

Добавка АНСС® для поддержки иммунной функции для лечения персистирующих папилломавирусных инфекций человека

Judith A. Smith^{1,2*}, Anjali A. Gaikwad¹, Lata Mathew¹, Barbara Rech³, Jonathan P. Faro⁴, Joseph A. Luccilli^{1,2}, Yu Bai⁵, Randall J. Olsen⁶ and Teresa T. Byrd¹

¹ Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, UT Health McGovern Medical School, Houston, TX, United States, ² Department of Pharmacy, UT Health-Memorial Hermann Cancer Center, Houston, TX, United States,

³ UT Physicians Women's Center, Houston, TX, United States, ⁴ Specialists in Obstetrics & Gynecology, Houston, TX, United States,

⁵ Department of Pathology, UT Health McGovern Medical School, Houston, TX, United States, ⁶ Department of Molecular Pathology, Houston Methodist Research Institute, Houston, TX, United States

Цель: Определить эффективность, безопасность и продолжительность использования добавки АНСС в течение 6 месяцев для поддержки иммунной системы хозяина в борьбе с инфекциями, вызываемыми вирусом папилломы человека (ВПЧ) высокого риска. Добавка АНСС представляет собой запатентованный стандартизированный экстракт культивированного мицелия *lentinula edodes* (АНСС®, Amino Up, Ltd., Саппоро, Япония), который, как было показано, обладает уникальными иммуномодулирующими свойствами.

Дизайн исследования: Это было рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование (СТН: NCT02405533) с участием 50 женщин старше 30 лет с подтвержденной персистирующей инфекцией ВПЧ высокого риска в течение более 2 лет. Пациенты были рандомизированы для приема плацебо один раз в день в течение 12 месяцев (N = 25) или приема 3 г АНСС перорально один раз в день натощак в течение 6 месяцев с последующим 6-месячным приемом плацебо (N = 25). Каждые 3 месяца у пациентов проводили анализ ДНК ВПЧ и РНК ВПЧ, а также собирали образец крови для оценки панели иммунных маркеров, включая интерферон-альфа, интерферон-бета (IFN- β), интерферон-гамма (IFN- γ), IgG1, Т-лимфоциты и уровни естественных киллеров (NK). По завершении 12-месячного периода исследования пациентам из группы плацебо была предоставлена возможность продолжить исследование, чтобы получать добавку АНСС без слепого наблюдения в течение 6 месяцев с теми же последующими посещениями и тестированием, что и в группе вмешательства.

Отредактировано:

Catherine M. T. Sherwin,
Wright State University, United States

Рассмотрено:

Richard Lee, Case Western Reserve University, United States
Elena Y. Enioutina, The University of Utah, United States

*Корреспонденция:

Judith A. Smith
Judith.Ann.Smith@uth.tmc.edu

Раздел специализации:

This article was submitted to Gynecological Oncology, a section of the journal Frontiers in Oncology

Получено: 03 марта 2022 г.

Одобрено: 25 мая 2022 г.

Опубликовано: 22 июня 2022 г.

Цитирование:

Smith JA, Gaikwad AA, Mathew L, Rech B, Faro JP, Lucci JA III, Bai Y, Olsen RJ and Byrd TT (2022) АНСС® Supplementation to Support Immune Function to Clear Persistent Human Papillomavirus Infections. *Front. Oncol.* 12:881902. doi: 10.3389/fonc.2022.881902

Результаты: В исследование были включены 50 женщин с ВПЧ высокого риска, 41 из которых завершили исследование. Четырнадцать (63,6%) из 22 пациентов в группе, получавшей добавки АНСС, были отрицательными по РНК/ДНК ВПЧ через 6 месяцев, при этом 64,3% (9/14) достигли стойкого ответа, определяемого как отсутствие РНК/ДНК ВПЧ через 6 месяцев после приема добавок. В группе плацебо двое (10,5%) из 19 пациентов были отрицательными по ВПЧ через 12 месяцев. Из двенадцати пациентов группы плацебо, которые решили продолжить открытое исследование, 50% (n = 6) были отрицательными по РНК/ДНК ВПЧ после 6 месяцев приема добавки АНСС. На момент завершения исследования насчитывалось в общей сложности 34 пациента (22 слепых и 12 незаслепленных), которые получали добавку АНСС с общей частотой ответов 58,8%, которые излечили персистентную инфекцию ВПЧ. На момент включения средний уровень IFN- β составлял $60,5 \pm 37,6$ пг/мл у женщин с подтвержденной персистирующей ВПЧ-инфекцией. Подавление IFN- β до уровня менее 20 пг/мл коррелировало с увеличением Т-лимфоцитов и IFN- γ и стойким исчезновением инфекций ВПЧ у женщин, получавших добавки АНСС.

Вывод: результаты этого исследования фазы II показали, что АНСС в дозе 3 г один раз в день был эффективен для поддержки иммунной системы хозяина в устранении персистирующих инфекций ВПЧ и хорошо переносился без сообщений о значительных побочных эффектах. Продолжительность приема добавок АНСС, необходимая после первого отрицательного результата, требует дополнительной оценки, чтобы оптимизировать успех для достижения устойчивых результатов. Подавление уровня IFN- β до уровня менее 20 пг/мл коррелирует с элиминацией ВПЧ-инфекций и заслуживает дальнейшей оценки в качестве клинического инструмента для наблюдения за пациентами с ВПЧ-инфекциями.

Регистрация клинических испытаний:

Clinicaltrials.gov/ct2/, идентификатор NCT02405533.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус папилломы человека (ВПЧ) классифицируется как безоболочечный вирус с двухцепочечной ДНК, который обычно поражает эпителиальный слой клеток, включая поверхности кожи и слизистых оболочек, и ассоциируется с доброкачественными бородавками, а так же с карциномой *in situ* и злокачественными поражениями (1, 2).

У людей идентифицировано более 100 штаммов ВПЧ, 40 штаммов ВПЧ низкого риска (LR-HPV), связанных с генитальными бородавками/поражениями, и пятнадцать штаммов ВПЧ высокого риска (HR-HPV), связанных с раком. Когда инфекции HR-HPV сохраняются с течением времени, у пациентов повышается риск развития рака (3).

Однако следует отметить, что персистирующая ВПЧ-инфекция высокого риска сама по себе не вызывает рак; скорее, это сопутствующий фактор риска развития рака, когда он возникает в сочетании с другими нарушениями, такими как плохое питание, курение, физиологический стресс или иммунная дисфункция/подавление. По оценкам, в США насчитывается 85 890 случаев рака, вызванных персистирующими инфекциями ВПЧ высокого риска, и сегодня около 79 миллионов американцев инфицированы ВПЧ (4, 5).

Хотя вакцинация против ВПЧ эффективна для профилактики ВПЧ-инфекций, она малоэффективна для лечения пациентов, уже инфицированных ВПЧ (6). Существует очень мало эффективных вариантов лечения для ликвидации инфекций ВПЧ высокого риска. Цель современных методов лечения заключается в раннем выявлении с помощью рутинного скрининга мазка Папаниколау и последующем лечении с использованием криотерапии, хирургического иссечения, процедуры петлевой электрохирургической иссечения (LEEP) или конизации холодным ножом. Эти процедуры имеют более высокую скорость ответа от 80% до 100%. Это местное лечение удаляет поражение, но у пациентов часто возникают рецидивы поражения. Другие методы лечения, используемые для лечения ВПЧ, включают местное применение подофиллотоксина с частотой рецидивов до 40% или имиквимода с примерно 15% рецидивов (7, 8).

На сегодняшний день не существует эффективного системного лечения персистирующих ВПЧ-инфекций высокого риска.

АНСС представляет собой запатентованный стандартизированный экстракт культивируемого мицелия *lentinula edodes* (АНСС®, Amino Up, Ltd., Саппоро, Япония), разработанный в Японии в 1992 г.; соединение в основном состоит из компонентов α -глюкана. В нескольких исследованиях на животных и людях сообщалось о различных терапевтических эффектах, включая антиоксидантную и противораковую активность и модуляцию иммунной системы для предотвращения инфекционных процессов как вирусных, так и бактериальных инфекций (9–14). В клинических исследованиях АНСС продемонстрировал преимущество в

снижении риска инфекции и облегчении симптомов существующих инфекций (11).

