

Nutraceutická tableta obsahujúca berberín oproti ezetimibu na plazmatické lipidy u hypercholesterolemických jedincov a jej aditívny účinok u pacientov s familiárnou hypercholesterolémiou na stabilnú liečbu znižujúcu cholesterol

Abstrakt

Hoci sú statíny (ST) liekmi prvej voľby u hypercholesterolemických pacientov, najmä u pacientov s vysokým kardiovaskulárnym rizikom, niektorí z nich ST netolerujú alebo liečbu týmito liekmi odmietajú. Vzhľadom na to sme hodnotili hypolipidemický účinok nutraceutickej pilulky obsahujúcej berberín (BBR) a ezetimibu ako alternatívnej liečby, v monoterapii alebo v kombinácii, u 228 jedincov s primárnou hypercholesterolémiou (HCH), s anamnézou ST. neznášanlivosť alebo odmietnutie liečby ST. Okrem toho, keďže sa zistilo, že PCSK9 je up-regulovaný ST, čo tlmí ich účinok prostredníctvom degradácie LDL receptorov (LDLR) a BBR potláča expresiu PCSK9 v bunkových štúdiách, doplnili sme stabilnú terapiu znižujúcu lipidy u 30 heterozygotov s familiárnou hypercholesterolémiou s potvrdeným genotypom (HeFH) s BBR pri hľadaní ďalšieho zníženia cholesterolu v plazme. Vzorec lipidov v plazme bol hodnotený na začiatku liečby a počas liečby.

Výsledky

U jedincov s HCH bola nutraceutická tableta účinnejšia ako EZE pri znižovaní LDL cholesterolu (-31,7 % oproti -25,4 %, $P < 0,001$) a bola lepšie tolerovaná. Počas liečby sa hladina LDL-C pod 3,36 mmol/l (≤ 130 mg/dl) pozorovala u 28,9 % jedincov liečených nutraceutickými tabletkami a 11,8 % jedincov liečených EZE ($P < 0,007$). V skupine liečenej EZE subjekty nesúce alelu G g.1679 C > G tichý polymorfizmus génu *NPC1L1* vykazovali vyššiu odpoveď na EZE ako homozygoti pre spoločnú alelu (GG + CG: LDL-C $-29,4 \pm 5,0$ % CC $-23,6 \pm 6,5$ %, $P < 0,001$). Kombinovaná liečba týmito liekmi bola rovnako účinná ako ST v miernych dávkach (LDL cholesterol -37 %, triglyceridy -23 %). U pacientov s HeFH pridanie BBR viedlo k zníženiu LDL cholesterolu nepriamo úmernému k zníženiu indukovanému stabilnou liečbou ($r = -0,617$, $P < 0,0001$), s priemerným ďalším poklesom o 10,5 %.

Záver

Alternatívne liečby testované u našich jedincov s HCH boli pomerne účinné a bezpečné. Zistenia u pacientov s HeFH naznačujú, že BBR môže pôsobiť in vivo pri zvýšení expresie a stability LDLR a/alebo potláčaní expresie PCSK9.

Zvýšená hladina LDL cholesterolu (LDL-C) v plazme je hlavným rizikovým faktorom kardiovaskulárných ochorení (CVD). Inhibítory HMG-CoA reductázy (statíny, ST) sú liekmi prvej voľby na zníženie cholesterolu v plazme, najmä u pacientov s vysokým alebo veľmi vysokým rizikom kardiovaskulárneho ochorenia (CVD), vzhľadom na ich zdokumentovanú a od dávky závislú účinnosť pri znižovaní Morbidita a mortalita KVO v primárnej aj sekundárnej prevencii . Avšak 10-15 % pacientov má za následok intoleranciu akéhokoľvek ST, dokonca aj pri nízkych denných dávkach, pre svalové vedľajšie účinky, od miernej myalgie bez zvýšenia kreatínkinázy (CK) až po závažnejšie svalové symptómy s významným zvýšením CK a 1-3 % vykazujú asymptomatické zvýšenie transamináz (AST, ALT) pri absencii jasnej hepatálnej toxicity. Niektorí ďalší pacienti v primárnej prevencii odmietajú liečbu ST, pretože sa obávajú možných vedľajších účinkov. Alternatívne

hypocholesterolemické liečby, ktoré je potrebné zvážiť vo vyššie uvedených prípadoch, zahŕňajú rastlinné steroly a stanoly, inhibítor absorpcie cholesterolu ezetimib, sekvestranty žľočových kyselín (najmä dobre tolerovaný kolesevelam) a niektoré nutraceutické produkty obsahujúce rôzne kombinácie červenej kvasnicovej ryže, policosanoly, fytoosteroly a berberín.

Keď monoterapia vedie k neuspokojivému hypolipidemickému účinku, možno predpísať kombinovanú liečbu niektorým z týchto produktov.

Cieľom tejto práce bolo: i) zhodnotiť účinok nutraceutického prípravku s obsahom berberínu, policosanolov a červenej kvasnicovej ryže (BBR/P/RR) na zníženie plazmatických lipidov v porovnaní s účinkom indukovaným ezetimibom (EZE) v monoterapii subjekty s primárnou polygénnou hypercholesterolémiou (HCH) netolerujúcou ST alebo odmietajúce liečbu týmito liekmi; ii) otestovať účinok kombinovanej terapie s BBR/P/RR a EZE na koncentrácie lipidov v plazme u podskupiny týchto subjektov s nízkou odpoveďou na monoterapiu a iii) hľadať ďalšie zníženie plazmatického cholesterolu vyvolané suplementáciou BBR /P/RR u malého počtu pacientov s potvrdeným genotypom s heterozygotnou familiárnou hypercholesterolémiou (HeFH), ktorí boli na stabilnej dávke ST alebo ST plus EZE, vzhľadom na účinok Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin typu 9 (PCSK9) na degradáciu lipoproteínového receptora s nízkou hustotou (LDLR), zvýšenie plazmatickej hladiny PCSK9 vyvolané ST a inhibičný účinok BBR na expresiu PCSK9 zistený v kultivovaných bunkách ľudského pôvodu.

