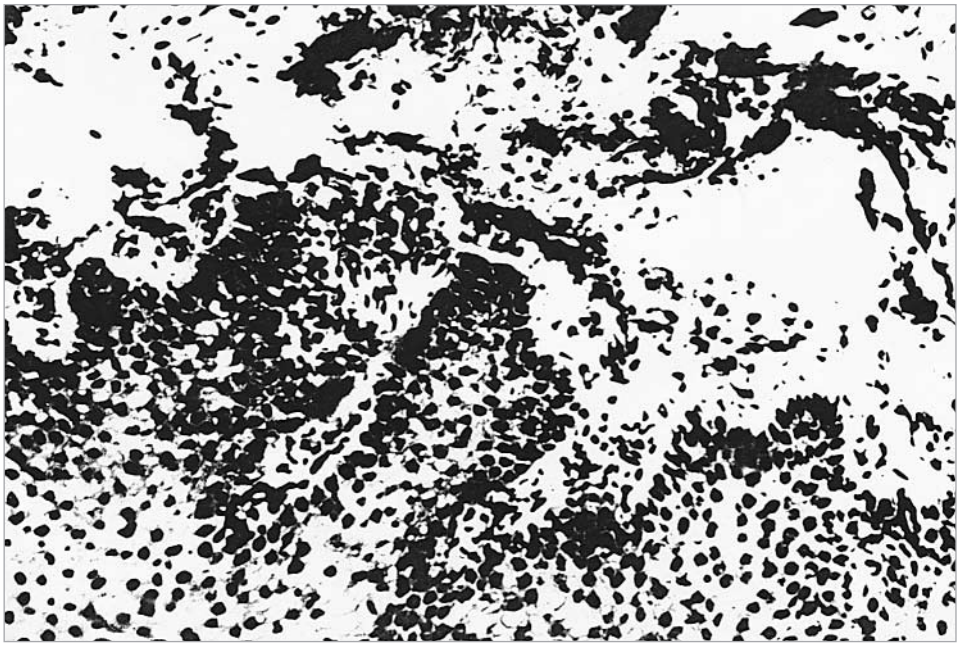


Рис. 7. **Микроскопическая картина биоптата опухоли кожи больной П. через 20 сут. лечения АФП. Увеличение × 250. Окрашивание: гематоксилин, эозин. Резкое уменьшение количества и «замуровывание» опухолевых клеток соединительной тканью**

Рис. 8. **Больная П., вид опухоли кожи через 40 сут. лечения АФП**

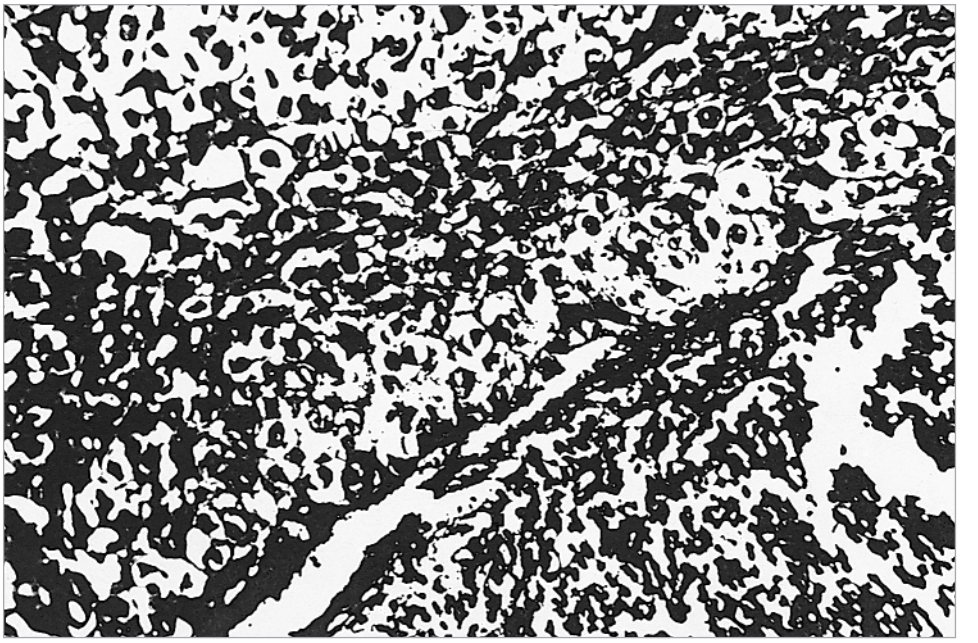


Рис. 9. **Микроскопическая картина биоптата опухоли кожи больной П. через 40 сут. лечения АФП. Увеличение × 250. Окрашивание: гематоксилин, эозин. На фоне нормального плоского эпителия – единичные опухолевые клетки**

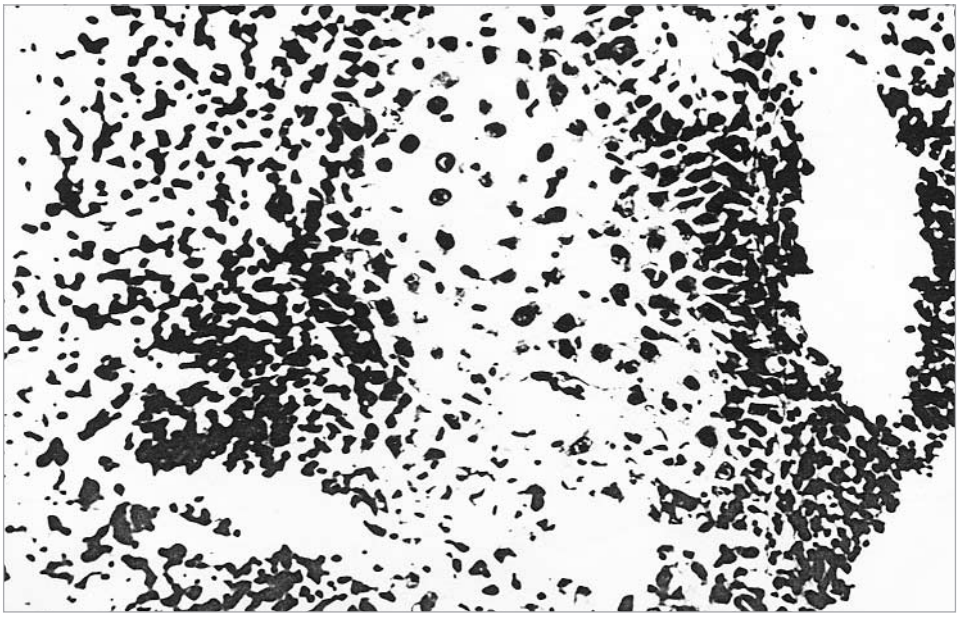


Рис. 10. **Микроскопическая картина биоптата опухоли кожи больной П. через 40 сут. лечения АФП. Увеличение × 250. Окрашивание: гематоксилин, эозин. В наблюдаемом участке ткани – картина нормального плоского эпителия**

Рис. 11. **Больная П., вид опухоли через 60 сут. лечения АФП (полная резорбция)**

Рис. 12. **Больная П., вид опухоли через 60 сут. после окончания лечения АФП**

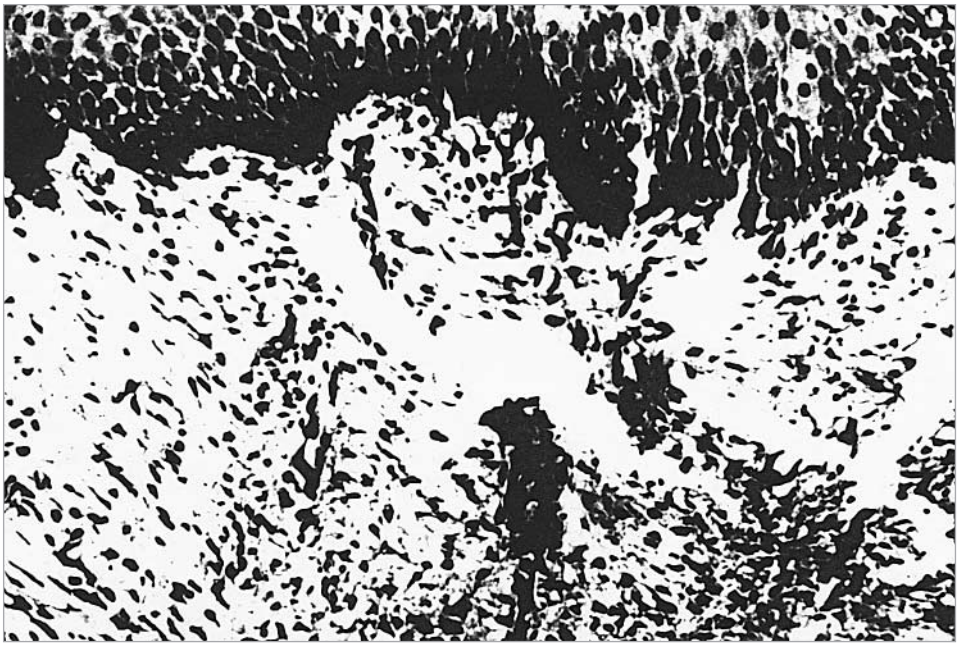


Рис. 13. **Микроскопическая картина биоптата из места локализации опухоли кожи больной П. через 60 сут. лечения АФП. Увеличение × 250. Гематоксилин, эозин. Определяются слои здоровой кожи (эпидерма, дерма, базальная мембрана)**

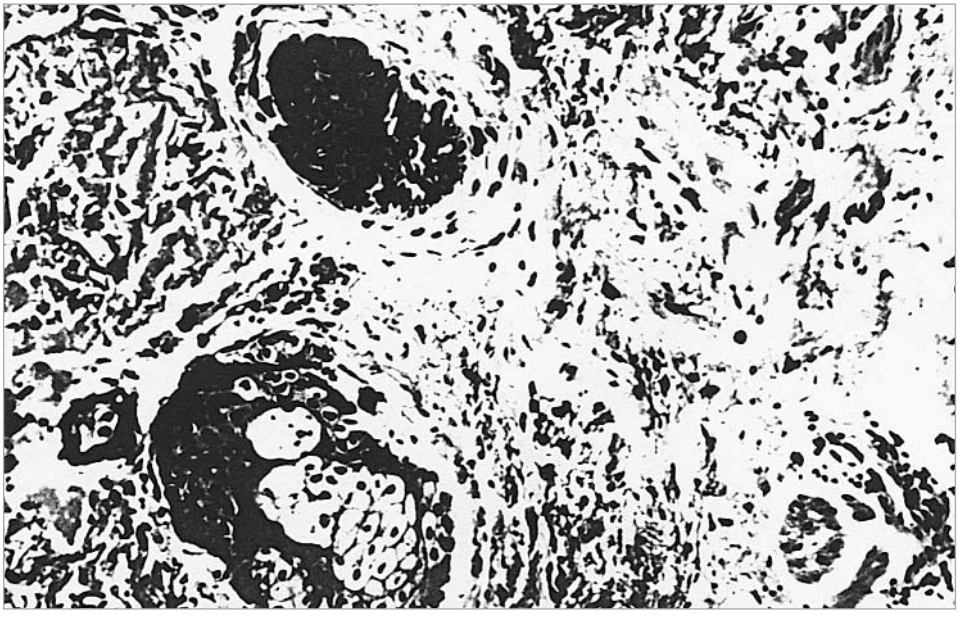


Рис. 14. **Микроскопическая картина биоптата из места локализации опухоли кожи больной П. через 60 сут. после окончания лечения АФП. Определяются дериваты кожи (волосяной мешочек, сальная железа)**

ПРИМЕР 2

Больная Т., 39 лет.

Диагноз: рак левой почки.

Из анамнеза: больная была радикально прооперирована: выполнена лапаротомия, чрезбрюшинная левосторонняя нефрэктомия. Гистологический диагноз: гипернефроидная аденокарцинома почки. Выписана под наблюдение онколога. Лучевая и химиотерапия не проводились.

Через 5 лет на УЗИ органов брюшной полости обнаружены очаговые образования в печени, наличие которых подтверждено данными компьютерной томографии. Лапаротомия: в ложе удаленной левой почки обнаружен конгломерат 10 × 8 × 6 см, связанный интимно с брюшной аортой; в воротах селезенки – увеличенные лимфоузлы. В V, VI, VII сегментах печени – множественные метастатические очаги. Решением консилиума больная признана неоперабельной, операция завершена взятием тканевого материала на гистологичекое исследование. Гистологическое заключение: гипернефроидный рак. Клинический диагноз: рецидив рака левой почки, метастазы в печени, спаечная болезнь брюшной полости (рис. 15), клиническая группа IV.

Больная выписана из стационара для проведения симптоматической терапии. Лучевая и химиотерапия не проводились.

С учетом бесперспективности терапии известными методами лечения, по настоятельной просьбе больной и родственников и при положительном решении консилиума специалистов начато лечение препаратом АФП (внутривенно 4 мкг/кг один раз в сутки в течение 42 дней). Терапия больной начата на фоне выраженной астенизации, отсутствия аппетита, нарушения биохимических показателей, высокого СОЭ. Из вспомогательных методов лечения использованы витаминотерапия, антибиотикотерапия, инфузия солевых растворов и аминокислот.

В ходе лечения самочувствие больной улучшалось. Край печени, выступавший из-под реберной дуги на 3 см, пришел в норму. Увеличенная до 56 см селезенка уменьшилась до 35 см. Опухолевые образования в ложе левой почки уменьшились с 6 × 5 до 5,3 × 4,8 см, превратившись в фиброзное образование через некротические изменения. Метастатические очаги в печени в динамике резко уменьшились вследствие распада (рис. 16) и в конечном итоге исчезли с образованием мелких кальцификатов (рис. 17). У больной в ходе лечения нормализовались биохимические показатели крови. Через 6 недель больная была выписана из клиники в удовлетворительном состоянии под наблюдение онколога.

Непосредственный результат лечения – полный эффект.

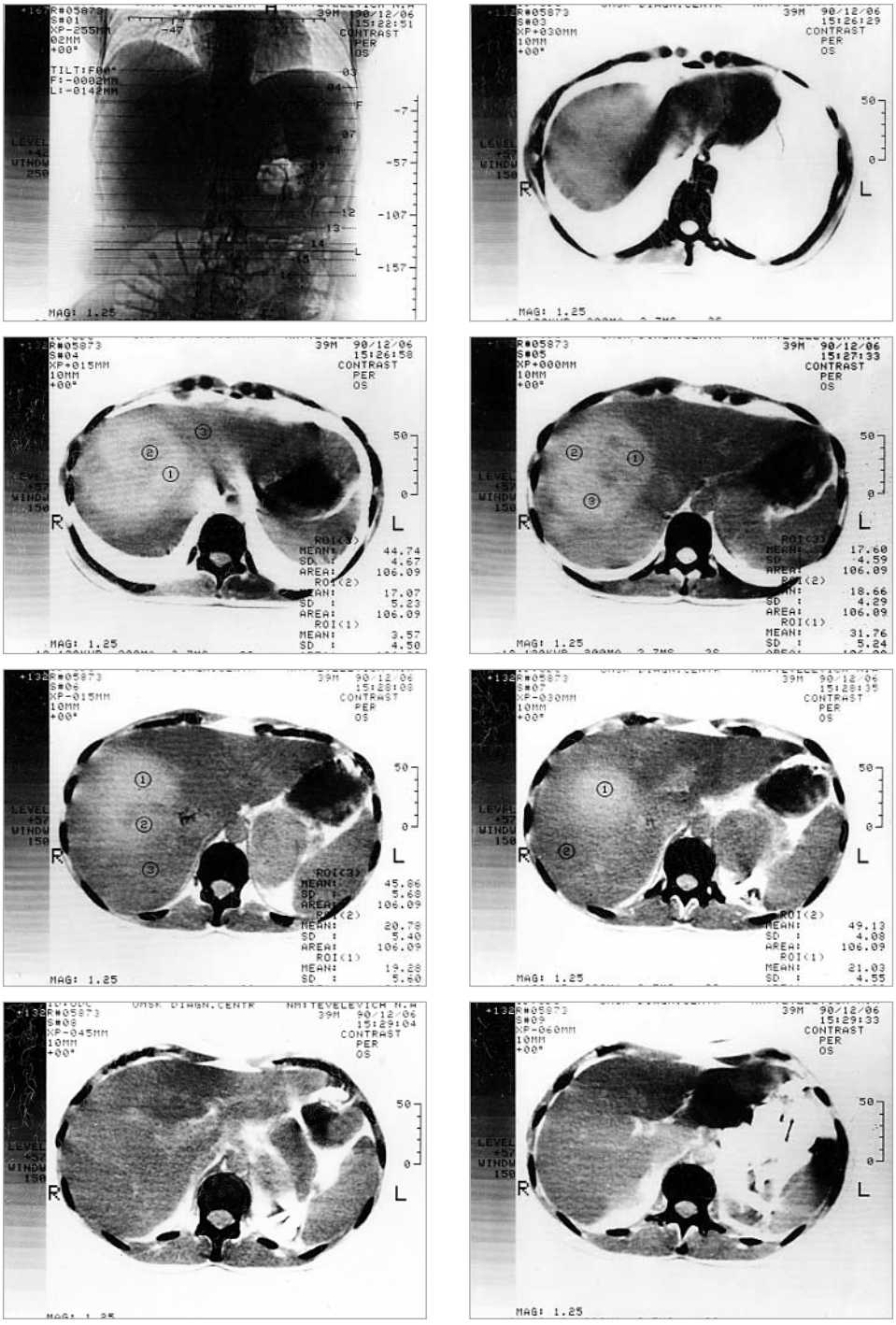


Рис. 15. **Томография (позитив) больной Т. до лечения. Рецидив опухоли в ложе левой почки, метастазы в V, VI, VII сегментах печени**

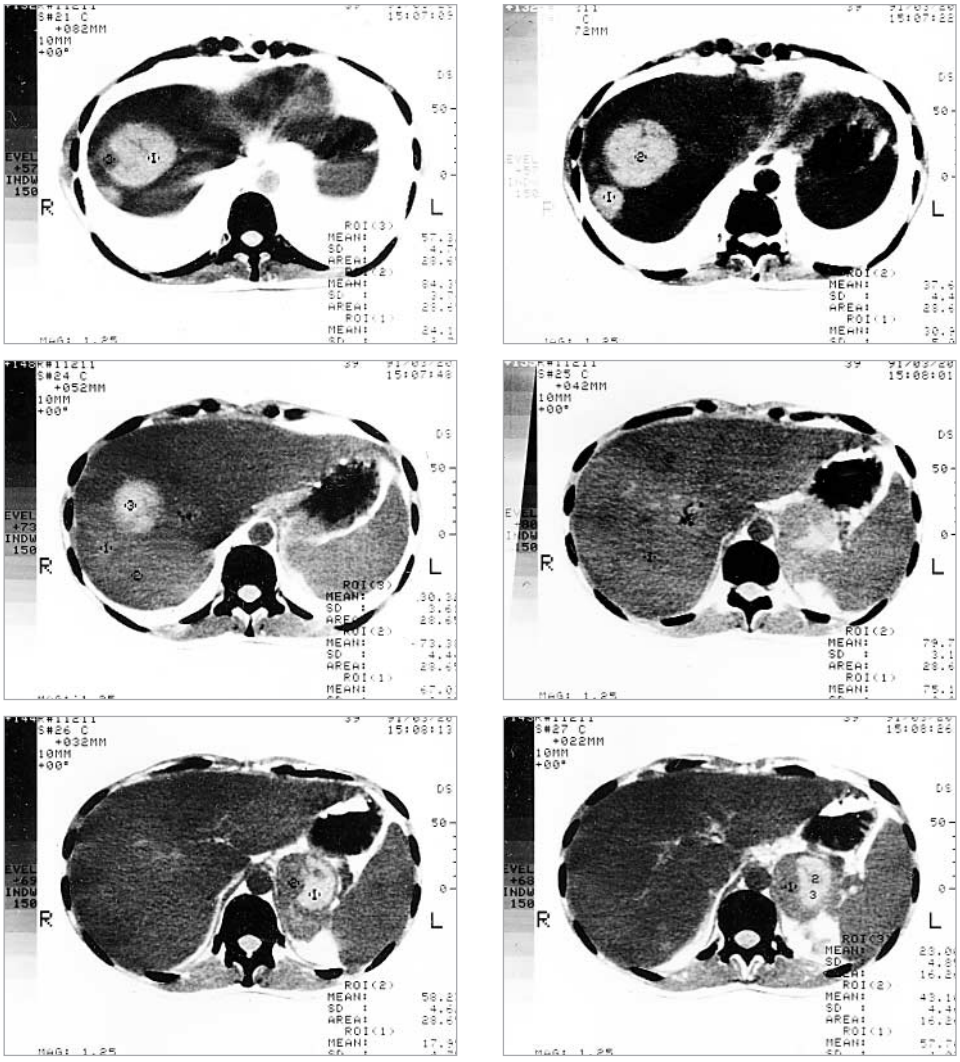


Рис. 16. **Томография (позитив) больной Т. через 20 сут. терапии АФП. Рецидив опухоли в ложе левой почки и метастатические очаги в печени некротизированы и представлены жидкостными образованиями**

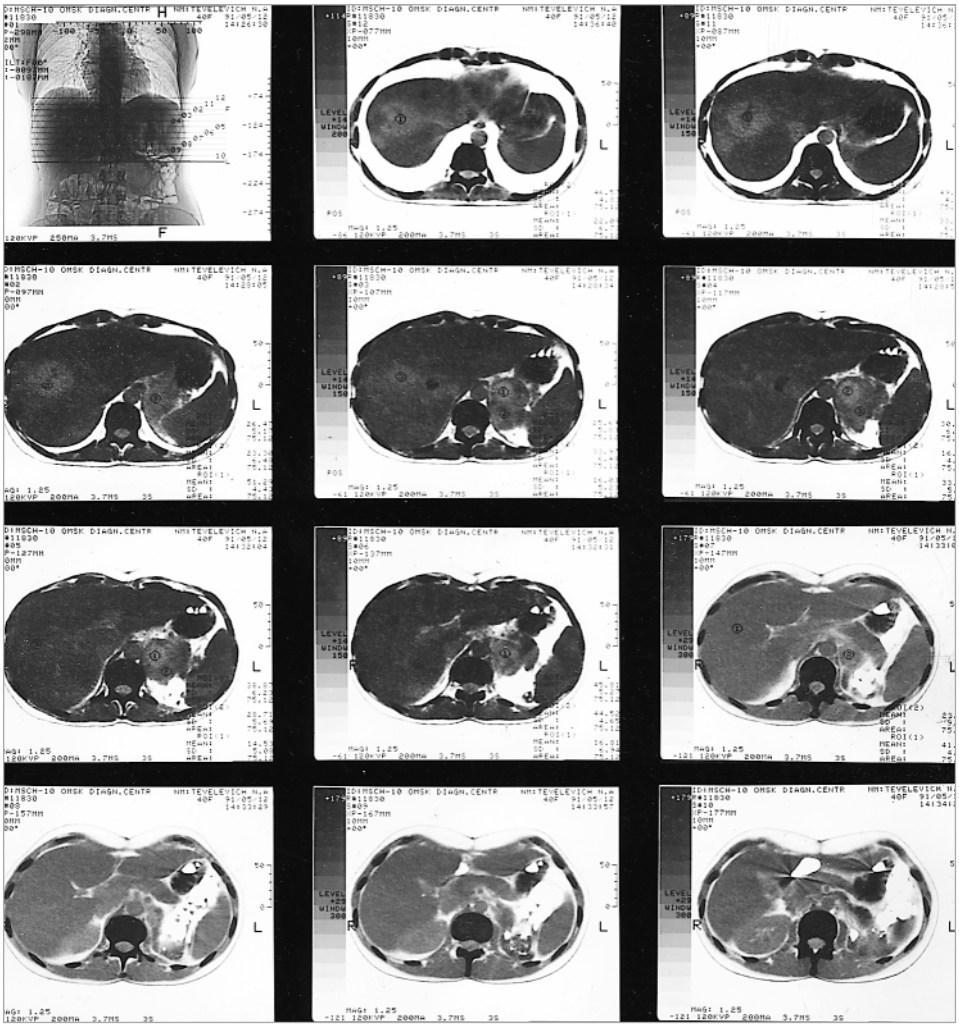


Рис. 17. **Томография (позитив) больной Т. через 42 дня терапии АФП. Кальцификация и исчезновение очагов опухолевого роста в ложе левой почки и печени**

ПРИМЕР 3

Больная З., 33 года, поступила переводом из специализированного гематологического отделения для лечения АФП ввиду неэффективности химиотерапии.

Диагноз при поступлении: острый монобластный лейкоз, алейкемический моноклональный вариант.

Для лечения больной использовали препарат АФП (4 мкг/кг внутривенно один раз в сутки в течение 4 недель). Симптомов интоксикации и аллергии не было. Вспомогательное лечение: витаминотерапия, инфузионная терапия.

До начала терапии величина поражения костного мозга бластными клетками составляла 75%. По окончании лечения результаты лабораторных, клинических и морфологических исследований позволили сделать однозначный вывод о регрессии процесса. Исследование пунктатов и трепанобиопсий костного мозга показал, что процент бластных клеток постоянно снижался. Через один месяц лечения зафиксирована нормализация морфологического состава миелограмм и трепанобиопсий, отмечено восстановление всех показателей периферической крови до нормы. Больная выписана из клиники в удовлетворительном состоянии.

Непосредственный результат лечения – полная ремиссия.

ПРИМЕР 4

Больная Л., 54 года.

Из анамнеза: случайно выявлена лейкопения в анализах крови, в связи с чем больная госпитализирована в гематологическое отделение. В пунктате и трепанате костного мозга обнаружены изменения, характерные для острого миеломонобластного лейкоза, подтвержденного цитохимическими исследованиями. Проведено три курса химиотерапии по схеме «7 + 3», которые сопровождались явлениями миелодепрессии и последующей ремиссией. Во время проведения очередного курса полихимиотерапии в НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова произошла токсическая остановка сердца, клиническая смерть. Реанимация, постреанимационная болезнь, рецидив заболевания. Проведено лечение малыми дозами цитозара, профилактика нейролейкемии метотрексатом.

На момент поступления при исследовании костного мозга обнаружено появление миелобластов в виде скоплений (гнезд), а местами и диффузно.

Больной предложена химиотерапия, но ввиду серьезной сопутствующей патологии и на основании просьб больной и родственников консилиумом специалистов принято решено провести курс лечения препаратом АФП (4 мкг/кг внутривенно один раз в сутки в течение 30 дней).

Курс терапии протекал без симптомов интоксикации, аллергических реакций не было.

Через месяц лечения при исследовании костного мозга на месте «расцветающих» очагов бластных клеток выявлен очаговый миелофиброз с отсутствием бластных форм клеток. Больная в удовлетворительном состоянии выписана из клиники под наблюдение гематолога.

Непосредственный результат лечения – полная ремиссия.

ПРИМЕР 5

Больная Ю., 52 года.

Диагноз: рак правой молочной железы ($T_3N_1M_0$).

Жалобы на наличие плотного болезненного опухолевого образования размерами 6 × 8 см в верхних квадрантах правой молочной железы. В подмышечной области справа определяется увеличенный до 2 см плотный лимфоузел.

Цитологически установлен диагноз: рак молочной железы (рис. 18, 19).

Больная категорически отказалась от оперативного лечения, лучевой и химиотерапии.

Данные лабораторных анализов и специальных методов обследования: карциноэмбриональный антиген 7,2 нг/мл (норма 0–2,5 нг/мл), СА 19-9 – 84,35 Е/мл (норма 0–37 Е/мл).

При рентгенологическом обследовании (маммография) в правой молочной железе, в центральном и верхненаружном квадрантах, выявлено узловое образование с неровными контурами, размером 5,7 × 4,2 см. Справа, в аксиллярной области, определяется плотный лимфоузел диаметром 1,5 см.

По настоятельной просьбе больной ей начато лечение препаратом АФП (4 мкг/кг внутривенно один раз в сутки в течение 60 дней).

После первых введений больная отмечала усиление болевых ощущений в местах локализации опухолевых очагов. Через 1,5–2 ч после каждого введения вслед за усилением болей отмечалась умеренная гипертермия тела (до 37,9 °С).

В ходе лечения у больной наблюдалась положительная динамика, заключавшаяся в размягчении основного опухолевого узла в правой молочной железе; в исчезновении симптома «лимонной корочки», наблюдавшегося ранее; в уменьшении подмышечного лимфатического узла справа.

Ультразвуковое исследование выявило следующую картину: в наружных отделах правой молочной железы определяется участок фиброза неправильной (звездчатой) формы – 2,4 × 2,3 см, с нечеткими контурами неоднородной структуры; периферические лимфоузлы не определяются. По данным маммографии также отмечается положительная динамика.

Проведенное через 2 месяца терапии клиническое и специальное обследование опухолевых очагов не выявило. Контрольная маммография в правой молочной железе опухолевых образований не показала. Карциноэмбриональный антиген – 1,29 нг/мл (норма). СА 19-9 – 13,71 Ед/мл (норма). После лечения из места локализации ранее выявлявшегося опухолевого очага и лимфоузла трижды взята пункционная биопсия.

Заключение: в поле зрения клеточный некротический детрит, клетки с пикнотическими гиперхромными ядрами и коллабированной цитоплазмой, некротические клетки (рис. 20).

Непосредственный результат лечения – полный эффект.