Недавно были проведены два пилотных исследования на женщинах, у которых был зарегистрирован персистирующий ВПЧ-положительный статус в течение более 2 лет, которые в остальном были здоровы и соответствовали остальным критериям приемлемости (15). Десять женщин были включены в первое исследование для оценки эффективности добавок АНСС в дозе 3 г перорально один раз в день для поддержки иммунной системы хозяина для устранения стойких инфекций ВПЧ высокого риска. Схема повторялась ежемесячно до тех пор, пока у пациента не возникнет отрицательный результат на ВПЧ или пока не истечет 6 месяцев активного лечения. Пациентов с положительным результатом теста после 6 месяцев лечения считали неудачным лечением. Тестирование на ВПЧ и скрининг панели иммунных маркеров проводились один раз в месяц для контроля за элиминацией персистентных инфекций ВПЧ высокого риска. Обнадеживающий ответ наблюдался у 4 из 8 (50%) пациентов с подтвержденной эрадикацией ДНК HR-HPV после как минимум 3 месяцев и до 6 месяцев ежедневного приема 3 г АНСС (15). Во втором пилотном исследовании с добавлением 1 г АНСС один раз в день аналогичный ответ наблюдался у 4 из 9 (44%) пациентов с подтвержденным исчезновением персистирующих инфекций ВПЧ высокого риска после 7 месяцев приема (15). Эти результаты двух пилотных исследований подтверждают предыдущие доклинические данные о том, что добавки АНСС могут быть эффективными для поддержки иммунной системы хозяина для устранения стойких инфекций ВПЧ высокого риска, и поддерживают обоснование продолжения формальной оценки фазы II для подтверждения этих предварительные выводы (16).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Это было рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы II с неслепым АНСС после исследования (рис. 1), которое было рассмотрено и одобрено

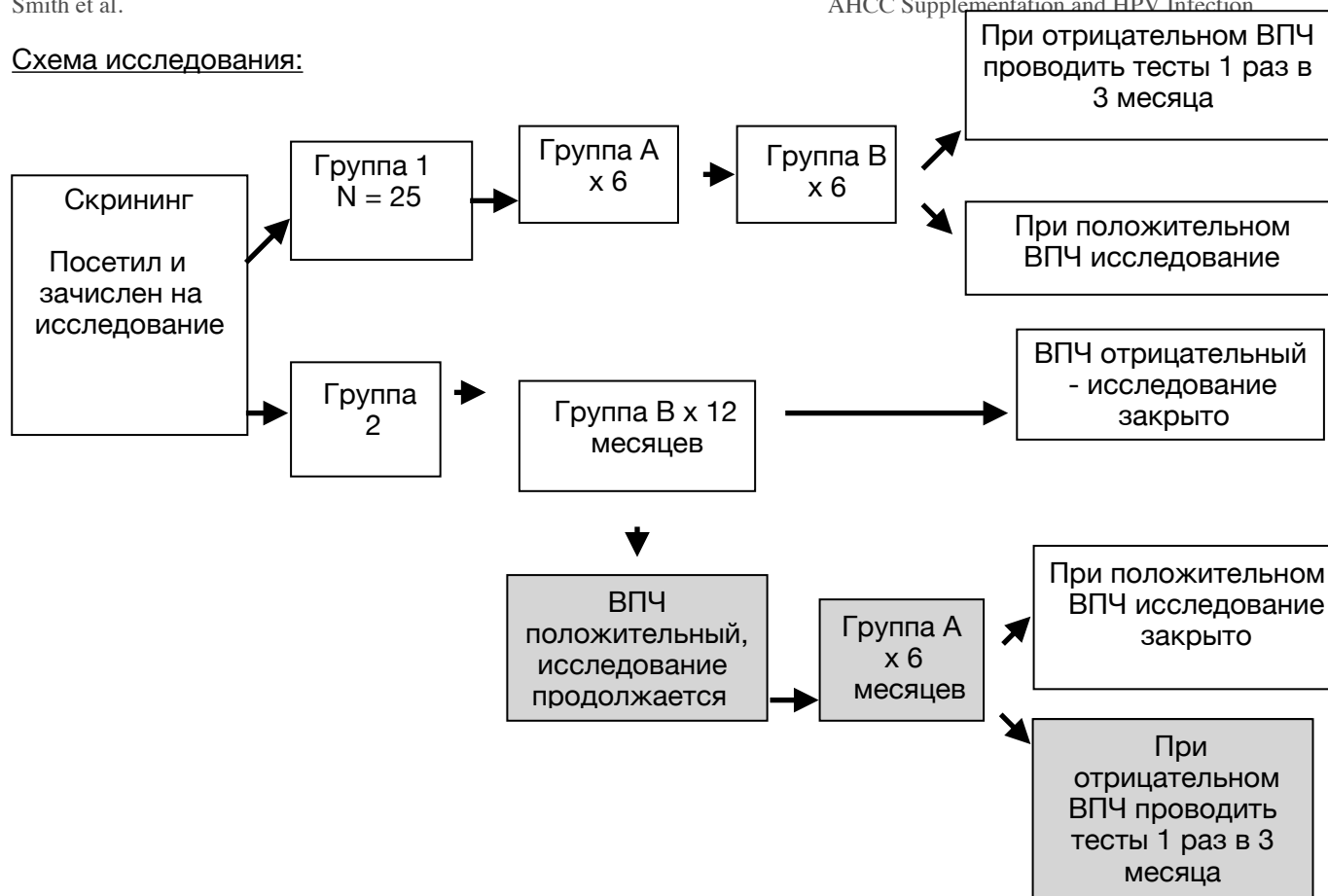
Схема исследования:

РИСУНОК 1 | Дизайн исследования для набора пациентов. Эта схема объясняет, как пациенты были рандомизированы, и степень последующего наблюдения на основе ответа вируса папилломы человека (ВПЧ) через 12 месяцев.

Институциональным наблюдательным советом Центра медицинских наук Техасского университета HSC-MS14-0866/NCT02405533.

Исследование проводилось у женщин в возрасте старше 30 лет с документально подтвержденными персистирующими инфекциями ВПЧ высокого риска в течение более 2 лет, все лабораторные показатели были в пределах нормы, имели нормальную гистологию вплоть до цервикальной интраэпителиальной неоплазии 2 (CIN2), как задокументировано по записям основного гинеколога и признаны здоровыми по всем другим показателям. На протяжении всего исследования собиралась демографическая информация о пациентах, включая

количество сексуальных партнеров на протяжении всей жизни, методы контрацепции и периодические тесты на беременность. АНСС и соответствующее плацебо были щедро предоставлены Amino Up, Ltd. (Саппоро, Япония).

После того, как соответствие было подтверждено на основании критериев, приведенных в Таблице 1, пациенты дали подписанное информированное согласие и были справедливо рандомизированы с помощью компьютерной платформы между двумя исследовательскими группами, так что после включения 30 пациентов в каждой группе было по 15 пациентов, а по завершении исследования при включении в исследование в каждой группе было по 25

пациентов. Группа 1 служила группой вмешательства и получала добавку АНСС в дозе 3 г перорально натошак один раз в день в течение 6 месяцев, после чего в течение 6 месяцев принимали плацебо перорально натошак. Цель 6-месячного плацебо в группе 1 состояла в том, чтобы облегчить сохранение ослепления в течение 12-месячного периода исследования. Группа 2 служила контрольной группой и получала плацебо перорально натошак в течение 12 месяцев.

