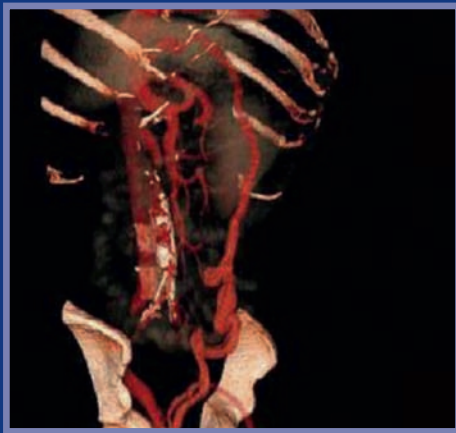
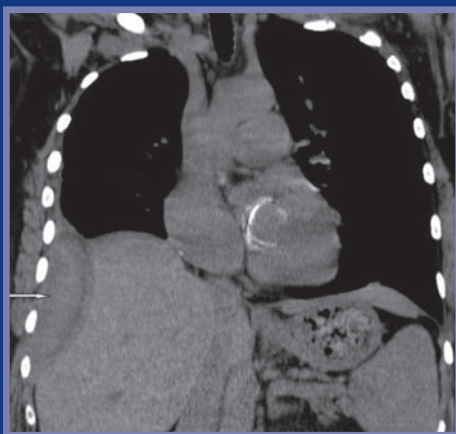


Clinical Gastroenterology and Hepatology

Клиническая Гастроэнтерология и Гепатология. Русское издание



■ Силибинин и родственные ему вещества — прямые ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса гепатита С



■ Подавление силимарином пролиферации Т-лимфоцитов и образования цитокинов *in vitro* при гепатите С

Издано в России
ООО «Рид Элсивер»



ELSEVIER

Перепечатка материалов
и использование их в любой
форме возможны только
с письменного разрешения
ООО «Рид Элсивер»

За дополнительной
информацией посетите раздел
«Медицина» на сайте:
www.elsevier.ru

Онлайн версия
и дополнительный контент
доступны на странице:
www.elsevier.ru/reprint

Несмотря на то, что содержа-
ние данного репринта было
тщательно проверено,
ни издатели, ни их партнеры,
не несут какой-либо ответ-
ственности или обязательств
за актуальность предоставлен-
ной информации, за любые
ошибки, пропуски или опечат-
ки в оригинальном тексте или
переводе, как и за любые
вызванные этим последствия.
Перед тем как предписывать
препарат, следует
ознакомиться с действующими
инструкциями по применению.

Русское издание и бесплатное
распространение репринта
статьи на территории
Российской Федерации
осуществляется при
спонсорской поддержке
ЗАО «Роттафарм»

Силибинин и родственные ему вещества — прямые ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса гепатита С

ABDELHAKIM AHMED-BELKACEM,^a NAZIM AHNOU,^a LAETITIA BARBOTTE,^a CZESLAW WYCHOWSKI,^b CORALIE PALLIER,^{a,c} ROZENN BRILLET,^a RALF-TORSTEN POHL,^d JEAN-MICHEL PAWLITSKY^{a,e}

^aResearch Team «Pathophysiology and Therapy of Chronic Viral Hepatitis», INSERM U955, Creteil, France; ^bInstitut de Biologie de Lille (CNRS UMR8161), Université de Lille I and II and Institut Pasteur de Lille, Lille, France; ^cDepartment of Virology, Hopital de Bicetre, Le Kremlin-Bicetre, France; ^dRottapharm/Madaus, Cologne, Germany; ^eNational Reference Center for Viral Hepatitis B, C and Delta, Department of Virology, Hopital Henri Mondor, Université Paris 12, Creteil, France

GASTROENTEROLOGY 2010;138:1112–1122

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ:
WWW.ELSEVIER.RU/GASTRO



АКТУАЛЬНОСТЬ И ЦЕЛИ. Стандартизированный силимарин представляет собой комплекс флавонолигнанов, выделенных из расторопши пятнистой. Стандартизированный силимарин содержит несколько молекул, включая силибинин А, силибинин В, изосилибинин А, изосилибинин В, силикристин и силидианин. Внутривенное введение силибинина вызывает дозозависимое снижение уровня РНК вируса гепатита С (HCV). Целью настоящего исследования было определить способность основных изомеров, содержащихся в препаратах стандартизированного силимарина, подавлять ферментативную активность HCV и его репликацию на различных моделях. **МЕТОДЫ.** Ингибирующая активность компонентов стандартизированного силимарина изучалась с помощью ферментного анализа РНК-зависимой РНК-полимеразы и NS3/4A-протеазы HCV. Кроме того, исследовалась их способность подавлять репликацию вируса на модели репликона HCV генотипа 1b и модели инфекционного штамма JFH1 в культуре клеток. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Силибинин А, силибинин В, водорастворимые дигидросукцинатные формы и Легалон® SIL (имеющийся на рынке препарат силибинина для в/в введения) подавляли активность РНК-зависимой РНК-полимеразы HCV с подавляющей концентрацией 50 %, что составляло приблизительно 75–100 мкмоль. Силибинин А и силибинин В также подавляли репликацию репликона HCV генотипа 1b и штамма JFH-1 генотипа 2a HCV в культуре клеток. Ни один из этих компонентов не подавлял протеазную активность HCV. **ВЫВОДЫ.** Силибинин А и силибинин В, а также Легалон® SIL подавляют репликацию штамма JFH1 и репликонов HCV в культуре клеток. Этот эффект, по крайней мере частично, объясняется способностью данных компонентов подавлять активность РНК-зависимой РНК-полимеразы HCV. Полученные результаты представляют основу для оптимизации и дальнейшей разработки препаратов — представителей семейства флавоноидов в качестве специфических противовирусных средств для лечения гепатита С.

Ключевые слова: вирус гепатита С, силибинин, ингибитор полимеразы, ферментный анализ.

ние основано на комбинации пегилированного интерферона (ИФН)-α и рибавирина, которая оказывает прямое подавляющее действие на репликацию HCV и обеспечивает постепенный клиренс инфицированных клеток с помощью сложных и лишь частично расшифрованных механизмов.^{2,3} Эрадикация инфекции после лечения ИФН-α и рибавирином происходит примерно у 80 % пациентов, инфицированных HCV генотипов 2 и 3. Однако при инфицировании HCV генотипов 1 и 4 этот показатель составляет менее 50 %.^{4,6}

Потребность в новых мощных противовирусных препаратах с хорошей переносимостью послужила стимулом к началу ряда программ, направленных на поиск новых лекарственных средств.⁷ Наиболее многообещающими в кратко- и среднесрочной перспективе считаются специфические ингибиторы ферментативной активности HCV. Через пару лет, скорее всего, на рынке появятся ингибиторы неструктурной сериновой протеазы 3/4A (NS3/4A).^{8–10} Также в стадии разработки находятся нуклеозидные, нуклеотидные и нунуклеозидные ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы HCV (RdRp).⁷

Включение ИФН-α и рибавирина в схему лечения хронического гепатита С было результатом эмпирического подхода.¹¹ Такой подход до сих пор используется при поиске новых лекарственных средств против гепатита С, и несколько препаратов в настоящее время уже проходит апробацию у больных гепатитом С, после того, как они были разработаны для лечения других состояний. Например, это касается ингибитора циклофилина DEBIO-025 (Debiopharm, Швейцария), изначально разработанного для лечения ВИЧ-инфекции,^{12,13} антипаразитарного препарата широкого спектра действия нитазоксанида (Romark Laboratories, США)¹⁴ и силибинина — компонента стандартизированного силимарина.

Стандартизированный силимарин представляет собой комплекс флавонолигнанов, выделенных из расторопши пятнистой (*Silybum marianum*), которая в течение многих лет приме-

Сокращения: DMSO — диметилсульфоксид; EC₅₀ — 50%-я эффективная концентрация; HCV — вирус гепатита С; HCVcc — инфекционные частицы HCV; IC₅₀ — 50-я ингибирующая концентрация; NS3/4A — неструктурный 3/4A; RdRp — РНК-зависимая РНК-полимераза; ИФН — интерферон; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота.

© 2010 AGA Institute

0016-5085/10/\$36.00

doi:10.1053/j.gastro.2009.11.053

В настоящее время вирусом гепатита С (HCV) инфицировано приблизительно 170 млн человек. Хроническая HCV-инфекция приводит к развитию цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы и служит причиной более 300 000 летальных исходов в год. Существующее в настоящее время лече-

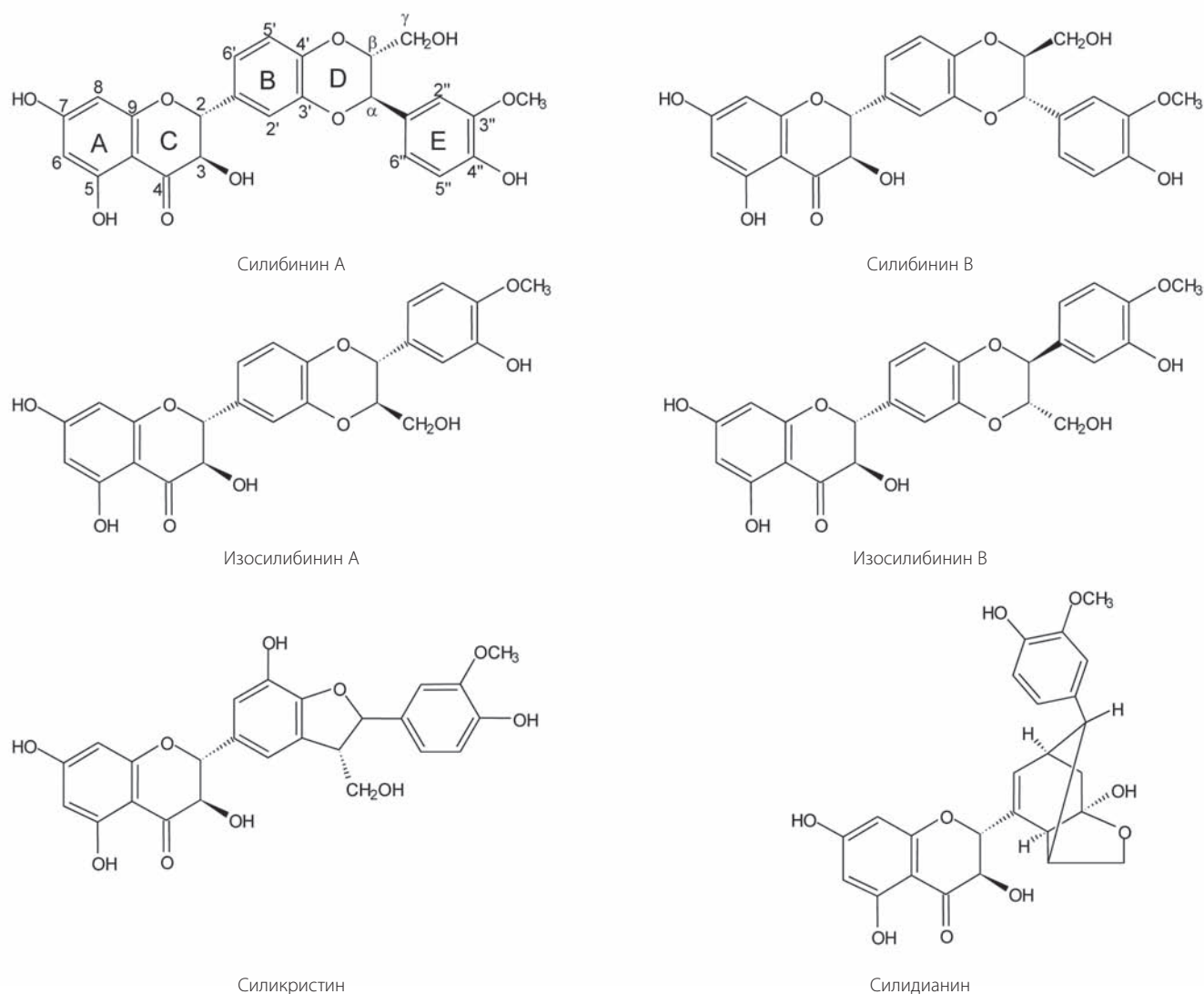


Рис. 1. Химические формулы шести основных активных компонентов стандартизированного силимарина, изучаемых в настоящем исследовании: силибинин А, силибинин В, изосилибинин А, изосилибинин В, силикристин и силидианин

нялась в качестве гепатопротектора. К основным компонентам стандартизированного силимарина относятся диастереоизомеры силибинин А и силибинин В в примерном соотношении 1:1, диастереоизомеры изосилибинин А и изосилибинин В, силикристин и силидианин (рис. 1). Эти термины используются в Европейской фармакопее и представляют собой непатентованные наименования фармакологических веществ, рекомендованные Всемирной организацией здравоохранения. В фармакопее США и в некоторых публикациях используются следующие названия для тех же соединений соответственно: силибин А, силибин В, изосилибин А, изосилибин В и силикристин. Имеются также следы (< 5 %) нескольких других веществ, таких как изосиликристин, дегидросилибинин, таксифолин, кверцетин и дезоксипроизводные (включая силандрин, изосиландрин, силимонин, силигермин и др.).¹⁵⁻¹⁷ Вместе силибины А и В составляют 50–60 % всех компонентов стандартизированного силимарина. Недавно Polyak et al.¹⁸ установили, что стандартизированный силимарин подавляет репликацию JFH1, инфекционного штамма HCV генотипа 2a, в культуре клеток гепатомы. Наблюдаемый противовирусный

эффект был отнесен частично за счет активации силимарином внутриклеточных ИФН-индуцированных путей и частично за счет активации им ИФН-независимых путей.¹⁸

Легалон® SIL (Madaus GmbH, Германия) — лекарственная форма для в/в введения, которая представляет собой смесь силибинина А и силибинина В в виде водорастворимых форм дигидросукцината в соотношении примерно 1:1. На сегодня этот препарат назначается во многих странах при отравлениях бледной поганкой (*Amanita phalloides*) в качестве специфического антидота.¹⁹ В недавно проведенном исследовании Ferenci et al.²⁰ использовали повышенные концентрации Легалона® SIL для лечения больных, у которых применение комбинации ИФН-α и рибавирина оказалось неэффективным. Авторы наблюдали статистически значимое дозозависимое снижение уровня РНК HCV на фоне лечения, после прекращения которого в некоторых случаях отмечены рецидивы.²⁰

В настоящем исследовании основные флавонолигнаны, содержащиеся в препаратах стандартизированного силимарина, включая силибинин А, силибинин В, дигидросукцинатные двунариевые формы, изосилибинин А, изосилибинин В, си-

ликристин, силидианин и Легалон® SIL, изучались на предмет их способности оказывать прямое подавляющее действие на активность RdRp и NS3/4A-протеазы в бесклеточном ферментном анализе. Их противовирусные свойства оценивали на клеточных моделях, включавших субгеномный репликон HCV генотипа 1b и модель инфекционного штамма HCV JFH1 в клеточных линиях Huh7.

Материалы и методы

Получение изомеров компонентов стандартизированного силимарина, их дигидросукцинатных форм

Основные 6 флавонолигнанов (силибинин А, силибинин В, изосилибинин А, изосилибинин В, силикристин и силидианин), их дигидродинатриевые сукцинатные формы, смесь в равном количестве силибининов А и В, смесь их дигидросукцинатных форм (водорастворимых форм, используемых в медицинских препаратах), а также официальный препарат Легалон® SIL (смесь дигидродинатриевых сукцинатных форм силибининов А и В) были предоставлены компанией Madaus GmbH (Германия). Все вещества были выделены из стандартизированного экстракта расторопши пятнистой с помощью органических растворителей. Степень очистки выделенных веществ по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии превысила 98 %. Затем они переводились в водорастворимые дигидродинатриевые сукцинатные формы. Вещества растворяли в базовом растворе диметилсульфоксида (DMSO) 100 ммоль и сохраняли при температуре -20°C . Непосредственно перед экспериментом выполняли серийные разведения таким образом, чтобы окончательная концентрация DMSO во всех реакциях составляла 2 % для бесклеточных анализов и модели инфекционного штамма JFH1 и 1 % для опытов с репликаонами.

Другие соединения

Ненуклеозидный ингибитор RdRp HCV, производное бензимидазола — JT-16²¹ и α -кетоамидный ингибитор HCV NS3/4A-протеазы — телпревир²² предоставлены командой Virgil-DrugPharm Европейской сети по контролю за вирусной резистентностью (VIRGIL).

Экспрессия и очистка рекомбинантной NS5B Δ 21 RdRp

RdRp HCV (неструктурный белок 5B [NSSB]), полученная из референтного штамма J4 генотипа 1b,²³ у которой была удалена 21 аминокислота С-терминального домена для обеспечения ее растворимости (NS5B Δ 21) и которая содержала метку гексагистидина (His-Tag) в области N-терминального домена, была экспрессирована в *Escherichia coli* C41(DE3) и очищена. Культуры выращивали при температуре 37°C приблизительно в течение часа до достижения оптической плотности 0,6 при длине волны 600 нм. Затем добавляли 1 ммоль изопропил- β -D-тиогаалактозида и выдерживали смесь в течение 4 ч при 37°C . Далее клеточный дебрис перерастворялся в растворе лизирующего буфера, содержавшем 50 ммоль NaH_2PO_4 (pH 8,0), 300 ммоль NaCl, 0,1% Тритон X100, 0,525 мг/мл лизоцима, 0,1 ЕД/мкл дезоксирибонуклеазы и таблетки Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science, Германия; 1 таблетка на 10 процедур очистки).