Metódy

Porovnanie medzi hypolipidemickým účinkom kombinovanej tabletky s nutraceutikami s obsahom berberínu (BBR/P/RR) a ezetimibu (EZE) v monoterapii

Medzi ambulantnými pacientmi navštevujúcimi našu Lipidovú kliniku sme považovali za vhodných pre túto štúdiu jedincov s primárnou polygénnou HCH, diagnostikovanou na základe osobných a rodinných štúdií, ktorí mali negatívnu anamnézu kardiovaskulárnych ochorení a predtým sa zistilo, že netolerujú ST alebo odmietali liečbu tieto lieky. Kardiovaskulárne hodnotenie sa uskutočnilo u každého subjektu záťažovým testom EKG a ultrazvukovým vyšetrením krčných tepien. Zo štúdie boli vylúčení pacienti so sekundárnymi formami hyperlipidémie, vrátane diabetikov 2. typu, jedinci s monogénnymi formami HCH a pacienti s tichou ischémiou pri záťažovom EKG teste a/alebo aterosklerózou arteriálnej karotídy s viac ako 40 % stenózou alebo morfológiou mäkkých plátov.

Po trojmesačnom prípravnom období s diétou stabilizujúcou plazmatické lipidy (chudobná na nasýtené tuky a cholesterol) bolo 270 subjektov randomizovaných žrebovaním na základe 2:1 buď na liečbu kombinovanou tabletkou nutraceutík (obsahujúcou 500 mg berberínu , policosanol 10 mg a červená kvasnicová ryža 200 mg; BBR/P/RR) alebo ezetimib 10 mg/deň (EZE) počas šiestich mesiacov.

Koncentrácie lipidov v plazme sa hodnotili po diéte (základný stav) a každé dva mesiace počas liečby a na štatistické porovnanie sa brala do úvahy priemerná hodnota troch stanovení každého lipidového parametra. Laboratórna analýza bola vykonaná „dvojito zaslepená“, pretože operátori laboratória nepoznali pridelenú liečbu.

Sedemdesiatšesť subjektov na EZE (31 mužov a 45 žien) dokončilo šesťmesačné obdobie sledovania; osem subjektov bolo vylúčených pre slabú komplianciu a šesť opustilo štúdiu pre gastrointestinálne alebo biochemické vedľajšie účinky (zvýšenie AST/ALT a/alebo CK). Na účely porovnania sa každý zo 76 subjektov na EZE zhodoval z hľadiska pohlavia, veku a základnej hladiny cholesterolu s dvoma subjektmi na liečbe BBR/P/RR (tabuľka 1). V skupine subjektov dostávajúcich nutraceutické pilulky neboli zaznamenané žiadne významné vedľajšie účinky.

Clinical features and baseline plasma lipid concentrations of the two groups of subjects with primary hypercholesterolemia (HCH) treated with BBR/P/RR or EZE for six months

	BBR/P/RR	EZE	P
Males/Females	62/90	31/45	
Age (years)	57.3 ± 12.1	58.3 ± 12.3	NS
BMI (kg/m ²)	23.9 ± 2.9	23.5 ± 2.8	NS
Arterial hypertension	30.2%	31.5%	NS
Carotid atherosclerosis*	26.3, 48.0, 3.9%	31.5, 51.3, 3.9%	NS
TC (mmol/L)	7.63 ± 0.50	7.72 ± 0.49	NS
LDL-C (mmo/L)	5.36 ± 0.48	5.36 ± 0.52	NS
HDL-C (mmo/L)	1.55 ± 0.35	1.57 ± 0.34	NS
non-HDL-C (mmol/L)	6.07 ± 0.54	6.15 ± 0.55	NS
TG (mmol/L) [†]	1.46 (1.22-1.90)	1.67 (1.24-2.12)	NS

*Percent of subjects with increased intima-media thickness, with fibrous-calcific plaques with less than 30% stenosis and with fibrous-calcific plaques with 30-40% stenosis, respectively. [†]Median (interquartile range). NS: not significant.

Percento jedincov so zvýšenou hrúbkou intima-media, s fibróznou-vápenatými plakmi s menej ako 30% stenózou a s fibróznou-kalcifikátovými plakmi s 30-40% stenózou, v uvedenom poradí. Medián (medzikvartilný rozsah) NS – nevýznamné

Kombinovaný účinok BBR/P/RR a EZE na zníženie lipidov

Ako rozšírenie predchádzajúcej štúdie, 26 subjektov (57,7 ± 9,0 rokov, BMI 23,3 ± 3,3 kg/m²), 12 (5 mužov a 7 žien) na BBR/P/RR a 14 (7 mužov a 7 žien) na EZE ako monoterapiu, dostávali kombinovanú liečbu s týmito dvoma produktmi počas ďalšieho trojmesačného obdobia. Títo jedinci boli vybraní z tých, ktorí mali počas monoterapie percentuálny pokles LDL-C pod strednú úroveň (-29 %) distribúcie hodnôt získaných v celej skupine jedincov na monoterapii (č. 152 na BBR/P/RR a č. 76 na EZE) a súhlasili s kombinovanou liečbou. Koncentrácie lipidov v plazme sa stanovovali mesačne a pre každý parameter lipidov sa stredná hodnota troch meraní porovnávala s priemernou hodnotou získanou počas monoterapie.

