

ВЛИЯНИЕ ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ ФОСФОЛИПИДОВ НА ТЕЧЕНИЕ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ И АЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПЕЧЕНИ

¹К.-Дж. Гундерман, ¹М. Дроздзик, ²В. М. Цыркунов (tvm111@mail.ru)

¹Поморский медицинский университет, Щецин, Польша;

²УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Введение. Несмотря на то, что эссенциальные фосфолипиды (ЭФЛ) из сои часто используются при мембранно-ассоциированных расстройствах и заболеваниях, их влияние на распространенные заболевания печени, особенно на жировые болезни печени разного происхождения, до сих пор широко не известны, в связи с чем, и в настоящее время ведутся активные исследования.

Цель исследования – рассмотрение, обсуждение и обобщение имеющихся результатов по влиянию ЭФЛ на течение неалкогольной жировой и алкогольной болезней печени (НАЖБП и АБП).

Материалы и методы. Исследование базы данных проводилось в Medline, Embase, Кокрановской библиотеке, журналах конкретных стран и цитатах из литературы по соответствующим гепато-, гастроэнтерологическим статьям в период с 1988 по 2018 гг. Проанализированы только те документы, в которых указывалось, что минимальное количество извлечения фосфатидилхолина (ФХ) из сои составляло 72% со значительным содержанием 1,2-дифосфолипидов в качестве ключевого компонента ЭФЛ.

Результаты. ЭФЛ обладают хорошо зарекомендовавшим себя действием, терапевтической эффективностью и отсутствием токсичности, что обеспечивает клинически значимое соотношение эффективности и безопасности. ЭФЛ влияют на мембранозависимые клеточные функции, включая ферменты и рецепторы, и проявляют противовоспалительное, антиоксидантное, антифиброгенное, антиапоптотное, мембранопротекторное, клеточное сигнальное и липидорегулирующее действие. Благодаря своему положительному влиянию на состав и функции мембран, ЭФЛ ускоряют улучшение состояния пациентов или нормализацию субъективных симптомов, патологических клинических и биохимических результатов, визуализации состояния и гистологии печени. Эти данные являются обоснованием для применения ЭФЛ вместе с другими лекарственными средствами в терапии заболеваний печени.

Заключение. Фармакологические и клинические результаты подтверждают эффективность ЭФЛ в лечении жировой болезни печени.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени, алкогольная болезнь печени, эссенциальные фосфолипиды, полиенфосфатидилхолин, дилинолеилфосфатидилхолин, мембрана.

Для цитирования: Гундерман, К.-Дж. Влияние эссенциальных фосфолипидов на течение неалкогольной и алкогольной жировых болезней печени / К.-Дж. Гундерман, М. Дроздзик, В. М. Цыркунов // Гепатология и Гастроэнтерология. 2019. Т. 3, № 1. С. 5-13. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2019-3-1-5-13>

THE INFLUENCE OF ESSENTIAL PHOSPHOLIPIDS ON THE COURSE OF NON-ALCOHOLIC AND ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASES

¹K.-J. Gundermann, ¹M. Drozdzik, ²V. M. Tsyrcunov

¹Department of Pharmacology, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland

²Educational Institution «Grodno State Medical University», Grodno, Belarus

Background. Though essential phospholipids (EPL) from soybean are often used in membrane-associated disorders and diseases, their effects on common liver diseases, especially on fatty liver diseases of different origin, are still widely unknown being the matter of ongoing active research.

The objective of the study is to review, discuss and summarize the available data on EPL in non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases (NAFLD and ALD).

Materials and methods. Database search was carried out using Medline, Embase, Cochrane Library, journals published in particular countries and citations from relevant hepatogastroenterological articles between 1988 and 2018. Those documents were analyzed only that indicated that minimum amount of phosphatidylcholine (PC) extraction from soy was 72% with a significant content of 1,2-dilinoleoyl phosphatidylcholine (DLPC) as a key component of EPL.

Results. EPL have proved to be therapeutically effective and nontoxic, ensuring clinically relevant efficacy-safety ratio. EPL affect membrane-dependent cellular functions, including enzymes and receptors, and produce anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-fibrogenic, anti-apoptotic, membrane-protective, cell signalling and lipid-regulating effects. Due to their positive effect on membrane composition and function EPL facilitate the improvement of patients' condition or the normalization of subjective symptoms, pathological clinical and biochemical results, liver imaging and histology findings. The received data justify the use of EPL alongside with other medications in liver diseases treatment.

Conclusion. Pharmacological and clinical findings confirm the effectiveness of EPL in fatty liver disease treatment.

Keywords: non-alcoholic fatty liver disease, alcoholic liver disease, essential phospholipids, polyene phosphatidylcholine, diinoleoylphosphatidylcholine, membrane

For citation: Gundermann K-J, Drozdik M, Tsyrukunov VM. Actual status of essential phospholipids in nonalcoholic and alcoholic fatty liver diseases. *Hepatology and Gastroenterology*. 2019;3(1):5-13. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2019-3-1-5-13>

Введение

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) и алкогольная болезнь печени (АБП) – заболевания разного происхождения (ожирение, употребление алкоголя, сахарный диабет, другие) [1]. В настоящее время НАЖБП является наиболее распространенным хроническим диффузным заболеванием печени [2]. По оценкам специалистов, 25% населения Земли страдает от НАЖБП, при этом распространенность заболевания резко возрастает [3, 4]. Несмотря на то, что НАЖБП и АБП являются важными проблемами общественного здравоохранения, до сих пор не существует общепринятой терапии этой патологии. Важная медицинская проблема – установленный факт прогрессирования жировой болезни печени от простого стеатоза до стеатогепатита и цирроза с возможным развитием рака печени [1-4].

Терапия НАЖБП в настоящее время в основном направлена на лечение тесно взаимосвязанных метаболических нарушений, включающих метаболический синдром, инсулинорезистентность, сахарный диабет 2 типа, ожирение, гиперинсулинемию и сердечно-сосудистые заболевания. Диета и физические упражнения рекомендуются в качестве базового универсального подхода [2]. К сожалению, применение при НАЖБП и АБП ряда лекарственных средств, продемонстрировав многообещающие результаты, не позволили сделать убедительные выводы об их эффективности [2, 5, 6].

