

Studio randomizzato controllato, in doppio cieco, per valutare l'efficacia e la tollerabilità di *phyllanthus niruri* verso placebo nel trattamento di pazienti affetti da epatite B cronica: il progetto corona



F. DONATO

Il razionale scientifico
Si ritiene che vi siano 350 milioni di persone nel mondo cronicamente infette da virus dell'epatite B (HBV) (Lok e McMahon 2001). Di essi, una percentuale compresa tra il 15 e il 40% vanno incontro a gravi conseguenze nel corso della loro vita, in particolare a cirrosi epatica o epatocarcinoma (Lok e McMahon). In Italia grazie anche alla diffusione della vaccinazione obbligatoria dal 1991 si è osservata una riduzione della frequenza dell'epatite B dagli anni '90 a oggi, anche se una quota dell'1% della popolazione risulta ancora cronicamente infetta (Stroffolini 2005). Tuttavia si riscontra una considerevole variabilità nella proporzione di soggetti adulti con infezione cronica da HBV. Nella provincia di Brescia uno studio epidemiologico ha mostrato come il 5-6% dei residenti di età superiore ai 50 anni

sia infetto, in assenza di manifestazioni cliniche a livello epatico (Donato et al, 2002). Attualmente il trattamento dell'epatite B viene effettuato con gli interferoni, lamivudina, adefovir, entecavir e tenofovir solo nei pazienti con epatite cronica da moderata a severa, definita sulla base della biopsia epatica, con attiva replicazione dell'HBV (HBV DNA > 100.000 coppie/ml) e con persistente elevazione delle transaminasi, secondo le raccomandazioni dell' European Association for the Study of the Liver (EASL) (EASL, 2009). Tuttavia i risultati dei trial finora effettuati hanno mostrato un'efficacia limitata di questi trattamenti, che in diversi casi vengono interrotti prima del termine per la comparsa di effetti avversi di rilievo.

Il *Phyllanthus niruri* è una pianta ampiamente diffusa nei paesi tropicali e subtropicali ed è usata per la cura di diverse patologie,

in particolare a carico del fegato, nella medicina tradizionale di diversi paesi, soprattutto nell'ambito della medicina cinese e indiana (Blumberg). Sono isolati diversi composti chimici negli estratti di questa pianta, che sembrano responsabili dei principali effetti farmacologici, tra cui alcaloidi, flavonoidi, legnani, fenoli e terpeni (Blumberg, 1998). Fin dagli anni '80, diversi studi sperimentali hanno mostrato un effetto positivo del trattamento dei soggetti con infezione cronica da HBV con piante del genere *Phyllanthus*. Alcuni studi in vitro e in vivo hanno mostrato che gli estratti di piante del genere *Phyllanthus* inibiscono la replicazione dell'HBV a diversi livelli (Venkateswaran et al, 1987; Lee et al, 1996; Ott et al, 1997; Lama et al, 2006).

Una revisione condotta da un gruppo Cochrane nel 2001 ha incluso 22 trial randomizzati con-

trollati (RCT) pubblicati dal 1991 al 1999 (Liu et al, 2001/a e 2001/b). In tutti questi studi il gruppo sottoposto a trattamento con il genere *Phyllanthus* è stato confrontato con un gruppo di controllo sottoposto a terapia con placebo, interferone o altri preparati erboristici. I risultati della meta-analisi mostrano che il trattamento con il genere *Phyllanthus* è circa 5 volte più efficace del placebo nel determinare la clearance dell'HBV (negatività di HBsAg) in soggetti HBsAg posi-

gior parte degli RCT erano di bassa qualità sotto l'aspetto metodologico, avevano un follow-up breve e includevano un piccolo numero di soggetti. Inoltre i risultati delle ricerche non sono concordi perché accanto a studi positivi vi sono studi con risultati negativi e non è chiaro quali elementi relativi al protocollo della ricerca o alle caratteristiche dei soggetti inclusi possano influenzare il risultato del trattamento. Tutte le ricerche sono state effettuate in paesi asiatici, ed è pos-

lutazione virologica ed epatica con un monitoraggio attento dei possibili effetti avversi e con un adeguato follow-up e numero di pazienti da sottoporre a trattamento.

Pochi studi sono stati pubblicati successivamente alla meta-analisi di Liu et al, con risultati contraddittori. Uno studio comparativo con *Phyllanthus amarus* verso interferone alfa-1b ha riscontrato un'efficacia del preparato erboristico simile a quelle dell'interferone (Xin-Hua et al, 2001). Invece, una ricerca condotta su soggetti con epatite cronica HBeAg positiva ed elevati livelli di transaminasi non ha rilevato alcun effetto anti-virale di *Phyllanthus urinarius* (Chan et al, 2003). Un'altra revisione critica dell'impiego del *Phyllanthus* per il trattamento dell'epatite B ha identificato 14 trial, dei quali la metà con risultati positivi e la metà con risultati negativi, sollevando il dubbio che altri eventuali trial con risultati negativi non siano stati pubblicati e concludendo sulla necessità di nuovi studi condotti in modo rigoroso (Martin e Ernst, 2003).