Hodnotenie vplyvu suplementácie BBR/P/RR na koncentrácie lipidov v plazme u pacientov s heterozygotnou familiárnou hypercholesterolémiou (HeFH) pri liečbe stabilnými dávkami statínmi (ST) alebo statínmi plus ezetimib (ST + EZE)

Tridsať pacientov s HeFH predtým geneticky charakterizovaných v našom laboratóriu (21 mužov a 9 žien, $56,5 \pm 9,2$ rokov, 12 s receptor-defektnými (RD) a 18 s receptor-negatívnymi (RN) mutáciami *LDLR* génu), ktorí boli na liečbe stabilnou dávkou s maximálnou tolerovanou dávkou ST alebo ST plus EZE počas jedného roka alebo dlhšie [pozri Ďalší súbor 1 : Tabuľka S1], dostávali pilulku BBR/P/RR počas troch mesiacov ako doplnkovú liečbu. Koncentrácie lipidov v plazme sa stanovovali mesačne a pre každý parameter lipidov sa stredná hodnota troch meraní porovnávala s priemernou hodnotou získanou počas liečby ST alebo ST plus EZE.

Od každého účastníka sa získal písomný informovaný súhlas a protokol štúdie bol schválený miestnym inštitucionálnym humánnym vyšetrovacím výborom.

Biochemická analýza

Plazmatické koncentrácie celkového cholesterolu (TC) a triglyceridov (TG) sa merali štandardizovanými enzymatickými metódami. Lipoproteínový cholesterol s vysokou hustotou (HDL-C) sa meral v supernatante plazmy po vyzrážaní lipoproteínov obsahujúcich apoB fosfowolfrámom-_{MgCl₂}. Lipoproteínový cholesterol s nízkou hustotou (LDL-C) sa vypočítal podľa Friedewaldovho vzorca. Sérové koncentrácie non-HDL-C sa vypočítali odčítaním koncentrácií HDL-C od koncentrácií TC.

Genotypizácia pre g.1679 C > G polymorfizmus génu NPC1L1

Genómová DNA bola extrahovaná z leukocytov periférnej krvi štandardnou metódou. Skrining tichého polymorfizmu g.1679 C > G (c.816 C > G, L272L) génu *NPC1L1* [GenBank: [NG_013088.1](#)] sa uskutočnil amplifikáciou centrálnej časti exónu 2 s použitím nasledujúcich primérov: 5' -CCA GCT AGG GTC TGG ACA ACT CC -3' (dopredu) a 5'-GGA TGA CAG ATA GCA CCA AGA TGG -3' (dozadu). Pretože prítomnosť alely G eliminuje reštrikčné miesto Taq I (T/CGA), produkt PCR sa inkuboval s 10 U Taq I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) pri 65 °C počas 1 hodiny a štiepenie produkty (387 a 269 bp pre alelu C a 656 bp pre alelu G) sa separovali na 2% agarózovom géli.

Štatistické analýzy

Štatistické analýzy sa uskutočnili s použitím štatistického softvérového balíka PASW 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Údaje sú prezentované ako priemer \pm SD pre kontinuálne premenné, mediány a interkvartilové rozsahy pre triglyceridy, ktoré majú skreslenú

distribúciu. Rozdiely v distribúcii kategorických premenných boli hodnotené pomocou χ^2 pomocou Yatesovej korekcie alebo Fisherových exaktných testov. Hodnoty triglyceridov, ktoré neboli normálne distribuované, boli pred analýzou logaritmicke transformované. Štatistická významnosť rozdielov medzi východiskovými a liečebnými hodnotami lipidov, ako aj medzi monoterapiou (BBR/P/RR alebo EZE) a kombinovanou liečbou (BBR/P/RR plus EZE), bola hodnotená Studentovým t -testom pre párové údaje, alebo Wilcoxonov test. Významnosť rozdielov medzi ošetreniami (BBR/P/RR vs EZE) sa hodnotila porovnaním percentuálnych variácií lipidových parametrov Studentovým t -testom alebo Mann-Whitneyho testom, podľa potreby. U pacientov s HeFH pri liečbe stabilnými dávkami ST alebo ST plus EZE bol účinok dodatočnej terapie s BBR/P/RR hodnotený pomocou ANOVA a pomocou t -testov s Bonferroniho korekciou sa vykonali viacnásobné porovnania medzi párami priemerov. Percentuálne variácie indukované ST alebo ST plus EZE boli porovnané s variáciami indukovanými BBR/P/RR suplementáciou Studentovým t -testom pre párové dáta alebo Wilcoxonovým testom. Korelácia medzi zmenami vyvolanými ST alebo ST plus EZE a zmenami vyvolanými suplementáciou BBR/P/RR bola hodnotená Pearsonovým a Spearmanovým testom.