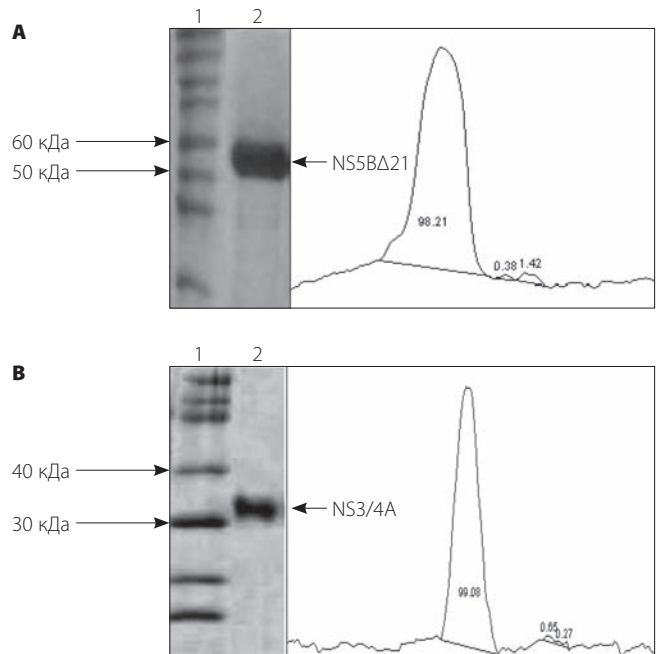


Рис. 2. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия: (А) очищенный NS5B Δ 21, (В) очищенная NS3/4A-протеаза (слева) и соответствующие денситометрические графики (справа), созданные с помощью программы ImageJ. Степень очистки в обоих случаях превысила 98 %

После воздействия ультразвуком клеточные лизаты очищали с помощью центрифугирования со скоростью 10 000 об./мин в течение 45 мин при температуре 4°C . Хроматография проводилась на колонке Ni-NTA (Qiagen, США). Для промывания колонок использовали буферный раствор, содержащий 50 ммоль NaH_2PO_4 (pH 8,0), 500 ммоль NaCl и 250 ммоль имидазола. Фракции, обогащенные NS5B Δ 21, выделяли с помощью колориметрического анализа по Брадфорду, а степень очистки определяли с помощью электрофореза в окрашенном красителем Coomassie полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Очищенные фракции RdRp объединяли и подвергали диализу против буфера, содержавшего 5 ммоль Tris (pH 7,5), 0,2 моль ацетата натрия, 1 ммоль дитиотреитола, 1 ммоль ЭДТА и 10% глицерин. Как показано на рис. 2, А, степень очистки NS5B Δ 21 составила более 98 %.

Для оценки влияния аминокислотных замен, обеспечивающих устойчивость к другим специфическим ингибиторам RdRp HCV, был проведен направленный мутагенез с помощью набора Quick Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, США). Изучались следующие замены: S282T, M423T, N316Y, H95Q и P495L. Структуру ферментов верифицировали с помощью секвенирования ДНК, соответствующие белки подвергали очистке, как было описано выше.

Ферментный анализ RdRp

Для оценки активности RdRp (NS5B Δ 21) и степени ее подавления был разработан ферментный анализ. Этот анализ основан на измерении количества двухцепочечной РНК, синтезированной в присутствии NS5B Δ 21, гомополимерной матричной РНК (Poly U, GE Healthcare, Великобритания) и аденозинтрифосфата, с помощью интеркалирующего агента (SYBR Green, Applied Biosystems, США). Анализ активности

Таблица 1. Ингибирующее действие различных компонентов стандартизированного силимарина на активность RdRp HCV в ферментном анализе, на репликацию HCV в модели репликона генотипа 1b и в инфекционной модели JFH1 в клетках Huh7

Вещество	Ферментный анализ NS5BΔ21 RdRp HCV, IC ₅₀ , мкмоль	Репликон генотипа 1b, EC ₅₀ , мкмоль	JFH1 инфекционная модель, EC ₅₀ , мкмоль
Силибинин А	96,4 ± 15,9	0,4 ± 0,3	23,4 ± 7,5
Силибина А дигидросукцинат	93,2 ± 18,3	НО	НО
Силибинин В	97,2 ± 24,1	1,0 ± 0,6	39,3 ± 12,5
Силибина В дигидросукцинат	99,3 ± 28,9	НО	НО
Силибинин А + силибинин В	82,0 ± 22,3	0,5 ± 0,2	25,4 ± 6,7
Силибина А дигидросукцинат + силибина В дигидросукцинат	64,5 ± 14,4	НО	НО
Легалон® SIL	74,5 ± 5,5	0,6 ± 0,2	16,8 ± 10,2
Изосилибинин А	211,6 ± 34,9	1,5 ± 0,5	45,8 ± 5,5
Изосилибинин В	165,5 ± 17,4	1,3 ± 0,2	20,9 ± 6,6
Силикрестин	> 500	> 100	> 100
Силидианин	> 500	> 100	> 100
ЛТ-16 (бензимидазол)	2,0 ± 0,9	5,2 ± 1,7	5,3 ± 0,3

НО — не определяли.

HCV RdRp проводился при комнатной температуре на 96-луночной пластине микротитратора в 200 мкл реакционной смеси, содержащей 20 ммоль HEPES (pH 7,3), 5 ммоль MnCl₂, 0,02 ЕД/мл ингибитора рибонуклеаз RNAsin, 50 мгк/л polyU, 2 ммоль аденозинтрифосфата, 10 ммоль дитиотреитола, 60 ммоль NaCl, 18,9 мкг/мл альбумина бычьей сыворотки и 0,135 мг/мл очищенного NS5BΔ21. Динамический диапазон ферментного анализа охватывает концентрации рекомбинантного белка от 8 до 0,005 мкмоль (данные не приводятся). Анализ специфичен, поскольку теллапревир, мощный ингибитор NS3/4A-протеазы HCV, не оказывает подавляющего действия вплоть до концентрации 200 мкмоль.

Активность RdRp в присутствии возрастающих концентраций изучаемых веществ оценивалась относительно контрольной реакции (в отсутствие ингибитора). Ингибирующие 50%-е концентрации (IC₅₀), т. е. концентрации веществ, способные подавлять активность RdRp на 50 %, вычисляли с помощью стандартных кривых, построенных с помощью уравнения логистической регрессии с 4 параметрами. При расчетах использовали статистические программы Sigma Plot 10 (Systat Software, США). В работе представлены средние значения трех независимых экспериментов, каждый из которых проводился дважды.

Экспрессия и очистка рекомбинантной NS3/4A-протеазы

Фрагмент ДНК, кодирующий участок от Ala1 до Ser181 домена протеазы NS3, получали путем ПЦР-амплификации из сыворотки крови больного, инфицированного HCV генотипа 1b (учетный номер в базе данных GenBank AM 423173). Последовательность 1–181 протеазы NS3 присоединялась к ее кофактору NS4A (участок 21–32) с помощью линкера Gly-Ser-Gly-Ser, как было описано ранее.²⁴ Полученную в результате слияния последовательность NS3/4A-протеазы вставляли в вектор pET-21a для дальнейшей экспрессии в штамме *Escherichia coli* C41(DE3) полностью активированной рекомбинантной одноцепочечной протеазы HCV с гексагистидиновой меткой в С-терминальном домене. Для этого единичную колонию только что трансформированных клеток выращивали при температуре 37 °С до достижения оптиче-

ской плотности культуры 0,6 при длине волны 600 нм. Затем культуру подвергали воздействию 0,5 ммоль изопропил-β-D-тиогалактозида в течение 4 ч при 37 °С. Все стадии очистки проводились при температуре 4 °С. Лизис клеточного дебриса осуществляли в 10 мл лизирующего буфера, содержащего 50 ммоль HEPES (pH 8,0), 300 ммоль NaCl, 0,1 % п-октил-β-D-глюкопиранозида, 5 ммоль β-меркаптоэтанола, 10 % глицерина, 1 мг/мл лизоцима, 0,1 ЕД/мкл дезоксирибонуклеазы I и таблетки Complete Protease Inhibitor Cocktail с 5 ммоль имидазола. Обработанный ультразвуком клеточный лизат подвергался очистке путем центрифугирования с частотой 16 000 об./мин в течение 30 мин. Хроматография проводилась на колонке Ni-NTA. Для промывания колонок использовали буферный раствор (в количестве 30 объемов колонки), содержащий 50 ммоль HEPES (pH 8,0), 300 ммоль NaCl, 0,1 % п-октил-β-D-глюкопиранозида, 5 ммоль β-меркаптоэтанола, 10 % глицерина и таблетки Complete Protease Inhibitor Cocktail с 5 ммоль имидазола. Элюирование связанных белков проводили во фракциях по 1 мл того же буферного раствора, содержащего 250 ммоль имидазола. Очищенные фракции рекомбинантной NS3-протеазы объединяли и подвергали диализу в течение ночи при температуре 4 °С против буфера, содержащего 5 ммоль Tris (pH 7,5), 200 ммоль натрия ацетата, 1 ммоль дитиотреитола, 1 ммоль ЭДТА и 10 % глицерина, и хранили при температуре –80 °С. Как показано на рис. 2, В, степень очистки NS3/4A-протеазы составила более 98 %.

Ферментный анализ NS3/4A-протеазы

Ферментный анализ NS3/4A-протеазы, основанный на резонансном переносе энергии флюоресценции, проводили на 96-луночных микротитрационных пластинах. Для анализа использовался флюорогенный депсипептид, находящийся в «потушенном» состоянии, RET-S1 (DABCYL, Anaspec Inc., США). Активность NS3-протеазы измеряли согласно рекомендациям производителя с небольшими модификациями. В частности, очищенную NS3-протеазу предварительно инкубировали с возрастающими концентрациями изучаемых веществ в растворе, содержащем 50 ммоль HEPES (pH 7,8), 100 ммоль NaCl, 20 % глицерина, 5 ммоль дитиотреитола, при температуре 30 °С в течение 60 мин. Реакцию начинали

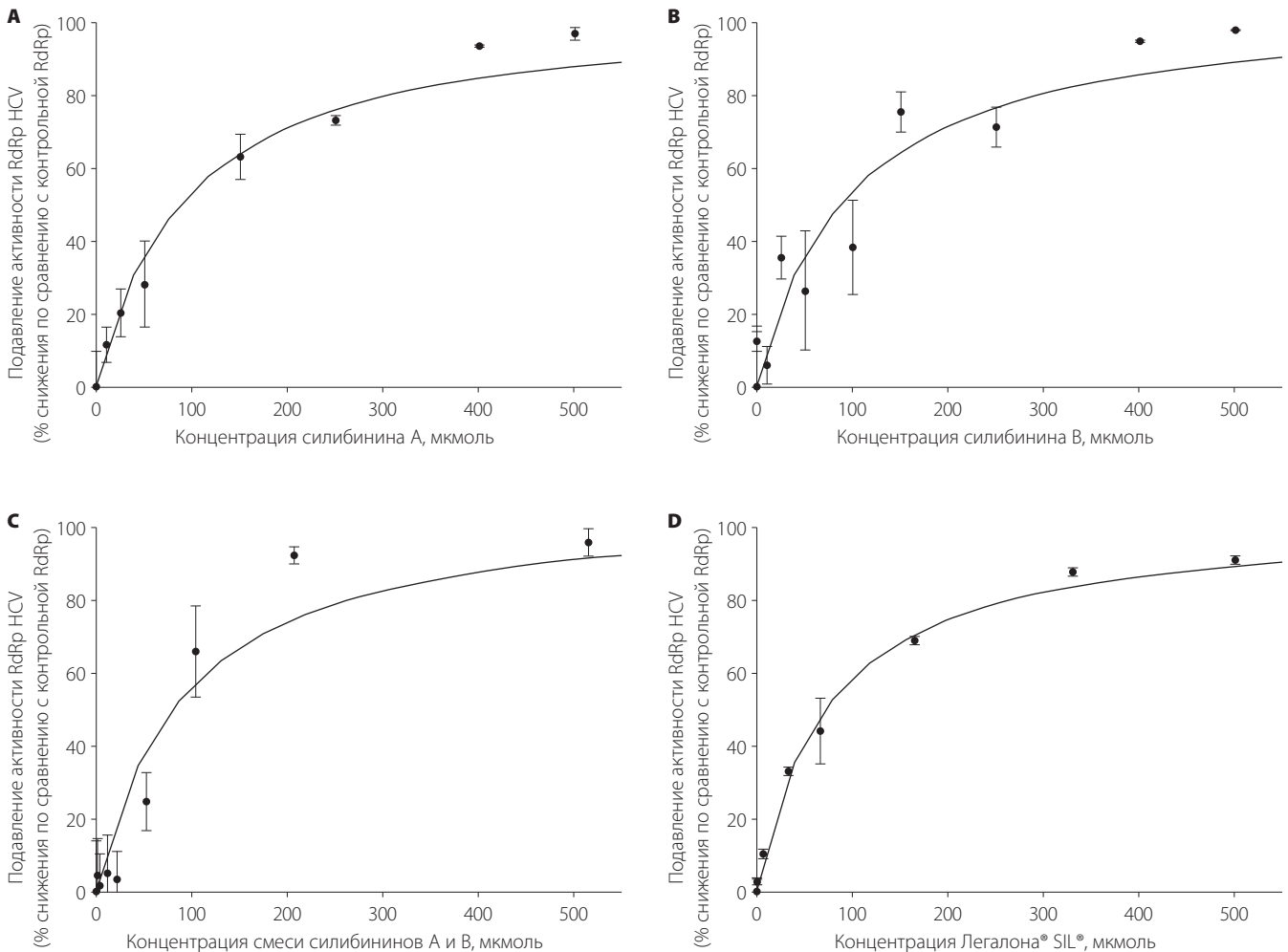


Рис. 3. Подавление активности РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) HCV силибинином А (А), силибинином В (В), смесью силибининов А и В (С) и Легалоном® SIL (D) в ферментном анализе, основанном на образовании двухцепочечной РНК в присутствии NS5BΔ21. Подавление RdRp представлено как процентное снижение ее активности с повышением концентрации изучаемых веществ по сравнению с необработанным контрольным анализом

в общем объеме 100 мкл путем добавления 5 мкмоль RET-S1. Затем смесь инкубировали при 30 °С в течение 20 мин. Процесс высвобождения продуктов протеолиза отслеживался (возбуждение при 360 нм, эмиссия при 500 нм) с помощью устройства Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Германия). Динамический диапазон анализа, по данным производителя, составляет от 8,3 до 0,5 пмоль. Анализ специфичен, поскольку у JТ-16, мощного ингибитора RdRp HCV, отсутствует подавляющий эффект на NS3/4А-протеазу при концентрациях вплоть до 50 мкмоль. Количественный показатель активности протеазы в присутствии изучаемых веществ определяли по отношению к контрольной реакции (отсутствие ингибитора). Показатели IC₅₀ вычисляли с помощью стандартных кривых по оси, отражающей концентрацию вещества. При этом применялось уравнение логистической регрессии с 4 параметрами. При расчетах использовали статистические программы Sigma Plot 10. В работе представлены средние значения трех независимых экспериментов, каждый из которых проводился дважды.

Оценка противовирусной активности на модели репликона

Бицистронный репликон генотипа 1b I389-neo/NS3-3'/5.1 был любезно предоставлен д-ром Ralf Bartenschlager (Гейдельбергский университет, Германия). Трансфицированные клетки Huh7 были выращены в среде Eagle в модификации Dulbecco (Invitrogen, США) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки, 50 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 0,1 мкг/мл фунгизона и 600 мкг/мл Генетина (G418; Invitrogen).

Клетки, несущие репликон HCV, сеяли на 96-луночные пластины с низкой плотностью 5000 клеток на 1 лунку. Далее к клеткам добавляли возрастающие концентрации изучаемых веществ в среде Eagle в модификации Dulbecco с 10 % фетальной бычьей сыворотки и 1 % DMSO без G418, после чего их культивировали в течение 3 дней. Выделение полной РНК проводилось с использованием набора RNeasy 96 (Qiagen). Уровень РНК HCV определяли с помощью количественной ПЦР в реальном времени по методу

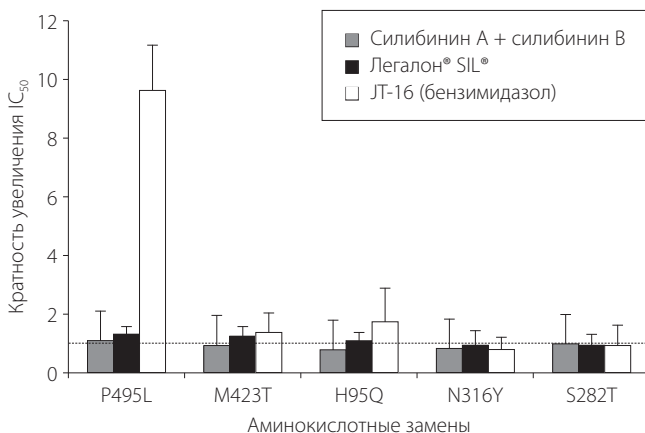


Рис. 4. Влияние аминокислотных замен, обеспечивающих резистентность к специфическим нуклеозидным и нуклеозидным ингибиторам РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) HCV, на ингибирующий эффект смеси силибининов А и В (серые столбики) и Легалона® SIL (черные столбики) в отношении RdRp в ферментном анализе. Изучены следующие замены: P495L (обеспечивает резистентность к бензимидазолам, «thumb-fingertips inhibitors»), M423T (резистентность к тиопенам, «thumb inhibitors»), H95Q (резистентность к бензотиадиазинам, «palm inhibitors»), N316Y (резистентность к бензофуранам, «R200 hinge inhibitors») и S282T (резистентность к 2'-метилнуклеозидам). Показана кратность увеличения 50%-х ингибирующих концентраций (IC_{50}). В качестве контроля использовался бензимидазол JT-16 (белые столбики)

Taqman с HCV-специфичными праймерами (смысловым 5'-CGCCCAAACCA-GAATACGA-3' и антисмысловым 5'-AGATAGTACACCCCTGT-TGCCAGATG-3') и зондом (5'-6-FAM-CAATGTGT-CAGTCGCG-TAMRA-3') на аппарате ABI 7003 (Applied Biosystems). Уровень РНК HCV измеряли с помощью спектрофотометра Nanodrop 1000 (Nanodrop Technologies, США). Результаты выражены в количестве гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Каждый результат представляет среднее значение из по крайней мере трех измерений в культуре клеток. Снижение уровня РНК HCV после лечения оценивалось путем сравнения ее уровня в клетках, к которым добавляли изучаемые вещества, и в контрольных клетках, к которым добавляли 1% раствор DMSO. 50%-е эффективные концентрации (EC_{50}), т. е. концентрации вещества, которые снижают уровень РНК репликонов HCV на 50 %, вычисляли для каждого изучаемого вещества методом подбора кривой с 4 параметрами с использованием пакета программ Sigma Plot 10.

