

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 615.276.4.03:616.36-002.1-022.036.8

Погорельская Л.В.¹, Хлопова И.Н.², Григорян С.С.³, Трякина И.П.¹, Рик Н.А.¹, Мальдов Д.Г.⁴**КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ И ВИРУСОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРЕПАРАТА СТИМФОРТЕ ПРИ ОСТРОМ ГЕПАТИТЕ В**

¹ ГБОУ ДП «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, 123995, Москва; ² ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского» Минздрава России, 123098, Москва; ³ ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи» РАМН, 123098, Москва; ⁴ ЗАО «Скай ЛТД», 117108, Москва.

Вирусный гепатит В является серьезной проблемой мирового здравоохранения. Заболеваемость острым вирусным гепатитом В в Российской Федерации за последние годы составила 2,2 на 100 000 населения. В 5% случаев инфекция может приобретать хроническое течение, приводящее к развитию цирроза и гепатокарциномы. В последнее время повышается интерес к препаратам растительного и животного происхождения, которые обладают иммуномодулирующей и противовирусной активностью. Одним из таких препаратов является Стимфорте. Целью настоящей работы явилось определение клинико-иммунологической и вирусологической эффективности инъекционной формы данного препарата. В исследование вошли 30 испытуемых и 22 пациента контрольной группы. Оценка эффективности терапии проводилась по результатам клинического и лабораторного обследования и определялась сроками обратного развития острого вирусного гепатита; динамикой и темпом снижения активности биохимических показателей (АлАт, АсАт, щелочной фосфатазы); элиминацией из крови маркеров острого гепатита, частотой формирования хронического гепатита. Проводилось исследование иммунного и интерферонового статусов. Одновременно учитывались возможные появления побочных реакций. В конце исследования было показано, что применение Стимфорте положительно влияло на регресс клинических симптомов заболевания, сокращая их продолжительность на 2–8 дней, способствовало более быстрой нормализации показателей цитолиза (АлАТ, АсАТ). Препарат Стимфорте оказывал иммуномодулирующее действие, стимулировал противовирусный иммунный ответ на острую HBV-инфекцию. В течение 6 мес наблюдения случаев хронизации не наблюдалось. Препарат хорошо переносился всеми пациентами без случаев возникновения побочных реакций.

Ключевые слова: острый гепатит В, иммуномодулятор, препарат «Стимфорте», лечение

L. V. Pogorelskaya¹, I.N. Khloпова², S.S. Grigoryan³, I.P. Tryakina¹, N.A.Rik¹, D.G. Mal'dov⁴

CLINICAL AND VIROLOGICAL EVALUATION OF THE DRUG "STIMFORTE" IN ACUTE HEPATITIS B

¹Russian Medical Academy of Post-Graduate Education, 2/1, Barrikadnaya Str., Moscow, Russian Federation, 123836; ²Ivanovsky Institute of Virology, 16, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation, 123098; ³N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 18, Gamalei Str., Moscow, Russia, 123098; ⁴Closed Joint-Stock Company "SKY LTD", 113/1, Leninsky avenue, Moscow, Russian Federation, 117108

Hepatitis B is a serious problem for global health. The incidence of acute hepatitis B in the Russian Federation in recent years was 2.2 per 100 000 people. In 5% of cases the infection can acquire chronic course, leading to the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Recently, there is increased interest in drugs of plant and animal origin which have immunomodulatory and antiviral activity. "Stimforte" is one out of such drugs. The aim of this work was to determine the as clinical and immunologic as virologic efficacy of the injectable form of the drug. The study included 30 patients and 22 subjects from the control group. Evaluation of treatment efficacy was performed on the results of clinical and laboratory examination and was determined in the terms of reverse development of acute viral hepatitis, dynamics and rate of downward in activity of biochemical parameters (ALT, AST, alkaline phosphatase), elimination of markers of acute hepatitis from the blood, the frequency of formation of chronic hepatitis. The investigation of immune and interferon status was performed. At the same time the possible occurrences of adverse reactions were taken into account. At the end of the study the use of "Stimforte" was shown to have a positive effect on the regression of clinical symptoms of the disease, by reducing their duration by 2–8 days, contributed to a more rapid normalization of indices of cytolysis (ALT, AST). Drug "Stimforte" has immunomodulatory effect, stimulated antiviral immune response to acute HBV-infection. Within 6 months of following up patients no chronic cases were observed. The drug was well tolerated by all patients with no incidence of adverse reactions.