Anche gli autori di un recentissimo articolo pubblicato sul giornale ufficiale dell' AISF (Associazione Italiana per lo Studio del Fegato) concordano riguardo alla necessità di adeguati e rigorosi RCTs per accertare il ruolo dei preparati erboristici, tra cui *Phyllanthus amarus*, per il trattamento delle malattie epatiche (Stickel e Schuppan, 2007).

Per poter trarre conclusioni sul possibile impiego del *Phyllanthus* per il trattamento dell'infezione da HBV ci proponiamo di condurre un nuovo RCT con una metodologia rigorosa, per un tempo sufficientemente lungo e misure di outcome certo, quali la viremia, e con un numero adeguato di soggetti.

Obiettivi della ricerca
L'obiettivo primario è dimostrare la superiorità della risposta vi-

tivi (rischio relativo, RR=5,64, intervallo di confidenza al 95%, IC 95%: 1,85-17,21). Non si è riscontrata alcuna differenza tra il trattamento con *Phyllanthus* e quello con interferone. Si è invece riscontrata in alcuni studi una maggiore efficacia del trattamento combinato *Phyllanthus* + interferone rispetto a interferone da solo nel determinare la clearance di HBsAg sierico (RR=1,56, IC 95%: 1,06-2,32). Non sono stati riportati effetti avversi di rilievo del trattamento con *Phyllanthus*. Tuttavia, la mag-

sibile che vi siano bias di pubblicazione. Gli autori della meta-analisi concludono che nonostante vi sia qualche elemento per ritenere che le piante del genere *Phyllanthus* possano avere un effetto positivo nel trattamento dell'infezione da HBV, da sole o in associazione con interferone, non vi è ancora un'evidenza conclusiva in merito ad efficacia e innocuità del trattamento. Gli autori ritengono quindi necessari ulteriori ricerche, con RCT di elevata qualità, misure di outcome forte, in particolare quelli di va-



rologica al mese 12 (al termine del trattamento), misurata in termini di non rilevabilità dell'HBV DNA - misurato attraverso il metodo Versant HBVDNA® (soglia di rilevabilità 2000 copie/mL) - della somministrazione di Phyllanthus amarus in confronto a placebo in pazienti adulti affetti da epatite B cronica non candidabili ad altre terapie.

lutazione dell'efficacia e della tollerabilità di Phyllanthus niruri in pazienti adulti affetti da epatite B cronica. I gruppi di trattamento sono i seguenti:

- ▶ Phyllanthus niruri in monoterapia: 12 mesi di terapia orale;
- ▶ Placebo: 12 mesi di terapia orale

In questo studio viene inserito

tatto diretto con i medici che somministrano i trattamenti e con i pazienti. Le compresse del preparato sperimentale e quelle del placebo sono state confezionate dall'Azienda fornitrice (Dabur India) in modo tale da non consentire di distinguere le une dalle altre. I soggetti vengono assegnati ai due gruppi secondo l'ordine di entrata nello studio

FIGURA 1. FASI E TEMPI PREVISTI PER LO SVOLGIMENTO DELLA RICERCA

1a fase: reclutamento dei pazienti in 6 mesi



2a fase: trattamento dei pazienti, analisi di laboratorio e variabili di outcome in 12 mesi



3a fase: follow-up post-trattamento, analisi di laboratorio e variabili di outcome in 6 mesi



4a fase: analisi statistica e stesura del report finale: 1 mese



Obiettivi secondari sono:

- ▶ Misurare la concentrazione dell'HBV DNA ai mesi 1, 3, 6, 9, 12 e 18 per valutare l'attività anti-virale del trattamento in esame.
- ▶ Confrontare, ai mesi 1, 3, 6, 9, 12 e 18 l'efficacia della terapia in termini di scomparsa della sieropositività per HBsAg e di HBeAg nei soli soggetti HBeAg positivi.
- ▶ Valutare la frequenza di normalizzazione dei valori di transaminasi nel corso dello studio
- ▶ Valutare la frequenza di persistenza della eventuale normalizzazione dei valori di transaminasi e di negativizzazione dell'HBVDNA a 6 mesi dalla fine dello studio

Il disegno sperimentale
Lo studio è un trial randomizzato controllato di fase III, in doppio cieco, a 2 braccia, per la va-

un gruppo trattato con placebo in quanto non vi sono terapie approvate di consolidata efficacia e innocuità per pazienti nelle condizioni indicate dai criteri di inclusione.

La randomizzazione è stata effettuata mediante impiego di numeri casuali generati con un software per l'analisi statistica. Per assicurare il doppio cieco, la randomizzazione è stata effettuata da un epidemiologo che opera presso la Sezione di Igiene, Epidemiologia e Sanità Pubblica dell'Università di Brescia - Servizio di Epidemiologia dell'ASL di Brescia, e che invia l'indicazione dei trattamenti (A o B) da assegnare ai soggetti inclusi nella ricerca sulla base dei numeri casuali estratti, senza avere alcun con-

con una randomizzazione a blocchi randomizzati di 4, di modo che ogni 4 pazienti 2 sono trattati con il prodotto erboristico e 2 con il placebo, secondo una delle possibili sequenze casuali. Tutti gli esami di laboratorio e le visite cliniche vengono effettuate durante il periodo di trattamento e durante il follow-up su tutti i soggetti in cieco, nei tempi qui riportati. L'analisi dei dati verrà effettuata da un epidemiologo estraneo alla ricerca su dati anonimi, in cieco. E' prevista un'analisi ad interim su di 1/3 dei pazienti reclutati.