Как известно, нетоксичные незаменимые фосфолипиды широко признаны эффективными при разных заболеваниях печени [7, 8]. Эссенциальные фосфолипиды (ЭФЛ, EPL) представлены молекулами полиенилфосфатидилхолина (так-

же называемого полиенфосфатидилхолином или PPC) являются высокоочищенным экстрактом семян соевых бобов со стандартизованным содержанием (72-96%) 3-SN-фосфатидилхолина. Количественно и качественно доминирующей молекулой в ЭФЛ является дилинолеилфосфатидилхолин (DLPC), составляющий до 52% фосфатидилхолина (PC) и представленный на рисунке 1 [9].

Высокий уровень DLPC является основным различием между EPL/PPC и типичными фосфолипидами, а также PC, потребляемыми с пищей и синтезируемыми в организме. Высоконасыщенная PC с дополнительной ненасыщенной жирной кислотой в первом положении молекулы PC встречаются около 1,3% [10]. При введении ЭФЛ количество DLPC в печени значительно увеличивается [9].

Известно, что фосфолипиды образуют двойной слой клеточных и субклеточных мембран и обуславливают их гибкость и биологическую активность. Эффективность ЭФЛ в терапии заболеваний печени обеспечивается не только способностью DLPC включаться в поврежденные участки мембран и тем самым улучшать регенерацию печени, заменять эндогенные, менее ненасыщенные молекулы PC, но и повышать текучесть и функционирование мембран. Исследования на животных показали, что ЭФЛ влияют на мембранозависимые клеточные функции, обладают антиоксидантными, противовоспалительными, антифиброзными, апоптозодулирующими, регенеративными, восстанавливающими, защитными, липидорегулирующими эффектами, обеспечивая сигнальные и рецепторные взаимоотношения [7, 8].

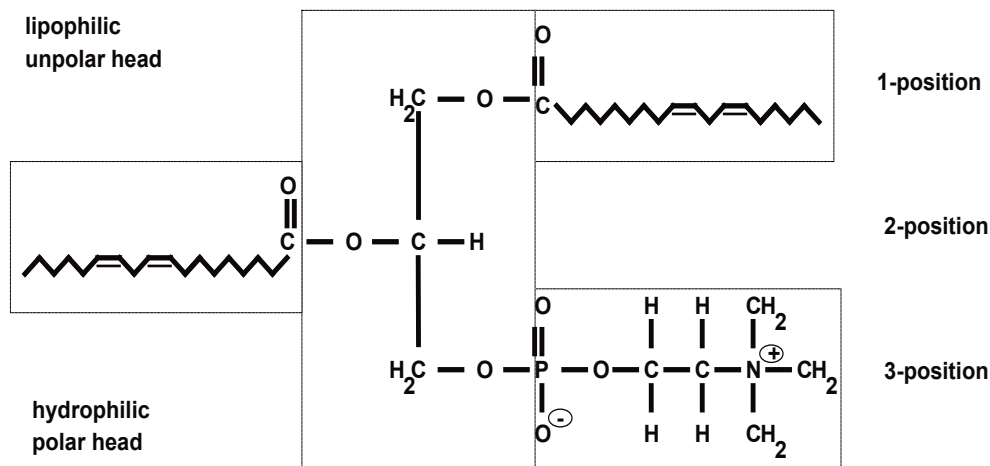


Рисунок 1. – 1,2 – Дилинолеилфосфатидилхолин (DLPC) в ЭФЛ

Цель исследования – рассмотрение, обсуждение и обобщение имеющихся результатов по влиянию ЭФЛ на течение неалкогольной жировой и алкогольной болезней печени (НАЖБП и АБП).

Материалы и методы

Исследование базы данных проводилось в Medline, Embase, Кокрановской библиотеке, журналах конкретных стран и цитатах из литературы по соответствующим гепато-, гастроэнтерологическим статьям в период с 1988 по 2018 гг. В двухэтапном процессе вначале использовали комбинации ключевых слов, в том числе: НАЖБП, АБП, эссенциале, липостабил, незаменимые фосфолипиды, полиенилфосфатидилхолин, PPC, DLPC, PC и терапия.

На втором этапе были рассмотрены работы, в которых указывалось, что в качестве ключевого компонента в ЭФЛ минимальное количество извлечения PC из сои составляло 72% со значительным содержанием DLPC, или которые были основаны на торговом наименовании Essentiale®. Исследования с менее очищенным PC из сои или с PC из других источников были исключены. В общей сложности из 86 клинических исследований (по состоянию на 04/2018) было отобрано 26 репрезентативных в отношении причин жировой болезни печени, дизайна исследования и изученных переменных, включая одно исследование с учетом конкретного случая и семь двойных слепых.

Результаты и обсуждение

Клиническая эффективность ЭФЛ при НАЖБП

С 1988 г. было опубликовано 147 клинических исследований на предмет ЭФЛ и НАЖБП (по состоянию на 04/2018), из них 127 – с 2000 г., 3 исследования были двойными слепыми. Дозировка ЭФЛ варьировала от 1,05 г до 1,8 г в день перорально, терапия продолжалась от 4-х недель до 24 и более месяцев, в большинстве исследований пациенты получали по 1,8 г ЭФЛ в день в течение 3-6 месяцев. В некоторых исследованиях терапия началась с 500-1000 мг ЭФЛ в/венно от 10 дней до 4-х недель, с последующим пероральным приемом ЭФЛ. В одном исследовании ЭФЛ вводились в дозе 500 мг в/венно в течение 30 дней.

НАЖБП и его более тяжелая форма – неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) – были в основном вызваны ожирением и сахарным диабетом II типа. В ряде случаев НАСГ был связан с гиперлипидемией, артериальной гипертензией, ишемической болезнью сердца (атеросклеротическим кардиосклерозом), хроническим вирусным гепатитом, холециститом, холелитиазом, гипотиреозом, беременностью или с разной сочетанной патологией. В большинстве представле-

ны жалобы, результаты объективного осмотра, биохимических, визуальных и морфологических исследований.

В первом клиническом исследовании из Японии 6 пациентов с ожирением печени неалкогольной этиологии и без сахарного диабета, страдающие ожирением, были успешно пролечены низкокалорийной диетой, физическими упражнениями и приемом внутрь 1,5 г ЭФЛ в день в течение 8 недель. Эта группа сравнивалась с 6 пациентами, которые также были на диете, занимались физическими упражнениями и принимали пролекарство (производное никотиновой кислоты). По данным компьютерной томографии установлено снижение накопления жира в печени в опытной группе, отразившееся на уменьшении показателя интенсивности стеатоза с 27-18 HU до 54-8 HU.

