



WJG

World Journal of
Gastroenterology®

Антиоксидантное и иммуномодулирующее действие Виусида у пациентов с хроническим гепатитом С

Eduardo Vilar Gomez, Yadina Martinez Perez, Hector Vega Sanchez, Gretel Riveron Forment, Enrique Arus Soler, Luis Calzadilla Bertot, Ali Yasells Garcia, Maria del Rosario Abreu Vazquez, Licet Gonzalez Fabian

РЕЗЮМЕ

Цель: исследовать эффективность пищевой добавки Виусид как антиоксиданта и иммуномодулятора у пациентов с хроническим гепатитом С.

Методы: 60 пациентов с хроническим гепатитом С, которым не помогло стандартная противовирусная терапия, были рандомно выбраны для прохождения терапии Виусидом на протяжении 24 недель (3 саше в день, n=30), а также в плацебо группу (n=30). Первичным результатом было изменение содержания в сыворотке малондиальдегидов и 4-гидроксиалкенолов (продукты перокисления липидов). Вторичным результатом были изменения в сыворотке содержания фактора некроза опухоли- α (TNF- α), интерферона- γ (IFN- γ) и интерлейкина-10 (IL-10).

Результаты: В обеих группах наблюдалось статистически значимое сокращение содержания в сыворотке 4 гидроалкенолов и малондиальдегида, в сравнении с показателями до начала лечения, но у пациентов, которые получали Виусид, наблюдалось более выраженное сокращение в сравнении с контрольной группой (P=0.001). Уровень TNF- α значительно возрос с 6.9 до 16.2 пг/мл (P<0.01) у пациентов, которые получали плацебо, в сравнении с отсутствием изменений, 6.6-7.1 пг/мл (P=0.26), у пациентов, получающих Виусид терапию (P= .001). Кроме этого, уровень интерлейкина IL-10 значительно увеличился у пациентов после лечения Виусидом (2.6-8.3 пг/мл, P=0.04) в сравнении с пациентами, получающими плацебо (2.8-4.1 пг/мл, P=0.09) (P=0.01). Подобно этому, введение Виусида значительно повысило средний

уровень IFN- γ с 1.92 до 2.89 пг/мл (P<0.001) в сравнении с уменьшением среднего показателя с 1.80 до 1.68 пг/мл (P=0.70) в группе плацебо (P<0.0001). Пациенты хорошо переносили терапию Виусидом.

Выводы: Результаты показывают, что лечение Виусидом приводит к значительному улучшению в показателях окислительного стресса, а также в иммунологических показателях у пациентов с хроническим гепатитом С.

Ключевые слова: антиоксидантная терапия, хронический гепатит С, цитокины, иммуномодуляторная терапия, природные добавки, окислительный стресс.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус гепатита С (HCV) является одной из наиболее распространенных причин хронического заболевания печени, приводящего к циррозу и гепатоцеллюлярной карциноме (HCC)[1]. Пегинтерферон с рибавирином являются единственным терапевтическим средством с доказанной эффективностью у пациентов с хроническим гепатитом С (CHC)[2]. К сожалению, вирусологическая реакция проявляется только приблизительно у 50% пациентов. Ученые исследовали ингибиторы протеазы и полимеразы HCV, но возрастание количества побочных эффектов при исследованиях и прерывание терапии пациентами вследствие этих побочных эффектов могут сделать невозможным дальнейшее использование препаратов [3,4]. На данный момент точный патогенез повреждения печени и фиброза

печени полностью не раскрыт. В предыдущих исследованиях было обнаружено увеличение окислительного стресса у пациентов с хроническим HCV[5,6]. Эти данные подтверждены увеличением содержания продуктов перокисления липидов (LPO) (таких как малондиальдегид и гидроксиненал), чрезмерными показателями видов активного кислорода, повышенной активностью супероксида дисмутазы (SOD) и понижением уровня глутатиона (GSH) в сыворотке эритроцитов пациентов с СНС в сравнении со здоровой контрольной группой[5-9]. Подобно этому, дисбаланс цитокинов играет значительную роль относительно длительности вирусной инфекции, как ключевой медиатор воспалительных и фиброгенных процессов у пациентов с инфекцией HCV [10]. Исследования показали, что увеличение выработки интерферона-γ (IFN-γ) связано со спонтанным выздоровлением при HCV инфекции, в сравнении со слабой выработкой у пациентов при длительном течение заболевания[11,12]. Подобно этому, есть данные, что у пациентов с хронической HCV инфекцией сывороточная концентрация интерлейкина (IL)-10 возрастает [13,14]; однако длительная терапия IL-10 при лечении пациентов с хроническим гепатитом С приводит к значительному улучшению показателей воспаления и фиброза[15]. В некоторых исследованиях предполагалось, что существует позитивная связь между увеличением в сыворотке содержания фактора некроза опухоли –α (TNF-α), IL-1 и -6, степенью воспаления печени и фиброза у пациентов с СНС [16,17]. Таким образом, очевидна актуальность изучения антиоксидантных и иммуномодулирующих веществ, однако, предыдущие исследования не четко продемонстрировали их потенциальные преимущества, частично вследствие

ограниченности нерандомизированных исследований малым количеством выборки, недостатком зависимых конечных позиций, и плохого понимания роли антиоксидантов при СНС[18-23]. Необходимо развивать новые стратегии лечения при СНС. Т.о., введение веществ с антиоксидантными и иммуномодуляторными свойствами может являться многообещающей терапевтической стратегией, которая будет способна остановить природное развитие заболевания, особенно если организм ранее не реагировал на антивирусное лечение. Виусид, природная добавка, содержит разные молекулы (аскорбиновая кислота, цинк, глицирризиновая кислота) с признанными антиоксидантными свойствами (Таблица 1) [24-26]. Его разные химические компоненты активируются через молекулярную активацию, что увеличивает их биоактивность без изменения физической структуры. В последних исследованиях, Vilar Gomez et al[27] сообщили, что сочетание Виусида с классической терапией интерферонами и рибавирином привело к значительным гистологическим и биохимическим улучшениям, особенно у пациентов без выявленной вирусологической реакции. Они предположили, что действие Виусида на гистологические показатели, особенно при фиброзе, связано с его антиоксидантными или иммуномодуляторными свойствами. Эти свойства могут влиять на гистологические показатели при СНС, при воспалении и фиброзе. Т.о., нами было проведено рандомизированное двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование, чтобы проверить, имеет ли Виусид действие на параметры окислительного стресса и показатели цитокинов у пациентов с хроническим гепатитом С.