Nel soprastante schema (**Fig. 1**) è riportato il cronogramma dello studio. Dopo la messa a punto iniziale del progetto con la predisposizione del materiale neces-

sario e l'approvazione del Comitato Etico, l'arruolamento dei pazienti è iniziato nel mese di dicembre 2008 e procederà nel corso del 2009, fino a raggiungere la numerosità prevista. Il trattamento dura 12 mesi, il follow-up post-trattamento 6 mesi e alla fine dello studio, verrà effettuata l'analisi dei dati e la stesura del report conclusivo. La durata com-

mento Materno Infantile e di Tecnologie Biomediche, Università degli Studi di Brescia, coadiuvato da **Massimo Puoti**, Professore Associato presso la medesima Clinica e **Francesco Donato**, Professore Ordinario presso la Sezione di Igiene, Epidemiologia e Sanità Pubblica, Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata, dell'Università degli Studi di Brescia e Responsabile del Servizio Epidemiologico dell'ASL di Brescia. Altri collaboratori sono le dr.sse **Barbara Zanini**, Clinica di Gastroenterologia, Azienda Ospedaliera Spedali Civili di Brescia, e **Chiara Baiguera**, Clinica delle Malattie Infettive e Tropicali, Azienda Ospedaliera Spedali Civili di Brescia.

Dipartimento e UO della struttura presso cui viene svolta effettivamente la sperimentazione e dove vengono conservate le informazioni della sperimentazione

La sperimentazione si svolge presso la Clinica delle Malattie Infettive e Tropicali, Azienda Ospedaliera Spedali Civili di Brescia, Ambulatorio Epatiti e, per la parte epidemiologica e biostatistica, presso la Sezione di Igiene, Epidemiologia e Sanità Pubblica, Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata, dell'Università degli Studi di Brescia.

Descrizione del trattamento e delle procedure

I pazienti ritenuti eleggibili per la ricerca sulla base dei dati clinici riportati nel database dell'Ambulatorio Epatiti della Clinica di Malattie Infettive e Tropicali degli Spedali Civili di Brescia vengono invitati a una visita di scree-

ning per valutare se possono prendere parte allo studio. Se un paziente risponde ai criteri di inclusione dello studio anche alla visita di screening, viene invitato a partecipare alla ricerca. Gli viene quindi spiegato il rationale dello studio e la metodologia di conduzione e gli vengono fornite tutte le informazioni inerenti i possibili vantaggi e svantaggi che avrà nel partecipare alla ricerca e la possibilità di ritirarsi in qualsiasi momento senza conseguenze. Se il paziente accetta di partecipare alla ricerca firma il modulo di consenso informato e viene quindi invitato a presentarsi ad una data prefissata per l'inizio della terapia.

Ai soggetti appartenenti al gruppo in trattamento viene somministrato il *Phyllanthus niruri*, per via orale, alla dose di una pastiglia da 250 mg per 2 volte al giorno per 12 mesi.

La preparazione di *Phyllanthus niruri* prodotta dalla "Dabur India" ha concluso favorevolmente la procedura di notifica nel registro degli integratori alimentari approvati dal Ministero della Salute secondo Decreto Legislativo 21 maggio 2004, n.169, art. 10. (codice E 06 25494-Y).

Il medico sperimentatore effettua la somministrazione del preparato utilizzando le confezioni appositamente fornite, contenenti l'uno il preparato in esame e l'altro il placebo, sulla base della lista di assegnazione di pazienti al trattamento fornita da un epidemiologo afferente alla Sezione di Igiene, Epidemiologia e Sanità Pubblica dell'Università di Brescia - Servizio di Epidemiologia dell'ASL di Brescia.

Follow-up

Ai mesi 1, 3, 6, 9 12 e 18 il paziente si reca presso l'Ambulatorio Epatiti della Clinica delle Malattie Infettive e Tropicali, Azienda Ospedaliera Spedali Civili di Brescia, per un controllo clinico e una valutazione di alcuni para-



lessiva prevista per il progetto è di 24 mesi.

