

Nowatorski nutraceutyczny preparat doustny zawierający kwasy tłuszczowe omega-3 i omega-6 z witaminami (PLP10) w rzutowo-remisyjnej postaci stwardnienia rozsianego: potwierdzające słuszność koncepcji badanie kliniczne z randomizacją i kontrolą placebo, prowadzone metodą podwójnie ślepej próby

Marios C Pantzaris,¹ George N Loukaides,¹ Evangelia E Ntzani,² Ioannis S Patrikios^{1,3}

Aby zacytować: Pantzaris MC, Loukaides GN, Ntzani EE, *et al.* Nowatorski nutraceutyczny preparat doustny zawierający kwasy tłuszczowe omega-3 i omega-6 z witaminami (PLP10) w rzutowo-remisyjnej postaci stwardnienia rozsianego: potwierdzające słuszność koncepcji badanie kliniczne z randomizacją i kontrolą placebo, prowadzone metodą podwójnie ślepej próby. *BMJ Open* 2013;**3**:e002170. doi:10.1136/bmjopen-2012-002170

► Wersje przed publikacją oraz dodatkowe materiały do tego artykułu są dostępne online. Aby obejrzeć te pliki, odwiedź stronę internetową czasopisma (<http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2012-002170>).

MCP i ISP są wspólnie pierwszym autorem i autorem do korespondencji.

Otrzymało 30 września 2012 r. Oceniono 5 marca 2013 r. Przyjęto 7 marca 2013 r.

Niniejszy ostatni artykuł jest dostępny na licencji Creative Commons Attribution Non-Commercial 2.0; zob. <http://bmjopen.bmj.com>

Numerowane afiliacje wymienione są na końcu artykułu.

Dane do korespondencji
Profesor Ioannis Patrikios i dr Marios Pantzaris;
i.patrikios@euc.ac.cy oraz patrikiosioannis@gmail.com

STRESZCZENIE

Cel: Ustalenie, czy trzy nowatorskie preparaty, których formuły zostały opracowane na podstawie koncepcji medycyny systemów, obniżyły aktywność choroby u pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego (SM, łac. sclerosis multiplex), niezależnie od tego, czy otrzymywali oni leczenie modyfikujące przebieg choroby.

Schemat: Trwające 30 miesięcy, potwierdzające słuszność koncepcji badanie kliniczne II fazy z randomizacją i kontrolą placebo, prowadzone w układzie równoległym metodą podwójnie ślepej próby.

Lokalizacja: Cypryjski Instytut Neurologii i Genetyki.

Uczestnicy: Osiemdziesięcioro uczestników podzielono na cztery grupy po 20 osób. Łącznie 41 (51%) pacjentów ukończyło trwające 30 miesięcy badanie. Kryteria włączenia stanowiły: wiek 18-65 lat; rozpoznana według kryteriów McDonald'a postać rzutowo-remisyjna SM; wynik 0,0-5,5 w rozszerzonej skali niewydolności ruchowej (EDSS, ang. Expanded Disability Status Scale); widoczne w badaniu rezonansem magnetycznym zmiany spójne z SM; przynajmniej jeden udokumentowany kliniczny rzut choroby oraz otrzymywanie bądź nieotrzymywanie leków modyfikujących przebieg choroby w 24-miesięcznym okresie poprzedzającym rozpoczęcie udziału w badaniu. Przyczynami wyłączenia pacjentów z badania były: niedawno przeżyty (< 30 dni) rzut choroby, uprzednia terapia immunosupresyjna lub z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych, ciąża lub karmienie piersią, inne ciężkie choroby upośledzające czynności narządów, postępująca postać SM, niedawne nadużywanie narkotyków lub alkoholu w wywiadzie, przyjmowanie jakichkolwiek dodatkowych suplementów diety, witamin lub wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w dowolnej postaci, a także ciężkie reakcje alergiczne lub anafilaktyczne w wywiadzie i stwierdzona nadwrażliwość na określone składniki odżywcze.

Preparaty: Pierwszy preparat (A) składał się z wielonienasyconych kwasów tłuszczowych Ω -3 i Ω -6 w stosunku 1:1 w/w. Z kwasów Ω -3 zawierał kwas dokozaheksaenowy i eikozapentaenowy w stosunku 3:1 w/w, a z kwasów Ω -6 – kwas linolowy i γ -linolenowy w stosunku 2:1 w/w. W skład tego preparatu wchodziły również niewielkie ilości innych określonych kwasów wielonienasyconych, jednonienasyconych i nasyconych, a także witaminy A i E (α -tokoferol). Drugi preparat (B, PLP10) stanowiło połączenie A z γ -tokoferolem. Trzecim preparatem (C) był sam γ -tokoferol. Czwarta grupa 20 uczestników otrzymywała placebo.

PODSUMOWANIE ARTYKUŁU

Główne zagadnienia

- Coraz częstsze występowanie stwardnienia rozsianego (SM) oraz ograniczona skuteczność i działania niepożądane istniejących terapii sprawiają, że konieczne staje się opracowanie nowych, innowacyjnych, bardziej skutecznych i bezpiecznych, zapobiegawczych strategii leczenia.
- Proponujemy trzy nowatorskie preparaty nutraceutyczne, opracowane zgodnie z zasadami medycyny systemów i biologii systemów odżywiania, przy czym PLP10 przedstawia sobą pełny skład preparatu.
- Przedstawione preparaty poddaliśmy ocenie w potwierdzającym słuszność koncepcji badaniu klinicznym II fazy z randomizacją i kontrolą placebo, prowadzonym metodą podwójnie ślepej próby.

Najważniejsze informacje

- W tym małym badaniu klinicznym wykazano, że terapia PLP10 istotnie obniżyła ARR i ryzyko utrzymującej się progresji niewydolności ruchowej; nie odnotowano żadnych poważnych działań niepożądanych.
- Łącznie 41 (51%) pacjentów ukończyło trwające 30 miesięcy badanie. Według analizy zgodnej z protokołem badania, skupiającej się na pierwszorzędkowych punktach końcowych, **względne zmniejszenie ryzyka** dla grupy PLP10 wyniosło 64%. Skumulowane prawdopodobieństwo progresji niewydolności ruchowej po upływie 2 lat wyniosło 10% w grupie PLP10 i 58% w grupie placebo.

Wszystkie preparaty podawano per os (drogą doustną) raz na dobę, 30 minut przed obiadem, przez 30 miesięcy.

Główne metody oceny wyników: Pierwszorzędkowym punktem końcowym był roczny wskaźnik rzutów choroby (ARR, ang. annualised relapse rate) dla trzech interwencji w porównaniu z placebo po upływie 2 lat. Drugorzędowy punkt końcowy stanowił czas, który upłynął do potwierdzenia progresji niewydolności ruchowej, określony po upływie 2 lat.

Wyniki: Łącznie 41 (51%) pacjentów ukończyło badanie trwające 30 miesięcy.

PODSUMOWANIE ARTYKUŁU

Zalety i ograniczenia tego badania

- Randomizacja, ślepa próba, zastosowanie placebo, wyraźne kryteria włączenia/wyłączenia i pierwszorzędowe/drugorzędowe punkty końcowe, a także wydłużony czas trwania badania – to wszystko pozwoliło na właściwą ocenę bezpieczeństwa i skuteczności.
- Ograniczeniami badania były niewielka próba badawcza i wysoki odsetek osób, które zrezygnowały z udziału.

Ogółem, analiza pierwszorzędowego punktu końcowego po upływie 2 lat zgodna z protokołem badania wykazała, że odnotowano osiem rzutów w grupie PLP10 ($n = 10$; 0,40 ARR) i 25 rzutów w grupie placebo ($n = 12$; 1,04 ARR), co oznacza, że skorygowane **względne zmniejszenie ryzyka (RRR, ang. relative risk reduction)** w grupie PLP10 wyniosło 64% (RRR 0,36; 95% CI 0,15-0,87; $p = 0,024$). W analizie podgrup, w której wyłączono pacjentów otrzymujących przeciwciała monoklonalne (natalizumab), zaobserwowano, że skorygowane RRR w czasie 2 lat było większe (72%) (RRR 0,28; 95% CI 0,10-0,79; $p = 0,016$). Analiza zgodna z protokołem badania, dotycząca drugorzędowego punktu końcowego ocenianego po 2 latach, czyli czasu do wystąpienia progresji niewydolności ruchowej, wykazała, że czas ten był istotnie dłuższy jedynie w grupie PLP10. Skumulowane prawdopodobieństwo progresji niewydolności ruchowej po upływie 2 lat wyniosło 10% w grupie PLP10 i 58% w grupie placebo (nieskorygowany test log-rank $p = 0,019$). W analizie podgrup, w której wyłączono pacjentów otrzymujących natalizumab, skumulowane prawdopodobieństwo progresji wyniosło 10% dla 10 pacjentów w grupie PLP10 i 70% dla 12 pacjentów w grupie placebo, co daje względne obniżenie ryzyka utrzymującego się postępu niewydolności ruchowej w grupie PLP10 o 86% (nieskorygowany test log-rank $p = 0,006$; skorygowany HR, 0,11; 95% CI 0,01-0,97; $p = 0,047$). Nie odnotowano żadnych działań niepożądanych. Nie wykazano skuteczności preparatu A (10 pacjentów) i C (9 pacjentów).

Wnioski: W tym małym randomizowanym badaniu klinicznym potwierdzającym słuszność koncepcji, przeprowadzonym metodą podwójnie ślepej próby, wykazano, że terapia PLP10 istotnie obniżała ARR i ryzyko utrzymującej się progresji niewydolności ruchowej, a jednocześnie nie powodowała żadnych poważnych działań niepożądanych. Konieczne są szersze badania w celu dalszej oceny bezpieczeństwa i skuteczności PLP10.

Rejestracja badania: Międzynarodowe standardowe randomizowane badanie kontrolowane, numer ISRCTN87818535.

WPROWADZENIE

Stwardnienie rozsiane (SM, łac. sclerosis multiplex) to złożona choroba wieloczynnikowa, która jest skutkiem wzajemnego oddziaływania czynników środowiskowych i predyspozycji genetycznych.¹⁻³ Razem czynniki te uruchamiają kaskadę zdarzeń pociągających za sobą uruchomienie układu odpornościowego, uszkodzenie osłonki mielinowej, aksonów i gleju w wyniku stanu zapalnego, regenerację czynnościową i strukturalną, glejozę i neurodegenerację.⁴ Do mechanizmów zaangażowanych w te procesy należy stan zapalny, w którym bierze udział układ immunologiczny, stres oksydacyjny i ekscytotoksyczność. Wszystkie te mechanizmy przyczyniają się do uszkodzenia oligodendrocytów i neuronów, a nawet do śmierci komórek, czego skutkiem jest progresja choroby.⁵⁻⁹ Coraz częstsze występowanie SM, w połączeniu z tylko częściową skutecznością i działaniami niepożądanymi dostępnych metod leczenia, sprawia, że konieczne jest opracowanie nowych, innowacyjnych, bardziej skutecznych, bezpiecznych i zapobiegawczych strategii terapeutycznych.

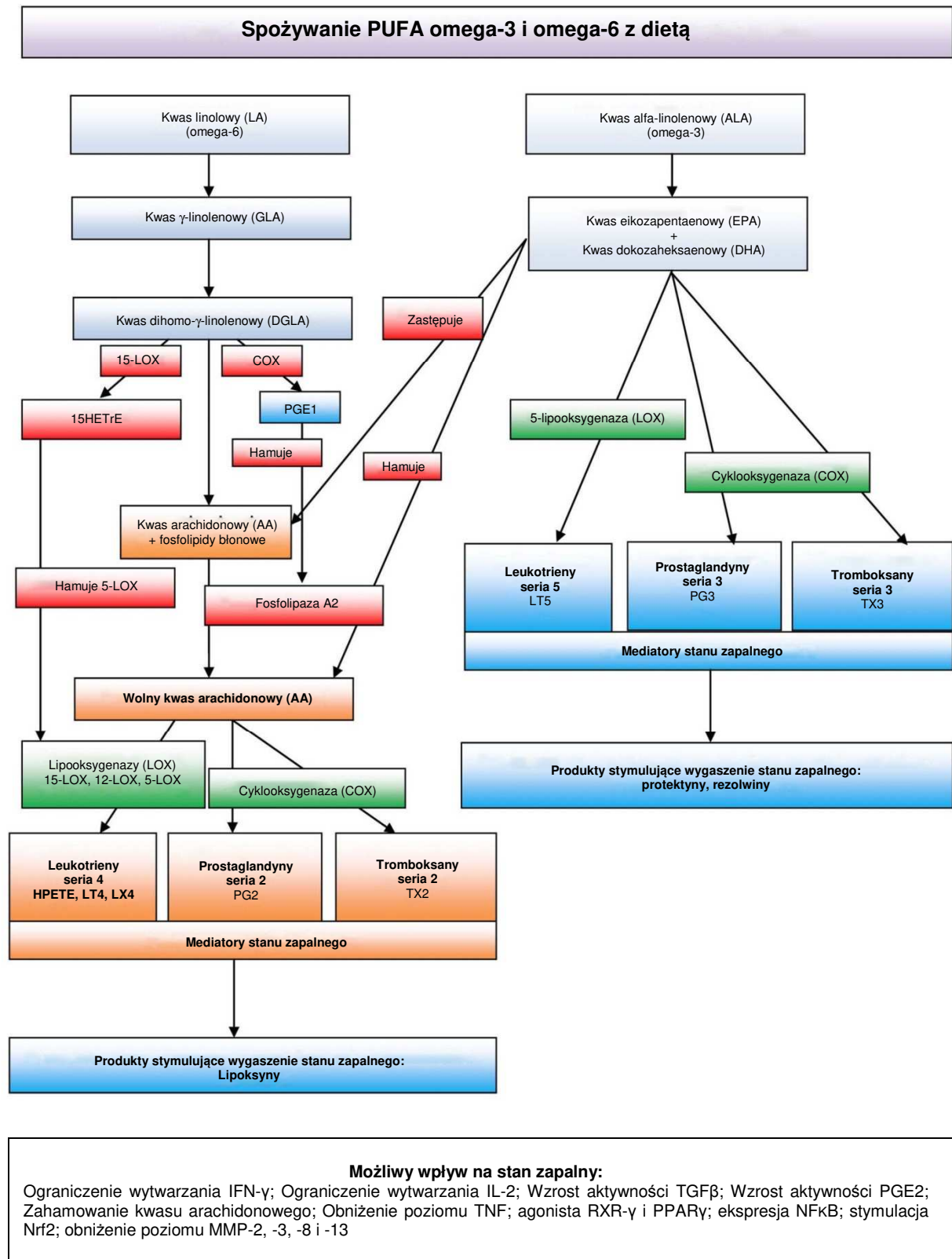
Ostatnie badania wykazały, że w patogenezę SM zaangażowanych jest wiele zmiennych, które stale wchodzi z sobą w interakcje, oraz liczne wzajemnie ze sobą powiązane procesy. Wyjątkowość koncepcji medycyny systemów polega na zwróceniu uwagi na fakt, że w kontrolowaniu przebiegu choroby ważne są różne złożone czynniki, które należy uwzględnić w wyborze i prowadzeniu terapii.¹⁰ Głównym wyzwaniem w naukowym podejściu do systemów jest wyjaśnienie, w jaki sposób te liczne zmienne stale wchodzi z sobą w interakcję i jak poprzez taką wiedzę można wpływać na systemy, by osiągnąć zamierzony efekt.^{10,11} Jedną z strategii może być jednoczesne działanie na różne szlaki zaangażowane w rozwój choroby dzięki zastosowaniu skojarzenia różnych substancji aktywnych, które mogłyby zadziałać synergistycznie i wywołać kompleksowy i utrzymujący się efekt terapeutyczny (zobacz online dodatkowe informacje – metody 1).

