

# Účinky liečby policosanolom na citlivosť lipoproteínu s nízkou hustotou (LDL) izolovaného od zdravých dobrovoľníkov na oxidačnú modifikáciu *in vitro*

## Cieľ

Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať účinok policosanolu na citlivosť LDL-C na peroxidáciu lipidov *in vitro* u zdravých dobrovoľníkov.

## Metódy

Účinok policosanolu (5 a 10 mg deň<sup>-1</sup>) na oxidáciu LDL-C sa skúmal v dvojito zaslepenej, randomizovanej, placebom kontrolovanej štúdii vykonanej na 69 subjektoch. Vzorky LDL-C izolované na začiatku a po 8 týždňoch boli podrobené *in vitro* testom oxidácie LDL-C. Testovali sme citlivosť LDL-C na peroxidáciu lipidov v bezbunkovom systéme pridaním iónov medi, ako aj vo fyziologickejšom systéme, oxidácii sprostredkovanej makrofágmi.

## Výsledky

Na začiatku boli všetky skupiny dobre zhodné, pokiaľ ide o všetky premenné. Po 8 týždňoch terapie policosanol podávaný v dávkach 5 a 10 mg významne a v závislosti od dávky zvýšil fázu oneskorenia generovania konjugovaného diénu (priemer ± sd) z 83,79 ± 29,16 min na 94,90 ± 25,50 min (5 mg deň<sup>-1</sup>) a z 82,74 ± 17,16 min na 129,89 ± 35,71 min (10 mg deň<sup>-1</sup>), zatiaľ čo v skupine s placebom sa oxidácia LDL-C významne nezmenila. Polikosanol (10 mg deň<sup>-1</sup>), ale nie placebo, významne znížil rýchlosť tvorby konjugovaného diénu. Porovnanie s placebom po terapii tiež ukázalo významné rozdiely. Oxidácia sprostredkovaná makrofágmi bola tiež inhibovaná policosanolom, ako je zrejme z merania látok reaktívnych s kyselinou tiobarbiturovou (TBARS). Polikosanol (10 mg deň<sup>-1</sup>) významne znížil tvorbu malondialdehydu (MDA) z 8,50 ± 0,91 na 5,76 ± 1,01 nmol mg<sup>-1</sup> proteínu. Porovnanie s placebom po 5 a 10 mg deň<sup>-1</sup> ukázalo významné rozdiely. Polikosanol významne znížil celkový cholesterol o 10,5 % (5 mg deň<sup>-1</sup>) a 12,4 % (10 mg deň<sup>-1</sup>) a LDL-C o 16,7 % a 20,2 %. Tiež policosanol (10 mg deň<sup>-1</sup>) zvýšil HDL-C o 15,2 %. Päť subjektov odstúpilo zo štúdie, žiadny z nich kvôli nepriaznivým skúsenostiam. Nezistili sa žiadne klinické alebo krvné biochemické poruchy súvisiace s liekom.

## Záver

Táto štúdia preukázala, že policosanol podávaný v rámci svojej terapeutickej dávky na zníženie cholesterolu (5 a 10 mg deň<sup>-1</sup>) znížil náchylnosť LDL-C na peroxidáciu lipidov *in vitro*.

## Úvod

Vzťah medzi koronárnou chorobou srdca (ICHS) a zvýšenými koncentráciami celkového cholesterolu v sére, najmä cholesterolu lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL-C) bol opakovane preukázaný a priaznivý účinok medikamentózneho terapie na zníženie cholesterolu u hypercholesterolemických pacientov boli tiež presvedčivo dokázané. Niekoľko dôkazov naznačuje, že oxidačná modifikácia LDL-C môže poskytnúť dôležité spojenie medzi plazmatickým LDL-C a rozvojom aterosklerózy. Oxidácia LDL-C je proces peroxidácie