Кроме того, репликонсодержащие клеточные лизаты Huh7 подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и обрабатывали моноклональными антителами anti-actin и anti-NSSB. Белки определяли путем иммуноблоттинга с помощью антител Goat Anti-Mouse IgG, конъюгированных с пероксидазой (Bio-Rad, Hercules, США).

Оценка противовирусной активности в инфекционной модели JFH1 в культуре клеток

Для создания инфекционных частиц HCV (HCVcc) в культуре клеток Huh7 использовалась плаزمид рJFH1, содержащая всю кДНК изолята JFH1 вируса генотипа 2a и ген люциферазы Renilla, как было описано ранее.²⁵ Клетки Huh7 сеяли на 24-луночные пластины с плотностью 30 000–

50 000 клеток на 1 лунку и через 24 ч инфицировали 200 мкл HCVcc в течение 2 ч при температуре 37 °С. После инкубации надосадочную жидкость удаляли и JFH1-инфицированные клетки промывали в свежей среде. Затем к среде, содержащей 2 % DMSO, добавляли изучаемые вещества в порядке увеличения концентрации и клетки снова инкубировали при 37 °С. Через 44 ч после инфицирования клетки однократно промывали физиологическим раствором с фосфатным буфером Dulbecco и в каждую лунку добавляли 100 мкл лизирующего буфера Renilla (Promega, США). Замороженные образцы все вместе размораживали для чтения, 20 мкл смешивали с люциферазой согласно рекомендациям производителя (Promega). Активность люциферазы измеряли в течение 10 с с помощью люцинометра.

Оценка цитотоксичности изучаемых веществ

Клетки Huh7 и HEK293 сеяли с плотностью 2000 и 1000 клеток на 1 лунку соответственно, на 96-луночные микротитрационные пластины в среду Eagle в модификации Dulbecco с 10 % фетальной бычьей сыворотки. Через 24 ч добавляли изучаемые вещества в серийных разведениях. Клетки размножались в течение 3 дней при температуре 37 °С. Затем жизнеспособность клеток оценивали с помощью колориметрического метода с 3-(4,5-диметилазизол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиума бромидом.²⁶ 50%-е цитостатические концентрации, определяемые как концентрации вещества, подавляющие пролиферацию экспоненциально растущих клеток на 50 %, вычисляли с помощью логистического уравнения с 4 параметрами с использованием пакета прикладных программ Sigma Plot 10. Каждый показатель был результатом трех экспериментов, каждый из которых был проведен 4 раза.

Результаты

Компоненты стандартизированного силимарина оказывают прямое подавляющее действие на NSSB RdRp HCV в ферментном анализе

Нами был разработан ферментный анализ *in vitro*, основанный на феномене образования двухцепочечной РНК в присутствии NSSBΔ21. Этот анализ использовался для оценки способности следующих компонентов стандартизированного силимарина подавлять RdRp HCV: силибинины А и В, их водорастворимые дигидросукцинатные формы, изо-силибинины А и В, силикристины, силидианин, смесь силибининов А и В, смесь их дигидросукцинатных форм, а также раствор Легалона® SIL. В качестве отрицательного контроля использовался мутантный фермент NSSBΔ21 со сниженной каталитической активностью (NSSBΔ21-D318A), у которого аспарат в каталитическом центре в положении 318 заменен на аланин. Положительным контролем служил бензимидазол JT-16, специфический нуклеозидный ингибитор RdRp HCV. Как следует из табл. 1, показатель IC_{50} у JT-16 в нашем анализе был равен $2,0 \pm 0,9$ мкмоль. Силибинины А и В, смесь силибининов А и В и раствор Легалона® SIL оказывали подавляющее действие на NSSBΔ21 HCV, выраженность которого зависела от концентрации вещества (рис. 3; см. табл. 1). Их IC_{50} были практически одинаковыми (диапазон от $74,5 \pm 5,5$ до $97,2 \pm 24,1$ мкмоль). Инулин, вспомогательное вещество, содержащееся в препарате Легалон® SIL, не оказывал никакого влияния на RdRp HCV (данные не приводятся). Изосилиби-

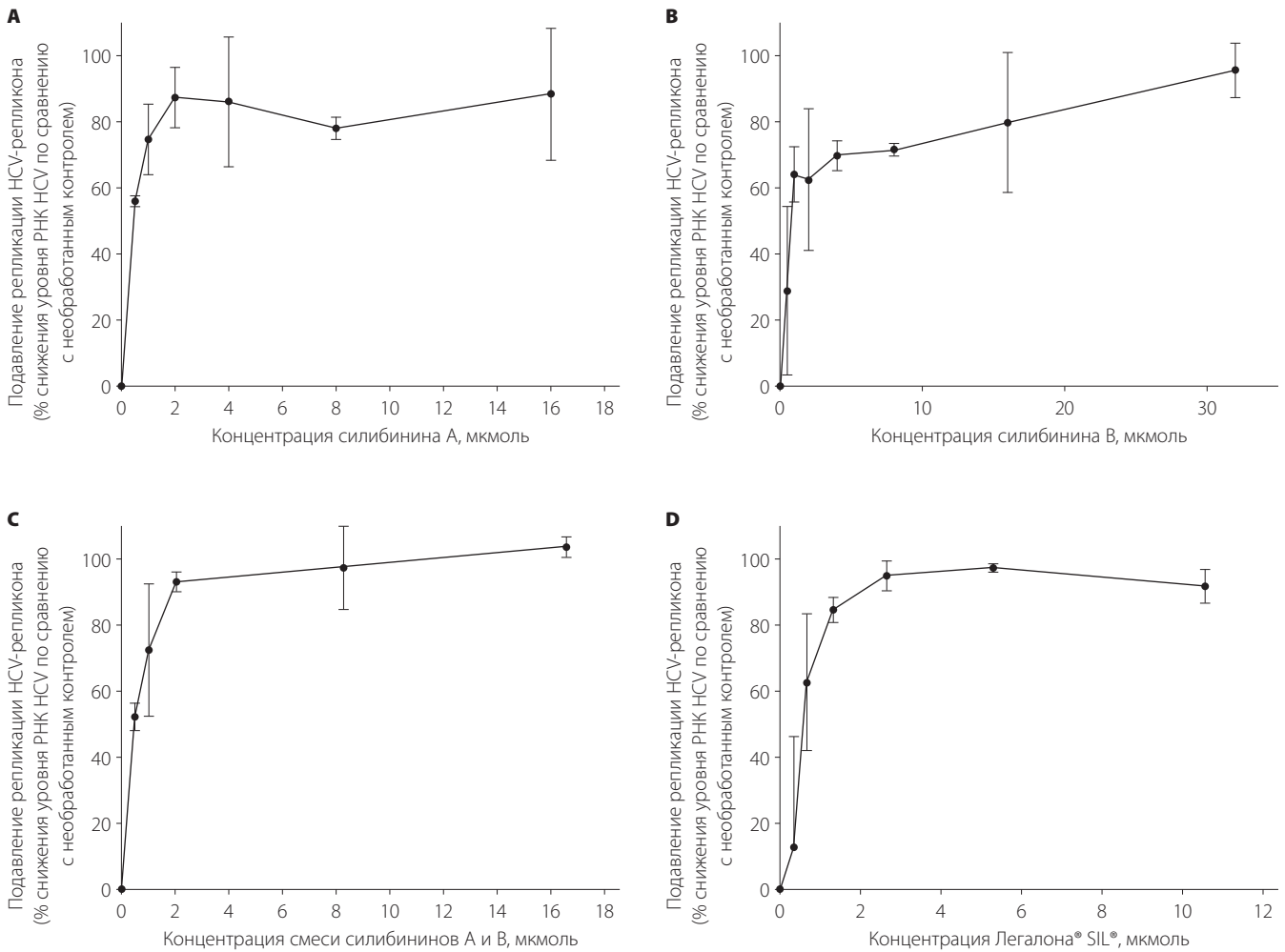


Рис. 5. Подавление репликации репликона HCV генотипа 1b в культурах клеток Huh7 силибинином А (А), силибинином В (В), смесью силибининов А и В (С), Легалоном® SIL (D). Подавление репликации представлено как процентное снижение уровня РНК HCV при повышении концентрации изучаемых веществ по сравнению с контролем

нины А и В также угнетали NSSBΔ21 HCV в зависимости от их концентрации, но их действие было в 2–3 раза слабее, чем у силибининов А и В, смеси силибининов А и В и раствора Легалона® SIL. Напротив, ни силикристин, ни силидианин не оказывали ингибирующего действия на RdRp HCV вплоть до максимальной концентрации 500 мкмоль (см. табл. 1). DMSO в концентрациях, используемых в нашем анализе, не оказывал самостоятельного влияния на активность RdRp (данные не приводятся).

Замены аминокислот, которые обеспечивают резистентность к специфическим ингибиторам RdRp, не влияют на угнетение активности RdRp HCV компонентами стандартизированного силимарина

В последовательности NSSBΔ21, использовавшейся в нашем анализе, с помощью сайт-направленного мутагенеза были проведены замены аминокислот, которые обеспечивают резистентность к различным группам специфических нуклеозидных и нунуклеозидных ингибиторов RdRp HCV. Эти замены включали S282T, M423T, N316Y, H95Q, P495L,

которые определяют резистентность к 2'-метилнуклеозидам, тиофенам («thumb inhibitors»), бензофуранам («R200 hinge inhibitor»; дикий тип фермента, использовавшийся в нашем анализе, содержал аспарагин [N] в положении 316), бензотиадиазинам («palm inhibitors») и бензимидазолам («thumb-fingertips inhibitors») соответственно. Как показано на рис. 4, ни одна из указанных замен не влияла на угнетение активности RdRp силибинином и Легалоном® SIL. Напротив, чувствительность RdRp к JТ-16 при наличии замены P495L значительно снижалась.

Компоненты стандартизированного силимарина не оказывают угнетающего влияния на NS3/4A-протеазу HCV в ферментном анализе

Для оценки угнетающего эффекта тех же компонентов стандартизированного силимарина на NS3/4A-протеазу нами использовался анализ, основанный на резонансном переносе энергии флюоресценции. Показатель IC₅₀ теллапревира, мощного кетоамидного ингибитора NS3/4A-протеазы, был в настоящем анализе равен 0,6 ± 0,2 мкмоль. Ни один из из-

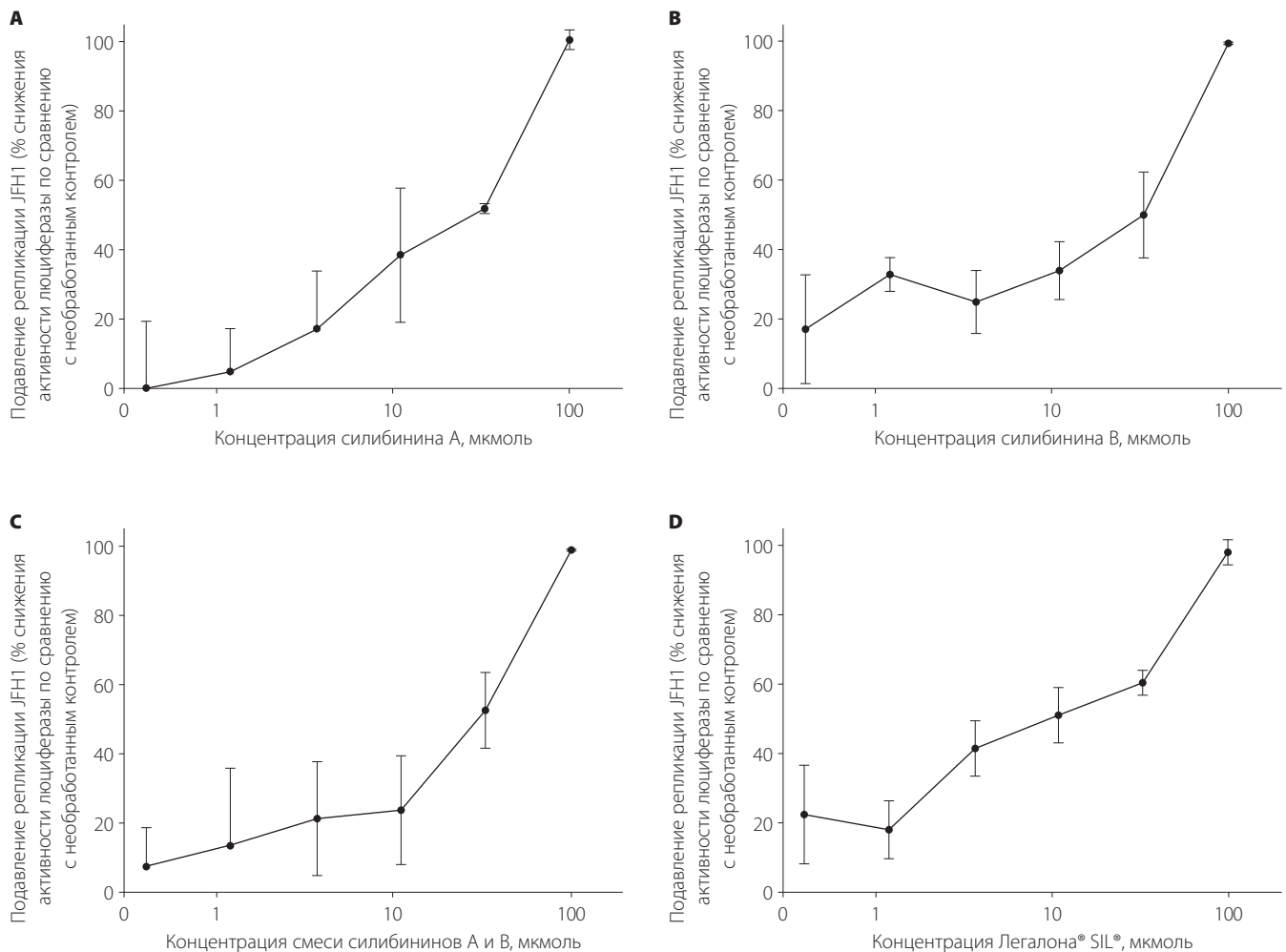


Рис. 6. Подавление репликации JFH1 в культуре клеток Huh7 силибинином А (А), силибинином В (В), смесью силибининов А и В (С), Легалона® SIL (D). Подавление репликации JFH1 представлено как процентное снижение активности люциферазы при повышении концентрации изучаемых веществ по сравнению с контролем

учаемых компонентов стандартизированного силимарина не оказывал угнетающего действия на NS3/4A-протеазу вплоть до концентрации 200 мкмоль (данные не приводятся). DMSO в концентрациях, применявшихся в настоящем исследовании, не оказывал влияния на активность NS3/4A-протеазы.

Компоненты стандартизированного силимарина подавляют репликацию репликона HCV генотипа 1b в клетках Huh7

Для оценки противовирусной активности компонентов стандартизированного силимарина, которые угнетают активность RdRp в репликативной модели HCV *in cellulo*, использовались клетки Huh7, содержащие субгеномный репликон HCV генотипа 1b.²⁷ Эти клетки обрабатывали силибинами А и В, смесью силибининов А и В, раствором Легалона® SIL, изосилибинами А и В, силидианином и силикристином в порядке возрастания их концентраций. Как показано на рис. 5 и в табл. 1, силибины А и В, смесь силибининов А и В, Легалон® SIL, изосилибины А и В подавляли репликацию репликона, причем выраженность их действия зависела от дозы вещества. Показатели EC_{50} находились на микромоляр-

ном уровне, т. е. примерно в 100 раз ниже, чем их IC_{50} в RdRp-ферментном анализе (см. табл. 1). Эти показатели EC_{50} были того же порядка, что и у телапревира, мощного ингибитора NS3/4A-протеазы HCV, в той же модели (0,5 ± 0,3 мкмоль). Результаты иммуноблоттинга показали одновременное подавляющее действие силибининов А и В в составе смеси на экспрессию этого белка HCV (данные не приводятся). В данной модели у силибинина А действие было немного сильнее, чем у силибинина В, изосилибининов А и В. У силикристина и силидианина в данной модели не было выявлено противовирусного эффекта вплоть до концентрации 100 мкмоль (см. табл. 1).

Компоненты стандартизированного силимарина подавляют репликацию JFH1 в клетках Huh7

Противовирусная активность компонентов стандартизированного силимарина оценивалась на инфекционной модели JFH1 HCV генотипа 2a, описанной ранее.^{25,28,29} Для этого действие силибининов А и В, смеси силибининов А и В, Легалона® SIL, изосилибининов А и В, силидианина и сили-

Таблица 2. Исследование цитотоксичности

Вещество	CC ₅₀ , мкмоль		
	Обработанные репликонсодержащие		
	Клетки Huh7	Клетки Huh7	Клетки HEK293
Силибинин А + силибинин В	> 200	> 200	183 ± 28
Легалон® SIL	> 300	> 300	> 300
Изосилибинин А	> 100	НО	> 100
Изосилибинин В	168 ± 5	НО	92 ± 3
Силидианин	> 250	НО	> 250
Силикристин	> 200	НО	> 200

ПРИМЕЧАНИЕ. Показаны 50%-е цитотоксические концентрации (CC₅₀), определяемые как концентрации, подавляющие пролиферацию экспоненциально растущих клеток Huh7, обработанных репликонсодержащих клеток Huh7 и клеток HEK293 на 50 % по сравнению с необработанными клетками. Каждый показатель — результат трех экспериментов, каждый из которых был проведен 4 раза.