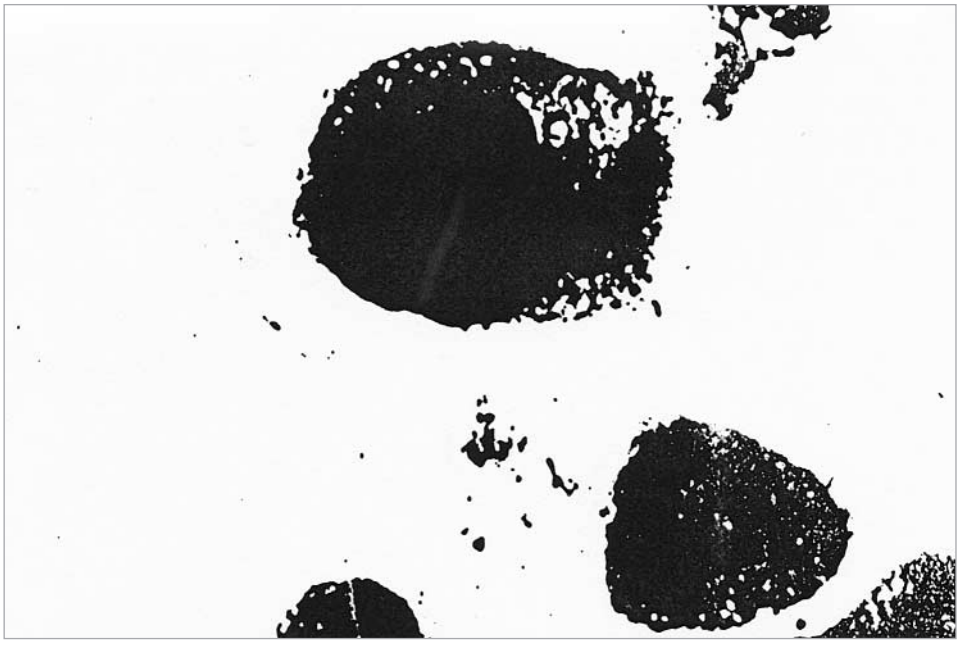


Рис 18. **Больная Ю. Микроскопическая картина до лечения АФП. Увеличение × 800. Окрашивание: гематоксилин, эозин. Группа опухолевых клеток с крупными округлыми гиперхромными ядрами и слабо представленной цитоплазмой**

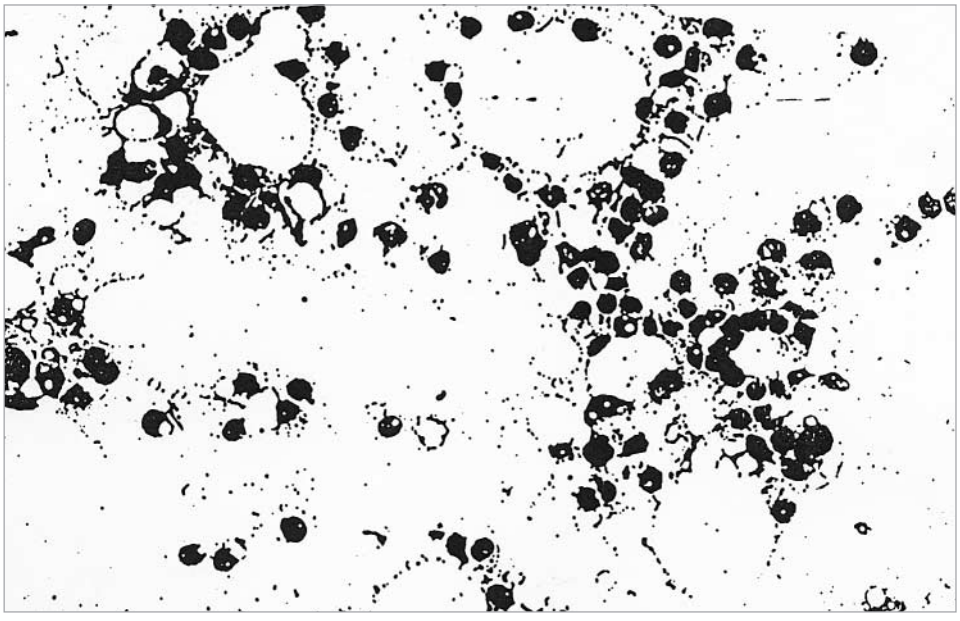


Рис 19. **Больная Ю. Микроскопическая картина до лечения АФП. Увеличение × 250. Окрашивание: гематоксилин, эозин. Клеточный полиморфизм, тяжи атипичных клеток с гиперхромными ядрами**

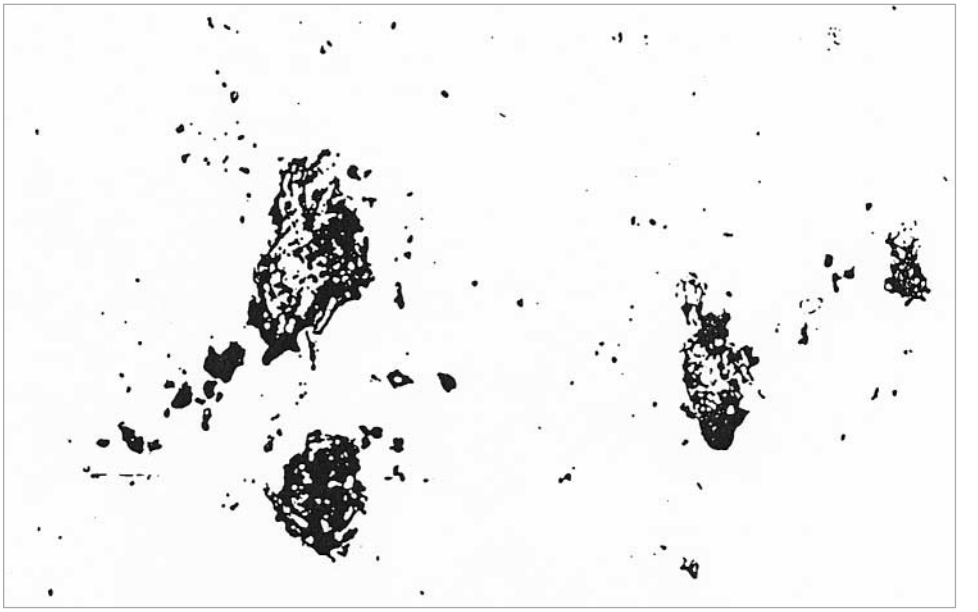


Рис. 20. **Больная Ю. Микроскопическая картина после проведенного лечения АФП. Увеличение × 800. Окрашивание: гематоксилин, эозин. Видны клеточный детрит, клетки с пикнотическими гиперхромными ядрами и коллабированной цитоплазмой в состоянии некробиоза**

ПРИМЕР 6

Больной А., 56 лет.

Диагноз: рак левого легкого ($T_3N_2M_1$), состояние после радикальной пульмонэктомии слева, метастаз в мягкие ткани в области проекции пятого ребра слева, синдром Ляриша.

Жалобы на наличие опухолевого образования слева, в области пятого ребра, по ходу операционного рубца. Жалобы на одышку, слабость и быструю утомляемость, на боли в мышцах ног при ходьбе (через 100–150 м), на головокружение и головные боли при незначительной физической нагрузке.

При осмотре больного слева, в области пятого ребра, определяется болезненное образование хрящевой плотности размером 12 × 8 см, спаянное с ребром. Цитологическое заключение по аспирационной биопсии: злокачественная дермоидная карцинома (рис. 21).

По настоятельной просьбе больного ему начато лечение препаратом АФП (4 мкг/кг внутривенно один раз в сутки в течение 45 дней).

Терапия сопровождалась болевыми ощущениями в месте локализации метастатического очага. Через 1–1,5 часа после введения препарата возникала гипертермия тела до 39,1 °С, были выражены явления интоксикации вследствие некроза опухолевых клеток.

В ходе лечения отмечена положительная динамика. Через месяц лечения опухолевый очаг уменьшился в размерах в четыре раза, стал мягким, подвижным. Через полтора месяца терапии опухолевый очаг не определялся, исчезли болевые ощущения, явления интоксикации и гипертермические реакции, несмотря на продолжение лечения. Из места локализации опухоли взята операционная биопсия. Опухолевой ткани не выявлено (рис. 22). В ходе лечения у больного исчезли явления синдрома Ляриша. Больной без признаков опухолевого роста выписан домой.

Непосредственный результат лечения – полный эффект.

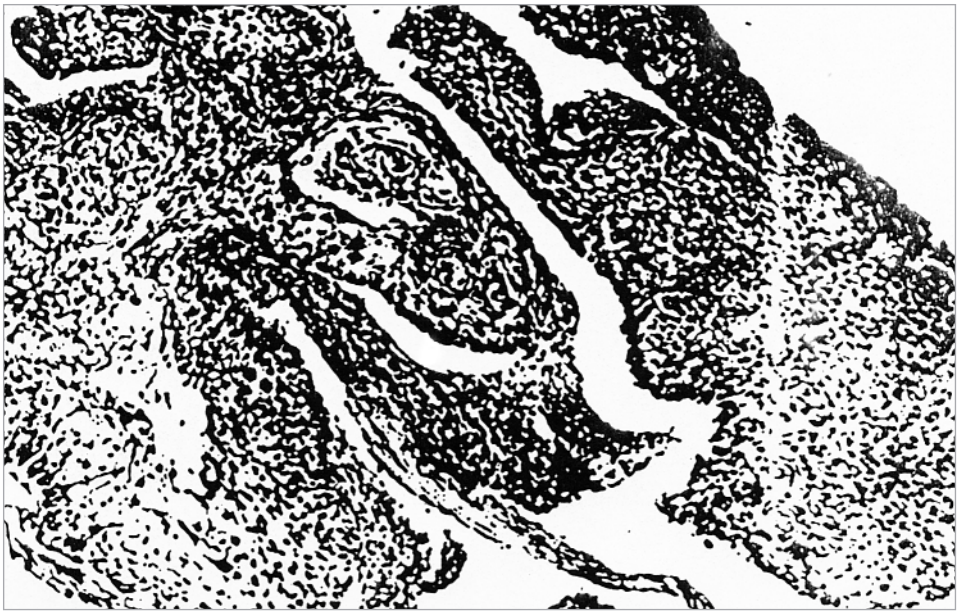


Рис. 21. **Больной А. Микроскопическая картина до лечения. Увеличение × 120. Окрашивание: гематоксилин, эозин. Метаплазия, «жемчужины» из плоских эпителиальных опухолевых клеток**

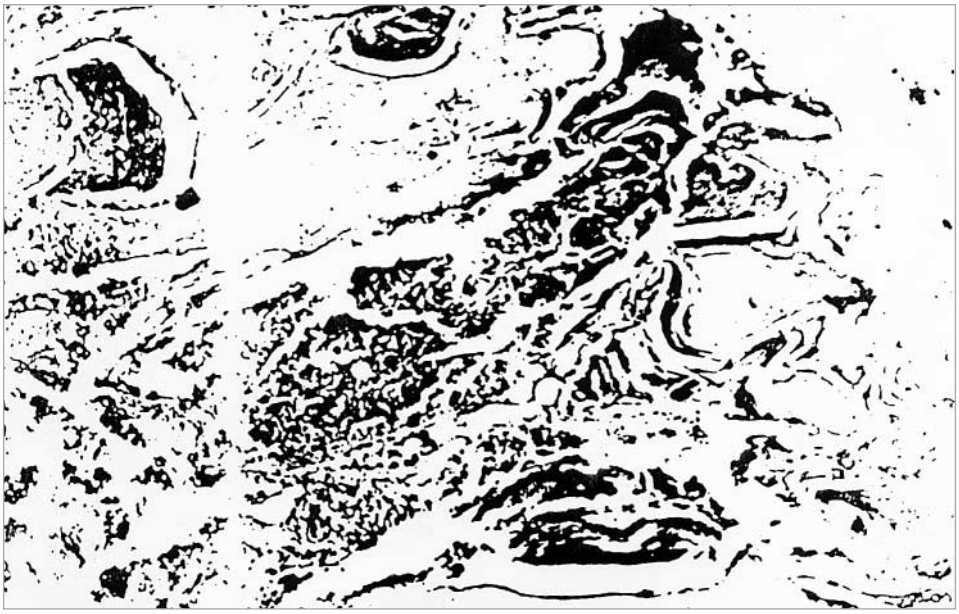


Рис. 22. **Больной А. Микроскопическая картина биоптата из места локализации опухоли после лечения АФП. Увеличение × 120. Окрашивание: гематоксилин, эозин. Фибриноидный некроз ткани**

ПРИМЕР 7

Больной К., 72 лет.

Диагноз: рак верхнеампулярного отдела прямой кишки (умереннодифференцированная аденокарцинома, $T_4N_1M_1$), метастазы в печени, состояние после передней резекции прямой кишки.

Больной поступил в плановом порядке для проведения специфической иммунотерапии препаратом АФП.

Жалобы при поступлении на слабость, недомогание, потерю массы тела (4 кг), боли и ощущение тяжести в области печени.

При исследовании органов брюшной полости и органов забрюшинного пространства методом компьютерной томографии в левой и правой долях, а также в воротах печени определяются множественные очаги от 2 до 3,6 см в диаметре, негомогенные по структуре (рис. 23). Заключение: признаки метастатического поражения печени. При ультразвуковом исследовании в V, VI, VII сегментах печени лоцируются округлые образования с нечеткими, неровными контурами, умеренной плотности (рис. 24). Заключение: множественные очаговые поражения печени.

Иммунограмма: выявлена выраженная дисфункция Т-клеточного звена; нарушено соотношение Т-хелперов/Т-супрессоров с преобладанием малодифференцированных тимоцитов (снижена экспрессия В-клеточных рецепторов); определяется гиперактивация В-клеточного звена с гипер-γ-глобулинемией и повышенным уровнем ЦИК; наблюдается дисфункция фагоцитарного звена по абсолютным показателям. Заключение: вторичный комбинированный иммунодефицит второй степени с поликлональной γ–глобулинемией. Онкомаркеры: АФП – 1,68 Ед/мл; РЭА – 413,3 нг/мл (–); ХГЧ – 2,46 МЕ/мл.

Больному назначена иммунотерапия препаратом АФП (4 мкг/кг внутривенно один раз в сутки в течение 2 месяцев). Терапия сопровождения: инфузионные препараты, витаминотерапия, пробиотики.

Через месяц лечения на серии контрольных компьютерных томограмм органов брюшной полости и органов забрюшинного пространства в сравнении с предыдущим исследованием (до лечения) выявлено следующее: количество очагов в печени не увеличилось, отмечается снижение их плотности с 21 до 5–13 ед. (соответствует плотности жидкости, тканевого детрита, гноя). Заключение: признаки некроза опухолевых очагов (рис. 25). При контрольном ультразвуковом обследовании отмечается явное изменение структуры очаговых образований правой доли печени, преобладание в них жидкостных компонентов. Заключение: признаки некроза опухолевых очагов (рис. 26).

Через 2 месяца лечения при контрольном обследовании получены следующие результаты. На серии компьютерных томограмм органов брюшной полости и органов забрюшинного пространства по сравнению с предыдущим исследованием отмечается положительная динамика: уменьшились размеры очагов в паренхиме печени, структура их стала более гомогенной вследствие исчезновения жидкостного компонента (равномерное накопление контраста, по-видимому, за счет репаративной регенерации печеночной ткани). Заключение: признаки регресса метастатических очагов в печени (рис. 27). Данные УЗИ органов брюшной полости выявили положительную динамику, заключающуюся в исчезновении жидкости и полостей в паренхиме печени. Участки, где ранее лоцировались очаги метастатического роста, практически не отличаются от нормальной окружающей печеночной ткани (рис. 28). Структурный регресс опухолевых очагов в печени определяется преобладанием в них фиброзной ткани и кальцинатов. При кон-

трольном исследовании РЭА уровень последнего находился в пределах физиологических значений – 6,14 нг/мл.

Учитывая вышеизложенное, можно заключить: у больного по основному заболеванию достигнут частичный эффект, верифицированный специальными инструментальными и лабораторными методами. Больной с увеличением массы тела на 2,2 кг выписан под динамическое наблюдение.

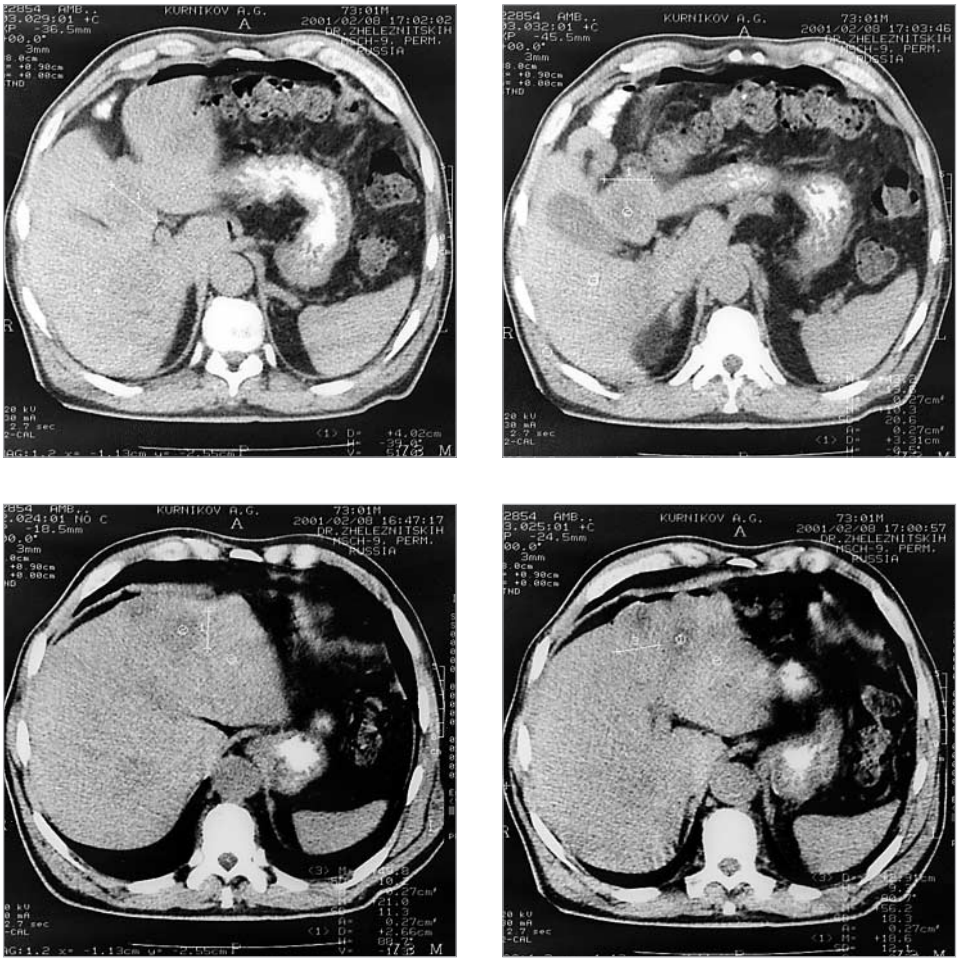


Рис. 23. **Томограмма органов брюшной полости больного К. до начала лечения препаратом АФП. Множественные метастазы левой и правой долей печени**

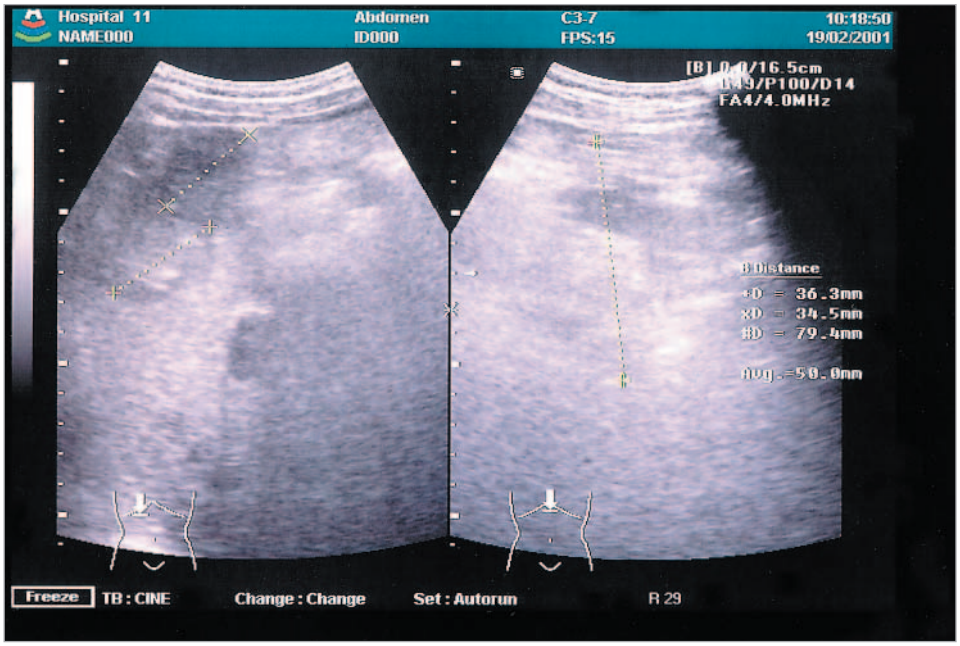


Рис. 24. **УЗИ органов брюшной полости больного К. до начала лечения препаратом АФП. Метастазы в V, VI, VII сегментах печени**

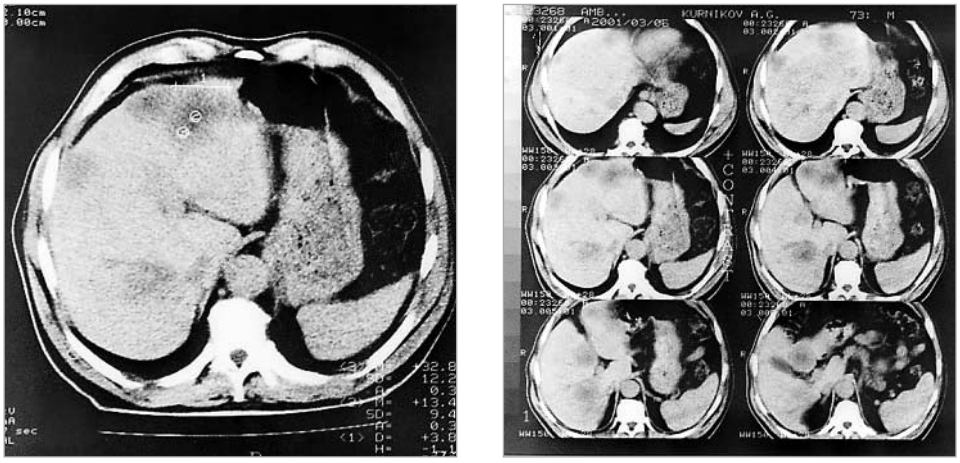
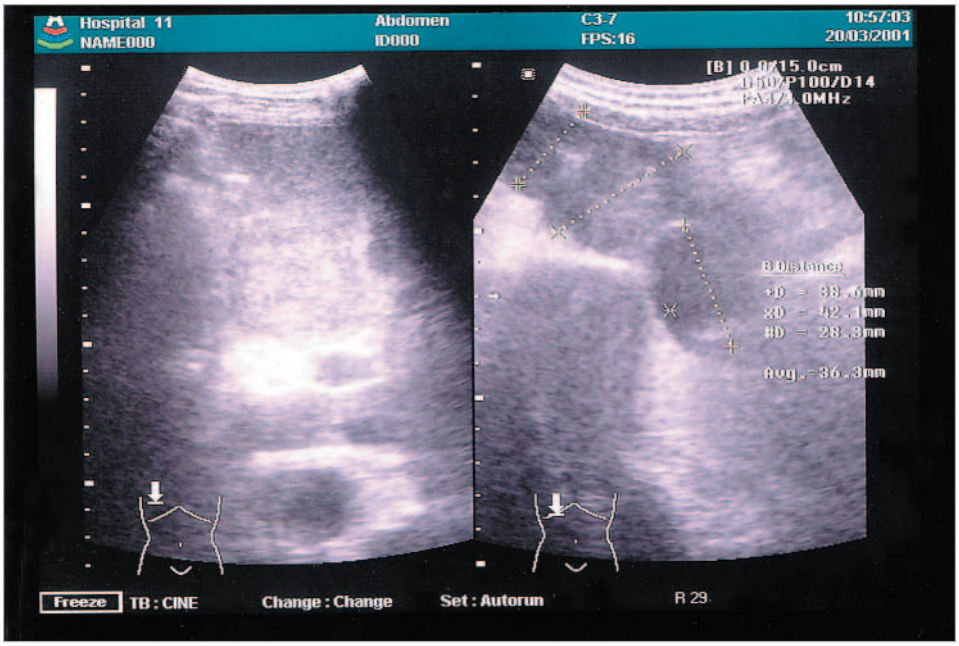


Рис. 25. **Томограмма органов брюшной полости больного К. через месяц лечения препаратом АФП. Некроз метастатических очагов в печени**



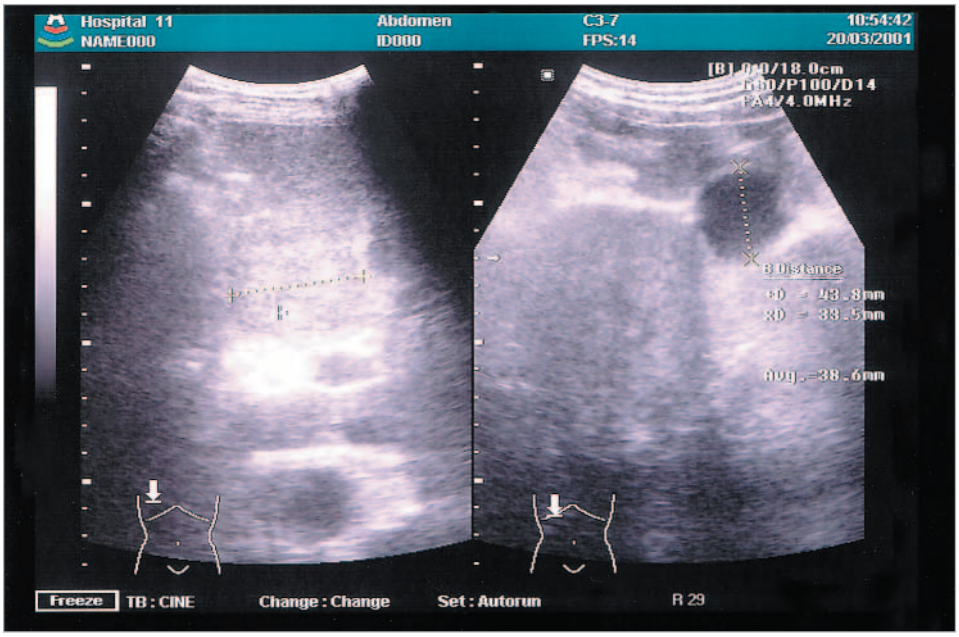


Рис. 26. **УЗИ органов брюшной полости больного К. через месяц лечения препаратом АФП. Некроз метастатических очагов в печени**

Рис. 27. **Томограмма органов брюшной полости больного К. через 2 месяца лечения препаратом АФП. Реверсия метастатических очагов в печени с признаками репаративной регенерации**

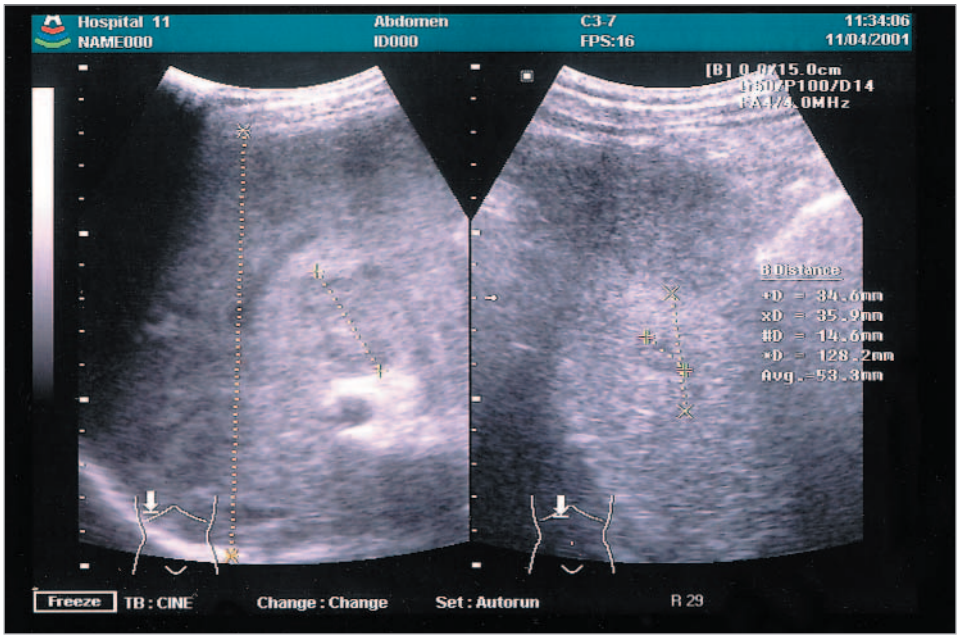


Рис. 28. **УЗИ органов брюшной полости больного К. через 2 месяца лечения препаратом АФП. Структурный регресс опухолевых очагов в печени с преобладанием в них фибриноидной ткани и кальцинатов**

ПРИМЕР 8

Больной Л., 41 год.

Диагноз: рак желудка ($T_3N_1M_1$).

Больному проведено хирургическое лечение: гастрэктомия с анастомозом по Ру.

Гистологический диагноз: перстневидно-клеточный, высокодифференцированный рак желудка.

В раннем послеоперационном периоде у больного развилась спаечная болезнь брюшной полости, странгуляционная острая высокая кишечная непроходимость. Выполнены лапаротомия, рассечение спаек, резекция участка тонкой кишки, тонкотонкокишечный анастомоз. Повторное оперативное вмешательство осложнилось развитием диффузного гнойного перитонита. Произведены лапаротомия, санация и дренирование брюшной полости. Через 2 месяца после купирования послеоперационных осложнений при контрольном рентгенографическом обследовании у больного обнаружен очаг в нижней доле правого легкого (рис. 29). По данным биопсийного исследования тканевого материала очаг оценен как метастаз перстневидно-клеточного рака желудка.

С учетом состояния больного (потеря массы тела 32%) и тяжести перенесенных операций решено в качестве противоопухолевой терапии провести лечение препаратом АФП (4 мкг/кг внутривенно один раз в сутки в течение 30 дней).

Через 6 дней терапии больной почувствовал усиливающиеся боли в нижней доле правого легкого. Контрольная рентгенограмма через 14 дней лечения АФП показала опухолевый очаг в состоянии некротического распада с элементами абсцедирования и образованием полости в центральной части (рис. 30). Назначена адекватная антибактериальная терапия, лечение препаратом АФП продолжено.

Через месяц лечения ранее выявляемый опухолевый очаг в нижней доле правого легкого был представлен мелкими кальцинатами (рис. 31). Больной в удовлетворительном состоянии, с увеличением массы тела на 10% выписан под динамическое наблюдение.

Непосредственный результат лечения – полный эффект.

