

ДОЗОЗАВИСИМАЯ ИНТЕРФЕРОНИНДУЦИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ И ФАРМАКОКИНЕТИКА ЦИКЛОФЕРОНА У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Д. С. Суханов¹, М. Г. Романцов¹, А. Н. Смагина², А. Л. Коваленко³, О. М. Локтева³

В статье представлены материалы, полученные в процессе обследования 35 здоровых добровольцев с целью оценки дозозависимой интерферогенной активности и фармакокинетики низкомолекулярного индуктора интерферона Циклоферон. Установлено, что циклоферон индуцирует у здоровых лиц продукцию раннего α -IFN в течение 24 ч от момента введения препарата. В дозе 500 мг препарат индуцирует продукцию лейкоцитами γ -IFN *in vitro* в течение суток от момента введения с сохранением титра последнего до 48 ч наблюдения. При введении 500 мг препарата здоровым лицам пик его концентрации в крови наблюдается через 40 мин с последующим значительным снижением через 2 ч. Изменение концентрации циклоферона в крови коррелирует с содержанием его в моче, свидетельствуя о выведении исследуемого препарата через почки.

Ключевые слова: интерферон, индукторы интерферона, циклоферон

ВВЕДЕНИЕ

Нормальное функционирование иммунной системы строится на балансе Th1- и Th2-иммунного ответа, основанном на равноценной продукции их регуляторных цитокинов. Хроническая несбалансированность их активации приводит к развитию иммунной патологии. От баланса двух форм иммунного ответа – клеточного и гуморального, а также соотношения про- и противовоспалительных его составляющих решающим образом зависит эффективность элиминации возбудителя [2, 4].

Индукторы интерферона (IFN) представляют собой семейство высоко- и низкомолекулярных природных и синтетических соединений. Используя механизмы естественного (врожденного) и адаптивного иммунитета они способны стимулировать пролиферацию, дифференцировку клеток костного мозга [1].

Одним из наиболее эффективных и перспективных низкомолекулярных индукторов IFN является циклоферон (меглумина акридонат, метилглюкамина акридонат), обладающий низкой токсичностью, отсутствием аллергенного, мутагенного и эмбриотоксического действия [7].

Противовирусное действие препарата связано с выработкой эндогенного IFN(α, β, γ) и прямым воздействием на репликацию вируса. Прямое действие препарата нарушает репликацию вируса, блокирует инкор-

порацию вирусных ДНК или РНК в капсиды, увеличивая количество дефектных вирусных частиц, снижает вирус-индуцированный синтез белков в клетках [1–3]. Иммунорегуляторные свойства циклоферона опосредуются через активацию синтеза γ -IFN, что восстанавливает Т-клеточное звено иммунитета. Продукция γ -IFN Th1-лимфоцитами и естественными киллерами осуществляется благодаря стимуляции γ -IFN-индуцирующими цитокинами IL-12, IL-2, TNF- α .

Курсовое применение циклоферона эффективно при хронических и рецидивирующих вирусных и бактериальных инфекциях, а также у больных с вторичным иммунодефицитным состоянием, ассоциированным с вирусами герпеса, цитомегаловируса, вирусами гепатитов. Вместе с тем остается невыясненным преобладание индукции того или иного вида эндогенного IFN в зависимости от дозы вводимого циклоферона, а также фармакокинетические особенности препарата.

Цель исследования - оценка дозозависимой интерферогенной активности и фармакокинетики циклоферона у здоровых добровольцев.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено в НИИ гриппа РАМН (Санкт-Петербург, Разрешение Фармакологического государственного комитета РФ от 22.10.1992, протокол №17) с участием 35 человек (28 мужчин, 7 женщин), не имевших противопоказаний к применению препарата. Средний возраст обследованных лиц составил $22,5 \pm 2,9$ года. При поступлении в специализированную клинику НИИ гриппа РАМН каждый волонтер подписывал бланк информированного согласия.

Все обследованные были разделены на 3 группы: получавшие циклоферон в дозе 250 мг ($n = 13$); получавшие циклоферон в дозе 500 мг ($n = 13$); получавшие плацебо ($n = 9$).

¹ Кафедра фтизиопульмонологии (зав. – проф. А. К. Иванов), кафедра инфекционных болезней (зав. – проф. Т. В. Сологуб) ГОУ ВПО Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И. И. Мечникова, 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., 47.

² Кафедра инфекционных болезней и эпидемиологии с курсом ВИЧ-медицины (зав. – Д. А. Лиознов) ГОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова.

³ ООО “НТФФ “ПОЛИСАН”, Санкт-Петербург.