M. Cairella и его коллеги из Италии оценили эффективность ЭФЛ в терапии гепатобилиарной дисфункции при введении 1,8 г ЭФЛ в день в течение трех месяцев [12]. Исследовательская группа и контроль включали 20 случаев, каждый с индексом массы тела $35,34 \pm 4,89$ кг/м². Экскреторные параметры общего билирубина, белка и ГГТП были в пределах нормы у всех пациентов исследовательской группы, но оставались повышенными у 15-35% пациентов в контрольной группе. В ЭФЛ-группе ультразвуковая картина (УЗИ) печени явно улучшилась у 14 пациентов и нормализовалась в 6 случаях, в то время как в трех случаях (контрольная группа) она изменилась незначительно. S. Koga и соавторы подтвердили непрерывное, вызванное ЭФЛ, улучшение или нормализацию показателей УЗИ у 39 пациентов с жировой дистрофией печени вследствие ожирения в виде уменьшения эхогенности печени, стабилизации эхокардиограммы и обратного развития внутрипеченочной венозной недостаточности [13].

В 2000 г. проведено рандомизированное двойное слепое исследование, в котором J. H. Li и его коллеги сообщили о положительном влиянии приема 1,8 г ЭФЛ в день на показатели общего холестерина (ОХ), триглицериды (ТГ) и печеночные трансаминазы, что сопровождалось значительным снижением выраженности жировой дистрофии печени, зарегистрированной на КТ [14].

Опыт применения ЭФЛ у пациентов, страдающих сахарным диабетом в зрелом возрасте и ожирением печени, начался с рандомизированного плацебо-контролируемого двойного слепого исследования [15]. Группе из 30 пациентов было дано указание сократить диету до 1200 ккал в день, содержащую 1 г на 1 кг белка. В группе плацебо было 5 пациентов и 7 пациентов в группе ЭФЛ, которые получали 1,0-1,5 г толбутамида в день. Половине пациентов дополнительно давали 1,8 г ЭФЛ в день, вторая половина прини-

мали плацебо. В течение 6-ти месяцев лечения размер печени почти не изменился у пациентов группы плацебо, в группе ЭФЛ наблюдалось значительное уменьшение размеров печени. Гистологическое исследование биоптата печени дало соответствующие результаты: заметное улучшение морфологической картины наблюдалось у 4 пациентов, получавших ЭФЛ, и только у 1 пациента из группы плацебо. Хотя в биопсии печени у этого пациента после лечения не наблюдалось жировой инфильтрации, у него были выявлены признаки цирроза печени. Кроме того, у 1 пациента, получавшего ЭФЛ, у которого жировая инфильтрация была более выраженной, при повторной биопсии наблюдались морфологические признаки наличия участков фиброза в портальных трактах. У пациентов после 1-го, 3-х и 6-ти месяцев терапии ЭФЛ произошло достоверное снижение показателя ГГТП, тогда как в контрольной группе отклонения не были статистически значимыми. Индикаторные печеночные ферменты и билирубин были в пределах нормы в течение всего исследования.

Начиная с двойного слепого исследования, проведенного до апреля 2018 г., семь дальнейших клинических исследований подтвердили влияние ЭФЛ на жировую болезнь печени, связанную с сахарным диабетом [16-22]. D. Yin и L. Kong пролечили 185 пациентов, применяя стандартную диету, пероральные антидиабетические препараты, физические упражнения. Из этой группы 125 пациентов дополнительно принимали 1,8 г ЭФЛ в день в течение трех месяцев [16]. Контроль лабораторных биохимических показателей показал значимую положительную динамику показателей АлАТ, общего холестерина (ОХ), липопротеидов низкой (ЛПНП), высокой плотности (ЛПВП) и триглицеридов (ТГ) в сыворотке крови в группе ЭФЛ, а также наличие различий по данным показателям между группами. Улучшение наблюдалось в 90,2% случаев в исследовательской группе (с ЭФЛ) и в 51% – в контроле ($p < 0,05$). Показатели глюкозы в крови натощак улучшились в обеих группах, но разница между группами была незначительной ($p > 0,05$).

В исследовании, проведенном S. Poonthai и его коллегами, 22 пациента получали, помимо стандартной диеты, противодиабетические средства в зависимости от тяжести уровня гликемии: 22,7% были на терапии метформином, 22,7% – на сульфонилмочевине, 45,5% – на комбинации обоих лекарств, 9% – на инсулинотерапии [17]. Дополнительно, кроме основной терапии, пациенты принимали внутрь ЭФЛ в дозе 2,1 г в день перорально в течение шести месяцев. Улучшение показателей УЗИ наблюдалось у 54,5% пациентов, у 40,9% не наблюдалось каких-либо изменений, в одном случае отмечено ухудшение. Эхоструктура печени улучшилась у 80% пациентов с выраженным диффузным сте-

атозом и у 50% пациентов с небольшими изменениями. Произошло также улучшение показателей трансаминаз и ГГТП.

H. Obayashi и коллеги лечили пациентку с НАСГ натеглинидом в качестве стимулятора секреции инсулина в течение 7 месяцев с последующим дополнительным введением 1,5 г ЭФЛ в день в течение двух лет [18]. Отмечены улучшение показателей как модели гомеостаза (НОМА) и индекса инсулинорезистентности, так и нормализация индекса гепаторенального эхоконтрастирования, трансаминаз, ГГТП и ферритина. Благоприятный эффект сохранялся в течение 24 месяцев. Показатели биопсии печени по критериям Бранта снизились со 2-й стадии до нулевой стадии после 9-месячного введения ЭФЛ, а также уменьшились стеатоз, баллонная дистрофия, инфильтрация ацинусов и портальных трактов.

В течение последних 10 лет в трех исследованиях изучалось влияние сочетания метформина и ЭФЛ у пациентов с диабетом. Авторы наблюдали положительные эффекты на показатели АсАТ, ГГТП, липиды крови и динамику сонографии [19-21]. Недавно проведенное исследование показало замедление прогрессирования фиброза печени в группе пациентов, принимающих ЭФЛ, по сравнению с контролем ($p = 0,03$), а также снижение выраженности стеатоза в группе с ЭФЛ и увеличение – в группе контроля ($p = 0,02$) [21].