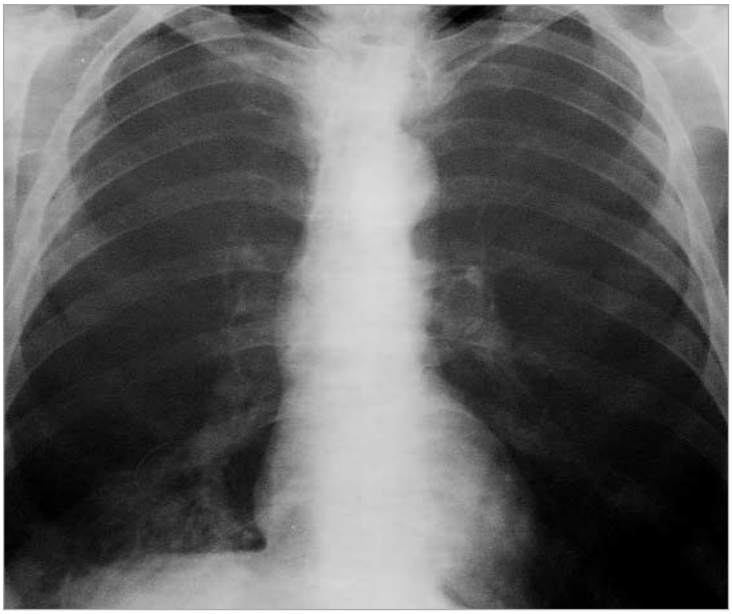


Рис. 29. **Рентгенограмма органов грудной полости больного Л. до лечения препаратом АФП. В нижней доле правого легкого определяется метастатический очаг рака желудка**

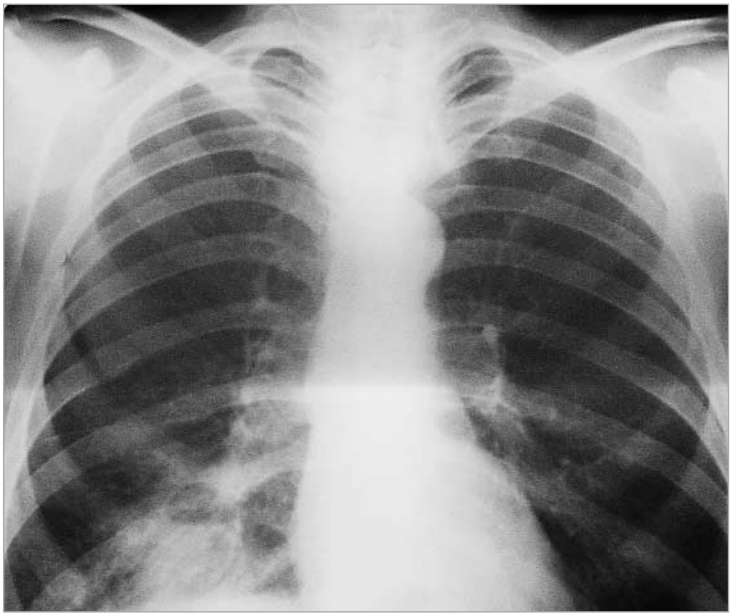


Рис. 30. **Рентгенограмма органов грудной полости больного Л. через 14 сут. лечения препаратом АФП. В нижней доле правого легкого определяется метастатический очаг рака желудка в состоянии некротического распада с элементами абсцедирования и образованием полости в центральной части**

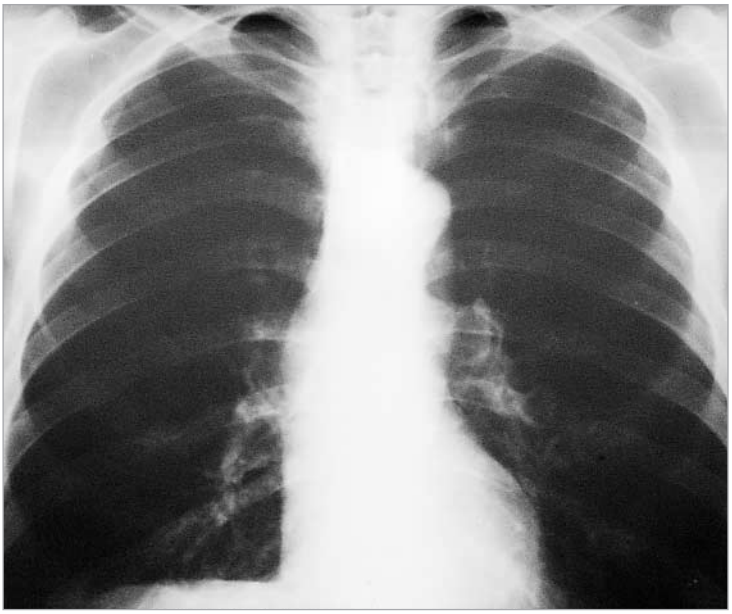


Рис. 31. **Рентгенограмма органов грудной полости больного Л. через 30 сут. лечения препаратом АФП. В нижней доле правого легкого определяются мелкие кальцинаты**

ПРИМЕР 9

Больной М., 49 лет.

Диагноз: эпидермоидный, умереннодифференцированный рак дна полости рта справа ($T_3N_1M_0$), состояние после лучевой терапии.

Больной прошел курс лучевой терапии на первичный очаг, подчелюстную область и область шеи справа – без видимой динамики. Через 3 месяца после лучевого лечения у больного при осмотре в области дна полости рта справа определялся очаг опухолевого роста, инфильтрирующий ткани дна полости рта и корень языка, размерами 2,5 × 2,0 см; обнаружены увеличенные лимфатические узлы в подчелюстной и шейной области справа. Компьютерная томография подчелюстной области справа выявила опухоль размерами 2,8 × 2,4 см (рис. 32). Общее состояние по индексу Карновского – 2 балла.

Было решено провести лечение с использованием препарата АФП (4 мкг/кг внутривенно один раз в сутки в течение 30 дней).

В период проведения лечения больной в первые сутки после введения АФП отметил резкое усиление болевых ощущений в местах локализации очагов опухолевого роста (дно полости рта, подчелюстная область и область шеи справа). Болевой синдром сохранялся в течение первых 2 недель лечения и постепенно купировался к моменту окончания курса лечения. Во время проведения лечения было отмечено усиленное отделение некротических опухолевых масс из области дна полости рта. В динамике ранее увеличенные и плотные лимфоузлы становились мягкими, уменьшались в размерах и к окончанию курса лечения приобрели обычную плотность и величину.

При контрольном обследовании после проведенного лечения препаратом АФП компьютерная томография не показала ранее выявлявшегося очага опухолевого роста в области дна полости рта (рис. 33). Гистологическое исследование ткани из места локализации опухоли обнаружило появление соединительной ткани с единичными фибробластами, исчезновение опухолевой ткани, IV степень терапевтического патоморфоза. Индекс Карновского на момент осмотра – 0 баллов. Непосредственный результат лечения – полный эффект.

Через 1,5 года больной обратился повторно. При осмотре – рецидив заболевания. Жалобы на наличие опухоли в области дна полости рта справа. В течение 2 месяцев проведено 2 курса полихимиотерапии. На фоне лечения отмечен прогресс заболевания. Больной стал жаловаться на выраженную одышку при легкой физической нагрузке, а затем и в покое. Индекс Карновского – 3 балла.

По данным рентгенологического исследования выявлен тотальный ателектаз левого легкого (рис. 34), вызванный (данные бронхоскопии) обтурацией опухолью левого главного бронха III степени. Гистологический диагноз: метастаз плоскоклеточного неороговевающего умереннодифференцированного рака.

Данные компьютерной томографии в области дна полости рта и корня языка справа позволили определить опухоль объемом 8 куб. см. Гистологическое заключение: неороговевающий умереннодифференцированный рак дна полости рта.

Ввиду отсутствия эффекта от проведенной полихимиотерапии и ранее достигнутого положительного результата при лечении препаратом АФП решено повторно провести курс терапии с применением альфа-фетопротеина (4 мкг/кг внутривенно один раз в сутки). Курс лечения составил 60 дней и сопровождался усилением болей в местах локализации опухолевых очагов, подъемом температуры тела до фибрильных значений, обильным отделением некротического детрита из бронхов и ротовой полости, а также умеренными геморрагиями. К моменту окончания лечения перечисленные явления исчезли.

При контрольном рентгенологическом обследовании после проведенного лечения ателектаз левого легкого не определялся (рис. 35), в месте локализации опухоли дна полости рта выявлен тканевый дефект в виде полости (рис. 36). Бронхоскопия: слева верхнедолевые бронхи дифференцируются до 5-го порядка, имеется расширение сегментарных шпор, инфильтративных изменений слизистой не отмечено; на задней стенке левого главного бронха, в нижней трети, и на задней стенке нижнедолевого бронха слева видна рубцовая ткань, ранее выявлявшаяся опухоль не определяется, устья базальных бронхов свободны. Выполнена браш-биопсия, опухолевых клеток не обнаружено.

На компьютерной томограмме после проведенного лечения АФП в области дна полости рта и нижней челюсти слева, в месте бывшей локализации опухоли, определяется полость (рис. 37). Гистологическое исследование тканей стенок и дна полости не дало положительного результата на наличие опухолевых клеток. Больной в удовлетворительном состоянии (индекс Карновского – 1 балл) выписан из клиники под динамическое наблюдение.

Непосредственный результат лечения – полный эффект.

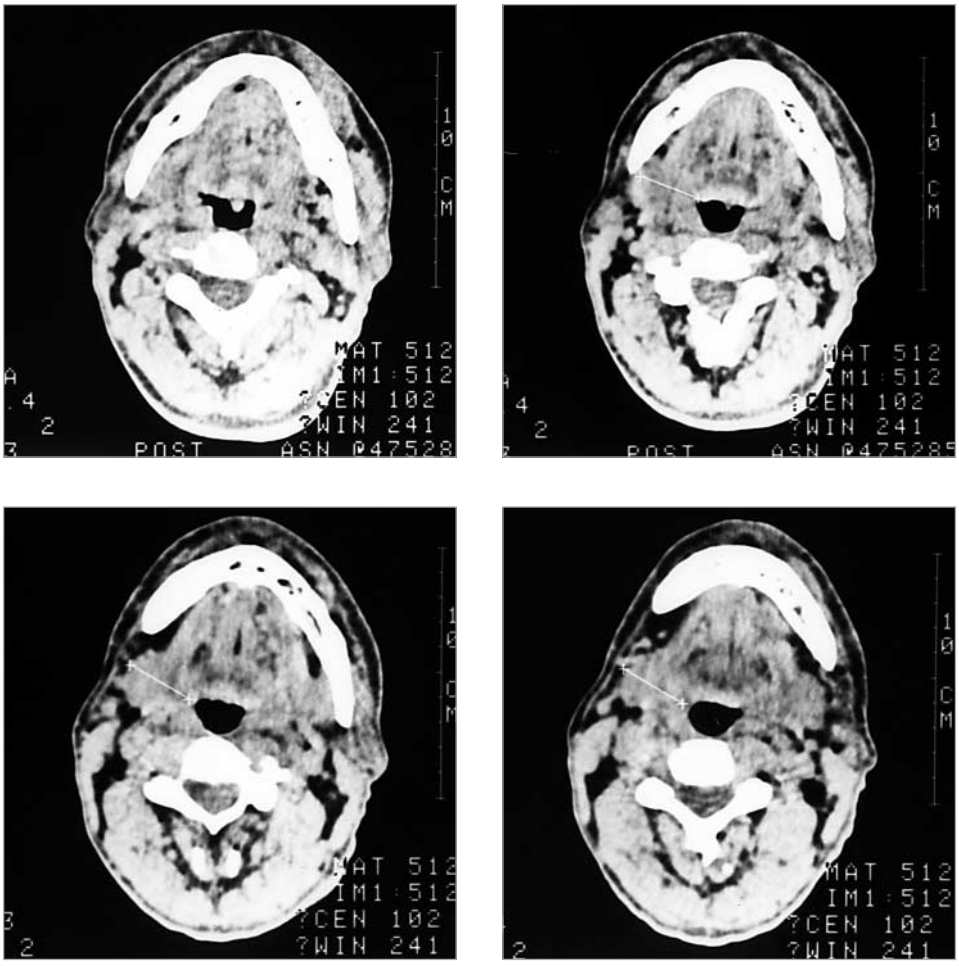


Рис. 32. **Томограмма больного М. до начала лечения препаратом АФП. Опухоль дна полости рта**

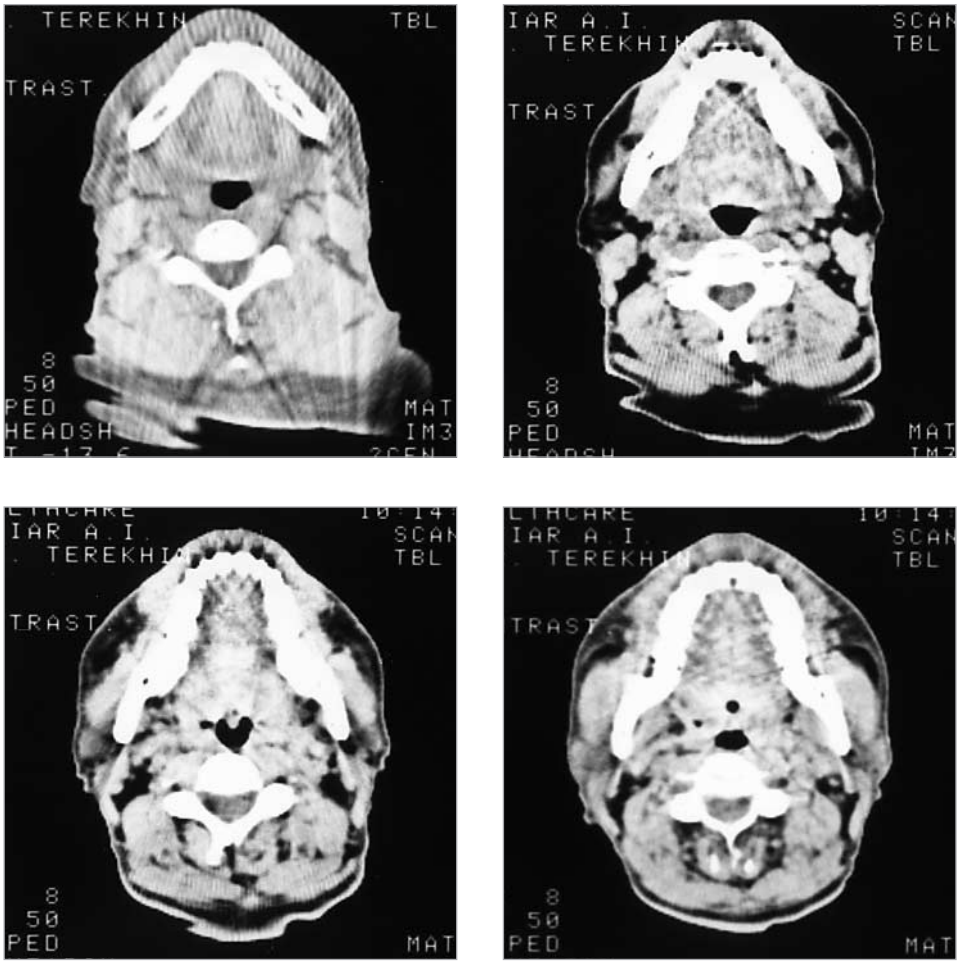


Рис. 33. **Томограмма больного М. через месяц лечения препаратом АФП. Опухоль в области дна полости рта не определяется**

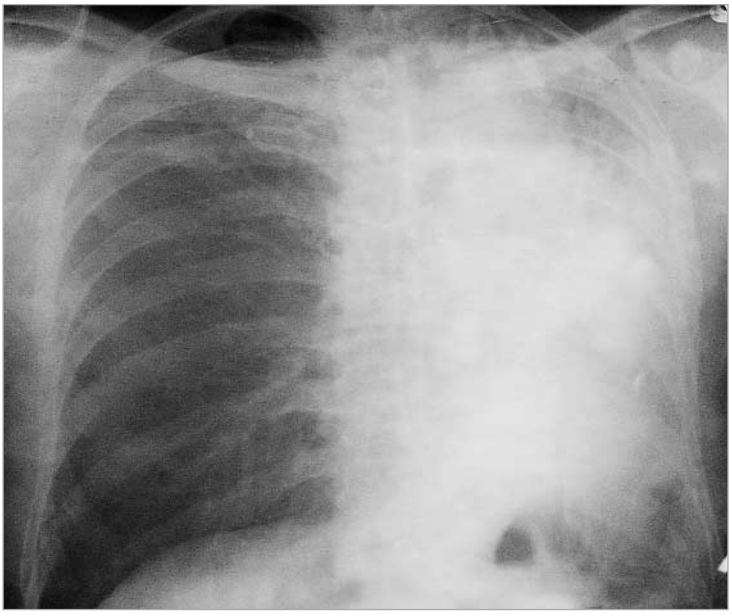


Рис. 34. **Рентгенограмма больного М. до начала лечения препаратом АФП. Ателектаз левого легкого**

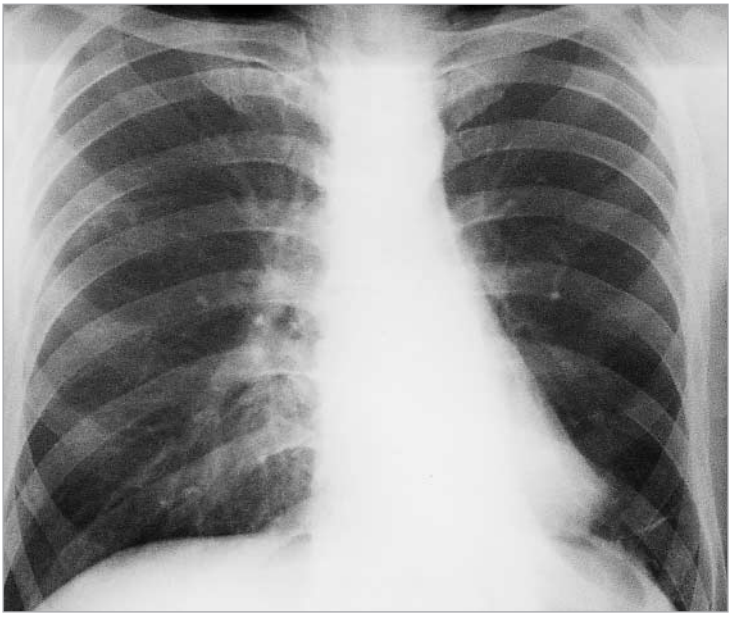


Рис. 35. **Рентгенограмма больного М. после лечения препаратом АФП. Ателектаз левого легкого купирован**

Рис 36. **Рентгенограмма больного М. после проведенного лечения препаратом АФП. Тканевый дефект в области дна полости рта и нижней челюсти справа, на месте локализации опухоли**

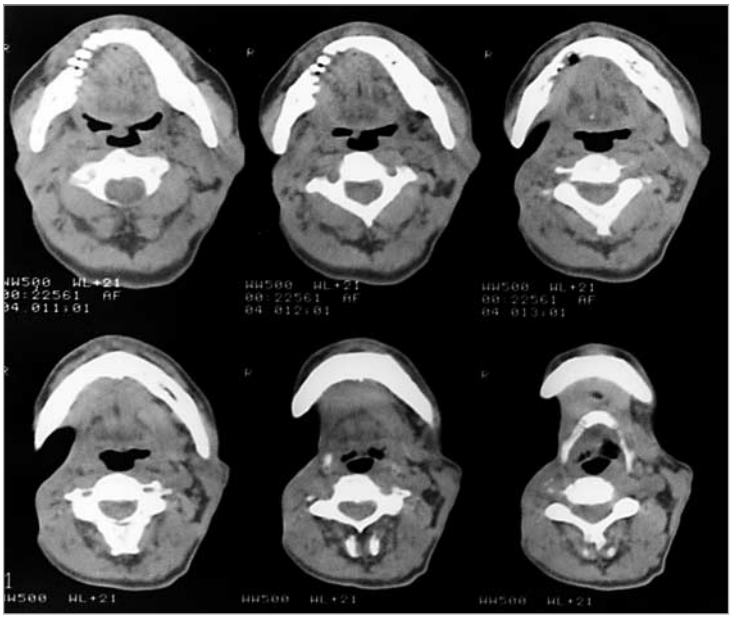


Рис 37. **Томограмма больного М. после проведенного лечения препаратом АФП. Тканевый дефект в области дна полости рта и нижней челюсти справа, на месте локализации опухоли**

ПРИМЕР 10

Больной Т., 54 года.

Диагноз: плоскоклеточный неороговевающий дифференцированный (эпидермоидный, высокодифференцированный) рак дна полости рта ($T_3N_0M_0$).

Гистологическое исследование: в ткани из язвы дна полости рта определяется рост атипического плоского эпителия в виде узких тяжей без ороговения, строма базальная, имеется инвазивное врастание в мышцу. Заключение: плоскоклеточный дифференцированный рак дна полости рта.

Индекс Карновского – 2 балла. При осмотре полости рта в области дна слева определяется язва размерами 3,0 × 2,5 см с переходом на боковую поверхность языка и инфильтрацией краевой зоны на 1 см. Группы регионарных лимфатических узлов не увеличены. Специфическое лечение не проводилось.

Больному начата терапия препаратом АФП (4 мкг/кг внутривенно один раз в сутки в течение 45 дней).

В процессе лечения в течение первых 7 дней больной отметил резкое усиление, а в последующие дни – уменьшение и полное исчезновение болевых ощущений в месте локализации опухоли. В период проведения терапии отмечено обильное отделение некротических опухолевых масс из очага злокачественного роста.

Через 45 дней лечения при осмотре больного зафиксировано следующее: индекс Карновского – 1 балл; регионарные лимфоузлы не увеличены; на слизистой дна полости рта слева имеется тканевый дефект (полость) размерами 1,5 × 0,7 см, дно и стенки его чистые. Выполнена биопсия тканей полости.

Гистологическое заключение: дифференцированный рак дна полости рта с явлениями тотального некроза (в исследуемом материале опухолевые клетки обнаружены на небольшом участке на краю изучаемого кусочка ткани), III степень терапевтического патоморфоза.

Непосредственный результат лечения – частичный эффект (60% регрессии опухоли).

ПРИМЕР 11

Больной Л., 63 года.

Диагноз: эпидермоидный рак боковой поверхности языка слева ($T_2N_1M_0$).

Гистологическое исследование: инвазивный высокодифференцированный эпидермоидный рак языка. Индекс Карновского – 1 балл.

Специфическое лечение не проводилось. Решено провести курс терапии препаратом АФП (4 мкг/кг внутривенно один раз в сутки в течение 37 дней).

Перед началом терапии произведен осмотр пациента с измерением опухолевого образования (размеры составили 2,5 х 2,5 см). В подчелюстной области справа определялся плотный увеличенный лимфоузел диаметром 0,8 см.

В период проведения лечения больной отметил усиление болевых ощущений в области локализации опухоли на языке и в подчелюстной области справа (проекция увеличенного лимфоузла). Через 37 дней лечения размеры опухоли на боковой поверхности языка составили 2,0 × 1,0 см, лимфоузел в подчелюстной области справа не определялся.

Контрольное гистологическое исследование ткани из опухоли языка: в исследуемом материале определялись дистрофические изменения эпидермального эпителия, об-

наруживались единичные гигантские клетки, наблюдались некрозы стромы и паренхимы опухоли (I степень терапевтического патоморфоза).

Непосредственный результат лечения – частичный эффект (48,2% резорбции опухоли).

ПРИМЕР 12

Больная М., 62 года.

Диагноз: эпидермоидный рак боковой поверхности языка справа ($T_3N_0M_0$).

Г**истологическое заключение:** инвазивный дифференцированный эпидермоидный рак языка. Индекс Карновского – 1 балл.

Специфическое лечение не проводилось. Решено провести курс терапии препаратом АФП (4 мкг/кг внутривенно один раз в сутки в течение 60 дней).

Перед началом лечения размеры опухоли языка составляли 5,5 × 4,5 см. Опухоль инфильтрировала слизистый и мышечные слои, локализуясь в задней и средней трети боковой поверхности тела языка справа с переходом на дно полости рта.

В процессе лечения больная отметила умеренные покалывающие боли в месте локализации опухоли. В динамике наблюдения опухоль уменьшалась в размерах, подвижность языка увеличивалась. Через 60 дней лечения при контрольном обследовании проведен осмотр полости рта с забором опухолевой ткани на гистологическое исследование. Размеры опухоли составили 3,0 × 2,0 см.

Гистологическое заключение: в исследуемом материале определяются обширные поля некроза; незначительные скопления клеток атипического эпителия тотально инфильтрированы лейкоцитами; по всем полям определяются тяжи фиброзной ткани (II степень терапевтического патоморфоза).

Непосредственный результат лечения – частичный эффект (50% резорбции опухоли).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абашев И. М., Смирнов Г. А., Бурнашева Р. Х. Изменения показателей иммунитета у больных туберкулезом легких, осложненным хроническим бронхитом // Пробл. туберкулеза. 1985. № 11. С. 36–40.
2. Абелев Г. И. 25 лет изучения α-фетопротеина // Онтогенез. 1989. Т. 20, № 6. С. 607–615.
3. Абелев Г. И. Альфа-фетопротеин: биология, биохимия, молекулярная генетика // Иммунология. 1994. № 3. С. 4–9.
4. Абелев Г. И. Клеточные основы синтеза α-фетопротеина в нормальных и опухолевых тканях // Эксперим. онкол. 1979. Т. 1, № 1. С. 8–12.
5. Абелев Г. И. Сверхчувствительный радиоиммунодиффузионный метод определения антигенов // Бюл. эксп. биол. и мед. 1973. Т. 76, № 11. С. 122–125.
6. Абелев Г. И. Эктопическая продукция эмбриональных белков при опухолевом процессе // Биологические аспекты злокачественного роста. Таллин, 1977. С. 3–5.
7. Абелев Г. И. Эмбриональный сывороточный альфа-глобулин при злокачественных опухолях // Вестник АМН СССР. 1970. Т. 25, № 7. С. 49–57.
8. Абелев Г. И., Перова С. Д., Храмкова Н. И. и др. Эмбриональный сывороточный альфа-глобулин и его синтез перевиваемыми гепатомами мышей // Биохимия. 1963. Т. 28, вып. 4. С. 625–633.
9. Абелев Г. И., Цветкова В. С., Бирюлина Т. И. и др. Оценка применения высокочувствительных методов определения α-фетопротеина для диагностики гепатоцеллюлярного рака и тератобластом // Бюл. эксп. биол. и мед. 1971. Т. 62, № 4. С. 75–81.
10. Авдеев Г. И., Вядро М. М., Кадагидзе З. Г. Иммунотерапия опухолей // ВИНИТИ. Сер. Онкология. 1985. Т. 14. С. 11-18.
11. Авербах М. М. Иммуногенетика инфекционных заболеваний. М.: Медицина, 1985. С. 109–121.
12. Авербах М. М. Иммунологические аспекты легочной патологии. М.: Медицина, 1980. 267 с.
13. Авцын А. П., Шахламов В. А. Ультраструктурные основы патологии клетки. М.: Медицина, 1979. 319 с.
14. Адамович В. Н. Циркулирующие иммунные комплексы при различных заболеваниях легких // Сб. трудов Центр. НИИ туберкулеза. М., 1983. С. 74–76.
15. Адо А. Д. Вопросы общей нозологии. М.: Медицина, 1985. 240 с.
16. Александров В. Я. Реакция клетки на повреждающее воздействие // Природа. 1948. № 1. С. 24–26.
17. Алексеева О. Г. Иммунология профессиональных хронических бронхолегочных заболеваний. М.: Медицина, 1987. 224 с.
18. Алехин Д. И., Фокин А. А., Родионов С. Ю. Первый опыт применения альфафетопротеина у больных молодого возраста с дистальным поражением артерий конечностей // Неотложная хирургия заболеваний сердца и сосудов. Челябинск, 1997. С. 25–26.
19. Альперович Б. И. Хирургия печени (избранные главы). Томск: Изд-во ТГУ, 1983. 349 с.
20. Апросина З. Г., Серов В. В. Патогенез хронического гепатита В // Архив патологии. 2001. № 2. С. 58–62.

21. Арипова Т. У., Бобоев А. Т., Черегадаев А. Г., Разиков А. А. Иммунореабилитация больных атопической бронхиальной астмой на фоне комбинированной иммунотерапии // Иммунология. 1999. № 1. С. 57–59.
22. Аутеншлюс А. И., Иванова А. И., Столярова В. М., Стариков В. В. Влияние альфа-фетопротеина на некоторые физиологические показатели животных *in vitro* и на лимфоциты человека *in vitro* // 1-я Национальная конференция Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов «Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии». М., 1997. С. 638.
23. Аутеншлюс А. И., Родионов С. Ю., Пак Н. А. Исследование динамики некоторых показателей иммунного статуса онкологических больных в процессе терапии препаратами фетального происхождения // Материалы 1-го Международного симпозиума по трансплантации фетальных тканей человека. М., 1995. С. 111–113.
24. Аутеншлюс А. И., Столярова В. М., Семерников В. А. Антитела к гликопротеину *Bacillus megaterium H* у больных с онкологической и неонкологической патологией желудочно-кишечного тракта // Бюл. эксп. биол. и мед. 1994. Т. 119, № 5. С. 520–522.
25. Бабаян Э. А., Ульянова Г. А., Тихонова Ю. В. и др. Руководящие методические материалы по экспериментальному и клиническому изучению новых лекарственных средств. М., 1975. 128 с.
26. Балаболкин М. И. Эндокринология. М.: Медицина, 1989. С. 175–178.
27. Балынина Е. С. Изменения поведения как критерий токсического действия на животных химических агентов // Тез. докл. Всесоюз. учредит. конф. по токсикологии. М., 1980. С. 88.
28. Барышников А. Ю. Моноклональные антитела серии ИКО // Гематол. и трансфузиол. 1988. № 12. С. 15–20.
29. Барышников А. Ю. Моноклональные антитела серии ИКО к дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека // Гематол. и трансфузиол. 1990. № 8. С. 4–7.
30. Батрак С. П. Использование эмбриональных тканей в лечебных целях // Врачебное дело. 1971. № 10. С. 127–129.
31. Батрак Г. Е., Кудрин А. Н. Дозирование лекарственных средств экспериментальным животным. М.: Медицина, 1979. 167 с.
32. Бахуташвили В. И., Мерабишвили Д. Г., Гогиташвили Р. В. Изучение физико-химических и биологических свойств человеческого плацентарного интерферона // Вопр. вирусол. 1985. Т. 30, № 6. С. 693–697.
33. Беляков И. М., Земсков В. М. Изменение функциональной активности макрофагов при ожогах и ее коррекция нуклеинатом натрия // Иммунология. 1992. № 5. С. 33–35.
34. Беляков И. М., Ярилин А. А., Кузьменок О. И. Содержание сывороточного β1-тимозина и некоторые возможные механизмы формирования Т-клеточного иммунодефицита у больных ожоговой болезнью // Иммунология. 1993. № 3. С. 47–50.
35. Бенюш В. А. Участие полиплоидных клеток в процессе нормального роста печени крыс // Цитология. 1970. Т. 12, № 12. С. 1497–1505.

