

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Россия
² ОАО «Аллоферон», Москва, Россия

Аллокин-альфа — новый отечественный препарат для терапии острого вирусного гепатита С

Среди вирусных гепатитов (ВГ) доминирующее место занимают инфекции, вызванные вирусами В и С. С ними связаны практически все летальные исходы у больных с острой формой ВГ, а также развитие хронических заболеваний печени (хронизация при ВГС достигает 80%) с исходом в цирроз и первичный рак печени. В последнее время в России значительно увеличилась заболеваемость ВГВ и ВГС, что связано, в первую очередь, с ростом численности так называемых инфекционных наркоманов. По сравнению с 1994 г. (первым годом официальной регистрации ВГС в России), в 2002 г. официальные показатели заболеваемости ВГС в России возросли в 7 раз (приблизительно 12 человек на 100 тыс. населения). Однако истинные масштабы этой инфекции значительно выше, так как в ряде случаев она протекает бессимптомно в течение многих лет [1, 2].

В медицинской практике существует пока одна рекомбинантная вакцина — против ВГВ. Большинство экспертов считают мировым стандартом противовирусную терапию больных с острыми формами ВГВ и ВГС с помощью препаратов интерферона (ИФН). В то же время длительная терапия ими связана с рядом побочных эффектов [3–5]. Препараты экзогенного ИФН могут заменяться в клинической практике его индукторами, вызывающими в организме образование собственного (эндогенного) ИФН и обладающими антивирусной, иммуномодулирующей и антитуморогенной активностью [4, 5]. Ряд индукторов ИФН (Амиксин, Циклоферон, Ридостин) в настоящее время широко применяется в терапии ВГС. Исследования показали, что противовирусная активность названных препаратов в целом совпадает с активностью экзогенных ИФН [5, 6]. К сожалению, несмотря на достаточно большой выбор препаратов, заболеваемость вирусными гепатитами плохо контролируется. Поэтому актуальной задачей была и остается разработка новых лечебных препаратов, эффективных при острых и хронических ВГ.

Известно, что при ВГС, как и при многих других вирусных заболеваниях, развивается дисбаланс иммунной системы человека. У больных отмечены значительные нарушения систем иммунитета и ИФН. По данным литературы, в ходе первичного обследования больных ВГС отмечена супрессия *Th-1* лимфоцитов [3, 7].

В настоящей работе проведено определение эффективности нового противогепатитного препарата «Аллокин-альфа» (ОАО «Аллоферон», Россия) на примере острого вирусного гепатита С (ОВГС) и сделана попытка определить закономерности изменений цитокинового профиля у обследованных больных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 100 больных (в возрасте от 16 до 50 лет) с верифицированным диагнозом ОВГС. Диагноз подтверждался определением серологических маркеров (анти-*HCV IgG*, анти-*HCV IgM*, *a/core-HCV IgG*), а также количественным анализом уровня РНК *HCV* с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Контрольную группу составили 100 здоровых добровольцев (в возрасте от 20 до 45 лет). Для определения показателей ИФН статуса и цитокинового профиля использовали гепаринизированную цельную кровь, полученную асептически из локтевой вены. Исследование расширенного ИФН статуса проводили по методике, разработанной в отделе интерферонов НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи [8, 9]. Определяли следующие показатели:

- продукция ИФН-а, индуцируемая вирусом болезни Ньюкасла (ВБН, лаборатория препаратов интерферона НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН, Москва);
- продукция ИФН- γ , индуцируемая стафилококковым энтеротоксином А (СЭА, НПО «Иммунопрепарат», Уфа);
- уровень циркулирующего ИФН в плазме крови;
- уровень спонтанно продуцируемого ИФН;
- чувствительность к препаратам ИФН-а (с использованием прайминг-эффекта); пациента считали чувствительным к ИФН-а, если его клетки крови отвечали увеличением ВБН-индуцируемой продукции ИФН при праймировании одним из следующих 6 препаратов ИФН-а: «Человеческий лейкоцитарный ИФН» и «Лейкинферон» («Интекор», Москва, Россия), «Реаферон» (НПО «Вектор», Новосибирск, Россия), «Реальдирон» («Биотехна», Литва), «Интерон А» («Шеринг-Плау», США), «Роферон А» («Хофман-Ля Рош», Швейцария);