Таблица 1. Ингредиенты Виусида

Яблочная кислота	0.666 г	Аскорбиновая кислота	0.020 г
Глицирризиновая кислота	0.033 г	Фолиевая кислота	66 мкг
Глюкозамин	0.666 г	Цианокобаламин	0.3 мкг
Аргинин	0.666 г	Сульфат цинка	0.005 г
Глицин	0.333 г	Пиридоксал	0.6 мг

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

В исследовании принимали участие 60 пациентов с хроническим гепатитом С, проходящие наблюдение в центре третичной медицинской помощи (Национальный Институт Гастроэнтерологии, Гавана, Куба): женщины и мужчины в возрасте 18-65 лет, с позитивным тестом на анти- HCV антитела, и обнаруженной в сыворотке путем полимеразной цепной реакции (PCR) РНК HCV, длительное время высоким уровнем ALT как минимум при двух обращениях, показателями биопсии печени, свидетельствующими о хроническом гепатите, а также те, кому не помогло лечение пегинтерфероном с рибавирином; пациенты не употребляющие много алкоголя (недельное употребление этанола не более 40г).

Не включены в исследование следующие пациенты: пациенты с любыми другими заболеваниями печени, пациенты с позитивным скринингом вирусного гепатита А, В и ВИЧ, беременные пациентки и пациентки, кормящие грудью, пациенты с декомпенсированным циррозом, пациенты с сопутствующими заболеваниями с ожидаемым сокращением длительности жизни, пациенты с психиатрическими нарушениями, наркозависимые, пациенты с признаками рака печени выявленном на УЗИ, с уровнем α -фетопротеина менее чем 50 нг/л, а также те, кто отказались принимать участие в исследовании.

Этика

Исследование было проведено согласно Хельсинской Декларации, одобрено этическим комитетом и советом Национального Института Гастроэнтерологи. Все пациенты подписали письменное согласие на участие в эксперименте. Исследование было зарегистрировано на ClinicalTrials.gov (NCT00778843).

Дизайн исследования

После первичного исследования пациенты начали принимать Виусид (3 саше в день, n=30)

на протяжении 24 недель. Пациенты были выбраны и распределены рандомизировано. Рандомизация была проведена распределением на блоки медиком, не задействованным в осмотре или терапии пациентов. Виусид и пакеты плацебо были произведены фирмой Катализис, Испания. Саше Виусид и плацебо не отличались внешним видом, вкусом или запахом.

Данные всех пациентов оценивали в сравнении с базовыми показателями, через интервал в месяц; исследование проводили гепатологи. Клиническое оценивание, включая массу тела, печеночные тесты, исследование показателей глюкозы, креатинина, гемоглобина, мониторинг приема препарата (количество саше), а также исследование побочных эффектов, производилось как основное, с интервалами в месяц на протяжении 24 недель исследования. Уровень HCV-RNA был определен ПЦР тестом (Amplicor Monitor HCV v. 2.0; Roche Molecular Systems; нижняя граница определения, 600 единиц/мл). Генотипирование HCV было осуществлено методом обратной гибридизации (Inno-LiPAHCV; Innogenetics, Ghent, Belgium). Как минимум за 6 месяцев до исследования пациентам была проведена биопсия печени, местный патологоанатом определил гистологические показатели согласно шкале Ishak. После вывода об эффективности антивирусного лечения пациентам также была проведена биопсия печени.

Лабораторный метод

Образы венозной крови были собраны утром, натощак, в пробирки с EDTA забирали 7 мл крови. Плазму получали путем центрифугирования (4000 г на протяжении 15 мин при 4°C), перед исследованием плазма была заморожена при -70°C. После отделения плазмы, была удалена лейкоцитарная пленка и эритроцитарная масса была промыта три раза изотоническим физраствором. Затем лизировали определенный объём эритроцитов холодной дистиллированной водой (1:4), далее их содержали в холодильнике при 4°C на протяжении 15 мин, остатки клеток были

удалены путем центрифугирования. Лизатные продукты эритроцитов содержались при -70°C . Все образцы были проанализированы в двух экземплярах.

Определение окислительного стресса

Каждые 2 месяца у пациентов забирали образцы крови для исследования окислительного стресса. Статус окислительного стресса крови оценивался по 9 параметрам: продукты перекисления липидов плазмы (малондиальдегид и 4-гидроксиалькеналы), продукты усиленного окисления белков, защитные системы антиоксидантов (пероксидаза глутатиона, Cu/Zn дисмутаза супероксида, каталаза, редуктаза глутатиона, глутатион, миелопероксидаза). Активность каталазы эритроцитов, редуктазы глутатиона и пероксидазы глутатиона определялись согласно BIOXYTECH[®] CAT-520[™], BIOXYTECH[®] GR-340[™] и BIOXYTECH[®] GPx-340[™] (OXIS Research, Portland, USA), соответственно. Показатели выражены в единицах на миллиграм гемоглобина. SOD (супероксид дисмутаза) в эритроцитах измеряли по методу Fulbert [28], основываясь на способности SOD ингибировать редукцию феррицитохрома, используя систему ксантин оксидазы. При использовании коммерчески доступных SOD (Sigma-Aldrich) была получена стандартная кривая. Развитие реакции оценивали спектрофотометрически при 405 нм. За единицу SOD было определено количество фермента, которое ингибирует редукцию цитохрома C на 50% в указанных условиях, причем активность экспрессируется через гемоглобин. Измерение LPO было проведено при использовании BIOXYTECH[®] LPO-586[™] (OXIS Research, Portland, USA), оно было основано на реакции хромогенного реагента (N-метил-2-фенилиндол)с малондиальдегидом (MDA) и 4-гидроксиалькеналами при 45°C . Определение продуктов усиленного окисления белков (AOPP) было проведено путем спектрофотометрии, согласно методике Witko-Sarsat [29]. Вкратце, 200 $\mu\text{л}$ плазмы [растворенных в концентрации 1:5

с фосфатным физраствором (PBS)], 200 $\mu\text{л}$ хлорамина-T (0-100 $\mu\text{мол/л}$) для калибровки, и 200 $\mu\text{л}$ PBS в качестве чистой среды были применены при микротитровании. 10 $\mu\text{л}$ 1.16 моль/л иодида калия и 20 $\mu\text{л}$ уксусной кислоты были добавлены в каждую упаковку. Их поглощение было измерено при 340 нм. Концентрацию AOPP выразили в единицах хлорамина ($\mu\text{мол/л}$). Концентрацию GSH измерили методом Sedlak и Lindsay, в котором 5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота вступает в реакцию с сульфгидриловыми группами и производит 2-нитро-5-меркаптобензойную кислоту с максимальным поглощением при 412 нм [30]. Для генерирования стандартной кривой использовали глутатион (Sigma-Aldrich). Концентрацию миелопероксидазы в сыворотке (MPO) измерили, используя высокочувствительный, количественный многослойный ферментный анализ (OXIS Research, Portland, USA). В данном анализе, самая низкая граница определения MPO составляет 1.02 нг/мл.