Investigatori principali e collaboratori

I principali investigatori della ricerca sono **Giampiero Carosi**, Professore Ordinario presso la Clinica delle Malattie Infettive e Tropicali, Azienda Ospedaliera Spedali Civili di Brescia e Cattedra di Malattie Infettive, Diparti-

TABELLA 1. FLOW-CHART RIASSUNTIVA DEI PARAMETRI PREVISTI E RELATIVI COSTI (EVIDENZIATI IN GIALLO GLI ESAMI NON PREVISTI DALLA ROUTINE, IL CUI COSTO QUINDI VA COPERTO DAI FONDI STANZIATI PER LA RICERCA)

ESEMPI E TEMPI	SCREENING	GIORNO 1 (BASALE)	MESE 1	MESER 3	MESE 6	MESE 9	MESE 12	MESE 18	COSTI AGGIUNTIVI
Consenso informato	X	X*							0
Criteri inclusione / esclusione	X	X*							0
Anamnesi	X								0
Esame obiettivo	X							X	0
Segni vitali	X	X	X	X	X	X	X	X	0
Peso e altezza	X	X	X	X	X	X	X	X	0
HIV, HCV, HDV	X								Routine
AFP	X								Routine
PT	X				X		X	X	2.58 x 3 = 7.74 euro
HBeAg/HbeAb	X				X		X	X	Routine
HBsAg/HbsAb	X						X	X	Routine
HBV DNA	X	X	X	X	X		X	X	Mese 1 e 3 = 40.2 x 3 = 80.4 euro
Test di gravidanza		X							Giorno1: 6.71 euro
Biochimica	X	X	X	X	X	X	X	X	Mese 1, 3 e 9 = 6,65 x 3 = 19,95 euro + 1.7 x 4 = 6.8 euro
Emocromo con formula	X	X	X	X	X	X	X	X	Mese 1, 3 e 9 = 3,98 x 3 = 11,94 euro
Esame urine	X	X			X		X	X	Routine
ECG	X								Routine
Eventi avversi	X	X	X	X	X	X	X	X	0
Consegna farmaco		X	X	X	X	X	X	X	0

*Confermare alla visita basale; Biochimica: transaminasi, bilirubina frazionata, creatininemia

NOTA: gli esami di routine sono quelli già in atto per il follow-up dei pazienti con epatite cronica da HBV, sono eseguiti presso un laboratorio centralizzato e non rappresentano un costo aggiuntivo a carico dell'Ente, essendo effettuati nei tempi previsti dalle linee guida nazionali ed internazionali per i pazienti affetti da epatite cronica da HBV (ogni 6 mesi). Quali esami di screening si terranno in considerazione gli esami già effettuati dal paziente per l'esecuzione della biopsia epatica. Per tutti i rimanenti esami, compresi anche quelli di routine, ma non esenti per il paziente (esenzione codice 016), i costi relativi vengono coperti dai fondi stanziati per la ricerca.

metri di laboratorio come da flow-chart riportata in Tabella 1. Al termine del mese 12 il paziente cessa l'assunzione del preparato o del placebo e viene infine rivisto dopo 6 mesi dalla cessazione della terapia, al mese 18 dall'inizio dello studio. Qualora il paziente non si presenti alla visita prestabilita, viene contattato telefonicamente per fissare un nuovo appuntamento. In caso di impossibilità a stabilire un contatto o di rifiuto del paziente di sottoporsi a ulteriori controlli il soggetto viene considerato perso al-

l'ultima osservazione. In caso di interruzione della terapia, il soggetto resta nello studio e viene invitato egualmente a sottoporsi alle visite ed ai controlli di laboratorio previsti.

Cessazione anticipata dello studio

I pazienti possono ritirarsi dallo studio in qualsiasi momento. Inoltre la partecipazione allo studio viene sospesa nei seguenti casi:

- ▶ aggravamento del quadro clinico con

indicazione all'inizio della terapia anti-virale

- ▶ necessità di effettuare terapia per altra patologia concomitante
- ▶ insorgenza di eventi avversi
- ▶ non aderenza del paziente

Eventi avversi

Non sono riportati in letteratura eventi avversi dovuti all'uso del trattamento in studio. Tuttavia, qualora, nel corso dello studio, dovessero manifestarsi episodi di intolleranza e tossicità, il medico che segue il paziente valuta la possibilità di sospendere la terapia, oltre

che effettuare una terapia degli effetti riscontrati, e compilare la segnalazione nella scheda raccolta dati di quanto occorso.

Raccolta dei dati

Per la raccolta dei dati della ricerca è stata predisposta una scheda cartacea ad hoc (CRF: case report form). Tutti i dati di interesse clinico, inclusi i risultati degli esami di laboratorio, vengono rilevati durante le visite di screening e successive valutazioni, fino al termine del follow-up, utilizzando la scheda informatizzata Health&Notes già in uso da alcuni anni presso l'Ambulatorio Epatiti della Clinica delle Malattie Infettive e Tropicali, predisposto per la normale routine dei protocolli di sorveglianza dei soggetti con epatite virale cronica. Gli eventuali eventi avversi vengono inizialmente segnati dai pazienti su di un diario terapeutico già predisposto per altre sperimentazioni di farmaci anti-virali e a loro consegnato all'inizio dello studio, e quindi riportati sulla cartella clinica informatizzata dal medico che segue la ricerca alla visita successiva. **(Tabella 1)**