36. Билынский Б. Т., Володько Н. А., Шпарик Я. В. Иммунологические механизмы естественной противоопухолевой резистентности. Львов, 1989. 63 с.
37. Богомолец А. А. Диалектика и патология // Врачебное дело. 1931. № 7–8. С. 309–316.
38. Бондаренко А. Л. Иммунореактивность у больных гепатитом В // Вятский мед. вестник. 1999. № 2. С. 7–10.
39. Бондаренко А. Л. Иммунотропные средства и их применение при лечении вирусных гепатитов // Рос. мед. журнал. 1999. № 4. С. 52–55.
40. Бондаренко А. Л. Тималин в комплексной терапии больных гепатитом В // Иммунология. 2001. № 2. С. 42–45.
41. Брюнель А. Процесс лечения рака и приготовление продуктов, используемых для этого лечения. Патент на изобретение А 61 К 35/54 (Франция). 1979.
42. Буеверов А. О. Иммунологические механизмы повреждения печени // Рос. журн. гастроэнт., гепатол. и колопрокт. 1998. № 5. С. 18–21.
43. Буеверов А. О., Тихонина Е. В., Москалева Е. Ю. и др. Апоптоз лимфоцитов и гранулоцитов периферической крови при хронических HBV- и HCV-инфекциях // Рос. журн. гастроэнт., гепатол. и колопрокт. 2000. № 6. С. 33–36.
44. Васильев Н. В., Городилова В. В., Мандрик Э. В. Вопросы иммунологии опухолей. Томск, 1986. 240 с.
45. Васильев Н. В. Иммунологические аспекты экспериментальной терапии и профилактики рака. Томск, 1980. 54 с.
46. Васильев Н. В., Родионов С. Ю., Пак Н. А. Динамика некоторых иммунологических показателей онкологических больных в ходе лечения фетальным белком // Бюл. эксп. биол. и мед. 1997. № 5. С. 576–578.
47. Васильев Н. В. Актуальные вопросы клинической и экспериментальной онкологии. Томск, 1982. 268 с.
48. Величковский Б. Т. Новые представления о патогенезе профессиональных заболеваний легких пылевой этиологии // Пульмонология. 1995. № 1. С. 6–16.
49. Величковский Б. Т. Патогенез профессиональных заболеваний легких пылевой этиологии // Медицина труда и промышленная экология. 1994. № 5–6. С. 1–8.
50. Вельш У., Шторх Ф. Введение в цитологию и гистологию животных / Пер. с нем. / Под ред. С. Я. Залкинда. М.: Мир, 1976. 259 с.
51. Винницкий В. В. О природе толерантности организма к опухоли // Эксперим. онкол. 1981. № 2. С. 3–9.
52. Винницкий В. Б. Онкогерминативная гипотеза опухолевого роста // Эксперим. онкол. 1989. Т. 11, № 6. С. 59–66.
53. Вихрев Б. С., Бурмистров В. М. Ожоги: руководство для врачей. Л.: Медицина, 1981. 328 с.
54. Владимирская Е. Б., Масчан А. А., Румянцев А. Г. Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста // Гематол. и трансфузиол. 1997. № 5. С. 4–9.
55. Волегов А. И. Устойчивость организма к злокачественным опухолям. М.: Медицина, 1987. 230 с.
56. Волчек И. В., Сологуб Т. В., Белозерова Л. А. и др. Возможности использования неовира в программе индивидуальной терапии вирусных гепатитов С и В // Terra medica. 2000. № 1. С. 7–10.

57. Волянский Ю. Л., Колотова Т. Ю., Васильев Н. В. Молекулярные механизмы программированной клеточной гибели // Усп. совр. биол. 1994. Т. 114, вып. 6. С. 679–692.
58. Волянский Ю. Л., Телепнева Л. Г., Васильев Н. В. Анализ некоторых клинико-иммунологических феноменов с позиций предлагаемой модели антигенраспознающего комплекса Т-хелперов // Усп. совр. биол. 1994. Т. 114, вып. 2. С. 225–238.
59. Воронцова М. А. Значение общего и местного в регенерационном процессе. М.: Медицина, 1956. С. 27–30.
60. Воронцова М. А., Лиознер Л. Д. Регуляционная способность хвостовой почки у эмбрионов *Rana temporaria* // Докл. Академии наук СССР. 1946. Т. 52, № 8. С. 735–737.
61. Гавриш Т. В. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у подростков, больных бронхиальной астмой // Аллергология. 2000. № 4. С. 7–11.
62. Гацура В. В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. М.: Медицина, 1974. 142 с.
63. Георгиев Г. П., Ильин Ю. В., Рысков А. П. и др. Мобильные диспергированные генетические элементы эукариот и их возможное отношение к канцерогенезу // Генетика. 1981. Т. 17, № 2. С. 222–232.
64. Глейберман А. С. Синтез альфа-фетопротеина в первичной культуре взрослых гепатоцитов мыши // Бюл. эксп. биол. и мед. 1982. Т. 93, № 2. С. 55–58.
65. Глейберман А. С., Гальперина Т. Э., Староверов Д. Б. Торможение синтеза АФП во взрослых гепатоцитах мыши сульфатом декстрана *in vitro* и *in vivo* // Бюл. эксп. биол. и мед. 1987. Т. 103, № 4, С. 470–473.
66. Глинчиков В. В. К вопросу о возрастных особенностях регенерации кожи у млекопитающих // Радиоизотопные индикаторы. Труды Института экспериментальной медицины Академии медицинских наук СССР. 1959. С. 129–138.
67. Глушкова А. Н. Иммунология автономного поведения опухоли // Иммунология. 1991. № 5. С. 11–14.
68. Говалло В. И. Иммунология репродукции. М.: Медицина, 1987. 304 с.
69. Гольдберг Д. И., Стояновский П. М. О применении эмбриональной мази в практике работы районных ветеринарных лечебниц. Томск, 1947. 223 с.
70. Гордиенская Н. А., Пылаева С. И. Влияние полиоксидония на течение генерализованной инфекции при ожогах // Иммунология. 1999. № 2. С. 60–61.
71. Гордиенская Н. А., Пылаева С. И. Влияние препарата витана на иммунный ответ при экспериментальной термической травме // Иммунология. 1999. № 2. С. 59–60.
72. Городилова В. В. Значение иммунологического статуса для прогноза заболевания у онкологических больных // Вопр. онкол. 1981. Т. 27, № 6. С. 22–26.
73. Городилова В. В., Боева М. Н. Иммунобиология опухолевого роста. М.: Медицина, 1983. 240 с.
74. Горский Ю. М., Астафьев В. И., Казначеев В. П., Родионов С. Ю. и др. Гомеостатика живых, технических, социальных и экологических систем // Новосибирск: Наука, 1990. 350 с.

75. Григорян С. С., Майоров И. А., Иванова А. М. и др. Оценка интерферонового статуса людей по пробам цельной крови // Вопр. вирусол. 1988. № 4. С. 433–437.
76. Гриневич Ю. А., Каменец Л. Я. Основы клинической иммунологии опухолей. Киев: Здоровье, 1986. 159 с.
77. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. М.: Медицина, 1969. 31 с.
78. Гусев А. И., Язова Л. К. Выделение и очистка эмбрионального альфа-глобулина человека и животных методом препаративного диск-электрофореза в полиакриламидном геле // Биохимия. 1970. Т. 35, вып. 3. С. 172–181.
79. Давыдов К. Н. Влияние различного состояния нервной системы на процесс регенерации тиреоидной паренхимы // Труды 6-го Всесоюзн. съезда анатомов, гистологов, эмбриологов. Киев, 1958. Т. 2. С. 635–638.
80. Давыдовский И. В. Компенсаторно-приспособительные процессы (биологические аспекты проблемы) // Архив патологии. 1962. № 8. С. 7–18.
81. Давыдовский И. В. Философские основы патологии // Архив патологии. 1969. № 6. С. 3–8.
82. Двойрин В. В., Клименков А. А. Методика контролируемых клинических испытаний. М.: Медицина, 1985. 189 с.
83. Дик Д. Иммунологические аспекты инфекционных заболеваний. М.: Медицина, 1982. 670 с.
84. Доклад научной группы ВОЗ. Прицины оценки лекарственных средств, применяемых в медицине // ВОЗ. Женева, 1977.
85. Долгих В. Т. Опухолевый рост. М.: Медицинская книга, 2001. 79 с.
86. Долгушин И. И., Зурочка А. В., Чукичев А. В., Колесников О. Л. Роль нейтрофилов в регуляции иммунной реактивности и репаративных реакций поврежденной ткани // Вестник РАМН. 2000. № 2. С. 14–19.
87. Долгушин И. И., Эберт Л. Я., Лифшиц Р. И. Иммунология травмы. Свердловск: УрГУ, 1989. 187 с.
88. Елизарова О. Н., Жидкова Л. В., Кочеткова Т. А. Пособие по токсикологии для лаборантов. М.: Медицина, 1974. 154 с.
89. Епишин А. В., Грыщив В. Е., Венгер Е. П. Иммунные нарушения у больных первичным гипотиреозом // Врачебное дело. 1991. № 6. С. 51–53.
90. Епишин А. В., Грыщив В. Е., Венгер Е. П. Иммуноактивные препараты в комплексном лечении больных гипотиреозом // Тер. архив. 1991. № 2. С. 88–92.
91. Епишин А. В., Грыщив В. Е., Венгер Е. П. Иммунологические реакции у больных гипотиреозом при лечении тиреоидином // Сов. медицина. 1991. № 3. С. 76–77.
92. Епишин А. В., Грыщив В. Е., Сивак Л. И., Венгер Е. П. Отдаленные результаты терапии первичного гипотиреоза в зависимости от иммунного статуса // Пробл. эндокринологии. 1991. № 5. С. 7–10.
93. Епишин А. В., Хабарова Н. А., Грыщив В. Е., Венгер Е. П. Применение иммуномодулирующих препаратов в комплексном лечении идиопатического гипотиреоза // Тер. архив. 1993. № 10. С. 39–42.
94. Ерхов В. С., Агеенко А. И. Возможная роль эмбриональных поверхностных антигенов в формировании аутостимула пролиферации опухолевых клеток // Эксперим. онкол. 1986. Т. 8, № 2. С. 32–35.

95. Журавлев В. Ф. Токсикология радиоактивных веществ. М.: Энергоатомиздат, 1990. 336 с.
96. Зайцев В. Т., Криворучко И. А., Климова Е. М. и др. Плазмоферез и иммунокорригирующая терапия в комплексной детоксикации пациентов с панкреатическим некрозом // Клин. хир. 1993. № 11. С. 3–5.
97. Затула Д. Г. Сходство антигенов у микроорганизмов и клеток злокачественных опухолей. Киев: Наук. думка, 1982. 247 с.
98. Земсков В. М., Земсков А. М., Золодеев В. И. Особенности коррекции иммунологических расстройств при различных патологических состояниях // Усп. совр. биол. 1994. Т. 114, вып. 6. С. 440–445.
99. Зильбер Л. А. Вирусная теория происхождения злокачественных опухолей. М.: Медицина, 1946. 72 с.
100. Зильбер Л. А., Абелев Г. И. Вирусология и иммунология рака. М.: Медицина, 1962. 458 с.
101. Иванова А. С., Родионов С. Ю., Сидорович И. Г., Хаитов Р. М. Влияние альфа-фетопротеина человеческого на общефизиологические показатели в эксперименте // Тезисы докл. 3-го съезда физиологов Сибири и Дальнего Востока. Новосибирск, 1997. С. 83.
102. Ивашкин В. Т. Прогресс в изучении и терапии хронических вирусных гепатитов // Рос. журнал гастроэнт., гепатол. и колопроктол. 1997. Т. 7, № 5. С. 22–26.
103. Ивашкин В. Т., Мамаев С. Н., Лукуна Е. А. и др. Система цитокинов у больных хроническими диффузными заболеваниями печени // Иммунология. 2001. № 1. С. 46–49.
104. Игнатьева Г. А., Топтыгин А. Ю., Сеславина Л. С., Сидорович И. Г. Противоопухолевый эффект конъюгата альфа-фетопротеина с ристицином // 1-я Национальная конференция Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов «Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии». М., 1997. С. 269.
105. Исаева В. В. Изменение способности к регенерации и соматическому эмбриогенезу в ходе онтогенеза некоторых тубеллярий // Восстановительные процессы и иммунологические реакции. М.: Наука, 1969. С. 27–37.
106. Кавецкий Р. Е. Взаимодействие организма и опухоли. Киев: Наук. думка, 1977. 235 с.
107. Каневский В. Ю., Позднякова Л. П., Аксенова О. А. и др. Выделение и исследование ассоциированных с АФП рецепторов из опухоли и плодных человеческих тканей // Biochem. Mol. Biol. Int. 1997. Vol. 41, № 6. P. 1143–1151.
108. Карлсон Б. М. Регенерация. М.: Наука, 1986. 296 с.
109. Кашкин К. Н., Трояновский С. М., Гудков А. В. Выявление тканеспецифической экспрессии генов методом гибридизации *in situ* на отпечатках гистологических срезов // Молек. генет., микробиол. и вирусол. 1987. № 9. С. 16–18.
110. Кеворков Н. Н., Шилов Ю. И., Ширшев С. В., Черешнев В. А. Гормоны репродукции в регуляции процессов иммунитета. Екатеринбург: УИФ «Наука», 1993. 171 с.
111. Климов А. Н. Иммунореактивность и атеросклероз. Л.: Медицина, 1986. С. 6–11.
112. Клиническая эндокринология. Руководство для врачей / Под ред. проф. Н. Т. Старковой. М.: Медицина, 1991. С. 154–158.
113. Клиническая рентгенорадиология. Руководство в 5 т. / Под ред. Г. А. Зедгенидзе. АМН СССР. М.: Медицина, 1985. 368 с.

114. Клиническая хирургия: Справочное руководство / Под ред. Ю. М. Панцырева. М.: Медицина, 1988. 640 с.
115. Коган Е., Демура С., Пальцев М. Патология митоза и апоптоза при опухолевом росте // Врач. дело. 2001. № 9. С. 35–37.
116. Когосова Л. С., Чернушенко Е. Ф., Ильинский И. Г. и др. Эффективность применения тималина в комплексном лечении больных туберкулезом легких // Пробл. туберкулеза. 1990. № 10. С. 29–32.
117. Кокорева Л. Н., Змызгова А. В., Волчкова Е. В. Циркулирующие иммунные комплексы у больных хроническим вирусным гепатитом при интерферонотерапии // Эпидем. и инфекц. бол. 1996. № 3. С. 40–42.
118. Коларов С., Гатева В. Функциональная диагностика в детском возрасте. София: Медицина и физкультура, 1979. 443 с.
119. Кологривова Е. Н., Иванова Н. В., Климов В. В. и др. Аутоиммунные реакции у пациентов со злокачественными новообразованиями различных локализаций // Вопросы онкологии. 2000. № 1. С. 61–63.
120. Колб В. Г., Камышников В. С. Справочник по клинической химии. Минск: Беларусь, 1982. 196 с.
121. Комаров Ф. И., Коровкин В. Ф., Меньшиков В. В. Биохимические исследования в клинике. Л.: Медицина, 1981. 407 с.
122. Комов Д. В., Рощин Е. В., Гуртовая И. Б. Лекарственное лечение первичного и метастатического рака печени. М.: Триада-Х, 2002. 157 с.
123. Короткова Т. П. Морфологические регенерации, их эволюция и классификация // Бесполое размножение, соматический эмбриогенез и регенерация. Л.: Изд-во ЛГУ, 1972. С. 43–73.
124. Корыстов Ю. Н. Физиологическая и репаративная регенерация тканей – основной фактор онкогенеза // Усп. совр. биол. 1994. Т. 114, вып. 5. С. 606–616.
125. Костина З. И., Прохидзей И. В., Герасимова Е. В. Значение циркулирующих иммунных комплексов в определении активности ограниченных форм туберкулеза легких // Иммунология и иммуногенетика туберкулеза: Сб. трудов ЦНИИ туберкулеза. М.: 1983. С. 86–88.
126. Кривчук А. А. Патофизиологические аспекты опухолевого роста. Минск: Вышэйшая школа, 1987. 211 с.
127. Кудрявцев А. А., Кудрявцева Л. А. Клиническая гематология животных. М., 1974. 176 с.
128. Кузин М. И. с соавт. Хирургические болезни. М.: Медицина, 1986. 704 с.
129. Кузин М. И., Сологуб В. К., Юденич В. В. Ожоговая болезнь. М.: Медицина, 1982. 61 с.
130. Кулаков В. И., Сухих Г. Т., Молнар Е. М. и др. Иммуноцитотерапия. Новое направление в трансплантации фетальных тканей // Бюл. эксп. биол. и мед. 1994. Т. 113, № 4. С. 412–415.
131. Куприна Н. И., Савушкина Н. К., Андреев А. В., Глейберман А. С. Модуляция фенотипа линии клеток человеческой гепатобластомы HepG2 под действием сульфоксида этана // Онтогенез. 1993. Т. 24, № 4. С. 57–67.
132. Курамшин Д. Х., Толоконская Н. П., Силков А. Н. и др. Содержание цитокинов Tx_1 и Tx_2 типа в сыворотке крови больных гепатитом С // Журн. эпид. и микробиол. 2001. № 1. С. 57–61.

133. Лавровский В. А. Иммунные свойства опухолевых клеток определяют степень их злокачественности // Усп. совр. биол. 1981. Т. 91, вып. 2. С. 228–240.
134. Лебедев К. А., Понякина И. Д. Иммунограмма в клинической практике. М.: Наука, 1990. 277 с.
135. Лебедев К. А., Понякина И. Д. Общий синдром иммунологической недостаточности // Итоги науки и техники. Иммунология. М., 1988. Т. 22. 224 с.
136. Лиознер Л. Д. Основные проблемы учения о регенерации. М.: Наука, 1975. 103 с.
137. Логинов А. С., Царегородцева Т. М., Зотина М. М. и др. Интерлейкины при хроническом вирусном гепатите // Тер. архив. 2001. № 2. С. 17–20.
138. Лужков Ю. М., Москалева Е. Ю., Накашьян Р. и др. Конъюгаты биологически активных веществ с альфа-фетопротеином, обладающие избирательным действием по отношению к раковым опухолям, способ их получения (варианты) и фармацевтическая композиция на их основе. Патент на изобретение РФ № 2071351 от 10.01.97.
139. Любимова О. И. Патогенетическое и клиническое значение различных вариантов иммунного ответа при бронхиальной астме у детей // Рос. вестн. перинат. и педиатрии. 2001. № 1. С. 39–42.
140. Любина А. Я., Ильичева Л. П., Катасонова Т. В. и др. Клинические лабораторные исследования. М.: Медицина, 1984. 288 с.
141. Мазуров В. И., Столов С. В., Линецкая Н. Э., Болдуева И. А. Содержание провоспалительных цитокинов ИЛ-2, ИЛ-8 и растворимого рецептора ИЛ-2 в крови у больных ИБС различных вариантов // Тер. архив. 2001. № 12. С. 14–17.
142. Малайцев В. В., Молнар Е. М., Сухих Г. Т., Богданова И. М. Трансплантация фетальных тканей человека – перспективный метод лечения сахарного диабета // Бюл. эксп. биол. и мед. 1994. Т. 111, № 4. С. 350–355.
143. Малашенко А. М., Суркова Н. И., Семенов Х. Х. Определение мутагенности имических соединений (генетический скрининг) на лабораторных мышах. Методические указания. М., 1977. 12 с.
144. Манцевичюте–Эрингене Е. В. Возможные подходы к исследованию иммунологического статуса у онкологических больных и у здоровых людей // Эксперим. онкол. 1984. Т. 6, № 2. С. 8–14.
145. Манько В. М. Патология иммунной системы у бестимусных животных // ВИНИТИ. Сер. Иммунология. 1979. Т. 8. С. 23–33.
146. Маянский Д. Н. Хроническое воспаление. М.: Медицина, 1991. 272 с.
147. Медуницын В. М. Повышенная чувствительность замедленного типа. М.: Медицина, 1983. 160 с.
148. Меклер Л. Б. Общая теория онкогенеза. 1. Основные положения теории // Усп. совр. биол. 1977. Т. 84, № 1 (4). С. 113–127.
149. Менджерицкий И. М. Секреты гастроэнтерологии. Ростов-на-Дону: Феникс, 1998. С. 445–459.
150. Методические материалы по экспериментальному (фармакологическому) и клиническому испытанию иммуномодулирующего действия фармакологических средств. М., 1984. С. 13.
151. Методические рекомендации по использованию поведенческих реакций животных в токсикологических исследованиях. Киев, 1980. 47 с.

152. Методические рекомендации по оценке аллергенных свойств фармакологических средств. М., 1988. 19 с.
153. Методические рекомендации по проверке мутагенных свойств у новых лекарственных препаратов. М., 1981. 18 с.
154. Мищенко А. И., Фоменко И. И., Бурнас Н. Н. Опыт применения экстрактов эндокринных желез при экспериментальном бластоматозном росте // Вопр. онкологии. 1930. Кн. 2. Т. 3. С. 8–16.
155. Муравьев И. А. Технология лекарств. М.: Медицина, 1980. 240 с.
156. Нагорнев В. А., Яковлева О. А., Мальцева С. Н. Атерогенез как отражение развития иммунного воспаления в сосудистой стенке // Вестник РАМН. 2000. № 10. С. 45–50.
157. Назаров И. П., Попов А. А., Мальцева М. А. и др. Состояние нейроэндокринных систем и иммунитета у больных с ожогами // Анестезиология и реаниматология. 1994. № 1. С. 5–8.
158. Нарзикулов Р. Б., Назруллаев С. И. Иммунопатология и иммунореабилитация ожоговых больных // Междунар. журн. иммунореабилит. 1997. № 4. С. 129.
159. Никитин В. В., Звягин И. В. Замораживание и высушивание биологических препаратов. М.: Колос, 1993. 344 с.
160. Новиков Д. К. Противоопухолевые реакции лейкоцитов. Минск: НиТ, 1988. 204 с.
161. Новиков Д. К., Новиков В. И. Клеточные методы иммунодиагностики. Минск, 1979. 222 с.
162. Нурмухамедова Е. Хронические вирусные гепатиты: современные принципы и перспективы лечения // Рос. мед. журнал. 1998. № 8. С. 525–528.
163. Ожоговая аутоинтоксикация. Пути иммунологического преодоления / Под ред. акад. Н. А. Федорова. М.: Медицина, 1985. 256 с.
164. Окороков А. Н. Диагностика болезней внутренних органов. М.: Мед. лит., 2000. С. 304–312.
165. Окороков А. Н. Диагностика болезней внутренних органов. М.: Мед. лит., 2001. Т. 2. С. 388–397.
166. Окороков А. Н. Лечение болезней внутренних органов. М.: Мед. лит., 2001. Т. 1. С. 66–145; 384–392.
167. Ольшанецкая Р. Л. Материалы по лечению злокачественных опухолей экстрактами из плаценты и эмбриональной ткани. Харьков, 1939. 211 с.
168. Павлов В. А., Родионов С. Ю. Нейротрофический фактор и процессы репаративной регенерации // Вестник АМН СССР. 1990. № 5. С. 1–6.
169. Павлов В. А., Слепушкин В. Д., Родионов С. Ю., Васильев Н. В. Соматический эмбриогенез как возможная основа злокачественного роста // Бюл. СО АМН СССР. 1991. № 2. С. 96–101.
170. Пак Н. А., Родионов С. Ю., Масычева В. И. и др. Экспериментальное исследование влияния препаратов из эмбриональных тканей на иммунитет при опухолевых процессах // Тезисы докл. XII Российской научной конференции «Факторы клеточного и гуморального иммунитета при различных физиологических и патологических состояниях». Челябинск, 1995. С. 91.
171. Панцирев Ю. М. и др. Клиническая хирургия: справочное руководство. М.: Медицина, 1988. 640 с.

172. Панченко Е. Л., Буркова М. И., Буркова А. С. и др. Опыт применения трансплантата фетальных тканей человека при болезни Дауна у детей // Бюл. эксп. биол. и мед. 1994. Т. 111, № 4. С. 373–375.
173. Пермякова Н. В. Оценка эффективности «Альфетина» в комплексном лечении больных пневмокониозами и инфильтративным туберкулезом легких: Автореф. дис… канд. мед. наук. Пермь, 2000. 22 с.
174. Покровский А. А. Биохимические методы исследования в клинике. М., 1969. 651 с.
175. Покровский А. В., Зотиков А. Е., Калинин Н. Л. Загадки атеросклероза. М., 1997. 128 с.
176. Полежаев Л. В. Регенерация путем индукции. М.: Медицина, 1977. 180 с.
177. Полежаев Л. В. Утрата и восстановление регенерации у животных. М.: Наука, 1968. 193 с.
178. Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP). М.: Минмедпром СССР, 1991.
179. Решетников С. С. Альфетин // Мед. картотека. 2001. № 6. С. 25–27.
180. Родионов С. Ю. Влияние фетальных куриных белков на синтез ДНК, РНК, белка и жизнеспособность клеток // Материалы 3-го Съезда физиологов Сибири и Дальнего Востока. Новосибирск, 1997. С. 188.
181. Родионов С. Ю., Мягкоходов В. А., Пляскин К. П. и др. Способ лечения злокачественных опухолей. Патент на изобретение РФ № 2105567 от 27.02.98.
182. Родионов С. Ю., Пак Н. А. Влияние препарата из эмбриональных тканей на рост и метастазирование опухолей // Материалы Всероссийской конференции «Опухоли висцеральных локализаций». Томск, 1995. С. 188–189.
183. Родионов С. Ю., Пак Н. А., Татьков А. И. Противоопухолевое действие препарата из эмбриональных тканей // Материалы Всероссийской конференции «Организация паллиативной помощи и методы лечения больных с распространенными формами злокачественных новообразований». М., 1995. С. 113–114.
184. Родионов С. Ю., Пляскин К. П., Пак Н. А. и др. Опыт лечения тяжелых форм онкологических заболеваний альфа-фетопротеином и общей управляемой гипертермией // Тезисы докл. 4-го Всероссийского съезда онкологов. Ростов-на-Дону, 1995. С. 146–148.
185. Родионов С. Ю., Санкин Е. И., Сидорович И. Г., Пляскин К. П. Первый опыт применения нового иммунобиологического препарата «Альфетин» в комплексном лечении тиреоидита Хашимото // Актуальные вопросы эндокринологии. Пермь, 1997. С. 34.
186. Родионов С. Ю., Санкин Е. И., Шутов А. А. и др. Применение препаратов альфа-фетопротеина и ДНК в комплексной терапии неврологических заболеваний // Ак-туальные вопросы современной неврологии. Саратов, 1997. С. 149.
187. Родионов С. Ю., Сидорович И. Г., Пляскин К. П. и др. Первый опыт применения альфа-фетопротеина в комплексном лечении больных с бронхиальной астмой // Материалы Международной научной конференции «Проблемы семьи-2000». Анталья, 1997. С. 99–100.
188. Родионов С. Ю., Сидорович И. Г., Масычева В. И. Влияние эмбриональных белков на показатели иммунитета у животных при острых лучевых реакциях

// Материалы 3-го Съезда физиологов Сибири и Дальнего Востока. Новосибирск, 1997. С. 189.
189. Родионов С. Ю., Стариков В. В. Способ получения препарата альфа-фетопротеина. Патент РФ № 2154468 от 20.08.00.
190. Родионов С. Ю., Стариков В. В. Способ получения препарата альфа-фетопротеина. Патент РФ № 2163139 от 20.02.01.
191. Родионов С. Ю., Стариков В. В. Способ получения препарата альфа-фетопротеина. Патент РФ № 2169578 от 20.06.01.
192. Родионов С. Ю., Стариков В. В. Способ получения препарата альфа-фетопротеина. Патент РФ № 2170586 от 20.07.01.
193. Родионов С. Ю., Стариков В. В., Мягкоходов В. А. Способ лечения заболеваний, характеризующихся аутоиммунной агрессией. Патент на изобретение РФ № 2137477.
194. Родионов С. Ю., Татьков С. И., Пак Н. А. Влияние альфа-фетопротеина на рост и метастазирование саркомы Плисса у крыс // Вопр. онкол. 1996. Т. 42, № 1. С. 74–76.
195. Родионов С. Ю., Черкасов В. А., Аутеншлюс А. И., Бахметьев Б. А. Исследование динамики некоторых показателей иммунного статуса онкологических больных в процессе терапии новым иммунотропным препаратом «Альфетин» // Пермский мед. журн. 1998. Т. 15, № 1. С. 1–7.
196. Ройт А. Основы иммунологии. М.: Мир, 1991. 328 с.
197. Рощин Е. М., Комов Д. В., Нечипай А. В. и др. Теоретическое обоснование и первые итоги клинического применения альфа-фетопротеина человека (АФП) и комплекса доксорубицин-эстрон (ДЭ) у больных злокачественными новообразованиями печени // Новое в онкологии. Воронеж, 1997. Вып. 2. С. 137–140.
198. Руководство ВОЗ по отчету о результатах терапии рака // WHO, Женева, 1979.
199. Рыболовлев Ю. Н., Сидляров Д. П., Афонин Н. И. Токсикологические аспекты безопасности готовых лекарственных форм. М., 1981. С. 9.
200. Рыкова М. П., Спиранде И. В., Зедгенидзе М. С. и др. Новая высокочувствительная техника тестирования нормальных киллеров // Иммунология. 1981. № 3. С. 88–90.
201. Савула М. М. Иммунологические показатели при туберкулезе, раке легких и затяжных пневмониях // Пробл. туберкулеза. 1993. № 4. С. 24–26.
202. Саноцкий И. В., Уланова И. П. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений. М.: Медицина, 1975. 328 с.
203. Саноцкий И. В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ. Токсикометрия. М., 1970. 134 с.
204. Саркисов Д. С., Пальцин А. А., Втюрин Б. В. Электронно-микроскопическая авторадиография клетки. М.: Медицина, 1975. 184 с.
205. Середа Н. Н., Шапошник Е. Н. Содержание иммунных комплексов у больных туберкулезом легких в зависимости от уровня иммуноглобулинов // Иммунология и иммуногенетика туберкулеза: Сб. трудов ЦНИИ туберкулеза. 1983. С. 89–90.
206. Сидоренко Г. И. Поверхностно-активные свойства конденсата выдыхаемого воздуха // Терап. архив. 1980. № 3. С. 65–68.