- уровень чувствительности к препарату ИФН- γ «Гаммаферону» (НПО «Фермент», Рига, Латвия) с использованием прайминг-эффекта;
- уровень чувствительности к разрешенным для медицинского применения индукторам ИФН: «Ридостину» (НПО «Вектор», Новосибирск, Россия) и «Циклоферону» (НТФФ «Полисан», С.-Петербург, Россия), а также к иммуномодулирующему препарату «Аллокин-альфа» (ОАО «Аллоферон», Россия); пациента считали чувствительным к указанным препаратам, если его клетки крови продуцировали ИФН при действии этого препарата;
- ИФН-ингибирующая или стимулирующая способность плазмы или сыворотки крови.

Определение активности ИФН. Титрование ИФН проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах с культурой диплоидных фибробластов человека (получены из музея клеточных культур НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, Москва), выращенных в ростовой среде до образования монослоя. В качестве индикаторного тест-вируса использовали вирус энцефаломиокардита мышей (получен там же). За единицу активности ИФН (Ед/мл) принимали величину, обратную его максимальному разведению, которая защищала 50% клеток от цитопатического действия 100 ТЦД₅₀ вируса. В каждом титровании использовался также референс-препарат ИФН для перевода полученной активности ИФН в международные единицы (МЕ).

Определение мРНК цитокинов в мононуклеарах периферической крови проводили с использованием методов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Выделение РНК проводили по методике Р. Chomczynsky, N. Sacchi [10] методом кислой гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформ-экстракции. Обратная транскрипция и ПЦР-амплификация были выполнены в соответствии с методикой, предложенной Gelder [11]. В работе были использованы пары праймеров для следующих цитокинов: ИФН- α [11], ИЛ-6, ИЛ-8 [12], ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 ФНО- α , ИФН- γ [13], ИЛ-18 [14], ИЛ-12 [15]. В качестве положительного контроля использовали β -актин [12]. Регистрацию результатов ПЦР осуществляли электрофоретически в 2,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Для идентификации нуклеотидных последовательностей использовали маркер для электрофореза фирмы Promega (G 1758).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цитокиновый профиль при ОВГС. Определение уровня ИФН и других цитокинов у больных ВГС может служить одним из критериев результативности терапии. Представляло интерес изучить наруше-

ния экспрессии генов ряда цитокинов и ИФН у больных ОВГС и возможность коррекции обнаруженных нарушений новым отечественным препаратом «Аллокин-альфа».

Исследование ИФН статуса больных ОВГС до лечения показало:

- повышенное содержание ИФН в сыворотке крови в среднем у 40% пациентов;
- наличие в среднем у 17% пациентов ИФН, спонтанно вырабатываемого клетками крови;
- снижение способности к продукции ИФН- α практически у всех обследованных больных (93%);
- снижение способности к продукции ИФН- γ в среднем у 52% пациентов;
- снижение чувствительности к препаратам ИФН- α и ИФН- γ в среднем у 41% и 55% пациентов, соответственно;
- снижение чувствительности к индукторам ИФН в среднем у 14% больных; ИФН- α / γ -ингибирующая активность сыворотки крови была выше нормы у 30–50% пациентов.

Терапия ОВГС препаратом «Аллокин-альфа». Определение показателей ИФН статуса больных ОВГС после курса лечения, включающего Аллокин-альфа в дозе 10 мг, выявило в большинстве случаев нормализацию титров циркулирующего в сыворотке крови (90%) и спонтанно вырабатываемого ИФН (80%), а также ИФН-ингибирующей активности сыворотки крови в среднем у 35% пациентов. Способность к продукции ИФН- α и ИФН- γ восстанавливалась у 40% и 80% больных, соответственно. При этом чувствительность к препаратам ИФН- α / γ и индукторам ИФН повышалась.

Следует отметить, что нормализация большинства параметров ИФН статуса соответствовала положительному клиническому эффекту. Отмечено исчезновение РНК ВГС в 80% случаев. В то же время отсутствие клинического эффекта или отрицательный клинический эффект наблюдался у больных при совокупном изменении следующих параметров: повышение циркулирующего и спонтанно вырабатываемого ИФН, снижение способности к продукции ИФН- α , ИФН- γ и чувствительности к иммуномодулирующим препаратам. При этом РНК ВГС снижалось с 10^5 до 10^3 КОЕ/мл (табл.2).