Descrizione
della popolazione

Caratteristiche dei pazienti

Vengono reclutati i pazienti con epatite cronica da HBV, di età compresa fra i 18 e i 75 anni d'età, che sono seguiti presso l'Ambulatorio Epatiti della Clinica di Malattie Infettive e Tropicali degli Spedali Civili di Brescia, che soddisfino i criteri di inclusione precedentemente descritti e non rientrino nei criteri di esclusione. Tali pazienti fanno parte di una coorte di circa 600 pazienti con infezione cronica da HBV che sono seguiti da diversi anni presso la suddetta struttura e sono inseriti in un database clinico. Tali pazienti sono sottoposti a un monitoraggio continuo che prevede visite ed esami di laboratorio con periodicità fissa, ed in alcuni casi un trattamento con farmaci anti-virali, in accordo con quanto raccomandato dalle linee guida attuali sul trattamento dei soggetti con infezione da HBV (de Franchis R et al. J Hepatol. 2003;39 Suppl 1:S3-25).

I pazienti che, sulla base delle caratteristiche cliniche rilevate nel database clinico, soddisfano ai criteri di inclusione e di esclusione vengono invitati a presentarsi all'Ambulatorio Epatiti della Clinica di Malattie Infettive e Tropicali degli Spedali Civili di Brescia per una nuova visita di screening e, se risultati candidati

alla ricerca, verranno invitati a prendervi parte. In un arco di tempo di 6 mesi verranno contattati tutti i pazienti ritenuti idonei.

Numero di pazienti arruolati.

È previsto l'arruolamento nello studio 140 pazienti, 70 per ogni braccio della ricerca. La dimensione del campione permette la valutazione adeguata dell'obiettivo primario, che consiste nella negativizzazione dell'HBV DNA sierico. La proporzione di pazienti con clearance dell'HBV DNA attesa è del 30% nel gruppo trattato, sulla base dei trial finora condotti (Liu et al, J Viral Hep 2001; 8:358-366) rispetto ad un valore di clearance spontanea nel periodo di osservazione del 2% nel gruppo di controllo. Ipotizzando una perdita o interruzione della terapia in un massimo di 20 dei 70 soggetti inclusi nel gruppo in trattamento, dei quali solo il 2% avrebbe una clearance spontanea dell'HBV DNA, si avrebbe una proporzione complessiva di eventi osservati nel gruppo di intervento del 20% (15 su 70) con un rischio relativo di circa 10 rispetto al gruppo di controllo. Con una potenza del 90% ed effettuando test statistici a due code con $\alpha = 0.05$, lo



studio consentirà di evidenziare tale differenza tra i due gruppi come statisticamente significativa mediante un test esatto di Fisher.

Criteria di inclusione

- a) Entrambi i sessi ed età ≥ 18 anni e ≤ 75 anni.
- b) Epatite cronica B (CHB) documentata, definita tramite i seguenti criteri:
 - ▶ Anamnesi compatibile per CHB, HBsAg rilevabile nel siero alla visita di screening ed almeno nei 6 mesi precedenti
 - ▶ Anamnesi positiva per infiammazione epatica cronica, documentata da un'anamnesi di precedenti elevazioni della ALT (almeno due valori di ALT elevati in un periodo di 6 mesi o più, riscontrabili su referti disponibili)
 - ▶ Aumento della ALT sierica ($1,3 - 10$ volte il limite superiore della norma (ULN) alla visita di screening, HBV DNA sierico $\geq 4 \log_{10}$ copie/mL, determinato tramite il metodo Versant 3 presso il laboratorio alla visita di Screening)
 - ▶ Infiammazione epatica cronica con assente o lieve fibrosi periportale alla biopsia epatica eseguita nei 36 mesi precedenti lo studio.
- c) Volontà e capacità di aderire al trattamento ed a tutte le procedure previste dallo studio.
- d) Volontà e capacità di esprimere un consenso informato scritto.
- e) Impegno dei pazienti ad evitare il concepimento per tutta la durata dello studio
- f) Assenza di indicazione o intolleranza a tutte le altre terapie anti-HBV (interferoni, adefovir, entecavir, lamivudina)

Criteria generali di valutazione dell'efficacia/tollerabilità

La variabile di efficacia primaria è la determinazione dell'HBV DNA sierico effettuata dal laboratorio centralizzato usando il metodo Versant HBV™ (soglia di determinazione 2000 copie/mL). Questo è lo standard impiegato negli studi clinici nell'epatite cronica da HBV.

Altri markers sierologici dell'HBV (HBsAg/Ab, HBeAg/Ab)

vengono determinati dal laboratorio usando i test immunoenzimatici standard del commercio. I livelli di ALT sono determinati nei campioni di siero prelevati ai vari tempi previsti dal protocollo