Zawartość poszczególnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA, ang. polyunsaturated fatty acids) w fosfolipidach błonowych odgrywa istotną rolę w rozwoju stanu zapalnego związanego i niezwiązanego z układem odpornościowym. U pacjentów z SM odnotowywano niedobory PUFA i przeciwutleniaczy, a także obniżoną wydajność komórkowych mechanizmów antyoksydacyjnych.¹²⁻¹⁵ Przyczyna niedoborów PUFA jest niejasna; może wynikać ze zmian metabolicznych i odżywczych.¹²

Zaostrzony lub niekontrolowany stan zapalny przyczynia się do rozwoju kilku ostrych i przewlekłych schorzeń; charakteryzuje się wytwarzaniem cytokin prozapalnych, eikozanoidów wywodzących się od kwasu arachidonowego (AA, ang. arachidonic acid) (prostaglandyn (PG), tromboksanów (TX), leukotrienów (LT) i innych utlenionych pochodnych) oraz innych czynników zapalnych, na przykład reaktywnych form tlenu (ROS, ang. reactive oxygen species), tlenku azotu (NO) i białek adhezyjnych (**rycina 1**).¹⁶ W czasie stanu zapalnego homeostaza glutaminianu zostaje zaburzona, ponieważ jest on uwalniany w większych ilościach przez aktywowane komórki układu immunologicznego. Może to doprowadzić do nadmiernej aktywacji receptorów dla glutaminianu, co z kolei może skutkować śmiercią ekscytotoksyczną oligodendrocytów.^{7 17} Patologie związane z błonami, stan zapalny wywołany przez układ odpornościowy, stres oksydacyjny i ekscytotoksyczność mogą potencjalnie stanowić punkt uchwytu dla terapii skojarzonej w leczeniu SM.

Badania in vitro i in vivo wykazały, że kwasy: eikozapentaenowy (EPA), dokozaheksaenowy (DHA), linolowy (LA) i γ -linolenowy (GLA), przyjmowane z pożywieniem, mogą wpływać na niemal wszystkie znane złożone sieci zdarzeń i szlaków biorących udział w patogenezie SM. Zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w błonach komórek w mózgu może być modyfikowana suplementacją diety, ale wykazano, że wydajność tego procesu zależy od wieku (zajmuje więcej czasu u osób dorosłych niż w przypadku mózgu rozwijającego się) i może zleżeć od ilości PUFA pochodzących z diety/suplementów.¹⁸ Zarówno badania na ludziach, jak i na zwierzętach udowodniły, że dieta bogata w DHA i EPA może zwiększyć udział tych PUFA w błonach komórek zapalnych, a także może obniżyć poziom AA, biomarkera związanego ze stresem.^{16 19} Właściwości przeciwzapalne PUFA Ω -3 wynikają z wytwarzania PG i TX z podwójnym wiązaniem przy 3. węglu (seria 3) oraz LT z podwójnym wiązaniem przy 5. węglu (seria 5) (**Ryc. 1**).^{18 20} Rezolwiny i protektyny powstają z kwasów tłuszczowych Ω -3 na drodze szlaków cyklooksygenazy-2/lipooksygenazy (COX-2/LOX) i ułatwiają kontrolę stanu zapalnego w tkance nerwowej (**rycina 1**).²¹⁻²⁵ Proliferację limfocytów T w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych również można ograniczyć suplementacją PUFA Ω -3 lub Ω -6.²⁶

Biologia systemów odżywiania może być odpowiedzią na problem stwardnienia rozsianego



Rycina 1 PUFA Ω -6 i Ω -3, ich pochodne metaboliczne i możliwy wpływ na stan zapalny. Po spożyciu PUFA są metabolizowane na drodze kilku szlaków metabolicznych (nie pokazano) do aktywnych związków, które pośredniczą w procesach zapalnych, i do produktów stymulujących wygaszenie stanu zapalnego. COX, cyklooksigenaza; HETrE, kwas hydroksyeikozatetraenowy; HPETE, kwas hydroperoksyekozatetraenowy; IFN- γ , interferon γ ; IL-2, interleukina 2; LOX, lipooksygenaza; LT, leukotrien; MMP, metaloproteinaza; NF κ B, czynnik jądrowy kappa B; Nrf2, jądrowy czynnik oddechowy; PG, prostaglandyna; PGE2, prostaglandyna E2; PL, fosfolipid; PPAR γ , receptor aktywowany przez proliferatory peroksyosomów γ ; PUFA, wielonienasycone kwasy tłuszczowe; RXR- γ , receptor retinoidowy X/ γ ; TGF β , transformujący czynnik wzrostu β ; TNF, czynnik martwicy nowotworu; TX, tromboksan.

Biologia systemów odżywiania może być odpowiedzią na problem stwardnienia rozsianego

Ponadto witamina E jest ważnym przeciwutleniaczem, który ma zdolność hamowania reakcji łańcuchowych zainicjowanych przez wolne rodniki.²⁷ Witamina E (α -tokoferol, izoforma witaminy E) szczególnie skutecznie wymiata rodniki hydroksylowe, wodoronadtlenkowe i ponadtlenkowe, a γ -tokoferol (inna izoforma witaminy E) skutecznie eliminuje rodniki NO.²⁸⁻²⁹ Dodatkowo α -tokoferol wykazuje inne właściwości niż przeciwutleniające, między innymi moduluje mechanizmy sygnalizacji komórkowej i funkcjonowanie układu immunologicznego, reguluje transkrypcję i indukuje apoptozę.³⁰

Ponadto elektrofilowe pochodne kwasów tłuszczowych Ω -3, tworzone przez COX-2 w aktywowanych makrofagach, mogą stymulować jądrowy czynnik oddechowy (NRF, ang. nuclear respiratory factor), który indukuje transkrypcję genów neuroprotektynnych i związanych z mechanizmami antyoksydacyjnymi, może także pobudzać receptory aktywowane przez proliferatory peroksydomów γ (PPAR γ , ang. peroxisome proliferator-activated receptor) w odpowiedzi przeciwzapalnej.³¹⁻³⁴ W badaniach z udziałem zwierząt wykazano, że EPA i DHA stanowią ligandy dla receptora retinoidowego X (RXR, ang. retinoid X receptor) i korzystnie wpływają na neurogenezę.³⁵ Ponadto w 2008 r. Salvati i wsp. opisali występowanie szybszej mielinizacji u zwierząt otrzymujących DHA i EPA.³⁶ Oprócz tego wykazano, że DHA i EPA w znacznym stopniu obniżają poziom metaloproteinaz (MMP) 2, MMP-3, MMP-9 i MMP-13, które odgrywają ważną rolę w migracji limfocytów do ośrodkowego układu nerwowego poprzez przerywanie ciągłości bariery krew-mózg; jest to ważny etap powstawania zmian w SM.³⁷⁻⁴³

Na podstawie powyższych obserwacji można stwierdzić, że niektóre PUFA i witaminy o właściwościach przeciwutleniających spełniają kryterium wiarygodności biologicznej i mają potencjał, by ograniczyć stopień nasilenia i aktywność objawów SM, a nawet stymulować regenerację (remielinizację).¹²⁻⁴⁴

Niniejszy artykuł opisuje jednośrodkowe, potwierdzające słuszność koncepcji badanie kliniczne II fazy z randomizacją i kontrolą placebo, prowadzone metodą podwójnie ślepej próby, którego celem była ocena zdolności terapeutycznych preparatu nutraceutycznego (skład i postać produktu PLP10 były kompletne) i dwóch innych preparatów (A i C) składających się z częściowych frakcji PLP10 frakcji zawierających substancje z wymienionych wyżej kategorii podawanych pacjentom z rzutowo-remisyjną postacią SM.

METODY**Pacjenci**

Kryteria włączenia stanowiły: wiek 18-65 lat; zdiagnozowana według kryteriów McDonalda postać rzutowo-remisyjna SM; wynik 0,0-5,5 w rozszerzonej skali niewydolności ruchowej (EDSS, ang. Expanded Disability Status Scale), w której możliwe są wartości od 0 do 10, przy czym wyższe wartości wskazują na cięższy stopień niewydolności; widoczne w badaniu rezonansem magnetycznym zmiany zgodne z SM; przynajmniej jeden udokumentowany kliniczny rzut choroby oraz otrzymywanie bądź nieotrzymywanie leków modyfikujących przebieg choroby (LMPCh) w 24-miesięcznym okresie poprzedzającym rozpoczęcie udziału w badaniu.

Przyczynami wyłączenia pacjentów z badania były: niedawno przebyty (<30 dni) rzut choroby, uprzednia terapia immunosupresyjna lub z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych, ciąża lub karmienie piersią, inne ciężkie choroby upośledzające funkcjonowanie narządów, postępująca postać SM, niedawne nadużywanie narkotyków lub alkoholu w wywiadzie, przyjmowanie jakichkolwiek dodatkowych suplementów diety, witamin lub PUFA w dowolnej postaci, a także ciężkie reakcje alergiczne lub anafilaktyczne w wywiadzie i stwierdzona nadwrażliwość na określone składniki odżywcze. Nie rozważano kontrolowania codziennych nawyków żywieniowych pacjentów ani ograniczeń, które mogą z nich wynikać, ponieważ zawartość składników w preparacie była na tyle wysoka, że żaden konkretny schemat żywieniowy nie mógł istotnie wpływać na ich działanie.

Badanie zostało przeprowadzone zgodnie ze standardami Dobrej Praktyki Klinicznej opracowanymi przez Międzynarodową Konferencję ds. Harmonizacji. Protokół został napisany przez badaczy i zatwierdzony przez Narodową Cypryjską Komisję Bioetyczną, a nadzorowany był przez niezależną komisję monitorującą bezpieczeństwo, która dokonała oceny bezpieczeństwa oraz profilu korzyści i ryzyka. Oceny stopnia przestrzegania protokołu przez pracowników służby zdrowia, poprzez przegląd kart obserwacji klinicznej, dokonała zewnętrzna komisja zatrudniona przez założyciela projektu. Przed rozpoczęciem udziału w badaniu wszyscy pacjenci udzielili pisemnej świadomej zgody.

Randomizacja i maskowanie

Pacjentów w sposób losowy przydzielono do czterech grup w stosunku 1:1:1:1, stratyfikowanym pod względem płci (stosunek kobiet do mężczyzn wynosił 3:1). Randomizacji dokonano za pomocą puli ponumerowanych kul, podobnych do tych stosowanych w loterii. Pacjenci byli losowo przydzielani do poszczególnych terapii w blokach po czworo przez rzut monetą w następujący sposób: dla dwóch pierwszych wylosowanych kul awers monety przydzielał ich do grup A/B, a rewers do grup C/D. Pozostałe dwie kule były stratyfikowane analogicznie. Za pomocą drugiej rzutu monety przydzielano dwoje pacjentów do grupy A (awers)/B (rewers) lub do grupy C (awers)/D (rewers). System randomizacji został wygenerowany, wdrożony i zabezpieczony w Helix Incubator Organization Uniwersytetu w Nikozji (HIONU).

Preparaty nie różniły się między sobą wyglądem ani zapachem, były przechowywane w ciemnych buteleczkach (w każdej znajdowało się 15 dawek dobowych) pod poduszką azotu. Każda buteleczka była opatrzona przez HIONU kodem liczbowym, nieznanym ani pacjentom, ani badaczom. Dane z badania były zbierane przez badaczy i przechowywane przez HIONU, tam również znajdowały się zaszyfrowane kody do badania. Cały personel zaangażowany w prowadzenie tego badania był zaślepiony przez cały czas jego trwania. Przydziału terapii nie znali lekarz prowadzący leczenie/wykonyjący badania, inni badacze, farmaceuta, neuroradiolog i pacjenci.

Procedury i punkty końcowe

Zakupiono określone materiały Ω -3 i Ω -6 zgodnie z wymaganą specyfikacją frakcji PUFA dla preparatów (struktura molekularna, ilość i jakość), z witaminą E (α -tokoferol) jako stabilizatorem – przeciwutleniaczem zastosowanym przez producenta. Witaminy i aromat maskujący zakupiono oddzielnie. Mieszanie frakcji w celu otrzymania ostatecznego pożądanego preparatu – kompozycji o określonej specyfikacji – było wykonywane co 6 miesięcy, w odpowiednich warunkach, zawsze przez ten sam zespół naukowców pod nadzorem specjalisty biochemika medycznego i specjalisty lipidologa.