lipidov, pri ktorom sa nenasýtené mastné kyseliny (PUFAS) obsiahnuté v LDL-C transformujú na lipidové hydroperoxydy a potom na niektoré nenasýtené aldehydy. O týchto produktoch vytvorených v časticiach LDL-C sa predpokladá, že sa kovalentne viažu na aminokyselinový bočný reťazec apo B a modifikujú jeho kladne nabité aminokyselinové zvyšky. Tým sa znižuje afinita apo B k receptoru LDL-C a zvyšuje sa jeho afinita k vychytávaciemu receptoru. Oxidovaný LDL-C je vychytávaný makrofágmi, čo vedie k tvorbe penových buniek naplnených lipidmi, čo je charakteristickým znakom skoršej aterosklerotickej lézie. Ďalšie vlastnosti modifikovaného LDL-C (oLDL-C) môžu zvýšiť jeho aterogenitu. Modifikovaný LDL-C môže tiež podporovať aterosklerózu svojimi chemotaktickými vlastnosťami na monocyty, svojou cytotoxicitou voči endotelovým bunkám arteriálnej steny a inhibíciou vazodilatácie sprostredkovanej oxidom dusnatým. Množstvo aterogénnych vlastností oLDL-C teda robí z prevencie jeho tvorby atraktívnu stratégiu prevencie koronárnej choroby srdca u ľudí.

Policosanol je zmes vyšších primárnych alifatických alkoholov purifikovaných z vosku cukrovej trstiny s účinkami na zníženie cholesterolu, preukázaná na zvieracích modeloch, zdravých dobrovoľníkov a pacientov s hypercholesterolémiou II. typu. Predklinické štúdie preukázali, že policosanol podávaný perorálne počas 4 týždňov normocholesterolemickým potkanom čiastočne zabránil *in vitro* a *in vivo* mikrozomálnej peroxidácii lipidov a inhiboval peroxidáciu lipidov lipoproteínových frakcií obsahujúcich LDL-C + VLDL-C. Policosanol významne predĺžil fázu oneskorenia oxidácie, znížil fázu propagácie a znížil maximálne množstvo generovania diénu. Policosanol tiež významne znížil tvorbu malondialdehydu (MDA) vo frakciách LDL-C + VLDL-C a zoslabil zníženie reaktivity lyzínových aminoskupín lipoproteínu po oxidácii medi, čo by mohlo súvisieť s ochranou proteínovej časti lipoproteínov .

Predkladaná štúdia bola zameraná na skúmanie účinku policosanolu podávaného v rámci jeho obvyklého dávkového rozsahu ako liečiva znižujúceho cholesterol na náchylnosť LDL-C na peroxidáciu lipidov *in vitro* u zdravých dobrovoľníkov.

## Metódy

Do štúdie bolo celkovo zaradených 69 normocholesterolémií (hladiny cholesterolu v sére  $< 5,2 \text{ mmol l}^{-1}$  a triglyceridov  $< 2,2 \text{ mmol l}^{-1}$ ) u oboch pohlaví vo veku 20–60 rokov. Jedinci, ktorí boli súčasnými fajčiarimi, zneužívajúcimi alkohol, s akoukoľvek chronickou patológiou, ako aj s akútnymi ochoreniami v čase náboru, boli zo štúdie vylúčení. Okrem toho boli vylúčené aj subjekty s dokumentovanou konzumáciou antioxidantných doplnkov alebo vitamínov počas posledných 3 mesiacov pred štúdiou a tehotné ženy. Počas štúdie nebola povolená konzumácia akéhokoľvek lieku alebo doplnku s uznaným antioxidantným účinkom.

## Štúdia

Táto štúdia bola vykonaná v súlade s Helsinskou deklaráciou a bola schválená etickou komisiou Národného centra pre vedecký výskum. Subjekty boli zaradené po udelení písomného informovaného súhlasu. V tomto čase sa zaznamenali všeobecné údaje a vykonalo sa klinické vyšetrenie. Jedinci, ktorí splnili vstupné kritériá do štúdie, boli náhodne pridelení za dvojito zaslepených podmienok tak, aby dostávali buď placebo ( $n = 23$ ), policosanol 5 mg ( $n = 24$ ) alebo policosanol 10 mg ( $n = 22$ ). Dobrovoľníci boli poučení, aby užívali tablety raz denne s večerným jedlom počas 8 týždňov. Peroxidácia lipidov, krvné testy, klinické

vyšetrenie a žiadosť o nežiaduce účinky sa vykonali na začiatku liečby a opakovali sa po 8 týždňoch liečby.