Во время исследования пациенты наблюдались один раз каждые 3 месяца с визитом в клинику для просмотра дневника приема таблеток для оценки соблюдения режима лечения, оценки любой токсичности, возникшей в течение предыдущих 90 дней, и сбора образцов ВПЧ с помощью цервикального мазка/щетки и образца периферической крови. Исследование было открытым через 12 месяцев, чтобы определить статус ВПЧ и результаты иммунных маркеров, а также выявить группы исследования. Все пациенты, которые получали АНСС и были отрицательными по ВПЧ через 12 месяцев, находились под наблюдением в течение дополнительных 6 месяцев (в общей сложности 12 месяцев наблюдения после завершения приема АНСС). Через 12 месяцев, если пациенты из контрольной группы, получавшие плацебо, все еще оставались ВПЧ-позитивными, им предлагалось продолжить прием АНСС вслепую, чтобы получить больше информации о его токсичности и эффективности. Цель «перехода» после временной точки раскрытия заключалась в том, чтобы также помочь увеличить набор и зачисление, поскольку АНСС является легкодоступной пищевой добавкой.

Первичным результатом этого исследования была оценка элиминации персистирующей ВПЧ-инфекции высокого риска, определяемой отрицательными результатами теста на ДНК ВПЧ, достигнутыми при приеме добавки АНСС и сохраняемыми в течение 3, 6 и 12 месяцев

после завершения приема добавки АНСС по сравнению с приемом плацебо. Через 12 месяцев, после приема добавок АНСС в течение 6 месяцев, если у пациентов все еще была положительная ДНК ВПЧ, это считалось неудачей лечения или отсутствием ответа (NR), и они выходили из исследования. В случае отрицательного результата после завершения 6 месяцев приема АНСС и 6 месяцев приема плацебо пациенты продолжали исследование еще в течение 6 месяцев (два посещения), чтобы подтвердить, что они остаются отрицательными по ВПЧ, и оценить стойкость ответа. Полный ответ (ПО) определял тех пациентов, которые были отрицательными по РНК ВПЧ и ДНК ВПЧ на момент завершения приема АНСС и оставались отрицательными по РНК ВПЧ и ДНК ВПЧ в течение 12 месяцев наблюдения после приема АНСС. Частичный ответ (ЧО) был определен у пациентов, у которых на момент завершения приема АНСС была отрицательная реакция на РНК ВПЧ и ДНК ВПЧ, но затем были получены положительные результаты на РНК ВПЧ или ДНК ВПЧ при одном или нескольких визитах в течение 12 месяцев наблюдения после добавки АНСС. 2-я группа служила контролем для всех временных точек на протяжении всего исследования. Данные по безопасности и эффективности были собраны у пациентов, которые решили продолжить прием добавок АНСС без слепого метода в течение 6 месяцев.

Сбор и обработка проб

При каждом посещении гинекологический образец (со стенки шейки матки или влагалища) собирали тремя способами — цитологической щеткой, цитологической щеткой другого типа и цервикальным шпателем — для обеспечения адекватного образца и переносили во флакон с жидким гинекологическим образцом ThinPrep® (Hologic, Inc., Мальборо, Массачусетс, США). Двенадцать миллилитров цельной крови собирали в пробирки с ЭДТА (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния, США)

ТАБЛИЦА 1 | Критерии включения и исключения для исследования фазы II.

Критерии включения:	Критерии исключения:
<ul style="list-style-type: none"> Женщины старше 30 лет с положительным тестом на ВПЧ и нормальной/отрицательной цитологией, атипичными клетками, ASCUS или дисплазией шейки матки CIN1 или CIN2 в течение 3 месяцев после включения в исследование. Это свело к минимуму потенциальные помехи, такие как иммунная модуляция, которая может устранить инфекцию, что часто встречается у женщин в возрасте до 26 лет. 	<ul style="list-style-type: none"> История инфаркта миокарда в течение последних 6 месяцев, нестабильная стенокардия, ЗСН или неконтролируемая гипертензия (>140/90).
<ul style="list-style-type: none"> Женщины должны пройти 2 других ВПЧ-положительных теста с нормальной/отрицательной цитологией, атипичными клетками, ASCUS или дисплазией шейки матки CIN1 или CIN2. <ul style="list-style-type: none"> 1 более 6 месяцев и не более 18 месяцев до начала исследования и 1 более чем за 24 месяца до начала исследования. (Это должно помочь установить персистентную инфекцию ВПЧ.) 	<ul style="list-style-type: none"> Женщины с текущим или ранее диагностированным раком.
<ul style="list-style-type: none"> Женщины детородного возраста должны иметь отрицательный результат теста мочи на беременность в течение 7 дней до начала терапии. 	<ul style="list-style-type: none"> Женщины с текущим диагнозом дисплазии шейки матки CIN3.
<ul style="list-style-type: none"> Пациенты должны иметь адекватные гематологические, почечные и печеночные функции, как отмечено в лабораторных исследованиях в течение предыдущих 12 месяцев: АЧН ≥ 1500 клеток/мм³, тромбоциты $100\ 000 \geq$ клеток/мм³; клиренс креатинина ≥ 60 мл/мин (по уравнению Кокрофта-Голта), общий билирубин, SGPT, SGOT и щелочная фосфатаза $\leq 1,5$ раза выше нормы. 	<ul style="list-style-type: none"> Женщины, которые в настоящее время принимают другие иммуномодулирующие пищевые добавки.
<ul style="list-style-type: none"> Пациентки детородного возраста должны дать согласие на использование эффективных методов контрацепции (оральные контрацептивы, презервативы и т.д.) во время исследования. 	<ul style="list-style-type: none"> Женщины с гепатитом (аутоиммунным, А, В или С) в анамнезе или с положительным антигеном.
<ul style="list-style-type: none"> Пациенты должны предоставить одобренное информированное согласие, указывающее, что они осведомлены о исследовательском характере этого исследования. 	<ul style="list-style-type: none"> Пациенты со значительными психическими расстройствами в анамнезе (шизофрения, биполярное расстройство и психоз) или неконтролируемые припадки.
<ul style="list-style-type: none"> Пациенты должны согласиться вернуться в клинику для последующих посещений (включая повторное тестирование на ВПЧ) и заполнить календарь приема лекарств. 	<ul style="list-style-type: none"> Пациенты с серьезными сопутствующими заболеваниями на усмотрение главного гинеколога. Включая иммуносупрессивные состояния (например, ВИЧ+ и ревматоидный артрит) или прием средств иммуномодуляции (например, иммунодепрессантов).
	<ul style="list-style-type: none"> Женщины, самостоятельно принимавшие коммерческий препарат АНСС в течение последних 6 месяцев. Те, кто принимал участие в пилотном исследовании АНСС 1 г в день, имеют право участвовать в этом исследовании.
	<ul style="list-style-type: none"> Беременные или кормящие женщины.

ASCUS, атипичные плоскоклеточные клетки неопределенного значения; ANC, абсолютное число нейтрофилов; SGPT, сывороточная глутаминовая пировиноградная трансаминаза; SGOT, сывороточная глутамин-оксалоуксусная трансаминаза; ВПЧ, вирус папилломы человека; ХСН, застойная сердечная недостаточность.

у всех пациентов при каждом посещении. Все образцы крови центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин, а образцы плазмы отделяли и хранили при температуре -80°C в течение 6 ч после сбора до дальнейшего использования. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из оставшейся крови путем центрифугирования в градиенте плотности над средой для разделения лимфоцитов Ficoll (Lonza, Базель, Швейцария) с использованием протокола производителя. PBMC были криоконсервированы в среде для замораживания, содержащей 90% фетальной телячьей сыворотки (FBS) и 10% диметилсульфоксида (DMCO) в жидком азоте (-196°C) до дальнейшего использования. FBS была приобретена у GIBCO Invitrogen Co. (Карлсбад, Калифорния, США). DMCO был приобретен у Sigma-Aldrich Co. (Сент-Луис, Миссури, США).

Анализ образцов вируса папилломы человека

Образцы ВПЧ первоначально оценивали с помощью тестирования РНК ВПЧ E6/E7 (ARTIMA, Hologic, Мальборо, Массачусетс, США) в лаборатории молекулярной патологии Медицинской школы Макговерна UTHealth. Отрицательные результаты на РНК ВПЧ были подтверждены с помощью теста ДНК ВПЧ COBAS (Roche Molecular Systems, Inc., Бранчбург, штат Нью-Джерси, США) в лаборатории методической молекулярной патологии для выявления присутствия ДНК ВПЧ и исключения латентных инфекций ВПЧ.