207. Сидорова В. Ф. Регенерационная способность поджелудочной железы крыс различного возраста // Бюл. эксп. биол. и мед. 1969. Т. 54 , № 12. С. 79–81.
208. Скалецкий Н. Н., Фатеева Н. Л., Сухих Г. Т., Молнар Е. М. Трансплантация культур островковых клеток фетальной поджелудочной железы в лечении инсулинзависимого сахарного диабета // Бюл. экспер. биол. и мед. 1994. Т. 111, № 4. С. 356–362.
209. Слепушкин В. Д., Павлов В. А., Родионов С. Ю. Уровни регуляции регенерации // Тезисы докл. VII Всесоюзного семинара «Гомеостатика живых и технических систем». Иркутск, 1989. С. 23–29.
210. Стариков В. В., Родионов С. Ю. Способ получения препарата альфа-фетопротеина. Патент РФ № 2121350 от 10.11.98.
211. Стариков В. В., Родионов С. Ю., Мягкоходов В. А., Пак Н. А. Способ получения альфа-фетопротеина. Патент РФ № 2100031 от 27.12.97.
212. Сургова Т. М., Сидоренко М. В., Винницкий В. Б. Белковые маркеры беременности и рака // Усп. совр. биол. 1989. Т. 107, вып. 3. С. 418–433.
213. Суслов А. П. Макрофаги и противоопухолевый иммунитет. ВИНИТИ. 1990. Т. 19. С. 34–47.
214. Суслов В. А. Этиопатогенез, клиника и лечение прогрессирующих форм туберкулеза легких // Воен. мед. журнал. 1996. № 7. С. 29–34.
215. Сухих Г. Т., Молнар Е. М., Малайцев В. В., Богданова И. М. Трансплантация фетальных тканей человека в гематологии // Бюл. экспер. биол. и мед. 1994. Т. 112, № 4. С. 375–377.
216. Такаси Я. Способ лечения злокачественных опухолей. Патент на изобретение № 63-91330 (Япония), МКИ А61 К39/395. 1988. С. 197–202.
217. Татаринов Ю. С. Присутствие эмбрионального альфа-глобулина в сыворотке больных с первичным раком печени // Вопр. мед. химии. 1964. № 10. С. 90–91.
218. Теплова С. Н., Звеняцковская Е. Р., Никушкина К. В. Система комплемента и циркулирующие иммунные комплексы у больных с ожогами // Журн. микробиол., эпидем. и иммунобиол. 1999. № 3. С. 61–65.
219. Титов В. Н. Кардинальные вопросы патогенеза атеросклероза: настоящее и перспективы // Тер. архив. 2001. № 12. С. 78–81.
220. Тихонов А. В., Щербаков В. М., Шутов А. В. Способ получения препарата для направленной доставки противоопухолевых лекарств в раковую клетку. Патент РФ № 2026688 от 24.05.99.
221. Тканевая терапия / Под ред. И. А. Пучковской. Киев, 1975. 208 с.
222. Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. София: Медицина и физкультура, 1963. 528 с.
223. Токин Б. П. Онтогения и бластомогенный рост // Журн. общей биол. 1942. № 3–4. С. 262–282.
224. Токин Б. П. Электронно–микроскопический анализ процесса дифференцировки клеток // Архив анатомии, гистологии, эмбриологии. 1972. Т. 62, № 6. С. 46–62.
225. Токин Б. П. Регенерация и соматический эмбриогенез. Л.: Изд-во ЛГУ, 1959. 149 с.
226. Томашевский А. И., Юверский В. Н. Новая схема выделения и очистки альфафетопротеина человека // Биоорг. хим. 1999. Т. 25, № 6. С. 412–417.

227. Трапезников Н. Н. Важность изучения иммунологического статуса у онкологических больных и его значение в клинической практике // Иммунокомпетентность и иммунотерапия больных злокачественными новообразованиями. Кемерово,1981. С. 12–21.
228. Требования к доклиническому изучению общетоксического действия новых фармакологических веществ. М., 1984. 156 с.
229. Уманский С. Р. Генетическая программа клеточной гибели: гипотеза и некоторые приложения (трансформация, канцерогенез, старение) // Усп. совр. биол. 1982. Т. 98, № 1. С. 139–148.
230. Фатех-Могхадам А., Стиебер П. Рациональное использование опухолевых маркеров. Мюнхен: Boehringer Mannheim, 1993. С. 30–32.
231. Филин В. А., Салмова В. С., Вартапетова Е. Е. Современные аспекты этиологии и патогенеза неспецифического язвенного колита // Педиатрия. 2000. № 6. С. 95–99.
232. Фримель Г. Иммунологические методы. М.: Медицина, 1987. С. 472.
233. Хаитов Р. М. Аллергология и клиническая иммунология в России // 1-я Национальная конференция Ассоциации аллергологов и клинических иммунологов «Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии». М., 1997. С. 3–10.
234. Хаитов Р. М., Балаболкин И. И., Рылеева И. В. и др. Иммунотерапия при бронхиальной астме // Иммунология. 1993. № 6. С. 4–7.
235. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В., Истамов Х. И. Экологическая иммунология. М.: Изд-во ВНИРО, 1995. 219 с.
236. Хоменко А. Г. Туберкулез сегодня и завтра – проблемы и пути решения // Пробл. туберкулеза. 1995. № 1. С. 4–8.
237. Хоменко А. Г. Туберкулез. М., 1996. 493 с.
238. Худзик Л. Б., Салина Т. Ю., Паролина Л. Е. Иммунотерапия туберкулеза органов дыхания // Пробл. туберкулеза. 1998. № 6. С. 23–26.
239. Худзик Л. Б., Морозова Т. И. Комплексная оценка защитных систем у больных инфильтративным туберкулезом легких // Пробл. туберкулеза. 1990. № 2. С. 30–32.
240. Худзик Л. Б., Морозова Т. И. Протеолитические системы крови у больных туберкулезом легких // Пробл. туберкулеза. 1995. № 3. С. 56–58.
241. Черкасов В. А., Малютина Н. Н., Пермякова Н. В. и др. Нарушения иммунитета и иммунокорригирующая терапия при пневмокониозах и инфильтративном туберкулезе легких. Методические рекомендации. Пермь, 2001. 26 с.
242. Черкасов В. А., Пермякова Н. В., Родионов С. Ю. и др. Оценка эффективности «Альфетина» в комплексном лечении больных инфильтративным туберкулезом легких // Пермск. мед. журн. 2000. № 4. С. 6–9.
243. Черкасов В. А., Пермякова Н. В., Малютина Н. Н., Родионов С. Ю. Применение иммуномодулятора «Альфетин» в комплексном лечении больных пневмокониозами // Тезисы докл. «Современные аспекты и проблемы охраны труда. Охрана труда-98». Пермь, 1998. С. 244–245.
244. Чернецова Л. Ф., Зотов П. Б. Иммунотерапия сопровождения ликопидом больных с распространенными формами злокачественных новообразований // Рус. онкол. журн. 2001. № 5. С. 49–53.

245. Чернушенко Е. Ф., Середа Н. Н. Циркулирующие иммунные комплексы при туберкулезе легких // Врачебное дело. 1982. № 9. С. 94–95.
246. Черепнев Г. В., Слобнов Ю. Д., Зимакова И. Е.. Перспективы иммуномодулирующей терапии бронхиальной астмы // Казан. мед. журн. 1998. № 5. С. 388–391.
247. Черешнев В. А., Щекотов В. В., Туев В. А. и др. Альфа-фетопротеин в комплексном лечении бронхиальной астмы // Астма. 2003. Т. 4, № 1. С. 13–18.
248. Чучалин А. Г. Иммунокоррекция в пульмонологии. М.: Медицина, 1989. 250 с.
249. Шапот В. С. Биохимические аспекты роста. М.: Медицина, 1975. 304 с.
250. Шевелев А. С. Противоречия иммунологии. М.: Медицина, 1978. 256 с.
251. Ширшев С. В. Белки фето-плацентарного комплекса в регуляции иммунных реакций // Усп. совр. биол. 1993. Т. 113, вып. 2. С. 230–246.
252. Ширшев С. В. Цитокины плаценты в регуляции иммуноэндокринных процессов при беременности // Усп. совр. биол. 1994. Т. 114, вып. 2. С. 223–239.
253. Ширшев С. В. Механизмы иммуноэндокринного контроля процессов репродукции. Т. 1, 2. Екатеринбург: УрО РАН, 2002. 985 с.
254. Шифрин О. С. Болезнь Крона: особенности патогенеза, клиники и лечения // Consilium medicum. 2001. № 6. Р. 261–266.
255. Шмагель К. В., Черешнев В. А. Альфа-фетопротеин: строение, функции и роль в эмбриогенезе // Акушерство и гинекология. 2002. № 5. С. 6–8.
256. Шмагель К. В., Черешнев В. А. Альфа-фетопротеин: диагностическое значение в акушерстве // Акушерство и гинекология. 2002. № 5. С. 8–11.
257. Шмагель К. В., Черешнев В. А. Иммунитет беременной женщины. М.: Мед. книга, 2003. 225 с.
258. Шпарик Я. В., Билынский Б. Т. Некоторые методические подходы к изучению естественных клеток-киллеров в клинике // Лаб. дело. 1988. № 5. С. 3–8.
259. Штрауб Ф. Б. Биохимия. Будапешт: Изд-во АН Венгрии, 1963. 691 с.
260. Шулутко Б. И. и др. Внутренние болезни: Лекции для студентов и врачей. В 2-х т. Изд. 2-е, испр. и дополн. СПб., 1994. 960 с.
261. Щитовидная железа (физиология и клиника) / Пер. с англ., под ред. Е. Н. Сперанской / Под ред. С. Вернера. Л.: Мед. лит., 1963. 451 с.
262. Эльгорт Д. А., Абелев Г. И. Иммуноауторадиографическое определение α-фетопротеина животных и человека // Бюл. эксп. биол. и мед. 1971. Т. 74, № 2. С. 118–120.
263. Эмж Н. Н. Влияние беременности на рост опухолей // Реф. клин. мед. 1935. № 8. С. 424.
264. Эндокринообменная диагностика / Под ред. И. Пенчева. София: Медицина и физкультура, 1961. 499 с.
265. Эрайзер Т. Л., Хамзина Л. С., Абелев Г. И. Межклональная вариабельность клеток гепатомы McA-RH 7777, выявленная аналитическим клонированием // Бюл. эксп. биол. и мед. 1987. Т. 103. № 5. С. 324–327.
266. Эренпрейс Я. Г. Эмбриональные свойства опухолевых клеток: факты и гипотезы // Эксперим. онкол. 1982. Т. 4, № 6. С. 13–18.
267. Юверский В. Н., Нарижнева В. Н., Иванова Т. В., Томашевский А. Я. Ригидность человеческой третичной структуры альфа-фетопротеина находится под контролем лиганда // Биохимия. 1997. Т. 36, № 44. С. 13638–13645.

268. Abe H., Tani T., Naitoh H., Kodama M. Retroperitoneal germ cell tumor treated by PVeBV chemotherapy: a case report // Jpn. J. Clin. Oncol. 1999. Vol. 29, № 5. P. 261–263.
269. Abelev G. I. Study of antigenic structure of tumors // Acta Un. Int. Cancer. 1963. Vol. 19. P. 80–82.
270. Abelev G. I. Production of embryonal serum alpha-fetoprotein by hepatomas: review of experimental and clinical data // Cancer Res. 1968. Vol. 28. P. 1344–1350.
271. Abelev G. I., Assecritova I. V., Kraevsky N. A. et al. Embrional serum alpha-globulin in cancer patients: diagnostic value // Int. J. Cancer. 1967. Vol. 2. P. 551–558.
272. Abelev G. I., Eraiser T. L. Cellular aspects of alpha-fetoprotein reexpression in tumors // Semin. Cancer Biol. 1999. Vol. 9, № 2. P. 95–107.
273. Aggarwal B. B., Kohr W. J., Hass P. E. Human tumor necrosis factor. Production, purification and characterization // J. Biol. Chem. 1985. Vol. 260, № 4. P. 2345–2354.
274. Aitken D. A., Crossley J. A. Neural tube defects (alpha-fetoprotein) Down's syndrome screening // Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 1997. Vol. 9, № 2. P. 113–120.
275. Akasofu M., Kawahara E., Kaji K., Nakanishi I. Sarcomatoid hepatocellular-carcinoma showing rhabdomyoblastic differentiation in the adult cirrhotic liver // Virchows Arch. 1999. Vol. 434, № 6. P. 511–515.
276. Alava M. A., Iturralde M., Gonzalez B., Piceiro A. Fatty acid desaturation: effect of alpha-fetoprotein on alpha-linolenic acid conversion by fetal rat hepatocytes // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty. Acids. 1999. Vol. 60, № 3. P. 209–215.
277. Alava M. A., Iturralde M., Lampreave F., Piceiro A. Specific uptake of alpha-fetoprotein and albumin by rat Morris 7777 hepatoma cells // Tumour Biol. 1999. Vol. 20, № 1. P. 52–64.
278. Allen S. H., Bennett J. A., Mizejewski G. J. et al. Purification of alpha-fetoprotein from human cord serum with demonstration of its antiestrogenic activity // Biochem. Biophys. Acta. 1993. Vol. 1202, № 1. P. 135–142.
279. Alpert E., Schur P., Drysdale J. Human alpha-fetoprotein: purification and physical properties // Fed. Proc. 1971. Vol. 30. P. 246.
280. Anteby E., Shapan P., Dushnik M. et al. The regulatory role of tri-iodthironine on the production of alpha-fetoprotein and albumin by mouse fetal live cells // Hum. Reprod. 1993. Vol. 8, № 10. P. 163–185.
281. Antonini C., Forgiarini O., Chiara A. et al. Hepatoid adenocarcinoma of the stomach. Case report and review of the literature // Pathologica. 1997. Vol. 89, № 3. P. 310–316.
282. Aoyagi Y., Suzuki Y., Igarashi K. et al. Carbohydrate structures of human alpha-fetoprotein of patients with hepatocellular carcinoma: presence of fucosylated and non-fucosylated triantennary glycans // Br. J. Cancer. 1993. Vol. 67, № 3. P. 486–492.
283. Arnould L., Drouot F., Fargeot P. et al. Hepatoid adenocarcinoma of the lung: report of a case of an unusual alpha-fetoprotein-producing lung tumor // Am. J. Surg. Pathol. 1997. Vol. 21, № 9. P. 1113–1118.
284. Aussel C., Fehlmann M. Alpha-fetoprotein stimulates leukotriene synthesis in P338D1 macrophages // Cellular immunology. 1986. Vol. 101, № 2. P. 415–424.
285. Aussel C., Fehlmann M. Effect of alpha-fetoprotein and indomethacin on arachidonic acid metabolism in P388D1 macrophages: role of leukotrienes // Prostaglandins Leukot Med. 1987. Vol. 28, № 3. P. 325–336.

286. Aussel C., Masseyeff R. Alpha-fetoprotein and estrogen metabolism. I. Influence of steroids by rat liver microsomes *in vitro* // Biohimie. 1976. Vol. 58, № 6. P. 737–741.
287. Aydiner A., Topuz E., Disci R. et al. Serum tumor markers for detection of bone metastasis in breast cancer patients // Acta Oncol. 1994. Vol. 33, № 2. P. 181–186.
288. Ayme S., Aurran Y., Chabal F. et al. Evaluation of trisomy 21 risk by serial determination of chorionic gonadotrophin hormone and alpha-fetoprotein: results of a national pilot study // Contracept. Fertil. Sex. 1993. Vol. 21, № 2. P. 133–43.
289. Balkwill F. R., Burke F. The cytokine network // Immunol. Today. 1989. Vol. 10, № 9. P. 299–304.
290. Baltimore D. Tumor viruses // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1975. Vol. 39. P. 1187–1200.
291. Barber H. R. K. Immunology for the clinican. A wiley medical publication. John Wiley N. Y. London – Sydney – Toronto – New York, 1977. 355 p.
292. Bartha J. L., Comino-Delgado R., Arce F. et al. Relationship between alpha-fetoprotein and fetal erythropoiesis // J. Reprod. Med. 1999. Vol. 44, № 8. P. 689–697.
293. Bass H. N., Miranda C., Oei R. Crandall B.F. Association of generalized dystrophic epidermolysis bullosa with positive acetylcholinesterase and markedly elevated maternal serum and amniotic fluid alpha-fetoprotein // Prenat. Diagn. 1993. Vol. 13, № 1. P. 55–59.
294. Bath L. E., Walayat M., Mankad P. et al. Stage IV malignant intrapericardial germ cell tumor: a case report // Pediatr. Hematol. Oncol. 1997. Vol. 14, № 5. P. 451–455.
295. Benn P. A., Craffey A., Horne D. et al. Elevated maternal serum alpha-fetoprotein with low unconjugated estriol and the risk for lethal perinatal outcome // J. Matern. Fetal. Med. 2000. Vol. 9, № 3. P. 165–169.
296. Benn P. A., Horne D., Craffey A. et al. Maternal serum screening for birth defects: results of a Connecticut regional program // Conn. Med. 1996. Vol. 60, № 6. P. 323–327.
297. Benn P. A. Improved antenatal screening for Down's syndrome // Lancet. 2003. Vol. 8. P. 794–795.
298. Bennett J. A., Semeniuk D. J., Jacobson H. I., Murgita R. A. Similarity between natural and recombinant human alpha-fetoprotein as inhibitors of estrogen-dependent breast cancer growth // Breast. Cancer Res. Treat. 1997. Vol. 45, № 2. P. 169–179.
299. Bernier D., Thomassin H., Allard D. et al. Functional analysis of developmentally regulated chromatin–hypersensitive domains carrying the alpha-1-fetoprotein gene promoter and the albumin/alpha 1-fetoprotein intergenic enhancer // Mol. Cell. Biol. 1993. Vol. 13, № 3. P. 1619–1633.
300. Berry E., Aitken D. A., Crossley J. A. et al. Screening for Down's syndrome: changes in marker levels and detection rates between first and second trimesters // Br. J. Obstet. Gynaecol. 1997. Vol. 104, № 7. P. 811–817.
301. Bilbao R., Gerolami R., Bralet M. P. et al. Transduction efficacy, antitumoral effect, and toxicity of adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir therapy of hepatocellular carcinoma: the woodchuck animal model // Cancer Gene Ther. 2000. Vol. 7, № 5. P. 657–662.
302. Bois-Joyeux B., Cailliau K., Danan J. L. Regulation of alpha-fetoprotein gene expression by fatty acids and fibrates // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 1999. Vol. 60, № 5–6. P. 357–362.

303. Bonichon N., San Galli F., Perel Y. et al. Central nervous system. Experience of the Bordeaux University Hospital Center and review of the literature // Cancer Radiother. 1999. Vol. 3, № 4. P. 297–304.
304. Bose C. K., Mukherjea M. Alpha-fetoprotein in advanced epithelial ovarian cancer // Br. J. Obstet. Gynaecol. 1993. Vol. 100, № 12. P. 1149–1150.
305. Bosl G. L., Head M. D. Serum tumor marker half-life during chemotherapy in patients with germ cell tumors // Int. J. Biol. Markers. 1994. Vol. 9, № 1. P. 25–28.
306. Bourgaux J. F., Ponsoda P., Raffanel C. et al. Highly elevated alpha-fetoprotein and hepatic cirrhosis. It is not always hepatocarcinoma // Presse Med. 2001. Vol. 30, № 10. P. 486–487.
307. Brenner T., Zielinski A., Argov Z., Abramsky O. Prevention of experimental alpha-fetoprotein rich fractions // Tumor Biol. 1984. Vol. 5, № 5. P. 263–274.
308. Brill S., Zvibel I., Reid L. M. Expansion conditions for early hepatic progenitor cells from embryonal and neonatal rat livers // Dig. Dis. Sci. 1999. Vol. 44, № 2. P. 364–371.
309. Brock D., Sutcliffe R. Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida // Lancet. 1972. Vol. 5. P. 197.
310. Brownbill P., Mahendran D., Owen D. et al. Denudations as paracellular routes for alpha-fetoprotein and creatinine across the human syncytiotrophoblast // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2000. Vol. 278, № 3. P. 677–683.
311. Bruix J., Castells A., Montanya X. et al. Phase II stady of transarterial embolization in European patients with hepatocellular carcinoma: need for controlled trials // Hepatology. 1994. Vol. 20, № 3. P. 643–650.
312. Brumfield C. G., Wenstrom K. D., Owen J., Davis R. O. Ultrasound findings and multiple marker screening in trisomy 18 // Obstet. Gynecol. 2000. Vol. 95, № 1. P. 51–54.
313. Bucher N. L. R., Malt R. A. Regeneration of liver and kidney. Boston: Little Brow and Co, 1971. P. 217–230.
314. Butterfield L. H., Koh A., Meng W. et al. Generation of human T-cell responses to an HLA-A2.1-restricted peptide epitope derived from alpha-fetoprotein // Cancer Res. 1999. Vol. 59, № 13. P. 3134–3142.
315. Butterfield L. H., Meng W. S., Koh A. et al. T-cell responses to HLA-A*0201-restricted peptides derived from human alpha-fetoprotein // J. Immunol. 2001. Vol. 166, № 8. P. 5300–5308.
316. Cao G., Kuriyama S., Gao J. et al. Gene therapy for hepatocellular carcinoma based on tumour-selective suicide gene expression using the alpha-fetoprotein (AFP) enhancer and a housekeeping gene promoter // Eur. J. Cancer. 2001. Vol. 37, № 1. P. 140–147.
317. Cardoso E., Valdez G., Comini E. Effect of human AFP on native and *in vitro* stimulated NK-activity // J. Clin. Lab. Immunol. 1991. Vol. 34, № 4. P. 183–188.
318. Carrera M., Kestild M., de la Iglesia C. et al. Maternal serum alpha-fetoprotein levels in congenital nephrotic syndrome carrier pregnancies // Prenat. Diagn. 1999. Vol. 19, № 5. P. 489–490.
319. Carroll S. G., Kuo P. Y., Kyle P. M., Soothill P. W. Fetal protein loss in gastroschisis as an explanation of associated morbidity // Am. J. Obstet. Gynecol. 2001. Vol. 184, № 6. P. 1297–1301.
320. Chalasani N., Said A., Ness R. et al. Screening for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis in the United States: results of a national survey // Am. J. Gastroenterol. 1999. Vol. 94, № 8. P. 2224–2229.

321. Charpigny G., Reinaud P., Huet J. C. High homology between a trophoblastic protein (trophoblastin) isolated from ovine embrio and alpha-interferons // FEBS Lett. 1988. Vol. 8, № 288 (1). P. 12–16.
322. Chen C. P., Chao Y., Li C. P. et al. Concurrent chemoradiation is effective in the treatment of alpha-fetoprotein – producing acinar cell carcinoma of the pancreas: report of a case // Pancreas. 2001. Vol. 22, № 3. P. 326–329.
323. Chen C. P., Chern S. R., Lee C. C. et al. Prenatal diagnosis of mosaic ring chromosome 13 with anencephaly // Prenat. Diagn. 2001. Vol. 21, № 2. P. 102–105.
324. Chen R. J., Lin Y. H., Wang C. W. et al. Alpha-fetoprotein in women during pregnancy and in the neonate during intrapartum // Am. J. Perinatol. 1994. Vol. 11, № 4. P. 279–281.
325. Chi C. W., Chang Y. F., Chao T. W. et al. Flowcytometric analysis of the effect berberine on the expression of glucocorticoid receptors in human hepatoma HepG2 cells // Life Sci. 1994. Vol. 54, № 26. P. 2099–2107.
326. Chow L. P., Chang K. H., Lin J.Y. Selective cytotoxic effects of immunotoxin monoclonal anti AFP-ab A chain conjugate on several human hepatoma cell lines // Biochem. Int. 1990. Vol. 22, № 1. P. 95–102.
327. Chow L.P., Chou M.H., Ho C.Y. et al. Purification, characterization and molecular cloning of trichoanguin, a novel type I ribosome-inactivating protein from the seeds of Trichosanthes anguina. // Biochem. J. 1999. Vol. 15, № 338. P. 211–219.
328. Choyke P. L., Hayes W. S., Sesterhenn I. A. Primary extragonadal germ cell tumors of the retroperitoneum: differentiation of primary and secondary tumors // Radiographics. 1993. Vol. 13, № 6. P. 1365–1375.
329. Christmas T. J., Doherty A. P., Rustin G. J. et al. Primary retroperitoneal germ cell tumours: excision via a thoracoabdominal extraperitoneal approach // Br. J. Surg. 1997. Vol. 84, № 7. P. 1022–1025.
330. Christophi C., Muralidharan V. Treatment of hepatocellular carcinoma by percutaneous laser hyperthermia // J. Gastroenterol. Hepatol. 2001. Vol. 16, № 5. P. 548–552.
331. Chu C. W., Hwang S. J., Luo J. C. et al. Clinical, virologic, and pathologic significance of elevated serum alpha-fetoprotein levels in patients with chronic hepatitis C // J. Clin. Gastroenterol. 2001. Vol. 32, № 3. P. 240–244.
332. Chu C. W., Hwang S. J., Luo J. C. et al. Manifestations of hypercholesterolaemia, hypoglycaemia, erythrocytosis and hypercalcaemia in patients with hepatocellular carcinoma: report of two cases // J. Gastroenterol. Hepatol. 1999. Vol. 14, № 8. P. 807–810.
333. Clark G. F., Dell A., Morris H. R. et al. Viewing AIDS from a glycobiological perspective: potential linkages to the human fetoembryonic defence system hypothesis // Mol. Hum. Reprod. 1997. Vol. 3, № 1. P. 5–13.
334. Colombo M. P., Form G. Cytokine gene transfer in tumor inhibition and tumor therapy: where are we now? // Immunol. today. 1994. № 15. P. 48–51.
335. Copado M. A., Ruiz-Gutierrez V., Rodrigez-Burgos A. Fatty acids and squalene carried by alpha-fetoprotein, and fetal and adult serum albumin from chicken. Comparison with these from mammals // J. Protein. Chem. 1999. Vol. 18, № 4. P. 413–424.
336. Correale M., Giannuzzi V., Iacovazzi P. A. et al. Serum 90K/MAC-2BP glycoprotein levels in hepatocellular carcinoma and cirrhosis // Anticancer Res. 1999. Vol. 19, № 4. P. 3469–3472.

337. Cristani A., Cioni G., de Santis M. et al. Increase in serum alpha-fetoprotein without recurrent disease after hepatectomy for hepatocellular carcinoma // Hepatogastroenterology. 1994. Vol. 41, № 2. P. 137–139.
338. Cristani A., Cioni G., de Santis M. et al. A case of hepatocellular carcinoma that resisted identification // Ital. J. Gastroenterol. 1994. Vol. 26, № 6. P. 303–305.
339. Crowe A. J., Sang L., Li K. K. et al. Hepatocyte nuclear factor 3 relieves chromatin-mediated repression of the alpha-fetoprotein gene // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274, № 35. P. 25113–25120.
340. Culver K. W., Wickers T. M., Lamsam J. L. et al. Gene therapy for solid tumors // Brit. Med. Bull. 1995. Vol. 51, № 1. P. 192–204.
341. Cummings O. W., Ulbright T. M., Eble J. N., Roth L. M. Spermatocytic seminoma: an immunohistochemical study // Hum. Pathol. 1994. Vol. 25, № 1. P. 54–59.
342. Cushing B., Giller R., Ablin A. et al. Surgical resection alone is effective treatment for ovarian immature teratoma in children and adolescents: a report of the pediatric oncology group and the children's cancer group // Am. J. Obstet. Gynecol. 1999. Vol. 181, № 2. P. 353–358.
343. Cwley D. B., Simpson D. L., Herschman H. R. Asialoglycoprotein receptor mediates the toxic effects of an asialofetnin – diphteria toxin fragment A conjugate of cultured rat hepatocytes // Prog. Nat. I. Acad. Sci. USA. 1981. Vol. 78, № 6. P. 3383–3387.
344. Czokalo M., Wishnewski L. Culture conditions modify the effects exerted by human fetal AFP on some lymphocyte functions *in vitro* // Exp. Pathol. 1981. Vol. 20, № 4. P. 233–238.
345. Dabeva M. D., Shafritz D. A. Activation, proliferation and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration // Am. J. Pathol. 1993. Vol. 143, № 6. P. 1606–1620.
346. Dayer J. M., Beutler B., Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor (TNF) stimulates collagenase and PGE_2 production by human cynovial cells and dermal fibroblasts // J. Exp. Med. 1985. Vol. 162. P. 2163–2168.
347. De Graaf I. M., Cuckle H. S., Pajkrt E. et al. Co-variables in first trimester maternal serum screening // Prenat. Diagn. 2000. Vol. 20, № 3. P. 186–189.
348. De Nechaud B., Viron A., Puvion E. Culture en monocouches de cellules hepatiques de souris adultes secretant Lalburnine et alpha–foetoproteine // C. R. Acad. Sci. (Paris). 1979. Vol. 289 (ser. D). P. 737–740.
349. Del Castillo-Olivares A., Gil G. Alpha-1-fetoprotein transcription factor is required for the expression of sterol 12-alpha-hydroxylase, the specific enzyme for cholic acid synthesis. Potential role in the bile acid-mediated regulation of gene transcription // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275, № 23. P. 17793–17799.
350. Dolan C. R., Smith L. T., Sybert V. P. Prenatal detection of epidermolysis bullosa letalis with pyloric atresia in a fetus by abnormal ultrasound and elevated alpha-fetoprotein // Am. J. Med. Genet. 1993. Vol. 47, № 3. P. 395–400.
351. Dror Y., Gelman-Kohan Z., Hagai Z. et al. Aplasia cutis congenita, elevated alpha-fetoprotein, and a distinct amniotic fluid acetylcholinesterase electrophoretic band // Am. J. Perinatol. 1994. Vol. 11, № 2. P. 149–152.
352. Dudich E., Semenkova L., Dudich I. et al. Alpha-fetoprotein causes apoptosis in tumor cells via a pathway independent of CD95, TNFR1 and TNFR2 through activation of caspase-3-like proteases // Eur. J. Biochem. 1999. Vol. 266, № 3. P. 750–761.