НО — не определяли.

кристина оценивали в порядке возрастания концентраций. Как показано на рис. 6, силибинины А и В, смесь силибининов А и В, Легалон® SIL, изосилибинины А и В подавляли репликацию JFH1, причем выраженность их действия зависела от дозы вещества. Показатели EC₅₀ были приблизительно на 1 лог выше, чем при исследовании этих же веществ в модели репликона (см. табл. 1). У силикристина и силидианина в этой модели не было обнаружено противовирусной активности вплоть до концентрации 100 мкмоль (см. табл. 1).

Компоненты стандартизированного силимарина в ингибирующих концентрациях не оказывают цитотоксического действия

Согласно данным табл. 2, 50%-е цитотоксические концентрации изучаемых компонентов стандартизированного силимарина в клетках Huh7, обработанных ИФН-а репликонсодержащих клетках Huh7 и клетках HEK293 во всех случаях намного превышали их EC₅₀ в моделях репликона и JFH1. Это свидетельствует о том, что изучаемые компоненты в ингибирующих концентрациях не оказывают цитотоксического действия. Кроме того, был проведен анализ цитотоксичности смеси силибининов А и В и препарата Легалон® SIL в культурах с более высокой плотностью клеток, подобных используемым в анализе противовирусной активности. Полученные результаты аналогичны представленным в табл. 2 (данные не приводятся).

Обсуждение

Существующее в настоящее время лечение хронического гепатита С, которое включает применение пегилированного ИФН-а и рибавирина, приводит к эрадикации HCV генотипа 1, наиболее распространенного во всем мире генотипа вируса, только в 40–50 % случаев.^{5,6,20} Показатель терапевтических неудач аналогичен таковому при лечении HCV генотипа 4, распространенность которого повышается среди потребителей инъекционных наркотиков в развитых странах.^{30,31} В связи с этим разработка более эффективных ме-

тодов лечения HCV-инфекции — неотложная задача. Предложено несколько подходов, большинство из которых направлено на различные стадии жизненного цикла вируса, такие как процессинг полипротеина и репликация.⁷ Ferenci et al. недавно установили, что силибинин, основной компонент стандартизированного силимарина, обладает способностью в значительной степени снижать репликацию HCV на фоне стандартной комбинированной терапии.²⁰ Обоснованием для назначения силибина таким пациентам считается то, что индуцированный HCV окислительный стресс способствует развитию фиброза и канцерогенезу, а силибинин, как известно, является антиоксидантом. Противовирусное действие силибина было выявлено неожиданно. Силибинин оказался эффективным при назначении в/в в составе препарата Легалон® SIL, а его противовирусный эффект — дозозависимым. Обнаружено, что противовирусное действие силибина как минимум аддитивное, т. е. суммируется с эффектом ИФН-а и рибавирина при добавлении этих препаратов через неделю монотерапии силибинином. РНК HCV достигла неопределяемого уровня к 12-й неделе у 7 из 14 пациентов, получавших 15–20 мг/кг силибина в виде инфузий Легалона® SIL в течение 14 дней с последующим назначением только ИФН-а и рибавирина. Никаких изменений показателей окислительного стресса во время лечения не наблюдалось.²⁰

В другом исследовании Polyak et al. показали, что стандартизированный экстракт стандартизированного силимарина МК-001 тормозит заражение клеток Huh7 и Huh7.5.1. штаммом HCV JFH1.¹⁸ Этот эффект дозозависимый. Кроме того, он подавляет репликацию JFH1 в этих культурах клеток. Авторы предполагают, что наблюдаемые ими противовирусные свойства экстрактов расторопши пятнистой обусловлены, главным образом, клеточным эффектом, опосредованным частично за счет индукции фосфорилирования Stat1 (что приводит к активации внутриклеточных ИФН-индуцируемых сигнальных путей) и частично за счет ИФН-независимых механизмов.¹⁸

В настоящем исследовании показано, что силибинины А и В подавляют репликацию JFH1 в культуре клеток при EC₅₀ порядка 20–40 мкмоль. Кроме того, обнаружено, что силибинины А и В, изосилибинины А и В служат мощными ингибиторами репликации репликона HCV генотипа 1b в культуре клеток при EC₅₀ около 1 мкмоль. Учитывая, что наши исследования проводились на одинаковых клеточных культурах (Huh7), более выраженное действие компонентов силибина на репликон генотипа 1b по сравнению с генотипом 2a JFH1, по-видимому, обусловлено генетически.

Для объяснения противовирусного действия силибина и его компонентов на репликацию HCV можно выдвинуть два не исключаящих друг друга предположения: 1) компоненты силибина активируют клеточные противовирусные механизмы; 2) компоненты силибина оказывают прямое подавляющее действие на жизненные функции HCV. Первую гипотезу изучали в своей работе Polyak et al. Они получили данные, подтверждающие индукцию силибинином ИФН-зависимых и независимых клеточных сигнальных путей.¹⁸ В настоящем исследовании мы обратились ко второй гипотезе. Нами было изучено влияние компонентов стандартизированного силимарина и их водорастворимых форм на NS3/4A-протеазу и RdRp HCV с помощью ферментных анализов. Ни один из изучаемых компонентов не оказывал угнетающего действия на функцию NS3/4A-протеазы. С другой стороны, мы обнаружили, что силибинины А и В, их водорастворимые дигидросукцинатные формы и Легалон® SIL подавляли функцию RdRp при IC₅₀ порядка 75–100 мкмоль.

Изосилибинины А и В также оказывали угнетающее действие на RdRp HCV, но оно было чуть менее выраженным. Ни силикстин, ни силидианин не влияли на RdRp HCV. Эти данные согласуются с отсутствием у них противовирусного эффекта в моделях реплика и JFH1 в клетках Huh7.

Как показано на рис. 1, противовирусный эффект силибинина был более выраженным в культурах клеток, чем в RdRp-ферментном анализе. Это можно объяснить особенностями самого анализа или тем, что в ферментном анализе использовалась референтная последовательность генома 1b, а в других экспериментах — репликон. Однако, скорее всего, угнетение функции RdRp — лишь часть противовирусного действия компонентов силибинина, наблюдаемого *in vitro* в культурах клеток и *in vivo* у HCV-инфицированных пациентов. Клеточные эффекты силибинина также принимают участие в контроле вирусной репликации в инфицированных клетках.

Замены аминокислот, обеспечивающие резистентность к различным группам ингибиторов RdRp HCV, не снижали чувствительность к компонентам стандартизированного силимарина. Это позволяет предположить, что действие изучаемых веществ имеет разные точки приложения или разный механизм подавления вирусной активности. Дальнейшие исследования необходимы для выявления связанных с резистентностью аминокислотных замен в RdRp HCV, которые могут обозначить сайт-мишень для компонентов стандартизированного силимарина. Обнаружено, что другие представители семейства флавоноидов также служат мощными ингибиторами RdRp HCV (Ahmed-Belkacem et al., данные не опубликованы). Для улучшения ингибирующих свойств этих веществ требуется оптимизация их химического состава. Анализ химического состава различных компонентов стандартизированного силимарина, представленный на рис. 1, дает предварительное представление о структурах, которые могут обеспечивать ингибирующий эффект этих веществ на RdRp HCV. Обязательным представляется наличие интактного шестичленного кольца D, поскольку силидианин, имеющий в составе пятичленное кольцо D, не обладает активностью против RdRp. Более того, положение кольца E также может быть важным: ингибирующая активность у изосилибибинов А и В выражена меньше, чем у силибибинов А и В. Кольцо E у изомеров присоединяется к кольцу D в положении α , а не в положении β . Эта информация может оказаться важной для повышения противовирусной активности у представителей семейства флавоноидов.

Показано, что только очищенный силибинин для в/в введения эффективно влияет на репликацию HCV.²⁰ Необходима оценка практической пользы от его применения у HCV-инфицированных пациентов. Учитывая полученные в настоящем исследовании показатели IC_{50} , могут потребоваться относительно высокие дозы веществ для достижения выраженного противовирусного эффекта. *In vivo* в/в введение Легалона® SIL было связано с максимальной концентрацией силибинина в крови (C_{max}) — около 17 000 нг/мл, т. е. приблизительно 50 мкмоль (Madaus GmbH, данные не опубликованы). Указанные концентрации близки к IC_{50} , наблюдавшимся в нашем исследовании в ферментном анализе, и превышают показатели EC_{50} в моделях реплика и JFH1. Эти данные позволяют предположить, что прямое угнетение RdRp HCV служит тем механизмом, посредством которого силибинин сокращает репликацию HCV у инфицированных больных. В недавно проведенном исследовании обнаружено, что пероральное назначение высоких доз связано со стойкими пиковыми концентрациями силибибинов А и В в плазме, которые на

1–2 порядка ниже концентраций, вызывающих противовирусный эффект *in vitro*. При этом остаточные концентрации были примерно в 25 раз ниже пиковых, что, вероятно, объясняет отсутствие противовирусного эффекта стандартизированного силимарина *in vivo* при приеме внутрь.³² Для выявления группы пациентов, у которых будет эффективно одновременное применение силибинина и ИФН- α с рибавирином, необходимы дальнейшие исследования. Требуется также изучить использование силибинина в качестве терапии второй линии у пациентов, не ответивших на схему ИФН- α + рибавирин, а также у больных с тяжелым поражением печени, учитывая при этом необходимость в/в введения препарата.

Подводя итоги, отметим, что в настоящем исследовании было показано, что силибинин А и силибинин В, а также имеющийся на рынке препарат силибинина для в/в введения Легалон® SIL подавляют репликацию JFH1 и реплика HCV в культуре клеток. Этот эффект частично объясняется способностью изучаемых веществ угнетать RdRp HCV. Необходимы дальнейшие исследования для определения эффективности применения силибинина в комбинации с пегилированным ИФН- α и рибавирином у пациентов с недостаточным ответом на терапию. Полученные нами данные могут служить базой для оптимизации и последующей разработки специфических противовирусных препаратов на основе представителей семейства флавоноидов.

Литература

1. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S21–S29.
2. Pawlowsky JM. Mechanisms of antiviral treatment efficacy and failure in chronic hepatitis C. *Antiviral Res* 2003;59:1–11.
3. Chevaliez S, Pawlowsky JM. Interferons and their use in persistent viral infections. *Handb Exp Pharmacol* 2009;203–241.
4. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975–982.
5. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet* 2001;358:958–965.
6. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, et al. Peginterferon-alfa2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346–355.
7. Pawlowsky JM, Chevaliez S, McHutchison JG. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 2007;132:1979–1998.
8. Hezode C, Forestier N, Dusheiko G, et al. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2009;360:1839–1850.
9. McHutchison JG, Everson GT, Gordon SC, et al. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2009;360:1827–1838.
10. Kwo P, Lawitz E, McCone J, et al. HCV SPRINT-1 final results: SVR 24 from a phase 2 study of boceprevir plus PegIntron (peginterferon alfa-2b)/ribavirin in treatment-naive subjects with genotype 1 chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2009;50(Suppl):S4.
11. Pawlowsky JM. Therapy of hepatitis C: from empiricism to eradication. *Hepatology* 2006;43(Suppl):S207–220.
12. Flisiak R, Feinman SV, Jablkowski M, et al. The cyclophilin inhibitor Debio-025 combined with PEG IFN-alpha2a significantly re-

- duces viral load in treatment-naive hepatitis C patients. *Hepatology* 2009;49:1460–1468.
13. Flisiak R, Horban A, Gallay P, et al. The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus. *Hepatology* 2008;47:817–826.
 14. Rossignol JF, Elfert A, El-Gohary Y, et al. Improved virologic response in chronic hepatitis C genotype 4 treated with nizatxonide, peginterferon, and ribavirin. *Gastroenterology* 2009;136:856–862.
 15. Simanek V, Kren V, Ulrichova J, et al. Silymarin: what is in the name? An appeal for a change of editorial policy. *Hepatology* 2000;32:442–444.
 16. Gazak R, Walterova D, Kren V. Silybin and silymarin: new and emerging applications in medicine. *Curr Med Chem* 2007;14:315–338.
 17. Kroll DJ, Shaw HS, Oberlies NH. Milk thistle nomenclature: why it matters in cancer research and pharmacokinetic studies. *Integr Cancer Ther* 2007;6:110–119.
 18. Polyak SJ, Morishima C, Shuhart MC, et al. Inhibition of T-cell inflammatory cytokines, hepatocyte NF-kappaB signaling, and HCV infection by standardized silymarin. *Gastroenterology* 2007;132:1925–1936.
 19. Hruby K, Csomos G, Fuhrmann M, Thaler H. Chemotherapy of Amanita phalloides poisoning with intravenous silibinin. *Hum Toxicol* 1983;2:183–195.
 20. Ferenci P, Scherzer TM, Kerschner H, et al. Silibinin is a potent antiviral agent in patients with chronic hepatitis C not responding to pegylated interferon/ribavirin therapy. *Gastroenterology* 2008;135:1561–1567.
 21. Ishida T, Suzuki T, Hirashima S, et al. Benzimidazole inhibitors of hepatitis C virus NS5B polymerase: identification of 2-[(4-diaryl-methoxy)phenyl]-benzimidazole. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16:1859–1863.
 22. Summa V. VX-950 (Vertex/Mitsubishi). *Curr Opin Investig Drugs* 2005;6:831–837.
 23. Inchauspe G, Zebedee S, Lee DH, et al. Genomic structure of the human prototype strain H of hepatitis C virus: comparison with American and Japanese isolates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10292–10296.
 24. Taremi SS, Beyer B, Maher M, et al. Construction, expression, and characterization of a novel fully activated recombinant single-chain hepatitis C virus protease. *Protein Sci* 1998;7:2143–2149.
 25. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791–796.
 26. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
 27. Lohmann V, Korner F, Koch J, et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999;285:110–113.
 28. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:9294–9299.
 29. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005;309:623–626.
 30. Payan C, Roudot-Thoraval F, Marcellin P, et al. Changing of hepatitis C virus genotype patterns in France at the beginning of the third millenium: The GEMHEP GenoCII Study. *J Viral Hepat* 2005;12:405–413.
 31. Al Ashgar H, Helmy A, Khan MQ, et al. Predictors of sustained virological response to a 48-week course of pegylated interferon alpha-2a and ribavirin in patients infected with hepatitis C virus genotype 4. *Ann Saudi Med* 2009;29:4–14.
 32. Hawke RL, Schrieber SJ, Soule TA, et al. Silymarin ascending multiple oral dosing phase I study in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *J Clin Pharmacol* In press.

Получено 20 февраля 2009 г.; принято в печать 30 ноября 2009 г.

Конфликты интересов

Авторы заявили о следующем: д-р Pawlotsky является научным консультантом компании Rottapharm/Madaus, д-р Pohl — сотрудником компании Rottapharm/Madaus. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Спонсоры

Настоящее исследование — часть работы VIRGIL European Network of Excellence, посвященной резистентности противовирусных препаратов, которая проводится при поддержке гранта (LSHM-CT-2004-503359), полученного по программе Priority 1 «Life Sciences, Genomics and Biotechnology for Health» 6-й Рамочной программы научных исследований Евросоюза. А. А. получает стипендию от Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hepatites Virales (ANRS), N. А имеет контракт с этой организацией. L. В. получает стипендию от Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Очищенные компоненты стандартизированного силимарина, их дигидросукцинатные формы были предоставлены компанией Madaus GmbH (Rottapharm Group), Кельн, Германия.

Подавление силимарином пролиферации Т-лимфоцитов и образования цитокинов *in vitro* при гепатите С

CHIHIRO MORISHIMA,^a MARGARET C. SHUHART,^b CHIA C. WANG,^c DENISE M. PASCHAL,^a MINJUN C. APODACA,^a YANZE LIU,^d DEREK D. SLOAN,^{a,e} TYLER N. GRAF,^f NICHOLAS H. OBERLIES,^f DAVID Y.-W. LEE,^d KEITH R. JEROME,^{a,e} STEPHEN J. POLYAK^{a,g}

^aDivision of Virology, Department of Laboratory Medicine, University of Washington School of Medicine, Seattle; ^bDivision of Gastroenterology ^cDivision of Infectious Diseases, Department of Medicine, University of Washington School of Medicine, Seattle, Washington; ^dDepartment of Psychiatry, McLean General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts; ^eVaccine and Infectious Disease Institute, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington; ^fDepartment of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina Greensboro, Greensboro, North Carolina; ^gDepartment of Global Health, University of Washington School of Medicine, Seattle, Washington

GASTROENTEROLOGY 2010;138:671–681

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ:
WWW.ELSEVIER.RU/GASTRO



АКТУАЛЬНОСТЬ И ЦЕЛИ. Силимарин — экстракт семян расторопши пятнистой (*Silybum marianum*), который столетиями использовался для лечения хронических заболеваний печени. Хотя его терапевтическая эффективность не изучена, в США при гепатите С его применяют широко. Мы поставили цель исследовать *in vitro* влияние силимарина на некоторые механизмы иммунитета, возможно лежащие в основе его благоприятного действия при хроническом гепатите С. **МЕТОДЫ.** Исследование *in vitro* реакции на неспецифическую антигенную стимуляцию свежeweделенных мононуклеарных клеток периферической крови и Т-лимфоцитов у пациентов с гепатитом С и не страдающих этой инфекцией лиц в присутствии стандартного препарата силимарина (МК001) и без него. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Минимальное токсическое действие МК001 на мононуклеарные клетки периферической крови проявлялось при концентрации 5–40 мкг/мл. МК001 оказывал дозозависимое подавляющее действие на пролиферацию и секрецию фактора некроза опухолей альфа (ФНО- α), интерферона-гамма (ИФН- γ) и интерлейкина-2 (ИЛ-2) свежeweделенными мононуклеарными клетками периферической крови, стимулированными антителами к CD3. Кроме того, МК001 подавлял пролиферацию Т-лимфоцитов CD4, специфичных к антигенам вируса гепатита С и *Candida spp.*, и HLA-A2/HCV 1406–1415-специфичных Т-лимфоцитов CD8, стимулированную чужеродными антигенами. МК001 также подавлял секрецию ФНО- α и ИФН- γ в ответ на стимуляцию антигенами столбнячного токсина и *Candida spp.* Наконец, выявлена способность МК001 подавлять у Т-лимфоцитов линии Jurkat активность ядерного фактора транскрипции каппа В после опосредованной рецепторами Т-лимфоцитов стимуляции и соответствующее подавление им пролиферации Т-лимфоцитов той же линии и секреции ими ИЛ-2. **ВЫВОДЫ.** В основе благоприятного влияния стандартизированного силимарина на течение гепатита С кроме ранее описанной противовирусной активности, очевидно, лежит способность подавлять пролиферацию Т-лимфоцитов и секрецию ими провоспалительных цитокинов.