Criteria di esclusione

- a) Anamnesi positiva per ipersensibilità al trattamento in studio o a preparati con strutture chimiche simili o ai loro eccipienti
- b) Co-infezione con virus dell'epatite C (HCV), virus dell'epatite D (HDV) o virus dell'immunodeficienza umana (HIV)
- c) Trattamento con una delle seguenti terapie:
 - ▶ Cortisonici, immunodepressori.
- d) Pazienti con:
 - ▶ anamnesi positiva o segni/sintomi di insufficienza epatica, come ascite, sanguinamento di varici esofagee, encefalopatia epatica o peritonite batterica spontanea;
 - ▶ anamnesi positiva negli ultimi 5 anni per neoplasie maligne di qualunque organo o apparato, trattate e non trattate, sia in presenza sia in assenza di recidiva locale o di metastasi, ad eccezione del basalioma cutaneo localizzato;
 - ▶ dati precedenti suggestivi di carcinoma epatocellulare (HCC) devono essere sottoposti ad accertamenti per escludere la malattia prima di poter essere arruolati.
- e) Uno dei seguenti valori di laboratorio allo Screening:
 - ▶ Emoglobina (Hb) < 11 g/dL per i maschi e < 10 g/dL per le femmine
 - ▶ Globuli bianchi (GB) $< 3500/\text{mm}^3$, Conta assoluta dei neutrofilii $< 1500/\text{mm}^3$
 - ▶ Conta delle piastrine $< 75000/\text{mm}^3$, Amilasi sierica o lipasi sierica $\geq 1,5 \times \text{ULN}$
 - ▶ Albumina sierica $< 3,3$ g/dL, Bilirubina totale $\geq 2,0$ mg/dL, ANA $> 1:320$
 - ▶ Tempo di protrombina > 3 secondi nonostante la somministrazione di vitamina K
 - ▶ Creatinina clearance < 50 mL/min calcolata usando la formula di Cockcroft-Gault e prendendo in considerazione il minore tra peso attuale e peso ideale
 - ▶ Alfafetoproteina (AFP) > 50 ng/mL
- f) Gravidanza o allattamento

lo (Tabella). Si ritiene che livelli elevati di ALT riflettano l'attività dell'epatite sottostante (cioè l'infiammazione epatica attiva). Di conseguenza, la normalizzazione della ALT è un obiettivo terapeutico accettato negli studi nell'epatite dato che si ritiene che rifletta sostanzialmente la riduzione dell'attività della malattia epatica.

La tollerabilità viene valutata mediante la registrazione e il monitoraggio di tutti gli eventi avversi e dei parametri di laboratorio comprendenti l'ematologia, l'ematochimica, l'esame delle urine, i segni vitali e l'esame obiettivo.

Metodologia statistica

La variabile principale di efficacia di questo studio è la proporzione di pazienti che ottengono al mese 12 (termine del trattamento) la non rilevabilità dell'HBV DNA alla PCR. Tutte le analisi di efficacia sono condotte sulla popolazione secondo il metodo intention to treat.

La superiorità del trattamento rispetto al placebo viene valutata sottoponendo a test l'ipotesi nulla, H_0 : non esiste differenza tra le proporzioni di pazienti che raggiungono la non rilevabilità dell'HBV DNA al mese 12 confrontando i pazienti trattati con Phyllanthus niruri con quelli trattati con placebo.

La differenza tra le proporzioni di pazienti nei gruppi di trattamento che raggiungono la non rilevabilità dell'HBV DNA al mese 12 (response rate) viene analizzata mediante il test esatto di Fisher. Il rapporto tra le response rates e la differenza nelle response rates vengono stimati insieme ai relativi intervalli di confidenza 95%.

La superiorità della terapia rispetto al placebo verrà dichiarata se l'ipotesi nulla è rifiutata in favore della terapia usando un test a due code a un livello di significatività del 5%.

I dati mancanti al basale verranno sostituiti con le valutazioni allo screening. Il metodo Last Observation Carried Forward (LOCF) viene utilizzato per i dati mancanti alle visite dopo il basale.

Valutazione del rapporto rischio/beneficio

Possibili vantaggi e svantaggi

Un successo terapeutico del trattamento pari a quello ipotizzato sulla base degli studi finora condotti (30% di negativizzazione di HBV DNA sierico), a fronte di una clearance spontanea dell'infezione valutata in non più dell'1% dei casi l'anno, e dell'assenza di trattamenti della medicina scientifica occidentale indicati in questi pazienti, comporta considerevoli vantaggi di carattere sanitario ed economico.

Dal punto di vista sanitario, il beneficio per i soggetti è di arrestare l'evoluzione della malattia e quindi ridurre sostanzialmente il rischio di evoluzione dell'epatite cronica in cirrosi epatica e in epatocarcinoma.

Il vantaggio economico è notevole, tenuto presente il costo sani-

tario di un'epatopatia cronica in fase avanzata che si svilupperà prevedibilmente in un quinto dei pazienti non sottoposti ad alcun trattamento, in termini di ricoveri ospedalieri, esami diagnostici, trattamenti con antivirali di costo elevato come gli interferoni, la lamivudina e l'adefovir. D'altro canto, il costo del preparato erboristico è oggi assai modesto (per esempio il *Phyllanthus niruri* prodotto dalla "Dabur India" e commercializzato in Italia dalla Concessionaria Italia snc, ha un costo di 16,40 euro a confezione da 60 capsule). Si tratta inoltre di un preparato generalmente ben tollerato, per il quale a tutt'oggi non vi sono in letteratura segnalazioni di effetti avversi seri.