Помимо упомянутого, еще одно исследование провели H. Ohbayashi и его коллеги в двух группах пациентов с НАСГ (18 и 8 чел.) и подтвердили, что длительная терапия ЭФЛ способствует улучшению функции печени [22, 23]. Уже после 4-х недель терапии уровни трансаминаз значительно снижались и оставались на таком уровне в течение 12 месяцев терапии [22]. Из 7 пациентов 2-й исследовательской группы, которым были проведены парные биопсии печени до и после 6-месячного курса терапии, у 1-го наблюдалось значительное улучшение гистологической картины, у 4-х других – снижение степени выраженности стеатоза, баллонной дистрофии и воспалительных изменений в печеночных дольках и/или перипортальной области, у 1-го пациента гистологические изменения отсутствовали, ещё у 1-го – незначительная отрицательная динамика [23].

В последние годы ЭФЛ сравнивали с другими соединениями, которые, как считается, эффективны при НАЖБП. Так, ЭФЛ сравнивали с *Gynostemma pentaphyllum gypenosides*, с экстрактом из красного дрожжевого риса (*Xuezhikang* – каждая капсула содержит 2,5 мг ловастатина) и с диаммонийглицерризинатом [24-27].

По сравнению с гипенозидами *Gynostemma pentaphyllum*, ЭФЛ демонстрировали большее влияние на восстановление клинических симптомов, нормализацию сывороточных уровней ОХ и ТГ, улучшение ультразвуковой картины и функции печени. Терапия ЭФЛ была эффектив-

на в 93,3% случаев [24]. Рандомизированные открытые контролируемые исследования X.Fan с соавт. и X. Guo с соавт. не показали различий по показателям, характеризующим значительное восстановление функции печени, в группах, получавших ЭФЛ и контрольной группе [25, 26]. Тем не менее, ЭФЛ были более эффективными при тяжелой жировой болезни печени и значительно снижали уровни липидов в сыворотке. В частности, количество пациентов с выраженной жировой дистрофией печени изменилось в группе получавших ЭФЛ с 23 до 9 пациентов по сравнению с контрольной группой, где улучшения наблюдались у 3-х из 15 пациентов [26]. Сравнение УЗИ печени по количеству «заметно эффективных» и «эффективных» улучшений показало значительные различия в пользу группы получавших ЭФЛ против группы, получавшей диаммонийглицирризинат [27].

Упомянутые рандомизированные, открытые контролируемые исследования [24-27] проводились двойным слепым методом, в котором сравнивали трехмесячную терапию 1,05 г ЭФЛ в день с 7-10 мг/кг урсодезоксихолевой кислоты (УДХК) в день [28]. Десять пациентов из каждой группы имели НАЖБП с сахарным диабетом (СД), остальные – НАЖБП с ожирением (ИМТ>30 кг/м²). Пациенты с сердечно-сосудистыми заболеваниями, заболеваниями печени, отличными от стеатоза печени, осложнениями диабета, включая кетоацидоз, беременные и кормящие женщины, а также пациенты с употреблением алкоголя в анамнезе были исключены из исследования. Потребление всех других лекарств было прекращено в ходе исследования. ЭФЛ продемонстрировали большую эффективность, чем УДХК. Сорок пять процентов пациентов, получавших ЭФЛ, отметили значительное уменьшение симптомов (тошнота, недомогание и вздутие живота) в конце терапии по сравнению с 30% пациентов, получавших УДХК. Никаких заметных сонографических изменений не зафиксировано через 4 недели терапии, но через 12 недель у 20% пациентов, получавших ЭФЛ, и 10% пациентов, получавших УДХК, отмечалось улучшение показателей УЗИ. У пациентов, получавших ЭФЛ, наблюдалось достоверное снижение уровней АлАТ и щелочной фосфатазы ($p<0,05$), заметно снизился уровень АсАТ ($p=0,087$). В группе пациентов, получавших УДХК, достоверно снизился только уровень АлАТ. В группах пациентов с СД и ожирением не было существенных различий в динамике показателей.

Оценка влияния ЭФЛ на НАЖБП дополняется исследованиями, в которых изучалась комбинированная терапия ЭФЛ с другими лекарственными средствами в сравнении с монотерапией ЭФЛ [29, 30]. В этих двух рандомизированных, открытых контролируемых исследованиях при-

менение комбинации ЭФЛ с УДХК у пациентов с НАСГ и комбинации ЭФЛ с силибином, глюкуронолактоном и комплексом витаминов В у пациентов со стеатозом печени было более эффективным, чем при монотерапии ЭФЛ.

Клиническая эффективность ЭФЛ при алкогольной болезни печени (АБП)

С 1988 г. опубликовано 47 клинических исследований по влиянию ЭФЛ на АБП, из них 34 – с 2000 г. Пять исследований были двойными слепыми. Полученные в дальнейшем данные не различались вне зависимости от наличия смешанного типа АБП, алкогольной жировой дистрофии печени, острого или хронического алкогольного гепатита, хронического активного алкогольного гепатита или цирроза печени, а также у пациентов с алкогольным перивенулярным фиброзом и с неполным циррозом печени. В большинстве исследований пациентам рекомендовалось прекратить употребление алкоголя в течение периода наблюдения. В целом дозировка ЭФЛ составляла 1,8 г/день per os, а продолжительность лечения варьировала от 4 недель до 6 месяцев. В некоторых исследованиях (особенно с более высокой активностью воспалительного процесса в печени) терапия начиналась с 500-1000 мг ЭФЛ в день внутривенно, затем 1800 мг ЭФЛ в день per os. Некоторые исследования проведены с 500-1000 мг ЭФЛ/день в/венно более четырех недель без перорального введения ЭФЛ.

G. Ни и соавторы опубликовали обзор 6 рандомизированных двойных слепых исследований по терапии АБП и жировой болезни печени [31]. По оценке двух независимых рецензентов, методологическое качество этих исследований – достаточно высокое. Все полученные результаты в ходе исследования сравнивали с плацебо. Два исследования проведены на основе нашей базы данных [32, 33], два проводились ранее [34, 35] и в двух исследованиях пациенты имели НАЖБП [14, 15].

Только в одном исследовании сообщалось о смертности, которая составила 22,6% в группе, получавшей лечение, и 39,2% в контрольной группе [32]. Критериями эффективности 4 испытаний, включавших систематический обзор 146 пациентов, были ремиссия клинических симптомов и нормализация биохимических показателей (общая клиническая эффективность) [14, 15, 34, 35]. Частота ответов составила 21 из 24 в группе лечения и 3 из 12 в контрольной группе. Метаанализ 4 исследований показал эффективность в 83,5% случаев в группе лечения и 41,7% – в контрольной группе ($p=0,03$) [31]. Это говорит о том, что из каждых 100 пациентов с АБП/ЖБП, получавших ЭФЛ, 41 отвечает на терапию, отмечая улучшение. Кроме того, у всех 923 пациентов в трех исследованиях был проведен гисто-

логический анализ [15, 32, 33]. Согласно мета-анализу, ЭФЛ не улучшали гистологию пациентов ($p=0,07$), но сдерживали гистологическое ухудшение ($p=0,02$). О серьезных побочных эффектах в 6 исследованиях не сообщалось.