Анализ иммунных маркеров и естественных клеток-киллеров

Готовые к использованию сэндвич-наборы ELISA для обнаружения человеческого интерферона-альфа и бета были приобретены у R&D Systems (Миннеаполис, Миннесота, США). Наборы для ELISA человеческого интерферона-гамма (IFN-g) и

IgG1 были приобретены у Affymetrix eBioscience (Сан-Диего, Калифорния, США). Сэндвич-ИФА для обнаружения общего IgG1, интерферона-альфа, интерферона-бета и интерферона-гамма выполняли в соответствии с протоколом производителя. Для каждой серии определений иммунных маркеров строили стандартную кривую с известными концентрациями этих маркеров, поставляемых с наборами. Концентрации этих иммунных маркеров в плазме в каждый момент времени рассчитывали по стандартным графикам и сравнивали с исходными концентрациями. Для идентификации и количественного определения человеческих естественных клеток-киллеров (NK-клеток) использовали пять мышиных антител против человека: клон CD56 APC, B159; клон CD3 PerCP-Cy5.5, UCST1; клон CD2 PE, RPA 2,10; клон CD7 FITC, M-T701; и клон CD45 APC-H7, 2D1. Все антитела и лизирующие растворы для сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) были приобретены у BD Biosciences (Сан-Хосе, Калифорния, США). Для проточного цитометрического анализа человеческих NK-клеток PBMC, криоконсервированные в каждый момент времени, осторожно оттаивали и центрифугировали с 5 мл полной среды при 1500 об/мин в течение 5 мин при 4°C . Осадки клеток повторно суспендировали в 100 мкл буфера FACS (фосфатно-солевой буфер (PBS) с 5% FBS). Для окрашивания клеток одну серию клеток из каждого образца инкубировали с 5 мкл CD45 APC, а вторую серию клеток инкубировали с 50 мкл коктейля из пяти антител в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре согласно протокол производителя. После инкубации во все пробирки добавляли по 1 мл лизирующего буфера FACS и инкубировали в течение 5 мин в темноте при комнатной температуре. Для прекращения лизиса клеток сразу после инкубации в каждую пробирку добавляли по 1 мл PBS. Затем все пробирки центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин, клетки

ресуспендировали в 500 мкл буфера FACS и хранили при 4°C. Окрашенные клетки получали с помощью LSR II (BD Biosciences), а для анализа использовали программное обеспечение Diva. При использовании прямого и бокового рассеяния популяция лимфоцитов была отобрана по низкому боковому рассеянию и яркой популяции CD45 при получении 50 000 включенных событий. Популяцию NK-клеток затем идентифицировали как (CD3-отрицательные, CD2, CD56C и CD7-положительные) клетки. Для окончательного анализа был получен процент Т-клеток и NK-клеток из ворот лимфоцитов.

Статистический анализ

В этой популяции женщин с персистирующей инфекцией ВПЧ ожидаемая эрадикация или устранение ВПЧ-инфекции самостоятельно составляет от нуля до 10%. Целевой показатель успеха, основанный на данных пилотного исследования, составил 50% через 6 месяцев после окончания приема АНСС и через 12 месяцев после окончания приема. На основе этих пропорций, 10% клиренса без добавок и 50% клиренса с добавками, был проведен анализ мощности с использованием моделирования данных в Mplus 7.2 посредством многоэтапного процесса (17). Ожидалось, что пропорциональная разница будет наблюдаться между группой 1, принимающей добавки АНСС, и группой плацебо-контроля 2 в конце 6 месяцев после лечения. При доверительном уровне 0,05 выборка максимум из 50 пациентов (N = 25 в группе) имеет мощность 94,5% для достижения обнаружения эффекта исследуемого вмешательства. Исходные характеристики пациентов по исследуемым группам сравнивались с использованием критерия хи-квадрат для категориальных переменных и критерия Стьюдента для непрерывных переменных. Критерий Манна-Уитни использовали для оценки различий в показателях ответа на основе продолжительности ответа на ВПЧ (NR, PR

и CR) между исследуемыми группами, которые ответили, по сравнению с не ответившими. Стьюдентский t-критерий использовался для оценки различий между иммунными маркерами между добавками АНСС и плацебо. Все анализы проводились с помощью программного обеспечения SPSS (версия 24) (IBM, Нью-Йорк, штат Нью-Йорк, США). Все значения p были двусторонними, при этом значения p менее 0,05 считались значимыми.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

В это исследование были включены 50 женщин с ВПЧ высокого риска, и 41 женщина завершила исследование (рис. 2). У всех пациентов была подтверждена ВПЧ-инфекция высокого риска в течение более 2 лет, и она была подтверждена снова во время включения в исследование. Пациенты в группе плацебо и добавки АНСС были схожи по возрасту, расе/этнической принадлежности, индексу массы тела (ИМТ), количеству предыдущих сексуальных партнеров и количеству текущих партнеров во время исследования. Демографические данные пациентов приведены в Таблице 2. Четырнадцать (63,6%) из 22 пациентов в группе, получавшей добавки АНСС, через 6 месяцев оказались отрицательными по РНК/ДНК ВПЧ. Девять из 14 (64,3%) пациентов все еще были ВПЧ-отрицательными с помощью методов анализа РНК ВПЧ и ДНК ВПЧ через 12 месяцев после прекращения приема добавок АНСС. Два из 14 (14,3%) пациентов были ВПЧ-позитивными с помощью методов анализа РНК ВПЧ и ДНК ВПЧ после прекращения АНСС через 12 месяцев. Восемь из 22 (36,3%) пациенты в группе АНСС были ВПЧ-положительны как с помощью методов анализа РНК ВПЧ, так и с помощью методов анализа ДНК ВПЧ после 6 месяцев приема добавок АНСС. В группе плацебо двое (10,5%) из 19 пациентов были отрицательными по ВПЧ через 12 месяцев. Семнадцать (89,5%) пациентов оставались положительными по ВПЧ в