Attualmente la preparazione di *Phyllanthus amarus* o *niruri* prodotta dalla "Dabur India" e commercializzata in Italia dalla Concessionaria Italia snc, ha concluso favorevolmente la procedura di notifica nel registro degli integratori alimentari approvati dal Ministero della Salute (<http://www.ministerosalute.it/alimenti/dietetica/dieApprofondimento.jsp?lang=italiano&label=int&id=60>) secondo Decreto Legislativo 21 maggio 2004, n.169, art. 10.

(codice E 06 25494-Y).

Alternative diagnostico-terapeutiche

Poiché i pazienti non sono candidati al trattamento con gli attuali farmaci anti-HBV secondo le attuali raccomandazioni, non vi sono attualmente alternative terapeutiche di provata efficacia. Per questo motivo al braccio di controllo della ricerca viene somministrato un placebo. I pazienti vengono comunque sottoposti a tutti gli accertamenti diagnostici e prognostici attualmente previsti dal protocollo di sorveglianza dei pazienti con infezione da HBV presso la Divisione di Malattie Infettive e Tropicali degli Spedali Civili di Brescia.

Precauzioni a salvaguardia dei pazienti

Tutti i pazienti vengono seguiti durante il periodo di trattamento ed il successivo di follow-up come da protocollo di sorveglianza dei soggetti con epatite cronica da HBV. Essi pertanto sono sottoposti a tutti gli esami virologici e biochimici e alle valutazioni cliniche previste di routine. Ai pazienti che nel corso dello stu-



dio presentino condizioni tali da essere candidati alle attuali terapie farmacologiche previste per il trattamento dell'infezione da HBV (interferoni, lamivudina, adefovir, entecavir) viene proposta l'uscita dallo studio e il trattamento suggerito dalle attuali linee guida nazionali e internazionali. Non sono segnalati effetti avversi per il trattamento con Phyllanthus niruri. Tuttavia, in presenza di condizioni tali da sospettare un'intolleranza al trattamento o una reazione di tipo allergico, considerate anche le condizioni cliniche del soggetto, si vedrà se il soggetto sta assumendo P. niruri o placebo, e quindi si valuterà l'opportunità di sospendere il trattamento in atto.

Consenso informato

Ad ogni soggetto partecipante alla ricerca vengono fornite informazioni complete sullo scopo dello studio, sulle modalità di effettuazione dello stesso, sui vantaggi e possibili rischi derivanti dalla partecipazione alla ricerca e sulla possibilità di interrompere comunque la partecipazione alla ricerca, in qualsiasi momento e senza alcuna conseguenza. A tutti i soggetti viene quindi richiesto di firmare un modulo di consenso informato.

Aspetti Etici

Il protocollo ha ottenuto parere favorevole dal comitato etico (CE) dell'Azienda Spedali Civili di Brescia nella seduta del il protocollo ha ottenuto parere favorevole dal comitato etico (CE) della Azienda Ospedaliera (AO) Spedali Civili di Brescia nella seduta del 5/02/2008. E' stata completata la procedura di attivazione del Codice EudraCT a seguito della registrazione del protocollo del trial presso l'Osservatorio Nazionale sulla sperimentazione Clinica dei Medicinali dell'AIFA.

Lo studio viene condotto secondo i principi espressi nella dichia-

razione di Helsinki.

Tutte le informazioni cliniche relative ai pazienti partecipanti vengono conservate e trattate a fini statistici nel rispetto della normativa vigente che tutela la privacy.

Si garantisce la diffusione e la pubblicazione dei risultati, secondo le disposizioni di cui art. 5, comma 3. lettera c) del DM 12/05/06.

Copertura assicurativa nel caso della presenza di sponsor

Lo studio non è sponsorizzato e pertanto, ai sensi del Decreto 17/12/2004, poiché la sperimentazione non è finalizzata né utilizzata allo sviluppo commerciale di un farmaco o comunque ai fini di lucro, ma che anzi è finalizzata al miglioramento della pratica clinica, la copertura assicurativa prevista è a carico dell'Azienda Ospedaliera Spedali Civili in cui la ricerca viene effettuata, nell'ambito della copertura assicurativa prevista per l'attività clinica generale o di ricerca della struttura

Aspetti finanziari

Riassunto delle spese previste e risorse disponibili.

Le spese aggiuntive della ricerca sono quelle che riguardano l'effettuazione di alcuni esami di laboratorio non previsti nell'attuale routine dei pazienti, che comportano un costo complessivo di 133.54 euro a paziente, per un totale quindi di 18695.60 euro sui 140 pazienti reclutati. Inoltre è previsto il costo di un medico che segua i pazienti presso l'Ambulatorio Epatiti della Divisione della Clinica delle Malattie Infettive e Tropicali 1-2 volte la settimana (costo previsto 4500 euro)

e il costo di un medico che svolga le funzioni di Contract Research Organization del progetto, quale monitor esterno per raccolta dati su CRF, predisposizione e compilazione/aggiornamento database (costo previsto 2500 euro). In totale quindi le spese previste ammontano a 18695.60 + 4500 + 2500 = 25695.60 euro. Le confezioni dell'integratore alimentare e del placebo sono state fornite gratuitamente dal-



l'Azienda Dabur India.