Key words: Acute hepatitis B, an immune modulator, "Stimforte", treatment.

Вирусный гепатит В является серьезной проблемой мирового здравоохранения. Заболеваемость острым вирусным гепатитом В в Российской Федерации за последние годы, по данным Федеральной службы государственной статистики, составила 2,2 на 100 000 населения [6].

Для корреспонденции: Погорельская Лидия Васильевна, профессор, доктор мед. наук кафедры инфекционных болезней ГБОУ ДП «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России. e-mail: lv2009p@mail.ru

Как правило, у 95% пациентов происходит элиминация вируса острого гепатита В (ОГВ), поэтому лечение традиционно проводится только базисной терапией, не включающей в себя противовирусные препараты. Однако у 5% больных инфекция приобретает хроническое течение, исход которого цирроз и гепатокарцинома, или может происходить развитие фульминантных форм [1].

В последнее время повышается интерес к препаратам растительного и животного происхождения, которые обладают иммуномодулирующей и противовирусной активностью. Одним из таких препа-

ратов является Стимфорте. Технология получения Стимфорте разработана ЗАО «Скай ЛТД». Стимфорте – иммуномодулирующий препарат животного происхождения представляет собой вытяжку из низших позвоночных, содержащую природный конгломерат примерно из 20 веществ [4,5], используется для приготовления раствора для внутримышечного введения.

Стимфорте существенно стимулирует в клетках иммунной системы образование микромолярных концентраций перекиси водорода. Эффект связан с активацией одного из важнейших цитоплазматических транскрипционных факторов NF- κ B, который активирует транскрипцию около 120 генов воспаления и иммунного ответа. Следствием этого является продукция важнейших провоспалительных цитокинов ИФН- γ , ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6, участвующих в противоинфекционной защите и активации адаптивного иммунитета. Стимфорте обладает способностью стимулировать и гуморальный иммунный ответ, регистрируемый по образованию в селезенке антителообразующих клеток, играющих важную роль в инициации гуморального иммунного ответа. ИФН- γ является активатором экспрессии молекул HLA-DR на поверхности антигенпрезентирующих клеток, с помощью которых осуществляется представление антигена Т- и В-лимфоцитов [3].

В связи с этим изучение и обоснование применения Стимфорте при лечении острого вирусного гепатита В представляется актуальной и перспективной задачей.

Целью настоящей работы явилось определение клинико-иммунологической и вирусологической эффективности инъекционной формы Стимфорте.

Материал и методы

В исследование были взяты больные острым вирусным гепатитом, диагноз у которых был верифицирован клинико-лабораторными показателями. Все пациенты были разделены на 2 группы. 1-я группа – испытуемые – состоит из больных (30 человек), которые, помимо базисной терапии, получили внутримышечные инъекции Стимфорте. Препарат назначался курсом по следующей схеме: 1-я инъекция 1,5 мл, через 72 ч 2-я инъекция 2 мл, далее через 7 дней ставили 3-ю инъекцию 3 мл, и через 72 ч после 3-й следовала последняя 4-я инъекция 3 мл. Такие курсы повторялись троекратно с интервалом в 14 дней в зависимости от наличия виремии.

2-я группа, контрольная, больные острым вирусным гепатитом (22 человека), которые получали только базисную терапию, включающую постельный режим, диету №5, обильное питье, введение внутривенно солевых и 5% глюкозы растворов, ферменты.

Клиническая апробация препарата Стимфорте проходила в двух центрах согласно протоколам исследования. От всех пациентов, участвовавших в исследовании, было получено информированное согласие.

Возраст больных колебался от 22 до 44 лет (средний возраст 33,9 \pm 3,8). Больные обеих групп были

сопоставимы по возрасту, полу, срокам развития желтухи, тяжести заболевания, сопутствующим заболеваниям, составу базисной терапии.

Оценка эффективности терапии проводилась по результатам клинического и лабораторного обследования и определялась:

- сроками обратного развития острого вирусного гепатита;

- динамикой и темпом снижения активности печеночно-клеточных ферментов АлАТ и АсАТ, щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранспептидазы, гипербилирубинемии и сроками нормализации биохимических показателей;

- элиминацией из крови маркеров ОГВ – HBsAg, ДНК HBV;

- частотой формирования хронического гепатита.

Одновременно учитывались возможные появления побочных реакций.