Определение цитокинов в сыворотке.

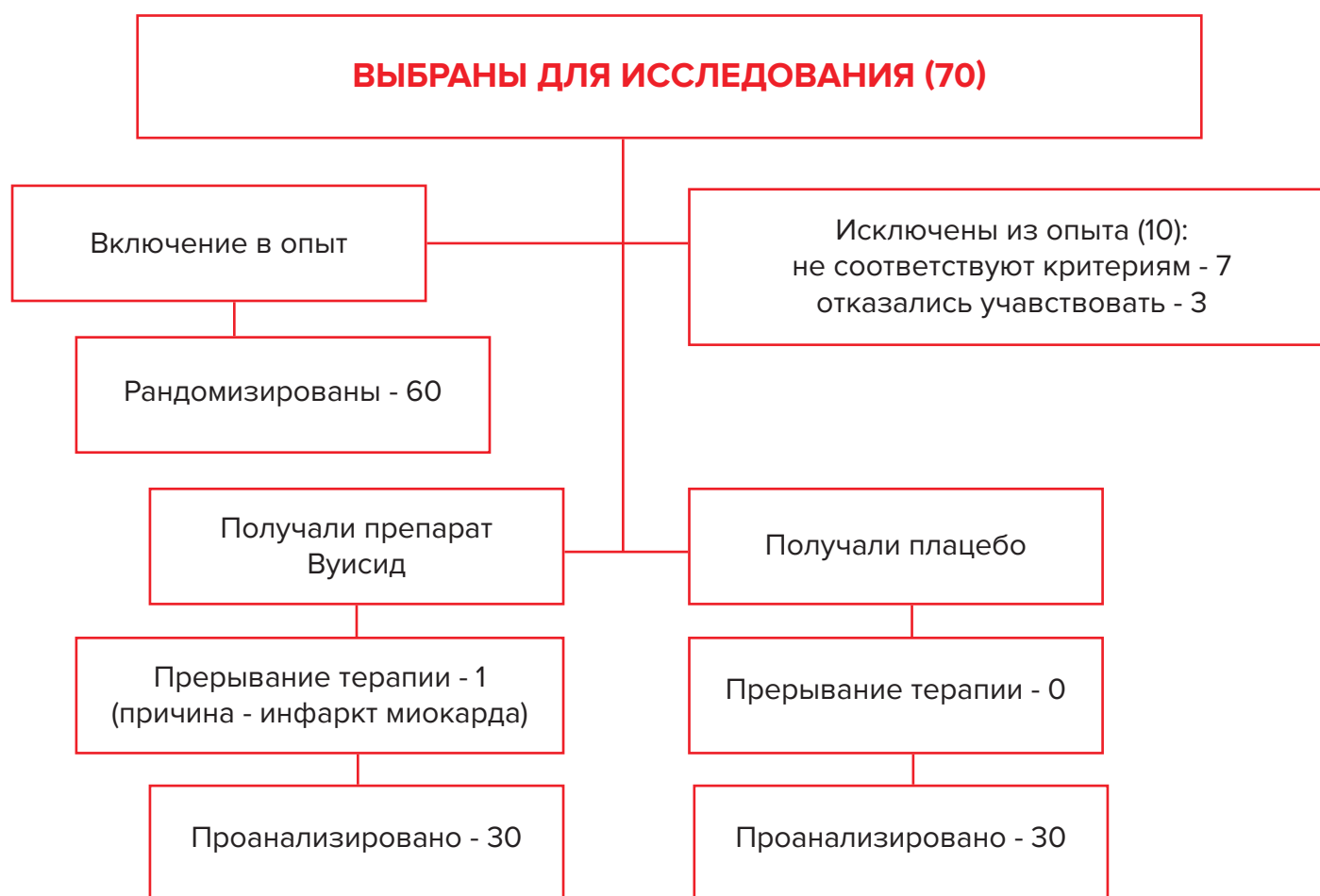
Кровь для определения цитокинов забирали каждые 2 месяца вплоть до окончания опыта. Уровни цитокинов в сыворотке (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12; TNF- α , TNF- β , IFN- γ , катепсин L, и GM-CSF) были измерены путем коммерческого многофакторного теста ELISA согласно процедуре, рекомендованной производителями (Bender MedSystem, Vienna, Austria). Определенные границы были следующими: 1.1 пг/мл для IL-1 α , 0.3 пг/мл для IL-1 β , 9.9 пг/мл для IL-2, 0.92 пг/мл для IL-6, 1.0 пг/мл для IL-10, 2.1 пг/мл для IL-12; 2.3 пг/мл для TNF- α , 4.6 пг/мл для TNF- β , 0.99 пг/мл для IFN- γ , 1.71 нг/мл для катепсина L, и 2.9 пг/мл для GM-CSF.

Рисунок 1.

Движение участников в исследовании.

Результаты

Первичным результатом было изменение в сыворотке содержания MDA и



4-гидоксиалькенолов (продукты перокисления липидов). Вторичными результатами были изменения в сыворотке содержания TNF- α , IL-10 и IFN- γ . Данные изменения рассматриваются как разница между данными базовых исследований и данными исследований в конце эксперимента (24 нед).

Статистический анализ

Основные характеристики представлены в процентном соотношении для дискретных переменных и как среднее арифметическое \pm SE для непрерывных переменных. Был применен критерий тест χ^2 для дискретных переменных. Двухвыборочный t-тест был применен для сравнения средних значений, U-тест Mann-Whitney – если не было стандартного распределения. Все пациенты, которые получили по меньшей мере одну дозу препарата, прошли заключительное исследование. Для сравнения изменений в

базовом и посттерапевтическом результате, а также для сравнения эффективности лечения в группах использовали тест Wilcoxon. В анализ безопасности были включены все пациенты, которым было проведено по крайней мере одно исследование безопасности после базовых исследований.

Показатель статистической силы исследования составляет 80% при определении абсолютной разницы 28% в изменениях сыворотки MDA и 4-гидроксиалькенолов (28% в группе с Виусидом в сравнении с 0% в группе плацебо). Рассматривая ошибку типа I в 0.05 и типа II в 0.20, 30 пациентов в группе показали статистически значимые данные. Все доверительные интервалы, тесты значимости и показатели P являются двусторонними, с alpha уровнем 0.05. Статистический анализ был проведен с использованием SPSS Inc. для Windows, выпуск 15, Chicago, IL.