La ricerca viene svolta grazie alla collaborazione del personale dell'Ambulatorio Epatiti della Clinica di Malattie Infettive e Tropicali degli Spedali Civili di Brescia e quelli della Sezione di Igiene, Epidemiologia e Sanità Pubblica dell'Università di Brescia - Servizio di Epidemiologia dell'ASL

di Brescia. A tal fine vengono messe a disposizione le strutture di Ambulatori e Servizi e il materiale necessario per la conduzione della ricerca.

La Regione Lombardia ha deliberato di stanziare 22.700 euro per il progetto.

I rimanenti 2995.60 euro saranno pagati dalla Sezione di Igiene, Epidemiologia e Sanità Pubblica dell'Università di Brescia - Servizio di Epidemiologia dell'ASL di Brescia utilizzando fondi per attività di ricerca nell'ambito dell'epidemiologia e prevenzione delle malattie di fegato nell'ambito del Fondo di Ricerca Locale

(ex 40%) del Ministero dell'Università e della Ricerca (MIUR). Non sono previste sponsorizzazioni per questa ricerca.

Conflitto di interessi

Il principale sperimentatore, il co-sperimentatore, il sub-investigatore e tutti gli altri sperimentatori dichiarano di non avere alcun conflitto di interesse nella ricerca. Lo studio non è sponsorizzato e ha finalità eminentemente scientifiche.

La ditta "Dabur India" non ha alcun ruolo nella conduzione della ricerca.

La proprietà dei dati è degli spe-

rimentatori che renderanno noti i risultati della ricerca mediante comunicazione a convegni scientifici e pubblicazioni possibilmente su riviste scientifiche a diffusione internazionale.

Prof. Francesco Donato

Responsabile della Sezione di Igiene, Epidemiologia e Sanità Pubblica Università di Brescia



References

- Blumberg BS.** Hepatitis B virus: search for plant-derived antiviral. In: Tomlinson TR, Akerele D, eds. Medical plants - Their role in health and biodiversity. Philadelphia, University of Pennsylvania Press, 1998.
- Chan HL, Sung JJ, Fong WF, Chim AM, Yung PP, Hui AY, Fung KP, Leung PC.** Double-blinded placebo-controlled study of Phyllanthus urinaris for the treatment of chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003 Aug 1;18(3):339-45.
- Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, Decarli A, Trevisi P, Ribero ML, Martelli C, Porru S, Nardi G.** Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol.* 2002 Feb 15;155(4):323-31.
- European Association For The Study Of The Liver.** *EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B.* *J Hepatol.* 2009 Feb;50(2):227-42.
- Lam WY, Leung KT, Law PT, Lee SM, Chan HL, Fung KP, Ooi VE, Waye MM.** Antiviral effect of Phyllanthus nanus ethanolic extract against hepatitis B virus (HBV) by expression microarray analysis. *J Cell Biochem.* 2006 Mar 1;97(4):795-812.
- Lee CD, Ott M, Thyagarajan SP, Shafritz DA, Burk RD, Gupta S.** Phyllanthus amarus down-regulates hepatitis B virus mRNA transcription and replication. *Eur J Clin Invest.* 1996 Dec;26(12):1069-76.
- Liu J, Lin H, McIntosh H.** Genus Phyllanthus for chronic hepatitis B virus infection: a systematic review. *J Viral Hepat.* 2001 Sep;8(5):358-66. (a).
- Liu JP, McIntosh H, Lin H.** Chinese medicinal herbs for chronic hepatitis B. *Cochrane Database Syst Rev.* 2001;(1):CD001940. Review. (b).
- Lok AS, McMahon BJ;** Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. *Chronic hepatitis B. Hepatology.* 2001 Dec;34(6):1225-41.
- Martin KW, Ernst E.** Antiviral agents from plants and herbs: a systematic review. *Antivir Ther.* 2003 Apr;8(2):77-90.
- Ott M, Thyagarajan SP, Gupta S.** Phyllanthus amarus suppresses hepatitis B virus by interrupting interactions between HBV enhancer I and cellular transcription factors. *Eur J Clin Invest.* 1997 Nov;27(11):908-15.
- Stickel F, Schuppan D.** *Herbal medicine in the treatment of liver disease.* *Dig Liver Dis.* 2007 Feb 27; [Epub ahead of print].
- Stroffolini T.** The changing pattern of hepatitis B virus infection over the past three decades in Italy. *Dig Liver Dis.* 2005 Aug;37(8):622-7.
- Venkateswaran PS, Millman I, Blumberg BS.** Effects of an extract from Phyllanthus niruri on hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses: in vitro and in vivo studies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Jan;84(1):274-8.
- Xin-Hua W, Chang-Qing L, Xing-Bo G, Lin-Chun F.** A comparative study of Phyllanthus amarus compound and interferon in the treatment of chronic viral hepatitis B. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2001 Mar;32(1):140-2.