Таблица 1. Сравнительная оценка интерферонового ответа у добровольцев, получавших циклоферон

Препарат, мг	Показатели IFN-ответа <i>in vivo</i>	Концентрация препарата в МЕ/мл через				
		Исходный фон	4 ч	8 ч	24 ч	48 ч
Плацебо	α -IFN	2,0 ± 0,18	2,1 ± 0,18***	1,2 ± 0,11***	1,5 ± 0,07***	0,7 ± 0,06***
	γ -IFN	3,3 ± 0,28	4,0 ± 0,38###	4,7 ± 0,12##	4,0 ± 0,32###	1,1 ± 0,03###
Циклоферон, 250	α -IFN	1,3 ± 0,01	23,9 ± 2,31* "	78,6 ± 6,98*	23,3 ± 2,05* "	9,9 ± 0,75* "
	γ -IFN	2,8 ± 0,24	1,4 ± 0,08# "	4,5 ± 0,41# "	3,3 ± 0,23# "	1,6 ± 0,82# "
Циклоферон, 500	α -IFN	2,0 ± 0,21	80,1 ± 7,86** "	77,3 ± 7,24** "	17,3 ± 1,83** "	4,2 ± 0,36** "
	γ -IFN	3,2 ± 0,62	7,6 ± 0,63## "	8,6 ± 0,74### "	3,6 ± 0,32### "	0### "

Примечание. Здесь и в табл. 2 разница достоверна ($p < 0,05$) при сравнении:

* - групп "плацебо" и "циклоферон 250 мг" по концентрации α -IFN;

** - групп "плацебо" и "циклоферон 500 мг" по концентрации α -IFN;

" - групп "циклоферон 250 мг" и "циклоферон 500 мг" по концентрации α -IFN;

- групп "плацебо" и "циклоферон 250 мг" по концентрации γ -IFN;

- групп "плацебо" и "циклоферон 500 мг" по концентрации γ -IFN;

- групп "циклоферон 250 мг" и "циклоферон 500 мг" по концентрации γ -IFN.

Циклоферон применяли в виде раствора – 125 мг/мл, форма выпуска – по 2 мл (250 мг активного вещества). В качестве плацебо использован апирогенный физиологический раствор. Способ введения – внутримышечно однократно, дозы препарата – 250 и 500 мг.

Интерфероновый статус определялся методом иммуноферментного анализа сыворотки крови с помощью планшеточных тест-систем ("Вектор-бест"); модифицированным биологическим методом, в основе которого лежит культивирование лейкоцитов, полученных у обследованных, совместно с исследуемым препаратом и раствором индикаторного вируса. Для последующего количественного определения уровня индуцированного IFN тест-культуру окрашивали раствором кристаллического фиолетового, экстрагировали 30% раствором этанола и фотометрировали. Количественную величину активности IFN в пробах определяли по калибровочной кривой для референс-препарата нативного человеческого α -IFN, полученного в ГИСК им. Л. А. Тарасевича[5]. Определение уровня α -IFN и γ -IFN обоими методами проводили 5-кратно: исходно, через 4, 8, 24 и 48 ч. Активность IFN выражали в международных единицах активности на 1 мл сыворотки крови или индукционной системы (МЕ/мл).

Концентрацию циклоферона для определения фармакокинетических параметров в биологическом мате-

риале (плазма крови, моча) определяли методом спектрофлуориметрии с использованием прибора СФЛ-2. Исследуемый препарат вводили однократно внутримышечно в дозе 500 мг.

Статистическая обработка данных проведена в соответствии с рекомендациями по обработке иммунологических данных [6] с использованием методов непараметрической статистики (U-критерий Манна-Уитни). Статистически значимыми различия признавали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что в дозах 250 и 500 мг препарат индуцировал в организме практически здоровых людей выработку раннего α -IFN в первые 8 часов от момента введения препарата. При этом индукция при введении препарата в двойной дозе к концу 4-го часа введения в 3,4 раза превышала таковую в дозе 250 мг (табл.1). К 24 часам от момента введения препарата концентрация α -IFN в сыворотке снижалась соответственно в 3,4 и 4,5 раза. К 48 часам от момента введения препарата концентрация α -IFN в сыворотке сохранялась на титрах, в 7,6 и 2,1 раза превышающих исходный уровень обследования. При этом уровень эндогенного IFN на фоне введения 250 мг циклоферона в 2,4 раза превышал аналогичный при введении 500 мг препарата.