Vzorky krvi sa odoberali po 12 hodinách nalačno cez noc, aby sa stanovil lipidový profil, ukazovatele bezpečnosti biochemickej biochémie krvi a aby sa testovala peroxidácia lipidov. Celkový cholesterol v sére, triglyceridy a chemické parametre krvi (glukóza, AST, ALAT) boli testované enzymatickými metódami s použitím reagenčných súprav od Boehringer Mannheim (Mannheim, Nemecko). Hladiny cholesterolu lipoproteínu s vysokou hustotou (HDL-C) boli stanovené ako obsah cholesterolu v supernatante získanom po precipitácii  $\beta$ -lipoproteínu. LDL-C sa vypočítal pomocou Friedewaldovho vzorca. Laboratórne analýzy sa uskutočnili v autoanalyzátore Hitachi v Medical Surgical Research Center. Počas celej štúdie sa vykonávala systematická kontrola kvality.

## **Techniky na hodnotenie oxidácie LDL-C**

### ***Izolácia LDL-C***

Po celonočnom hladovaní sa vzorky žilovej krvi odobrali do plastových skúmaviek obsahujúcich príslušný objem vodného roztoku 10 % EDTA, aby sa získala konečná koncentrácia v krvi 0,1 % EDTA (w/v). Plazma bola oddelená ihneď po odbere centrifugáciou, doplnená sacharózou (konečná koncentrácia 6  $\text{g l}^{-1}$ ), aby sa zabránilo agregácii LDL-C a skladovaná pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vzorky sa skladovali až 3 týždne. Zmrazená EDTA plazma sa rýchlo rozmrazila a použila sa na prípravu LDL-C ultracentrifugáciou s gradientom hustoty (22 hodín pri 285 000 g (max) v rotore Beckman SW40 v ultracentrifúge Beckman L7), podľa Terpsta *a kol.* bez predbežného farbenia amidočernou. Izolovaný LDL-C bol dialyzovaný proti 200-násobnému objemu fosfátom pufrovaného fyziologického roztoku (PBS, 0,01 M fosfátu, 0,15 NaCl, pH 7,4) pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  v tme počas 24 hodín. Počas tejto doby sa pufor dvakrát vymenil a pred použitím sa prepláchol dusíkom.

Koncentrácia LDL-C bola odhadnutá stanovením koncentrácie proteínu modifikáciou Lowryho postupu.

### ***Kinetika oxidácie LDL-C indukovanej $\text{Cu}^{2+}$***

Po dialýze cez noc sa LDL-C (50  $\mu\text{g}$  proteínu  $\text{ml}^{-1}$ ) oxidoval v prítomnosti  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (konečná koncentrácia). Kinetika oxidácie LDL-C bola sledovaná nepretržitým monitorovaním zmeny absorbancie pri 234 nm v spektrofotometri Ultrospec plus (LKB) vybavenom šesťpolohovým automatickým meničom vzoriek riadeným termostatom ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Údaje odvodené z kriviek konjugovaného diénu boli vyjadrené ako krivky časového priebehu. Časový profil absorpcie vykazoval tri odlišné fázy; (1) lag fáza, počas ktorej sa absorpcia nezvyšuje alebo sa zvyšuje len mierne, (2) propagačná fáza, počas ktorej absorbanca rýchlo narastá na maximálnu hodnotu a (3) fáza rozkladu, v ktorej po dosiahnutí maximálnej hodnoty konjugovaných diénov pomaly klesá rozkladom za vzniku aldehydov. Z tejto kinetiky bola nakreslená dotyčnica k strmému segmentu krivky fázy šírenia a extrapolovaná na horizontálnu os (čas). Interval medzi pridaním iónov  $\text{Cu}^{2+}$  a priesečníkom na tejto osi je definovaný ako čas oneskorenia a je vyjadrený v minútach. Rýchlosť šírenia sa vypočítala zo sklonu dotyčnice krivky počas fázy šírenia. Použitím molárneho koeficientu extinkcie pre konjugované diény  $29\,500\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  je rýchlosť tvorby konjugovaných diénov vyjadrená v  $\text{nmol diénov vytvorených min}^{-1}\text{ mg}^{-1}$  LDL-C proteínu. Každý prípravok LDL-C bol oxidovaný trojmo. Reprodukovateľnosť lag fázy bola kontrolovaná počas 3