Таблица 2. Базовые характеристики

Возраст
 Пол
 Мужчины
 Женщины
 Индекс массы тела
 РНК HCV
 Шкала воспаления Ishak
 Шкала фиброза Ishak
 АЛТ
 АСТ
 Глюкоза натощак
 Щелочная фосфатаза
 Креатинин
 Гемоглобин
 Гамма-глутамилтрансфераза
 Билирубин
 Альбумин
 Мочевая кислота

Variable	Viucid (n = 30)	Placebo (n = 30)	P value ¹
Age (yr)	49.3 ± 2.1	49.7 ± 2.2	0.90
Sex, n (%)			
Male	10 (33)	16 (53)	0.19
Female	20 (67)	14 (47)	
Body mass index (kg/m ²)	25.3 ± 0.7	26.4 ± 0.7	0.28
HCV RNA > 600000 IU/mL, n (%)	24 (80)	21 (70)	0.36
Genotype 1, n (%)	30 (100)	30 (100)	1.00
Ishak inflammation score	5.98 ± 3	5.88 ± 3	0.55
Ishak fibrosis score	1.88 ± 0.91	2.06 ± 1.8	0.68
ALT (IU/L)	66.9 ± 7.6	75.4 ± 8.4	0.45
AST (IU/L)	55.9 ± 7	65.8 ± 7.6	0.34
Fasting plasma glucose (mmol/L)	5.1 ± 0.14	5.8 ± 0.4	0.09
Alkaline phosphatase (mmol/L)	217.8 ± 12.8	221.1 ± 13.7	0.86
Creatinine (mmol/L)	80.4 ± 2.8	82.8 ± 3.6	0.59
Hemoglobin (g/L)	126.4 ± 1.4	131.3 ± 2.7	0.11
γ-glutamyltransferase (IU/L)	72.7 ± 13.5	84.1 ± 13.8	0.55
Bilirubin (mmol/L)	11.4 ± 1.4	14.1 ± 1.3	0.16
Albumin (g/L)	47.8 ± 0.5	47.6 ± 0.9	0.80
Uric acid (mmol/L)	257 ± 16.8	276 ± 13.4	0.37
IL-1α (pg/mL)	3.26 ± 0.7	3.09 ± 0.5	0.89
IL-1β (pg/mL)	3.7 ± 0.1	4 ± 0.1	0.29
IL-2 (pg/mL)	17.9 ± 2.3	19.9 ± 4.7	0.93
IL-6 (pg/mL)	2.5 ± 0.2	2.1 ± 0.3	0.35
IL-10 (pg/mL)	2.6 ± 0.6	2.8 ± 4.1	0.67
IL-12 (pg/mL)	7.5 ± 1.4	7.6 ± 1.2	0.92
IFN-γ (pg/mL)	1.92 ± 0.2	1.80 ± 0.1	0.63
TNF-α (pg/mL)	6.6 ± 0.2	6.9 ± 0.5	0.45
TNF-β (pg/mL)	8.5 ± 0.4	9.1 ± 0.6	0.58
Cathepsin L (ng/mL)	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	0.99
GM-CSF (pg/mL)	4.4 ± 0.1	4.3 ± 0.1	0.97
MDA (μmol/L)	0.97 ± 0.05	1.12 ± 0.09	0.17
4-hydroxyalkenals (μmol/L)	1.75 ± 0.09	1.92 ± 0.14	0.30
Cu/Zn SOD (U/mg Hb)	17.6 ± 1.1	18.7 ± 0.9	0.46
CAT (U/mg Hb)	235 ± 23.7	289 ± 21.8	0.09
GR (mU/mg Hb)	6.1 ± 0.7	6.9 ± 1.1	0.73
GPx (mU/mg Hb)	169 ± 11.6	176 ± 11.2	0.66
GSH (μmol/L)	26.3 ± 2.3	31.8 ± 3.2	0.16
MPO (ng/mL)	221 ± 6.6	221 ± 6.7	0.91
AOPP (μmol/L)	36.1 ± 5.4	26.2 ± 5.5	0.20

Результаты

Суммарно 60 пациентов, проходящих лечение в третичном центре (Национальный Институт Гастроэнтерологии, Гавана, Куба), приняли участие в исследовании в период с октября 2008 по май 2009. Движение участников представлено в рисунке 1. Все рандомизированные пациенты получили по крайней мере одну дозу препарата, 1 субъект не закончил терапию, причиной прерывания был инфаркт миокарда на 16 неделе исследования. Ни один пациент не умер в период после терапии, и ни один пациент не получал дополнительные препараты, которые могли бы повлиять на исследование.

Результаты всех пациентов были проанализированы на эффективность лечения, согласно первичным заданиям терапии (анализ целей терапии). В 2 группах мы сравнивали базовые показатели (Таблица 2). Большинство пациентов, получавшие терапию Виусидом, были женщинами, хотя в группе плацебо такой статистической разницы не наблюдалось. Все пациенты ранее не реагировали на противовирусную терапию пегинтерфероном с рибавирином, будучи инфицированными генотипом 1, вирусная нагрузка более чем половины пациентов составила более 600 000 единиц/мл (75%).

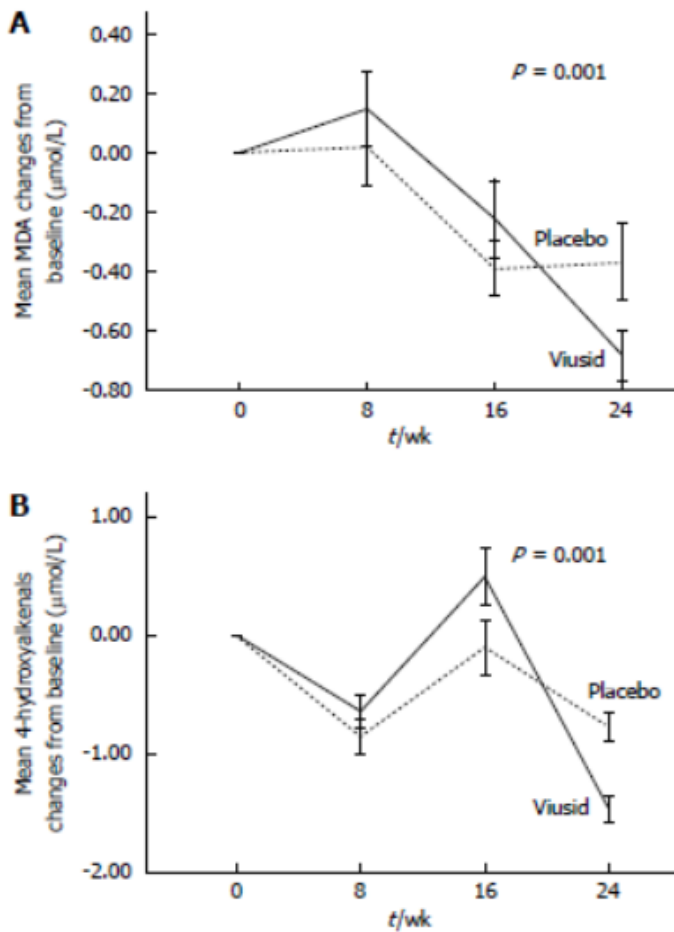


Рис.2. Изменения в средних показателях уровня малондиальдегида(а) и 4-гидроксиалькенолов во время периода лечения в сравнении с базовыми показателями.