ского гепатита С — прогрессирующий фиброз печени — при нормальном иммунном статусе наступает спустя десятилетия.¹

Современная стандартная терапия гепатита С, включающая пегилированный интерферон и рибавирин, обеспечивает подавление инфекции приблизительно в 55 % случаев, в большинстве из них — длительное исчезновение вируса из крови.^{2,3} Однако у значительного числа больных достичь этого не удается, препараты вызывают побочное действие или имеются противопоказания к их применению. Это существенно повышает вероятность таких осложнений фиброза печени, как печеночная недостаточность и гепатоцеллюлярная карцинома, в последующие 20 лет.⁴ Отсутствие до настоящего времени других методов лечения заставляет многих пациентов обращаться к растительным средствам. По последним данным, в США такими средствами, в первую очередь силимарином, пользуется 13–23 % больных хроническим гепатитом.^{5,6}

Силимарин — экстракт семян расторопши пятнистой (*Silybum marianum*), который столетиями использовался для лечения болезней печени. Силимарин представляет собой смесь 7 флавонолигнанов (силибин А, силибин В, изосилибин А, изосилибин В, силикристин, силидианин, изосиликристин) и 1 флавоноида (таксифолин). До конца механизм его действия не изучен, но известно, что он обладает свойствами антиоксиданта и иммуномодулятора, подавляет фиброз, пролиферацию клеток и размножение вируса.^{7,8} Эффективность силимарина при хроническом гепатите изучается, т. к. результаты его применения противоречивы. Данные разных исследований трудно сравнивать из-за недостаточного для статистической достоверности числа наблюдений, использования неодинаковых, в т. ч. и заведомо недостаточных, доз или нестандартизированных препаратов силимарина, а в некоторых исследованиях — преимущественно силибинина, химически модифицированного силибинина или смеси силибинов А и В.

Сокращения: CFSE — карбоксифлуоресцеинсукцинимидиловый эфир; DMSO — диметилсульфоксид; ELISA — твердофазный иммуноферментный анализ; HCV — вирус гепатита С; NF κ B — ядерный фактор транскрипции каппа В; SOD — супероксиддисмутаза; ИЛ — интерлейкин; ИФН — интерферон; ФНО — фактор некроза опухолей.

© 2010 AGA Institute

0016-5085/10/\$36.00

doi:10.1053/j.gastro.2009.09.021

Хроническим гепатитом С в США страдает около 3 млн человек. Он служит ведущей причиной цирроза печени, требующего ее трансплантации. Основное последствие хрониче-

Вирус гепатита С (HCV), по-видимому, цитопатогенными свойствами не обладает. Фиброз печени при этой инфекции представляет собой конечную стадию длительного воспаления, которое сопровождается накоплением в печени Т-лимфоцитов CD4 и CD8. По многим данным, к опосредованному иммунными механизмами повреждению печени приводит образование специфичными к HCV Т-лимфоцитами цитокинов и цитолитических факторов.¹¹ Поскольку Т-лимфоциты, пролиферирующие вследствие стимуляции, секретирующие цитокины и уничтожающие инфицированные клетки, играют важную роль в воспалительной реакции при гепатите С, мы поставили цель установить, может ли стандартизованный препарат силимарина (МК001) оказывать защитное действие, подавляя такие компоненты провоспалительной иммунной реакции, как пролиферация Т-лимфоцитов и секреция ими цитокинов.

Материалы и методы

Участники

Здоровых лиц и пациентов с хроническим гепатитом С из Медицинского центра Харборвью включали в исследование после получения от них информированного согласия в соответствии с протоколом, принятом наблюдательным советом Вашингтонского университета.

Силимарин

Во всех экспериментах использовали только стандартизованный препарат силимарина (МК001).⁸ Химический состав препарата определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с разрешающей способностью 254 нм и учетом всех пиков, превышающих по количеству 0,7 %. Общее содержание флавонолигнанов в нем составляло 92 %. МК001 растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO), 95% этиловом спирте или метиловом спирте. Контрольные пробы обрабатывали теми же растворителями в тех же концентрациях. Очистку силибина А, силибина В и силибинина проводили, как подробно описано ранее.¹²

Выделение и стимуляция мононуклеарных клеток периферической крови

Для упомянутых выше определений использовали мононуклеарные клетки, выделенные из периферической крови путем стандартного центрифугирования по Ficoll-Нугае. Клетки выделяли перед экспериментом не позднее 24 ч после взятия крови. Для стимуляции их инкубировали в течение разных промежутков времени при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ с фиксированными на твердой подложке антителами анти-CD3 (UCHT1, 10 мкг/мл; BD Biosciences, США), анти-CD3 и анти-CD28, конъюгированными на однородных монодисперсных полистирольных частицах (Invitrogen, США), фитогемагглютинином (1,6 мкг/мл; Remel, Lenexa, США) или форбол миристат ацетатом (РМА)/иономицином (50 нг/мл РМА 1 мкг/мл иономицина; оба препарата фирмы Sigma Aldrich, США) в среде RPMI 1640 с добавлением 10 % человеческой сыворотки (Gemini Bio-Products, США).

Оценка пролиферации клеток

Как количественный показатель пролиферации клеток использовали захват ³H-тимидина в реплицируемую ДНК.

До использования счетчика сцинтилляций в жидкостях Topcount Liquid Scintillation Counter (Perkin-Elmer, США) его измеряли приростом 1 мКи на каждый очаг пролиферации 10⁵ мононуклеарных клеток за 24 ч (в экспериментах с анти-CD3 и фитогемагглютинином) или за 16–18 ч (в экспериментах с белковыми антигенами). Как правило, результаты выражали средним числом поглощаемых импульсов в минуту. При каждом варианте условий проводили 4 эксперимента.

Для оценки специфической пролиферативной реакции на HCV мононуклеарные клетки периферической крови инкубировали с рекомбинантными белковыми антигенами супероксиддисмутазы (SOD) вируса (любезно предоставлены Michael Houghton и Kevin Crawford, Chiron Corp) в конечной концентрации 10 мкг/мл в течение 5 дней до добавления ³H-тимидина, как описано выше.¹³ Использовали следующие рекомбинантные супероксиддисмутазы HCV: SOD-c22 (HCV [aa] 2–120), SOD-c100 (HCV aa 1569–1931), SOD-N55 (HCV aa 2054–2995), а также полученную из *Escherichia coli* SOD-c33c (HCV aa 1192–1457), в качестве отрицательного контроля — SOD дрожжей. Одновременно проводили эксперименты с фитогемагглютинином (1,6 мкг/мл; Remel), антигеном *Candida albicans* (20 мкг/мл; Greer Laboratories, США) и столбнячным токсином (12 флокулирующих ед./мл Wyeth-Ayerst Laboratories, США). Результаты считались достоверными только при сохранной реакции на фитогемагглютинин.

Для оценки пролиферации мононуклеарных клеток периферической крови и Т-лимфоцитов использовали также эффект разведения карбоксифлюоресцеинсукцинимидилового эфира (CFSE) (Invitrogen/Molecular Probes, США). Мононуклеарные клетки периферической крови инкубировали с ним в концентрации 1 мкмоль/л в течение 10 мин при температуре 37 °С, затем отмывали и культивировали со стимуляторами и с МК001 (20 мкг/мл) или без при 37 °С в атмосфере с 5 % CO₂. На следующий день клетки метили поверхностными флюоресцирующими антителами анти-CD5-PerCP-Cy5.5, анти-CD8-PE и анти-CD45-APC (все предоставлены BD Biosciences), фиксировали 1% параформальдегидом и подвергали точной цитометрии, как описано выше. В опытах с Т-лимфоцитами HCV 1406–1415-обогащенные Т-лимфоциты культивировали с аллогенными В-лимфоцитами лимфобластоидной линии в отношении 10:1 с МК001 (20 мкг/мл) или без него на протяжении 3 дней, после чего метили анти-CD8-PerCP, анти-CD3-APC (оба предоставлены BD Biosciences) и HLA-A2 HCV 1406–1415 пентамером-PE (ProImmune, США).

Поточный цитометрический анализ жизнеспособности клеток

Жизнеспособные клетки подсчитывали после окрашивания набором, дифференцирующим живые, жизнеспособные и погибшие клетки (Live/Dead Fixable Dead Cell Stain Kit) (фиолетовый, выявляющий жизнеспособные клетки, Invitrogen/Molecular Probes, США), в течение 24 ч и анализировали с помощью цитометра Becton Dickinson FACS Calibur (Puget Sound Blood Center, США) и пакета программ FlowJo для Macintosh (версия 6.3.3; Treestar, Inc, США).

Внутриклеточное окрашивание цитокинов

Мононуклеарные клетки стимулировали с отрицательным контролем (DMSO, 95% этиловым спиртом или средой) фиксированными к подложке анти-CD3 (10 мкг/мл) или фитогемагглютинином (1,6 мкг/мл) в присутствии МК001

или без него и обрабатывали 1 мкг/мл брэфелдина А (Sigma-Aldrich, США). В целом этот процесс занимал 16 ч, после чего клетки метили следующими поверхностными маркерами: Live/Dead Fixable Dead Cell Stain Kit, анти-CD5-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences), анти-CD8-ECD (Beckman Coulter), анти-CD4-APC-Cy7 и анти-CD56-биотин (BD Biosciences) плюс QDot605-стрептавидином (Invitrogen/Molecular Probes). Затем клетки отмывали BD Perm/Wash и осуществляли внутриклеточное окрашивание с помощью ФНО-а-APC (BD Biosciences) и ИФН- γ -PE-Cy7 (BD Pharmingen, США). Все пробы фиксировали параформальдегидом в конечной концентрации 1 % и анализировали с помощью поточного цитометра BD LSR II (BD Biosciences, Fred Hutchinson Flow Cytometry Center, США) с компенсацией. Для обработки результатов использовали пакет программ FlowJo.

Определение цитокинов с помощью твердофазного иммуоферментного анализа

Через 24 ч после стимуляции при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ надосадочную жидкость собирали и немедленно замораживали при -80 °С. Выявление ФНО- α , ИФН- γ , ИЛ-2 и ИЛ-10 проводили в лаборатории анализа цитокинов научного онкологического центра Fred Hutchinson Cancer Research Center с помощью стандартных наборов для твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA) или комплексного набора иммуогранул для ELISA (Biosource/Invitrogen, США) и системы Luminex xMAP (Luminex Corp, США).

Трансфекция Т-лимфоцитов линии Jurkat и количественное определение NF κ B-зависимой транскрипции

Преходящую трансфекцию Т-лимфоцитов Jurkat выполняли с помощью Cell Line Nucleofector Kit V согласно инструкции изготовителя. Краткое описание метода: клетки на 12-луночных пластинах (5 × 10⁶ клеток на 1 лунку) электропорировали, используя программу S-18 и 5 мкг плазмид, содержащих ген-репортер (ген люциферазы), под контролем NF κ B-чувствительного промотора. Через 48 ч клетки обрабатывали в течение 30 мин МК001 в концентрации 20 мкг/мл в DMSO или обработке не подвергали. NF κ B-транскрипцию активировали посредством рецепторов Т-лимфоцитов с помощью фиксированных на твердой подложке антител анти-CD3 (10 мкг/мл), анти-CD3 (10 мкг/мл) + растворимых анти-CD28 (1 мкг/мл) или рекомбинантного человеческого ФНО (15 нг/мл, Pierce Biotechnology, США). Через 4 ч определяли люциферазную активность лизата клеток с помощью тест-системы Britelite (Perkin-Elmer, США).

Результаты

Токсичность МК001 для клеток

Для выявления токсического действия силимарина свежeweделенные мононуклеарные клетки периферической крови пациентов с гепатитом С культивировали с разными концентрациями его стандартизованного препарата МК001 (рис. 1). Для контроля клетки культивировали со средой без добавок, DMSO и этиловым спиртом в концентрациях, соответствующих испытываемым дозам МК001. Жизнеспособность мононуклеарных клеток периферической крови, не стимулированных (рис. 1, А) и стимулированных анти-CD3

(рис. 1, В), а также Т-лимфоцитов подклассов CD8 и CD4 определяли с помощью набора Live/Dead Fixable Dead Cell Stain Kit и поточного цитометрического анализа, как описано в разд. «Материалы и методы». Процент нежизнеспособных клеток, поглощающих краску, указан в правом верхнем углу каждой диаграммы (см. рис. 1). Он невелик. Гибель клеток обусловлена в первую очередь воздействием растворителей, а не токсичностью МК001. Последняя значима и постоянна только при 24-часовой инкубации с МК001 в концентрации 100 мкг/мл, в 5 раз превышающей использованную в большинстве экспериментов настоящего исследования (20 мкг/мл). Для оценки жизнеспособности мононуклеарных клеток периферической крови применяли метод исключения трипановым синим после однократного добавления МК001 в разных концентрациях. Жизнеспособность при концентрации 20 мкг/мл через 24 ч составляла 99 %, через 5 дней — 97 %. Во всех последующих экспериментах, за исключением особо оговоренных, использовали концентрацию 20 мкг/мл, или приблизительно 40 мкмоль/л.

Дозозависимое подавляющее действие МК001 на пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови и Т-лимфоцитов

Важная составляющая иммунной реакции на вирусную инфекцию — пролиферация антигенспецифических Т-лимфоцитов. Мы поставили перед собой цель выяснить, задерживает ли МК001 пролиферацию свежeweделенных антигенспецифических и неспецифических мононуклеарных клеток периферической крови и Т-лимфоцитов у пациентов с гепатитом С и не страдающих этой инфекцией лиц. Однократное добавление МК001 в начале культивирования оказывало дозозависимое подавляющее действие на пролиферацию свежeweделенных мононуклеарных клеток периферической крови под влиянием неспецифических стимуляторов — анти-теланти-CD3 (рис. 2, А) и фитогемагглютинаина (рис. 2, С). Как видно на рис. 2, В, по данным измерения захвата ³H-тимидина МК001 (20 мкг/мл) подавил пролиферацию клеток у 5 лиц (3 пациентов с гепатитом С и 2 здоровых) на 54–78 % (в среднем на 70 %), стимулированную фиксированными на твердой подложке анти-CD3. Пролиферацию клеток у тех же лиц, стимулированную фитогемагглютинином, МК001 подавлял приблизительно также — на 23–79 % (в среднем на 48 %) (рис. 2, D). Очищенные препараты расторопши пятнистой — силибинин, силибин А и силибин В — оказывали аналогичное подавляющее действие на пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови (дополнительный рис. 1, А).

Другой метод оценки пролиферации клеток — измерение разведения CFSE путем поточной цитометрии. Белки цитоплазмы связывают CFSE, поэтому по мере деления клеток происходит его разведение. Этот метод выявил пролиферацию Т-лимфоцитов CD8+ и CD8- (равноценных CD4+) при стимуляции анти-CD3 (рис. 3, А) и ее подавление после 24 ч инкубации с МК001. Наконец, измерение захвата ³H-тимидина показало, что при 24-часовой инкубации МК001 (20 мкг/мл) подавляет пролиферацию свежeweделенных мононуклеарных клеток периферической крови, стимулированную белками HCV и кандидозными антигенами (рис. 3, В). По данным этого измерения пролиферативная реакция ограничивалась Т-лимфоцитами CD4+.