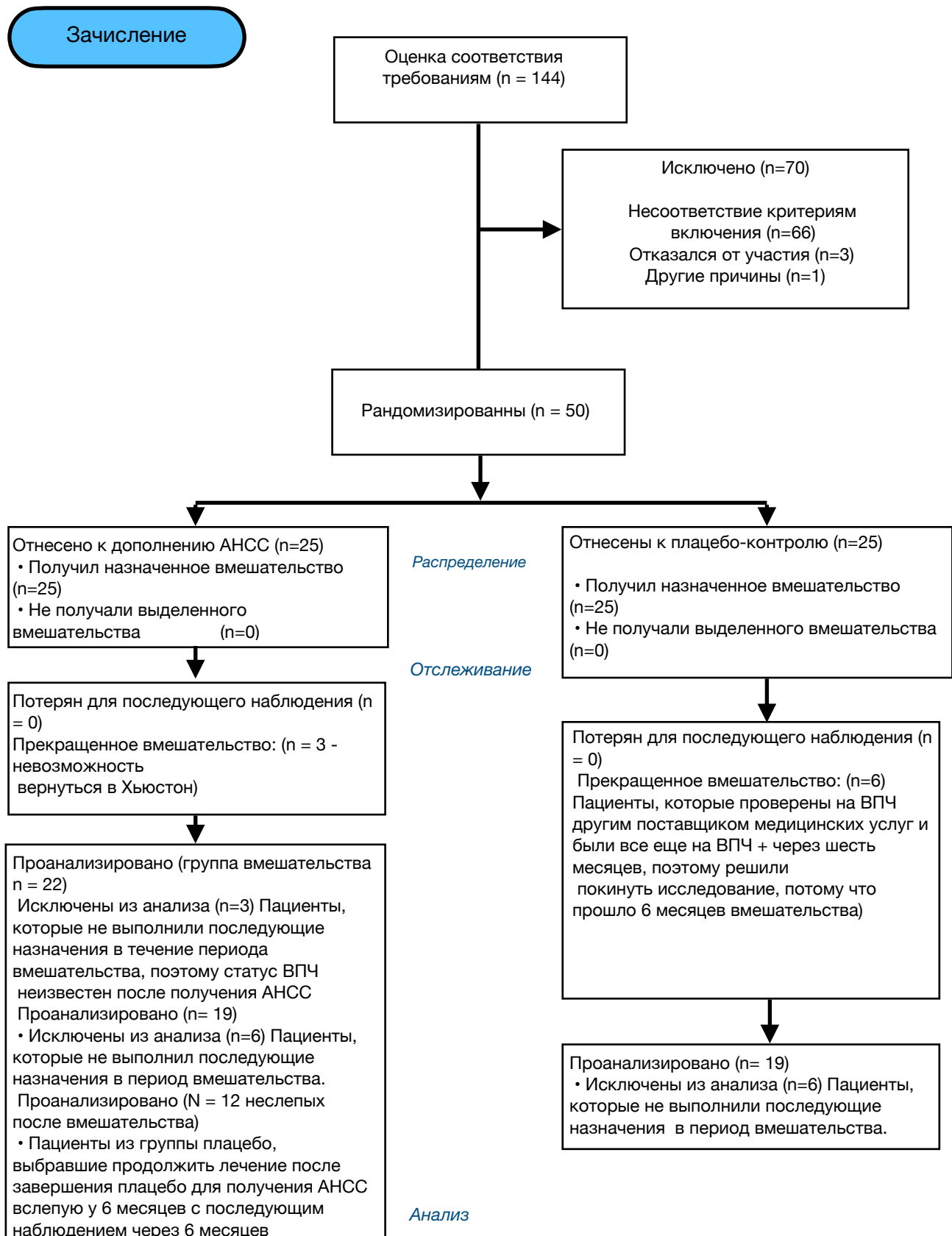


РИСУНОК 2 | Резюме регистрации пациентов и анализа. Эта диаграмма CONSORT суммирует общее количество пациентов, включенных в исследование, завершивших исследование и включенных в анализ данных.

ТАБЛИЦА 2 | Резюме демографических данных пациентов.

	Плацебо (N=19) Среднее стандартное отклонение	АНСС (N=22) Среднее стандартное отклонение
Возраст	46.4 (± 13.5)	42.8 (± 8.9)
Раса	15 светлокожих 3 темнокожих 1 азиат	19 светлокожих 1 американский индеец 1 темнокожий 1 другой
ИМТ (кг/м²)	23.8 (± 13.4)	21 (± 11)
Кол-во половых партнеров	6.3 (± 7.9)	7.8 (± 6.4)
Кол-во партнеров за последний год	1 (± 1)	1 (± 1)

После соответствия критериям приемлемости пациенты были рандомизированы либо в группу АНСС, либо в группу плацебо. Эта таблица обобщает демографическую информацию. Статистических различий между двумя группами не было.

ИМТ, индекс массы тела.

ТАБЛИЦА 3 | Резюме ответа ВПЧ.

Исход	Плацебо (N=19)	Слепая АНСС (N=22)	Пациенты, получавшие плацебо, перешедшие на незаслепленный АНСС (N=12)	Все пациенты АНСС (N=34)
Общая скорость	10.5% (2)	63.6 (14)	50% (6)	58.8% (20)
CR (полный ответ): ВПЧ-отрицательный после 12 мес прекращения АНСС)	10.5% (2)	40.9% (9)	50% (6)	44.1% (15)
PR (частичный ответ)	нет	22.7% (5)	нет	22.7% (5)
Нет ответа	89.5% (17)	36.3% (8)	50% (6)	41.1 (14)

Первичной конечной точкой этого исследования было подтверждение клиренса ВПЧ с помощью тестирования как РНК ВПЧ, так и ДНК ВПЧ. Полный ответ (CR) был определен как пациенты, которые были отрицательными по РНК/ДНК ВПЧ после 6 месяцев приема добавок АНСС и продолжали быть отрицательными по РНК/ДНК ВПЧ через 6 месяцев после приема добавок АНСС. Частичный ответ был определен как пациенты, которые были отрицательными по ДНК и РНК ВПЧ после 6 месяцев приема добавок АНСС, но после 6 месяцев прекращения приема добавок АНСС больше не были отрицательными по ДНК ВПЧ. Отсутствие ответа определяли как тех пациентов, которые оставались положительными по ДНК ВПЧ на протяжении всего исследования. ВПЧ, вирус папилломы человека

конце 12 месяцев. Двенадцать пациентов завершили открытое исследование, и 50% ($n = 6$) были отрицательными по РНК/ДНК ВПЧ после 6 месяцев приема добавок АНСС. Объединение всех 34 пациентов, получавших добавки АНСС, дает общий уровень ответа 58,8%, который излечил персистентную инфекцию ВПЧ. Эти результаты обобщены в таблице 3. Все пациенты были включены в анализ безопасности для сравнения профиля токсичности добавки АНСС с плацебо. Ни один пациент не сообщил о степени выше 1 (Общие терминологические критерии нежелательных явлений (СТСАЕ) V5.0, 2018 г.) ни при приеме плацебо, ни при приеме добавок АНСС, а нежелательные явления исчезли в течение первого месяца исследования. Ни один пациент не прекратил исследование из-за нежелательных явлений. Профиль токсичности добавок АНСС был сравним с плацебо (таблица 4). ИФА и проточный анализ общего числа лимфоцитов и НК-клеток, выполненные в образцах плазмы в разные моменты времени у 41 пациента, завершившего исследование, показали, что подавление IFN- β до уровня менее 20 пг/мл коррелирует с увеличением Т-лимфоцитов и IFN- γ и устранение инфекций ВПЧ у женщин, получавших добавки АНСС. Среднее процентное изменение Т-лимфоцитов по сравнению с исходным уровнем составляло от 25% до 45% у полных респондеров, что было статистически значимым. Было отмечено среднее увеличение Т-лимфоцитов через 6 месяцев на 45% как у полных, так и у частичных ответчиков, в то время как у пациентов, не ответивших на лечение, и у пациентов, получавших плацебо, значительных изменений Т-лимфоцитов не наблюдалось. Среднее процентное изменение НК-клеток было менее 10% от исходного уровня и не было статистически значимым во всех группах. Эти результаты представлены на рисунках 3, 4.

ОБСУЖДЕНИЕ

Это было первое двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование, которое продемонстрировало, что пищевая добавка АНСС эффективна в устранении персистирующих ВПЧ-инфекций высокого риска с длительным ответом у тех пациентов, у которых уровень IFN- β был ниже 20 пг/мл. В целом, АНСС хорошо переносился и имел сопоставимые побочные эффекты по сравнению с плацебо.

В настоящее время существует ограниченное количество эффективных вариантов лечения персистирующих инфекций ВПЧ-ВПЧ, и большинство из них включают инвазивные процедуры или местное местное лечение, которые не обязательно останавливают возвращение вируса ВПЧ в это место или в потенциально другие инфицированные области тела, такие как анус или инфицированный эпителий головы и шеи. К счастью, большинство пациентов со здоровой иммунной системой избавляются от ВПЧ высокого риска в течение 6–18 месяцев самостоятельно без каких-либо вмешательств (16, 18). Только около 10% пациентов обычно страдают персистирующей инфекцией ВПЧ (16, 18). Не существует других системных вмешательств, которые, как было бы доказано, дают стойкий ответ на устранение персистирующих инфекций ВПЧ.

АНСС представляет собой запатентованный стандартизированный экстракт культивированного мицелия *lentinula edodes* (АНСС®, Amino Up, Ltd., Саппоро, Япония); соединение в основном состоит из компонентов α -глюкана по сравнению с большинством экстрактов грибов, которые состоят из компонентов β -глюкана.