Таблица 2. Интерфероновый ответ лейкоцитами крови *in vitro* на введение циклоферона добровольцам

Препарат, мг	Показатели IFN-ответа <i>in vivo</i>	Концентрация препарата в МЕ/мл через				
		Исходный фон	4 ч	8 ч	24 ч	48 ч
Плацебо	α -IFN	46,8 ± 4,42	48,2 ± 4,76***	49,1 ± 3,53***	46,1 ± 2,58**	46,8 ± 4,43*
	γ -IFN	47,6 ± 4,51	47,2 ± 4,19##	45,2 ± 4,29##	48,1 ± 4,75##	47,7 ± 4,42##
Циклоферон,250	α -IFN	44,3 ± 3,62	40,1 ± 4,02* "	41,9 ± 4,08* "	44,2 ± 4,21"	42,1 ± 4,13* "
	γ -IFN	45,5 ± 4,38	49,7 ± 3,92# "	52,1 ± 4,96# "	49,9 ± 4,81# "	45,8 ± 4,23# "
Циклоферон,500	α -IFN	47,2 ± 4,68	58,7 ± 5,62** "	52,8 ± 5,16** "	50,6 ± 4,93** "	48,2 ± 4,76 "
	γ -IFN	48,7 ± 5,19	71,0 ± 6,82## "	76,2 ± 7,53### "	80,0 ± 7,91### "	66,2 ± 6,58### "

Таблица 3. Содержание циклоферона в плазме и сыворотке крови добровольцев в зависимости от времени после введения препарата

Время отбора проб, ч	Содержание препарата			
	в плазме крови		в сыворотке крови	
	отн.ед.	10^{-5} мг/мл	отн.ед.	10^{-5} мг/мл
0,65	0,108 ± 0,0091	522,0 ± 50,48	0,110 ± 0,009	554,0 ± 52,73
1	0,060 ± 0,0054	207,0 ± 19,94	0,064 ± 0,0052	234,0 ± 21,79
2	0,025 ± 0,0021	53,0 ± 5,83	0,025 ± 0,0021	48,6 ± 5,01
3	0,013 ± 0,0008	23,2 ± 2,16	0,0138 ± 0,001	24,2 ± 2,33
4	0,006 ± 0,0004	13,4 ± 1,25	0,007 ± 0,0003	13,4 ± 1,25
6	0,003 ± 0,0002	8,6 ± 0,78	0,0032 ± 0,0002	8,6 ± 0,72
12	0,002 ± 0,0001	4,0 ± 0,32	0,002 ± 0,0001	4,0 ± 0,38
16	0,001 ± 0,00001	2,3 ± 0,18	0,001 ± 0,00008	2,3 ± 0,95
48	0,002 ± 0,00018	3,6 ± 0,24	0,0014 ± 0,0001	9,0 ± 0,75
72	0,0396 ± 0,0028	59,8 ± 4,87	0,042 ± 0,002	64,6 ± 6,20
200	0,0344 ± 0,0030	0,20 ± 0,017	0	0

Уровень эндогенного γ -IFN при введении двойной дозы изучаемого препарата возрастал через 8 ч, превышая в 1,9 раза таковой при введении 250 мг циклоферона и у добровольцев, получавших плацебо (табл.1). Однако через 48 ч эксперимента только в группе лиц, получавших 250 мг циклоферона, отмечено сохранение концентрации эндогенного γ -IFN сыворотки крови в концентрации, превышающей в 1,5 раза таковую у лиц, получивших плацебо.

При введении циклоферона в дозе 500 мг продукция γ -IFN *in vitro* лейкоцитами крови к 4 часам превысила в 1,4 раза аналогичный показатель в дозе 250 мг, сохраняя данную тенденцию к концу 24–48 часов эксперимента (табл.2). Прирост эндогенного γ -IFN, по сравнению с исходным уровнем составил: через 24 ч – 1,6 раза, через 48 ч – 1,4 раза. Уровень индукции эндогенного γ -IFN при введении индуктора в дозе 250 мг статистически значимо не отличался от исходного и аналогичного показателя лиц, получавших плацебо.

Таблица 4. Содержание циклоферона в моче в зависимости от времени отбора проб (в сравнении с концентрацией препарата в плазме крови этих же лиц)

Номер истории болезни	Время отбора, ч	Концентрация препарата в сыворотке крови, отн.ед	Концентрация препарата 10^{-5} мг/мл	
			в моче	в плазме
75	3	0,081	0,2	20
	6	1,06	19	10
81	3	0,120	0,25	30
	6	1,45	70	10
82	3	0,090	0,20	30
	6	0,830	11	13
116	3	0,055	0,10	15
	6	0,640	60	5
117	3	0,060	0,10	21
	6	0,880	13	5

Данные по содержанию препарата в образцах плазмы и сыворотки крови приведены в табл. 3. Так, концентрация препарата в крови достигает максимального значения менее чем за 40 мин (0,65 ч), составив 0,108–0,110 отн.ед. и 522–554 $\cdot 10^{-5}$ мг/мл, и начинает снижаться через 2 ч от момента введения препарата в 9,8 и 11,4 раза, составив 53 и 48,6 $\cdot 10^{-5}$ мг/мл ($p < 0,05$). Через 16 ч она составила 2,3 $\cdot 10^{-5}$ мг/мл и соответственно 0,001 отн.ед ($p < 0,05$).