Для того чтобы выявить подавляющее действие МК001 на пролиферацию клеток, специфичных к HCV, использовали обогащенные HCV 1406–1415 свежeweделенные мононукле-

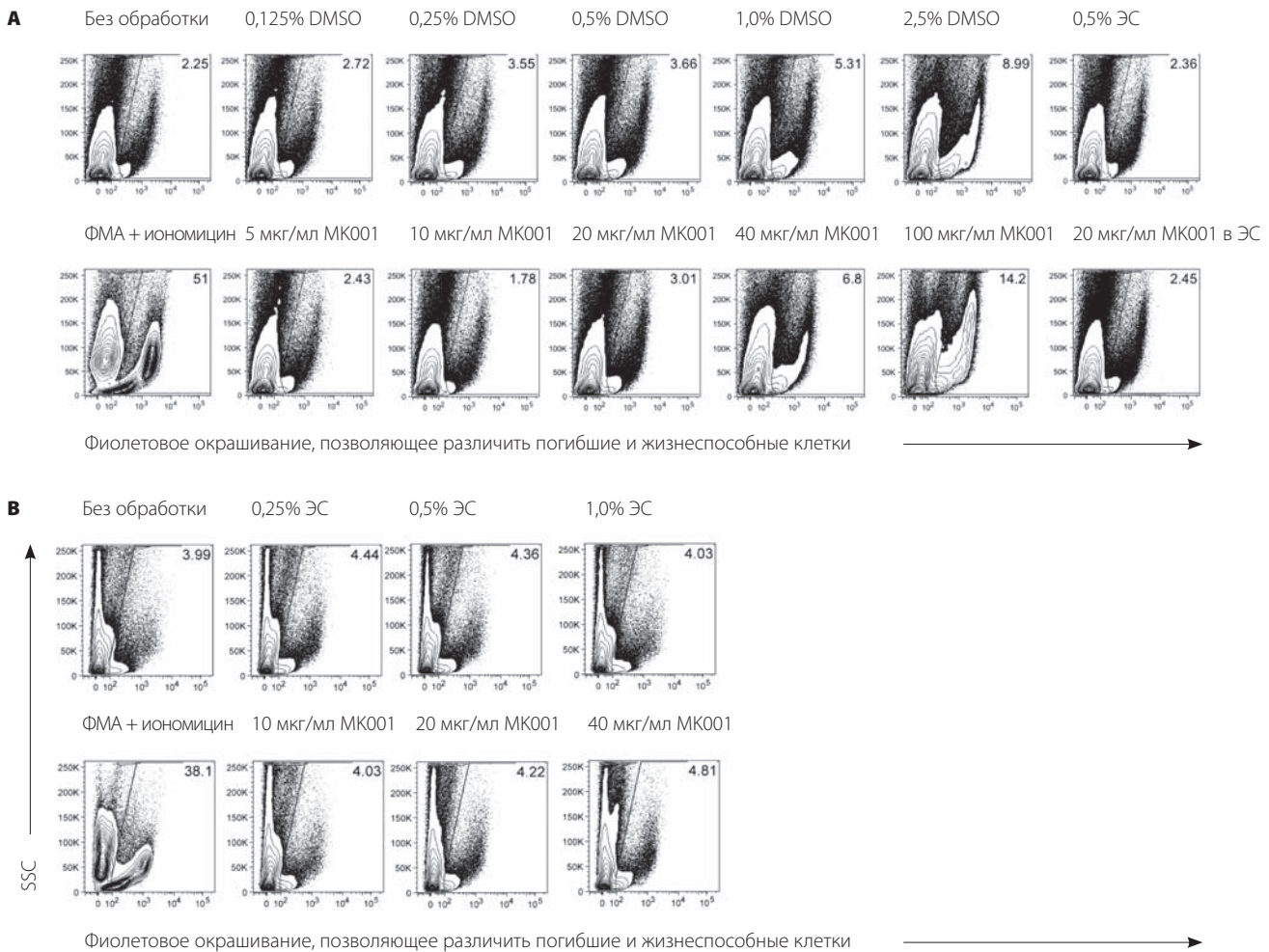


Рис. 1. Минимальное действие силимарина на жизнеспособность клеток. Свежевыделенные мононуклеарные клетки периферической крови у пациентов с гепатитом С культивировали в среде с разными концентрациями МК001, растворенного в DMSO или этиловом спирте, либо в качестве контроля с этими растворителями без МК001 в течение 24 ч без стимуляции (A) или со стимуляцией в начале культивирования с анти-CD3 (B). Клетки метили фиолетовым, выявляющим их жизнеспособность (ось X), с помощью набора Live/Dead Fixable Dead Cell Stain Kit и подвергали проточной цитометрии. Процент нежизнеспособных, поглощающих краску клеток указан в правом верхнем углу каждой диаграммы. Образцы для положительного контроля, обработанные форбол мириостат ацетатом/ионоцицином через 24 ч продемонстрировали гибель значительного количества клеток (внизу слева, рис. A и B). Два дополнительных опыта с клетками крови неинфицированных вирусом гепатита С лиц дали те же результаты. Аналогичные результаты получены и со стимулированными и нестимулированными Т-лимфоцитами CD4 и CD8 (графически не представлены). ФМА — форбол мириостат ацетат; ЭС — этиловый спирт.

арные клетки периферической крови пациента с вирусным гепатитом с HLA-A2+. Пролиферацию специфичных к белкам HCV Т-лимфоцитов (рис. 3, С, левая часть) подтверждает исчезновение свечения CFSE. Добавление МК001 к культуре клеток предупреждает эффект его разведения вследствие пролиферации Т-лимфоцитов, неспецифичных и специфичных к HCV 1406–1415 (диаграммы на рис. 3, С).

МК001 подавляет секрецию провоспалительных цитокинов стимулированными Т-лимфоцитами человека in vitro

Секреция провоспалительных цитокинов усиливает иммунный ответ. Мы поставили задачу проверить, подавляет ли МК001 секрецию ФНО-α, ИФН-γ и ИЛ-2 свежевыделенных мононуклеарных клеток периферической крови у пациен-

тов с вирусным гепатитом и здоровых доноров. Как видно на рис. 4, А, С и E, МК001 оказывает дозозависимое подавляющее действие на секрецию ФНО-α, ИФН-γ и ИЛ-2 свежевыделенными мононуклеарными клетками периферической крови, стимулированными анти-CD3. Тот же результат получен при добавлении МК001 (20 мкг/мл) мононуклеарных клеток, свежевыделенных из периферической крови еще у 3 пациентов с вирусным гепатитом и 2 неинфицированных лиц (рис. 4, B, D и F). Секреция ФНО-α подавлялась на 47–86 % (в среднем на 70 %), ИФН-γ — на 58–83 % (в среднем на 68 %), ИЛ-2 — на 53–87 % (в среднем на 71 %). На нестимулированные мононуклеарные клетки периферической крови МК001 влияния не оказывал (данные графически не представлены). Очищенные компоненты расторопши пятнистой — силибинин, силибин А и силибин В — также оказывали дозозависимое подавляющее действие на секрецию ИФН-γ клетками, стимулированными анти-CD3 (дополнительный рис. 1, B).

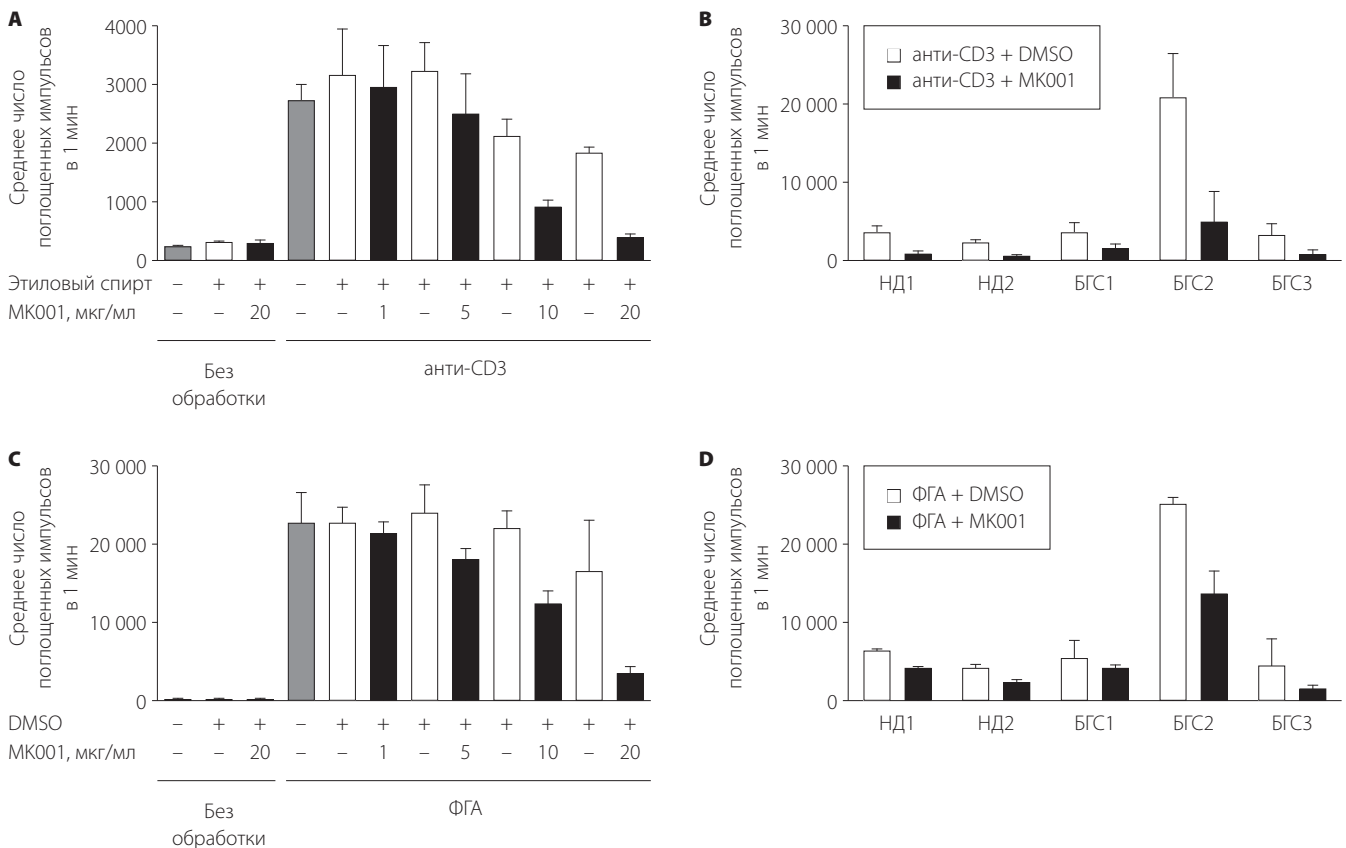


Рис. 2. Дозозависимое подавляющее действие МК001 на свежевыделенные мононуклеарные клетки периферической крови. Во всех экспериментах МК001 добавляли однократно в начале культивирования. В контроле клетки культивировали с его растворителями — DMSO или этиловым спиртом. Способность свежевыделенных мононуклеарных клеток периферической крови к пролиферативной реакции проверяли в 4 образцах с фиксированными на твердой подложке анти-CD3 (10 мкг/мл) (A и B) и фитогемагглютинином (1,6 мкг/мл) (C и D) и оценивали после 24 ч культивирования по захвату ³H-тимидина. Результаты выражали средним количеством импульсов, поглощенных в минуту, в культурах, обработанных разными дозами МК001 (черные столбики), и в контрольных, обработанных DMSO или этиловым спиртом (белые столбики). Серые столбики — пролиферация свежеполученных мононуклеарных клеток периферической крови только стимулированных анти-CD3 или фитогемагглютинином. Т-образные линии на вершинах столбиков отображают 1 стандартное отклонение между результатами 4 экспериментов в одинаковых условиях. Мононуклеарные клетки для изучения действия МК001 выделяли из крови пациента с гепатитом С (A) и неинфицированного донора (C). Аналогичные результаты получены с клетками крови еще у 5 пациентов и 1 неинфицированного. Результаты культивирования при тех же условиях, но с добавлением МК001 (20 мкг/мл) представлены на рис. B и D. Они статистически достоверно отличались от результатов культивирования с его растворителями (тест согласованных пар Уилкоксона, $p = 0,03$ для анти-CD3 и фитогемагглютинина по отдельности). БГС — больной гепатитом С; НД — неинфицированный донор; ФГА — фитогемагглютинин.

Для того чтобы установить, подавляет ли МК001 секрецию цитокинов Т-лимфоцитами, мы сравнили концентрации ФНО- α , ИФН- γ и ИЛ-2 в надосадочной жидкости высокообогащенной (чистота 99,4 %) популяции этих клеток после 24-часовой инкубации с МК001 (рис. 5, A) и без него (рис. 5, B) и выявили четкое подавляющее действие. Кроме того, внутриклеточная концентрация ФНО- α , ИФН- γ в Т-лимфоцитах CD8+ и CD8- (CD4+), определенная путем поточной цитометрии после инкубации с МК001, была ниже, чем в контроле механических повреждений, инкубированном с DMSO (рис. 5, C).

Влияние МК001 на секрецию цитокинов антигенспецифическими Т-лимфоцитами исследовали в образцах свежевыделенных мононуклеарных клеток периферической крови у 2 пациентов с гепатитом С (рис. 6). ELISA секреции ФНО- α и ИФН- γ в ответ на стимуляцию антигенами столбнячного токсина и *Candida spp.* и ее подавления МК001 (20 мкг/мл) дал аналогичные результаты.

МК001 подавляет пролиферацию, секрецию ИЛ-2 и опосредованную NF κ B транскрипцию Т-лимфоцитов линии Jurkat

Поскольку уже известно, что силимарин подавляет NF κ B⁷, мы решили определить, влияет ли это на пролиферацию Т-лимфоцитов и секрецию ими цитокинов. Для этого мы использовали трансформированные Т-лимфоциты линии Jurkat, которые пролиферируют спонтанно. Однократное добавление МК001 по данным измерения захвата ³H-тимидина после 24-часовой инкубации их пролиферацию подавляло (рис. 7, A). Стимуляция одними только антителами анти-CD3 не способна индуцировать секрецию цитокинов лимфоцитами линии Jurkat (данные графически не представлены), но в сочетании с анти-CD28 они индуцируют секрецию ИЛ-2. (Однако секрецию ФНО- α и ИФН- γ не индуцирует и такая стимуляция; данные также графически не представлены.) Таким образом, мы проверили только возможность подавления МК001 секреции ИЛ-2 Т-лимфоцитами линии Jurkat. По ре-

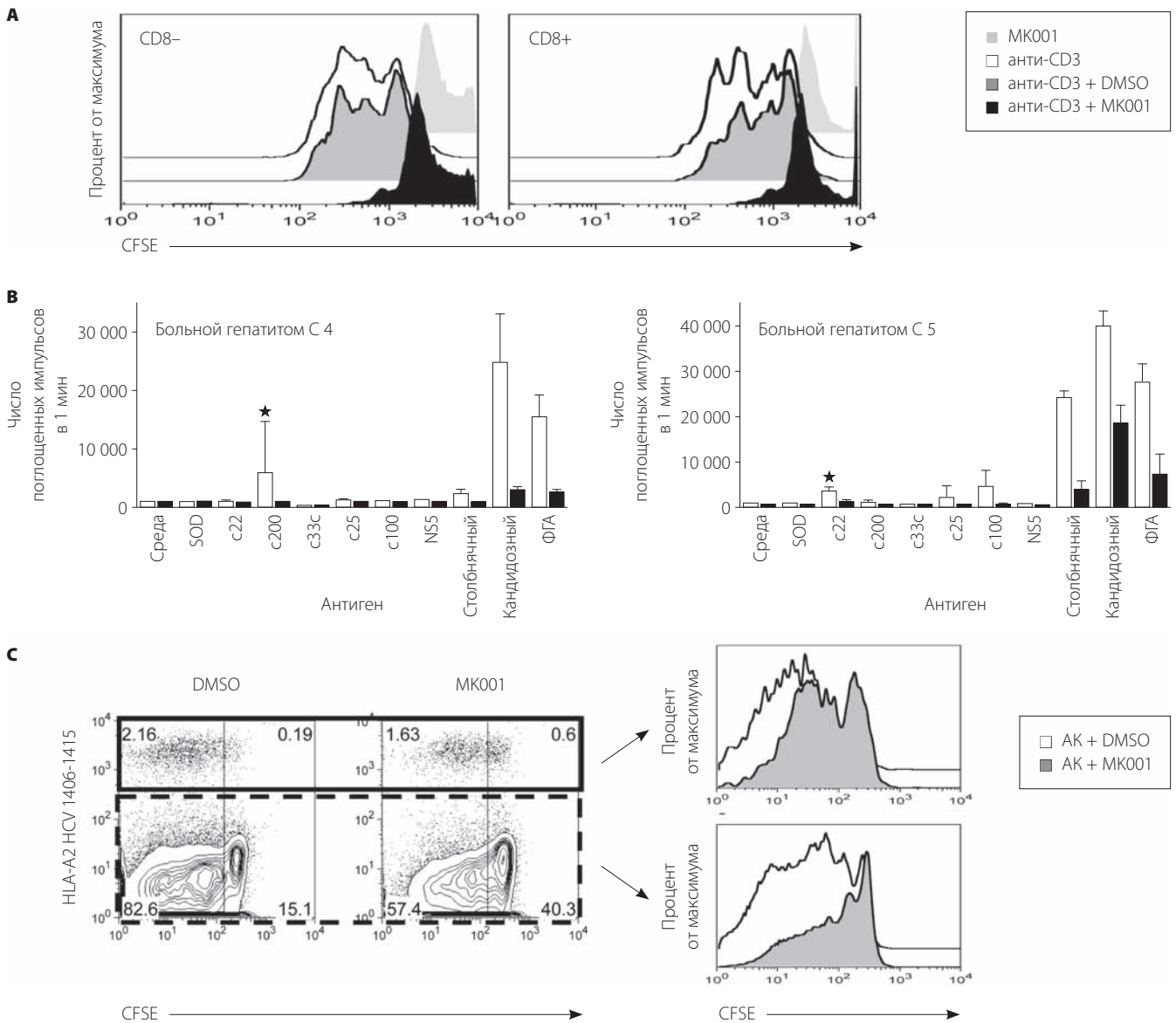


Рис. 3. Подавление MK001 пролиферации антигенспецифических и неспецифических Т-лимфоцитов. Во всех экспериментах результаты культивирования с однократным добавлением MK001 (20 мкг/мл) сравнивали с результатами культивирования с однократным добавлением растворителя (DMSO). (А) Свежевыделенные мононуклеарные клетки периферической крови больного гепатитом С обрабатывали CFSE в течение 10 мин, отмывали и культивировали одну ночь со средой, анти-CD3 (фиксированными на твердой подложке, 10 мкг/мл), анти-CD3 + DMSO или анти-CD3 + MK001 в DMSO. О пролиферации Т-лимфоцитов CD8- (левая часть рисунка) и CD8+ (правая часть рисунка) судили по результатам проточного цитометрического определения живых лимфоцитов, экспрессирующих CD45, которые также CD5-позитивны. На оси Y отдельной диаграммы указан максимальный процент числа клеток. Данные относительно Т-лимфоцитов CD8-CD5+ подкреплены данными относительно Т-лимфоцитов CD4+CD5+ (равнозначны CD8-CD3+ и CD4+CD3+ соответственно) (графически не представлены). (В) Свежевыделенные мононуклеарные клетки периферической крови 2 пациентов с гепатитом С культивировали с антигенами вируса, другими антигенами, вызывающими анамнестический иммунный ответ, и фитогемагглютинином в течение 5 дней, как описано выше.¹³ Пролиферацию при добавлении в культуру MK001 (черные столбики) и без него (белые столбики) измеряли по захвату ³H-тимидина, т. е. среднему количеству импульсов, поглощенных в 1 мин. Значительное (от положительной к отрицательной) подавление пролиферации в ответ на специфические вирусные антигены отмечено звездочками. Аналогичные результаты получены и с клетками крови у остальных 4 пациентов с гепатитом С. Как пороговый уровень реакции на антигены HCV рассматривали индекс стимуляции более 0,4. Т-образные линии на вершинах столбиков показывают стандартное отклонение между результатами 4 одинаковых экспериментов. (С) Мононуклеарные клетки крови HLA-A2+у пациента с гепатитом С обогащали Т-лимфоцитами путем 12-дневного культивирования с 9mer HCV 1406–1415 и rhIL-2 при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂, инкубировали в течение 10 мин с CFSE, отмывали и культивировали с аллогенными клетками В-лимфобластоидной линии и MK001 (20 мкг/мл) в DMSO или одним только DMSO. Через 3 дня поверхность Т-лимфоцитов метили конъюгированными с флуоресцеином анти-CD3, анти-CD8 и пентамером HLA-A2-HCV NS3 1406–1415, а затем анализировали с помощью потокового цитометра BD FACS Calibur и пакета программ FlowJo, чтобы выявить среди них живые, экспрессирующие CD3 и CD8. В правом верхнем квадрате отражено количество клеток, связавших пентамер и содержащих CFSE. Количество делившихся, следовательно, не содержащих его клеток отражено в левом квадрате. Кривые на отдельной диаграмме показывают отличия клеточного профиля пентамер-положительных (верхний рисунок) и пентамер-отрицательных (нижний рисунок) Т-лимфоцитов при культивировании с MK001 (заштрихованная часть) и одним только DMSO (незаштрихованная часть). SOD — супероксиддисмутаза; АК — аллогенные клетки В-лимфобластоидной линии; ФГА — фитогемагглютинин.