Маркеры окислительного стресса. Продукты перокисления липидов (Первичная конечная точка):

В каждой группе наблюдалось значительное среднее уменьшение показателей малондиальдегида MDA и 4-гидроксиалькенолов от базовых данных до 6 мо (таблица 3). Введение Виусида связано с значительным сокращением среднего уровня MDA с 0.97 до 0.29 μmol/л, среднее улучшение в 0.68 (95% CI: 0.50-0.84) в сравнении с группой плацебо: сокращение среднего уровня MDA с 1.12 до 0.76 μmol/л со средним улучшением в 0.36 (95% CI: 0.11-0.62) (P=0.001) (Рис 2А). Подобно этому, значимые изменения в средних показателях сывороточного содержания 4-гидроксиалькенолов отмечались у пациентов после терапии Виусидом (1.76 до 0.53 μmol/л), со средней разницей в 1.22 (95% CI: 0.97-1.45), в сравнении с пациентами, которые получили плацебо (1.92 до 1.39 μmol/L), со средней разницей в 0.53 (95% CI: 0.43-1.17) (рисунок 2В).

Маркеры антиоксидантной защиты:

Значительное сокращение содержания в эритроцитах Cu/Zn SOD, CAT, GR, и содержания в сыворотке GSH и MPO наблюдалось в обеих группах в сравнении с показателями до лечения, однако, не было определено значимого отличия (Табл 3).

Таблица 3. Начальные показатели окислительного стресса и результаты через 6 месяцев.

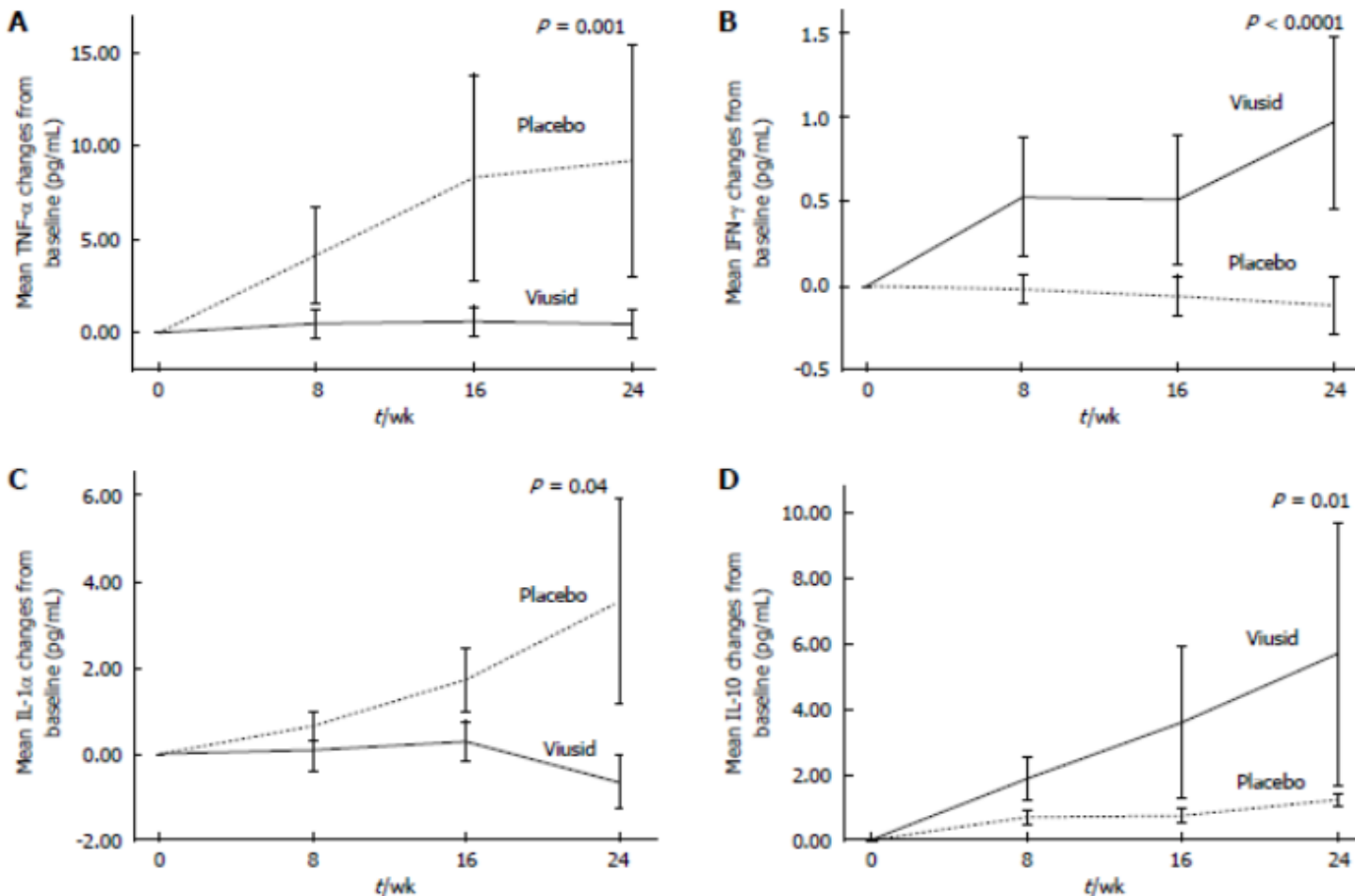
Table 3 Patients' baseline oxidative stress parameters and outcome at 6 mo