Biologia systemów odżywiania może być odpowiedzią na problem stwardnienia rozsianego

Preparaty przeznaczone do podawania przechowywano w lodówce bez dostępu światła do czasu użycia. Szczegółowy opis preparatów podano w Tabeli 1 i w informacjach dodatkowych do metody 1 i 2.

Uczestników przydzielono losowo do grup przyjmujących: grupa A, codzienną dawkę 19,5 ml mieszaniny EPA (1650 mg)/DHA (4650mg)/GLA (2000mg)/LA (3850 mg)/łącznie pozostałe Ω -3 (600 mg)/łącznie jednonienasycone kwasy tłuszczowe (MUFA) (1714 mg)+łącznie nasycone kwasy tłuszczowe (SFA) (18:0 160 mg i 16:0 650 mg)/witamina A (0,6 mg)/witamina E (22 mg) plus aromat cytrusowy (preparat A); grupa B (PLP10), codzienną dawkę 19,5 ml mieszaniny EPA (1650mg)/DHA (4650mg)/GLA (2000 mg)/LA (3850 mg)/łącznie pozostałe Ω -3 (600 mg)/łącznie MUFA (1714 mg)+łącznie SFA (18:0 160 mg i 16:0 650 mg)/witamina A (0,6 mg)/witamina E (22 mg) plus czysty γ -tokoferol (760 mg) plus aromat cytrusowy (preparat B); grupa C, codzienną dawkę 19,5 ml mieszaniny czystego γ -tokoferolu (760 mg) dyspergowanego w czystej oliwie z oliwek z pierwszego tłoczenia (16,137 mg) plus aromat cytrusowy (preparat C) oraz grupa D (placebo), codzienną dawkę 19,5 ml mieszaniny czystej oliwy z oliwek (16 930 mg) plus aromat cytrusowy (preparat D; Tabela 1). Farmaceuta w instytucji odpowiadał za właściwe przechowywanie i obchodzenie się z interwencjami przeznaczonymi dla poszczególnych uczestników. Preparaty były przyjmowane doustnie przez 30 miesięcy, raz dziennie, 30 minut przed obiadem, przy użyciu kalibrowanego kubeczka. Składniki, stosunki składników i dawki dobierano na podstawie ich wzajemnych oddziaływań biofizycznych z ogólnie znanymi czynnikami powodującymi SM, ich biochemicznym znaczeniem i rolą, którą odgrywają w normalizacji i leczeniu skomplikowanej sieci zdarzeń występujących w patofizjologii choroby. Ponadto wybrano wysoką dawkę preparatów w celu zoptymalizowania stosunku kwasów PUFA Ω -3 do Ω -6 PUFAs na poziomie 1:1 (wag.), bez względu na nawyki żywieniowe i pochodzenie geograficzne.

Okres normalizacyjny trwał od 1 lipca 2007 (rekrutacja) do 31 grudnia 2007 r. Ten 6-miesięczny okres normalizacji umożliwił wystąpienie pozytywnych skutków przyjmowania preparatów, ponieważ przyjmowane doustnie PUFA potrzebują 4–6 miesięcy na osiągnięcie maksymalnego poziomu oddziaływania na neurony i komórki układu odpornościowego, korekty niedoboru przeciwutleniaczy i redystrybucję PUFA w organizmie, oraz na optymalną normalizację stosunków EPA i DHA.⁴⁵⁻⁴⁷ Badanie zakończono 31 grudnia 2009 r. (30 miesięcy), natomiast rejestrowanie rzutów kontynuowano do 31 grudnia 2010 r. (42 miesiące). Ogólnie badanie obejmowało „okres normalizacji” (1 lipca 2007 do 31 grudnia 2007 r.), „okres leczenia” (1 stycznia 2008 r., punkt początkowy, do 31 grudnia 2009 r.) oraz 12-miesięczny okres obserwacji po zakończeniu badania (1 stycznia 2010 do 31 grudnia 2010 r.).

W zależności od stanu klinicznego i zgodnie z powszechnie stosowaną praktyką uczestnicy otrzymywali wskazany regularny lek przy stałym monitorowaniu wszelkich skutków ubocznych i zdarzeń niepożądanych. Wizyty w celu dokonania oceny klinicznej ustalono po 3, 9, 15, 21 i 24 miesiącach podawania leku. Pacjenci byli również poddawani badaniu klinicznemu przez neurologa prowadzącego w ciągu 48 godzin od wystąpienia nowych lub nawracających objawów neurologicznych.

Pierwszorzędowym punktem końcowym był roczny wskaźnik rzutów (annualised relapse rate – ARR) po 2 latach. Rzut choroby definiowano jako nowe lub nawracające objawy neurologiczne niezwiązane z gorączką lub infekcją, które trwają co najmniej 24 godziny i którym towarzyszą nowe objawy neurologiczne. Rzuty leczono metyloprednizolonem w dawce 1 g dożylnie na dobę przez 3 dni, po czym podawano prednizon doustnie w dawce 1 mg/kg masy ciała na dobę przez 3 tygodnie, przy stopniowo zmniejszającej się dawce. Drugorzędowym punktem końcowym po 2 latach był czas do progresji niewydolności ruchowej, definiowany jako wzrost o 1,0 lub więcej w skali EDSS, potwierdzony po 6 miesiącach. Progresji nie można było potwierdzić podczas rzutu choroby, a końcowy wynik w skali EDSS potwierdzono 6 miesięcy po zakończeniu badania.

Tabela 1 Skład preparatów w poszczególnych grupach badanych

Badane grupy			
A*	B (PLP10)*	C*	Placebo*
<i>Preparat:</i> EPA (1650 mg)/DHA (4650 mg)/ GLA (2000 mg)/LA (3850 mg)/łącznie inne Ω -3 (600 mg)†/łącznie MUFA‡ (1714 mg)+łącznie SFA (18:0 160 mg, 16:0 650 mg)/witamina A (0,6 mg)/witamina E (22 mg)+plus aromat cytrusowy	<i>Preparat:</i> EPA (1650 mg)/DHA (4650 mg)/GLA (2000 mg)/LA (3850 mg)/łącznie inne Ω -3 (600 mg)†/łącznie MUFA‡ (1714 mg)+łącznie SFA (18:0 160 mg, 16:0 650 mg)/witamina A (0,6 mg)/witamina E (22 mg)+czysty γ -tokoferol (760 mg) plus aromat cytrusowy	<i>Preparat:</i> Czysty γ -tokoferol pochodzenia naturalnego (760 mg), rozproszony w nośniku – czystej oliwie z oliwek z pierwszego tłoczenia (16137 mg); aromat cytrusowy	<i>Preparat:</i> Oliwa z oliwek (czysta, z pierwszego tłoczenia) plus aromat cytrusowy

*Łączna dawka dobową: 19,5 ml.

†Inne Ω -3: C18:3n-3 37 mg, C18:4n-3 73 mg, C20:4n-3 98 mg, C22:5n-3 392 mg.

‡MUFA: 18:1 1300 mg, 20:1 250 mg, 22:1 82 mg, 24:1 82 mg.

PUFA Ω -3 w postaci reestryfikowanych glicerydów z olejów rybich pozyskano z EPAX 1050, EPAX AS z Aalesund w Norwegii; źródłem PUFA Ω -6, MUFA i SFA w postaci triglicerydów był naturalny, tłoczony na zimno olej z nasion ogórecznika *Borago officinalis* firmy Goerlich Pharma International GmbH z Edling w Niemczech. Czysty naturalny γ -tokoferol zakupiono od firmy Tama Biochemical Co Ltd z Shinjuku-ku w Tokio (Japonia); witamina A, w postaci β -karotenu, od firmy HealthAid Ltd z Middlesex (Wielka Brytania), a aromat cytrusowy od firmy Givaudan Schwaiz AG z Dubendorf (Szwajcaria).

DHA, kwas dokozaheksaenowy; EPA, kwas eikozapentaenowy; GLA, kwas γ -linolenowy; LA, kwas linolowy.

Biologia systemów odżywiania może być odpowiedzią na problem stwardnienia rozsianego

Wykonano analizę post hoc w celu oceny odsetka pacjentów bez nowych i powiększających się zmian T2 w obrazie MRI mózgu na koniec badania dla uczestników z populacji zgodnej z protokołem w grupie otrzymującej najbardziej skuteczny preparat w porównaniu z placebo. Porównania tego dokonano w stosunku do dostępnych archiwalnych obrazów MRI do 3 miesięcy przed datą rekrutacji. Badania MRI wykonano i analizowano w sposób zaślepiony w ośrodku oceny wyników badań MRI. Pacjentów monitorowano przez dodatkowe 12 miesięcy po zakończeniu badania i rejestrowano rzuty choroby. Pacjentów zachęcano do nierezygnowania z udziału w badaniu w celu wykonania badań kontrolnych, nawet jeśli przerwali oni przyjmowanie leku badanego.

Próbki krwi pobierano od wszystkich pacjentów poddanych randomizacji w chwili włączenia do badania podczas każdej planowanej wizyty oceniającej oraz podczas rzutów. W celu oceny stopnia podporządkowywania się przez pacjentów zaleceniom lekarzy skład kwasów tłuszczowych w błonach czerwonych krwinek pacjentów oznaczono metodą chromatografii gazowej zgodnie ze standardowym protokołem. Analizę kwasów tłuszczowych wykonano po zakończeniu badania i dlatego nie wpłynęła ona na jego zaślepienie. Środki bezpieczeństwa oceniano od czasu rekrutacji do 12 miesięcy po zakończeniu badania. Badania hematologiczne i biochemiczne wykonywano w czasie włączenia do badania i co 12 miesięcy; obejmowały one pełną morfologię, badania czynności nerek i wątroby, oraz stężenia białek, cholesterolu, triglicerydów, glukozy i elektrolitów.

Neurolog biorący udział w badaniu był doświadczonym lekarzem z ponad dwudziestoletnią praktyką. Odbył on szkolenia w standaryzacji procedur stosowania skali EDSS, badań pacjentów, podejmował wszelkie decyzje medyczne, wyznaczał punktację w skali EDSS i oceniał działania niepożądane lub efekty uboczne. Osoba wykonująca badania medyczno-biochemiczne, specjalista lipidolog i immunolog oraz zarejestrowany dietetyk kliniczny byli oboje członkami zespołu badawczego z ponad 25 latami praktyki w zawodzie. Pacjenci mogli kontaktować się z neurologiem w dowolnym czasie w każdym przypadku wystąpienia działania niepożądanego, efektu ubocznego lub reakcji alergicznej. Nie spodziewano się wystąpienia jakichkolwiek niepożądanych efektów klinicznych lub laboratoryjnych innych niż wywołane przez placebo, które mogłyby zakłócić podwójnie zaślepioną naturę badania. Dlatego neurolog biorący udział w badaniu działał w charakterze zarówno lekarza prowadzącego, jak i oceniającego.

Cała procedura była zgodna z wytycznymi dotyczącymi badań klinicznych, których spełnienie jest wymagane przez FDA, EMA oraz Komitet ds. Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi.⁴⁸

Analiza statystyczna

Nie można było wykonać obliczeń mocy badania ze względu na brak informacji z poprzednich badań dotyczących wielkości potencjalnego efektu. W roku 2005, chorobowość w przypadku SM na Cyprze (600 000 mieszkańców) wynosiła 120/100 000. Na podstawie wspomnianej wyżej liczby pacjentów w naszym kraju i w ośrodku odniesienia, Cypryjskim Instytucie Neurologii i Genetyki, mogliśmy włączyć do badania 20% łącznej liczby pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią choroby (RRMS – Relapsing-remitting MS) kwalifikujących się do badania. Wielkość próby była oparta dokładnie na dostępności uczestników i nowości ocenianego preparatu.

Dokonano porównania charakterystyk bazowych dla wszystkich grup otrzymujących preparaty badane poprzez analizę wariancji lub przy użyciu testu rang Kruskala-Wallisa dla zmiennych ciągłych i testu Fishera dla zmiennych kategorycznych, w zależności od tego, który jest właściwy.

Dla wyników pierwszorzędkowych analizowano ARR parami dla aktywnych preparatów w porównaniu z placebo przy użyciu dwumianowych modeli regresji skorygowanych ze względu na liczbę rzutów w ciągu 2 lat, wynik w skali EDSS i LMPCh. Współczynnik liczby rzutów obliczono jako całkowitą liczbę rzutów podzieloną przez całkowitą liczbę pacjento-lat dla każdej grupy terapeutycznej. Różnice ARR obliczono również wśród wszystkich porównywalnych parametrów i podano jako różnice procentowe.

Dla drugorzędowego punktu końcowego, czasu do progresji niewydolności ruchowej, sporządzono krzywe Kaplana-Meiera. Progresję niewydolności ruchowej i jej czas porównano parami dla aktywnych preparatów i placebo w logarytmicznym teście rang w głównej analizie i w modelu proporcjonalnego hazardu Coxa z korektą dla wyniku w skali EDSS w punkcie początkowym, wieku i LMPCh w analizie wspierającej. Modele wielowymiarowe uwzględniały wszystkie zmienne z $p < 0,1$ w modelach jednowymiarowych. Nie zostało naruszone założenie proporcjonalności.

Zarówno analiza zgodna z protokołem, jak i analiza ITT zostały wykonane dla różnych zestawów pytań badawczych, na które starano się uzyskać odpowiedź, i obie zostały zamieszczone w publikacji. Brakujące dane dla pięciu pacjentów, dla których nie przeprowadzono badań kontrolnych, uzupełniono metodą „last-observation-carried-forward”. Ze względu na schemat badania, którego celem jest potwierdzenie koncepcji, znaczący stopień nieprzebrzegania zaleceń (49%) i wynikające stąd problemy interpretacyjne dotyczące analizy ITT, uznano analizę „per-protocol” jako dostarczającą większej ilości informacji i bardziej odpowiednią do uzyskania odpowiedzi na pytania badawcze dotyczące skuteczności preparatów, gdy uczestnicy stale postępowali zgodnie z protokołem. Wszystkie analizy statystyczne były prawidłowo zdefiniowane a priori. Wszystkie analizy wykonano przy użyciu oprogramowania STATA SE V.10.0 (College Station, Texas, USA). Wartości p były dwustronne (two-tailed).