Рандомизированные проспективные двойные слепые исследования M. Z. Papos с соавт. и C. S. Lieber с соавт., выполненные в соответствии с GCP, отличались от более ранних двойных слепых исследований [34, 35] попыткой повысить эффективность ЭФЛ путем увеличения дозировки и продолжительности лечения [32, 33]. В исследовании, проведенном M. Z. Papos с соавт., 53 пациента ежедневно получали 6 г ЭФЛ в течение двух лет, 51 пациент находился в контрольной группе плацебо [32]. В общей сложности 46 пациентов завершили исследование (ЭФЛ, $n=27$; плацебо, $n=19$). Среди выбывших умерли 12 пациентов из группы ЭФЛ и 20 из контрольной группы (31% из числа тех пациентов, которые участвовали в исследовании, и 51% – не приверженных к терапии). Кривые выживания, построенные по методу Каплана-Мейера, показали заметную тенденцию к улучшению выживаемости в группе ЭФЛ по сравнению с плацебо, хотя и не были значимыми ($p=0,086$). Пациенты с категорией B по шкале Child Pugh обычно имели более высокий риск смерти, чем те, которые относились к категории A. Принимая во внимание только пациентов, входящих в категорию B, разница была более выраженной: двое из 12 пациентов, получавших ЭФЛ, умерли (17% из числа тех, кто начал терапию, 25% из тех, кто прервал терапию), по сравнению с 7 из 16 пациентов в контроле (44% из числа тех, кто начал терапию, 64% – из тех, кто ее прервал, $p>0,05$). Средняя выживаемость составила 83,9 недели (с ЭФЛ) и 56,6 недели (плацебо), соответственно.

В исследовании, проведенном C. S. Lieber и его коллегами, 789 заядлых алкоголиков из 20 медицинских центров по делам ветеранов (США) с историей среднесуточного потребления алкоголя 16 drink (приемов) в день (один drink = 14 г алкоголя) в течение 19 лет и с наличием перивенулярного или септального фиброза, или неполного цирроза, были случайным образом отобраны для мониторинга в течение от 4 до 6 лет. Пациенты получали либо 4,5 г/сут ЭФЛ, либо плацебо [33]. Биопсии в течение двух лет были выполнены у 412 пациентов. ЭФЛ существенно не отличались от плацебо по влиянию на стадию фиброза, тем не менее, употребление алкоголя было неожиданно уменьшено в обеих группах примерно до 2,5 drink в день в результате нового подхода «краткосрочного вмешательства». Не отмечено дальнейшего прогрессирования фиброза, но не было и возможности проверить, могут ли ЭФЛ противодействовать такому прогрессированию, за исключением под-

группы пациентов, которые все еще потребляли 6 или более drink в день, и у которых наблюдался противофиброзный эффект. Асцит, важный вторичный клинический признак цирроза печени, также реже наблюдался во время наблюдения за пациентами, получавшими ЭФЛ. Кроме того, на фоне приема ЭФЛ происходило снижение уровней аминотрансфераз и билирубина в определенные моменты времени у пациентов, употребляющих алкоголь, инфицированных HCV, и у тех, кто алкоголь не употреблял [36].

В рандомизированном одиночном слепом клиническом исследовании, проведенном E. Sas и его коллегами, 86 пациентов с неосложненной АБП следовали базовой схеме лечения, включая диету, физическую активность и воздержание от алкоголя [37]. Среди наблюдаемых 56 пациентов получали дополнительное лечение в течение 6 месяцев с использованием 1,8 г ЭФЛ в день, 30 пациентов из контрольной группы – 400 мг витамина E в день.

Базовое лечение в сочетании с ЭФЛ привело к более высокому снижению уровней трансаминаз, чем базовое лечение в сочетании с витамином E. Кроме того, среднее значение активности гепатита, оцененное по шкале Metavir, после лечения составило A1 (легкая активность) в группе ЭФЛ и A3 (тяжелая активность) в контрольной группе. УЗИ выявило значительное улучшение эхоструктуры печени у 49 из 56 пациентов основной группы. Биопсия печени и Fibromax-тест показали, что дополнительное введение ЭФЛ значительно замедляло прогрессирование фиброза печени до стадии F1 (портальный фиброз без септ) по сравнению с F3 (многочисленные септы без цирроза) в контрольной группе. Стеатоз значительно увеличился в группе, принимавшей витамин E, и уменьшился в группе ЭФЛ. Кроме того, авторы сообщили о значительном снижении уровня глюкозы, инсулина и индекса инсулинорезистентности.

В одном из новых клинических исследований сравнивалось внутривенное введение восстановленного глутатиона (GSH) + ЭФЛ и GSH + глицирризин. В обеих группах значительно снизились уровни АсАТ, АлАТ, ГГТП и общего билирубина в качестве маркеров функции печени, а также гиалуроновой кислоты, ламинина, проколлаген-III-пептида и коллагена IV типа как биомаркеров фиброза [38]. После лечения показатели в группе ЭФЛ были значительно ниже, чем в контрольной группе ($p<0,05$).

Согласно данным мета-анализа, из 9 рандомизированных плацебо-контролируемых двойных слепых исследований клинической эффективности ЭФЛ у 409 госпитализированных пациентов, страдающих хроническим заболеванием печени (хроническим активным гепатитом или жировой дистрофией печени), в целом эффективность

терапии зафиксирована на 26,6% чаще у пациентов, получавших ЭФЛ ($p < 0,0001$) (рис. 2) [39].

Применение ЭФЛ при НАЖБП обосновано наличием большой доказательной базы их эффективности в проведенных исследованиях за последние 15 лет. На сегодняшний день используется не так много вариантов лечения НАЖБП, кроме коррекции ожирения с помощью гипокалорийных диет и физических упражнений, а также контроля гипергликемии с помощью диеты, инсулина или пероральных гипогликемических препаратов. Следовательно, любое терапевтическое вмешательство, которое воздействует на накопление жира в печени и улучшает гистологию печени, будет весьма полезным [40]. ЭФЛ являются одними из обсуждаемых лекарственных средств, оказывающих значительное положительное влияние на НАЖБП. По причине их мембранных, антиоксидантных и антифибротических эффектов введение ЭФЛ при НАЖБП и НАСГ патогенетически оправдано.