Исследование иммунного статуса включало: подсчет лейкоцитов и лимфоцитов

(CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD56) методом иммунофенотипирования с использованием меченых FITC моноклональных антител (ООО «Сорбент», г.Москва); оценку нейтрофильного фагоцитоза (латекс тест); определение концентраций сывороточных IgA, IgG, IgM с помощью соответствующих тест-систем.

Интерфероновый статус исследовали по четырем основным показателям:

- уровню продукции лейкоцитами крови ИФН- α *in vitro* при его индукции эталонным индуктором ИФН- α – вирусом болезни Ньюкасла (NDV);

- уровню продукции лейкоцитами крови ИФН- γ *in vitro* при его индукции эталонным индуктором ИФН- γ – фитогемагглютинином;

- уровню продукции лейкоцитами крови спонтанного ИФН *in vitro* при отсутствии какой-либо дополнительной индукции;

- количественному содержанию ИФН в сыворотке крови – сывороточному ИФН.

Лабораторные исследования проводились до назначения препарата и через 17-19 дней от начала терапии, а затем через 1,5 и 3,6 мес.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программ STATGRAF и FoxPro версия 6.0 с использованием вариационной статистики, включающих определение среднего арифметического (M) и среднеквадратичного отклонения (σ).

Результаты и обсуждение

Все больные 1-й и 2-й группы ежедневно наблюдались, в динамике контролировались субъективные проявления болезни, клинико-лабораторные показатели. Заболевание острым вирусным гепатитом имело среднетяжелое течение, холестатических вариантов не было.

Результаты продолжительности симптомов заболевания у больных ОГВ, получавшим Стимфорте, представлены на рис. 1.

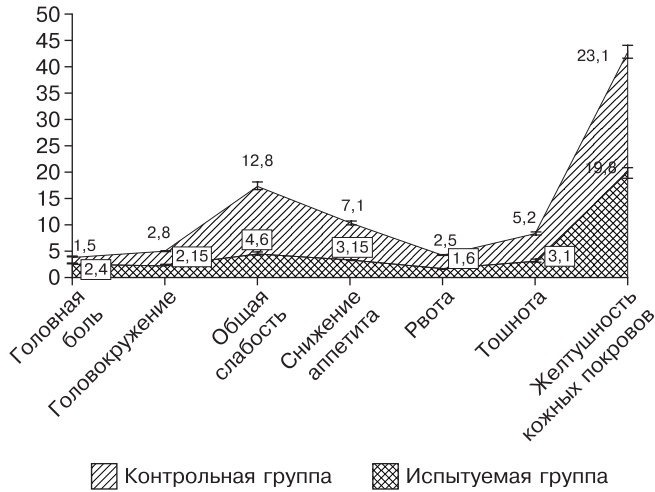


Рис. 1. Сравнительная характеристика продолжительности симптомов заболевания у больных ОГВ, получавших стимфорте и и базисную терапию.

Как видно из рис. 1, у больных, получавших Стимфорте, проявления интоксикационного синдрома наблюдались более короткое время. Так, общая слабость у больных испытуемой группы продолжалась $4,6 \pm 0,71$ дня, а в контрольной группе $12,8 \pm 3,49$ дня ($p < 0,05$), восстановление аппетита у больных происходило через $3,15 \pm 0,74$ дня – в испытуемой группе и через $7,1 \pm 2,4$ дня – в группе сравнения ($p < 0,05$). Иктеричность кожных покровов исчезала быстрее в группе, получающей препарат Стимфорте.

Динамика биохимических показателей у больных ОГВ представлена на рис. 2.

Как видно из рис. 2, динамика снижения активности ферментов в обеих группах имела существенные различия. Снижение концентрации билирубина в крови после окончания курса введения Стимфорте было более быстрым, чем в контрольной группе сравнения ($p < 0,05$).

Содержание общего белка в крови, мочевины в процессе лечения практически не изменялось. Показатели протромбинового индекса не снижались ниже уровня 73,2% в обеих группах.

В процессе наблюдения за больными гепатитом В в динамике проводилось исследование на HBs-антигеномию. В начальный период болезни HBsAg определялся у всех больных. После проведенного курса Стимфорте через 1,5 мес HBsAg не выявлялся в сыворотке крови у 54,6% в испытуемой группе и у 57% в контрольной группе. Однако к 6 мес наблюдения ни у кого из пациентов испытуемой группы поверхностный антиген HBV не был обнаружен в ИФА, в то время как в контрольной группе у 2 человек HBsAg сохранялся и сероконверсии HBeAg anti-HBe не наблюдалось.