В табл. 1 представлены данные о количестве здоровых добровольцев и больных ВГС с выявленной мРНК цитокинов. Показано, что при ВГС-инфекции возрастало число больных, у которых определялись мРНК ИФН- α , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-18, по сравнению со здоровыми добровольцами. При этом обнаружено, что в стадии обострения до лечения снижалось число больных с выявленной мРНК ИФН- γ , ФНО- α , ИЛ-12, а мРНК ИЛ-8 и ИЛ-10 опре-

делялись у больных ВГС с той же частотой, что и у здоровых добровольцев.

Изучение РНК цитокинов у обследованных больных в процессе и после лечения Аллокином-альфа показало:

- на протяжении всего срока наблюдения (180 дней) сохранялась продукция мРНК ИФН- α , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-18 у большинства обследованных пациентов, получавших препарат «Аллокин-альфа»;
- встречаемость мРНК ИФН- γ через 10 дней терапии обнаруживалась в 2 раза чаще, чем

до лечения, а через 20–30 дней и до конца срока наблюдения выявляемость мРНК этого цитокина у обследованных пациентов была такой же, как и у здоровых добровольцев, что позволяет предполагать нормализацию иммунного ответа у этих больных по *Th1*-типу, что является благоприятным признаком при лечении;

- применение Аллокина-альфа вызывало появление мРНК ФНО- α и ИЛ-12 у 80% больных через 2 мес лечения;
- лечение Аллокином-альфа способствовало снижению встречаемости мРНК ИЛ-6 через 20–30 дней лечения, но через 2 мес экспрессия гена этого цитокина наблюдалась у всех обследованных больных;
- отмечено снижение встречаемости мРНК ИЛ-10 у обследованных больных ОВГС до 20–30-го дня наблюдения и увеличение ее через 2 мес, в это же время обнаружено повышение встречаемости мРНК другого противовоспалительного цитокина — ИЛ-4;
- активность В-лимфоцитов может характеризоваться их способностью к синтезу ИФН- α , ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-10 и ИЛ-12, а *Th2*-лимфоцитов — способностью к продукции ИЛ-4 и ИЛ-10; при лечении Аллокином-альфа отмечалось увеличение числа больных с повышенной экспрессией генов именно этих цитокинов, определяющих активацию гуморального иммунитета.

ВЫВОДЫ

Таким образом, в результате лечения Аллоки-

Таблица 1. Цитокиновый профиль у здоровых добровольцев ($n=100$) и больных ОВГС ($n=100$) до и после лечения Аллокином-альфа

мРН цитокинов	Количество людей (%)						
	Здоровые добровольцы	Больные до лечения	Через 10 дней	Через 20–30 дней	Через 2 мес	Через 3 мес	Через 6 мес
ИФН- α	2	67	29	33	60	50	50
ИФН- γ	30	17	43	33	40	30	40
ФНО- α	75	17	14	17	80	80	70
ИЛ-1 β	35	67	86	67	60	56	40
ИЛ-2	0	17	86	33	80	43	17
ИЛ-4	0	17	43	33	80	40	17
ИЛ-6	20	67	71	33	100	30	30
ИЛ-8	10	17	43	50	80	43	25
ИЛ-10	20	17	14	0	60	50	30
ИЛ-12	70	33	86	50	80	80	60
ИЛ-18	30	100	86	83	80	80	60

Таблица 2. Эффективность терапии Аллокином-альфа больных ВГС в зависимости от показателей цитокинового, интерферонового и иммунного статуса

Показатели	Положительный статус		Отрицательный статус	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
мРНК ИЛ-2	—	+	—	+/-
мРНК ИФН-γ	—	+	—	—
мРНК ИЛ-12	—	+	—	—
РНК ИФН-α	+	—	+	+
мРНК ИЛ-4	—	+	—	—
мРНК ИЛ-10	+/-	—	+	+
мРНК ИЛ-8	+	—	+	+
мРНК ФНО-α	+/-	+	—	—
Продукция ИФН-α	↓	↑	↓	↓
Продукция ИФН-γ	N	N	↓	↓
Количество Т-лимфоцитов	N/↑	N	N/↓	N
Количество В-лимфоцитов	N/↓	N	N/↑	↓
Количество ЕККК	↓	↑	↑	↑
РНК ВГС (КОЕ/ml)	10 ⁵	—	10 ⁵	10 ³

Примечание: (+) — наличие и (—) — отсутствие мРНК цитокина; ↑ — повышение; ↓ — снижение; N — норма.