АНСС проявляет уникальную иммунную модуляцию для снижения гиперстимулированного уровня IFN- β , что приводит к отрицательной обратной связи, запускающей высвобождение IFN- γ и Т-лимфоцитов, необходимых для устранения хронических вирусных инфекций (17). Эта перезагрузка иммунитета хозяина была продемонстрирована в двух независимых исследованиях Уилсона с коллегами и

Тейджаро с коллегами, которые оценивали персистирующие инфекции, вызванные вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и продемонстрировали, что подавление хронической передачи сигналов IFN- β может сбросить иммунитет хозяина и обеспечить контроль, и устранение стойких вирусных инфекций (19, 20). В целом, экстракты β -глюкановых грибов являются иммуностимуляторами пути IFN- β , которые помогают поддерживать иммунную систему при острых инфекциях, но не так сильно при хронических вирусных инфекциях. Ранее Гао и его коллеги продемонстрировали иммуномодулирующие эффекты АНСС в исследовании, которое показало усиленную активацию антигена (Ag) CD4 (+) и CD8 (+) Т-клеток, а также увеличение количества NK-клеток (10). Кроме того, Roorngam и его коллеги продемонстрировали, что β -глюканы полисахаридов серой вешенки (*Pleurotus sajorcaju*) обладают мощной иммуномодулирующей активностью (21). Иммуномодуляция грибного полисахарида усиливает размножение CD4+/CD8+ Т-клеток (21). Данные этого клинического исследования также показали значительное увеличение Т-лимфоцитов у пациентов, которые принимали добавки АНСС.

Иммунная система человека начинает ослабевать примерно в возрасте 25 лет, что, возможно, может быть фактором, способствующим тому, почему персистирующие ВПЧ-инфекции чаще всего наблюдаются у женщин старше 30 лет или с другими иммунодепрессивными состояниями.

Это исследование фазы II подтвердило результаты двух предыдущих пилотных исследований, которые продемонстрировали, что добавка АНСС будет модулировать иммунную систему хозяина для устранения стойких инфекций ВПЧ высокого риска (14). Хотя это может помочь не всем пациентам, в отсутствие других системных методов лечения клиницисты могут рекомендовать АНСС, которая представляет собой легкодоступную пищевую добавку, которая дает хорошие шансы на излечение от персистирующих инфекций ВПЧ.

Ранее были проведены два пилотных исследования по оценке добавок АНСС у женщин с персистирующей инфекцией HR-HPV определили, что уровни IFN- β менее 20 пг/мл коррелируют с элиминацией HR-HPV (17). Это исследование фазы II подтвердило корреляцию между подавленными уровнями IFN- β до уровня менее 20 пг/мл и увеличением Т-лимфоцитов и IFN- γ , что в конечном итоге привело к исчезновению инфекций ВПЧ у женщин, получавших добавки АНСС. У тех пациентов, которые были отрицательными по РНК ВПЧ/ДНК ВПЧ после 6 месяцев приема АНСС, но имели средний уровень IFN- β выше 20 пг/мл, двое оставались отрицательными по РНК ВПЧ, но положительными по ДНК ВПЧ, а трое имели как РНК ВПЧ, так и ВПЧ положительный ДНК через 3 месяца после прекращения приема добавок. Это определило возможность для будущих исследований по оптимизации и персонализации продолжительности приема добавок как для статуса инфекции ВПЧ, так и для целевого уровня IFN- β . Кроме того, данные этого исследования выявили потенциальную возможность использования мониторинга уровней IFN- β , который можно было бы использовать как для мужчин, так и для женщин с ВПЧ-инфекцией. Хотя это исследование было сосредоточено на женщинах с инфекциями HR-HPV, в отсутствие эффективных инструментов тестирования на статус ВПЧ у мужчин и с профилем безопасности, сравнимым с плацебо, использование добавок АНСС для мужчин с известным воздействием HR-HPV (т.е. партнеры женщин с HR-HPV), а также женщины с инфекциями LR-HPV могут рассмотреть возможность приема добавок АНСС для устранения инфекции HPV. Это исследование фазы II было поддержано доклиническими исследованиями *in vitro*, исследованиями на животных *in vivo* и двумя пилотными исследованиями, которые определили механизм действия и подтвердили преимущества добавок АНСС для устранения персистирующих инфекций ВПЧ.

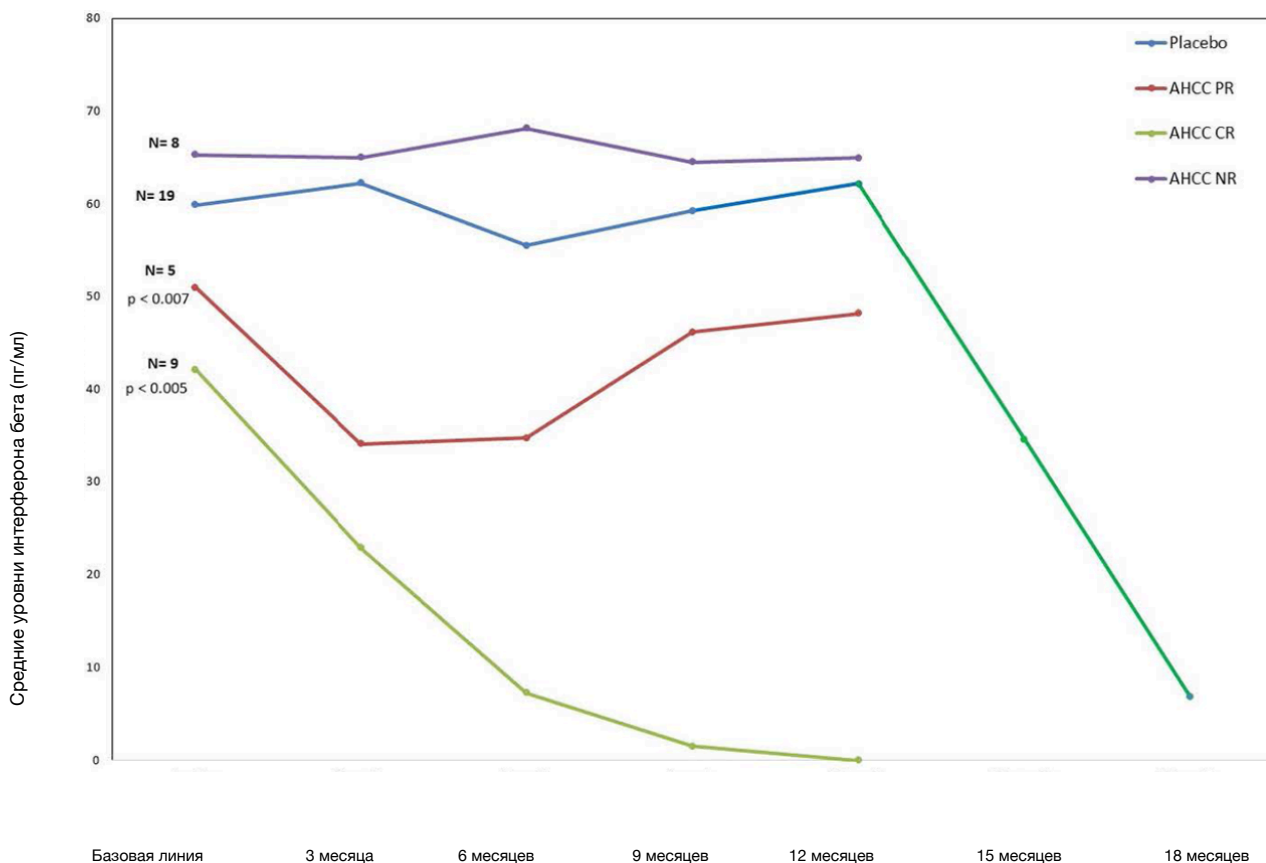
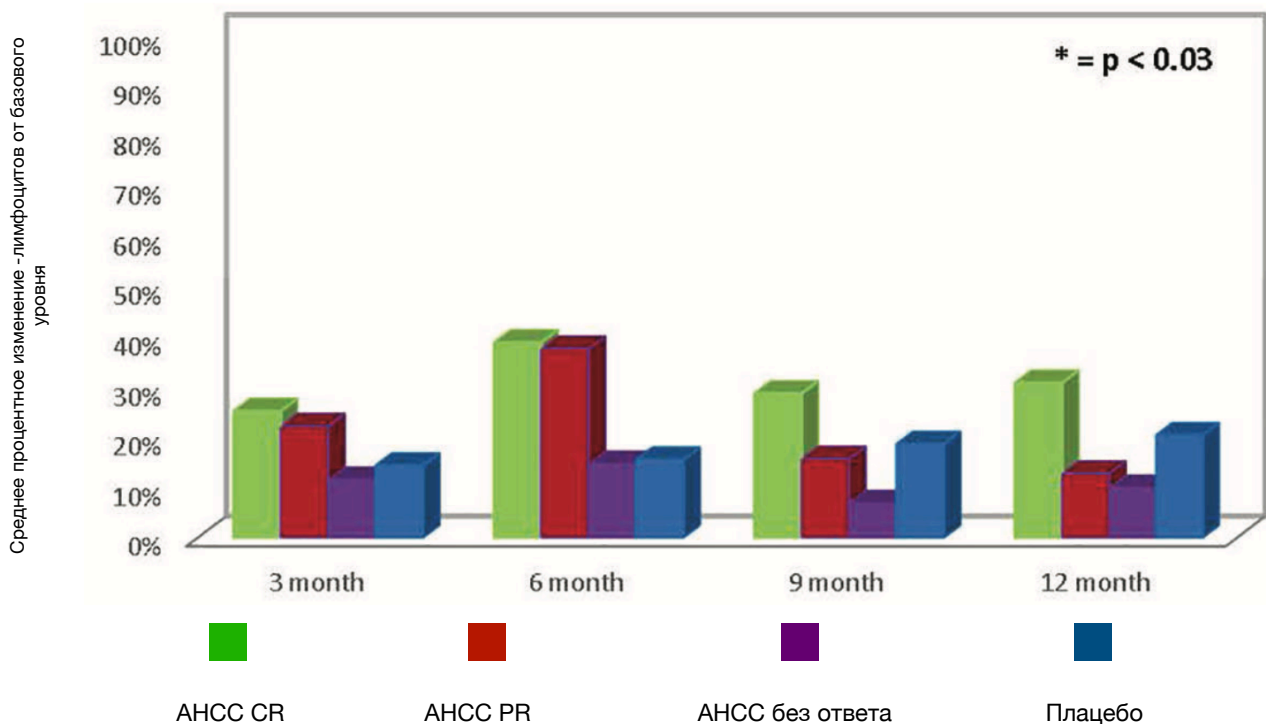