Анализ наличия ДНК вируса гепатита В, выполненный в реальном времени при помощи ПЦР позволил установить, что при наличии практически одинаковых титров ДНК HBV до лечения (титр 10^5 – 10^8 генокопий ДНК на 1 мл сыворотки) у пациентов

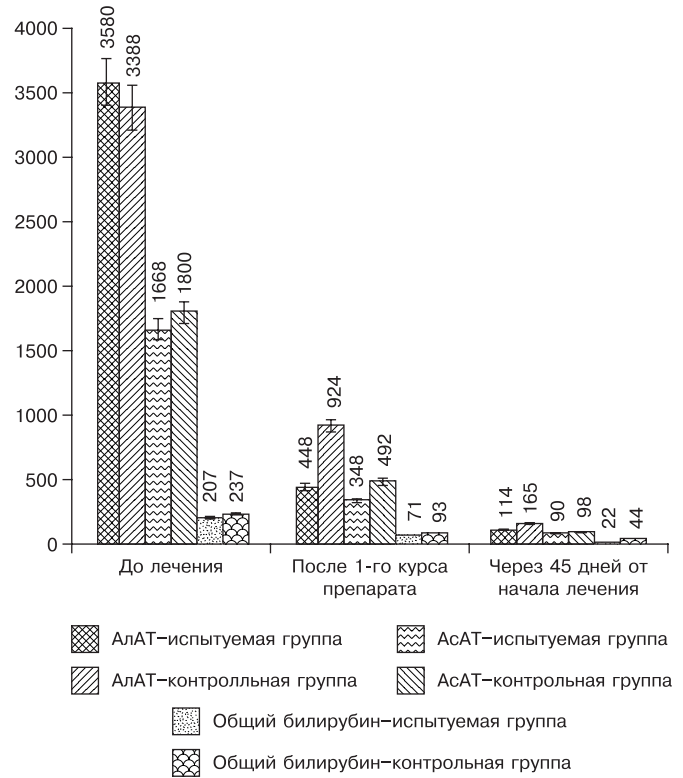


Рис. 2. Оценка действия стимфорте на динамику биохимических показателей крови у больных ОГВ.

с острым гепатитом В, после проведенного курса терапии не тестировались у 23 из 30 больных и у 9 из 22 пациентов группы сравнения (76,67% и 40,91% соответственно). Установлено, что у пациентов 1-й группы при изначально низких титрах до лечения ДНК не тестировалась после первого курса терапии, тогда как при высоких титрах ДНК HBV ($> 10^8$) после курса Стимфорте отмечено снижение уровня ДНК HBV на 3-5 порядков.

Через 1,5 мес после проведенного курса ДНК HBV в 1-й группе не определена ни у одного больного острым вирусным гепатитом В, в группе сравнения – у 3 человек флюктуировала ДНК HBV. Через 6 мес наблюдения у 2 пациентов из 3 последних сохранялся этот маркер в крови. Дальнейшие наблюдения регистрировали у них переход ОГВ в хроническую форму.

За время наблюдения больных, получавших Стимфорте, велась регистрация нежелательных побочных явлений. Ни у одного пациента из 30 с острым вирусным гепатитом побочных эффектов от препарата не наблюдалось.

Также оценивалось влияние Стимфорте на основные показатели гемограммы – гемоглобин, эритроциты, лейкоциты, тромбоциты. До лечения в сравниваемых группах значения показателей гемограммы были сходными и не выходили за принятые пределы норм. В течение болезни как в испытуемой, так и в контрольной группе существенных изменений в гемограмме не выявлено. Развитие анемии, лейкоцитопении, тромбоцитопении у больных, получавших

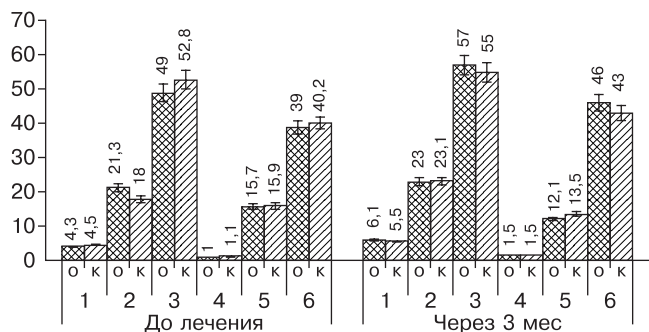


Рис. 3. Динамика показателей Иммунного статуса больных ОГВ.