Rola podmiotu finansującego

Podmiot finansujący nie odgrywał żadnej roli w projektowaniu badania, gromadzeniu i analizie danych, podejmowaniu decyzji o publikacji i przygotowywaniu manuskryptu. Wszyscy członkowie grupy przygotowującej publikację mieli dostęp do wszystkich danych, brali udział w ich interpretacji oraz przygotowywali, przeglądali i zatwierdzali manuskrypt do przedłożenia. Za decyzję o przedłożeniu artykułu do publikacji odpowiadają wszyscy autorzy.

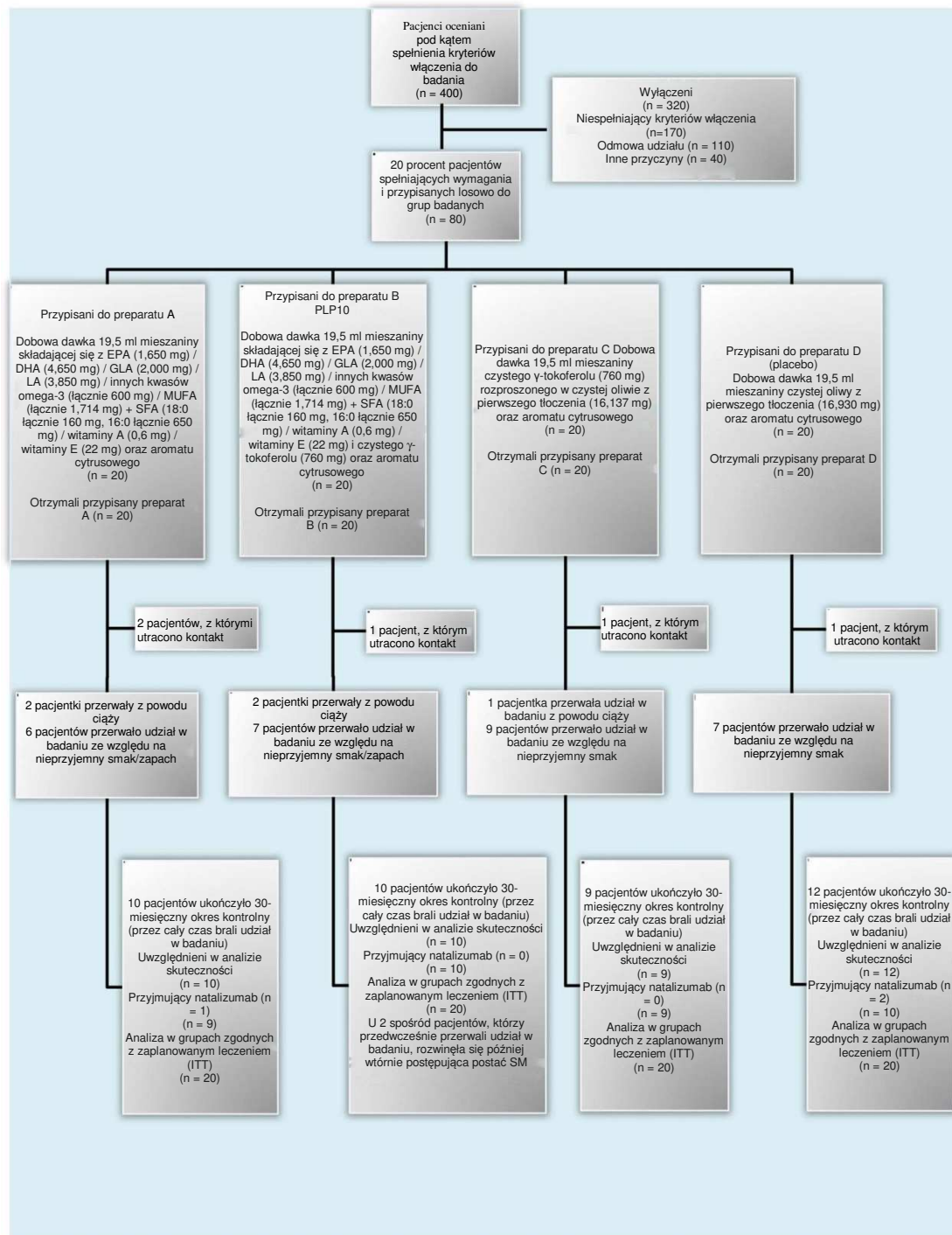
WYNIKI Populacja badana

Spośród 80 pacjentów po 20 przydzielono losowo do każdej z trzech grup mających otrzymywać preparat, natomiast 20 do grupy otrzymującej placebo (Ryc. 2).

Biologia systemów odżywiania może być odpowiedzią na problem stwardnienia rozsianego

Charakterystyki w punkcie początkowym obu populacji: ITT i „per-protocol” były podobne we wszystkich grupach (Tabela 2A i B). Wszyscy pacjenci, którzy przegrali udział w badaniu kontynuowali udział w fazie badań kontrolnych do zakończenia badania i zostali włączeni do analiz ITT (Tabela 3). Pięć pacjentów zrezygnowało z udziału w badaniach kontrolnych przed pierwszą planowaną wizytą. U dwojga innych pacjentów, którzy zakończyli udział w badaniu przed pierwszą planowaną wizytą, wystąpiła progresja do wtórnej postępującej formy SM.

Piętnastu pacjentów, w tym pięć pacjentek w ciąży, zakończyło udział w badaniu przed zakończeniem okresu normalizacji. Innych 17 pacjentów zakończyło udział w badaniu po punkcie początkowym. Siedmiu pacjentów, którzy zakończyli udział w badaniu, zostało poddanych leczeniu przeciwciałami monoklonalnymi (natalizumab). Łącznie trwające 42 miesiące badanie zakończyło 41 (51%) pacjentów; jeden pacjent z grupy A i dwoje z grupy placebo przeszło na natalizumab, a 39 (49%) pacjentów wycofało się z udziału w badaniu lub nie poddało się badaniom kontrolnym. Przyczyny przerywania udziału w badaniu podano na Ryc. 2.



Rycina 2 Schemat blokowy badania.

Biologia systemów odżywiania może być odpowiedzią na problem stwardnienia rozsianego

Tabela 2 W części A przedstawiono dane demograficzne i dane dotyczące choroby z początku badania dla całkowitej populacji poddanej randomizacji, z podziałem na grupy badane; w części B zawarte zostały dane demograficzne i dane dotyczące choroby z początku badania dla populacji pacjentów, którzy przez cały czas trwania badania brali w nim udział, z podziałem na grupy badane

Część A					
Parametr	Grupa A (n = 20)	Grupa B* (n = 20)	Grupa C (n = 20)	Placebo (n = 20)	Wartość p
Płeć					
Kobiety – liczba (%)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	1,000
Wiek (lata)					
Średnia ± SD	38,0 ± 11,9	36,9 ± 8,4	37,7 ± 8,7	38,1 ± 10,9	0,982
Mediana (zakres)	38,0 (22-65)	37,0 (25-61)	36,5 (24-54)	36,0 (21-58)	
Otrzymywane leczenie w wywiadzie					
Pacjenci przyjmujący LMPCh – liczba	11 (55)	9 (45)	12 (60)	10 (50)	0,875
Czas trwania choroby przed rozpoczęciem leczenia (lata)					
Średnia ± SD	9,0 ± 7,6	8,6 ± 4,8	8,6 ± 5,3	7,7 ± 5,7	0,909
Mediana (zakres)	7,5 (2-37)	8,0 (2-20)	8,0 (3-24)	6,5 (2-25)	
Liczba rzutów choroby przed rozpoczęciem leczenia†					
Średnia ± SD	2,33 ± 1,68	2,41 ± 1,73	2,31 ± 1,66	2,10 ± 1,32	0,946
Mediana (zakres)	2,0 (1-6)	2,0 (1-7)	2,0 (1-6)	2,0 (1-4)	
ARR	1,17	1,21	1,16	1,05	0,946
% pacjentów z ≤ 1 rzutem choroby	40	45	40	35	
Wynik w skali EDSS na początku badania†					
Średnia ± SD	2,52 ± 1,23	2,15 ± 1,05	2,42 ± 1,21	2,39 ± 0,93	0,775
Mediana (zakres)	2,5 (1,0-5,5)	2,0 (1,0-4,0)	2,5 (0,0-5,0)	2,5 (1,0-4,0)	
Część B					
Parametr	Grupa A (n = 10)	Grupa B* (n = 10)	Grupa C (n = 9)	Placebo (n = 12)	Wartość p
Płeć					
Kobiety – liczba (%)	5 (50)	7 (70)	6 (66,6)	10 (83,3)	0,419
Wiek (lata)					
Średnia ± SD	36,6 ± 13,5	34,8 ± 5,4	40,9 ± 8,1	39,8 ± 13,2	0,572
Mediana (zakres)	34,5 (22-65)	34,5 (26-43)	40,0 (29-54)	37,5 (21-58)	
Otrzymywane leczenie w wywiadzie					
Pacjenci przyjmujący LMPCh – liczba	6 (60)	4 (40)	6 (67)	6 (50)	0,949
Czas trwania choroby przed rozpoczęciem leczenia (lata)					
Średnia ± SD	9,7 ± 10,0	8,3 ± 5,3	11,3 ± 6,1	8,7 ± 7,1	0,807
Mediana (zakres)	7,5 (2-37)	8,0 (2-20)	8,0 (4-24)	5,5 (2-25)	
Liczba rzutów choroby przed rozpoczęciem leczenia					
Średnia ± SD	2,20 ± 1,47	2,70 ± 1,25	1,78 ± 0,66	1,67 ± 1,37	0,241
Mediana (zakres)	2,0 (1-6)	2,5 (1-)	2,0 (1-3)	1,5 (1-4)	
ARR	1,10	1,35	0,89	0,83	
% pacjentów z ≤ 1 rzutem choroby	30	20	33	50	
Wynik w skali EDSS na początku badania					
Średnia ± SD	2,65 ± 1,37	2,40 ± 1,12	2,11 ± 1,02	2,16 ± 0,96	0,698
Mediana (zakres)	3,0 (1,0-5,5)	2,5 (1,0-4,0)	2,0 (1,0-4,0)	2,0 (1,0-3,5)	

Nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami pod względem jakichkolwiek cech w momencie rozpoczęcia badania.

*Grupa PLP10.

† Dane dostępne z momentu włączenia do badania (n = 18 dla grupy A, n = 17 dla grupy B, n = 19 dla grupy C, n = 19 dla grupy D). ARR, roczny wskaźnik rzutów choroby; LMPCh, leczenie modyfikujące przebieg choroby.

Skuteczność Rzutów

Ponieważ celem tego badania było potwierdzenie wcześniejszej koncepcji, przede wszystkim chcieliśmy odpowiedzieć na pytanie, czy podawane preparaty były skuteczne u tych pacjentów, którzy stosowali przydzielone leczenie (analiza populacji zgodnej z protokołem – „per protocol”).⁴⁹ Aby badanie było pełne metodologicznie, wykonaliśmy również analizę populacji ITT jako analizę drugorzędową aby odpowiedzieć na różne pytania komplementarne w stosunku do naszej hipotezy głównej, np. co się dzieje ze wszystkimi pacjentami z SM, którzy otrzymywali preparaty (efekt przydziału).⁴⁹

W analizie populacji „per-protocol” w pierwszym roku badania wskaźnik absolutnego zmniejszenia ryzyka (ang. absolute risk reduction – ARR) wynosił 0,80, 0,40, 0,78 i 0,83, odpowiednio dla grup otrzymujących preparaty. W drugim roku wskaźnik ARR wyniósł 0,90, 0,40, 0,67 i 1,25 odpowiednio dla 4 preparatów. Łącznie dla głównego punktu końcowego po dwóch latach zarejestrowano 8 rzutów dla 10 pacjentów w grupie PLP10 (0,40 ARR) w porównaniu z 25 rzutami u 12 pacjentów w grupie placebo (1,04 ARR), skorygowane względne zmniejszenie ryzyka 65% (ang. relative rate reduction – RRR) w grupie PLP10 (RRR 0,36, 95% CI 0,15 do 0,87, p=0,024; [Tabele 4A i 5](#) oraz [Ryc. 3A i C](#)).

Tabela 3 W części A zestawiono liczbę rzutów choroby, stanowiącą pierwszorzędowy punkt końcowy po 2 latach zgodnie ze schematem badania, zgłaszaną przez pacjentów, którzy przedwcześnie zakończyli udział w badaniu, z podziałem na grupy badane; część B porównuje ARR z okresu 24 miesięcy poprzedzających badanie (dane z momentu rozpoczęcia badania) z ARR z okresu 24 miesięcy w czasie trwania badania dla całkowitej populacji poddanej randomizacji, z podziałem na grupy badane

Część A									
Parametr	Grupa A (N = 8)		Grupa B* (N = 7)		Grupa C (N = 10)		Placebo (N = 7)		
Punkt końcowy	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	Y
Liczba rzutów choroby	20	14	14	14	27	26	20		13
Roczny wskaźnik rzutów choroby	1,25	0,88	1,00	1,00	1,35	1,30	1,42		0,92
Część B									
Parametr	Grupa A (N = 20)		Grupa B* (N = 20)		Grupa C (N = 20)		Placebo (N = 20)		
Punkt końcowy	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	Y
Liczba rzutów choroby	45	34	49	30	46	41	43		41
Roczny wskaźnik rzutów choroby	1,13	0,85	1,23	0,75	1,15	1,03	1,08		1,03
% obniżenia ARR (Y do X)†			-25	-39		-10			-5
Wartość p w porównaniu z początkiem badania			0,120	0,005		0,475			0,652
Procentowe obniżenie ARR w porównaniu z placebo (Y)†			-18	-27		0,0			Nie
Wartość p w porównaniu z placebo			0,447	0,121		0,996			

Część A: Najwięcej pacjentów, którzy zmienili leczenie na modyfikujące przebieg choroby (LMPCh), było w grupach A i placebo; spośród nich, odpowiednio, troje i dwoje otrzymywało natalizumab. Tłumaczy to mniejszą liczbę rzutów choroby odnotowaną wśród osób z grupy A i grupy placebo, które przerwały udział w badaniu, i może wpływać na wynik analizy ITT na korzyść placebo, gdy brane są pod uwagę dane całkowite z okresu 2 lat. W przypadku grupy PLP10 w momencie rozpoczęcia badania odnotowanych było 14 rzutów choroby; liczba ta nie zmieniła się w czasie 2 lat trwania badania. W przypadku grupy placebo w momencie rozpoczęcia badania odnotowanych było 20 rzutów choroby; liczba ta zmniejszyła się do 13 w czasie 2 lat trwania badania. Takich wyników należało się spodziewać, ponieważ w momencie rozpoczęcia badania 43% spośród osób z grupy PLP10, które przerwały udział w badaniu, otrzymywało LMPCh (żadna z nich nie przyjmowała natalizumabu), a przez okres trwania badania liczba ta nie uległa zmianie; jednak w przypadku grupy placebo na początku badania pacjentów otrzymujących LMPCh było 57%, a pod koniec jego trwania już 86%, z czego dwie osoby przyjmowały natalizumab.