353. Dudich E. I., Semenkova L. N., Dudich I. V. et al. Alpha-fetoprotein-induced apoptosis of cancer cells // Bull. Exp. Biol. Med. 2000. Vol. 130, № 12. P. 1127–1133.
354. Dudich I., Tokhtamysheva N., Semenkova L. et al. Isolation and structural and functional characterization of two stable peptic fragments of human alpha-fetoprotein // Biochemistry. 1999. Vol. 38, № 32. P. 10406–10414.
355. Dumble M. L., Knight B., Quail E. A., Yeoh G. C. Hepatoblast-like cells populate the adult p53 knockout mouse liver: evidence for a hyperproliferative maturation-arrested stem cell compartment // Cell Growth Differ. 2001. Vol. 12, № 5. P. 223–231.
356. Dziadek M. Modulation of alpha-fetoprotein synthesis in the early post-implantation embryo // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1978. Vol. 46. P. 135–146.
357. Eastham J. A., Wilson T. G., Russell C. et al. Surgical resection in patients with nonseminomatous germ cell tumor who fail to normalize serum tumor markers after chemotherapy // Urology. 1994. Vol. 43. P. 74–80.
358. Eisele L. E., Mesfin F. B., Bennett J. A. et al. Studies on a growth-inhibitory peptide derived from alpha-fetoprotein and some analogies // J. Pept. Res. 2001. Vol. 57, № 1. P. 29–38.
359. Engelhardt N. V., Baranov V. N., Lazareva M. N. et al. Ultrastructural localization of alpha-fetoprotein (AFP) in regenerating murine liver poisoned with CCL. I. Reexpression of AFP in differentiated hepatocytes // Histochemistry. 1984. Vol. 80. P. 401–407.
360. Engelhardt N. V., Poltoranina V. S., Yasova A. K. Localization of alpha-fetoprotein in transplantable murine teratocarcinomas // Int. J. Cancer. 1973. Vol. 11. P. 448–459.
361. Enjoji M., Nakashima M., Honda M. et al. Hepatocytic phenotypes induced in sarcomatous cholangiocarcinoma cells treated with 5–azacytidine // Hepatology. 1997. Vol. 26, № 2. P. 288–294.
362. Eriguchi N., Aoyagi S., Hara M. et al. Large acinar cell carcinoma of the pancreas in a patient with elevated serum AFP level // J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. 2000. Vol. 7, № 2. P. 222–225.
363. Falasca L., Marcellini P., Ara C. et al. Growth inhibition and induction of specific hepatic phenotype expression by retinoic acid in HEPG2 cells // Anticancer Res. 1999. Vol. 19, № 4. P. 3283–3292.
364. Fearon E. R., Pardoll D. M., Itaya T. IL-2 production by tumor cells by passes T-helper function in the generation of antitumor responce // Cell. 1990. Vol. 60, № 3. P. 397–403.
365. Ferry N. Gene therapy of primary cancers of the liver: hopes and realities // Bull. Cancer. 1997. Vol. 84, № 4. P. 431–434.
366. Festin S. M., Bennett J. A., Fletcher P. W. et al. The recombinant third domain of human alpha-fetoprotein retains the antiestrotrophic activity found in the full-length molecule // Biochem. Biophys. Acta. 1999. Vol. 1427, № 2. P. 307–314.
367. Feuchtbaum L. B., Currier R. J., Lorey F. W. Prenatal ultrasound findings in affected and unaffected pregnancies that are screen–positive for trisomy 18: the California experience // Prenat. Diagn. 2000. Vol. 20, № 4. P. 293–299.
368. Ficher G. Letzte Beobachtungen und neue Tatsachen uber die Versuche einer biologischen Behandlung der bosartigen Geschwulste // ZS. f. Krebsforsch. 1932. Bd. 36, Ht. 1.
369. Filella X., Molina R., Alcover J. et al. Influence of AFP, CEA and PSA on the *in vitro* production of cytokines // Tumour Biol. 2001. Vol. 22, № 2. P. 67–71.

370. Filly R. A., Callen P. W., Goldstein R. B. Alpha-fetoprotein screening programs: what every obstetric sonologist should know // Comment in: Radiology. 1993. Vol. 188, № 1. P. 17–18; Radiology. 1993. Vol. 188, № 1. P. 1–9.
371. Fiorentini G., Campanini A., Dazzi C. et al. Chemoembolization in liver malignant involvement. Experiences on 17 cases // Minerva Chir. 1994. Vol. 49, № 4. P. 281–285.
372. Fischman W. H., Singer R. M. Regulatory controls of oncotrophoblast proteins and developmental alkaline phosphates in cancer cells // Cancer Res. 1976. Vol. 36, № 11, pt. 2. P. 4256–4261.
373. Flanagan C. W., Parker J. R., Mannel R. S. et al. Primary endodermal sinus tumor of the vulva: a case report and review of the literature // Gynecol. Oncol. 1997. Vol. 66, № 3. P. 515–518.
374. Florey E. D. General pathology. London: Loyd Like. 1970. 1259 p.
375. Folrman J. The vascularisation of tumors // Sci., Amer. 1976. Vol. 234, № 5. P. 59–73.
376. Fong Y., Sun R. L., Jarnagin W., Blumgart L. H. An analysis of 412 cases of hepatocellular carcinoma at a Western center // Ann. Surg. 1999. Vol. 229, № 6. P. 790–799.
377. Foo K. F., Tan C. K., Wong K. K. et al. A case of alpha-fetoprotein-producing gastric cancer // Ann. Acad. Med. Singapore. 2001. Vol. 30, № 1. P. 58–61.
378. Forrester M. B., Merz R. D. Impact of demographic factors on prenatal diagnosis and elective pregnancy termination because of abdominal wall defects, Hawaii, 1986–1997 // Fetal. Diagn. Ther. 1999. Vol. 14, № 4. P. 206–211.
379. Forrester M. B., Merz R. D. Prenatal diagnosis and elective termination of neural tube defects in Hawaii, 1986–1997 // Fetal. Diagn. Ther. 2000. Vol. 15, № 3. P. 146–151.
380. Fosse S. D., Stenning S. P., Gerl A. et al. Prognostic factors in patients progressing after cisplatin–based chemotherapy for malignant non–seminomatous germ cell tumours // Br. J. Cancer. 1999. Vol. 80, № 9. P. 1392–1399.
381. Foster J. H., Berman M. M. The malignant transformation of liver cell adenomas // Arch. Surg. 1994. Vol. 129, № 7. P. 712–717.
382. Fransen L., Van der Heyden J., Ruysschaert R. Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon–gamma on a variety of normal and transformed human cell lines // Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 1986. Vol. 22. P. 419.
383. Fryer A. A., Jones P., Strange R. et al. Plasma protein levels in normal human fetuses: 13 to 41 weeks' gestation // Br. J. Obstet. Gynaecol. 1993. Vol. 100, № 9. P. 850–855.
384. Fujii Y., Taketa K., Aoi T. et al. Increased serum levels of monosialo–alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma and other malignancies // Tumour Biol. 1993. Vol. 14, № 5. P. 319–324.
385. Fujiwara T., Grimm E. A., Cai D. W. A retroviral wild type p53 expression vector penetrates human lung cancer spheroids and inhibits growth by including apoptosis // Cancer Res. 1993. Vol. 53. P. 4129–4133.
386. Fujiwara T., Motoyama T., Ishihara N. et al. Characterization of four new cell lines derived from small-cell gastrointestinal carcinoma // Int. J. Cancer. 1993. Vol. 54. P. 965–971.
387. Fujiyama S., Tanaka M., Maeda S. et al. Tumor markers for hepatocellular carcinoma // Gan To Kagaku Ryoho. 2001. Vol. 28, № 5. P. 723–732.
388. Gazit A., Igaraschi H., Chin I. M. Expression of normal human sis/PDGF-2 coding sequence induces cellular transformation // Cell. 1984. Vol. 39, № 1. P. 89–97.

389. Gels M. E., Marrink J., Visser P. et al. Importance of a new tumor marker TRA-1-60 in the follow–up of patients with clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors // Ann. Surg. Oncol. 1997. Vol. 4, № 4. P. 321–327.
390. Gerl A., Clemm C., Konl P. et al. Primar extragonadale Keimzelltumoren. Klinisches Erscheinungsbild, differential Diagnose und Therapie // Med. Klin. 1994. Vol. 89, № 5. P. 240–244.
391. Germa J. R., Llanos M., Tabernero J. M., Mora J. False elevations of alpha-fetoprotein associated with liver dysfunction in germ cell tumors // Cancer. 1993. Vol. 72, № 8. P. 2491–2494.
392. Gerolami R., Cardoso J., Lewin M. et al. Evaluation of HSV-tk gene therapy in a rat model of chemically induced hepatocellular carcinoma by intratumoral and intrahepatic artery routes // Cancer Res. 2000. Vol. 60. № 4. P. 993–1001.
393. Gershwin M. E., Gaxtles J. J., Makishima R. Alpha-fetoprotein-associated alterations of New Zealand mouse immunopathology // Immunopharmacol. 1979. Vol. 1, № 4. P. 331–341.
394. Geuskens M., Torres J. M., Esteban C., Uriel J. Endocinosis of three serum proteins of a multigene family and of arachidonic acid in human lecnin-stimulated T-lymphocytes // Microsc. Res. Tech. 1994. Vol. 28, № 4. P. 297–307.
395. Geuskens M., Dupressoir T., Uriel J. A study, by electron microscopy, of the specific uptake of alpha-fetoprotein by mouse embryonic fibroblasts in relation to *in vitro* aging, and by human mammary epithelial tumour cells in comparison with normal donors' cells // J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 1991. Vol. 23. P. 59–66.
396. Ghidini A., Alvarez M., Silverberg G. et al. Congenital nephrosis in low-risk pregnancies // Prenat. Diagn. 1994. Vol. 14, № 7. P. 599–602.
397. Gibbs P., Zielinsky R., Boyd C. et al. Structure, polymorphism and novel repeated DNA elements revealed by a complete sequence of human alpha-fetoprotein gene // Biochemistry. 1987. Vol. 26. P. 1332–1343.
398. Gibson D., Ambrosio R. E., Crowe D. L. et al. The establishment and continuous subculturing of normal human adult hepatocytes: expression of differentiated liver functions // Cell. Biol. Toxicol. 1993. Vol. 9, № 4. P. 385–403.
399. Gleiberman A. S., Abelev G. I. Cell position and cell interactions in expression of fetal phenotype of hepatocyte // Int. Rev. Cytol. 1985. Vol. 95. P. 229–266.
400. Gleiberman A. S., Kudrjavtseva E. I., Sharovskaya Yu. Yu. et al. The synthesis of alpha-fetoprotein in hepatocytes is coordinately regulated with cell-cell and cell-matrix regulation // Molecular Biology and Medicine. 1989. Vol. 6, № 2. P. 95–107.
401. Gleiberman A. S., Sharovskaya Yu., Chailakhjan L. M. Contact inhibition of alpha-fetoprotein synthesis and junctional communication in adult mouse hepatocyte culture // Exp. Cell Res. 1989. Vol. 184, № 1. P. 228–301.
402. Goerttler K. Lehrbuch der histology und der mikroskopischen Anatomie des Menschen. VEB Gustav Fischer Verlag. Jena, 1955. 558 p.
403. Goldstein N. S., Blue D. E., Hankin R. et al. Serum alpha-fetoprotein levels in patients with chronic hepatitis C. Relationships with serum alanine aminotransferase values, histologic activity index, and hepatocyte MIB-1 scores // Am. J. Clin. Pathol. 1999. Vol. 111, № 6. P. 811–816.
404. Goss R. J. Principles of Regeneration. N. Y. – L. Acad., Press. 1970. 341 p.
405. Grady R. W., Ross J. H., Kay R. Epidemiological features of testicular teratoma in a prepu-bertal population // J. Urol. 1997. Vol. 158, № 3, pt 2. P. 1191–1192.

406. Graf M., Blaeker H., Schnabel P. et al. Intracardiac yolk sac tumor in an infant girl // Pathol. Res. Pract. 1999. Vol. 195, № 3. P. 193–197.
407. Gramenzi A., Andreone P., Fiorino S. et al. Impact of interferon therapy on the natural history of hepatitis C virus related cirrhosis // Gut. 2001. Vol. 48, № 6. P. 843–848.
408. Grazi G. L., Mazziotti A., Legnani C. et al. The role of tumor markers in the diagnosis of hepatocellular carcinoma, with special reference to the des-gamma-carboxy prothrombin // Liver Transpl. Surg. 1995. Vol. 1, № 4. P. 249–255.
409. Gregory J. J., Finlay J. L. Alpha-fetoprotein and beta-human chorionic gonadotropin: their clinical significance as tumour markers // Drugs. 1999. Vol. 57, № 4. P. 463–467.
410. Grevengood C., Shulman L. P., Dungan J. S. et al. Severity of abnormality influences decision to terminate pregnancies affected with fetal neural tube defects // Fetal. Diagn. Ther. 1994. Vol. 9, № 4. P. 273–277.
411. Grimm C. F., Ortmann D., Mohr L. et al. Mouse alpha-fetoprotein-specific DNA-based immunotherapy of hepatocellular carcinoma leads to tumor regression in mice // Gastroenterology. 2000. Vol. 119, № 4. P. 1104–1112.
412. Guertin M., La Rue H., Bernier D. et al. Enchancer and promoter elements directing activation and glycocorticoid repression of the alpha-fetoprotein gene in hepatocytes // Mol. Cell Biol. 1988. Vol. 8. P. 1398–1407.
413. Gupta D. K., Kataria R., Sharma M. C. Prepubertal testicular teratomas // Eur. J. Pediatr. Surg. 1999. Vol. 9, № 3. P. 173–176.
414. Haas R. J., Schmidt P., Gubel U., Harms D. Testicular germ cell tumors, an update. Results of the German cooperative studies 1982–1997 // Klin. Padiatr. 1999. Vol. 211, № 4. P. 300–304.
415. Hallenbeck P. L., Chang Y. N., Hay C. et al. A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma // Hum. Gene Ther. 1999. Vol. 10, № 10. P. 1721–1733.
416. Halme L., Karkkdinen P., Isoniemi H. et al. Carbohydrate 19–9 antigen as a marker of non–malignant hepatocytic ductular transformation in patients with acute liver failure. A comparison with alpha-fetoprotein and carcinoembryonic antigen // English. Scand. J. Gastroenterol. 1999. Vol. 34, № 4. P. 426–431.
417. Hamamura K., Shiratori Y., Shiina S. et al. Unique clinical characteristics of patients with hepatocellular carcinoma who present with high plasma des-gamma-carboxy prothrombin and low serum alpha-fetoprotein // Cancer. 2000. Vol. 88, № 7. P. 1557–1564.
418. Hamazaki T., Iiboshi Y., Oka M. et al. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells *in vitro* // FEBS Lett. 2001. Vol. 497, № 1. P. 15–19.
419. Hamazoe R., Hirooka Y., Ohtani S. et al. Intraoperative microwave tissue coagulation as treatment for patients with nonresectable hepatocellular carcinoma // Cancer. 1995. Vol. 75, № 3. P. 794–800.
420. Hamazoe R., Takahashi S., Sumi K. et al. Intraoperative interstitial microwave therapy for recurrent hepatocellular carcinoma of the caudate lobe: a case report // Gan to Kagaku Ryoho. 1997. Vol. 24, № 12. P. 1735–1737.
421. Hanazaki K., Kajikawa S., Koide N. et al. Prognostic factors after hepatic resection for hepatocellular carcinoma with hepatitis C viral infection: univariate and multivariate analysis // Am. J. Gastroenterol. 2001. Vol. 96, № 4. P. 1243–1250.

422. Hancock R. L. Biochemical formulations of embryonic gene control // Med. Hypotheses. 1993. Vol. 40, № 5. P. 287–295.
423. Hansen L. M., Donnenfeld A. E. Concordant anencephaly in monoamniotic twins and an analysis of maternal serum markers // Prenat. Diagn. 1997. Vol. 17, № 5. P. 471–473.
424. Hanson P. R., Belitsky P., Millard O. H., Lannon S. G. Prognostic factors in metastatic nonseminomatous germ cell tumours // Can. J. Surg. 1993. Vol. 36, № 6. P. 537–540.
425. Hautkappe A. L., Lu M., Mueller H. et al. Detection of germ-cell tumor cells in the peripheral blood by nested reverse transcription-polymerase chain reaction for alpha-fetoprotein-messenger RNA and beta human chorionic gonadotropin-messenger RNA // Cancer Res. 2000. Vol. 60, № 12. P. 3170–3174.
426. He P., Tang Z. Y., Ye S. L. et al. The targeted expression of interleukin-2 in human hepatocellular carcinoma cells // J. Exp. Clin. Cancer. Res. 2000. Vol. 19, № 2. P. 183–187.
427. He Y., Keel B. A. Biochemical characterization of bovine alpha-fetoprotein and comparison with human alpha-fetoprotein // Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol. 1994. Vol. 108, № 3. P. 327–336.
428. Herlin D., Koprowski H. Fetuin inhibits zone pellucida hardening and conversion of ZP2 to ZP2f during spontaneous mouse oocyte maturation *in vitro* in the absence of serum // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. Vol. 79. P. 4761–4765.
429. Herrmann H. D., Westphal M., Winkler K. et al. Treatment of nongerminomatous germ – cell tumors of the pineal region // Neurosurgery. 1994. Vol. 34, № 3. P. 524–529.
430. Higashi H., Hirabayashi Y., Fukui Y. et al. Characterization of N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides as tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human colon cancer // Cancer Res. 1985. Vol. 45. P. 3796–802.
431. Hirai H., Taga H., Kaneda H. Alpha-fetoprotein: its diagnostic specificity and therapeutic use of its antibody // Human tumor markers: Biol. Clin. Appl. Proc. 3rd Int. Conf., Lacco Ameno d'Ischia, Naples, Apr. 23–26, 1986. Berlin; New York, 1987. P. 181–201.
432. Hirano T., Kaneko S., Kaneda Y. et al. HVJ-liposome-mediated transfection of HSVtk gene driven by AFP promoter inhibits hepatic tumor growth of hepatocellular carcinoma in SCID mice // Gene Ther. 2001. Vol. 8, № 1. P. 80–83.
433. Hooper D. C., Cohen B. L., Ducas D. et al. Selective inhibition of murine T-cell proliferation and limphokine-activated natural killer cell function by AFP // Biological activities of alpha-fetoprotein. 1987. Vol. 1. P. 153–167.
434. Horbelt D., Delmore J., Meisel R. et al. Mixed germ cell malignancy of the ovary concurrent with pregnancy // Obstet. Gynecol. 1994. Vol. 84, № 4. P. 662–664.
435. Horigome H., Nomura T., Saso K., Itoh M. Standards for selecting percutaneous ethanol injection therapy or percutaneous microwave coagulation therapy for solitary small hepatocellular carcinoma: consideration of local recurrence // Am. J. Gastroenterol. 1999. Vol. 94, № 7. P. 1914–1917.
436. Hsieh C., Wuu J., Trichopoulos D., Adami H. O. Gender of offspring and maternal breast cancer risk // Int. J. Cancer. 1999. Vol. 81, № 3. P. 335–338.
437. Hsu J. J., Hseih T. T., Chiu T. H. et al. Alpha-fetoprotein levels of paired samples between the amniotic fluid and maternal serum from 16 to 18 weeks' gestation in Chinese women // J. Formos. Med. Assoc. 1994. Vol. 93, № 5. P. 374–378.
438. Hsu J. J., Hsieh T. T., Soong Y. K., Spencer K. Comparison of Down's syndrome screening strategies in Asians combining serum free beta-hCG and alpha-fetoprotein with maternal age // Prenat. Diagn. 1997. Vol. 17, № 8. P. 707–716.

439. Hu Z., Fujio K., Marsden E. R. et al. Hepatic regeneration in vitamin A–deficient rats: changes in the expression of transforming growth factor alpha/epidermal growth factor receptor and retinoic acid receptors alpha and beta // Cell. Growth. Differ. 1994. Vol. 5, № 5. P. 503–508.
440. Huderer-Duric K., Skrablin S., Kuvacic I. et al. The triple-marker test in predicting fetal aneuploidy: a compromise between sensitivity and specificity // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2000. Vol. 88, № 1. P. 49–55.
441. Huerta-Enochian G., Katz V., Erfurth S. The association of abnormal alpha-fetoprotein and adverse pregnancy outcome: does increased fetal surveillance affect pregnancy outcome? // Am. J. Obstet. Gynecol. 2001. Vol. 184, № 7. P. 1549–1553.
442. Hunninen P., Soini A., Meltola N. et al. A new microvolume technique for bioaffinity assays using two-photon excitation // Nat. Biotechnol. 2000. Vol. 18, № 5. P. 548–550.
443. Ido A., Uto H., Moriuchi A. et al. Gene therapy targeting for hepatocellular carcinoma: selective and enhanced suicide gene expression regulated by a hypoxia-inducible enhancer linked to a human alpha-fetoprotein promoter // Cancer Res. 2001. Vol. 61, № 7. P. 3016–3021.
444. Igarashi K., Aoyagi Y., Ohkoshi S. et al. Sequence analysis of the proximal promoter region of the human alpha-fetoprotein gene in hepatocellular carcinoma // Cancer Lett. 1994. Vol. 76, № 2. P. 93–99.
445. Inoue H., Iwasaki M., Ogawa J. et al. Pure yolk-sac tumor of the lung // Thorac. Cardiovasc. Surg. 1993. Vol. 41, № 4. P. 249–251.
446. Inoue H., Miyazono N., Hori A. et al. Treatment of hepatocellular carcinoma by intraarterial injection of adriamycin/mitomycin C oil suspension (ADMOS) alone or combined with cis-diaminodichloroplatinum (CDDP) // Acta Radiol. 1993. Vol. 34, № 4. P. 388–391.
447. Ishiguro T., Tsuchida Y. Clinical significance of serum alpha-fetoprotein subfractionation in pediatric diseases // Acta Pediatr. 1994. Vol. 83, № 7. P. 709–713.
448. Ishikawa H., Nakata K., Mawatari F. et al. Utilization of variant-type of human alpha-fetoprotein promoter in gene therapy targeting for hepatocellular carcinoma // Gene Ther. 1999. Vol. 6, № 4. P. 465–470.
449. Ishikawa H., Nakata K., Tsuruta S. et al. Differential regulation of albumin gene expression by heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in alpha-fetoprotein-producing and nonproducing human hepatoma cells // Tumour Biol. 1999. Vol. 20, № 3. P. 130–138.
450. Iwai K., Ishikura H., Inoue T., Yoshiki T. A case of AFP-positive pancreas papillary carcinoma suggestive of a primitive endoderm phenotype // Acta Pathol. Jpn. 1993. Vol. 43, № 7–8. P. 434–439.
451. Iwanowski L., Kupryjanczyk J., Kuchna I. et al. Embryonal carcinoma of the pineal gland with yolk sac tumor differentiation. A case report // Folia. Neuropathol. 1997. Vol. 35, № 2. P. 128–132.
452. Iwasaki M., Furuse J., Yoshino M. et al. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma: a case report // Jpn. J. Clin. Oncol. 1997. Vol. 27, № 4. P. 278–281.
453. Jackson S., Hollingworth T., Macpherson M. Elevated serum alpha-fetoprotein and normal liquor alpha-fetoprotein values in association with an abdominal pregnancy // Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol. 1993. Vol. 33, № 2. P. 214–215.

454. Jacobson H. I., Bennett J. A., Mizejewski G. J. Inhibition of estrogen-dependent breast cancer growth by a reaction product of alpha-fetoprotein and estradiol // Cancer Res. 1990. Vol. 50, № 2. P. 415–420.
455. Jaffa A., Yaron Y., Har-Toov J. et al. Doppler velocimetry of the umbilical artery as a predictor of pregnancy outcome in pregnancies characterized by elevated maternal serum alpha-fetoprotein and normal amniotic fluid alpha-fetoprotein // Fetal. Diagn. Ther. 1997. Vol. 12, № 2. P. 85–88.
456. Jang W. I. Isoaccepting transfer RM's in mammalian differentiated cells // Cancer Res. 1971. Vol. 31, № 5. P. 639–642.
457. Jiao L. R., Hansen P. D., Havlik R. et al. Clinical short-term results of radiofrequency ablation in primary and secondary liver tumors // Am. J. Surg. 1999. Vol. 177, № 4. P. 303–306.
458. Jimena P., Castilla J. A., Ramirez J. P. et al. Follicular fluid alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen, and CA-125 levels in relation to *in vitro* fertilization and gonadotropin and steroid hormone concentrations // Fertil. Steril. 1993. Vol. 59, № 6. P. 1257–1260.
459. Johnson P. J. Role of alpha-fetoprotein in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma // J. Gastroenterol. Hepatol. 1999. Vol. 14. P. 32–36.
460. Johnson P. J. The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma // Clin. Liver. Dis. 2001. Vol. 5, № 1. P. 145–159.
461. Johnson P. J., Poon T. C., Hjelm N. M. et al. Structures of disease-specific serum alpha-fetoprotein isoforms // Br. J. Cancer. 2000. Vol. 83, № 10. P. 1330–1337.
462. Jorgensen F. S., Valentin L., Salvesen K. A. et al. Scandinavian multicenter second trimester obstetric ultrasound and serum screening study // Acta Obstet. Gynecol. Scand. 1999. Vol. 78, № 6. P. 501–510.
463. Kalland T. Physiology of natural killer cells. *in vivo* regulation of progenitors by interleukin-3 // J. Immunol. 1987. Vol. 139. P. 3671–3675.
464. Kallinen J., Heinonen S., Ruundnen M. et al. Antenatal genetic screening for congenital nephrosis // Prenat. Diagn. 2001. Vol. 21, № 2. P. 81–84.
465. Kataoka H., Miura Y., Joh T. et al. Alpha-fetoprotein producing gastric cancer lacks transcription factor ATBF1 // Oncogene. 2001. Vol. 20, № 7. P. 869–873.
466. Kato Y., Tsukada Y., Hara T., Hirai H. Enchanced antitumor activity of mitomycin C conjugated whit anti alpha-fetoprotein antibody by a novel method of conjugation // J. Appl. Biochem. 1983. Vol. 5, № 4–5. P. 313–319.
467. Kato Y., Umemoto N., Kayama Y. et al. A novel method of conjugation of daunomycin with antibody with a poly-L-glutamic acid derivative as intermediate drug carrier. An anti-alpha-fetoprotein antibody-daunomycin conjugate // J. Med. Chem. 1984. Vol. 27, № 12. P. 1602-1607.
468. Katsuragi H., Takahashi K., Suzuki H., Maeda M. Chemiluminescent measurement of peroxidase activity and its application using a lucigenin CT-complex // Luminescence. 2000. Vol. 15, № 1. P. 1–7.
469. Kawahara N., Ohta M., Liu M. et al. Developmental alterations in the alpha-fetoprotein sugar chain in maternal serum analyzed by lectin affinity electrophoresis // Acta Med. Okayama. 1999. Vol. 53, № 3. P. 103–110.
470. Keel B. A., Eddy K. B., Cho S., May J. V. Human alpha-fetoprotein purified from amniotic proliferation *in vitro* // Mol. Reprod. Dev. 1991. Vol. 30. № 2. P. 112–118.

471. Keel B. A., Eddy K. B., He Y. et al. Purified human alpha-fetoprotein inhibits follicule-stimulating hormone-stimulating estradiol production by porcine granulose cell in culture // Mol. Cell. Endocrinol. 1993. Vol. 94, № 1. P. 21–25.
472. Keel B. A., Eddy K. B., Cho S., May J. V. Synergistic action of purified alpha-fetoprotein and growth factors on the proliferation of porcine granulosa cells in monolayer culture // Endocrinology. 1991. Vol. 129, № 1. P. 217–225.
473. Khalifa A., Mady E. A., Abadeer N., Kamal A. Differential tumor markers and hepatitis markers profile in liver tumors // Anticancer Res. 1999. Vol. 19, № 4. P. 2495–2500.
474. Khan K. N., Nakata K., Nakao K. et al. Use of FDP and F1P aldolase to detect tumorous and nontumorous tissue damage by ethanol injection of hepatocellular carcinoma // Dig. Dis. Sci. 1999. Vol. 44, № 8. P. 1610–1618.
475. Kienle P., Weitz J., Klaes R. et al. Detection of isolated disseminated tumor cells in bone marrow and blood samples of patients with hepatocellular carcinoma // Arch. Surg. 2000. Vol. 135, № 2. P. 213–218.
476. Kim S. H., Song S. H., Kim Y. J., Park S. Y. Expression and characterization of a recombinant Fab fragment derived from an anti-human alpha-fetoprotein monoclonal antibody // Mol. Cells. 2001. Vol. 11, № 2. P. 158–163.
477. Kim S. Y., Kim S. K., Lee J. S. et al. The prediction of adverse pregnancy outcome using low unconjugated estriol in the second trimester of pregnancy without risk of Down's syndrome // Yonsei Med. J. 2000. Vol. 41, № 2. P. 226–229.
478. Kirikae M., Arai H., Hidaka T. et al. Pineal yolk sac tumor in 65-year-old man // Surg. Neurol. 1994. Vol. 42, № 3. P. 253–258.
479. Kishida T., Hoshi N., Hattori R. et al. Efficacy of maternal serum screening in the prenatal detection of fetal chromosome abnormalities in Japanese women // Fetal. Diagn. Ther. 2000. Vol. 15, № 2. P. 112–117.
480. Kitagawa T., Yokochi T., Sugano H. Alpha-fetoprotein and hepatocarcinogenesis in rats fed 3'-methyl-4-(diamino)azobenzene and N-2-fluorenylacetate // Int. J. Cancer. 1972. Vol. 10. P. 368–381.
481. Klapdor R. Arbeistsgruppe Qualitaskontrolle und Standardisierung von Tumormarker – test im Rahmen der Hamburger Symposien uber Tumormarker // Tumordiagn. Ther. 1992. Vol. 13. P. 9–12.
482. Knox W. E. Enzyme patters in fetal, adult and neoplastic rat tissues. 2-nd ed. Basel Karger, 1976. 359 p.
483. Kobayashi K., Yamashita Y., Kamachi M. et al. Microspectrophotometric analysis of nuclear DNA contents related to the presence of alpha-fetoprotein in human hepatocellular carcinoma // Gan. To. Kagaku. Ryoho. 1994. Vol. 21, № 1. P. 95–101.
484. Koide N., Nishio A., Igarashi J. et al. Alpha-fetoprotein-producing gastric cancer: histochemical analysis of cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis // Am. J. Gastroenterol. 1999. Vol. 94, № 6. P. 1658–1663.
485. Kokuba Y., Otani Y., Kakita A., Yamashita K. Establishment of alpha-fetoprotein producing human rectal cancer cell line (RKK-YK) and its features // Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi. 1999. Vol. 96, № 7. P. 809–816.
486. Konno T., Kai Y., Yamashita R. et al. Targeted chemotherapy for unresectable primary and metastatic liver cancer // Acta Oncol. 1994. Vol. 33, № 2. P. 133–137.
487. Koprowski H., Steplewski Z. Monoclon. Antibodies and T-cell Hybridomas / Eds. Hammerling O. et al. Amsterdam: Elsevier, 1981. P. 161.