Výsledky

Porovnanie medzi hypolipidemickým účinkom kombinovanej tabletky s nutraceutikami s obsahom berberínu (BBR/P/RR) a ezetimibu (EZE) v monoterapii

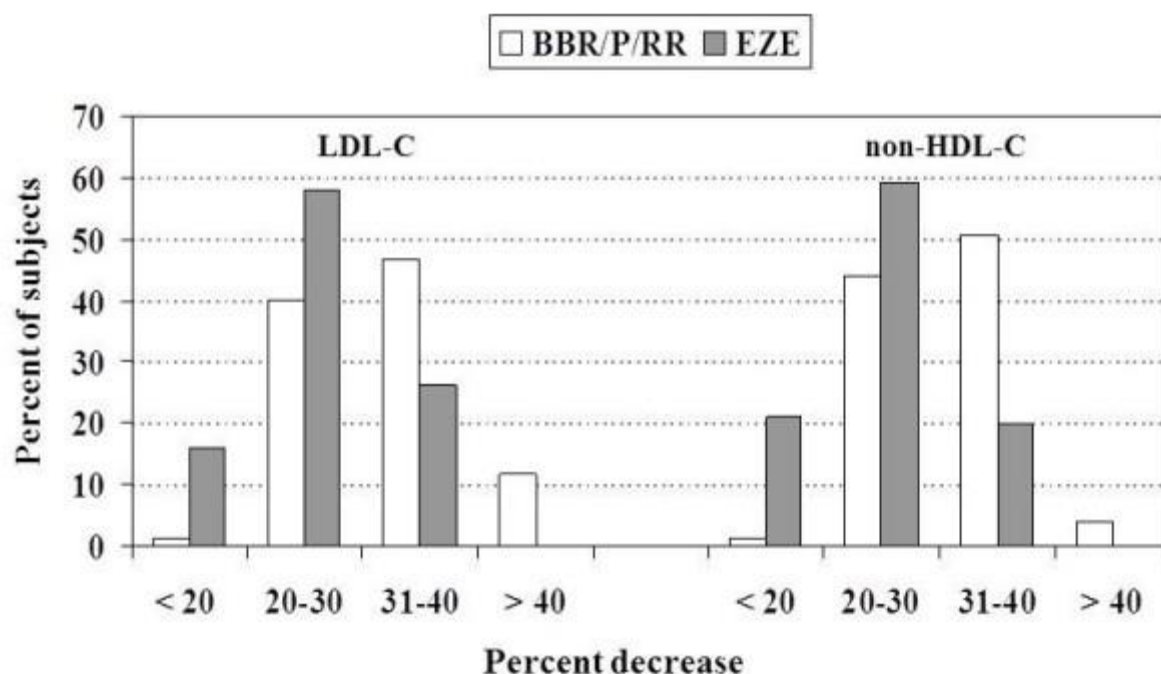
Tabuľka ukazuje účinky na lipidové parametre indukované liečbou BBR/P/RR a EZE v dvoch skupinách subjektov s primárnou HCH. Porovnanie týchto dvoch liečebných postupov z hľadiska percentuálnych variácií lipidov ukázalo, že BBR/P/RR bol účinnejší ako EZE pri znižovaní hladín TC, LDL-C a non-HDL-C a vykazoval tendenciu znižovať TG viac ako EZE. Percento jedincov s viac ako 30 % znížením LDL-C a non-HDL-C bolo vyššie v skupine liečenej BBR/P/RR ako v skupine liečenej EZE ($P < 0,0001$). Žiadny významný účinok na hladinu HDL-C nebol zaznamenaný ani pri jednej liečbe, hoci u pacientov liečených EZE bola pozorovaná tendencia k zvýšeniu. Počas liečby sa hladina LDL-C pod 3,36 mmol/l (≤ 130 mg/dl) pozorovala u 28,9 % jedincov liečených BBR/P/RR a 11,8 % jedincov liečených EZE ($P < 0,007$); hladina non-HDL-C pod 4,14 mmol/l (≤ 160 mg/dl) sa pozorovala u 44,0 % jedincov liečených BBR/P/RR a u 21,0 % jedincov liečených EZE ($P < 0,002$). Vzorka DNA bola dostupná pre 70 zo 76 subjektov liečených EZE. Títo jedinci boli genotypovaní na g.1679 C > G tichý polymorfizmus génu *NPC1L1*, o ktorom sa predtým zistilo, že ovplyvňuje účinok EZE na zníženie cholesterolu. Nosiči alely G (3 GG a 23 CG) skutočne vykazovali vyššiu odpoveď na EZE ako homozygoti pre spoločnú alelu (44 CC) (LDL-C $-29,4 \pm 5,0$ % vs. $-23,6 \pm 6,5$ %, $P < 0,001$).

Comparison between treatments with BBR/P/RR and EZE on plasma lipid concentrations in HCH patients. Six months follow-up

Plasma lipids (mmo/L)	BBR/P/RR			EZE			†p
	Baseline	On treatment	Percent change	Baseline	On treatment	Percent change	
TC	7.63 ± 0.50	5.77 ± 0.49*	-24.2 ± 5.2	7.72 ± 0.49	6.25 ± 0.51*	-19.0 ± 4.6	< 0.001
LDL-C	5.36 ± 0.48	3.66 ± 0.48*	-31.7 ± 7.0	5.36 ± 0.52	4.00 ± 0.52*	-25.4 ± 6.4	< 0.001
HDL-C	1.55 ± 0.35	1.54 ± 0.37	-0.64 ± 7.2	1.57 ± 0.34	1.58 ± 0.35	+1.24 ± 6.9	NS
non-HDL-C	6.07 ± 0.54	4.22 ± 0.53*	-30.3 ± 6.5	6.15 ± 0.55	4.66 ± 0.58*	-24.2 ± 5.9	< 0.001
TG	1.46 (1.22-1.90)	1.12 (0.95-1.41)*	-19.5 ± 16.1	1.67 (1.24-2.12)	1.43 (1.08-1.80)*	-14.9 ± 11.5	NS

Data are means ± SD or medians (interquartile ranges). *P < 0.001 vs baseline values (Student's *t* test for paired data or Wilcoxon test); †P: significance of the differences between percent changes induced by BBR/P/RR and by EZE treatments (Student's *t* test and Mann-Whitney test, respectively). NS: not significant.