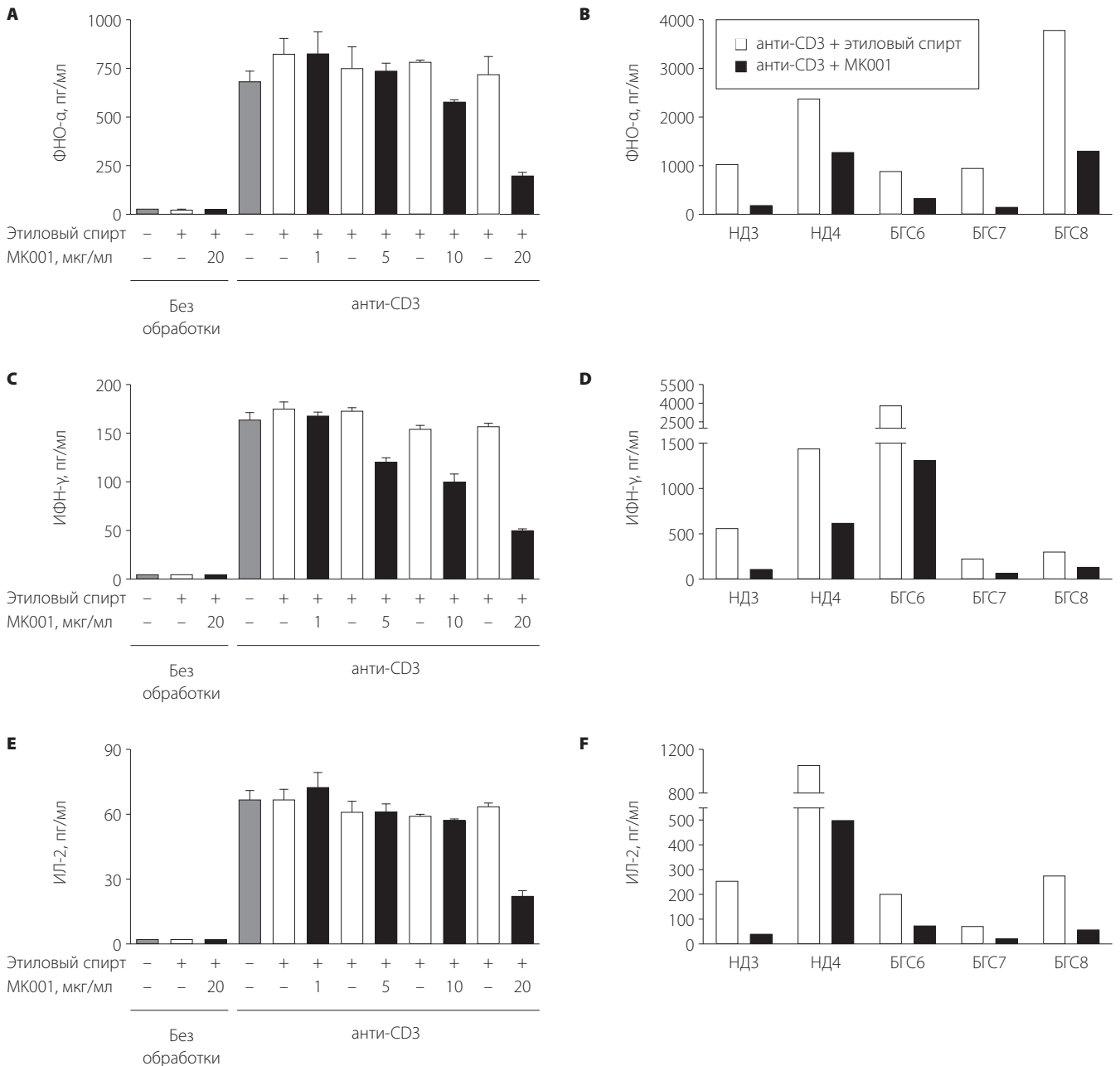


Рис. 4. МК001 дозозависимо подавляет секрецию ФНО-α, ИФН-γ и ИЛ-2, стимулированную *in vitro*. Свежевыделенные мононуклеарные клетки периферической крови у пациентов с гепатитом С, стимулированные фиксированными на твердой подложке анти-CD3 (10 мкг/мл), и отрицательный контроль (клетки с добавлением 95% этилового спирта или только среды) культивировали с МК001, растворенным в 95% этиловом спирте или только одним этиловым спиртом. Через 24 ч после стимуляции надосадочную жидкость собирали и с помощью ELISA определяли в ней методами, описанными выше, ФНО-α (А), ИФН-γ (С) и ИЛ-2 (Е). Белые столбики — показатели, полученные при культивировании с одним только этиловым спиртом, без МК001; черные столбики — при культивировании с растворенным в нем МК001; серые столбики — пролиферация свежевыделенных мононуклеарных клеток периферической крови после стимуляции одними только анти-CD3. Клетки больных гепатитом С и неинфицированных лиц контрольной группы культивировали и исследовали одинаково. Выявлено устойчивое подавляющее действие МК001 (20 мкг/мл) на секрецию ФНО-α (В), ИФН-γ (D) и ИЛ-2 (F) как клетками больных гепатитом С, так и неинфицированных лиц, одинаковое при одной и той же дозе препарата. Результаты при культивировании в присутствии МК001 статистически достоверно отличались от таковых в присутствии одного только растворителя (тест согласованных пар Уилкоксона для каждого цитокина по отдельности $p = 0,03$). БГС — больной гепатитом С; HD — неинфицированный донор.

зультатам стандартного ELISA такое подавление имеет место (рис. 7, В). Наконец, чтобы установить, подавляется ли одновременно активность NFκB, Т-лимфоциты линии Jurkat подвергли трансфекции плазмидами, содержащими ген-репортер (ген люциферазы). Обработка МК001 оказывала дозозависимое

подавляющее действие на опосредованную рецепторами активацию NFκB Т-лимфоцитов. Мы также исследовали возможность повышения секреции ИЛ-10 как фактора косвенного ограничения провоспалительной реакции, но ее, по нашим данным, МК001 тоже подавляла (дополнительный рис. 2).

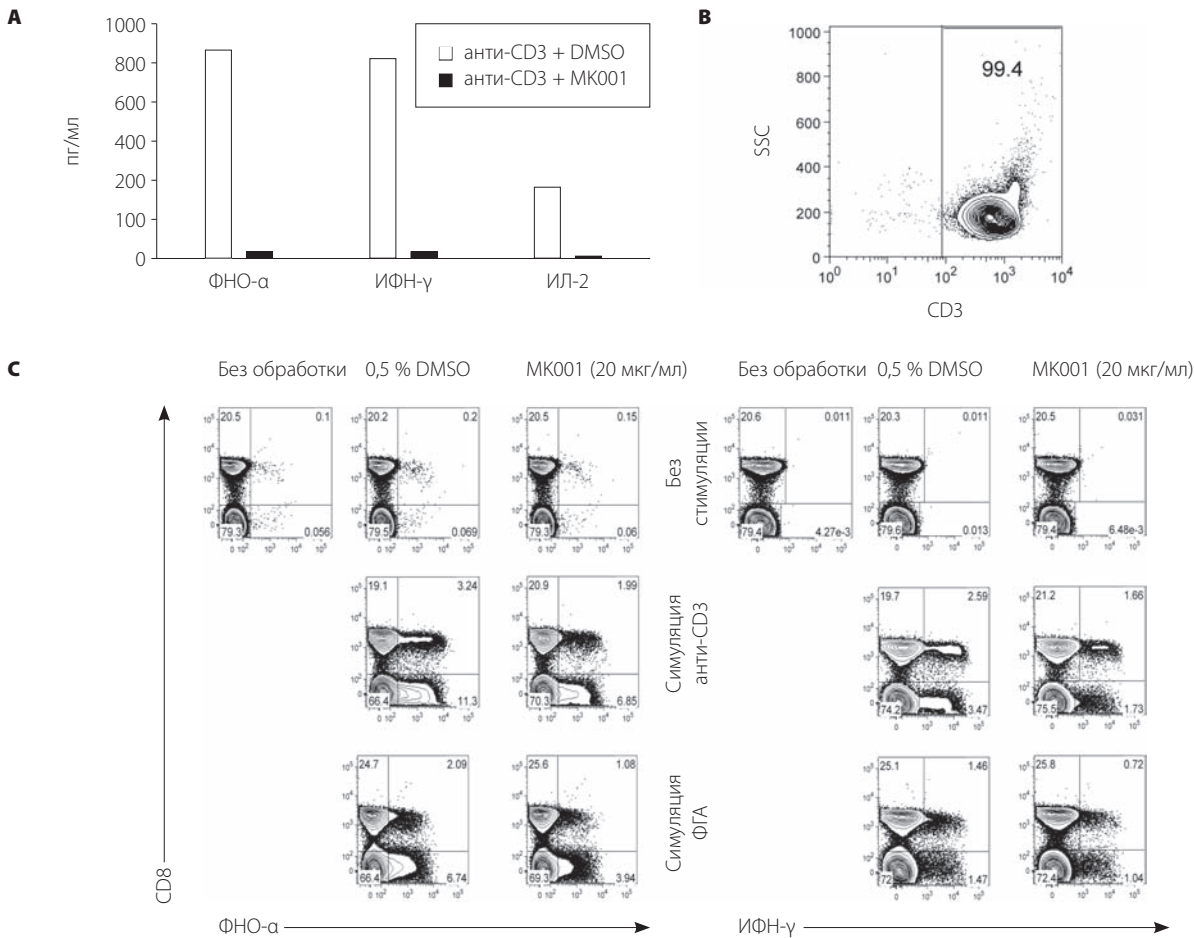


Рис. 5. Секретия ФНО-α, ИФН-γ и ИЛ-2 Т-лимфоцитами и ее подавление МК001. (А) Обогащенные Т-лимфоцитами клетки больного гепатитом С культивировали с добавлением 0,5 % DMSO или среды (графически не представлено) или с фиксированными на твердой подложке анти-CD3 (10 мкг/мл) в присутствии МК001 (20 мкг/мл) или растворителя (DMSO) в течение 24 ч. Уровень ФНО-α, ИФН-γ, ИЛ-2 в надосадочной культуральной жидкости определяли с помощью комплексного ELISA (доступные определению уровни 2, 2 и 4 пг/мл соответственно). (В) Чистоту обогащенных Т-лимфоцитов CD3+ на рис. А проверяли с помощью проточной цитометрии, регистрирующей живые лимфоциты CD45+ (чистота 97,5 %, не считая лизиса). (С) Стимулированные фиксированными на твердой подложке анти-CD3 (10 мкг/мл) или фитогемагглютинином (1,6 мкг/мл) с отрицательным контролем (DMSO или средой) свежевыведенные мононуклеарные клетки периферической крови у еще 1 пациента с гепатитом С культивировали с 20 мкг/мл МК001 или растворителем (DMSO) в течение 16 ч. Внутриклеточную экспрессию цитокинов (ФНО-α и ИФН-γ) оценивали в присутствии 1 мкг/мл брефедина А. Чтобы отличить жизнеспособные клетки от мертвых, использовали фиолетовое окрашивание. Дальнейший отбор клеток проводили на основании экспрессии CD5 и отсутствия экспрессии CD56. Экспрессия ФНО-α (ось X, левые диаграммы) и ИФН-γ (ось X, правые диаграммы) живыми CD5+CD8+CD56– лимфоцитами отражена диаграммами в верхнем правом квадрате. В каждом квадрате представлена доля клеток в процентах. Обнаружение цитокинов в популяции лимфоцитов CD5+CD8–CD56– подтверждено их получением из лимфоцитов CD5+CD4+CD56– в таком же эксперименте. Результат с Т-лимфоцитами CD5+CD8+ ранее подтвержден экспериментом с такой же популяцией Т-лимфоцитов CD3+CD8+ (графически не представлен). ФГА — фитогемагглютинин.

Обсуждение

Показателями тяжести воспалительной реакции печени при хроническом гепатите служат распространенность лимфоцитарной инфильтрации, гибели гепатоцитов и зон некроза, обычно около скоплений лимфоцитов. Клинические исследования выявили четкую зависимость прогрессирования фиброза печени от тяжести предшествующего воспаления.^{14,15} Таким образом, подавление воспаления уменьшает риск тяжелых последствий хронического гепатита. Мы показали в эксперименте, что МК001, стандартизованный препарат силимарина, и два его очищенных компонента, силибин А и силибин В (по отдельности или в виде смеси — силибинина), оказывают *in vitro* дозозависимое подавляющее действие на

пролиферацию Т-лимфоцитов и секрецию провоспалительных цитокинов. Кроме того, МК001 подавляет зависимую от NFκB транскрипцию Т-лимфоцитов линии Jurkat, с чем, возможно, связана способность этого препарата подавлять пролиферацию Т-лимфоцитов и секрецию цитокинов. Таким образом, можно ожидать, что в достаточных больших дозах МК001 подавит воспаление при хроническом гепатите. Результаты нашего исследования согласуются с немногочисленными опубликованными сообщениями о способности силимарина влиять на функцию лимфоцитов и свидетельствуют в пользу его иммуносупрессивного и противовоспалительного действия. Увеличение количества Т-лимфоцитов — важный механизм усиления иммунного ответа. Мы выявили подавление силимарином пролиферации специфичных

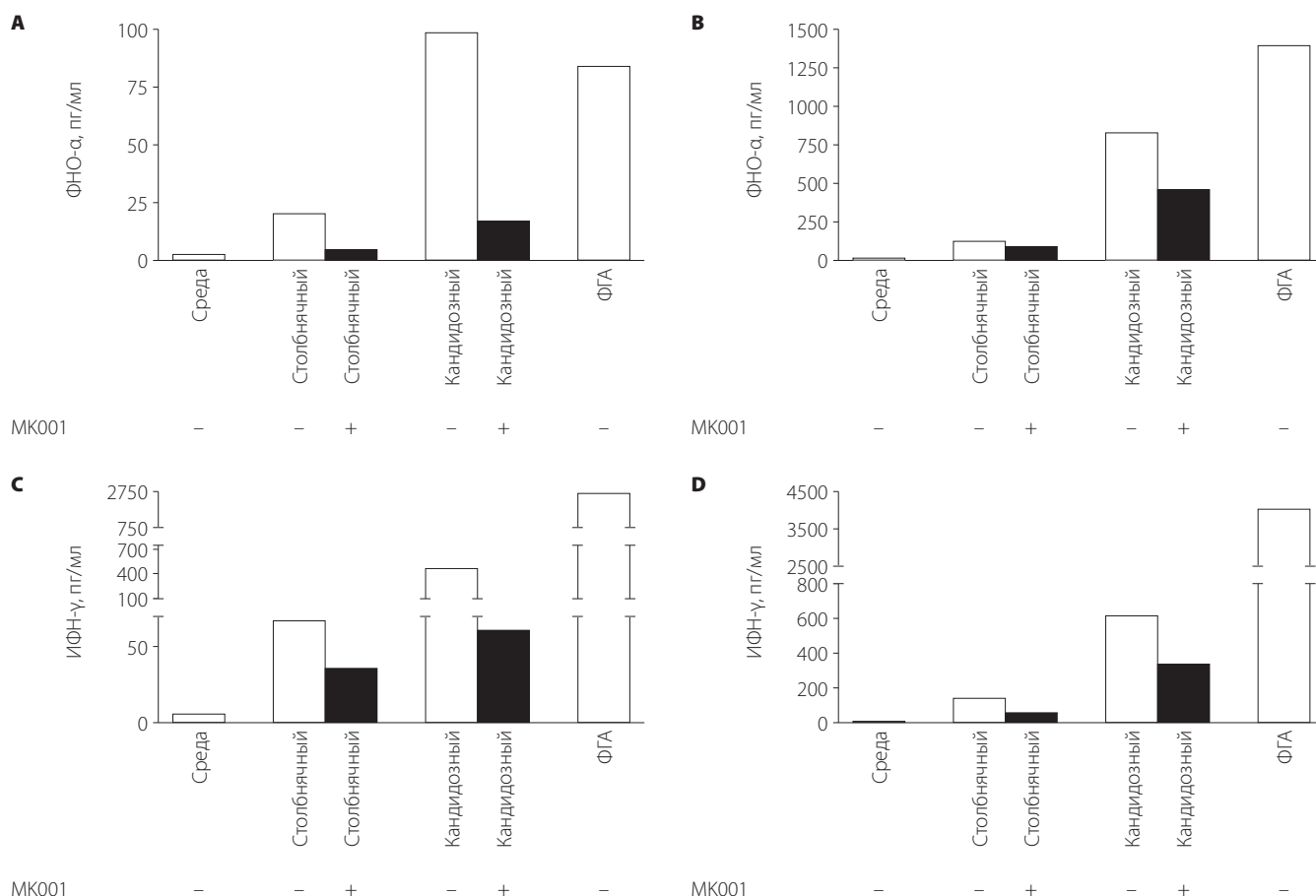


Рис. 6. Подавление секреции ФНО-α и ИФН-γ Т-лимфоцитами, специфичными к столбнячному токсину и антигенам *Candida albicans*. Свежевыделенные мононуклеарные клетки периферической крови 2 пациентов с гепатитом С (A и C; B и D) культивировали с антигенами столбнячного антигена и *Candida albicans* и фитогемагглютинином в присутствии МК001 (20 мкг/мл) или без него в течение 4 дней. Надосадочную культуральную жидкость замораживали при температуре -80°C , а затем определяли в ней ФНО-α и ИФН-γ с помощью комплексного ELISA (порог чувствительности для обоих цитокинов — 2 пг/мл). В отсутствие указанных антигенов цитокины не секретируются. Аналогичные результаты получены с мононуклеарными клетками крови у 5 пациентов с гепатитом С и 2 неинфицированных лиц. ФГА — фитогемагглютинин.