О – основная группа; К – контрольная группа; 1 – лейкоциты · 10⁹/л; 2 – лимфоциты · 10⁹/л; 3 – CD3⁺ Т-лимфоциты, %; 4 – CD4/CD8 (ИРИ); 5 – CD56 (NK-клетки), %; 6 – фагоцитарный показатель.

Стимфорте, не наблюдалось.

У больных ОГВ до лечения в 58,8% случаев определялись в различной степени выраженная лейкопения и в 41,2% - нейтрофильный лейкоцитоз, причем лейкопения сопровождалась лимфоцитопенией в 58,8% случаев, а при лейкоцитозе содержание лимфоцитов находилось на нижней границе физиологической нормы (41,2%). Низкое содержания CD3⁺ - Т лимфоцитов определялось в 47,7% случаев, в основном за счет CD4⁺ хелперов-1 у 58,8% и субпопуляций CD8⁺ ЦТЛ у 70,5% больных, что отражалось на низких значениях иммунорегуляторного индекса (ИРИ), определяемых у 82,3% больных ОГВ. Количественное содержание субпопуляций CD 19⁺ В-лимфоцитов определялось как повышенное у 35,2% пациентов, а содержание НК. - клеток CD16⁺ и CD56⁺ превышало верхнюю границу физиологической нормы в 76,4% и 64,7%, соответственно. Низкая фагоцитарная активность и снижение содержания в сыворотке крови IgA и IgG тестировались у 70,6%, 47% и 76,4% лиц соответственно. Уровень IgM определялся, как правило, в пределах физиологической нормы (рис. 3).

Таким образом, изменения показателей иммунного статуса больных ОГВ выражались в подавлении вирусом HBV количественного содержания Т- лимфоцитов, ответственных за развитие клеточного противовирусного иммунного ответа, сопровождающего как лейкопению, так и нейтрофильный лейкоцитоз, а также активацией субпопуляций НК клеток, обеспечивающих гибель вирусинфицированных клеток.

После курса терапии Стимфорте в количественных показателях иммунного статуса больных ОГВ (n=30) определялись разнонаправленные тенденции изменений. Так, при изначальной лейкопении и сниженном содержании субпопуляций Т-лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, ИРИ), фагоцитоза, иммуноглобулинов IgA и IgG отмечалось их повышение. При изначальном лейкоцитозе и повышенном содержании субпопуляций НК клеток (CD16⁺ и CD56⁺) отмечалось их снижение, причем в последние сроки наблюдения эта тенденция сохранялась и в за-

висимости от уровня виремии до лечения нормализация количественных показателей иммунного статуса больных ОГВ отмечалась через 1 – 3 мес от начала лечения. Указанные изменения в показателях иммунного статуса под действием препарата Стимфорте хотя и отстают по времени от сроков снижения вирусной нагрузки и элиминации HBV у больных ОГВ, характеризуют его иммуномодулирующее действие способствующее сокращению сроков реабилитации больных [2]. У больных ОГВ, получавших только базисную терапию аналогичная тенденция изменения показателей иммунного статуса тестировалась в зависимости от изначальной вирусной нагрузки через 3 и даже через 6 мес от начала лечения.

При тестировании основных показателей ИФН – статуса у больных ОГВ в зависимости от выраженности вирусной нагрузки до лечения определялась недостаточность функциональной активности системы ИФН по продукции лейкоцитами ИФН-α и ИФН-γ II-III-ей степени. Повышенное содержание ИФН в сыворотке крови (до 16 ед/мл) определялось только при низком содержании ДНК-копий HBV (10⁴ – 10³ копий/мл). Стимуляция и тенденция к нормализации сниженной продукции ИФН-α и ИФН-γ после лечения препаратом Стимфорте, более выраженная у лиц с изначальной низкой виремией, определялась через 1 – 3 мес от начала лечения и сопровождалась снижением содержания ИФН в сыворотке крови. Описанные изменения в ИФН-статусе больных ОГВ указывают на восстановление функциональной активности системы ИФН и ослабление остроты инфекционного процесса. У лиц с более выраженной вирусной нагрузкой (10⁷ – 10⁵ копий/мл), получавших препарат тенденция к нормализации основных показателей ИФН - статуса начинала определяться через 3 мес от начала лечения, сохраняя положительную динамику до конца срока наблюдения.

Заключение:

Таким образом, подводя итоги, можно сказать, что применение Стимфорте положительно влияло на регресс клинических синдромов острого вирусного гепатита – интоксикационного, астено-вегетативного, диспептического, сокращая его продолжительность на 2–8 дней, что является важным показателем нормализации общего состояния.