488. Krause T. G., Christens P., Wohlfahrt J. et al. Second-trimester maternal serum alpha-fetoprotein and risk of adverse pregnancy outcome (1) // Obstet. Gynecol. 2001. Vol. 97, № 2. P. 277–282.
489. Kreczko S., Lipska A., Wysocka J. Alpha-fetoprotein: diagnostic value in hepatic disorders // Pol. Merkuriusz Lek. 2000. Vol. 8, № 48. P. 420–423.
490. Kreienberg R. Die Bedeutung von Tumormarkern in gynakologischen Oncologie und beim mammakarzinom. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1984.
491. Kulkarni J. N., Kamat M. R. Value of tumor markers in nonseminomatous germ cell tumor of the testis // Eur. Urol. 1993. Vol. 24, № 2. P. 166–171.
492. Kumar Dhar D., Kubota H., Tabara H. et al. Nm23 in the primary and metastatic sites of gastric carcinoma. Relation to AFP-producing carcinoma // Oncology. 1999. Vol. 56, № 2. P. 122–128.
493. Kunitomi M., Takayama E., Suzuki S. et al. Selective inhibition of hepatoma cells using diphtheria toxin A under the control of the promoter/enhancer region of the human alpha-fetoprotein gene // Jpn. J. Cancer Res. 2000. Vol. 91, № 3. P. 343–350.
494. Kuo J. Y., Chin T., Hsieh Y. L. et al. Observations after orchiectomy in clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors of the testis // Chung. Hua. I Hsueh. Tsa. Chih. (Taipei). 1999. Vol. 62, № 6. P. 356–361.
495. Kusumoto J., Nakata K., Vuro T. et al. Serotherapy of AFP–producing tumors with the purified antibody to AFP // Oncodevelop. Biol. and Med. 1983. Vol. 4, № 6. P. 95–100.
496. Kuwashima Y., Uehara T., Kishi K. et al. Immunohistochemical characterization of undifferentiated carcinomas of the ovary // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1994. Vol. 120, № 11. P. 672–677.
497. Laborda J., Naval J., Allouche M. et al. Specific uptake of alpha-fetoprotein by malignant human lymphoid cell // Int. J. Cancer. 1987. Vol. 40. P. 314–318.
498. Lakhoo K., Boyle M., Drake D. P. Mediastinal teratomas: review of 15 pediatric cases // J. Pediatr. Surg. 1993. Vol. 28, № 9. P. 1161–1164.
499. Lamertz R., Fateh–Moghadam A. Carcinofetale antigene: alpha-fetoprotein // Klin. Wochenschr. 1975. Vol. 53. P. 147–169.
500. Lamertz R., Reithmeier A., Stieber P. Role of blood markers in the detection metastases from primary breast cancer // Diagn. Oncol. 1991. Vol. 1. P. 88–97.
501. Lamertz R., Stieber P., Borlinghaus K. Tumor markers in cancer of the liver // Diagn. Oncol. 1991. Vol. 1. P. 363–372.
502. Lampreave F., Alava M. A., Pineiro A. Concanavalin A crossed affinoimmunoelectrophoretic analysis of the major pig serum proteins during fetal development // Electrophoresis. 1993. Vol. 14, № 3. P. 214–219.
503. Lanman J. T. Transplantation immunity mammalian pregnancy: mechanisms of fetal protection against immunologic rejection // J. Pediatr. 1965. Vol. 66, № 3. P. 525–540.
504. Lassam N., Jay G. Supression of MHC class I RNA in higly oncogenic cells occurs at the level of transcription initiation // J. Immunol. 1989. Vol. 143, № 11. P. 3792–3797.
505. Lazarevich N. L. Molecular mechanisms of alpha-fetoprotein gene expression // Biochemistry (Mosc.). 2000. Vol. 65, № 1. P. 117–133.
506. Leal J. A., May J. V., Keel B. A. Human alpha-fetoprotein enhances epidermal growth factor proliferative activity upon porcine granulosa cells in monolayer culture // Endocrinol. 1990. Vol. 126, № 1. P. 669–671.

507. Lee A. C., Chan G. C., Fung C. F. et al. Paradoxical response of a pineal immature teratoma to combination chemotherapy // Med. Pediatr. Oncol. 1995. Vol. 24, № 1. P. 53–57.
508. Lee K. C., Crowe A. J., Barton M. C. p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression by specific DNA binding // Mol. Cell. Biol. 1999. Vol. 19, № 2. P. 1279–1288.
509. Leffert H., Moran T., Sell S. Growth state-dependent phenotype of adult hepatocytes in primary monolayer cultures // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. Vol. 75. P. 1834–1838.
510. Lemoine A., Le-Bricon T., Salvucci M. et al. Prospective evaluation of circulating hepatocytes by alpha-fetoprotein mRNA in humans during liver surgery // Ann. Surg. 1997. Vol. 226, № 1. P. 43–50.
511. Leung W. T., Lau W. Y., Ho S. et al. Selective internal radiation therapy with intra arterial iodine-131-Lipoidol in inoperable hepatocellular carcinoma // J. Nucl. Med. 1994. Vol. 35, № 8. P. 1318–1320.
512. Levy R. Biologicals for cancer treatment: Monoclonal antibodies // Hosp. Pract. 1985. Vol. 20. P. 67–84.
513. Lin J. N., Wang K. L., Hung I. J., Yang C. P. Management of yolk sac tumor of the testis in children // J. Formos. Med. Assoc. 1994. Vol. 93, № 5. P. 393–396.
514. Lindhout D., Omtzigt J. G. Teratogenic effects of antiepileptic drugs: implications for the management of epilepsy in women of childbearing age // Epilepsia. 1994. Vol. 35, № 4. P. 19–28.
515. Line B. R., Feustel P. J., Festin S. M. et al. Scintigraphic detection of breast cancer xenografts with Tc-99m natural and recombinant human alpha-fetoprotein // Cancer Biother. Radiopharm. 1999. Vol. 14, № 6. P. 485–494.
516. Liu D. L., Xia S., Tang J. et al. Allotransplantation of whole spleen in patients with hepatic malignant tumors or hemophilia A. Operative technique and preliminary results // Arch. Surg. 1995. Vol. 130, № 1. P. 33–39.
517. Liu Y., Chiu J. F. Transactivation and repression of the alpha-fetoprotein gene promoter by retinoid X receptor and chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor // Nucleic. Acids Res. 1994. Vol. 22, № 6. P. 1079–1086.
518. Livraghi T., Lazzaroni S., Pellicano S. et al. Percutaneous ethanol injection of hepatic tumors: single-session therapy with general anesthesia // AJR. Am. J. Roentgenol. 1993. Vol. 161, № 5. P. 1065–1069.
519. Llovet J. M., Sala M., Castells L. et al. Randomized controlled trial of interferon treatment for advanced hepatocellular carcinoma // Hepatology. 2000. Vol. 31, № 1. P. 54–58.
520. Loft A. G., Hogdall E., Larsen S. O., Norgaard-Pedersen B. A comparison of amniotic fluid alpha-fetoprotein and acetylcholinesterase in the prenatal diagnosis of open neural tube defects and anterior abdominal wall defects // Prenat. Diagn. 1993. Vol. 13, № 2. P. 93–109.
521. Louha M., Nicolet J., Zylberberg H. et al. Liver resection and needle liver biopsy cause hematogenous dissemination of liver cells // Hepatology. 1999. Vol. 29, № 3. P. 879–882.
522. Lowe C. J., Riepe S. P., Wood W. C. Hepatocellular carcinoma presenting as a pancreatic head mass: report of an unusual case // Am. J. Clin. Oncol. 1997. Vol. 20, № 5. P. 509–510.

523. Lu C. Y., Changelian P. S., Unanue E. R. Alpha-fetoprotein inhibits macrophage expression of Ia antigens // Jornal of immunology. 1984. Vol. 132, № 4. P. 1722–1777.
524. Lui W. Y., P'eng F. K., Chang Y. F. et al. Analysis of glucocorticoid receptors in human hepatocellular carcinoma and HepG2 cells // Hepatology. 1993. Vol. 18, № 5. P. 1167–1174.
525. Lutsenko S. V., Feldman N. B., Finakova G. V. et al. Antitumor activity of alpha-fetoprotein and epidermal growth factor conjugates *in vitro* and *in vivo* // Tumour Biol. 2000. Vol. 21, № 6. P. 367–374.
526. Lypinard C., Descamps P., Meneguzzi G. et al. Prenatal diagnosis of pyloric atresia-junctional epidermolysis bullosa syndrome in a fetus not known to be at risk // Prenat. Diagn. 2000. Vol. 20, № 1. P. 70–75.
527. Ma Z. M., Feng Y. Z., Zhou X. R. Rational surgical approaches to the treatment of small primary liver cancer, and the prevention of postoperative recurrence // Chung. Hua. Wai. Ko. Tsa. Chih. 1994. Vol. 32, № 1. P. 31–34.
528. Macri P., Gordon J. W. Delayed morbidity and mortality of albumin/SV40 T-antigen transgenic mice after insertion of an alpha-fetoprotein/herpes virus thymidine kinase transgene and treatment with ganciclovir // Hum. Gene. Ther. 1994. Vol. 5, № 2. P. 175–182.
529. Maisin A., Wassiliadis V., Picard K. Essais d'organotherapie et de metallotherapie des cancers de la peau chez l'homme // Bull. Assoc. franc. etude du cancer. 1932. Vol. 21, № 4. P. 254.
530. Markens S., Browner C. H., Press N. Because of the risks: how US pregnant women account for refusing prenatal screening // Soc. Sci. Med. 1999. Vol. 49, № 3. P. 359–369.
531. Martinez-Cerezo F. J., Puig M., Martinez-Nogueras A. et al. Value of ultrasonography in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma // Rev. Esp. Enferm. Dig. 1993. Vol. 84, № 5. P. 311–314.
532. Masuda K., Nagata S., Hirano K. et al. Cytotoxicity induced by monoclonal antibody to alpha-fetoprotein coadministered with spleen cells of nude mice // Microbiol. Immunol. 1993. Vol. 37, № 2. P. 165–167.
533. Masuda K., Nagata S., Hirano K. et al. Elevated serum alpha-fetoprotein level of nude mice bearing hepatoma cells by treatment with monoclonal antibodies to alpha-fetoprotein // Biochem. Biophys. Acta. 1993. Vol. 1182, № 2. P. 128–132.
534. Matsumura M., Niwa Y., Kato N. et al. Detection of alpha-fetoprotein mRNA, an indicator of hematogenous spreading hepatocellular carcinoma, in the circulation: a possible predictor of metastatic hepatocellular carcinoma // Hepatology. 1994. Vol. 20, № 6. P. 1418–1425.
535. Matsumura M., Shiratori Y., Niwa Y. et al. Presence of alpha-fetoprotein mRNA in blood correlates with outcome in patients with hepatocellular carcinoma // J. Hepatol. 1999. Vol. 31, № 2. P. 332–339.
536. Matsusaka S., Tsujimura T., Toyosaka A. et al. Role of c-kit receptor tyrosine kinase in development of oval cells in the rat 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model // Hepatology. 1999. Vol. 29, № 3. P. 670–676.
537. Matsuura E., Kang Y., Kitakawa H. et al. Modulation of T-cell function by alpha-fetoprotein: an *in vivo* study on porcine thyroid peroxidase-induced experimental autoimmune thyroiditis in transgenic mice producing human alpha-fetoprotein // Tumour Biol. 1999. Vol. 20, № 3. P. 162–171.

538. Mazumdar M., Bajorin D. F., Bacik J. et al. Predicting outcome to chemotherapy in patients with germ cell tumors: the value of the rate of decline of human chorionic gonadotrophin and alpha-fetoprotein during therapy // J. Clin. Oncol. 2001. Vol. 19, № 9. P. 2534–2541.
539. Mazume H., Nakata K., Hida D. et al. Effect of simvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, on alpha-fetoprotein gene expression through interaction with the ras-mediated pathway // J. Hepatol. 1999. Vol. 30, № 5. P. 904–910.
540. McCluggage W. G., Maxwell P., Patterson A., Sloan J. M. Immunohistochemical staining of hepatocellular carcinoma with monoclonal antibody against inhibin // Histopathology. 1997. Vol. 30, № 6. P. 518–522.
541. McLean M., Bisits A., Davies J. et al. Predicting risk of preterm delivery by second-trimester measurement of maternal plasma corticotropin-releasing hormone and alpha-fetoprotein concentrations // Am. J. Obstet. Gynecol. 1999. Vol. 181, № 1. P. 207–215.
542. McMichael J. Immunotherapeutic methods and composition employing antigens characteristic of malignant neoplasms. USA Patent. 1990. № 4966753. A61K 39/00.
543. Melbye M., Wohlfahrt J., Lei U. et al. Alpha-fetoprotein levels in maternal serum during pregnancy and maternal breast cancer incidence // J. Natl. Cancer. Inst. 2000. Vol. 92, № 12. P. 1001–1005.
544. Mermod J. J., Bourgeois S., Defer N. Demetilation and expression of murine mammary tumor proviruses in mouse thymoma cell lines // PNAS. 1983. Vol. 80, № 1. P. 110–114.
545. Mesfin F. B., Bennett J. A., Jacobson H. I. et al. Alpha-fetoprotein-derived antiestrotrophic octapeptide // Biochem. Biophys. Acta. 2000. Vol. 1501, № 1. P. 33–43.
546. Miller R., Stephan M. J., Hume R. F. et al. Extreme elevation of maternal serum alpha-fetoprotein associated with mosaic trisomy 8 in a liveborn // Fetal. Diagn. Ther. 2001. Vol. 16, № 2. P. 120–122.
547. Millner S. N. Effect of incorrect gestational dating on Down's syndrome and neural tube risk assessment // Ann. Clin. Biochem. 2001. Vol. 38. P. 230–234.
548. Minata M., Nishida N., Komeda T. et al. Postoperative detection of alpha-fetoprotein mRNA in blood as a predictor for metastatic recurrence of hepatocellular carcinoma // J. Gastroenterol. Hepatol. 2001. Vol. 16, № 4. P. 445–451.
549. Mintz B., Illmensee K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1975. Vol. 72. P. 3585–3589.
550. Mita Y., Aoyagi Y., Suda T. Plasma fucosyltransferase activity in patients with hepatocellular carcinoma, with special reference to correlation with fucosylated species of alpha-fetoprotein // J. Hepatol. 2000. Vol. 32, № 6. P. 946–954.
551. Mitelman F., Kaneko Y., Trent J. Report of the commitee of chromosome changes in neoplasia // Cytogenet. Cell. Genet. 1991. Vol. 58, № 3–4. P. 1053–1079.
552. Miyamoto A., Nagano H., Sakon M. et al. Clinical application of quantitative analysis for detection of hematogenous spread of hepatocellular carcinoma by real-time PCR // Int. J. Oncol. 2001. Vol. 18, № 3. P. 527–532.
553. Mizejewski G. J., Phillips L., Stoll W. *in vitro* studies of the abortogenic potential of anti-serum to alpha-fetoprotein // Int. J. Immunopharmacol. 1981. Vol. 3. P. 87–95.
554. Mizejewski G. J. Alpha-fetoprotein binding proteins: implications for transmembrane passage and subcellular localization // Life Sci. 1994. Vol. 56, № 1. P. 1–9.
555. Mizejewski G. J. Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants // Exp. Biol. Med. (Maywood). 2001. Vol. 226, № 5. P. 377–408.

556. Mizejewski G. J. Title alpha-fetoprotein as a biologic response modifier: Relevance to domain and subdomain structure // Full source Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1997. Vol. 215, № 4. P. 333–362.
557. Mondazzi L., Bottelli R., Brambilla G. et al. Transarterial oily chemoembolization for the treatment of hepatocellular carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors // Hepatology. 1994. Vol. 19, № 5. P. 1115–1123.
558. Mooney E. E., Nogales F. F., Tavassoli F. A. Hepatocytic differentiation in retiform Sertoli-Leydig cell tumors: distinguishing a heterologous element from Leydig cells // Hum. Pathol. 1999. Vol. 30, № 6. P. 611–617.
559. Moran C. A., Suster S. Mediastinal yolk sac tumors associated with prominent multilocular cystic changes of thymic epithelium: a clinicopathologic and immunohistochemical study of five cases // Mod. Pathol. 1997. Vol. 10, № 8. P. 800–803.
560. Moran C. A., Suster S. Hepatoid yolk sac tumors of the mediastinum: a clinicopathologic and immunohistochemical study of four cases // Am. J. Surg. Pathol. 1997. Vol. 21, № 10. P. 1210–1214.
561. Motoyama T., Aizawa K., Fujiwara T. et al. Coexistence of choriocarcinoma and hepatoid adenocarcinoma in the stomach // Pathol. Int. 1994. Vol. 44, № 9. P. 716–721.
562. Murayama Y., Tadakuma T., Kunitomi M. et al. Cell-specific expression of the diphtheria toxin A-chain coding sequence under the control of the upstream region of the human alpha-fetoprotein gene // J. Surg. Oncol. 1999. Vol. 70, № 3. P. 145–149.
563. Murgita R., Tomasi T. Suppression of the immune response by alpha-fetoprotein // J. Exp. Med. 1975. Vol. 141. P. 117–121.
564. Murgita R. A., Goidl E. A., Kontianen S., Wigzell H. Alpha-fetoprotein induces suppressor T-cells *in vitro* // Nature. 1977. Vol. 267, № 5608. P. 257–259.
565. Murphy B. A., Motzer R. J., Vlamis M. et al. Serum tumor marker decline is early predictor of treatment outcome in germ cell tumor patients treated with cisplatin and fosfamide salvage chemotherapy // Cancer. 1994. Vol. 73, № 10. P. 2520–2526.
566. Naitoh A., Aoyagi Y., Asakura H. Highly enhanced fucosylation of serum glycoproteins in patients with hepatocellular carcinoma // J. Gastroenterol. Hepatol. 1999. Vol. 14, № 5. P. 436–445.
567. Nakamura K., Kubo A., Hosokawa S. et al. Effect of alpha-interferon on anti-alpha-fetoprotein-monoclonal-antibody targeting of hepatoma // Oncology. 1993. Vol. 50, № 1. P. 35–40.
568. Natali P. G., Nicotra M. R., Bigotti A. et al. Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors // Proc. Natl. Acad. Sci. 1989. Vol. 86, № 17. P. 6719–6723.
569. Nawa A., Obata N., Kikkawa F. et al. Prognostic factors of patients with yolk sac tumors of the ovary // Am. J. Obstet. Gynecol. 2001. Vol. 184, № 6. P. 1182–1188.
570. Nemoto H., Midorikawa T., Nagasaki H. et al. A case of AFP-producing gastric cancer responding to low-dose CPT-11 and low-dose cisplatin combination chemotherapy // Gan To Kagaku Ryoho. 2001. Vol. 28, №3. P. 387–390.
571. Nesin M., Seymour C., Kim Y. Role of elevated alpha-fetoprotein in prenatal diagnosis of junctional epidermolysis bullosa and pyloric atreria // Am. J. Perinatol. 1994. Vol. 11, № 4. P. 286–287.
572. Ng F. H., Chow K. C., Cheng C. S. et al. High alpha-fetoprotein level in HCV-related nodular liver cell dysplasia // Am. J. Gastroenterol. 1999. Vol. 94, № 8. P. 2296–2297.

573. Niimi T., Kajita M., Saito H. Successful treatment with cisplatin-based chemotherapy and post-chemotherapy operation for mediastinal nonseminomatous germ cell tumor with pulmonary metastasis // Nippon. Kyobu. Shikkan. Gakkai. Zasshi. 1993. Vol. 31, № 11. P. 1478–1484.
574. Nishi S. Isolation and characterization of a human fetal alpha-globulin from the sera of fetuses and a hepatoma patient // Cancer Res. 1970. Vol. 30. P. 2507–2513.
575. Nishihira J., Koyama Y., Sakai M., Nishi S. The fatty acid binding site of human alpha-fetoprotein // Biohem. Biophys. Res. Commun. 1993. Vol. 196, № 3. P. 1049–1057.
576. Nokura K., Yamamoto H., Okawara Y. et al. Reversible limbic encephalitis caused by ovarian teratoma // Acta Neurol. Scand. 1997. Vol. 95, № 6. P. 367–373.
577. Nonomura N., Imazu T., Harada Y. et al. Molecular staging of testicular cancer using polymerase chain reaction of the testicular cancer-specific genes // Hinyokika Kiyo. 1999. Vol. 45, № 8. P. 593–597.
578. Nunes E. A. Biological role of alpha-fetoprotein in the endocrinological field: data and hypoteses // Tumour. Biol. 1994. Vol. 15, № 2. P. 63–72.
579. Nunez E., Englemann G., Benassayag C. et al. Identification et purificaiton preliminaire de la foetoproteine liant les oestrogenes dans le serum de rats nouveau-nes // C. R. Acad. Sci. (Paris). 1971. Vol. 273. P. 831–834.
580. Nunez E. A. Free fatty acids as modulators of the steroid hormone message // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 1993. Vol. 48. P. 63–70.
581. O'Connell M. P., Holding S., Morgan R. J. Biochemical screening for Down syndrome: patients' perception of risk // Int. J. Gynaecol. Obstet. 2000. Vol. 68, № 3. P. 215–218.
582. O'Connor G., Tatarinov Y. S., Abelev G. I. et al. Collaborative study from the evaluation of serological test for primary liver cancer // Cancer. 1970. Vol. 25. P. 1091–1098.
583. Odell W. D. Glucopeptide hormones and neoplasms // N. Engl. J. Med. 1977. Vol. 297, № 1. P. 609–610.
584. Ogden S. K., Lee K. C., Barton M. C. Hepatitis B viral transactivator HBx alleviates p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275, № 36. P. 27806–27814.
585. Ohashi M., Kanai F., Tateishi K. et al. Target gene therapy for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by E1B55k-attenuated adenovirus // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. Vol. 282, № 2. P. 529–535.
586. Ohta H., Kuroda K., Mafune Y. et al. Clinical study on liver metastasis of AFP-producing gastric cancer – characteristic findings of angiography // Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi. 1999. Vol. 96, № 8. P. 941–946.
587. Okada S., Okazaki N., Nose H. et al. A phase 2 study of cisplatin in patients with hepatocellular carcinoma // Oncology. 1993. Vol. 50, № 1. P. 22–26.
588. Okai Y. Heterogeneous macrophage-activating factors from extracellular matrix of human embryo fibroblasts // Immunol. Lett. 1988. Vol. 17, № 2. P. 145–149.
589. Okamoto T., Hirabayashi K., Ishiguro T. Immunohistochemical type distinction of alpha-fetoprotein in various alpha-fetoprotein-secreting tumors // Jpn. J. Cancer Res. 1993. Vol. 84, № 4. P. 360–364.
590. Okusaka T., Okada S., Ueno H. et al. Evaluation of the therapeutic effect of transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma // Oncology. 2000. Vol. 58, № 4. P. 293–299.
591. Olinescu A., Laky M., Pofescu D. E. et al. The effect of alpha-fetoprotein on the im-

mune response. III. Diminution of the phagocytic capacity of macrophages cultures *in vitro* in the presence of mouse amniotic fluid or alpha-fetorprotein // Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol. 1977. Vol. 36, № 3–4. P. 247–253
592. O'Neal W. K., Rose E., Zhou H. et al. Multiple advantages of alpha-fetoprotein as a marker for *in vivo* gene transfer // Mol. Ther. 2000. Vol. 2, № 6. P. 640–648.
593. Ono N., Isobe I., Uki J. et al. Recurrence of primary intracranial germinomas after complete response with radiotherapy: recurrence patterns and therapy // Neurosurgery. 1994. Vol. 35, № 4. P. 615–621.
594. Onoe T., Dempo K., Kaneko A. Significance of alpha-fetoprotein appearance in the early stage of azo-dye carcinogenesis // Alpha-fetoprotein and Hepatoma / Ed. by Hirai H., Miyagy T. Baltimore. Univ. Park Press. 1973. Vol. 14. P. 233–247.
595. Ostor A. G., McNaughton W. M., Fortune D. W. et al. Rectal adenocarcinoma with germ cell elements treated with chemotherapy // Pathology. 1993. Vol. 25, № 3. P. 243–246.
596. Packer R. J., Cohen B. H., Cooney K. Intracranial germ cell tumors // Oncologist. 2000. Vol. 5, № 4. P. 312–320.
597. Paner G. P., Thompson K. S., Reyes C. V. Hepatoid carcinoma of the pancreas // Cancer. 2000. Vol. 88, № 7. P. 1582–1589.
598. Pare J. F., Roy S., Galarneau L., Belanger L. The mouse fetoprotein transcription factor (FTF) gene promoter is regulated by three GATA elements with tandem E box and Nkx motifs, and FTF in turn activates the Hnf3beta, Hnf4alpha, and Hnf1alpha gene promoters // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, № 16. P. 13136–13144.
599. Pazdur R., Moore D. F., Bready B. et al. Phase II trial of edatrexate in patients with advanced hepatocellular carcinoma // Ann. Oncol. 1994. Vol. 5, № 7. P. 646–648.
600. Peck A. B., Murgita R. A., Wigzell H. Cellular and genetic restrictions in the immunoregulatory activiti of alpha-fetoprotein. III. Role of the MLC-stimulating cell population in alpha-fetoprotein-inducted suppression of T-cell-mediated cytotoxicity // Jornal of immunology. 1982. Vol. 128, № 3. P. 1134–1140.
601. Peck A. B., Murgita R. A., Wigzell H. Cellular and genetic restrictions in the immunoregulatory activiti of AFP. II. AFP-induced suppression of cytotoxic T-lymphocyte development // J. Exp. Med. 1978. Vol. 148, № 2. P. 360–372.
602. Penttila I. M., Ryynanen M., Hamalainen E. et al. Quality specifications for S-AFP and S-HCG-beta determinations for screening of fetal abnormalities // Ups. J. Med. Sci. 1993. Vol. 98, № 3. P. 375–380.
603. Peyton D. K., Huang M. C., Giglia M. A. et al. The alpha-fetoprotein promoter is the target of Afr1-mediated postnatal repression // Genomics. 2000. Vol. 63, № 2. P. 173–180.
604. Phillips J. H., Gemlo G. T., Myers W. W. *in vivo* and *in vitro* activation of natural killer cells in advanced cancer patients undergoing combined recombinant interleukin-2 and LAK cell therapy // J. Clin. Oncol. 1987. Vol. 5. P. 1933.
605. Prager M. Immunological Aspects of Cancer / Ed. by Castro J. Lancaster. MTP. Press, 1978. P. 313–356.
606. Przibram H. Experimental Zoologie 2. Regeneration. Leipzig; Wien; Denticke, 1909. 243 p.
607. Qiao L., Wu P., Ghaleb A. H., Pizzoli J. G. et al. Bivariate flow cytometric of p53 and DNA content in hepatocellular carcinoma // Anal. Quant. Cytol. Histol. 1994. Vol. 16, № 2. P. 124–130.

608. Qiao L., Zhao L.Y., Rong S.B. et al. Rational design, synthesis, and biological evaluation of rigid pyrrolidone analogues as potential inhibitors of prostate cancer cell growth // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2001. Vol. 11, № 8. P. 955–959.
609. Rabbani F., Sheinfeld J., Farivar-Mohseni H. et al. Low-volume nodal metastases detected at retroperitoneal lymphadenectomy for testicular cancer: pattern and prognostic factors for relapse // J. Clin. Oncol. 2001. Vol. 19, № 7. P. 2020–2025.
610. Rabek J. P., Papaconstantinou J. Interference mapping of nuclear protein binding to the acute phase response element of the mouse alpha1 acid glycoprotein gene // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999. Vol. 255. P. 608–613.
611. Rabek J. P., Zhang D. E., Torres-Ramos C. A., Papaconstantinou J. Analysis of the mechanism of glucocorticoid-mediated down regulation of the mouse alpha-fetoprotein gene // Biochem. Biophys. Acta. 1994. Vol. 1218, № 2. P. 136–144.
612. Raedle J., Oremek G., Roth W. K. et al. Anti-p53 autoantibodies in hepatitis C virus-infected patients // Anticancer Res. 1997. Vol. 17, № 4. P. 3079–3081.
613. Rebischung C., Pautier P., Morice P. et al. Alpha-fetoprotein production by a malignant mixed Mallerian tumor of the ovary // Gynecol. Oncol. 2000. Vol. 77, № 1. P. 203–205.
614. Rescorla F., Billmire D., Stolar C. et al. The effect of cisplatin dose and surgical resection in children with malignant germ cell tumors at the sacrococcygeal region: a pediatric intergroup trial (POG 9049/CCG 8882) // J. Pediatr. Surg. 2001. Vol. 36, № 1. P. 12–17.
615. Robbin M., Filly R. A., Fell S. et al. Elevated levels of amniotic fluid alpha-fetoprotein: sonographic evaluation // Comment in: Radiology. 1993. Vol. 188, № 1. P. 17–18; Radiology. 1993. Vol. 188, № 1. P. 165–169.
616. Roberts D., Walkinshaw S. A., McCormack M. J., Ellis J. Prenatal detection of trisomy 21: combined experience of two British hospitals // Prenat. Diagn. 2000. Vol. 20, № 1.P. 17–22.
617. Rodriguez J. G., Porter H. J., Andrews H. S., Soothill P. W. Placental lessions: is growth a predictor of bad outcome? // Fetal. Diagn. Ther. 1997. Vol. 12, № 3. P. 163–166.
618. Runyon B. A. Malignancy-related ascites and ascitic fluid «humoral tests of malignancy» // J. Clin. Gastroenterol. 1994. Vol. 18, № 2. P. 94–98.
619. Ruoslahti E., Pihko H., Seppala M. Alpha-fetoprotein: immunochemical purification and chemical properties. Expression in normal state and in malignant and non-malignant liver disease // Transplant. Rev. 1974. Vol. 20. P. 38–60.
620. Ruoslahti E., Seppala M. Studies on carcino-fetal proteins. III. Development of radioimmunoassay for alpha-fetoprotein. Demonstration of alpha-fetoprotein in serum of healthy human adults // Int. J. Cancer. 1971. Vol. 8. P. 374–383.
621. Ruther U., Rothe B., Grunert K. et al. Role of human chorionic gonadotropin in patients with pure seminoma // Eur. Urol. 1994. Vol. 26, № 2. P. 129–133.
622. Ryty R., Virtanen A., Koskinen P. et al. Maternal midtrimester serum AFP and free beta-hCG levels in *in vitro* fertilization twin pregnancies // Prenat. Diagn. 2000. Vol. 20, № 3. P. 221–223.
623. Sadamoto Y., Koujima M., Itaba S. et al. A case of advanced hepatocellular carcinoma with lung and bone metastases effectively treated by orally administered UFT // Gan To Kagaku Ryoho. 2000. Vol. 27, № 3. P. 471–473.
624. Sakai N., Yamada H., Andoh T. et al. Long-term survival in malignant intracranial germ-cell tumors: a report of two cases and a review of the literature // Childs. Nerv. Syst. 1993. Vol. 9, № 7. P. 431–436.