к определенным антигенам и неспецифичных Т-лимфоцитов. Таким образом, его подавляющее действие распространяется не только на опухолевые клетки, как было установлено ранее, но и на свежевыделенные из крови пациентов с гепатитом С и здоровых лиц Т-лимфоциты. Что касается влияния на секрецию цитокинов, Schumann et al. установили, что силибинин при предварительном применении оказывал иммуносупрессивное и противовоспалительное действие при экспериментальном гепатите мышей, зависящем от индуцированных ConA Т-лимфоцитов.¹⁶ Совпадает с нашими экспериментальными данными и сообщение о значительном подавлении силибинином повышения уровня информационной РНК ИЛ-2, ИЛ-4, ИФН-γ и ФНО-α в печени и секреции тех же цитокинов спленоцитами. Кроме того, авторы обнаружили повышение в ткани печени и спленоцитах уровня ИЛ-10, что с нашими результатами не совпадает, но указывает на иммуносупрессивное действие силибинина в дополнение к снижению под его влиянием активности аланин- и аспартатаминотрансфераз и подавлению апоптоза гепатоцитов. Lee et al. сообщают о подавлении силибинином созревания дендритных клеток *in vitro*, что свидетельствует о его влиянии на иммунореактивность.

Силимарин имеет короткий период полувыведения, т. е. быстро конъюгируется в печени и выводится в основном с жел-

чью.^{18,19} Однако, чтобы подавить активность гепатита *in vivo* силимарин в доступной в настоящее время лекарственной форме, требуются, по-видимому, высокие дозы и/или частый прием. Недавно опубликованы результаты фармакокинетического исследования Легалона (Madaus GmbH, Германия), препарата стандартизированного силимарина для приема внутрь, при гепатите С. Выявлен устойчивый максимум концентрации в плазме свободных и общих (свободные + конъюгированные) флавонолигнанов 0,4–2,7 и 4,1–18,9 мкг/мл соответственно после приема внутрь 700 мг,²⁰ причем более высокий уровень наблюдался при более выраженном фиброзе печени.¹⁹ Неясно, что точнее отражает биоактивность: уровень свободных или общих флавонолигнанов. Следует заметить, что последний находится в пределах, создающих описанное в данной статье противовоспалительное и описанное ранее антивирусное действие.⁸ К тому же концентрация в плазме, по-видимому, ниже, чем в печени. Клинические¹⁸ и экспериментальные (на крысах)²¹ исследования, выявившие в печени более высокую концентрацию флавонолигнанов, чем в плазме, показывают, что действие силимарина реализуется в печени. Следовательно, вероятность побочного действия на иммунный ответ в лимфоузлах или внепеченочных очагах инфекции, по-видимому, невелика. Для выяснения возмож-

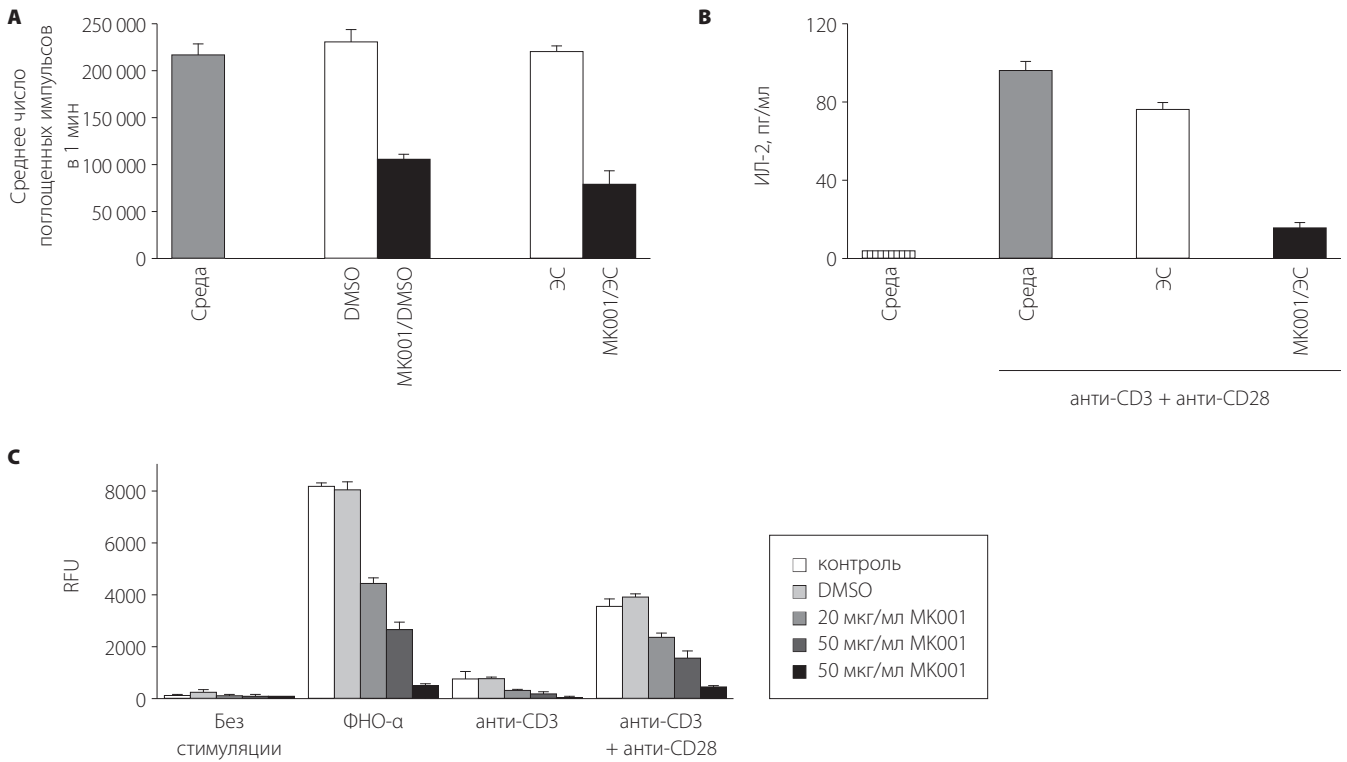


Рис. 7. Подавление МК001 пролиферации лимфоцитов, секреции ИЛ-2 и транскрипции Т-лимфоцитов линии Jurkat, опосредованной NFκB. (А) Спонтанную пролиферацию Т-лимфоцитов линии Jurkat оценивали по захвату 3H-тимидина (среднее число импульсов в 1 мин с 4 очагов пролиферации). Показаны результаты параллельного культивирования с МК001 (20 мкг/мл), растворенным в DMSO или 95% этиловым спиртом. (В) Секрецию ИЛ-2 Т-лимфоцитами линии Jurkat стимулировали фиксированными на твердой подложке анти-CD3 и растворимыми анти-CD28. Клетки культивировали в присутствии МК001 (20 мкг/мл). Отрицательным контролем служило культивирование с 95% этиловым спиртом. Через 24 ч в надсадочной жидкости количественно определяли ИЛ-2 с помощью ELISA. (С) Т-лимфоциты линии Jurkat подвергали трансфекции с помощью 5 мкг плазмид, кодирующих ген-репортер (ген люциферазы) под контролем промотора, чувствительного к NFκB. За 30 мин до стимуляции клетки обрабатывали МК001 или DMSO. (Токсического действия использованных для 30-минутной обработки концентраций МК001 не выявлено). NFκB активировали посредством рецепторов Т-лимфоцитов, используя фиксированные на твердой подложке анти-CD3, анти-CD3 + анти-CD28 или обработку 15 нг/мл ФНО-α. Через 4 ч после активации рецепторов Т-лимфоцитов или обработки ФНО-α определяли активность люциферазы. Обработка МК001 оказывала дозозависимое подавляющее действие на индуцированную рецепторами лимфоцитов активацию NFκB. Т-образные линии на верхушках столбиков показывают 1 стандартное отклонение по результатам 4 одинаковых экспериментов. ЭС — этиловый спирт.

ности такого побочного действия необходимы испытания силимарина, включающие фармакокинетический и иммунологический анализ. К счастью, силимарин даже в очень больших дозах переносится хорошо, что делает возможным проверку безопасности тех доз, которые необходимы для подавления воспаления. В идеале следует определить терапевтическое окно для силимарина, т. е. ту дозу, которая подавляет иммунный ответ печени настолько, чтобы предотвратить прогрессирование воспаления и фиброза, не оказывая общего иммуносупрессивного действия. Для широкого клинического применения силимарина необходимо знать, достижима ли его оптимальная концентрация *in vivo*.

Применительно к гепатиту С важно иметь в виду, что воспалительный ответ лимфоцитов тоже, вероятно, до некоторой степени подавляет размножение вируса. Следовательно, теоретически, ослабив ответ лимфоцитов, мы создадим условия для неконтролируемого размножения вируса и его губительных последствий. Однако ранее наша исследовательская группа выявила *in vitro* подавление размножения HCV под влиянием того же препарата силимарина (МК001), что использован в настоящей работе.⁸ Ferenci et al. в клиническом исследовании продемонстрировали снижение концентрации

РНК HCV в крови при в/в введении силибинина.²² Исходя из данных упомянутых исследований, мы предположили, что стандартизированный силимарин оказывает как противовоспалительное, так и противовирусное действие. Очевидно, при гепатите С силимарин может оказывать отдаленное благоприятное влияние как прямо, подавляя воспаление, так и косвенно, подавляя размножение вируса. Для того чтобы установить, преобладает ли *in vivo* какой-то один механизм действия, необходимы дальнейшие исследования. При невирусном хроническом гепатите, разумеется, такой проблемы нет.

Доказанное противовирусное действие стандартизированного силимарина и его компонентов дает основания предполагать, что подавление иммунного ответа и воспаления не приводит к сколько-нибудь значимому увеличению прямого повреждения печени из-за неконтролируемого размножения HCV.

Таким образом, мы установили, что стандартизированный препарат силимарина МК001 и два его компонента (силибин А и силибин В) оказывают дозозависимое подавляющее действие на пролиферацию свежeweделенных мононуклеарных клеток периферической крови у пациентов с гепатитом С и не страдающих этой инфекцией лиц и секрецию ими провоспалительных цитокинов. Следовательно, интерес как врачей, так

и пациентов к данному препарату как средству лечения этой инфекции оправдан, хотя механизм его действия до конца не изучен. Будет ли он подавлять пролиферацию Т-лимфоцитов и секрецию ими цитокинов *in vivo* так же, как *in vitro*, можно установить только путем рандомизированного контролируемого исследования. Важно отметить, что возможность благоприятного действия при гепатите С уже продемонстрирована в недавнем сообщении о существенном снижении концентрации РНК HCV после в/в введения силибинина.²² Необходимо проверить предположение о том, что в этих условиях имеет место и иммуномодулирующее действие. Требуется дополнительные исследования, чтобы лучше понять механизм действия и фармакокинетику силимарина *in vitro* и *in vivo*, т. к. это откроет новые возможности его применения и даст опорные точки для выбора эффективных доз.

Дополнительные материалы

Ознакомиться с дополнительными материалами к данной статье можно в онлайн-версии журнала на сайте: www.gastrojournal.org, doi: 10.1053/j.gastro.2009.09.021.

Литература

- Alter HJ, Seeff LB. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* 2000;20:17–35.
- Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:958–965.
- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975–982.
- Davis GL, Albright JE, Cook SF, et al. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. *Liver Transpl* 2003;9:331–338.
- Strader DB, Bacon BR, Lindsay KL, et al. Use of complementary and alternative medicine in patients with liver disease. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2391–2397.
- Seeff LB, Curto TM, Szabo G, et al. Herbal product use by persons enrolled in the Hepatitis C Antiviral Long-Term Treatment Against Cirrhosis (HALT-C) Trial. *Hepatology* 2008;47:605–612.
- Agarwal R, Agarwal C, Ichikawa H, et al. Anticancer potential of silymarin: from bench to bedside. *Anticancer Res* 2006;26:4457–4498.
- Polyak SJ, Morishima C, Shuhart MC, et al. Inhibition of T-cell inflammatory cytokines, hepatocyte NF- κ B signaling, and HCV infection by standardized silymarin. *Gastroenterology* 2007;132:1925–1936.
- Saller R, Meier R, Brignoli R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* 2001;61:2035–2063.
- Jacobs BP, Dennehy C, Ramirez G, et al. Milk thistle for the treatment of liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med* 2002;113:506–515.
- Spengler U, Nattermann J. Immunopathogenesis in hepatitis C virus cirrhosis. *Clin Sci (Lond)* 2007;112:141–155.
- Graf TN, Wani MC, Agarwal R, et al. Gram-scale purification of flavanolignan diastereoisomers from *Silybum marianum* (Milk Thistle) extract in support of preclinical *in vivo* studies for prostate cancer chemoprevention. *Planta Med* 2007;73:1495–1501.
- Morishima C, Polyak SJ, Ray R, et al. Hepatitis C virus-specific immune responses and quasi-species variability at baseline are associated with nonresponse to antiviral therapy during advanced hepatitis C. *J Infect Dis* 2006;193:931–940.
- Yano M, Kumada H, Kage M, et al. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996;23:1334–1340.
- Ghany MG, Kleiner DE, Alter H, et al. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003;124:97–104.
- Schumann J, Prockl J, Kiemer AK, et al. Silybinin protects mice from T cell-dependent liver injury. *J Hepatol* 2003;39:333–340.
- Lee JS, Kim SG, Kim HK, et al. Silybinin polarizes Th1/Th2 immune responses through the inhibition of immunostimulatory function of dendritic cells. *J Cell Physiol* 2007;210:385–397.
- Lorenz D, Lucker PW, Mennicke WH, et al. Pharmacokinetic studies with silymarin in human serum and bile. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1984;6:655–661.
- Schrieber SJ, Wen Z, Vourvahis M, et al. The pharmacokinetics of silymarin is altered in patients with hepatitis C virus and nonalcoholic fatty liver disease and correlates with plasma caspase-3/7 activity. *Drug Metab Dispos* 2008;36:1909–1916.
- Hawke RL, Schrieber SJ, Soule TA, et al. Silymarin ascending multiple oral dosing phase I study in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *J Clin Pharm* 2009; Epub ahead of print.
- Wu JW, Lin LC, Hung SC, et al. Analysis of silybinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application. *J Pharm Biomed Anal* 2007;45:635–641.
- Ferenci P, Scherzer TM, Kerschner H, et al. Silybinin is a potent antiviral agent in patients with chronic hepatitis C not responding to pegylated interferon/ribavirin therapy. *Gastroenterology* 2008;135:1561–1567.

Получено 28 октября 2008 г.; принято в печать 15 сентября 2009 г.

Благодарности

Авторы благодарят Melissa A. Silva за техническую поддержку, Jee-Hang Tse за помощь в подготовке рукописи, Terri Mathisen, медицинского регистратора, за помощь в подборе участников исследования, Michael Houghton, PhD, и Kevin Crawford (Chiron Corp) за безвозмездное предоставление белковых антигенов вируса гепатита С.

Конфликты интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Спонсоры

Исследование поддержано грантом R21 AT002895 от Национального центра дополнительной и альтернативной медицины/Национальных институтов здоровья (для S.J.P.) и грантом R01 CA104286 от Национального института рака/Национальных институтов здоровья для выделения чистых компонентов расторопши пятнистой (для T.N.G. и N.H.O.). В сборе данных, представленных в статье, их анализе и интерпретации спонсоры участия не принимали.

Оригинальный усовершенствованный

силимарин + селективное

действие на гепатоциты + *АНТИТОКСИЧЕСКИЕ*

СВОЙСТВА + **препятствует**

фиброзированию ткани +

предотвращает развитие жирового гепатоза +

останавливает прогрессирование

заболеваний печени + доказательства

эффективности в многочисленных РКИ +

одобрен FDA



В России идет регистрация инъекционной формы ЛЕГАЛОН®SIL – силибинина дигидросукцинат 350 мл во фл., №4

Полную информацию о препарате можно прочитать в инструкции по применению.

Регистрационное удостоверение П №011358/01 от 26.06.2009 и П №011359/02 от 24.06.2009

117198, г. Москва, Ленинский пр-кт, 113/1, оф. 404 В. Тел.: +7 (495) 933-67-94

www.rottapfarm-madaus.ru