РИСУНОК 3 | Сводка ответа пациента на бета-интерферон (IFN- β) фазы II. Этот график хорошо показывает, как уровни IFN- β снижались у пациентов, получавших АНСС. Если уровень падает ниже 20 пг/мл, это ассоциировалось со стойким клиренсом папилломавирусной инфекции (ВПЧ). Значительное снижение IFN- β (зеленая линия) через 12 месяцев представляет уровни у пациентов, получавших неслепую добавку АНСС.

A



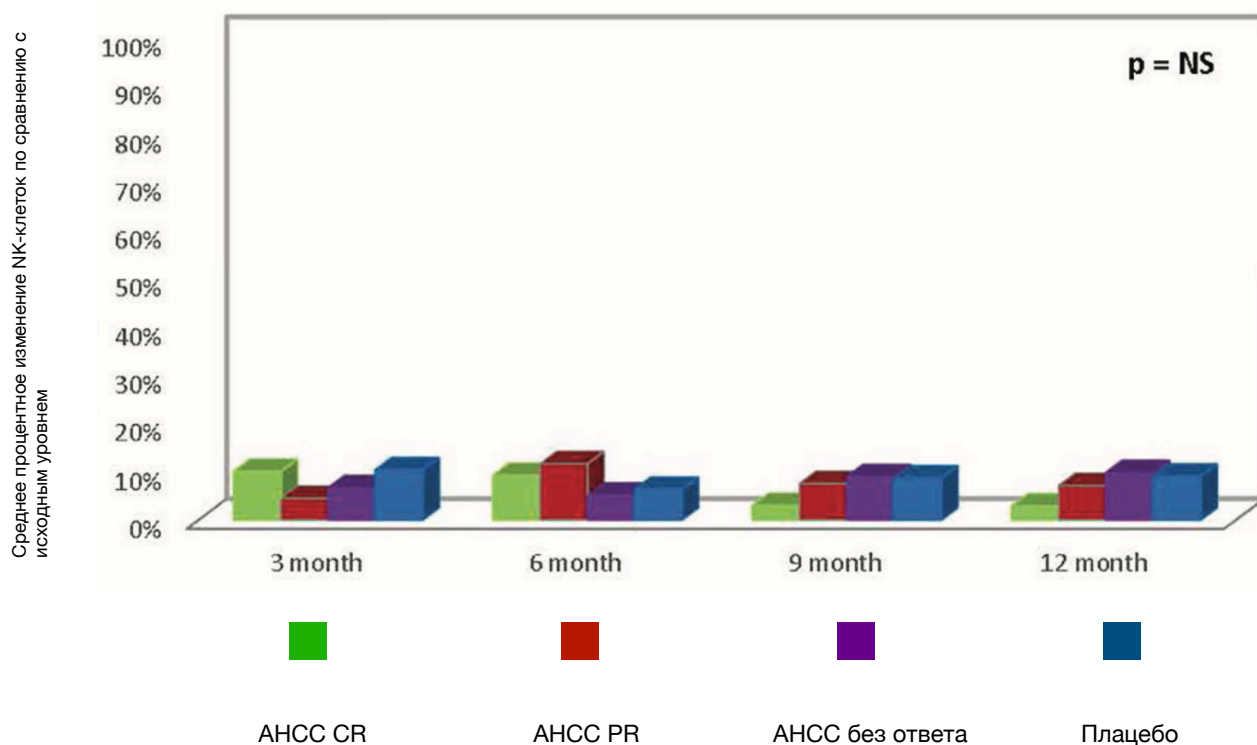
B

РИСУНОК 4 | (A) Сводка среднего процентного изменения Т-лимфоцитов по сравнению с исходным уровнем у пациентов с фазой II. Изменение Т-лимфоцитов коррелировало с элиминацией вируса папилломы человека (ВПЧ). (B) Сводка ответа пациента на интерферон-гамма (IFN-g) фазы II. Увеличение IFN-g, интерферона типа II, коррелировало со снижением IFN-b, интерферона типа I, и, в конечном счете, излечением от ВПЧ-инфекций.

ТАБЛИЦА 4 | Резюме нежелательных явлений, о которых сообщалось в исследовании.

	Плацебо (N=25)	AHCC (N=25)
Тошнота	2 (8%)	1 (4%)
Вздутие	1 (4%)	1 (4%)
Изжога	0	1 (4%)
Усталость	0	1 (4%)

Все зарегистрированные пациенты были включены в анализ безопасности на предмет нежелательных явлений. В целом, ни один из участников исследования не сообщил о токсичности выше 1-й степени ни в группе плацебо, ни в группе добавок AHCC. AHCC хорошо переносился по сравнению с плацебо.

Основная сила этого исследования заключается в том, что, хотя АНСС не является традиционным медикаментозным вмешательством, преимущества добавок АНСС были подтверждены традиционным тестом эффективности двойного слепого рандомизированного плацебо-контролируемого исследования.

В отличие от многих исследований пищевых добавок, в этом исследовании изучались специфические иммунные маркеры, чтобы подтвердить механизм модуляции АНСС иммунной функции хозяина. Из-за ограниченных финансовых ресурсов в этом исследовании не удалось изучить все возможные механизмы иммуномодуляции, которые могли способствовать излечению от персистирующих инфекций ВПЧ. Поскольку гипотеза о преимуществах АНСС основана на модуляции иммунной функции хозяина, специфическое типирование ВПЧ не было включено в это исследование, которое необходимо более тщательно изучить в будущих исследованиях.

В заключение, результаты этого исследования фазы II продемонстрировали, что АНСС в дозе 3 г один раз в день был эффективен для поддержки иммунной системы хозяина в борьбе с персистирующими инфекциями ВПЧ и хорошо переносился без сообщений о значительных побочных эффектах.