ном-альфа положительный клинический эффект наблюдался при следующих закономерностях в изменении лабораторных показателей (табл. 2):

— снижение активности инфекционного процесса при активации системы ИФН и нормализации Т- и В-клеточного иммунитета;

— нормализация или тенденция к нормализации у больных ОВГС экспрессии генов следующих цитокинов: ИФН-α (через 10–30 дней наблюдения), ИФН-γ (через 10–30 дней и до конца срока наблюдения), ФНО-α и ИЛ-12 (через 10–60 дней и до конца срока наблюдения), ИЛ-8 и ИЛ-10 (через 3 мес и до

конца срока наблюдения);

— нормализация продукции ИФН-γ на разных этапах его синтеза и, соответственно, восстановление функциональной активности Т-лимфоцитов, способности к активации иммунной системы и нормализации иммунного ответа по Th1-типу.

— Исчезновение РНК ВГС.

Авторы выражают благодарность ведущим специалистам в области гепатологии проф. С. Г. Чешеку, канд. мед. наук Д. В. Быченко (КИБ № 1, Москва), член-корреспонденту РАМН, профессору С. Г. Паку и доктору мед. наук Е. В. Волчковой (КИБ № 2, Москва) за оказанную помощь в проведении исследований.

Список литературы

1. Каркищенко Н. Н. Лекарственная профилактика. М.: Воентехлит, 2001.
2. Онищенко Г. Г. Доклад на конференции «Лекарственная профилактика» в МЗ РФ. М., 2002.
3. Гусев В. А., Жданов К. В., Лобзин Ю. В., Симбирцев А. С. Сравнительный анализ некоторых показателей иммунитета при желтушных формах гепатитов В, С и В+С // Мед. иммунол. 2001. Т.3. № 2. С. 217.
4. Ершов Ф. И. Система интерферона в норме и при патологии. М.: Медицина, 1996.
5. Ершов Ф. И. Антивирусные препараты. М.: Медицина, 1998.
6. Мезенцева М. В., Наровлянский А. Н., Касьянова Н. В. и др. Циклоферон — в терапии острого гепатита С у наркоманов // В кн: Циклоферон — от эксперимента в клинику. СПб., 2002.
7. Журкин А. С., Соловьев С. В. Продукция цитокинов и интерферонотерапия у больных хроническими вирусными гепатитами // Эпидемиол. и инфекцион. болезни. 1999. № 5. С. 27–29.
8. Ершов Ф. И., Мезенцева М. В., Васильев А. Н. др. Методические указания по определению индивидуальной

чувствительности организма к интерферонам, другим цитокинам и индукторам интерферона // Ведомости науч. центра экспертизы и государ. контроля лекарств средств. 2002. № 1 (9). С. 22–26.

9. Мезенцева М. В., Наровлянский А. Н., Амченкова А. М. и др. Определение клеточной чувствительности к интерферонам в цельной крови (расширение показателей интерферонового статуса): Метод. реком. НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи. М., 1997.

10. Chomczynski P., Sacchi N. // Ann. Biochem. 1987. № 162. P. 156–159.

11. Gelder C. M., Thomas P. S., Yates D. H. et al. // Thorax. 1995. № 50. P. 1033–1037.

12. Lin Y., Zhang M., Barnes P. F. // Infect. and Immun. 1998. Vol. 66. № 3. P. 1121–1126.

13. Yamamura M., Uyemura K., Deans R. J. et al. // Science. 1991. Vol. 254. № 11. P. 277–279.

14. Gaede K. I., Mamat U., Schlaak M. et al. // J. molec. Med. 1999. Vol. 77. № 12. P. 847–852.

15. Harrison Thomas S., Levitz Stuart M. // J. Immunol. 1996. № 3. P. 4492–4497.