Údaje sú priemery ± SD alebo mediány (medzikvartilové rozsahy). P < 0,001 oproti východiskovým hodnotám. (študentov t test pre párové dáta alebo Wilcoxonov test) P: významnosť rozdielov medzi percentuálnymi zmenami vyvolanými liečbou BBR/P/RR a EZE.



Percentuálna distribúcia jedincov liečených BBR/P/RR a EZE podľa percentuálneho zníženia LDL-C a non HDL-C.

Kombinovaný účinok BBR/P/RR a EZE na zníženie lipidov

Tabuľka 3 ukazuje hypolipidemický účinok kombinovanej terapie s BBR/P/RR a EZE u 26 jedincov s nízkou odpoveďou na monoterapiu. V porovnaní s monoterapiou spôsobila kombinovaná liečba ďalší priemerný pokles TC, LDL-C, non-HDL-C a TG o -9,7 %, -13,6 %, -12,5 % (P <0,001) a -4,5 % (P <0,005). Počas kombinovanej liečby 50 % jedincov dosiahlo hladinu LDL-C pod 3,36 mmol/l (≤ 130 mg/dl) a 65,4 % non-HDL-C pod 4,14 mmol/l (≤ 160 mg/dl). Táto kombinácia bola dobre tolerovaná a nevyvolávala vedľajšie účinky.

Comparison between plasma lipid changes induced by monotherapy with BBR/P/RR (n. 14 subjects) or EZE (n. 12 subjects) and combined therapy with BBR/P/RR plus EZE in HCH patients

Lipid parameter	Baseline	Monotherapy	% changes	Combined therapy	% changes	‡P
TC (mmol/L)	7.74 ± 0.40	6.34 ± 0.40*	-18.0 ± 3.5	5.59 ± 0.40†	-27.7 ± 3.8	< 0.001
LDL-C (mmol/L)	5.47 ± 0.51	4.19 ± 0.48*	-23.5 ± 3.5	3.44 ± 0.44†	-37.1 ± 4.5	< 0.001
HDL-C (mmol/L)	1.58 ± 0.40	1.59 ± 0.42	+0.17 ± 8.2	1.60 ± 0.42	+1.10 ± 5.7	NS
non-HDL-C (mmol/L)	6.15 ± 0.59	4.75 ± 0.57*	-22.8 ± 3.8	3.98 ± 0.49†	-35.3 ± 4.2	< 0.001
TG (mmol/L)	1.48 (1.08-1.89)	1.12 (0.95-1.47)*	-18.6 ± 15.5	1.09 (0.94-1.35)†	-23.1 ± 12.9	< 0.005

Values are means ± SD or medians (interquartile ranges). *P <0.001 vs baseline values and †P <0.001 vs monotherapy; ‡P: significance of the differences between percent changes induced by monotherapy and by combined therapy (Student's t test for paired data or Wilcoxon test, respectively). NS: not significant.

Doplnková liečba BBR/P/RR u pacientov s HeFH na stabilnej dávke ST alebo ST + EZE

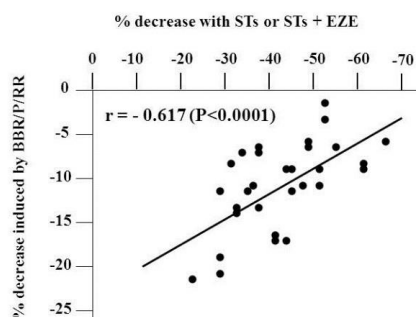
Tabuľka 4 ukazuje koncentrácie lipidov v plazme na začiatku, počas liečby stabilnou dávkou ST alebo ST plus EZE a po suplementácii BBR/P/RR u 30 pacientov s HeFH navštevujúcich našu Lipidovú kliniku. Xantomatóza šliach, ochorenie koronárnych artérií a predchádzajúca koronárna revaskularizácia boli prítomné u 17 %, 33 % a 25 % pacientov s HeFH-RD a u 89 %, 61 % a 33 % pacientov s HeFH-RN.

Plasma lipid changes induced by supplementary treatment with BBR/P/RR in 30 HeFH patients on stable-dose therapy with STs or STs plus EZE

Lipid parameter	Baseline	on STs or STs + EZE	% changes vs baseline	plus BBR/P/RR	% changes after BBR/P/RR addition	P
TC (mmol/L)	9.94 ± 1.49	6.35 ± 0.99 [†]	-35.5 ± 8.5	5.54 ± 0.77 ^{†‡}	-43.7 ± 7.3	< 0.001
LDL-C (mmol/L)	7.91 ± 1.35	4.47 ± 0.94 [†]	-42.6 ± 10.9	3.65 ± 0.71 ^{†§}	-53.2 ± 8.7	< 0.001
HDL-C (mmol/L)	1.29 ± 0.39	1.30 ± 0.35	+2.6 ± 10.3	1.33 ± 0.38	+4.3 ± 11.4	NS
non-HDL-C (mmol/L)	8.65 ± 1.47	5.05 ± 1.06 [†]	-41.2 ± 9.8	4.20 ± 0.84 ^{†‡}	-50.9 ± 8.7	< 0.001
TG (mmol/L)	1.48 (0.98-2.30)	1.27 (0.89-2.03)	-17.7 ± 17.2	1.11 (0.83-1.63) [*]	-23.1 ± 21.2	< 0.03

Values are means ± SD or medians (interquartile ranges). ^{*}P < 0.05 vs baseline, [†]P < 0.02 vs baseline; [‡]P < 0.05 vs STs and STs + EZE, [§]P < 0.02 vs STs and STs + EZE (ANOVA and multiple comparisons among pairs of means by *t*-tests with Bonferroni's correction). [¶]P: significance of the differences between percent changes induced by STs or STs + EZE and those induced by treatment supplementation with BBR/P/RR (Student's *t* test for paired data or Wilcoxon test). NS: not significant.