Variable	Viusid (n = 30)				Placebo (n = 30)				P value ¹
	Before treatment	After treatment	Change	P value	Before treatment	After treatment	Change	P value	
MDA (μmol/L)	0.97 ± 0.05	0.29 ± 0.05	-0.68 ± 0.08	<0.001	1.12 ± 0.09	0.76 ± 0.08	-0.36 ± 0.12	0.002	0.001
4-hydroxyalkenals (μmol/L)	1.75 ± 0.09	0.53 ± 0.06	-1.22 ± 0.1	<0.001	1.92 ± 0.14	1.39 ± 0.13	-0.53 ± 0.2	0.01	0.001
Cu/Zn SOD (U/mg Hb)	17.6 ± 1.1	3.26 ± 0.4	-14.3 ± 1.2	<0.001	18.7 ± 0.9	3.44 ± 0.39	-15.3 ± 1.04	<0.001	0.71
CAT (U/mg Hb)	235 ± 23.7	17.6 ± 2.3	-217.4 ± 24	<0.001	289 ± 21.8	21 ± 2.7	-268 ± 22	<0.001	0.13
GR (mU/mg Hb)	6.1 ± 0.7	11 ± 1.1	4.9 ± 1.3	<0.001	6.9 ± 1.1	12 ± 1.2	5.1 ± 1.6	0.001	0.97
GPx (mU/mg Hb)	169 ± 11.6	147 ± 12	-22 ± 17	0.20	176 ± 11.2	136 ± 16	-40 ± 19	0.05	0.87
GSH (μmol/L)	26.3 ± 2.3	16.4 ± 1.9	-9.9 ± 3	0.002	31.8 ± 3.2	19.8 ± 2.5	-12 ± 4.1	0.005	0.69
MPO (ng/mL)	221 ± 6.6	123 ± 12.9	-98 ± 14.2	<0.001	221 ± 6.7	115 ± 22	-106 ± 23.2	<0.001	0.61
AOPP (μmol/L)	36.1 ± 5.4	48.4 ± 13.7	12.3 ± 11.2	0.39	26.2 ± 5.5	35.9 ± 7.6	9.7 ± 9.3	0.30	0.57

Белковые продукты сильного окисления: Концентрация АОРР в сыворотке оставалась без изменений для пациентов, которые получили Виусид или плацебо в сравнении с базовыми показателями (Табл 3).

Цитокины сыворотки

Рисунок 3. Изменения в сыворотке TNF-α, IFN-γ, IL-1α, IL-10 на протяжении лечения.



Цитокины сыворотки определены в таблице 4. Уровень TNF-α (вторичный результат) значительно возрос с 6.9 до 16.2 пг/мл ($P < 0.01$) у пациентов группы плацебо в сравнении с отсутствием изменений у пациентов, получающих терапию Виусидом (6.6 до 7.1 пг/мл, $P = 0.26$) ($P = 0.001$) (Рисунок 3А).

Применение Виусида значительно повысило средний уровень IFN-γ (вторичный результат) с 1.92 до 2.89 пг/мл ($P < 0.001$) в сравнении с понижением среднего уровня с 1.80 до 1.68 пг/мл ($P = 0.70$) в группе плацебо ($P < 0.0001$) (Рисунок 3В).

Содержание IL-1α незначительно уменьшилось с 3.26 до 2.61 пг/мл ($P = 0.04$) у пациентов, которые принимали Виусид, это особенно видно при сравнении со значительным

увеличением с 3.09 до 6.62 пг/мл ($P = 0.04$) у плацебо группы (Рис 3С). Кроме этого, содержание IL-10 значительно увеличилось у пациентов, принимающих Виусид (с 2.6 до 8.3 пг/мл, $P = 0.04$) в сравнении с пациентами группы плацебо (с 2.8 до 4.1 пг/мл, $P = 0.09$) ($P = 0.01$) (Рис. 3D).

Таблица 4. Базовые показатели цитокинов и показатели через 6 месяцев.

Неожиданно значительное понижение в среднем значении уровня сыворотки IL-1β, IL-2, TNF-β, и катепсина L наблюдалось у всех пациентов на 24 неделе лечения при сравнении с базовыми данными. Между группами значимого отличия не наблюдалось.

Table 4 Patients' baseline cytokine values and outcome at 6 mo

Variable	Viucid (n = 30)				Placebo (n = 30)				P value ¹
	Before treatment	After treatment	Change	P value	Before treatment	After treatment	Change	P value	
IL-1α (pg/mL)	3.26 ± 0.7	2.61 ± 0.3	-0.60 ± 0.8	0.04	3.09 ± 0.5	6.62 ± 2.3	3.53 ± 2.4	0.04	0.04
IL-1β (pg/mL)	3.7 ± 0.1	2.9 ± 0.1	-0.8 ± 0.1	<0.001	4 ± 0.1	3 ± 0.1	-1 ± 0.2	<0.001	0.24
IL-2 (pg/mL)	17.9 ± 2.3	11.3 ± 0.2	-6.5 ± 2.2	<0.01	19.9 ± 4.7	12.1 ± 0.8	-7.8 ± 3.9	0.04	0.39
IL-6 (pg/mL)	2.5 ± 0.2	2.1 ± 0.2	-0.4 ± 0.3	0.14	2.1 ± 0.3	2 ± 0.2	-0.1 ± 0.3	0.71	0.24
IL-10 (pg/mL)	2.6 ± 0.6	8.3 ± 4.1	5.7 ± 4	0.04	2.8 ± 4.1	4.1 ± 0.1	1.3 ± 0.2	0.09	0.01
IL-12 (pg/mL)	7.5 ± 1.4	5.1 ± 0.9	-2.4 ± 1.1	0.04	7.6 ± 1.2	6.2 ± 1.5	-1.4 ± 1.4	0.34	0.29
IFN-γ (pg/mL)	1.92 ± 0.2	2.89 ± 0.4	0.97 ± 0.5	<0.001	1.80 ± 0.1	1.68 ± 0.1	-0.11 ± 0.2	0.70	<0.0001
TNF-α (pg/mL)	6.6 ± 0.2	7.1 ± 0.4	0.45 ± 0.4	0.26	6.9 ± 0.5	16.2 ± 3.4	9.3 ± 3.1	<0.01	0.001
TNF-β (pg/mL)	8.5 ± 0.4	5.4 ± 0.1	-3.1 ± 0.5	<0.001	9.1 ± 0.6	6.3 ± 1.2	-2.8 ± 1.2	0.03	0.21
Cathepsin L (ng/mL)	1.7 ± 0.1	2.9 ± 0.2	1.2 ± 0.2	<0.001	1.7 ± 0.1	3.1 ± 0.2	1.4 ± 0.2	<0.001	0.16
GM-CSF (pg/mL)	4.4 ± 0.1	4.6 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.24	4.3 ± 0.1	4.6 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.11	0.60

Концентрация IL-6, IL-12, и GM-CSF в сыворотке оставалась без изменений как у пациентов после терапии Виусидом, так и в плацебо группе.

Биохимические результаты

На 24 неделе лечения, уровень γ-глутамилтрансферазы (GGT) значительно сократился в сравнении с базовыми показателями (Таблица 5). Уровень GGT сократился на 44% (с 72.7 до 40.8 Ед/л, P=0.001) у пациентов принимающих Виусид, в сравнении

с 12% (с 84.1 до 74.4 Ед/л, P=0.56) у пациентов группы плацебо (P=0.002). Уровень мочевой кислоты немного понизился на 23% (с 257 до 198 ммол/л, P=0.01) у пациентов, принимающих Виусид, в сравнении с 3% (с 276 до 267 ммол/л, P=0.66) у пациентов группы плацебо. В обеих группах уровень трансферазы остался без изменений в сравнении с начальными показателями (Таблица 5).