Część B: ARR dla grupy PLP10 na początku badania wynosił 1,23, a pod koniec – 0,75 (redukcja o 39%, $p = 0,005$); dla grupy placebo wartości te wyniosły, odpowiednio, 1,08 i 1,03 (redukcja o 5%, $p = 0,652$). Nie stwierdzono istotnej różnicy między tymi dwiema grupami badanymi. W czasie 24-miesięcznego okresu trwania badania w grupie PLP10 odnotowano redukcję ARR o 27% względem grupy placebo ($p = 0,121$), ale w żadnej z grup nie osiągnięto statystycznie istotnych wyników

X: całkowita liczba rzutów choroby w 24-miesięcznym okresie poprzedzającym badanie (dane z momentu rozpoczęcia badania).

Y: całkowita liczba rzutów choroby w 24-miesięcznym okresie trwania badania.

*Grupa PLP10.

†Nieskorygowane wartości szacunkowe.

Po wyłączeniu pacjentów otrzymujących przeciwciała monoklonalne (natalizumab) zaobserwowano wzmocnienie wartości RRR (72%) w okresie 2 lat (RRR 0,28, 95% CI 0,10 do 0,79, $p=0,016$, 4B i 5). Porównanie w parach dla pozostałych grup względem placebo nie dało istotnych wyników (Tabela 4A i B). Odsetek pacjentów z $\square 1$ rzutem w ciągu 2 lat badania był wyższy w grupie PLP10 niż w grupie placebo (90% vs 42%, $p=0,030$, Tabela 5). W celu bardziej dogłębnego zbadania różnicy porównaliśmy wskaźnik rzutów w czasie 24 miesięcy przed rozpoczęciem badania z okresem 24 miesięcy badania dla każdej grupy otrzymującej preparat. Zaobserwowaliśmy istotne względne zmniejszenie ryzyka w ARR (70%) tylko w grupie PLP10 (RRR 0,30; 95% CI 0,14 do 0,65, $p=0,003$, Tabela 4A); porównania w obrębie grup dotyczące zmniejszenia ARR dla pozostałych trzech grup nie były istotne i pozostały takie po wyłączeniu z analizy pacjentów przyjmujących natalizumab.

Efekt PLP10 w czasie w różnych oknach czasowych w porównaniu z placebo dla pacjentów biorących udział w całym badaniu pokazano na Ryc. 3A-D. Chociaż analiza ARR w obrębie okien czasowych nie była wyznaczonym punktem końcowym, mogła ona być pomocna w analizie informacji równoległych, takich jak profil skuteczności w czasie. PLP10 osiągnęło maksymalny efekt w ciągu 1 roku podawania (liczonego od punktu początkowego); pozostał on stały w okresie późniejszym przy ARR równym 0,4 w niektórych oknach czasowych wolnych od rzutów. Ryc. 3D pokazuje rozkład rzutów w ciągu 2-letniego okresu dla wszystkich pacjentów uczestniczących w badaniu (z wyłączeniem pacjentów przyjmujących natalizumab) dla PLP10 ($n=10$) w porównaniu z placebo ($n=10$). Zgodnie z obecną wiedzą o tym, w jaki sposób przeszłe rzuty oddziałują na przyszłe rzuty u pacjentów z SM (zjawisko zakażenia), w grupie placebo zaobserwowano oczekiwany trend wzrostowy dla incydentów rzutów.⁵⁰ Takie samo zjawisko zaobserwowano również w grupach A i C. Na koniec, podczas 12-miesięcznego przedłużonego okresu po badaniu, u pacjentów biorących udział w badaniu i otrzymujących PLP10 zaobserwowano korzystną wartość ARR w porównaniu z placebo (sześć rzutów u 10 uczestników w grupie PLP10, 0,6 ARR vs 19 u 12 uczestników w grupie placebo, 1,58 ARR), wskazując na statystycznie istotne 62% skorygowane RRR w ARR dla grupy PLP10 (RRR 0,38, 95% CI 0,12 do 0,99, $p=0,046$).

Biologia systemów odżywiania może być odpowiedzią na problem stwardnienia rozsianego

Tabela 4 W części A zestawiono uzyskane po 2 latach wartości ARR (pierwszorzędowy punkt końcowy) dla populacji pacjentów uczestniczących w badaniu przez cały czas jego trwania, z podziałem na grupy badane, oraz różnicę procentową w odniesieniu do placebo; część B porównuje ARR z okresu 24 miesięcy poprzedzających badanie z ARR z okresu 24 miesięcy w czasie badania dla populacji pacjentów biorących w nim udział od początku do końca, z wyłączeniem pacjentów przyjmujących natalizumab; w tej części porównano także ARR z okresu 24 miesięcy w czasie trwania badania (pierwszorzędowy punkt końcowy) w poszczególnych grupach

Część A Parametr	Grupa A (N=10)		Grupa B* (N=10)		Grupa C (N=9)		Placebo (N=12)	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
Punkt końcowy	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
Całkowita liczba rzutów choroby	22	17	27	8	16	13	20	25
Roczny wskaźnik rzutów choroby (ARR)	1,10	0,85	1,35	0,40	0,88	0,72	0,83	1,04
Redukcja procentowa w porównaniu z placebo (pierwszorzędowy punkt końcowy)†		-18		-62		-30		Nie
Wartość p w porównaniu z placebo		0,468		0,024		0,578		
% zmiany ARR (Y do X)†		-23		-70		-18		+25
Wartość p w porównaniu z początkiem badania		0,425		0,003		0,578		0,500

Część B Wyłączając pacjentów otrzymujących natalizumab	Grupa A (N=9)		Grupa B* (N=10)		Grupa C (N=9)		Placebo (N=10)	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
Punkt końcowy	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
Całkowita liczba rzutów choroby	16	15	27	8	16	13	13	19
ARR	0,88	0,83	1,35	0,40	0,88	0,72	0,65	0,95
Redukcja w procentach w porównaniu z placebo (pierwszorzędowy punkt końcowy)†		-13		-58		-24		Nie
Wartość p w porównaniu z placebo		0,493		0,016		0,412		
% zmiany ARR (Y do X)†		-6		-70		-18		+46
Wartość p w porównaniu z początkiem badania		0,857		0,003		0,578		0,354

Część A: W czasie 24-miesięcznego udziału w badaniu ARR dla grupy A wynosił 0,85, co jest wartością o 18% niższą niż dla grupy placebo ($p = 0,468$); dla grupy PLP10 wartość ta wynosiła 0,40, o 62% mniej ($p = 0,024$), a dla grupy C – 0,72, o 30% mniej niż dla grupy placebo ($p = 0,578$). W tej części porównano także ARR z okresu 24 miesięcy poprzedzających badanie (ARR w momencie rozpoczęcia badania) z ARR z okresu 24 miesięcy w czasie trwania badania dla populacji pacjentów biorących w nim udział od początku do końca, w tym pacjentów otrzymujących natalizumab.

X: całkowita liczba rzutów choroby w 24-miesięcznym okresie poprzedzającym badanie (dane z momentu rozpoczęcia badania).

X: całkowita liczba rzutów choroby w 24-miesięcznym okresie trwania badania.

*Grupa PLP10.

†Nieskorygowane wartości szacunkowe.

Jeśli chodzi o analizę ITT, dane dotyczące rzutów choroby u pacjentów, którzy nie ukończyli udziału w badaniu, są podane w tabeli 3A. Zgodnie z oczekiwaniami nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w ARR dla porównania dowolnej spośród grup z grupą placebo dla pacjentów biorących udział w badaniu przez 24 miesiące (Tabela 3B). Populację pacjentów przyjmujących leki modyfikujące przebieg choroby i/lub natalizumab pokazano na Ryc. 1 z informacjami uzupełniającymi online. Co interesujące, mimo wysokiego odsetka pacjentów niestosujących się do zaleceń wystąpiła statystycznie istotna różnica dla porównania ARR w ciągu 24 miesięcy przed punktem początkowym i 24 miesięcy trwania badania dla grupy PLP10 (RRR 0,45, 95% CI 0,26 do 0,78, $p=0,005$).

Progresja niewydolności ruchowej

Stwierdzono w analizie populacji „per protocol” po 2 latach, że czas do wystąpienia progresji niewydolności ruchowej był istotnie dłuższy tylko w grupach PLP10. Skumulowane prawdopodobieństwo wystąpienia progresji niewydolności ruchowej wynosiło 10% w grupie PLP10 i 58% w grupie placebo ($p=0,019$; zob. informacje uzupełniające online, Ryc. 2). Po wyłączeniu pacjentów przyjmujących natalizumab, wystąpiła ponownie statystycznie istotna różnica między grupą PLP10 a grupą placebo w tej samej analizie ($p=0,006$; Ryc. 4A).

Po 2 latach łączne prawdopodobieństwo progresji niewydolności ruchowej wyniosło 10% w grupie PLP10 i 70% w grupie placebo, co jest obniżeniem o 60 p.p. lub względnym spadkiem o 86% ryzyka trwałej progresji niewydolności ruchowej w obrębie grupy PLP10 (skorygowany współczynnik ryzyka HR, 0,11; 95% CI 0,01 do 0,97, $p=0,047$). Po wyłączeniu pacjentów przyjmujących natalizumab u 1 vs 7 z 10 pacjentów wystąpiła progresja do potwierdzonej niewydolności ruchowej, odpowiednio w grupie PLP10 i w grupie placebo. Nie zaobserwowano statystycznie istotnej różnicy dla żadnego porównania pozostałych dwóch grup z grupą placebo (Ryc. 4A i zob. dodatkową informację online Ryc. 2).

W analizie ITT po 2 latach łączne prawdopodobieństwo progresji wyniosło 10% w grupie PLP10 i 35% w grupie placebo ($p=0,052$, trend efektu), co stanowi spadek o 25 p.p. lub względnym spadkiem o 71% dla grupy PLP10 w odniesieniu do ryzyka wystąpienia stałej progresji niewydolności ruchowej (skorygowane ryzyko względne HR 0,22, 95% CI 0,04 do 1,07, $p=0,06$; Ryc. 4B). U 2 vs 7 spośród wszystkich pacjentów poddanych randomizacji wystąpiła progresja do niewydolności ruchowej, odpowiednio w grupie PLP10 i w grupie placebo. Nie zaobserwowano istotnych różnic w grupach A i B w porównaniu z grupą placebo (Ryc. 4B). Średnią zmianę punktacji w skali EDSS w funkcji numeru wizyty pokazano na Ryc. 5.

Tabela 5 Kliniczne punkty końcowe dla populacji pacjentów uczestniczących w badaniu przez cały czas jego trwania, z podziałem na g badane

Parametr*	Grupa A (n = 10)	Grupa B (PLP10) (n = 10)	Grupa C (n = 9)	Placebo (n = 12)	Wartość dla grupy placebo
Roczny wskaźnik rzutów choroby po 1 roku†	0,80	0,40	0,78	0,83	
Całkowita liczba rzutów choroby†	8	4	7	10	
Pierwszorzędowe punkty końcowe					
Roczny wskaźnik rzutów choroby po 2 latach (CI 95%)†	0,85	0,40 (0,15-0,87)	0,72	1,04	0,024
Całkowita liczba rzutów choroby†	17	8	13	25	
Wyłączając pacjentów otrzymujących natalizumab					
Roczny wskaźnik rzutów choroby po 2 latach (CI 95%)	0,83	0,40 (0,10-0,79)	0,72	0,95	0,016
Całkowita liczba rzutów choroby	15	8	13	19	
Drugorzędowe punkty końcowe					
Skumulowane prawdopodobieństwo stałego wzrostu progresji o 1 punkt w skali EDSS, potwierdzonego po 6 miesiącach, na przestrzeni 2 lat, %†	43	10 (1/10)	24	58 (7/12)	0,019
Wyłączając pacjentów otrzymujących natalizumab					
Skumulowane prawdopodobieństwo stałego wzrostu progresji o 1 punkt w skali EDSS, potwierdzonego po 6 miesiącach, na przestrzeni 2 lat, %	33	10 (1/10)	24	70 (7/10)	0,006
Wyniki eksploracyjne					
Odsetek pacjentów z ≤ 1 rzutem choroby w czasie 2 lat [%]†	50 (5/10)	90 (9/10)	56 (5/9)	42 (5/12)	0,030
Rezonans magnetyczny					
Odsetek pacjentów z nowymi lub powiększającymi się zmianami T2	-	29 (2/7)	-	67 (4/6)	
Wyłączając pacjentów otrzymujących natalizumab					
Odsetek pacjentów bez nowych i powiększających się zmian T2 [%]	-	29 (2/7)	-	80 (4/5)	
LMPCh (interferony, octan glatirameru) i natalizumab					
Odsetek pacjentów otrzymujących LMPCh i natalizumab po 2 latach [%]†	80 (8/10)‡	60 (6/10)	67 (6/9)	75 (9/12)§	0,747

*CI oznacza przedział ufności (ang. confidence interval).

† Włączając pacjentów otrzymujących natalizumab.

‡1 pacjent z 10 otrzymywał natalizumab.

§2 pacjentów z 12 otrzymywało natalizumab.