V priemere BBR/P/RR významne ďalej znížilo hladiny TC, LDL-C, non-HDL-C a TG o 8,1 %, 10,5 %, 9,7 % a 5,4 %. Tieto účinky sa medzi pacientmi s HeFH-RD a HeFH-RN významne nelíšili. Dodatočný percentuálny pokles LDL-C v plazme vyvolaný BBR/P/RR (vypočítaný ako rozdiel medzi percentuálnym poklesom vyvolaným liečbou ST alebo ST + EZE doplnenou o BBR/P/RR mínus pokles vyvolaný ST alebo ST + EZE) vykazovali širokú interindividuálnu variabilitu (od -22,5 % do -2,0 %). Pätnásť pacientov, ktorí vykazovali viac ako 10 % zníženie hladiny LDL-C vzhľadom na percentuálny pokles pozorovaný počas liečby ST alebo ST + EZE, sa považovalo za dobre reagujúcich na liečbu BBR/P/RR, zatiaľ čo dvaja pacienti vykazovali menej ako 5 % pokles, boli považovaní za nereagujúcich. Počas liečby ST alebo ST + EZE sa hodnota LDL-C pod 3,36 mmol/l (≤ 130 mg/dl) a non-HDL-C pod 4,14 mmol/l (≤ 160 mg/dl) dosiahla len v 3. a 6. pacientov; po pridaní BBR/P/RR bolo pacientov, ktorí dosiahli tieto hladiny 11 a 14, v uvedenom poradí. Aby sme definovali, či veľkosť odpovede na BBR/P/RR bola ovplyvnená už existujúcou liečbou ST alebo ST + EZE, vyniesli sme do grafu percentuálnu odpoveď na ST alebo ST + EZE oproti dodatočnému zníženiu LDL-C (uvedené v percentách) vyvolané BBR/P/RR. Pozorovali sme vysoko významnú inverznú koreláciu medzi týmito parametrami s Pearsonovým aj Spearmanovým testom ($r = -0,617$ a $r = -0,611$, v tomto poradí; $P < 0,0001$).



Personova korelácia medzi percentuálnym poklesom LDL-C vyvolaným ST alebo ST/EZE a dodatočnými percentuálnym poklesom v dôsledku suplementácie BBR/P/RR u pacientov s HeFH s potvrdeným genotypom.

Diskusia

Dvadsaťdva percent subjektov vybraných na liečbu BBR/P/RR alebo EZE malo v minulosti neznášanlivosť na akékoľvek ST, dokonca aj pri nízkej dávke, zatiaľ čo ostatní odmietli liečbu ST zo strachu z možných vedľajších účinkov. Keďže v súčasnosti neexistujú žiadne klinické údaje o znížení výskytu KVO pri týchto liečebných postupoch, do tejto štúdie sme zaradili iba subjekty s primárnou HCH a stredným rizikom KVO. Kombinácia BBR/P/RR bola z hľadiska zníženia TC, LDL-C a non-HDL-C účinnejšia ako EZE; ani jedno z liečení významne neovplyvnilo koncentrácie HDL-C, aj keď pri EZE bolo pozorované malé zvýšenie, ale obe znížili hladiny TG v rovnakom rozsahu. Okrem toho sa ukázalo, že tabletky BBR/P/RR bola lepšie tolerovaná ako monoterapia EZE. Predchádzajúce štúdie, kontrolované placebom alebo diétnym režimom, ktoré hodnotili účinky tejto nutraceutickej pilulky na zníženie plazmatických lipidov v skupinách rôznej veľkosti jedincov stredného alebo staršieho veku so stredne ťažkými formami zmiešanej hyperlipidémie, poskytli rôzne výsledky (zníženie LDL-C od -10,8 % do -31 % a TG od -9,5 % do 26 %). V našej skupine jedincov s ťažšou formou primárnej HCH liečených BBR/P/RR počas šiestich mesiacov sa LDL-C, non-HDL-C a TG znížili o 32 %, 30 % a 19,5 %, v uvedenom poradí. Rozpor s niektorými predchádzajúcimi nálezmi môže byť spôsobený viacerými faktormi, medzi ktoré patrí typ hyperlipidémie (izolovaná závažnejšia HCH verus zmiešaná hyperlipidémia), rozdiel v telesnej hmotnosti a glukózovej tolerancii, compliance k medikamentóznej liečbe a súbežná liečba liekmi zasahujúcimi do metabolizmu lipoproteínov.

Vo vzťahu k zloženiu nutraceutickej pilulky je potrebné zvážiť mechanizmy, ktoré sú základom jej hypolipidemického účinku pre každú jednotlivú zložku.