týždňov. LDL-C sa izoloval zo zásobnej plazmy po rôznych časoch skladovania a uskutočnili sa opakované merania času oneskorenia. Variáčny koeficient v rámci testu pre jeden roztok LDL-C bol 2,48 % a variabilita medzi testami získaná v štyroch rôznych dňoch poskytla koeficient variácie 3,88 %. Pred začatím pokusu bola stabilita rôznych vzoriek plazmy uložených v našich experimentálnych podmienkach overená pomocou LDL-C izolovaného od piatich darcov. Variabilita meraní lag fázy do 3 týždňov skladovania bola v rozmedzí 3,0–5,8 % (priemer 4,4 %).

### ***Bunkami sprostredkovaná oxidácia LDL-C***

Po dialýze sa vzorky LDL-C bez EDTA okamžite podrobili bunkami sprostredkovanej oxidácii rezidentnými makrofágmi čerstvo izolovanými zo samcov BalC myší podľa de Whalley *et al.* Makrofágy sa izolovali peritoneálnou lavážou myší (20–30 g) s použitím ľadovo studeného Dulbeccovho fyziologického roztoku pufrovaného fosfátom bez  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ . Bunky sa naniesli na 12-jamkové klastrové doštičky v množstve  $1 \times 10^6$  buniek/jamku a inkubovali sa pri  $37^\circ\text{C}$  v  $\text{CO}_2$ . Kultivačné médium pozostávalo z 9 objemov Dulbeccovho modifikovaného Eaglovho média (DMEM) a 1 objemu fetálneho telacieho séra obsahovalo  $50 \text{ ug gentamicínu ml}^{-1}$ . Po 2 hodinách sa makrofágy niekoľkokrát premyli DMEM a ihneď sa použili na experimenty. Vzorky LDL-C ( $100 \text{ ug ml}^{-1}$ ) sa inkubovali až 20 hodín s makrofágmi (makrofágmi modifikované) alebo bezbunkovými jamkami (kontroly). Kultivačné médium ( $0,5 \text{ ml jamka}^{-1}$ ) pozostávalo z Hamovho média F-10 obsahujúceho gentamicín ( $50 \text{ ug ml}^{-1}$ ). Po inkubácii sa pridali EDTA a butylovaný hydroxytoluén (konečná koncentrácia  $20 \text{ } \mu\text{M}$  a  $2 \text{ } \mu\text{M}$ , v danom poradí), aby sa zabránilo ďalšej oxidácii a médium sa odstránilo a odstredilo ( $250 \text{ g počas } 10 \text{ minút pri } 4^\circ\text{C}$ ), aby sa odstránili všetky uvoľnené látky. bunky. LDL-C v médiu sa testoval na látky reaktívne s kyselinou tiobarbiturovou (TBARS), ako už bolo opísané. Ako referenčný štandard sa použil čerstvo zriedený malondialdehyd bis(dimetylacetal). TBARS boli vyjadrené ako ekvivalentný obsah MDA (nanomóly MDA na miligram proteínu). Každý prípravok LDL-C bol oxidovaný trojmo.

### **Štatistická analýza**

Výsledky sú vyjadrené ako priemer  $\pm$  sd. Porovnanie v rámci skupín sa uskutočňovali Wilcoxonovým poradovým testom pre párové vzorky a Mann Whitney *U*-test sa použil na porovnanie medzi skupinami. Dvojstranná hodnota pravdepodobnosti  $< 0,05$  sa považovala za štatisticky významnú. Bonferroniho úprava bola aplikovaná na viacnásobné porovnanie v jedinom teste. Na úpravu pre viacnásobné testovanie bola ako hladina významnosti zvolená  $\alpha < 0,016$  ( $0,05 \div 3$ ). Štatistické analýzy sa uskutočňovali pomocou balíka štatistických programov CSS (Star Soft, Tulsa, Oklahoma).

**Tabuľka 1** Ukazuje hlavné základné charakteristiky skúmaných subjektov. Všetky skupiny boli na začiatku dobre zhodné. Zo 69 subjektov randomizovaných na dvojito zaslepenú liečbu 64 dokončilo štúdiu.