Продолжительность приема АНСС, необходимая после первого отрицательного результата, требует дополнительной оценки для оптимизации долгосрочных результатов на основе как статуса инфекции ВПЧ, так и целевого уровня IFN- β .

ЗАЯВЛЕНИЕ О НАЛИЧИИ ДАННЫХ

Оригинальные вклады, представленные в исследовании, включены в статью/дополнительные материалы. Дальнейшие запросы можно направлять соответствующему автору.

ЗАЯВЛЕНИЕ О ЭТИКЕ

Исследования с участием людей были рассмотрены и одобрены Институциональным наблюдательным советом Центра медицинских наук Техасского университета. Пациенты/участники предоставили письменное информированное согласие на участие в этом исследовании. Письменное информированное согласие было получено от лица (лиц) на публикацию любых потенциально идентифицируемых изображений или данных, включенных в эту статью.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

JS был главным исследователем клинического испытания и отвечал за концепцию исследования, разработку протокола, анализ данных, клиническую интерпретацию данных, написание и завершение рукописи. AG, LM и BR выступали в качестве основной исследовательской группы, отвечавшей за скрининг пациентов, посещения клиник, сбор образцов и анализ, а также участвовали в написании и рецензировании рукописи. JF был клиническим сотрудником этого исследования и участвовал в разработке протокола, клинической интерпретации данных и окончательном рассмотрении рукописи. JL был клиническим сотрудником этого исследования и участвовал в клинической интерпретации данных и окончательном рассмотрении рукописи. YB выступал в качестве научного сотрудника, участвуя в интерпретации образца анализа, разработке протокола и обзоре окончательной рукописи. RO выступал в качестве научного сотрудника, участвуя в интерпретации образца анализа и последствий для будущих анализов мониторинга. Он участвовал в рецензировании и доработке рукописи. TB выступал в качестве клинического сотрудника в этом исследовании и участвовал в разработке протокола,

существенный, непосредственный и интеллектуальный вклад в работу и одобрили ее для публикации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Это исследование было поддержано Программой малых грантов NIH-NCI для исследования рака (1R03CA212935), которая не участвовала в разработке исследования, сборе данных, анализе данных и интерпретации или написании рукописи или ее публикации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Окончательные результаты исследования будут представлены в виде устной презентации на виртуальном собрании Центральной ассоциации акушерства и гинекологии 7 ноября 2020 года. Мемориальная бумага Джорджа Морли».

REFERENCES

- Harris RWC, Brinton LA, Cowdell RH, Skegg DC, Smith PG, Vessey MP, et al. Characteristics of Women With Dysplasia or Carcinoma in Situ of the Cervix Uteri. *Br J Cancer* (1980) 42:359–69. doi: 10.1038/bjc.1980.246
- Furumoto H, Irahara M. Human Papillomavirus (HPV) and Cervical Cancer. *The Journal of Medical Investigation: JMI*. (2002) 49(3-4):124–33.
- Schiffman M, Wheeler CM, Castle PE. Human Papillomavirus DNA Remains Detectable Longer Than Related Cervical Cytologic Abnormalities. *J Infect Dis* (2002) 186:1169–72. doi: 10.1128/JCM.42.2.505-511.2004
- About HPV, Centers for Disease Control and Prevention. Available at: https://www.cdc.gov/hpv/parents/about-hpv.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fhpv%2Fparents%2Fwhatishpv.html Accessed 9/13/19.
- Sexually Transmitted Diseases (STDs). Centers for Disease Control and Prevention. Available at: <https://www.cdc.gov/std/hpv/default.htm> accessed 9/17/19.
- Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, et al. A Controlled Trial of a Human Papillomavirus Type 16 Vaccine. *NJMED* (2002) 347(21):1645–51. doi: 10.1056/NEJMoa020586
- Von Krogh G, Heldberg D. Self-Treatment Using 0.5% Podophyllotoxin Cream of External Genital Condylomata Acuminate in Women. A Placebo Controlled, Double Blind Study. *Sex Transm Dis* (1992) 19(3):170–4. doi: 10.1097/00007435-199205000-00012
- Beutner KR, Conant MA, Friedman-Kien AE, Conant MA, Illeman M, Thisted RA, et al. Patient-Applied Podofilox for Treatment of Genital Warts. *Lancet* (1989) 1(8642):831–4. doi: 10.1016/S0140-6736(89)92282-4
- Uno K, Kosuna K, Sun B, Fujii H, Wakame K, Chikumaru S, et al. Active Hexose Correlated Compound (AHCC) Improves Immunological Parameters and Performance Status of Patients With Solid Tumors. *Biotherapy* (2000) 14:303–9. doi: 10.4162/nrp.2015.9.2.129
- Gao Y, Zhang D, Sun B, Fujii H, Kosuna K, Yin Z. Active Hexose Correlated Compound Enhances Tumor Surveillance Through Regulating Both Innate and Adaptive Immune Responses. *Cancer Immunol Immunother* (2006) 55:1258–66. doi: 10.1007/s00262-005-0111-9
- Miura T, Kitadate K, Nishioka H, Wakame K. Basic and Clinical Studies on Active Hexose Correlated Compound. In: D Bagchi, FC Lau, DK Ghosh, editors. *Biotechnology in Functional Foods and Nutraceuticals*. London, UK: CRC Press Taylor and Francis Group (2010). p. 51–9.
- Hirose A, Sato E, Fujii H, Suna B, Nishioka H, Aruom OI, et al. The Influence of Active Hexose Correlated Compound (AHCC) on Cisplatin-Evoked Chemotherapeutic and Side Effects in Tumor-Bearing Mice. *Toxicol Appl Pharmacol* (2007) 222:152–8. doi: 10.1016/j.taap.2007.03.031
- Ishibashi H, Ikeda T, Tansho S, Ono Y, Yamazaki M, Sato A, et al. Prophylactic Efficacy of a Basidiomycetes Preparation AHCC Against Lethal Opportunistic Infections in Mice. *Yakugaku Zasshi* (2000) 120:715–9. doi: 10.1248/yakushi1947.120.8_715
- Hunter RJ, Fujii H, Wakame K, Gaikwad A, Wolf JK, Smith JA. Evaluation of Active Hexose Correlated Compound (AHCC) in Combination With PEGylated Liposomal Doxorubicin for Treatment of Ovarian Cancer. *Int J Appl Res Natural Products* (2011) 4(3):6–11. Available at: <http://www.doaj.org/doi?func=openurl&issn=19406223&genre=journal>
- Muthén LK, Muthén BO. (1998-2011). *Mplus User's Guide*. Sixth Edition. Los Angeles, CA: Muthén & Muthén (2014).
- Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural History of Cervicovaginal Papillomavirus Infection in Young Women. *N Engl J Med* (1998) 338(7):423–8. doi: 10.1056/NEJM199802123380703
- Smith JA, Mathew L, Gaikwad A, Rech B, Burney MN, Faro JP, et al. From Bench to Bedside: Evaluation of AHCC Supplementation to Modulate the Host Immunity to Clear High-Risk Human Papillomavirus Infections. *Front Oncol* (2019) 9:173. doi: 10.3389/fonc.2019.00173
- Doorbar J. Host Control of Human Papilloma Virus Infection and Disease. *Best Prac Res Clin Obstet Gynecol* (2018) 47:27–41. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2017.08.001
- Wilson EB, Yamada DH, Elsaesser H, Herskovitz J, Deng J, Cheng G, et al. Blockage of Chronic Type I Interferon Signaling to Control Persistent LCMV Infection. *Science* (2013) 340:202–7. doi: 10.1126/science.1235208
- Tejjaro JR, Ng C, Lee AM, Sullivan BM, Sheehan KCF, Welch M, et al. Persistent LCMV Infection is Controlled by Blockade of Type I Interferon Signaling. *Science* (2013) 340:207–11. doi: 10.1126/science.1235214
- Roopngam PE, Sralongrua T, Huaykra A. Increased Response of Human T- Lymphocytes by Dendritic Cells Pulsed With HPV16E7 and Pleurotus Sajor- Caju-b-Glucan (PBG). *Iran J Immunol* (2018) 15(4):246–55. doi: 10.22034/IJI.2018.39394