Ryžový extrakt z čínskych červených kvasníc je liečivá látka vyrobená fermentáciou kvasiniek *Monascus purpureus* na ryži. Kvasinky *Monascus* produkujú skupinu látok nazývaných monakolíny, vrátane monacolínu K (tiež nazývaného mevilonín alebo lovastátín), schopných inhibovať enzým HMG-CoA reductázu, a tiež obsahujú mononenasytené mastné kyseliny, izoflavóny a fytosteroly, všetky schopné znižovať LDL-C. Viaceré štúdie, vrátane jednej metaanalýzy, všetky podporujú priaznivý účinok červenej kvasnicovej ryže na krvný lipidový profil u hyperlipidemických subjektov a tento účinok bol potvrdený u pacientov s intoleranciou ST, kde prípravky z červenej kvasnicovej ryže vyvolali pokles závislý od dávky LDL-C, od 21 % do 30 %, bez závažných nežiaducich účinkov vo väčšine prípadov. Vo všetkých týchto štúdiách sa však prípravky z červenej kvasnicovej ryže, ktoré obsahovali premenlivé množstvo monacolínu K a iných monakolínov na fixnú dávku červenej kvasnicovej ryže, používali v denných dávkach v rozmedzí od 0,6 do 4,8 g, oveľa vyšších ako sú súčasné dávky. v nutraceutickej pilulke podávanej v tejto štúdii (200 mg so štandardizovaným obsahom 3 mg monacolínu K), čo zodpovedá niektorým hláseniam o myopatii u pacientov liečených vysokými dávkami červenej kvasnicovej ryže.

Policosanol je zmes primárnych alkoholov s dlhým reťazcom izolovaná z vosku cukrovej trstiny. Okrem skorých klinických štúdií vykonaných kubánskymi skupinami, ktoré preukázali priaznivé účinky policosanolu na plazmatický lipidový profil, novšie

randomizované kontrolované štúdie u hyperlipidemických belochov nezistili žiadny účinok tejto zlúčeniny na zníženie lipidov ani v monoterapii v rozmedzí dávok od 10 do 80 mg/deň alebo v kombinácii s ST. Na základe týchto zistení sa domnievame, že 10 mg policosanolu v našej nutraceutickej tabletke neprispieva k jej hypolipidemickému účinku.

Účinok BBR na zníženie lipidov, izochinolínového alkaloidu extrahovaného z mnohých bylenných rastlín (*Rhizoma coptidis*, *Hydrastis Canadensis*, *Berberis vulgaris*), bol po prvýkrát hlásený u čínskych pacientov s hyperlipidémiou typu IIa alebo IIb liečených samotným BBR (500 mg dvakrát za deň). V tejto štúdií BBR znížila TC, LDL-C a TG o 20 %, 25 % a 8 % pri type IIa a o 29,5 %, 11 % a 48 % pri type IIb. Štúdie na zvieratách a kultivovaných bunkách objasnili mechanizmy, ktoré sú základom účinkov tohto lieku. BBR zvyšuje hepatickú LDLR mRNA a LDLR proteín stabilizujúcu mRNA post-transkripčným mechanizmom, ktorý zahŕňa aktiváciu signálnej dráhy extracelulárnej signálom regulovanej kinázy (ERK). Aktivácia ERK inhibuje expresiu hnRNP I (heterogénny jadrový ribonukleo-proteín I) a KSRP (regulačný proteín zostrihu typu KH), ktoré pri interakcii s cis-regulačnými sekvenciami (prvky bohaté na AU) v proximálnej časti 3. ' netranslatovaná oblasť (UTR) LDLR mRNA, znižujú jej stabilitu. Aktiváciou JNK/c-jun dráhy zvyšuje BBR aj transkripčnú aktivitu promotora *LDLR*. Okrem toho môže BBR znižovať plazmatické lipidy inhibujúce syntézu cholesterolu a triglyceridov v pečeni prostredníctvom aktivácie AMP-aktivovanej proteínkinázy (AMPK), ktorá inaktivuje enzýmy HMG-CoA reductázu a acetyl-CoA karboxylázu.

V pôvodnej štúdií s hypercholesterolemickými pacientmi typu IIa sa 25 % zníženie hladín LDL-C dosiahlo dvojnásobnou dávkou BBR, ako je prítomná v našej nutraceutickej tabletke . Okrem toho Cicero a kol. u svojich hyperlipidemických pacientov, ktorí používali 500 mg/deň samotného BBR, pozorovali iba 20 % zníženie LDL-C. Vzhľadom na tieto zistenia a na výsledky získané v tejto štúdií s nízkou dávkou červenej kvasnicovej ryže a BBR môžeme predpokladať synergický účinok týchto dvoch zložiek na inhibíciu syntézy pečenných lipidov, okrem BBR-sprostredkovaného zvýšenia Množstvo LDLR mRNA a LDLR proteínu.

EZE inhibuje absorpciu diétného a žlčového cholesterolu, ako aj rastlinných sterolov na kefovom okraji jejunálnych enterocytov a reabsorpciu biliárneho cholesterolu pečennými bunkami, selektívne blokuje aktivitu transportéra NPC1L1 v enterocytoch a kanálikoch membrány hepatocytov. Znížením množstva chylomikrónového cholesterolu dodávaného do pečene EZE znižuje obsah cholesterolu v pečeni, čo vedie k zvýšenej expresii LDLR, čo vedie k zvýšenému vychytávaniu LDL z plazmy a zníženiu hladín cirkulujúceho LDL-C. Účinok EZE na expresiu LDLR je však čiastočne kompenzovaný zvýšením syntézy cholesterolu, ktorá je potlačená ST. To vysvetľuje aditívny účinok na zníženie LDL-C EZE a ST pri súbežnom podávaní týchto liekov.