LMPCh, leki modyfikujące przebieg choroby.

Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (MRI)

W ciągu 2 lat wyniki badań MRI potwierdzały pozytywny efekt związany z podawaniem PLP10, ponieważ tylko u 29% pacjentów w grupie PLP10 wobec 67% w grupie placebo wystąpiły nowe lub powiększeniu uległy istniejące zmiany T2 (57% względne zmniejszenie ryzyka). Po wyłączeniu pacjentów przyjmujących natalizumab zaobserwowano zwiększone względne zmniejszenie ryzyka (64%) w grupie PLP10 w porównaniu z grupą placebo, przy czym u 29% pacjentów w grupie PLP10 i 80% pacjentów w grupie placebo wystąpiły nowe lub uległy powiększeniu istniejące zmiany T2 (Tabela 5).

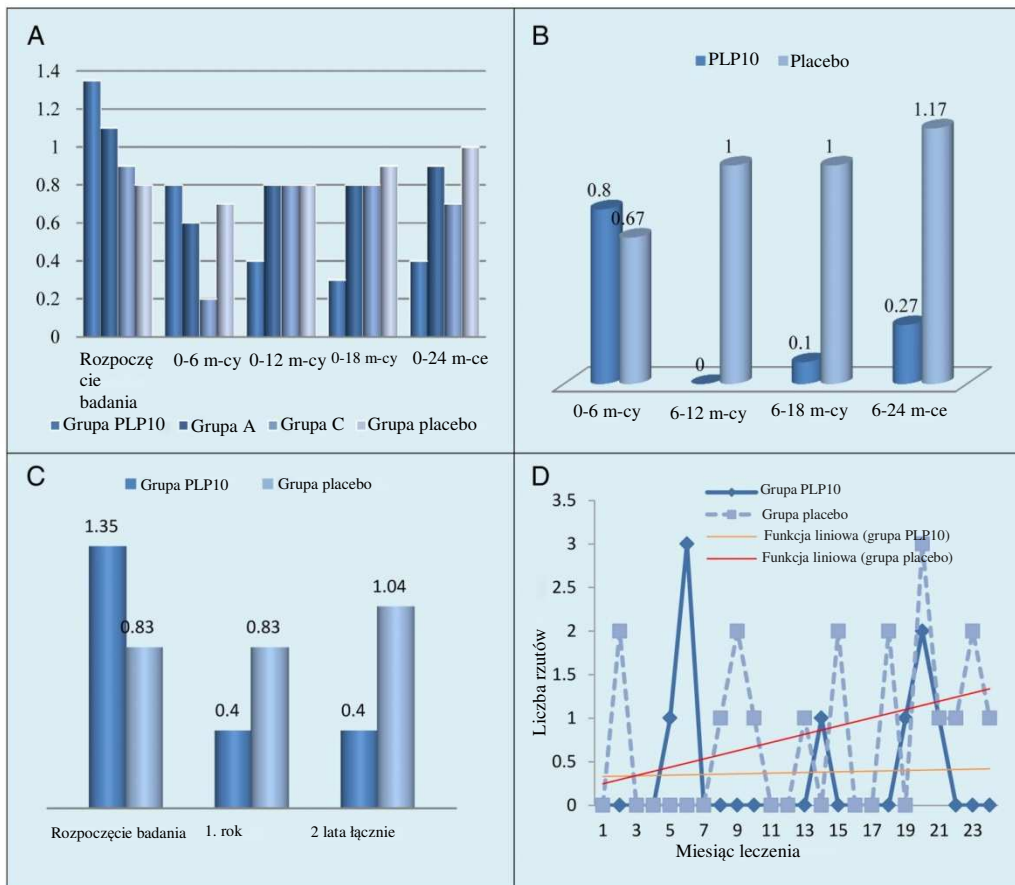
Bezpieczeństwo

W czasie trwającego 30 miesięcy badania nie zgłoszono żadnych istotnych zdarzeń niepożądanych w żadnej z grup. Jedynymi powodami zakończenia udziału w badaniu był smak i zapach preparatu oraz ciąża. U dwojga pacjentów wystąpiły nudności. Nie stwierdzono nieprawidłowości w wynikach żadnego z badań biochemicznych ani hematologicznych. Nie zgłoszono żadnych reakcji alergicznych.

DYSKUSJA

W tym potwierdzającym słuszność koncepcji, prowadzonym metodą podwójnie ślepej próby badaniu klinicznym z randomizacją, mającym na celu ocenę bezpieczeństwa i skuteczności trzech wariantów nowatorskiego preparatu w rzutowo-remisyjnej postaci SM, w przypadku preparatu zawierającego zbilansowaną mieszaninę określonych PUFA Ω -3 i Ω -6, MUFA, SFA, witaminy A, witaminy E i γ -tokoferolu (PLP10) analiza grup wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania wykazała istotną różnicę w porównaniu z placebo pod względem zarówno ARR, jak i progresji niewydolności ruchowej. Nasze wyniki obejmowały analizy dotyczące danych z badania gromadzonych łącznie przez 42 miesiące, w tym przez 12-miesięczny wydłużony okres leczenia, w czasie którego pacjenci nie otrzymywali badanych preparatów. Zaobserwowaliśmy także dużą liczbę osób rezygnujących z udziału w badaniu, głównie z powodu braku akceptacji smaku produktu, co jest częstym zjawiskiem w badaniach wykorzystujących preparaty oleiste. Co ciekawe, statystycznie istotne obniżenie ARR i spowolnienie progresji niewydolności ruchowej zaobserwowano także porównując ARR u pacjentów przyjmujących PLP10 w 24-miesięcznym okresie poprzedzającym badanie z ARR po 24 miesiącach trwania badania; różnice te stały się większe po wyłączeniu pacjentów otrzymujących natalizumab (obecnie najsilniejszy lek modyfikujący przebieg choroby).

Biologia systemów odżywiania może być odpowiedzią na problem stwardnienia rozsianego

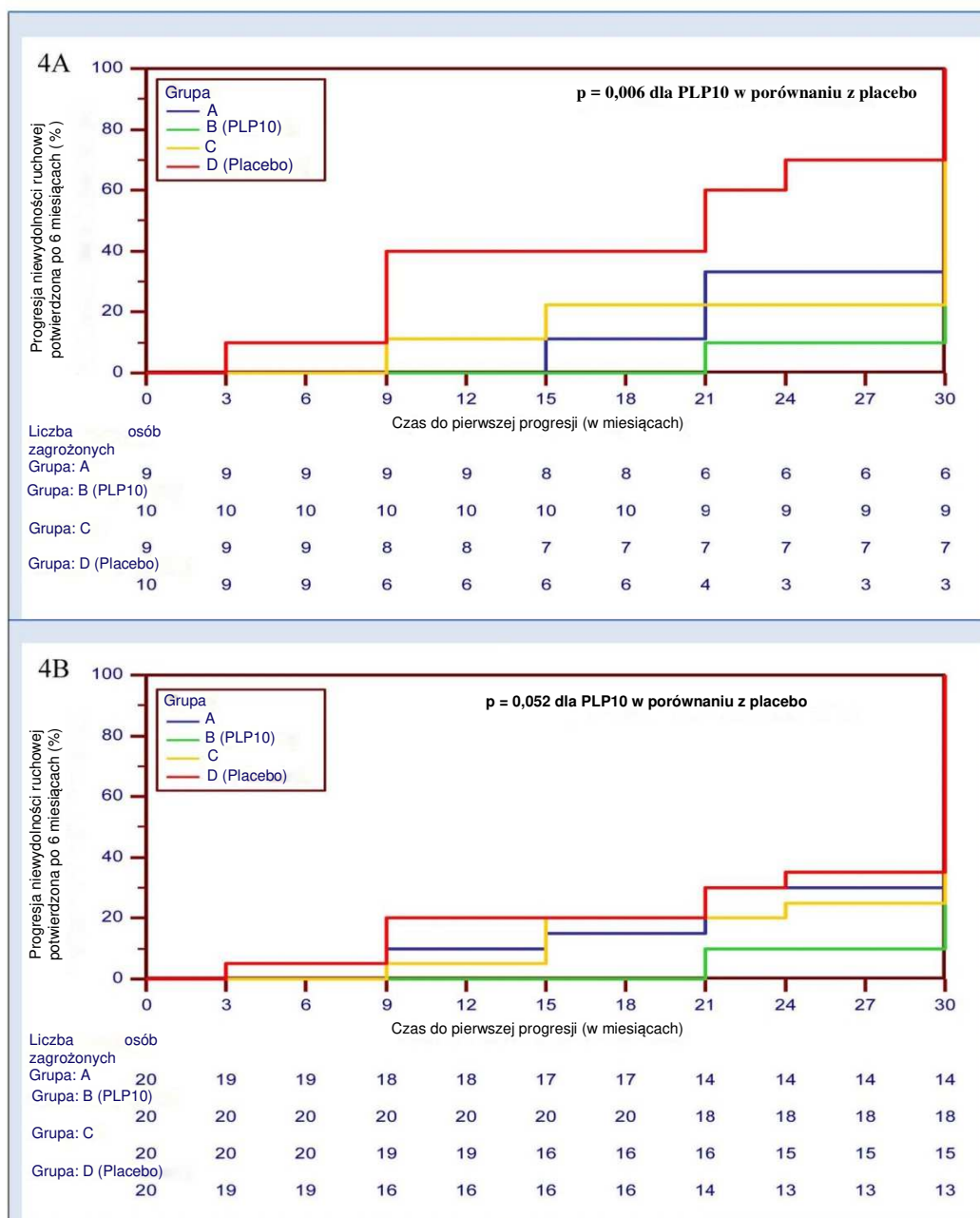


Rycina 3 (A) ARR populacji pacjentów biorących udział w badaniu przez cały czas jego trwania w 24-miesięcznym okresie poprzedzającym jego rozpoczęcie (ARR w punkcie początkowym badania) i w różnych przedziałach czasowych w trakcie badania (6, 12, 18 i 24 miesiące), w zależności od grupy badanej.* (B) ARR populacji pacjentów biorących udział w badaniu przez cały czas jego trwania w przedziałach czasowych 0-6, 6-12, 6-18 i 6-24 miesiące w grupie PLP10 w porównaniu z placebo.* (C) ARR populacji pacjentów biorących udział w badaniu przez cały czas jego trwania w grupie PLP10 w porównaniu z placebo w momencie rozpoczęcia badania, w czasie pierwszego roku i w czasie drugiego roku trwania badania.* (D) Rozkład rzutów choroby w czasie 2 lat w populacji pacjentów uczestniczących w badaniu przez cały czas jego trwania (wyłączając pacjentów otrzymujących natalizumab) w grupie PLP10 (n = 10) w porównaniu z placebo (n = 10). W grupie placebo zaobserwowano bardziej nieregularny rozkład rzutów choroby niż w grupie PLP10, z liniowym trendem wzrostowym, podczas gdy funkcja ta w przypadku grupy PLP10 ma charakter stały. Dzięki zastosowaniu modelu zgodnego z protokołem badania, w którym wykluczeni zostali pacjenci otrzymujący natalizumab, możliwe było porównanie liczby rzutów choroby dla tej samej liczby pacjentów.* Włączając pacjentów otrzymujących natalizumab.

Wartość ARR obniżyła się w ciągu roku u pacjentów przyjmujących PLP10 i utrzymywała się na stałym poziomie do końca trwania badania. Statystycznie istotna różnica w wartościach ARR u pacjentów otrzymujących PLP10 i tych otrzymujących placebo utrzymywała się przez 12-miesięczny okres przedłużenia (utrzymujące się działanie), bez istotnej różnicy w przypadku pacjentów przyjmujących LMPCh. Wyniki kliniczne zostały poparte analizami wyników badań rezonansem magnetycznym, według których odsetek pacjentów bez nowych lub powiększających się zmian T2 także był wyższy w grupie PLP10 niż w grupie placebo. Nie zgłoszono żadnych ciężkich działań niepożądanych.

Zgodnie z naszą wiedzą to badanie jest pierwszym badaniem klinicznym z randomizacją, które miało na celu ocenę proponowanego połączenia substancji czynnych w standaryzowanych proporcjach i schemacie dawkowania w leczeniu SM, zaprojektowanego zgodnie z koncepcją medycyny systemów.

Odżywianie się jest powszechnie uznawane za jeden z czynników środowiskowych potencjalnie zaangażowanych w patogenezę SM, ale jego rola jako leczenia uzupełniającego w tym schorzeniu jest niejasna i lekceważona.⁵¹ Powszechnie znany jest fakt, że większość pacjentów cierpiących na SM stosuje suplementy diety przez dłuższy lub krótszy czas.⁵² Przeciwnitleniacze i kwasy tłuszczowe przyjmowane wraz z pożywieniem mogą wpływać na procesy chorobowe w SM przez ograniczanie stanu zapalnego, w którym bierze udział układ immunologiczny, stresu oksydacyjnego i ekscytotoksyczności.¹² Według opublikowanych danych prozdrowotne substancje w pożywieniu mają działanie plejotropowe i są w stanie wpływać na metabolizm komórki i hamować procesy zapalne dzięki oddziaływaniu na enzymy, receptory jądrowe i czynniki transkrypcyjne.⁵¹ Obecnie dostępne metody leczenia są produktami redukcjonizmu, są tylko częściowo skuteczne i wiążą się z ciężkimi działaniami niepożądanymi. Interferony i octan glatirameru, najczęściej stosowane z obecnie dostępnych leków pierwszego rzutu w SM, charakteryzują się najłagodniejszymi działaniami niepożądanymi spośród terapii tego schorzenia, ale obniżają ARR jedynie o około jedną trzecią i nie mają istotnego wpływu na progresję niewydolności ruchowej.⁵³

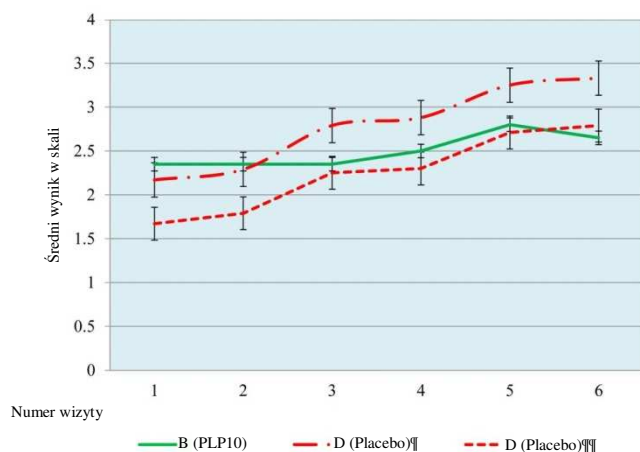


Rycina 4 (A) Krzywa Kaplana-Meiera dotycząca czasu do długotrwałej progresji niewydolności ruchowej wśród pacjentów biorących udział w badaniu przez cały czas jego trwania (wyłączając pacjentów otrzymujących natalizumab), otrzymujących preparat A, PLP10 lub C, w porównaniu z placebo. Preparat PLP10 obniżył ryzyko długotrwałej progresji niewydolności ruchowej o 86% w czasie 2 lat ($p = 0,006$). Preparat A obniżył ryzyko długotrwałej progresji niewydolności ruchowej o 53% ($p = 0,266$), a preparat C – o 67% ($p = 0,061$). (B) Krzywa Kaplana-Meiera dotycząca czasu do długotrwałej progresji niewydolności ruchowej wśród pacjentów wyjściowo przydzielonych do grup otrzymujących preparat A, PLP10 lub C, w porównaniu z placebo. Preparat PLP10 obniżał ryzyko długotrwałej progresji niewydolności ruchowej o 71% w czasie 2 lat ($p = 0,052$, trend). Preparat A obniżył ryzyko długotrwałej progresji niewydolności ruchowej o 22% ($p = 0,727$), a preparat C – o 40% ($p = 0,447$).