625. Sakai Y., Kaneko S., Sato Y. et al. Gene therapy for hepatocellular carcinoma using two recombinant adenovirus vectors with alpha-fetoprotein promoter and Cre/lox P system //J. Virol. Methods. 2001. Vol. 92, № 1. P. 5–17.
626. Sakamoto T., Liu Z., Murase N. et al. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy // Hepatology. 1999. Vol. 29, № 2. P. 403–411.
627. Sakisaka S., Watanabe M., Tateishi H. et al. Erythropoietin production in hepatocellular carcinoma cells associated with polycythemia: immunohistochemical evidence // Hepatology. 1993. Vol. 18, № 6. P. 1357–1362.
628. Salerno C., Crepaldi T., Savoia P. Expression of HLA class I antigens in human tumors and their involvement in tumor growth // Ric. Clin. Lab. 1990. Vol. 20, № 2. P. 85–93.
629. Salonen R., Turpeinen U., Kurki L. et al. Maternal serum screening for Down's syndrome on population basis // Acta Obstet Gynecol. Scand. 1997. Vol. 76, № 9. P. 817–821.
630. Sanches R., D'Incan C., Kuiper M. et al. Autologous fibroblasts as potential vehicle for regional ovarian cancer gene therapy // Adv. Exp. Med. Biol. 1998. Vol. 451. P. 331–334.
631. Sanches R., Kuiper M., Penault-Llorca F. et al. Antitumoral effect of interleukin-12-secreting fibroblasts in a mouse model of ovarian cancer: implications for the use of ovarian cancer biopsy-derived fibroblasts as a vehicle for regional gene therapy // Cancer Gene Ther. 2000. Vol. 7, № 5. P. 707–720.
632. Sangiovanni A., Colombo E., Radaelli F. et al. Hepatocyte proliferation and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients // Am. J. Gastroenterol. 2001. Vol. 96, № 5. P. 1575–1580.
633. Sato D., Kase T., Tajima M. et al. Clinical study of urine basic fetoprotein and urine polyamine as tumor markers in epithelial cancer of the urinary tract // Int. J. Urol. 2001. Vol. 8, № 5. P. 217–221.
634. Savill J. Apoptosis and kidney // J. Am. Soc. Nephrol. 1994. Vol. 5, № 1. P. 12–21.
635. Savitsky A. A., Gukasova N. V., Gumanov S. G. et al. Cytotoxic action of conjugates of alpha-fetoprotein and epidermal growth factor with photoheme, chlorines and phthalocyanines // Biochemistry (Mosc.). 2000. Vol. 65, № 6. P. 732–736.
636. Schreiber H. How antigenic cancer cells take advantage of their host to escape destruction // 3-rd Intern. Conf. «AIDS, Cancer and Related Problems». St. Petersburg, 1995. P. 26.
637. Schwartz M. K. Screening for cancer: is it cost effective? // Clin. Chem. 1993. Vol. 39, № 11. P. 2397–2403.
638. Scohy S., Gabant P., Szpirer C., Szpirer J. Identification of an enhancer and an alternative promoter in the first intron of the alpha-fetoprotein gene // Nucleic. Acids. Res. 2000. Vol. 28, № 19. P. 3743–3751.
639. Sebire N. J., Spencer K., Noble P. L. et al. Maternal serum alpha-fetoprotein in fetal neural tube and abdominal wall defects at 10 to 14 weeks of gestation // Br. J. Obstet. Gynaecol. 1997. Vol. 104, № 7. P. 849–851.
640. Segal R., Lukka H., Klotz L. H. et al. Surveillance programs for early stage nonseminomatous testicular cancer – a practice guideline // Can. J. Urol. 2001. Vol. 8, № 1. P. 1184–1192.
641. Seguchi T., Nakano E., Kameoka H. et al. Correlation of serum basic fetoprotein with acute rejection in kidney transplantation // Clin. Transplant. 1994. Vol. 8, № 1. P. 30–33.

642. Seizinger B. R., Klinger H. P., Junien C. Report of the commitee on chromosome and gene loss in human neoplasia // Cytogenet. Cell. Genet. 1991. Vol. 58, № 3–4. P. 1080–1096.
643. Seki T., Wakabayashi M., Nacagawa T. et al. Ultrasonically guided percutaneous coagulation therapy for small hepatocellular carcinoma // Cancer. 1994. Vol. 74, № 3. P. 817–825.
644. Sell S. Distribution of alpha-fetoprotein- and ablumin-containing cells in the livers of Fisher rats feel four cycles of N-2-fluorenylacetamide // Cancer Res. 1983. Vol. 38. P. 3107–3113.
645. Sell S., Becker F., Leffert H. L., Watabe H. Expression of an oncodevelopmental gene product (6-fetoprotein) during fetal development and adult oncogenesis // Cancer Res. 1976. Vol. 36, № 11. P. 4239–4249.
646. Selye A. Calciphylaxis. Chicago: UNIV of Chicago Press, 1962. 552 p.
647. Semenkova L. N., Dudich E. I., Dudich I. V. Induction of apoptosis in human hepatoma cells by alpha-fetoprotein // Tumour Biol. 1997. Vol. 18, № 5. P. 261–273.
648. Senat M. V., Rozenberg P., Bernard J. P., Ville Y. Trisomy 21 screening: value of ultrasound and serum markers in a combined approach // J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris). 2001. Vol. 30, № 1. P. 11–27.
649. Seppala M. Immunological detection of alpha-fetoprolein as a marker of fetal pathology // Clin. Obstet. Gynecol. 1972. Vol. 20. P. 737–757.
650. Shen K., Huang R., Lang J. Diagnosis and treatment of endodermal sinus tumor of the vagina // Zhonghua Fu Chan. Ke. Za. Zhi. 1999. Vol. 34, № 2. P. 105–107.
651. Shiina S., Tagawa K., Niwa Y. et al. Percutaneous ethanol injection therapy for hepatocellular carcinoma: results in 146 patients // AJR. Am. J. Roentgenol. 1993. Vol. 160, № 5. P. 1023–1028.
652. Shimada M., Hasegawa H., Gion T. et al. Risk factors of the recurrence of hepatocellular carcinoma originating from residual cancer cells after hepatectomy // Hepatogastroenterology. 1999. Vol. 46, № 28. P. 2469–2475.
653. Shimazu K., Yasuno M., Takahashi K. et al. Two cases of alpha-fetoprotein producing gastric cancer, showing marked response to continuous hepatic arterial infusion (HAI) chemotherapy with adriamycin // Gan To Kagaku Ryoho. 2001. Vol. 28, № 5. P. 685–688.
654. Shulman L. P., Elias S., Simpson J. L. et al. Alpha-fetoprotein and acetylcholinesterase are not predictors of fetal junctional epidermolysis bullosa, Herlitz variant // Prenat. Diagn. 1993. Vol. 13, № 3. P. 226–227.
655. Shuto T., Hirohashi K., Kubo S. et al. Postoperative blood tests and multicentric recurrence of hepatocellular carcinoma // Hepatogastroenterology. 1999. Vol. 46, № 28. P. 2545–2546.
656. Sicari M. C., Fyfe B., Parness I. et al. Intrapericardial yolk sac tumor associated with acute myocarditis // Arch. Pathol. Lab. Med. 1999. Vol. 123, № 3. P. 241–243.
657. Silver R. K., Leeth E. A., Check I. J. A reappraisal of amniotic fluid alpha-fetoprotein measurement at the time of genetic amniocentesis and midtrimester ultrasonography // J. Ultrasound Med. 2001. Vol. 20, № 6. P. 631–637.
658. Sironi M., Assi A., Quaglia G. et al. Pure yolk sac tumors in genital and extragenital sites: study on three pedriatic cases, with cytological findings on two // Adv. Clin. Path. 1999. Vol. 3, № 3. P. 55–62.

659. Soini E., Meltola N. J., Soini A. E. et al. Two-photon fluorescence excitation in detection of biomolecules // Biochem. Soc. Trans. 2000. Vol. 28, № 2. P. 70–74.
660. Solisch P., Bergman H., Granzaw H. Patent (DDR). № 228739, A61 K45/00. 1983.
661. Song Y. H., Naumova A. K., Liebhaber S. A., Cooke N. E. Physical and meiotic mapping of the region of human chromosome 4q11 – q13 encompassing the vitamin D binding protein DBP/Gc-globulin and albumin multigene cluster // Genome Res. 1999. Vol. 9, № 6. P. 581–587.
662. Sotnichenko A. I., Severin S. E., Posypanova G. A. et al. Water-soluble 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin complex with human alpha-fetoprotein: properties, toxicity *in vivo* and antitumor activity *in vitro* // FEBS Lett. 1999. Vol. 450, № 1–2. P. 49–51.
663. Soto A. M., Sonnenschein C. Control of growth of estrogen–sensitive cells: role for alpha-fetoprotein // Proc. Natl. Acad Sci USA. 1980. Vol. 77, № 4. P. 2084–2087.
664. Spear B. T. Alpha-fetoprotein gene regulation: lessons from transgenic mice // Semin. Cancer Biol. 1999. Vol. 9, № 2. P. 109–116.
665. Spencer K., Berry E., Crossley J. A. et al. Is maternal serum total hCG a marker of trisomy 21 in the first trimester of pregnancy? // Prenat. Diagn. 2000. Vol. 20, № 4. P. 311–317.
666. Spencer K., Liao A. W., Skentou H. et al. Screening for triploidy by fetal nuchal translucency and maternal serum free beta-hCG and PAPP-A at 10–14 weeks of gestation // Prenat. Diagn. 2000. Vol. 20, № 6. P. 495–499.
667. St Laurent M., Esterl R. M., Halff G. A., Speeg K. V. Gallbladder carcinoma producing alpha-fetoprotein // J. Clin. Gastroenterol. 1999. Vol. 28, № 2. P. 155–158.
668. Stransky J., Zichova M., Vodak M. Assessment of alpha-fetoprotein in chronic HBsAg carriers and in HBs Ag negative cirrhosis of the liver // Sb. Lek. 1993. Vol. 94, № 4. P. 311–315.
669. Suarez A., Palacios J., Burgos E., Gamallo C. Signet-ring stromal tumor of the ovary: a histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study // Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol. 1993. Vol. 422, № 4. P. 333–336.
670. Suenaga M., Sugura H., Kokuba Y. et al. Repeated hepatic resection for recurrent hepatocellular carcinoma in eighteen cases // Surgery. 1994. Vol. 115, № 4. P. 452–457.
671. Suzuki T., Sasano H., Aoki H. et al. Immunohistochemical comparison between anaplastic seminoma and typical seminoma // Acta Pathol. Jpn. 1993. Vol. 43, № 12. P. 751–757.
672. Swoboda R., Bommhardt U., Schimpl A. Regulation of lymphokine expression in T-cell activation. 1. Rapid loss of interleukinspecific RNA after removal of the stimulating signal // Eur. J. Immunol. 1991. Vol. 21, № 7. P. 1691–1695.
673. Sanchez A., Alvarez A. M., Pagan R. et al. Fibronectin regulates morphology, cell organization and gene expression of rat fetal hepatocytes in primary culture // J. Hepatol. 2000. Vol. 32, № 2. P. 242–250.
674. Taketa K., Fujii Y., Aoi T. et al. Identification of alpha-fetoprotein-P4 sugar chain as alpha 2–>6 monosialylated biantennary complex-type oligosaccharides with an exposed galactose on the mannose alpha 1–>6 arm by two-dimensional extended agarose gel-lectin affinity electrophoresis // Electrophoresis. 1993. Vol. 14, № 8. P. 798–804.
675. Taketa K., Fujii Y., Taga H. Characterization of E-PHA-reactive alpha-fetoprotein isoforms by two-dimensional lectin affinity electrophoresis // Electrophoresis. 1993. Vol. 14, № 12. P. 1333–1337.

676. Tamaoki T. Human alpha-fetoprotein transcriptional regulatory sequences. Application to gene therapy // Adv. Exp. Med. Biol. 2000. Vol. 465. P. 47–56.
677. Tan C. K., Gores G. J., Steers J. L. et al. Orthotopic liver transplantation for preoperative early-stage hepatocellular carcinoma // Mayo. Clin. Proc. 1994. Vol. 69, № 6. P. 509–14.
678. Tan M., Uygur C., Ozer E., Erol D. Sertoli cell tumor in a prepubertal boy mimicking testicular torsion // Urol. Int. 2000. Vol. 65, № 4. P. 211–213.
679. Tanaka A., Takeda R., Yamamoto H. et al. Extrahepatic large hepatocellular carcinoma with peritoneal dissemination: multimodal treatment, including four surgical operations // J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. 2000. Vol. 7, № 3. P. 339–344.
680. Tannapfel A., Geissler F., Witzigmann H., Wittekind C. Isolierte Tumorzellen bei primaren malignen Lebertumoren // Zentralbl Chir. 2000. Vol. 125, № 7. P. 602–605.
681. Tanno S., Obara T., Fujii T. et al. Alpha-fetoprotein-producing adenocarcinoma of the pancreas presenting focal hepatoid differentiation. // Int. J. Pancreatol. 1999. Vol. 26, № 1. P. 43–47.
682. Tanski S., Rosengren S. S., Benn P. A. Predictive value of the triple screening test for the phenotype of Down syndrome // Am. J. Med. Genet. 1999. Vol. 85, № 2. P. 123–126.
683. Taylor-Paradimitiou J. The interferons // Biochem. Soc. Symp. 1984. Vol. 49. P. 109.
684. Tchipysheva T. A., Guelstein V. I., Bannikov G. A. Alpha-fetoprotein-containing cells in the early stages of liver carcinogenesis induced by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene and N-2-acetylamino-fluorene // Int. J. Cancer. 1977. Vol. 20. P. 123–132.
685. Teilum G. Classification of endodermal sinus tumor (mesoblastoma vitellinum) and so-called «embryonal carcinoma» of the ovary // Acta Pathol. Microbiol. Scand. 1965. Vol. 64. P. 407–429.
686. Teraguchi M., Nogi S., Ikemoto Y. et al. Multiple hepatoblastomas associated with trisomy 18 in a 3-year-old girl // Pediatr. Hematol. Oncol. 1997. Vol. 14, № 5. P. 463–467.
687. Thompson C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease // Science. 1995. Vol. 267. P. 1456–1462.
688. Toder V., Blank M., Nebel L. Immunoregulatory mechanisms in pregnancy. 1 Evidence for the alpha-fetoprotein induced generation of suppressor cells *in vitro* // Transplantation. 1982. Vol. 33, № 1. P. 41–44.
689. Tokuuye K., Sumi M., Ikeda H. et al. Technical considerations for fractionated stereotactic radiotherapy of hepatocellular carcinoma // Jpn. J. Clin. Oncol. 1997. Vol. 27, № 3. P. 170–173.
690. Tong M. J., Blatt L. M., Kao V. W. Surveillance for hepatocellular carcinoma in patients with chronic viral hepatitis in the United States of America // J. Gastroenterol. Hepatol. 2001. Vol. 16, № 5. P. 553–559.
691. Torres J. M., Laborda J., Darracq N. et al. Expression of alpha-fetoprotein receptors by human T-lymphocytes during blastic transformation. // Mol. Immunol. 1989. Vol. 26. P. 851–857.
692. Trevisani F., D'Intino P. E., Morselli-Labate A. M. et al. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status // J. Hepatol. 2001. Vol. 34, № 4. P. 570–575.
693. Tsai J. F., Jeng J. E., Chuang L. Y. et al. Elevated urinary transforming growth factor-beta1 level as a tumour marker and predictor of poor survival in cirrhotic hepatocellular carcinoma // Br. J. Cancer. 1997. Vol. 76, № 2. P. 244–250.

694. Tsavaris N., Vonorta K., Tsoutsos H. et al. Carcinoembryonic antigen (CEA), alpha-fetoprotein, CA 19.9 and CA 125 in advanced colorectal cancer (ACC) // Int. J. Biol. Markers. 1993. Vol. 8, № 2. P. 88–93.
695. Tsujikawa T., Tsukamoto H., Itoh A. et al. Meningitis carcinomatosa originating from an alpha-fetoprotein-producing gastric cancer // Intern. Med. 2000. Vol. 39, № 3. P. 223–227.
696. Tsurumachi T., Yamamoto H., Watanabe K. et al. Resection of liver metastasis from alpha-fetoprotein-producing early gastric cancer: report of a case // Surg. Today. 1997. Vol. 27, № 6. P. 563–566.
697. Tsutsumi T., Ido A., Nakao K. et al. Reciprocal regulation of alpha-fetoprotein and albumin gene expression by butyrate in human hepatoma cells // Gastroenterology. 1994. Vol. 107, № 2. P. 499–504.
698. Unno J., Shirozaki T., Inoue K. et al. A case study of alpha-fetoprotein (AFP)-producing gastric carcinoma with multiple liver metastases, in which chemotherapy was effective enough to once save a life in rapid decline // Gan To Kagaku Ryoho. 2000. Vol. 27, № 5. P. 739–743.
699. Urata K., Matsumata T., Kamakura T. et al. Lipiodolization for unresectable hepatocellular carcinoma: an analysis of 205 patients using univariate and multivariate analysis // J. Surg. Oncol. 1994. Vol. 56, № 1. P. 54–58.
700. Uriel J. Transitory liver antigens and primary hepatoma in man and rat // Pathol. Biol. 1969. Vol. 17. P. 877–884.
701. Uriel J., de Nechatid B., Stanislawski-Birencxaist M. et al. Antigenes embryonaires et cancer du foie chez I'liomme. Association de la alpha-foetoproteine serique avec 1'liepatomae primaire // C. R. Acad. Sci. (Paris). 1967. Vol. 265. P. 75–78.
702. Uriel J., de Nechaud B., Dupiers M. Estrogen-binding properties of rat, mouse and man feto-specific serum proteins. Demonstration by immuno-autoradiagraphic methods // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972. Vol. 46. P. 1175–1180.
703. Vakharia D., Mizejewski G. J. Human alpha-fetoprotein peptides bind estrogen receptor and estradiol, and suppress breast cancer // Breast. Cancer Res. Treat. 2000. Vol. 63, № 1. P. 41–52.
704. Van der Kwast T. H., Olthof J. G., Benner R. Primary and secondary delayed-type hypersensitivity to minor histocompatibility antigens in the mouse // Cell. Immunol. 1979. Vol. 47. P. 182–191.
705. Van Hove L., Delacourt M., Park B. Presence of common surface antigen (1) on endodermal tumors and embryonal tissues of rats, hamsters and mice // Int. J. Cancer. 1978. Vol. 21, № 6. P. 731–740.
706. Verdin S. M., Braithwaite J. M., Spencer K., Economides D. L. Prenatal diagnosis of trisomy 21 in monozygotic twins with increased nuchal translucency and abnormal serum biochemistry // Fetal. Diagn. Ther. 1997. Vol. 12, № 3. P. 153–155.
707. Vessey C. J., de la Hall P. M. Hepatic stem cells: a review // Pathology. 2001. Vol. 33, № 2. P. 130–141.
708. Vollmer C. M., Eilber F. C., Butterfield L. H. et al. Alpha-fetoprotein-specific genetic immunotherapy for hepatocellular carcinoma // Cancer Res. 1999. Vol. 59, № 13. P. 3064–3067.
709. Von Eyben F. E., Blaabjerg O., Hyltoft-Petersen P. et al. Serum lactate dehydrogenase isoenzyme 1 and prediction of death in patients with metastatic testicular germ cell tumors // Clin. Chem. Lab. Med. 2001. Vol. 39, № 1. P. 38–44.

710. Von Schweinitz D., Burger D., Videnberger H. Is laparotomy the first step in treatment childhood liver tumors? The experience from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study // Eur. J. Pediatr. Surg. 1994. Vol. 4, № 2. P. 82–86.
711. Von Schweinitz D., Burger D., Bode U. et al. Results of the HB-89 Study in treatment of malignant epithelial liver tumors in childhood and concept of a new HB-94 protocol // Klin. Pediatr. 1994. Vol. 206, № 4. P. 282–288.
712. Wald N. J., Hackshaw A. K., Cuckle H. S. Maternal serum alpha-fetoprotein screening for open neural tube defects: revised statistical parameters // BJOG. 2000. Vol. 107, № 2. P. 296–298.
713. Wald N. J., Watt H. C., Hackshaw A. K. Integrated screening for Down's syndrome on the basis of tests performed during the first and second trimesters // N. Engl. J. Med. 1999. Vol. 341, № 7. P. 461–467.
714. Wang W., Alpert E. Downregulation of forbol 12-myristate 13-acetate-induced TNF-alpha and IL-1-beta production and gene expression in human monocytic cells by human alpha-fetoprotein // Hepatology. 1995. Vol. 22, № 3. P. 921–928.
715. Weatherall D. J. Scope and limitation of gene therapy // Brit. Med. Bull. 1995. Vol. 51, № 1. P. 1–11.
716. Weinberg D. S., Malet P. F. Chronic hepatitis C and markedly elevated serum alpha-fetoprotein: complete response to treatment with alpha-interferon // Am. J. Gastroenterol. 1994. Vol. 89, № 8. P. 1253–1254.
717. Weisberger E. C., McBride L. C. Modified neck dissection for metastatic nonseminomatous testicular carcinoma // Laryngoscope. 1999. Vol. 109, № 8. P. 1241–1244.
718. Weissbach L., Bussar-Maatz R., Mann K. The value of tumor markers in testicular seminomas. Results of a prospective multicenter study // Eur. Urol. 1997. Vol. 32, № 1. P. 16–22.
719. Williams H. M. Cancer therapy: reimbursement of new therapeutic technologies // Yale J. Biol. Med. 1992. Vol. 65. № 2. P. 83–97.
720. Williams L. J., Yankowitz J., Robinson R. A., Benda J. A. Nasopharyngeal teratoma. Report of a case with prenatal diagnosis and postnatal management // J. Reprod. Med. 1997. Vol. 42, № 9. P. 587–592.
721. Wong I. H., Leung T., Ho S. et al. Semiquantification of circulating hepatocellular carcinoma cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction // Br. J. Cancer. 1997. Vol. 76, № 5. P. 628–633.
722. Wong I. H., Yeo W., Leung T. et al. Circulating tumor cell mRNAs in peripheral blood from hepatocellular carcinoma patients under radiotherapy, surgical resection or chemotherapy: a quantitative evaluation // Cancer Lett. 2001. Vol. 167, № 2. P. 183–191.
723. Wright L. M., Van Damme E. J., Barre A. et al. Isolation, characterization, molecular cloning and molecular modelling of two lectins of different specificities from bluebell (Scilla campanulata) bulbs // Biochem. J. 1999. Vol. 340, pt. 1. P. 299–308.
724. Wu Chung. Biochemical correlation of oncogenesis with ontogenesis // Int. J. Cancer. 1973. Vol. 1, № 2. P. 438–447.
725. Yabusaki H., Nashimoto A., Tanaka O. A case of AFP-producing gastric cancer after curative operation effectively treated with chemotherapies including hepatic arterial infusion therapy // Gan To Kagaku Ryoho. 2000. Vol. 27, № 5. P. 735–738.
726. Yakimenko E. F., Yazova A. K., Goussev A. I., Abelev G. I. Epitope mapping of human alpha-fetoprotein // Biochemistry (Mosc.). 2001. Vol. 66, № 5. P. 524–530.

727. Yamada T., Fujita M., Kitao S. et al. Serum alpha-fetoprotein values in dogs with various hepatic diseases // J. Vet. Med. Sci. 1999. Vol. 61, № 6. P. 657–659.
728. Yamada T., Makita F., Takehara K. et al. Evaluation of the therapeutic effect of TAE on primary liver cancer // Cancer Chemother. Pharmacol. 1994. Vol. 33. P. 55–59.
729. Yamamoto R., Wakui Y., Taketa K. et al. A study on the lectin reactivity of alpha-fetoprotein produced by hepatoid adenocarcinomas and yolk sac tumors // Tumour Biol. 1999. Vol. 20, № 4. P. 212–217.
730. Yamashita K., Taketa K., Nishi S. et al. Sugar chains of human cord serum alpha-fetoprotein: characteristics of N-linked sugar chains of glycoproteins produced in human liver and hepatocellular carcinomas // Cancer Res. 1993. Vol. 53, № 13. P. 2970–2975.
731. Yang H. H., Zhu Q. Z., Li D. H. et al. Fluorescence immunoassay of alpha-fetoprotein with iron (III) tetrasulfonatophthalocyanine as a mimetic enzyme labeling reagent // Fresenius. J. Anal. Chem. 2001. Vol. 370, № 1. P. 88–91.
732. Yano T., Nakatani K., Watanabe A. et al. Utility of measurement of tumor markers for preoperative staging of gastric cancer // Nippon. Geka. Gakkai. Zasshi. 1993. Vol. 94, № 9. P. 977–987.
733. Yao F. Y., Ferrell L., Bass N. M. et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival // Hepatology. 2001. Vol. 33, № 6. P. 1394–1403.
734. Ye Q., Tang Z., Ma Z. et al. Differential diagnosis between hepatic focal nodular hyperplasia and hepatocellular carcinoma with negative alpha-fetoprotein // Zhonghua Gan. Zang. Bing. Za. Zhi. 2000. Vol. 8, № 3. P. 136–138.
735. Yen T. C., Hwang S. J., Wang C. C. et al. Hypercalcemia and parathyroid hormone-related protein in hepatocellular carcinoma // Liver. 1993. Vol. 13, № 6. P. 311–315.
736. Yoo B. I., Jung S. Y., Hur K. et al. Differentiation of hamster liver oval cell following Clonorchis sinensis infection // J. Vet. Med. Sci. 2000. Vol. 62, № 12. P. 1303–1310.
737. You X. Y., Jiang J., Yin F. Z. Preliminary observation on human saliva alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma // Chin. Med. J. Engl. 1993. Vol. 106, № 3. P. 179–182.
738. Yu C. L., Tsai M. H. Fetal fetuin selectively induces apoptosis in cancer cell lines and shows anti-cancer activity in tumor animal models // Cancer Lett. 2001. Vol. 166, № 2. P. 173–184.
739. Yu Y. Q., Xu D. B., Zhou X. D. et al. Experience with liver resection after hepatic arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma // Cancer. 1993. Vol. 71, № 1. P. 62–65.
740. Yuan J., Wang G., Majima K., Matsumoto K. Synthesis of a terbium fluorescent chelate and its application to time-resolved fluoroimmunoassay // Anal. Chem. 2001. Vol. 73, № 8. P. 1869–1876.
741. Yuasa T., Yoshiki T., Ogawa O. et al. Detection of alpha-fetoprotein mRNA in seminoma // J. Androl. 1999. Vol. 20, № 3. P. 336–340.
742. Yuasa T., Yoshiki T., Tanaka T. et al. Detection of circulating testicular cancer cells in peripheral blood // Cancer Lett. 1999. Vol. 143, № 1. P. 57–62.
743. Zhang M., Gong Y., Assy N., Minuk G. Y. Increased GABAergic activity inhibits alpha-fetoprotein mRNA expression and the proliferative activity of the HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line // J. Hepatol. 2000. Vol. 32, № 1. P. 85–91.
744. Zhang X. M., Kobatake E., Kobayashi K. et al. Genetically fused protein A-luciferase for immunological blotting analyses // Anal. Biochem. 2000. Vol. 282, № 1. P. 65–69.

745. Zhou X. D., Tang Z. Y., Yu Y. Q. et al. Recurrence after resection of alpha-fetoprotein – positive hepatocellular carcinoma // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1994. Vol. 120, № 6. P. 369–373.
746. Zvibel I., Brill S., Reid L. M. Insulin-like growth factor II regulation of gene expression in rat and human hepatomas // J. Cell. Physiol. 1995. Vol. 162, № 1. P. 36–43.

Научное издание

Валерий Александрович Черешнев
Сергей Юрьевич Родионов
Владимир Аристархович Черкасов
Наталья Николаевна Малютина
Олег Алексеевич Орлов

АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН

Рекомендовано к изданию ученым советом Института иммунологии
и физиологии и НИСО УрО РАН
ЛР № 020764 от 29.03.1998 г.

Редактор Урядова Л. А.

Дизайн, верстка, корректура, допечатная подготовка:

© СТУДИЯ ЗЁБРА
Россия, 614060, г. Пермь, ул. Уральская, 119, офис 222.
E-mail: press@zebra.perm.ru

Подписано в печать 29.07.2004.
Формат 70×100 1/16 . Бумага ВХИ 80. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 30,46. Тираж 1500 экз. Заказ 2387.

Печать:
Издательско-полиграфический комплекс «Звезда».
Россия, 614990, г. Пермь, ГСП-131, ул. Дружбы, 34.