Baseline characteristics of study subjects (mean  $\pm$  s.d.).

|   | Policosanol     |                 |                 |                 | Total n = 69    |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|   | Placebo n = 23  | (5 mg) n = 24   | (10 mg) n = 22  |                 |                 |
| Age (years)                               | 40 $\pm$ 10     | 38 $\pm$ 10     | 40 $\pm$ 11     | NS              | 39 $\pm$ 10     |
| Body weight (kg)                          | 64.2 $\pm$ 10.4 | 65.4 $\pm$ 11.5 | 67.9 $\pm$ 17.2 | NS              | 65.8 $\pm$ 13.2 |
| Sex (M/F)                                 | 9/14            | 11/13           | 8/14            | NS <sup>a</sup> | 28/14           |
| Total cholesterol (mmol l <sup>-1</sup> ) | 4.40 $\pm$ 0.66 | 4.60 $\pm$ 0.72 | 4.64 $\pm$ 0.55 | NS              |                 |
| LDL-C                                     | 2.99 $\pm$ 0.63 | 3.19 $\pm$ 0.67 | 2.65 $\pm$ 0.66 | NS              |                 |
| Triglycerides                             | 1.21 $\pm$ 0.42 | 1.14 $\pm$ 0.49 | 1.06 $\pm$ 0.45 | NS              |                 |
| HDL-C                                     | 0.96 $\pm$ 0.25 | 0.98 $\pm$ 0.22 | 0.96 $\pm$ 0.22 | NS              |                 |

(n) number of subjects; NS No significant difference from placebo (Mann Whitney U-test).

<sup>a</sup>NS Not significant compared with placebo (Fisher's Exact Test).

**Tabuľka 2** sumarizuje účinky liečby na lipidový profil. Pri randomizácii bol lipidový profil podobný vo všetkých skupinách. Polikosanol (5 a 10 mg deň<sup>-1</sup>) významne znížil oproti východiskovej hodnote celkový cholesterol ( $P < 0,0001$ ) (10,5 % a 12,4 %) a LDL-C ( $P < 0,0001$ ) (16,7 % a 20, %). Polikosanol (5 a 10 mg deň<sup>-1</sup>) zvýšil HDL-C o 9,0 % a 15,2 %, v uvedenom poradí. Tieto zmeny boli štatisticky významné ( $P < 0,01$  pre 5 mg deň<sup>-1</sup> a  $P < 0,001$  pre 10 mg deň<sup>-1</sup>). Tiež policosanol (10 mg deň<sup>-1</sup>) znížil triglyceridy o 9,4 % ( $P < 0,01$ ). Okrem toho sa po 8 týždňoch liečby plazmatické hladiny LDL-C medzi skupinou s placebom a policosanolom (5 a 10 mg deň<sup>-1</sup>) znížili ( $P = 0,020$  a  $P = 0,019$ , v uvedenom poradí). Po 8 týždňoch liečby policosanolom (10 mg deň<sup>-1</sup>) HDL-C sa zvýšil ( $P = 0,03$ ). Konečné hladiny triglyceridov sa znížili po policosanole 5 mg deň<sup>-1</sup> ( $P = 0,04$ ) a 10 mg deň<sup>-1</sup> ( $P = 0,011$ ). Bonferroniho úprava ovplyvnila význam. konečných plazmatických koncentrácií LDL-C medzi policosanolom (5 a 10 mg deň<sup>-1</sup>) a placebom a konečnými plazmatickými koncentraciami HDL-C medzi policosanolom (10 mg deň<sup>-1</sup>) a placebom sa významne nelíšili pri použití Bonferroniho korekcie ( $P < 0,016$ ). Podobne koncentrácie triglyceridov po 8 týždňoch medzi skupinami s policosanolom (5 mg deň<sup>-1</sup>) a placebom sa významne nelíšili. Navyše, porovnania percentuálnych zmien medzi skupinami s policosanolom (5 a 10 mg deň<sup>-1</sup>) a placebom celkového cholesterolu a LDL-C po 8 týždňoch boli vysoko významné ( $P < 0,0001$ ). Pre hladiny HDL-C sa percentuálne zmeny zvýšili po policosanole 5 mg deň<sup>-1</sup> ( $P = 0,02$ ) a 10 mg deň<sup>-1</sup> ( $P = 0,0078$ ). Boli pozorované percentuálne zmeny v triglyceridoch bonderlínovej významnosti ( $P = 0,05$ ). Významnosť ovplyvnila aj Bonferroniho korekcia ( $P < 0,016$ ), pretože percentuálne zmeny HDL-C po policosanole (5 mg deň<sup>-1</sup>) sa významne nelíšili v porovnaní so skupinou s placebom.