Natalizumab obniża ARR o 68% i zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia progresji niewydolności ruchowej o 43%, a u 57% pacjentów otrzymujących go stwierdza się brak nowych lub powiększających się zmian T2 widocznych w badaniu rezonansem magnetycznym, podczas gdy w grupie placebo odsetek ten wynosi 15%.⁵⁴ Fingolimod obniża ARR o 54% (bez istotnego działania ograniczającego progresję niewydolności ruchowej). Zarówno natalizumab, jak i fingolimod stanowią leki drugiego rzutu, które wywołują ciężkie działania niepożądane.⁵⁵

W artykule przeglądowym z 2009 roku Mehta opisał inne badania kliniczne dotyczące stosowania w SM preparatów opartych na pojedynczych składnikach wspomnianych wyżej lub na określonych połączeniach wspomnianych wyżej substancji, ale nikt nie zastosował przeciwutleniającej witaminy γ -tokoferolu.⁵⁶

Biologia systemów odżywiania może być odpowiedzią na problem stwardnienia rozsianego



Rycina 5 Średnia zmiana wyników w rozszerzonej skali niewydolności ruchowej przedstawiona jako funkcja numeru wizyty. Wartości są wyrażone jako średnia \pm błąd standardowy średniej, ¶ Włączając pacjentów otrzymujących natalizumab oraz ¶¶ wyłączając pacjentów otrzymujących natalizumab.

Skład preparatu w naszym badaniu i schemat dawkowania zostały opracowane na podstawie danych pochodzących z badań *in vivo* i *in vitro*. W diecie zachodniej stosunek kwasów Ω -3 do Ω -6 wynosi około 1:20-30; w populacji spożywającej przede wszystkim ryby stosunek ten wynosi około 1:1-2.^{57 58} Dawka dobową preparatu została dobrana według naszej wiedzy tak, aby była wystarczająco wysoka, by przywrócić/wzmocnić mechanizmy antyoksydacyjne organizmu i unormować profil lipidowy błon komórkowych (pod względem zawartości PUFA), a jednocześnie zwiększyć udział składników w mechanizmach przeciwzapalnych i naprawczych. Korzystny efekt spożywania kwasów tłuszczowych widoczny jest dopiero po około 6 miesiącach, co po raz pierwszy zostało uwzględnione w naszym schemacie badania (okres normalizacyjny).⁴⁶ Ten chronoterapeutyczny parametr może mieć kluczowe znaczenie i jest spójny z filozofią koncepcji medycyny systemów. Uważamy, że utrzymujące się działanie w okresie przedłużenia pokrywa się z bardzo długim czasem wymywania i powrotu do wartości stężeń sprzed leczenia dla kwasów Ω -3, szczególnie DHA.⁴⁶ Biorąc pod uwagę fakt, że suplementacja PUFA Ω -3 może stymulować zastępowanie nimi AA w obrębie błon komórkowych, można spekulować, że w ciągu pierwszych 6 miesięcy suplementacji możliwa jest podwyższona aktywność procesów zapalnych.

Oprócz EPA, DHA, LA i GLA, preparat PLP10 zawierał nieznaczne ilości innych strukturalnych/aktywnych kwasów tłuszczowych, określonych MUFA (głównie kwasu oleinowego) i SFA (kwasu palmitynowego i stearynowego), które posłużyły jako bezpośrednie źródło do regeneracji błon komórkowych neuronów i (re)mielinizacji oraz jako czynnik neuroprotekcji, ponieważ wszystkie te związki stanowią ważne składniki, prekursorzy i elementy struktury wszystkich powstających w warunkach fizjologicznych osłonek mielinowych i błon komórkowych. Inkorporacja odpowiednich cząstek do osłonek mielinowych może być szczególnie istotna w czasie aktywnej syntezy. Jeśli te kluczowe związki nie są bezpośrednio lub pośrednio dostępne, może wystąpić amielinizacja, dysmielinizacja lub demielinizacja.⁵⁹ Utrzymanie osłonki mielinowej wymaga ciągłej wymiany jej składników w czasie życia.^{60 61}

Wszystko wskazuje na to, że na etiologię SM składa się wiele czynników i cząstek; uważa się, że określone PUFA i przeciwutleniacze są kluczowe ze względu na powiązania ze wszystkimi poznanymi mechanizmami patogennymi i naprawczymi. W naszym badaniu pokazujemy, że przez zsynchronizowane działania można zastosować podejście holistyczne zgodne z koncepcją medycyny systemów. Po pierwsze, oczywiste jest, że przyjmowanie jednego preparatu zawierającego różne substancje czynne jest bardzo wygodne. Aktualne dane sugerują, że preparaty odżywcze wykazują małe do umiarkowanego działanie lecznicze, a przy tym posiadają odpowiedni profil bezpieczeństwa.^{12 52 56} Uważa się, że połączenie tych konkretnych substancji czynnych z γ -tokoferolem i innymi aktywnymi cząstkami w jeden stabilny preparat sprawi, że pacjenci chętniej będą przestrzegać przyjmowania go, a jednocześnie zachowany zostanie odpowiedni profil bezpieczeństwa. Nie jest możliwe wdrożenie takiego podejścia w przypadku preparatów farmaceutycznych wywołujących częste i ciężkie działania niepożądane, między innymi tych wskazanych obecnie w leczeniu SM. Wziąwszy pod uwagę zalety przyjmowania wielu składników razem, a także fakt, że każdy z nich wykazał biologiczną wiarygodność i został przebadany w różnych warunkach i w różnych schematach dawkowania, podjęliśmy się także weryfikacji hipotezy, że nowatorskie połączenie tych składników będzie wykazywało postulowaną skuteczność osiągniętą przez synergizm wynikający z różnych mechanizmów działania.^{52 56} Co ciekawe, zaobserwowana siła działania leczniczego nie wynika ze zsumowania postulowanej skuteczności pojedynczych składników. Wyniki badań *in vitro* i *in vivo* potwierdzają ideę proponowanej synergii, jednakże należy zweryfikować tę hipotezę w różnych warunkach i z udziałem większej liczby pacjentów.

Zdajemy sobie sprawę z tego, że nasze badanie posiada dwa istotne ograniczenia: mała próba badawcza i wysoki wskaźnik rezygnacji z udziału w badaniu. Co do wielkości próby badanej, należy wziąć pod uwagę, że jest to małe badanie kliniczne II fazy, mające na celu ocenę nowatorskiego preparatu, a co za tym idzie, liczba jego uczestników jest zgodna z danymi zamieszczonymi w stosownej literaturze. Odpowiedzi na pytania, które powstały w przebiegu tego badania, należy poszukać w większym badaniu z randomizacją, w którym możliwe byłoby wykonanie obliczeń o odpowiedniej mocy po uwzględnieniu naszych wyników. Stopień przestrzegania zaleceń przez uczestników stanowi kolejne ograniczenie naszego badania, ale całkowity czas jego trwania, wynoszący łącznie 42 miesiące, nadaje mu jego wartość.⁴⁸ Zdajemy sobie sprawę z tego, że byliśmy zmuszeni podawać nasz preparat w postaci najmniej chętnie przyjmowanej przez pacjentów, to jest w postaci płynu doustnego, czego skutkiem był wysoki poziom nietolerancji z uwagi na jego smak. Niemniej jednak obserwowany suboptymalny stopień przestrzegania zaleceń przez uczestników pokrywa się z danymi z literatury, według których w badaniach oceniających preparaty w postaci płynnych kwasów tłuszczowych pacjenci mniej chętnie przyjmowali badane preparaty niż w badaniach oceniających środki farmaceutyczne. I rzeczywiście, stale odnotowywane przez nas przyczyny wycofania się z badania wskazują, że większość uczestników przerwała stosowanie preparatu nie ze względu na jego bezpieczeństwo, tylko z uwagi na jego smak. Zdecydowanie łatwiej poradzić sobie z niechętnym przyjmowaniem preparatu ze względu na jego smak niż gdy przyczyną są jego działania niepożądane; problem ten można rozwiązać przez optymalizację postaci preparatu w dalszych badaniach. Na tym etapie opracowywania produktu znacznie przekroczylibyśmy próg efektywności kosztowej, gdybyśmy zainwestowali w poprawę tych właściwości preparatu. Ponadto należy zauważyć, że u pacjentów z SM otrzymujących obecne standardowe leczenie występują znacznie częstsze i poważniejsze działania niepożądane.

Niski współczynnik przyjmowania preparatu przez pacjentów i utrata mocy bezpośrednio przyczyniły się do tego, że wykonana analiza ITT była zdecydowanie mniej odporna niż przewidywano, dlatego musieliśmy poważnie rozważyć analizę wykonaną w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem badania. Skupiliśmy się na analizie danych zgodnych z protokołem ze względu na to, że jest to metoda, która najlepiej pozwala ocenić koncepcję, której słuszność badanie to miało potwierdzić.²⁴ Aby włączenie wyników analizy zgodnej z protokołem badania do interpretacji ogólnych wyników było uzasadnione, musimy upewnić się, że randomizacja nie została poważnie zakłócona w wyniku wyłączenia pacjentów, którzy zrezygnowali z udziału w badaniu. Porównanie parametrów z początku badania dotyczących pacjentów uwzględnionych w analizie zgodnej z protokołem wykazało względną równowagę w porównywanych grupach co do znanych czynników zakłócających. Niemniej nie można wykluczyć wpływu nieznanymi czynnikami wprowadzających błędy do wyników badania mimo nieistotnych różnic w charakterystykach w punkcie początkowym. Aby dodatkowo zabezpieczyć się pod tym kątem, wykonaliśmy analizy skorygowane dla pierwszo- i drugorzędowych analiz pod kątem istotnych parametrów klinicznych i demograficznych, to jest liczby rzutów choroby, EDSS, wieku i LMPCh.

Niniejsze wstępne, małe badanie kliniczne II fazy z randomizacją dostarcza danych na temat nowatorskiego preparatu opracowanego z uwzględnieniem czynników odżywczych, metabolicznych, immunologicznych i neurobiologicznych, które mogą być zaangażowane w progresję SM. Ten nowatorski produkt wykazał skuteczność w takich parametrach, jak ARR i progresja niewydolności ruchowej. Zadbaliśmy o to, aby zastosowana metodologia umożliwiła kontrolowanie potencjalnych źródeł błędów, a dzięki temu – wyciągnięcie rzetelnych wniosków. Jesteśmy świadomi, że ryzyko zakłóceń w każdych warunkach badawczych można jedynie zminimalizować, nie wykluczyć, oraz że w małych badaniach zawsze należy liczyć się z możliwością pojawienia się błędów przypadkowego. Dokładamy zatem uzyskane przez nas wyniki do puli danych z badań z randomizacją w nadziei, że znajdą one odzwierciedlenie w większym kontrolowanym badaniu klinicznym z randomizacją.

²Clinical and Molecular Epidemiology Unit, Department of Hygiene and Epidemiology, University of Ioannina School of Medicine (UISM), Ioannina, Greece

³Department of Health and Science, European University Cyprus, Nicosia, Cyprus

Podziękowania Dziękujemy wszystkim pacjentom biorącym udział w badaniu. Dziękujemy Thyrsos Posporis MD oraz czynie centralnej (Ayios Therissos Medical Diagnostic Centre, Nicosia, Cyprus) oraz Eleni Eracleous, MD (neuroradiolog) za udział w wykonywaniu badań MRI, a ich zespołom za wykonanie odczytów MRI. Specjalne podziękowania kierujemy do Eleni Kkolou, farmaceutki biorącej udział w badaniu, oraz do Eftychii Gagliarofa za opiekę pielęgniarską i pobieranie krwi od pacjentów. Dziękujemy również Demetris Hadjisofoklis i Ioannie Leontiou (University of Nicosia, Helix Business Incubator) za ich udział w procesie randomizacji pacjentów, gromadzenie danych oraz opiekę nad kodami zaślepienia. Oprócz tego dziękujemy CING za występowanie w roli gospodarza badania. Ponadto dziękujemy Ministerstwu Handlu, Przemysłu i Turystyki Cypru za finansowanie projektu, a Yasoo Health Ltd. za dostarczenie niektórych surowców w zamian za zbadanie, w ich imieniu, skuteczności i bezpieczeństwa stosowania γ -tokoferolu.