Через 48 ч во всех пробах наблюдается нарастание концентрации препарата до 3,6 $\cdot 10^{-5}$ мг/мл в плазме и до 9,0 $\cdot 10^{-5}$ мг/мл в сыворотке крови, составив 0,7 и 1,6% от 0,65 ч, через 72 ч концентрация препарата составила соответственно 59,8 $\cdot 10^{-5}$ и 64,6 $\cdot 10^{-5}$ мг/мл, т.е. 11,4 и 11,6% от уровня 0,65 ч. Через 200 ч в сыворотке крови препарат не определяется, а в плазме его следы 0,20 $\cdot 10^{-5}$ мг/мл.

Циклоферон циркулирует в кровеносном русле, находясь как в свободном, так и в связанном с белками плазмы крови состоянии. Вероятно, часть препарата, связанная с фибриногеном, увлекается при свертывании крови вместе с образовавшимся фибрином. Можно также предположить, что циклоферон накапливается в органах и тканях ретикуло-эндотелиальной системы и выводится из организма лишь через 90–100 ч.

В табл. 4 приведены данные по содержанию препарата в моче добровольцев, которые коррелируют с приведенными в последней графе результатами по содержанию препарата в плазме крови. Отмечено, что при концентрации препарата в плазме порядка 15–306 $\cdot 10^{-5}$ мг/мл, концентрация в моче составляет лишь 0,1–0,26 $\cdot 10^{-5}$ мг/мл, а по мере уменьшения содержания препарата в крови до 5–106 $\cdot 10^{-5}$ мг/мл, его концентрация в моче увеличивается до 10–706 $\cdot 10^{-5}$ мг/мл, что свидетельствует о его выведении через почки.

ВЫВОДЫ

1. Циклоферон в дозе 250 и 500 мг у здоровых лиц индуцирует ранний α -IFN в течение 24 ч от момента введения препарата.

2. Циклоферон в дозе 500 мг индуцирует продукцию лейкоцитами γ -IFN *in vitro* в течение суток от момента введения с сохранением титра последнего до 48 ч наблюдения.

3. Пик концентрации циклоферона в крови наблюдается через 40 мин после введения препарата здоровым лицам с последующим значительным снижением через 2 ч. Изменение концентрации препарата в крови коррелирует с содержанием его в моче.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. С. Григорян, *Интерферону – 50 лет*, Москва (2007), сс. 66 – 72.

- Ф. И. Ершов, О. И. Киселев, *Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств)*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2005).
- Ф. И. Ершов, М. Г. Романцов, *Антивирусные средства в педиатрии*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2005).
- Г. Ф. Железникова, В. В. Иванова, Н. Е. Монахова, *Варианты иммунопатогенеза острых инфекций у детей*, Фолиант, Санкт-Петербург (2007).
- О. И. Киселев, В. И. Мазуров, В. В. Малиновская и др., *Определение интерферонового статуса как метод оценки иммунореактивности при различных формах патологии*, Москва, Санкт-Петербург (2002).
- О. Ю. Реброва, *Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA*, Сфера, Москва (2006).
- М. Г. Романцов, Л. Г. Горячева, А. Л. Коваленко, *Противовирусные и иммуностропные препараты в детской практике*, МедиКа, Санкт-Петербург (2008).

Поступила 08.09.11

DOSE-DEPENDENT INTERFERON-INDUCTION ACTIVITY AND PHARMACOKINETICS OF CYCLOFERON IN HEALTHY HUMANS

D. S. Sukhanov¹, M. G. Romantsov¹, A. N. Smagina², A. L. Kovalenko³, and O. M. Lokteva³

¹ St. Petersburg Mechnikov State Medical Academy, Piskarevskii prospect 47/5, St. Petersburg, 195067, Russia.

² St. Petersburg Pavlov State Medical University, ul. L'va Tolstogo 6/8, St. Petersburg, 197022, Russia.

³ Polisan Research and Technology Company, Ligovskii prosp. 112, St. Petersburg, 192019, Russia.

Dose-dependent interferonogenic activity and pharmacokinetics of cycloferon – a low-molecular inductor of interferon – have been studied in a group of 35 healthy volunteers. It is established that cycloferon induces the production of early α -IFN within 24 h from the moment of drug introduction. In a dose of 500 mg, the drug induces production of γ -IFN by leukocytes *in vitro* within 24 h from the moment of introduction, with retention of the titer for 48 h. This proves the need for differentiated approach to a choice of the dose of cycloferon, depending on diseases in which complex treatment involving interferon inducers is required. After the introduction of cycloferon (500 mg) in healthy volunteers, the peak of drug concentration in the blood is observed in 40 min, with the subsequent considerable decrease within 2 h. Variation of the cycloferon concentration in the blood correlates with its content in urine, which is evidence for the drug elimination from organism through kidneys.

Key words: Interferon, inducers of interferon, cycloferon