|                      |             |                              |                       |
|----------------------|-------------|------------------------------|-----------------------|
| Policosanol-10       | 4.64 ± 0.58 | 4.06 ± 0.64 <sup>****+</sup> | -12.4 <sup>++++</sup> |
| <i>LDL-C</i>         |             |                              |                       |
| Placebo              | 2.99 ± 0.63 | 3.12 ± 0.51                  | + 7.3                 |
| Policosanol-5        | 3.19 ± 0.67 | 2.65 ± 0.66 <sup>****+</sup> | -16.7 <sup>++++</sup> |
| Policosanol-10       | 3.28 ± 0.63 | 2.64 ± 0.67 <sup>****+</sup> | -20.2 <sup>++++</sup> |
| <i>HDL-C</i>         |             |                              |                       |
| Placebo              | 0.96 ± 0.25 | 0.94 ± 0.21                  | -1.8                  |
| Policosanol-5        | 0.98 ± 0.22 | 1.07 ± 0.28 <sup>**+</sup>   | + 9.0 <sup>±</sup>    |
| Policosanol-10       | 0.96 ± 0.22 | 1.08 ± 0.21 <sup>***+</sup>  | + 15.2 <sup>±+</sup>  |
| <i>Triglycerides</i> |             |                              |                       |
| Placebo              | 1.21 ± 0.42 | 1.37 ± 0.66                  | + 17.6                |
| Policosanol-5        | 1.14 ± 0.49 | 1.03 ± 0.49 <sup>±</sup>     | -9.7 <sup>b</sup>     |
| Policosanol-10       | 1.06 ± 0.45 | 0.90 ± 0.39 <sup>**+a</sup>  | -9.4 <sup>b</sup>     |

% percent changes (-) decrease; (+) increase.

<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$

<sup>\*\*\*\*</sup> $P < 0.0001$ . Comparison with baseline (Wilcoxon Test for paired samples).

<sup>b</sup> $P = 0.05$

<sup>+</sup> $P < 0.05$

<sup>++</sup> $P < 0.01$

<sup>+++</sup> $P < 0.0001$ . Compared with placebo (Mann Whitney *U*-test)

<sup>a</sup>significantly different for the level of significance  $P < 0.016$  (Bonferroni correction).

Účinky policosanolu na parametre peroxidácie lipidov sprostredkovanej med'ou možno pozorovať v **Tabuľka 3**. Na začiatku vykazovali všetky skupiny podobné hodnoty rozsahu oxidácie LDL-C (fáza oneskorenia a rýchlosť šírenia). Polikosanol 5 mg deň<sup>-1</sup> ( $P < 0,01$ ) a 10 mg deň<sup>-1</sup> ( $P < 0,001$ ) významne a v závislosti od dávky zvýšili fázu oneskorenia oproti východiskovej hodnote, zatiaľ čo v skupine s placebom zostala nezmenená. Dĺžka fázy oneskorenia po liečbe 10 mg deň<sup>-1</sup> bola významne dlhšia ako u placebo ( $P < 0,001$ ), zatiaľ čo tie, ktoré sa dosiahli v skupine s 5 mg, nedosiahli štatistickú významnosť v porovnaní s placebom. Okrem toho podávanie policosanolu (5 mg deň<sup>-1</sup>) znížilo ( $P = 0,018$ ) mieru tvorby konjugovaného diénu v porovnaní so skupinou s placebom. Keď sa však použila Bonferroniho úprava, táto hladina významnosti bola ovplyvnená. Tiež policosanol podávaný v dávke 10 mg deň<sup>-1</sup> významne znížil rýchlosť tvorby konjugovaných diénov v porovnaní s východiskovou hodnotou ( $P < 0,001$ ) a placebom ( $P < 0,01$ ).