Еще одно важное обоснование эффективности ЭФЛ при НАЖБП недавно опубликовано D. Ling с соавторами, показавшими, что снижение соотношения фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в клеточной мембране является предиктором НАЖБП и выживаемости после частичной гепатэктомии [41]. ЭФЛ способны восстанавливать это нарушенное соотношение. Как уже упоминалось, помимо низкокалорийных диет и физических нагрузок, терапия НАЖБП должна быть направлена на компоненты метаболического синдрома, которые могут быть дополнительно полезны для печени. Согласно Консенсусу Международной Федерации Диабета (2006), к метаболическому синдрому относят центральное ожирение (определяемое как окружность талии с этническими особенностями) в совокупности с двумя любыми из приведенных критериев: повышенный уровень ТГ, пониженный уровень холестерина ЛПВП, повышенное

артериальное давление или гипергликемия натощак либо ранее диагностированный диабет 2 типа) [42]. Это определение включает триглицериды и холестерин ЛПВП, оба критерия, которые можно нормализовать, используя ЭФЛ [43, 44].

Продолжает интенсивно исследоваться фармакологический механизм действия ЭФЛ при АБП [7, 8], несмотря на уже имеющиеся сведения о характере и особенностях действия ЭФЛ при АБП (W. Okiyama и его коллеги) [45].

Клинически ситуация несколько иная, поскольку авторы отобрали для анализа 4 двойных слепых и 1 слепое исследование, из которых 2 исследования проводились давно, в 2 исследованиях пациентам назначались значительно более высокие дозы, чем рекомендовано в поступающей в продажу лекарственной форме [32, 33]. Пациенты с острым алкогольным гепатитом ежедневно принимали 12 капсул, содержащих 6 г ЭФЛ в течение двух лет [32]. Сомнительно, принимали ли пациенты, злоупотребляющие алкоголем, с общеизвестным низким уровнем комплаентности, по 12 капсул каждый день в течение двух лет. Тем не менее, по мнению авторов, правильный подход к терапии влияет на комплаентность пациентов с АБП и приводит к воздержанию от алкоголя или, по крайней мере, к явному снижению потребления алкоголя, а также сопровождается улучшением состояния печени [46]. Таким образом, первым требованием всегда является абсолютное воздержание от алкоголя, а затем следует рассмотреть возможность медикаментозного лечения, например с помощью ЭФЛ, причем последнее особо важно с самого начала лечения в тех случаях, когда есть проблемы с прекращением употребления алкоголя. Авторы полагают, что, поскольку существовала тенденция к более высокой выживаемости пациентов с острым алкогольным гепатитом в группе ЭФЛ, особенно у пациентов с классом цирроза В по шкале Child Pugh [32], необходи-

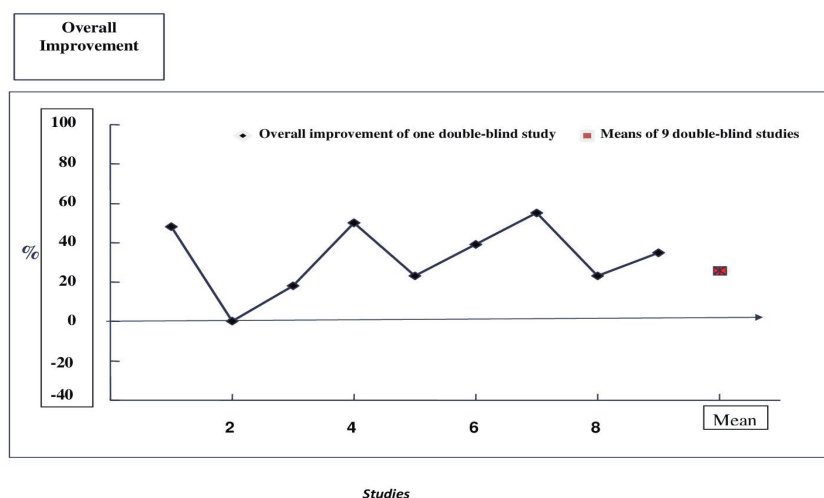


Рисунок 2. – Различия в показателях ответивших на терапию ЭФЛ при хронических заболеваниях печени (метаанализ двойных слепых исследований [38])

мо включение таких пациентов в дальнейшее двойное слепое исследование с уменьшением ежедневной дозировки ЭФЛ и более короткой продолжительностью лечения (1,8 г ЭФЛ в сутки в течение одного года).

Исследование показало, что, помимо слишком высокой суточной дозы ЭФЛ и большой продолжительности лечения, имели место дополнительные недостатки, влияющие на эффективность ЭФЛ [33]. На стадии планирования схемы лечения подсчитано, что в группе длительно употребляющих алкоголь с ранними стадиями фиброза естественная скорость прогрессирования будет 30% в течение 24 месяцев употребления алкоголя. Тем не менее, наблюдаемая естественная скорость прогрессирования, основанная на результатах группы плацебо, составила 20%, с сопоставимой скоростью регрессии. Предполагалось, что более медленная скорость прогрессирования связана с уменьшением употребления алкоголя. Таким образом, большинство пациентов не соответствовали критериям, согласно протоколу употребления алкоголя (6 или более drink в день) в течение периода наблюдения. Даже в подгруппе сильно пьющих прогнозируемый уровень прогрессирования в 30% не наблюдался. Вторым недостатком было то, что большое количество пациентов вышли из исследования до проведения 24-месячной биопсии.

С другой стороны, большинство из проанализированных клинических испытаний ЭФЛ при НАЖБП и АБП также имеют свои недостатки: слишком малое количество пациентов, неполное методологическое описание, включая нечеткую статистическую оценку, разные дозы ЭФЛ, данные, опубликованные во вторичных статьях. Следовательно, необходимы дальнейшие рандомизированные двойные слепые клинические исследования с большим числом пациентов и сопоставлением гистологического и визуального

статуса, чтобы включить ЭФЛ в стандарты терапии. До сегодняшнего дня во всем мире общепринятыми являются только диета, физические нагрузки при НАЖБП и отказ от злоупотребления алкоголем при АБП, хотя точная оптимальная диета, вид и продолжительность физических упражнений не разработаны.