Таблица 5. Базовые показатели пациентов и результат через 6 месяцев.

Table 5 Patients' baseline characteristics and outcome at 6 mo

Variable	Viucid (n = 30)			Placebo (n = 30)			P value ¹
	Before treatment	After treatment	P value	Before treatment	After treatment	P value	
Body mass index (kg/m ²)	25.6 ± 0.7	25.7 ± 0.7	0.92	26 ± 0.7	27.2 ± 0.6	0.08	0.12
Hemoglobin (g/L)	125.8 ± 1.4	125.2 ± 2.1	0.74	132.2 ± 2.7	135.6 ± 3.1	0.09	0.13
Alkaline phosphatase (mmol/L)	217.2 ± 12	206.1 ± 15	0.49	217.1 ± 13	211.4 ± 13	0.69	0.80
ALT (IU/L)	67.6 ± 7.6	65.1 ± 9.9	0.68	67.7 ± 8.4	63.5 ± 6	0.38	0.82
AST (IU/L)	56 ± 7	57.7 ± 9.1	0.81	62.7 ± 7.6	53.9 ± 6.5	0.11	0.24
Fasting plasma glucose (mmol/L)	5 ± 0.1	4.8 ± 0.2	0.17	5.6 ± 0.4	5.4 ± 0.5	0.69	0.91
Creatinine (mmol/L)	79.4 ± 2.8	75.7 ± 2.4	0.06	83.3 ± 3.6	77.7 ± 3	0.17	0.67
γ-glutamyltransferase (IU/L)	72.7 ± 13	40.8 ± 6.1	0.001	84.1 ± 14	74.4 ± 10	0.56	0.002
Albumin (g/L)	47.4 ± 0.5	46.6 ± 0.8	0.43	46.5 ± 0.9	46.1 ± 1	0.72	0.79
Bilirubin (mmol/L)	12.1 ± 0.08	11.9 ± 0.07	0.91	13.8 ± 0.07	14.3 ± 0.08	0.79	0.67
Uric acid (mmol/L)	257 ± 16.8	198 ± 13.8	0.01	276 ± 13.4	267 ± 18	0.66	0.04

Анализ безопасности

У одного пациента, принимавшего Виусид, наблюдались головная боль и диарея. Лабораторные побочные эффекты вследствие приема Виусида не наблюдались. Пациенты не прерывали терапию и не меняли дозировку вследствие побочных эффектов.

Обсуждение.

Исследование показало позитивное действие Виусида на гистологические показатели печени у пациентов с хроническим гепатитом С и неалкогольной жировой болезнью печени [27,31]; однако гистопатологический механизм этого явления неизвестен. Существует

потенциальный гепатопротекторный механизм действия Виусида, который может быть объяснён противовоспалительными и антиоксидантными свойствами молекул препарата (цинка, глицирризиновой кислоты, аскорбиновой кислоты)[24-26]. Целью данного исследования было изучить роль Виусида как антиоксиданта и иммуномодулятора у тех пациентов с СНС, которым ранее не помогло противовирусное лечение. Некоторые исследования показали увеличение выработки MDA в СНС, который является непрямым маркером окислительного стресса (перокисление липидов), его уровень ученые связывали с средним-сильным воспалением и фиброзом, в сравнении с пациентами с более мягким течением болезни, предполагая более высокий окислительный стресс при более тяжелом течении заболевания [32,33].

Мы обнаружили, что уровни MDA и 4-гидроксиалькенала значительно понизились в сыворотке пациентов, принимающих Виусид, в сравнении с плацебо, что указало на его важное влияние на продукты перокисления липидов. Недавние данные показали, что увеличение содержания продуктов перокисления липидов, таких как 4-гидроксиноненал, играло важную роль в активации звездчатых клеток и развитии фиброза [34]. Увеличение уровня 4-гидроксиноненала вызывают повышение содержания проколлагена и тканевого ингибитора экспрессии гена металлопротеиназы -1. Матрикс металлопротеиназы-1 играет важную роль в распаде коллагена, т.о., ингибирование данного фермента может повышать фиброз. Это обеспечивает предположительный механизм действия Виусида на сокращение фиброза у пациентов с гепатитом [27]. Данные результаты показывают необходимость последующего исследования препарата при лечении других заболеваний печени, таких как алкогольный цирроз и неалкогольная жировая болезнь печени. Последние исследования показали антиоксидантное действие аскорбиновой кислоты и цинка. Добавки аскорбиновой кислоты и цинка также ассоциируются со значительным сокращением содержания

продуктов LPO [35,36].

Во всей группе на протяжении терапии было обнаружено значительное сокращение содержания маркеров антиоксидантов в сыворотке, что возможно отобразило «регрессию по направлению к среднему значению», плацебо-вызванное действие или низкий уровень гомеостаза редокса. Несбалансированная реакция Th1- и Th2, как оказалось, играет важную роль, влияя на жизнеспособность инфекции гепатита С и масштабы повреждения печени [10,37,38]. В этом контексте, IFN- γ и IL-12 являются Th1-цитокинами, критическими для развития T-медиированного клеточного иммунитета. Увеличение выработки IFN- γ в сыворотке крепко связано с самоограничением инфекции гепатита С [11,12]. Согласно нашим данным, увеличение выработки IFN- γ у пациентов, получающих Виусид, в сравнении с начальными данными, может свидетельствовать о повторном включении T-клеточного иммунитета путем Th1-реакции; однако, основополагающие механизмы, которыми Виусид может индуцировать IFN- γ , все еще не ясны. С другой стороны, IL-10 является Th2-цитокином с супрессивным действием на поколение Th1-цитокинов (IFN- γ и IL-12), которые обладают противовоспалительным и провирусным действием [13-15]. Наши данные показывают, что уровень в сыворотке IL-10 значительно возрос при применении Виусида вопреки одновременному росту уровня IFN- γ в сыворотке. IL-10 подавляет секрецию провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IFN- γ , и IL-12 [15,39,40]. Наоборот, введение нейтрализующих моноклональных антител к IL-10 усиливает выработку *in vitro* IFN- γ у пациентов HCV, что предполагает, что уровень IL-10 различается среди разных индивидуумов, вероятно вследствие полиморфизма в промоторе регионе IL-10 гена [42]. Последние данные подтверждают гипотезу, что длительная терапия IL-10 при лечении хронически инфицированных пациентов HCV приводит к значительному гистологическому улучшению показателей воспаления и фиброза. Наши данные показывают, что увеличения уровня

IL-в сыворотке может быть значимым показателем, необходимым для объяснения действия Виусида на гистологические особенности (воспаление и фиброз) у пациентов с гепатитом С и не алкогольным жировым заболеванием печени (NAFLD) [27,31].