Changes in kinetics of copper-mediated oxidation.

| Groups  | Baseline      | 8 weeks                |
|---|---------------|------------------------|
| <i>Lag time (min)</i>   |               |                        |
| Placebo   | 88.17 ± 23.38 | 89.22 ± 16.62          |
| Policosanol-5   | 83.79 ± 29.16 | 94.90 ± 25.50 **       |
| Policosanol-10  | 82.74 ± 17.16 | 129.89 ± 35.71 ***+ ++ |
| <i>Propagation rate (nmol diene min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein)</i> |               |                        |
| Placebo   | 11.26 ± 3.57  | 11.13 ± 2.09           |
| Policosanol-5   | 10.23 ± 2.24  | 9.06 ± 1.75 ± NS       |
| Policosanol-10  | 12.53 ± 3.56  | 7.80 ± 2.64 ****+ +    |

\*\* $P < 0.01$

\*\*\* $P < 0.001$ . Comparison with baseline (Wilcoxon Test).

+ $P < 0.05$

+ + $P < 0.01$

+ + + $P < 0.001$ .

Comparison Vs Placebo (Mann Whitney  $U$ -test), NS, no significantly different for the level of significance  $P < 0.016$  (Bonferroni correction).

Polikosanol (5 a 10 mg deň<sup>-1</sup>) tiež v závislosti od dávky znižoval citlivosť LDL-C na oxidáciu sprostredkovanú makrofágmi, ako sa stanovilo stanovením tvorby TBARS **Tabuľka 4**. Priemerná akumulácia TBARS sa teda znížila v skupine liečenej 5 mg deň<sup>-1</sup> a 10 mg deň<sup>-1</sup> oproti východiskovej hodnote ( $P = 0,027$  pre 5 mg deň<sup>-1</sup> a  $P = 0,012$  pre 10 mg deň<sup>-1</sup>). Avšak po 8 týždňoch sa hladiny TBARS v skupine s policosanolom (5 mg deň<sup>-1</sup>) významne neznižili použitím Bonferroniho korekcie ( $P < 0,016$ ). V porovnaní s placebom však došlo k významnému poklesu generácie MDA po liečbe 5 a 10 mg deň<sup>-1</sup> ( $P < 0,01$ ).

Effects of policosanol treatment (5 and 10 mg day<sup>-1</sup>) on the susceptibility of LDL-C to macrophage-mediated lipid peroxidation.

| Group          | TBARS (nmol MDA mg <sup>-1</sup> protein) |                    |
|----------------|---|--------------------|
|                | Baseline                                  | 8 weeks            |
| Placebo        | 8.48 ± 0.78                               | 9.15 ± 0.66        |
| Policosanol-5  | 8.55 ± 0.29                               | 7.49 ± 1.03 *+ +   |
| Policosanol-10 | 8.50 ± 0.91                               | 5.76 ± 1.01 *a + + |

\* $P < 0.05$ . Comparison with baseline (Wilcoxon Test)

<sup>a</sup>significantly different for the level of significance  $P < 0.016$  (Bonferroniadjustment).

+ + $P < 0.01$  Comparison with placebo (Mann Whitney  $U$ -test).

Liečba bola dobre tolerovaná. Nezistili sa žiadne významné rozdiely v telesnej hmotnosti, systolickom a diastolickom krvnom tlaku, hladinách ALAT, AST a glukózy. Súčasné výsledky teda nenaznačujú žiadne poruchy súvisiace s drogami. Päť subjektov odstúpilo zo štúdie, žiadny z nich kvôli nepriaznivým skúsenostiam. Dvaja jedinci prerušili štúdiu, pretože nechceli pokračovať a traja z dôvodu porušenia protokolu. Štyri subjekty hlásili mierne nežiaduce účinky: dvaja hlásili somnolenciu (jeden placebo a jeden policosanol, 5 mg), jeden hlásil asténiu (placebo) a ďalší hlásil bolesť hlavy (policosanol, 5 mg).