Существует масса исследований, проведенных в разных странах, без каких-либо свидетельств об отсутствии эффекта от ЭФЛ или показывающих некоторое преимущество по сравнению с другими исследуемыми препаратами или в сочетании с другими лекарствами, что свидетельствует о том, что ЭФЛ полезны при заболеваниях печени, учитывая, что все виды заболеваний печени имеют мембрано-связанные нарушения, а также с учетом доказательства их эффективности в большом числе фармакологических исследований [7, 8]. Учитывая способность ЭФЛ приводить к коррекции повреждений мембраны и улучшения ее свойств, имеет смысл всегда сочетать ЭФЛ с другими методами терапии НАЖБП и АБП.

Выводы

ЭФЛ ускоряют улучшение и нормализацию субъективных симптомов, таких как боль в правом подреберье, диспепсические явления и гепатомегалия при НАЖБП и АБП. Приведенные результаты эффективного применения ЭФЛ подтверждаются визуальными методами оценки (УЗИ, КТ), показателями фибромакса, мониторингом биохимических маркеров цитолиза печени, детоксикации, выведения, синтеза и клиренса, а также изменением гистологической картины печени. О побочных эффектах не сообщалось. Рекомендуются дополнительные, адекватно проводимые рандомизированные клинические испытания ЭФЛ, а также изучение синергетических эффектов ЭФЛ с другими препаратами для лечения заболеваний печени.

References

- Völzke H. H. Multicausality in fatty liver disease: is there a rationale to distinguish between alcoholic and non-alcoholic origin? *World J. Gastroenterol.* 2012;18(27):3492-3501. doi: 10.3748/wjg.v18.i27.3492.
- Yu Y, Cai J, She Z, Li H. Insights into the epidemiology, pathogenesis, and therapeutics of nonalcoholic fatty liver diseases. *Adv. Sci.* 2019;6(4):1801585. doi: 10.1002/advs.201801585.
- Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy L, Hardy T, Henry L, Eslam M, George J, Bugianesi E. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2017;15(1):11-20. doi: 10.1038/nrgastro.2017.109.
- Diehl AM, Day C. Cause, pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.* 2017;377(21):2063-2072. doi: 10.1056/NEJMra1503519.
- Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2013;10(11):656-665. doi: 10.1038/nrgastro.2013.183.
- Orman ES, Odena G, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis, management, and novel targets for liver therapy. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2013;28(Suppl 1):77-84. doi: 10.1111/jgh.12030.
- Gundermann K-J, Kuenker A, Kuntz E, Drozdik M. Activity of essential phospholipids (EPL) from soybean in liver diseases. *Pharmacol. Rep.* 2011;63(3):643-659.
- Gundermann K-J, Gundermann S, Drozdik M, Prasad VGM. Essential phospholipids in fatty liver: a scientific update. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 2017;9:105-117. doi: 10.2147/CEG.S96362.
- Lieber CS, Robins SJ, Li J, DeCarli LM, Mak KM, Fasulo JM, Leo MA. Phosphatidylcholine protects against fibrosis and cirrhosis in the baboon. *Gastroenterology.* 1994;106(1):152-159.
- Oette K, Kuhn G, Rümmer A, Niemann R, Gundermann K-J, Schumacher R. Resorption von Dilinoleoyl-Phosphatidylcholin nach oraler Gabe [Absorption of dilinoleoyl-phosphatidylcholine after oral administration]. *Drug Res.* 1995;45(8):875-879. (German).
- Watanabe A, Kobayashi M, Morishita N, Nagashima H. Multimodal treatment resulting in rapid improvement of fatty liver in obese patients. *Curr. Ther. Res.* 1988;43(2):239-246.
- Cairella M, Callisto F, Godi R, Marchini G. La fosfatidilcolina polinsatura associata a complesso vitaminico B nel trattamento del danni della funzione hepatobiliare