Последние исследования показали, что глицирризин, водный экстракт корня солодки и главный компонент Виусида, может индуцировать значительную выработку IL-10 дендритными клетками печени при конканавалин А- индуцированном гепатите у мышей [43].

Наши данные также показывают, что короткий курс Виусида немного сокращает уровень IL-1 α и стабилизирует концентрации TNF- α у пациентов с гепатитом С. Это маркеры воспаления и фиброза, повышенные у пациентов с гепатитом С, в сравнении со здоровой контрольной группой [16,17,38]; т.о., их сокращение или стабилизация может быть связана с гистологическим улучшением, в частности, снижением воспаления и фиброза. Виусид содержит химические ингредиенты с признанными иммунорегулирующими свойствами, которые могут объяснить частично действие на секрецию цитокинов. Добавка цинка показала, что он может значительно увеличивать секрецию IFN- γ и IL-10, и уменьшать секрецию IL-1 и TNF- α у пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями [44].

GGT является биомаркером гепатобиллиарного заболевания и алкоголизма[45]. Также GGT ассоциируется с высокой смертностью от разных заболеваний, частотой сердечно сосудистых заболеваний и смертности от них, заболеваемостью раком и смертностью от него [46,47]. Дополнительные экспериментальные данные показывают, что GGT является ключевым медиатором в механизмах окислительного стресса. GGT медиированный окислительный стресс может вызывать окисление липидов, окисление тиолов протеина, изменения нормального фосфорилирования нормальных протеинов, а также активацию факторов транскрипции [48].

В нашем исследовании было обнаружено, что уровень GGT в сыворотке был значительно понижен у пациентов, принимавших Виусид, в сравнении с пациентами группы плацебо. Механизм, который объясняет влияние Виусида на сокращение GGT еще не полностью выявлен, необходимы дальнейшие исследования. С другой стороны, введение Виусида не повысило содержание аминотрансферазы на протяжении 2 недель лечения. Против того, что уже было предложено в двух опубликованных работах [33,37], Виусид без поддерживающей терапии (антивирусной терапии, изменения режима жизни при гепатите С), не способен индуцировать улучшение уровня аминотрансферазы несмотря на его доказанные значительные антиоксидантные и иммуномодуляторные свойства. В дальнейших исследованиях необходимо оценить эффективность введения более высоких доз и более длительного введения Виусида, чтобы определить его действие на уровень аминотрансферазы у пациентов с хроническими заболеваниями печени. Основной чертой данного исследования является присутствие сопутствующей контрольной группы плацебо, что позволяет осуществить адекватное сравнение между контрольной и экспериментальной группами. Слабой стороной нашего исследования является то, что пациенты получали лечение в течение 24 недель, и остается непонятным, возможно ли улучшить некоторые показатели, такие как окислительный стресс и иммунологический статус в течение 24 недель. Также, наши данные предполагают, что Виусид улучшает окислительный стресс через редукцию продуктов перекисления липидов, что производит иммуномодуляторное действие на секрецию цитокинов, IFN- γ и IL-10, уменьшение выработки IL-1 α , и стабилизацию секреции TNF- α у пациентов с CHC, которым не помогло предыдущее антивирусное лечение. Мы ограниченно понимаем комплексный механизм иммунной реакции, а также ее взаимодействия со статусом анти(про) оксиданта.

КОММЕНТАРИИ

Основание

Патогенез хронического гепатита С (СНС) связан с сильным окислительным стрессом и неселективным иммунологическим расстройством, которые приводят в некровоспалению и развитию фиброза. Несколько авторов в своих исследованиях предположили, что антиоксидантная и иммуностимулирующая терапия может помочь при лечении заболевания. Два предыдущих клинических исследования показали, что Виусид-соотносимое действие на гистологические особенности, в частности фиброз, связано с антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами препарата. Однако точный механизм действия не известен.

Границы исследования

Пегинтерферон с рибавирином – единственная терапевтическая альтернатива с доказанной эффективностью у пациентов с СНС. К сожалению, вирусологическая реакция достигается только у приблизительно 50% пациентов. Виусид – это пищевая добавка с задокументированным действием на гистологические показатели (стеатоз, воспаление и фиброз) у пациентов с СНС и неалкогольной жировой болезнью печени. Он содержит разные молекулы (аскорбиновую кислоту, цинк, глицирризиновую кислоту) с признанными антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами. Необходимо подтвердить, имеет ли Виусид действие на окислительный стресс и параметры цитокинов у пациентов с СНС.

Инновации

В недавних исследованиях предположено, что Виусид – соотносимое действие на гистологические особенности, в частности фиброз, и это связано с его антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами. Это может влиять на гистологию при гепатите С, особенно на воспаление и фиброз. Идентификация молекулярных механизмов действия Виусида как иммуномодулятора

и противовоспалительного препарата у пациентов с гепатитом С могла бы поддержать новую стратегию лечения пациентов, которым не помогло предыдущее лечение.

Применение

В текущей клинической практике не существует лечения для пациентов с гепатитом С, которым не помогло предыдущее антивирусное лечение. Необходимо развить новые стратегии лечения гепатита С. Введение компонентов с антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами, таких как Виусид, может являться многообещающей стратегией для пациентов с гепатитом С, в частности тех, кто не реагирует на предыдущую антивирусную терапию. Необходимы последующие исследования оценки клинического влияния введения Виусида пациентам с конечной стадией цирроза печени, вторичного после гепатита С.

Терминология

Виусид является природной добавкой. Он содержит разные молекулы (аскорбиновая кислота, цинк и глицирризиновая кислота) с признанными антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами. Различные компоненты лекарства активируются через принцип молекулярной активации, который увеличивает их биоактивность, не изменяя их. С этим методом на молекулы оказывается влияние в электрическом поле на протяжении заранее просчитанного времени, при специфических условиях для каждой молекулы.

Peer review

В данном докладе авторы сообщают результаты рандомизированного двойного плацебо-контролируемого исследования действия препарата Виусид на окислительный стресс и параметры цитокинов у пациентов с хроническим гепатитом С генотипом 1, которым не помогла терапия пегинтерфероном с рибавирином.

Віусід - біологічно дієтична харчова добавка, що має імунomodуючу, протівірусну і загальнозміцнюючу дії.

ВІУСІД



ДОКАЗОВА БАЗА

catalysis.com.ua



ПРИДБАТИ ВІУСІД