Wkład autorów Wszyscy autorzy brali udział w interpretacji danych. ISP sporządził raport i ryciny, natomiast wszyscy autorzy dokonali krytycznego przeglądu i zaakceptowali ostateczną wersję. MCP i ISP byli odpowiedzialni za protokół i schemat badania. MCP dokonywał oceny oznak postępu klinicznego u pacjentów i pełnił rolę lekarza prowadzącego. ISP i GNL brali udział w czynnościach związanych z opieką pozafarmaceutyczną. ISP przeprowadził poszukiwania literatury, natomiast ISP i GNL mieli udział w przygotowywaniu preparatu do podawania pacjentom i uzasadnieniu jego składu. ISP nadzorował procedurę ustalania składu preparatów i analizę profili kwasów tłuszczowych w błonach czerwonych krwinek. EEN i ISP wykonali analizy statystyczne. EEN był badaczem niezależnym. Wszyscy autorzy zaświadcza o dokładności i kompletności danych i analiz statystycznych. Wszyscy autorzy przeczytali i zatwierdzili manuskrypt.

Finansowanie Wsparcie finansowe stanowił grant z Ministerstwa Handlu, Przemysłu i Turystyki Cypru, z Programu Tworzenia Nowych Zaawansowanych Technologii i Przedsiębiorstw Innowacyjnych poprzez Inkubator Przedsiębiorstw.

Konflikt interesów MCP, GNL i ISP otrzymali granty z Ministerstwa Handlu, Przemysłu i Turystyki Cypru, z Programu Tworzenia Nowych Zaawansowanych Technologii i Przedsiębiorstw Innowacyjnych poprzez Inkubator Przedsiębiorstw. PALUPA Medical Ltd jest firmą badawczą utworzoną i zarejestrowaną w celu wykonania badania, zgodnie z wymaganiami rządowego programu grantowego. MCP, GNL, ISP i CING są udziałowcami PALUPA Medical Ltd. MCP jest pracownikiem CING. ISP jest starszym współpracownikiem badawczym w CING. GNL jest współpracownikiem CING. EEN deklaruje brak konfliktu interesów. Żadna firma farmaceutyczna nie była zaangażowana w prowadzenie tego badania klinicznego fazy II. Stosowany w badaniu preparat jest chroniony tymczasowym patentem USA, nr wniosku 61469081.

Zgoda pacjentów Uzyskana.

Aprobata komisji bioetycznej Cypryjska Państwowa Komisja Bioetyczna (nr re. EEBK/En/ 2005/10).

Proweniencja i recenzja Niezamawiana; recenzowane przez zewnętrznych recenzentów.

Oświadczenie o udostępnianiu danych Nie są dostępne żadne dodatkowe dane.

LITERATURA

1. Baranzini SE, Oksenberg JR, Hauser SL. New insights into the genetics of multiple sclerosis. *J Rehabil Res Dev* 2002;39:201-10.
2. Goni J, Esteban FJ, De Mendizabal NV, *et al.* A computational analysis of protein-protein interaction networks in neurodegenerative diseases. *BMC Syst Biol* 2008;2:52.
3. Lobo I. Multifactorial inheritance and genetic disease. *Nat Educ* 2008;1(1) <http://www.nature.com/scitable/topicpage/multifactorial-inheritance-and-genetic-disease-919>.
4. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2002;359:1221.
5. Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 1993;49:577-87.
6. Knight J. Reactive oxygen species and the neurodegenerative disorders. *Ann Clin Lab Sci* 1997;27:11-25.

Afiliacja autorów

¹The Cyprus Institute of Neurology and Genetics (CING) Neurology Clinic C i PALUPA Medical Ltd, Nicosia, Cypr

7. Matute C, Alberdi E, Domercq M, *et al.* The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. *Trends Neurosci* 2001;24:224-30.
8. Owens T. The enigma of multiple sclerosis: inflammation and neurodegeneration cause heterogeneous dysfunction and damage. *Curr Opin Neurol* 2003;16:259-65.
9. Smith KJ, Kapoor R, Felts PA. Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol* 1999;9:69-92.
10. Ahn AC, Tewari M, Poon CS, *et al.* The clinical applications of a systems approach. *PLoS Med* 2006;3:e209.
11. Auffray C, Chen Z, Hood L. Systems medicine: the future of medical genomics and healthcare. *Genome Med* 2009;1:2.
12. Van Meeteren ME, Teunissen CE, Dijkstra CD, *et al.* Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *Eur J Clin Nutr* 2005;59:1347-61.
13. Cunnane S, Ho S, Dore-Duffy P, *et al.* Essential fatty acid and lipid profiles in plasma and erythrocytes in patients with multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr* 1989;50:801-6.
14. Harbige LS, Pinto E, Xiang M, *et al.* Polyunsaturated fatty acids in the pathogenesis and treatment of multiple sclerosis. *Proc Nutr Soc* 2008;67:E21.
15. Wilson R, Tocher D. Lipid and fatty acid composition is altered in plaque tissue from multiple sclerosis brain compared with normal brain white matter. *Lipids* 1991;26:9-15.
16. Calder PC. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 2006;83:S1505-19.
17. Piani D, Fontana A. Involvement of the cystine transport system xc- in the macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. *J Immunol* 1994;152:3578-85.
18. Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Dev Neurosci* 2000;18:383-99.
19. Calder PC. Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc* 2002;61:345-58.
20. Gil Á. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomed Pharmacother* 2002;56:388-96.
21. Ariel A, Serhan CN. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends Immunol* 2007;28:176-83.
22. Arita M, Ohira T, Sun YP, *et al.* Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and chemR23 to regulate inflammation. *J Immunol* 2007;178:3912-17.
23. Janakiram NB, Rao CV. Role of lipoxins and resolvins as anti-inflammatory and proresolving mediators in colon cancer. *Curr Mol Med* 2009;9:565-79.
24. Serhan C, Arita M, Hong S, *et al.* Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. *Lipids* 2004;39:1125-32.
25. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 2008;8:349-61.
26. Rossetti RG, Seiler C, DeLuca P, *et al.* Oral administration of unsaturated fatty acids: effects on human peripheral blood T lymphocyte proliferation. *J Leukoc Biol* 1997;62:438-43.
27. Vatassery G. Vitamin E and other endogenous antioxidants in the central nervous system. *Geriatrics* 1998a;53(Suppl 1):S25-7.
28. Fukuzawa K, Gebicki JM. Oxidation of [alpha]-tocopherol in micelles and liposomes by the hydroxyl, perhydroxyl, and superoxide free radicals. *Arch Biochem Biophys* 1983;226:242-51.
29. Christen S, Woodall AA, Shigenaga MK, *et al.* γ -Tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NOx and complements α -tocopherol: physiological implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3217-22.
30. Brigelius-Flohe R, Kelly FJ, Salonen JT, *et al.* The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr* 2002;76:703-16.
31. Calder P. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol. Nutr Food Res* 2008;52:885-97.
32. Edwards IJ, O'Flaherty JT. Omega-3 fatty acids and PPAR γ in cancer. *PPAR Res* 2008;2008:1-15.
33. Groeger AL, Cipollina C, Cole MP, *et al.* Cyclooxygenase-2 generates anti-inflammatory mediators from omega-3 fatty acids. *Nat Chem Biol* 2010;6:433-41.
34. Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:162-76.
35. Dyall SC, Michael GJ, Michael-Titus AT. Omega-3 fatty acids reverse age-related decreases in nuclear receptors and increase neurogenesis in old rats. *J Neurosci Res* 2010;88:2091-102.
36. Salvati S, Natali F, Attorri L, *et al.* Eicosapentaenoic acid stimulates the expression of myelin proteins in rat brain. *J Neurosci Res* 2008;86:776-84.
37. Abraham M, Shapiro S, Karni A, *et al.* Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are preferentially expressed by Th1 vs. Th2 cells. *J Neuroimmunol* 2005;163:157-64.
38. Ffrench-Constant C. Pathogenesis of multiple sclerosis. *Lancet* 1994;343:271-75.
39. Leppert D, Lindberg RLP, Kappos L, *et al.* Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *Brain Res Rev* 2001;36:249-57.
40. Curtis CL, Rees SG, Cramp J, *et al.* Effects of n-3 fatty acids on cartilage metabolism. *Proc Nutr Soc* 2002;61:381-9.
41. Harris MA, Hansen RA, Vidsudhiphan P, *et al.* Effects of conjugated linoleic acids and docosahexaenoic acid on rat liver and reproductive tissue fatty acids, prostaglandins and matrix metalloproteinase production. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2001;65:23-9.
42. McCabe A, Wallace J, Gilmore W, *et al.* The effect of eicosapentaenoic acid on matrix metalloproteinase gene expression. *Lipids* 1999;34:S217-18.
43. Shinto L, Marracci G, Bumgarner L, *et al.* The effects of Omega-3 fatty acids on matrix metalloproteinase-9 production and cell migration in human immune cells: implications for multiple sclerosis. *Autoimmune Dis* 2011;2011:1-6.
44. McNamara RK. DHA deficiency and prefrontal cortex neuropathology in recurrent affective disorders. *J Nutr* 2010;140:864-8.
45. Huang WL, King VR, Curran OE, *et al.* A combination of intravenous and dietary docosahexaenoic acid significantly improves outcome after spinal cord injury. *Brain* 2007;130:3004-19.
46. Marangoni F, Angeli MT, Colli S, *et al.* Changes of n-3 and n-6 fatty acids in plasma and circulating cells of normal subjects, after prolonged administration of 20:5 (EPA) and 22:6 (DHA) ethyl esters and prolonged washout. *Biochim Biophys Acta* 1993;1210:55-62.
47. Martínez M, Vázquez E, García-Silva MT, *et al.* Therapeutic effects of docosahexaenoic acid ethyl ester in patients with generalized peroxisomal disorders. *Am J Clin Nutr* 2000;71:376S-85S.
48. Committee for medicinal products for human use. Guideline on clinical trials in small populations European Medicines Agency, London, UK, 2006;1-10.
49. Dallal GE. The Little Handbook of Statistical Practice ebook (kindle edition). USA, 2008.
50. Wang YC, Meyerson L, Tang YQ, *et al.* Statistical methods for the analysis of relapse data in MS clinical trials. *J Neurol Sci* 2009;285:206-11.
51. Riccio P. The molecular basis of nutritional intervention in multiple sclerosis: a narrative review. *Complement TherMed* 2011;19:228-37.
52. Farinotti M, Simi S, Di Pietrantonj C, *et al.* Dietary interventions for multiple sclerosis (Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2007(1) CD004192.
53. Marvin MG. Multiple sclerosis review. *P T* 2012;37:175-84.
54. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, *et al.* A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006;354:899-910.
55. Kappos L, Radue EW, O'Connor P, *et al.* A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010;362:387-401.
56. Mehta LR, Dworkin RH, Schwid SR. Polyunsaturated fatty acids and their potential therapeutic role in multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 2009;5:82-92.
57. Rafat AS, Saame RS, Laura AS, *et al.* Omega 3-fatty acids: health benefits and cellular mechanisms of action. *Mini Rev Med Chem* 2004;4:859-71.
58. Shaikh SR, Edidin M. Polyunsaturated fatty acids, membrane organization, T cells, and antigen presentation. *Am J Clin Nutr* 2006;84:1277-89.
59. Yao JK. Increased polyunsaturated fatty acids in developing and regenerating peripheral nerve. *Biochim Biophys Acta* 1982;712:542-6.
60. Lajtha A, Toth J, Fujimoto K, *et al.* Turnover of myelin proteins in mouse brain in vivo. *Biochem J* 1977;164:323-29.
61. LeBaron FN, Sanyal S, Jungalwala FB. Turnover rate of molecular species of sphingomyelin in rat brain. *Neurochem Res* 1981;6:1081-9.



Nowatorski nutraceutyczny preparat doustny zawierający kwasy tłuszczowe omega-3 i omega-6 z witaminami (PLP10) w rzutowo-remisyjnej postaci stwardnienia rozsianego: potwierdzające słuszność koncepcji badanie kliniczne z randomizacją i kontrolą placebo, prowadzone metodą podwójnie ślepej próby

Marios C Pantzaris, George N Loukaides, Evangelia E Ntzani, et al.

BMJ Open 2013 3:

doi: 10.1136/bmjopen-2012-002170

Zaktualizowane informacje i usługi można znaleźć na stronie:

<http://bmjopen.bmj.com/content/3/4/e002170.full.html>

Są to:

Uzupełnienie danych	„Supplementary Data” http://bmjopen.bmj.com/content/suppl/2013/04/10/bmjopen-2012-002170.DC1.html
Literatura	Niniejszy artykuł cytuje 55 artykułów, z których 13 jest dostępnych bezpłatnie na stronie: http://bmjopen.bmj.com/content/3/4/e002170.full.html#ref-list-1
Otwarty dostęp	Niniejszy artykuł, rozpowszechniany jest na zasadzie otwartego dostępu zgodnie z warunkami Creative Commons Attribution Non-commercial License, która zezwala na wykorzystanie, rozpowszechnianie i kopiowanie w dowolnym medium, pod warunkiem odpowiedniego zacytowania oryginalnej pracy, wykorzystania do celów niehandlowych, zgodnego z warunkami licencji. Zob.: http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/ i http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/legalcode
Bieżące informacje e-mailowe	Otrzymywanie bezpłatnych wiadomości e-mailowych, gdy ten artykuł jest cytowany w nowych artykułach. Zapisz się w polu w prawym górnym rogu wersji online tego artykułu.

—

Prośby o pozwolenie – przejdź do:
<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

Aby zamówić reprint artykułu – przejdź do:
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

Aby zamówić subskrypcję BMJ – przejdź do:
<http://group.bmj.com/subscribe/>

Temat Artykuły o podobnej tematyce można znaleźć w następujących zbiorach:
Zbiory

- [Medycyna komplementarna](#) (18 artykułów)
- [Neurologia](#) (77 artykułów)
- [Odżywianie i metabolizm](#) (57 artykułów)
- [Farmakologia i terapie](#) (144 artykuły)

Uwagi

Prośby o pozwolenie – przejdź do:
<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

Aby zamówić przedruk artykułu – przejdź do:
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

Aby zamówić subskrypcję BMJ –
przejdź do:
<http://group.bmj.com/subscribe/>