## Diskusia

Táto štúdia demonštruje, že policosanol podávaný v dávkach (5 a 10 mg deň<sup>-1</sup>) v rámci jeho konvenčnej dávky ako liečivo znižujúce lipidy znížil náchylnosť LDL-C na peroxidáciu lipidov závislú od kovových iónov a sprostredkovanú makrofágmi. Metódy vybrané na meranie oxidácie LDL-C sa ukázali ako platné, čo dokazuje reprodukovateľnosť kriviek časových priebehov katalyzovaných med'ou a generovanie MDA makrofágmi na začiatku a 8 týždňov v skupine s placebom. Okrem toho východiskové úrovne v čase oneskorenia a rýchlosti šírenia boli podobné ako tie, ktoré boli opísané skôr, čo tiež potvrdzuje metódu použitú v tejto práci na opis oxidácie LDL-C.

V súlade s predchádzajúcimi predklinickými štúdiami policosanol (5 a 10 mg deň<sup>-1</sup>) významne a v závislosti od dávky zvýšil čas oneskorenia a znížil maximálnu rýchlosť propagácie. Potenciálne dôležitý je účinok liečby policosanolom na citlivosť LDL-C na peroxidáciu lipidov sprostredkovanú makrofágmi. Ukázalo sa, že *in vivo* dochádza k oxidačnej modifikácii LDL-C. Bunky arteriálnej steny, vrátane makrofágov, môžu sprostredkovať lipidovú peroxidáciu LDL-C. Zistenie, že policosanol chránil LDL-C pred bunkami sprostredkovanou oxidáciou, teda naznačuje, že policosanol môže chrániť aj LDL-C *in vivo*.

Účinky policosanolu na lipidový profil v tejto štúdii sú očakávané a konzistentné s tými, ktoré boli pozorované v predchádzajúcich výsledkoch u zdravých dobrovoľníkov. Polikosanol v závislosti od dávky a významne znižuje hlavné premenné účinnosti lipidového profilu. Tiež, ako už bolo opísané policosanol bol dobre tolerovaný.

Údaje zo štúdií *in vivo* a *in vitro* naznačujú, že oxidácia LDL-C kriticky prispieva k ateroskleróze človeka. Podávanie antioxidantov môže chrániť LDL-C pred oxidačnou modifikáciou a tým inhibovať rozvoj aterosklerózy. V tejto súvislosti bola preukázaná inhibícia oxidácie LDL-C a regresia aterosklerózy] antioxidačným účinkom probukolu.

Boli hlásené antioxidačné účinky iných liekov na zníženie lipidov. Niektoré štúdie teda ukázali, že simvastatín a fluvastatín znížili náchylnosť LDL-C na oxidáciu *in vitro*. Nedávny výskum navyše opísal, že metabolit gemfibrozilu inhibuje peroxidáciu lipidov LDL-C *in vitro* v bezbunkovom systéme. Avšak perorálne podávanie gemfibrozilu (1200 mg / deň) počas 12 týždňov familiárnym kombinovaným hyperlipidemickým pacientom nedokázalo ochrániť LDL-C pred peroxidáciou lipidov indukovanou iónmi medi *in vitro*.

Preto, keďže policosanol je činidlo znižujúce hladinu cholesterolu, kombinácia tejto vlastnosti s jeho antioxidačným účinkom môže mať klinický význam. Zníženie koncentrácie LDL-C v plazme a náchylnosti LDL-C na oxidáciu môže byť dôležité pri znižovaní aterosklerotického rizika. Mechanizmus, ktorým policosanol bráni náchylnosti LDL-C na peroxidáciu lipidov, presahuje cieľ tejto štúdie. Napriek tomu, ak vezmeme do úvahy štruktúru alifatických alkoholov s vyššou molekulovou hmotnosťou a ich metabolizmus, účinky policosanolu zamerané na zmenu lipidovej štruktúry LDL-C nemožno vylúčiť.,

Napokon, keďže u pacientov s hypercholesterolemiou bola preukázaná zvýšená náchylnosť k oxidácii, ďalšie štúdie sú zamerané na skúmanie účinku perorálneho podávania policosanolu na citlivosť LDL-C izolovaného z hypercholesterolemických pacientov na peroxidáciu lipidov.

Zdroj: Roberto Menéndez , Rosa Más , Ana MA Amor , Rosa MA González , Julio C Fernández , Idania Rodeiro , Mirta Zayas a Sonia Jiménez, **Effects of policosanol treatment on the susceptibility of low density lipoprotein (LDL) isolated from healthy volunteers to oxidative modification in vitro**  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2014982/>