- da alimentazione squilibrata [Polyunsaturated phosphatidylcholine combined with vitamin B complex in the treatment of patients with disorders of the hepatobiliary function caused by unbalanced nutrition]. *Clin Ter.* 1989;131(4):237-246. (Italian).
13. Koga S, Irida T, Miyata Y, Sakai H, Tsuji Y, Fujimoto Y, Masumoto A, Matsuura T, Sato M, Yokota M, Yamamoto F, Tokumatso M. [Clinical progress of 51 fatty liver cases analyzed by liver function tests and ultrasonic screening and results of EPL administered cases]. *Prog. Med.* 1991;11(7):1891-1899. (Japanese).
 14. Li J-H, Chen X-Y, Zhong C-F, Min J. [A randomized controlled study of essential phospholipids (Essentiale capsules) in the treatment of fatty liver]. *Infect. Dis. Info.* 2000;13(4):180-181. (Chinese).
 15. Gonciarz Z, Besser P, Lelek E, Gundermann KJ, Johannes KJ. Randomised placebo-controlled double blind trial on "essential" phospholipids in the treatment of fatty liver associated with diabetes. *Müd Chir Dig.* 1988;17(1):61-65.
 16. Yin D, Kong L. [Observation for curative effect of Essentiale in treatment of fatty liver caused by diabetes mellitus]. *Med. J. Q.* 2000;15(4):277-278. (Chinese).
 17. Poongothai S, Karkuzhali K, Siva Prakash G, Sangeetha T, Saravanan G, Deepa R, Gopalakrishnan S, Mohan V. Effect of essential in diabetic subjects with non-alcoholic fatty liver. *Int. J. Diab. Dev. Countries.* 2005;25(1):12-19.
 18. Ohbayashi H, Fujimoto M, Yamase H, Ito M. Improvement of NASH with two-year treatment with oral polyene phosphatidylcholine. *J. Rural Med.* 2007;2(1):67-73. doi: 10.2185/jrm.2.67.
 19. Buyeverov AO, Yeshanu VS, Mayevskaya MV, Ivashkin VT. Jessencialnye fosfolipidy v kompleksnoj terapii steatohepatita smeshannogo geneza [Application of essential phospholipids in complex therapy of steatohepatitis of the mixed origin]. *Klinicheskie perspektivy gastroenterologii, gepatologii* [Clinical prospects of gastroenterology, hepatology]. 2008;(1):17-22. (Russian).
 20. Sun C, Zheng X, Tan Z, Cui F, Zhang R, Zhang H. [Clinical observation on polyene phosphatidyl choline and metformin in the treatment of type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease]. *Clin. Focus.* 2008;23(17):1272-1273. (Chinese).
 21. Sas E, Grinevich V, Efimov O, Shcherbina N. Beneficial influence of polyunsaturated phosphatidylcholine enhances functional liver condition and liver structure in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Results of prolonged randomized blinded prospective clinical study. *J. Hepatol.* 2013;58(Suppl 1):S549. doi: 10.1016/S0168-8278(13)61365-3.
 22. Ohbayashi H. [Twelve-month chronic administration of polyene phosphatidylcholine (EPL®) for improving hepatic function of fatty liver patients]. *Prog Med.* 2004;24(7):1751-1756. (Japanese).
 23. Ohbayashi H, Fujimoto M, Yoshida M, Ito M, Yamase H. [The therapeutic effect of polyene phosphatidylcholine (EPL) on NASH]. *Liver Bile and Pancreas.* 2006;52(4):637-642. (Japanese).
 24. Liang H. [Treatment of fatty liver applying polyene phosphatidyl choline]. *Chin. Med. Factory Mine.* 2006;19(3):207-208. (Chinese).
 25. Fan XF, Deng YQ, Ye L, Li YD, Chen J, Lu WW, Li JP. Effect of Xuezhikang capsule on serum tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperlipidemia. *Chin. J. Integr. Med.* 2010;16(2):119-123. doi: 10.1007/s11655-010-0119-7.
 26. Guo XL, Liang PX, Xu YQ. [Comparison of efficacies of diammonium glycyrrhizinate and polyene phosphatidylcholine on nonalcoholic steatohepatitis]. *Chin. J. New Drugs.* 2012;21(3):289-293. (Chinese).
 27. Shen Z. [Observation of efficacy in 100 patients with non-alcoholic fatty liver disease treated with Essentiale]. *Chin. J. Curr. Clin. Med.* 2007;5(8):693-694. (Chinese).
 28. Arvind N, Savaikar P, Rajkumar JS. Therapy for NAFLD – comparative study of essential phospholipids vs ursodeoxycholic acid. *Ind. J. Clin. Pract.* 2006;16(10):21-24.
 29. Zhuang XS, Zhang ZJ. [Study of ursodeoxycholic acid (UDCA) combined with polyene phosphatidylcholine in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis]. *China Pract. Med.* 2009;4(10):11-12. (Chinese).
 30. Zhou SY, Sun ZY. [Therapeutic efficacy of polyunsaturated phosphatidylcholine on fatty liver disease]. *J. Clin. Hepatol.* 2010;26(3):286-287. (Chinese).
 31. Hu G, Liu K, Zhao L. [Polyunsaturated phosphatidylcholine (Essentiale) for alcoholic/fatty liver: a systematic review]. *Liver.* 2005;10(1):5-7. (Chinese).
 32. Panos MZ, Polson R, Johnson R, Portmann B, Williams R. Polyunsaturated phosphatidyl choline for acute alcoholic hepatitis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 1990;2(5):351-355.
 33. Lieber CS, Weiss DG, Groszmann R, Paronetto F, Schenker S. II. Veterans affairs cooperative study of polyene phosphatidylcholine in alcoholic liver disease. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2003;27(11):1765-1772. doi: 10.1097/01.ALC.0000093743.03049.80.
 34. Кнъсчел F. Doppelblindstudie bei Patienten mit alkoholtoxischer Fettleber. Der Einfluss von "essentiellen" Phospholipiden auf Enzymverhalten und Lipidzusammensetzung des Serums [Fettleber Double-blind study in patients with alcoholic fatty liver. The influence of "essential" phospholipids on enzyme behaviour and lipid composition of the serum]. *Med Welt.* 1979;30(11):411-416. (German).
 35. Schaller Páirez A, González San Martín F. Placebo-controlled study with polyunsaturated phosphatidylcholine in alcoholic steatosis of the liver. *Med. Welt.* 1985;36(16):517-521.
 36. Lieber CS. New concepts of the pathogenesis of alcoholic liver disease lead to novel treatments. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2004;6(1):60-65.
 37. Sas E, Grinevich V, Kravchuk U, Efimov O. Polyunsaturated phosphatidylcholine reduces insulin resistance and hepatic fibrosis in patients with alcoholic liver disease: results of randomized blinded prospective clinical study. *J. Hepatol.* 2011;54:S207. doi: 10.1016/S0168-8278(11)60508-4.
 38. Cao Z, Zhang W, Wang W, Wang Y. Effect of reduced glutathione combined with polyene phosphatidylcholine on indicators of liver function and liver fibrosis in the treatment of patients with alcoholic liver disease. *Guangxi Med. J.* 2017;39:334-337.
 39. Gundermann K-J, Lehmacher W. Niezbkdne fosfolipidy w leczeniu chory wNetroby – metaanaliza podwójnie ślepych przyb klinicznych w przewlekłych chorobach wNetroby [The essential phospholipids as liver therapeutic – a meta-analysis of double-blind trials in chronic liver disease]. *Gastroenterol Polska.* 1998;5(6):553-559. (Polish).
 40. Adams LA, Angulo P. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgrad Med. J.* 2006;82(967):315-322.
 41. Ling J, Chaba T, Zhu LF, Jacobs RL, Vance DE. Hepatic ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine predicts survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology.* 2012;55(4):1094-1102.
 42. International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome [Internet]. Brussels; 2006. 24 p. Available from: <https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definition-of-the-metabolic-syndrome>.
 43. Klinger W, Gundermann KJ. (3-sn-phosphatidyl)choline in hyperlipoproteinemia [(3-sn-Phosphatidyl) cholin bei Hyperlipoproteinämien]. *Dtsch Dztztl.* 1992;26(Suppl):24-25. (German).
 44. Kirsten R, Heintz B, Nelson K, Schneider E, Oremek G, Nemeth N. Polyenyolphosphatidylcholine improves the lipoprotein profile in diabetic patients. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 1994;32(2):53-56.
 45. Okiyama W, Tanaka N, Nakajima T, Tanaka E, Kiyosawa K, Gonzalez FJ, Aoyama T. Polyene phosphatidylcholine prevents alcoholic liver disease in PPAR α -null mice through attenuation of increases in oxidative stress. *J Hepatol.* 2009;50(6):1236-1246. doi: 10.1016/j.jhep.2009.01.025.
 46. Lieber CS, Weiss DG, Groszmann R, Paronetto F, Schenker S; Veterans Affairs Cooperative Study 391 Group. I. Veterans Affairs Cooperative Study of polyenyolphosphatidylcholine in alcoholic liver disease: effects on drinking behavior by nurse/physician teams. *Alcohol Clin Exp Res.* 2003;27(11):1757-1764.