Применение Стимфорте в два раза быстрее способствовало нормализации показателей цитолиза – АЛт, АсАт по сравнению с данными контрольной группы, что свидетельствует о высокой терапевтической активности Стимфорте. Установлено положительное влияние Стимфорте на клиренс вируса у всех больных острым вирусным гепатитом В.

Включение препарата Стимфорте в комплексную терапию острого вирусного гепатита В оказывает иммуномодулирующее действие на сниженные и/или повышенные показатели иммунного статуса и функциональной активности системы ИФН и стиму-

лирует противовирусный иммунный ответ на острую HBV-инфекцию.

Стимфорте хорошо переносится всеми пациентами при внутримышечном введении в указанных дозах, оказывая положительный эффект на субъективные и объективные показатели.

В течение 6 мес наблюдения больных острым вирусным гепатитом В, пролеченных препаратом Стимфорте, случаев хронизации не наблюдалось.

Препарат Стимфорте может быть рекомендован в комплексной терапии при остром вирусном гепатите В.

ЛИТЕРАТУРА

1. *W. Ray Kim*, Epidemiology of Hepatitis B in the United States. *Hepatology*. 2009 May; 49(5 Suppl): S28–34.
2. *Дерябин П.Г., Е.И. Исаева, Д.Г. Мальдов, А.В. Ильичев, Л.В. Пичугина, Львов Д.К.* – Действие Стимфорте на устойчивый к интерферону генотип штамма вируса гепатита С. *Вопр. Вирусологии* 2009; 2: 17 – 20.
3. *Зыкова И.Н., Шульженко А. Е., Пинегин Б.В., Мальдов Д.Г., Ильичев А.В.* - Применение препарата «Стимфорте» в комплексной терапии рецидивирующей герпесвирусной инфекции. *Герпес*. 2009; 2: 30-36.
4. *Ильичев А.В., Бельков А.П., Мальдов Д.Г., Асташкин Е.И.* – Секретция гранул нейтрофилов человека под действием формил пептида и препарата «Стимфорте». *Иммунология*, 2009; 3: 159-61.
5. *Мальдов Д.Г., Галегов Г.А., Андропова В.Л., Ильичев А.В., Бельков А.П.* – Действие «Стимфорте» на основные характеристики воспаления при заражении экспериментальных животных впр I. *Антибиотики и химиотерапия* 2011.
6. *Российский статистический ежегодник. Заболеваемость населения по основным классам болезней. М: Федеральная служба государственной статистики.* 2011.

REFERENCES:

1. *W. Ray Kim*, Epidemiology of Hepatitis B in the United States. *Hepatology*. 2009 May; 49(5 Suppl): 28–34.
2. *Deryabin P.G., E.I. Isaeva, Mal'dov D.G., A.V. Ilyichev, A.P., Pichugina L.V.* Stimforte action on the interferon resistant genotype of hepatitis C virus culture. *Vopr. Virusologii*. 2009; 2: 17-20.
3. *Zykova I.N., Shul'zhenko A. E., B.V. Pinegin, Mal'dov D.G., Il'ichev A.V.* The use of the drug "Stimforte" in the treatment of recurrent herpes viral infections. *Gerpes*. 2009; 2: 30-6.
4. *Il'ichev A.V., Bel'kov A.P., Mal'dov D.G., Astashkin E.I.* The secretion granules of human neutrophils under the formil peptides and preparation "Stimforte." *Immunologija*. 2009; 3: 159-61.
5. *Mal'dov D.G., Galegov G.A., Andronova V.L., Il'ichev A.V., Bel'kov A.P.* Action "Stimforte" on the main characteristics of inflammation in experimental animals infected HSV I. *Antibiotiki i himioterapija*. 2011.
6. *Russian statistical year-book. Morbidity of the main classes of diseases.* Federal State Statistics Service. 2011.

Сведения об авторах:

Хлопова Ирина Николаевна, к.м.н., ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского» Минздравсоцразвития России.; **Трякина Ирина Петровна**, канд. мед. наук, доцент каф. инфекционных болезней ГБОУ ДП «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России; **Мальдов Дмитрий Григорьевич**, канд. биол. наук ЗАО «Скай ЛТД»; **Григорян Седа Суреновна**, проф., доктор мед. наук ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалея РАМН; **Рик Наталия Андреевна**, ординатор каф. инфекционных болезней ГБОУ ДП «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России. E-mail: riknata@mail.ru