Z metaanalýzy ôsmich randomizovaných kontrolovaných štúdií a zo 14 novších štúdií, ktoré ako celok skúmali 4110 hyperlipidemických jedincov (LDL-C $4,32 \pm 0,49$ a TG $1,90 \pm 0,75$ mmol/l) liečených počas 12 týždňov, vedie k tomu, že monoterapia s 10 mg/deň EZE znižuje LDL-C o 20,4 % a TG o 8,9 % a zvyšuje HDL-C o 3 %. U jedincov, ktorých sme liečili EZE, sme v kontexte veľkej interindividuálnej variability (pokles LDL-C z -9,2 % na -38,8 %) neočakávane pozorovali vyššie priemerné percento zníženia plazmatického LDL-C (-25,4 %). Možnými vysvetleniami týchto výsledkov v porovnaní s výsledkami uvedenými vyššie boli vyššie východiskové hladiny LDL-C našich pacientov, dlhšia liečba a genetické pozadie

našej populácie s odkazom na niektoré jednonukleotidové polymorfizmy alebo ne-synonymné sekvenčné varianty génu *NPC1L1* spojené s vyššou odpoveďou na zníženie LDL-C na EZE. Tento posledný predpoklad sa však musí posudzovať opatrne, pretože v tejto práci sme skúmali iba jeden genetický variant a našli sme frekvenciu minoritnej alely podobnú tej, ktorá bola zistená v iných populáciách.

V malej podskupine našich jedincov, ktorí boli považovaní za relatívne slabo odpovedajúcich na monoterapiu, kombinovaná liečba s BBR/P/RR a EZE znížila LDL-C o 37 %, non-HDL-C o 35 % a TG o 23 %, v dôsledku inhibície absorpcie cholesterolu spojenej s potlačením syntézy lipidov v pečeni, čo spôsobuje trvalejšiu expresiu LDLR. Účinky kombinovanej liečby boli podobné tým, ktoré vyvolal simvastatín 20 mg/deň, atorvastatín 10 mg/deň a rosuvastatín 5 mg/deň a vyššie ako účinky dosiahnuté s pravastatínom 40 mg/deň u pacientov s primárnou HCH, čo naznačuje uspokojivú alternatívnu liečbu pacientov intolerantných na ST.

V našej skupine pacientov s HeFH s potvrdeným genotypom, ktorí boli na stabilnej liečbe ST alebo kombináciou STs/EZE, doplnenie liečby nutraceutickými tabletkami s obsahom BBR, hoci v kontexte veľká interindividuálna variabilita vyvolala v priemere o 10,5 % ďalší pokles plazmatickej hladiny LDL-C. Mechanizmy, ktoré sú základom tohto účinku, sú pravdepodobne sprostredkované BBR a môžu spočívať v: i) zvýšenej expresii LDLR kódovaných alelou divokého typu v spojení s ich predĺženým polčasom a/alebo ii) znížená expresia PCSK9 a následne nižšia degradácia LDLR (pozri nižšie).

PCSK9 je serínová proteáza exprimovaná v pečeni a čreve, ktorá sa po autoštiepení v endoplazmatickom retikule (ER) presúva na povrch bunky a je secernovaná do plazmy. Cirkulujúci PCSK9 sa viaže na LDLR na bunkovom povrchu hepatocytov, komplex LDLR/PCSK9 je internalizovaný do bunky a v lyzozómoch LDLR podlieha degradácii sprostredkovanej PCSK9. PCSK9, nezávisle od endocytózy, môže tiež viazať LDLR v bunke a zacieliť ich na degradáciu v lyzozómoch. Úlohu PCSK9 ako post-transkripčného regulátora množstva LDLR v pečeni podporuje zistenie, že získ funkčných mutácií PCSK9 u ľudí spôsobuje hypercholesterolémiu, zatiaľ čo strata funkčných mutácií spôsobuje hypocholesterolémiu, respektíve zvyšuje a znižuje kardiovaskulárne riziko. Promótorová oblasť génu *PCSK9* obsahuje miesta HNF1 a SRE, ktoré viažu transaktivačné proteíny hepatocytový nukleárny faktor 1a (HNF1a) a proteín viažuci regulačný prvok sterolov 2 (SREBP2). HNF1 α je nevyhnutný pre bazálnu transkripciu *PCSK9* a pre maximálnu genovú expresiu indukovanú SREBP2 v reakcii na intracelulárnu depléciu cholesterolu.

Liečba ST inhibíciou syntézy cholesterolu spôsobuje depléciu cholesterolu v pečeni a následne translokáciu SREBP2 z cytoplazmy do jadra, kde tento transkripčný proteín súčasne upreguluje expresiu LDLR a PCSK9; posledne menované, zvýšením degradácie LDL receptorov, môže znížiť účinok ST na zníženie LDL-C. Štúdie in vitro a niektoré klinické pozorovania podporujú tento mechanizmus. Dubuc a spol. v bunkách HepG2 a v ľudských primárnych hepatocytoch zistili, že ST upregulovali expresiu mRNA PCSK9 a že táto indukcia bola závislá od dávky a bola zvrátená mevalonátom. Klinické vyšetrenia u pacientov s HCH ukázali na dávke závislé zvýšenie PCSK9 v plazme počas liečby atorvastatínom alebo rosuvastatínom. Liečba kombináciou ST/EZE prostredníctvom výraznejšej deplécie obsahu cholesterolu v pečeni vyvolala zvýšenie plazmatického PCSK9 výraznejšie (~77 %) ako samotné ST v rovnakých dávkach (~45 %). Tieto výsledky poskytujú jedno z možných

vysvetlení, prečo sa zvyšujúcimi dávkami ST nedarí dosiahnuť proporcionálne zníženie LDL-C (iba asi 6 % pri každom zdvojnásobení dávky), vzhľadom na na dávke závislé zvýšenie expresie PCSK9 vyvolané ST a následné PCSK9-sprostredkovaná degradácia LDLR.

Vychádzajúc zo zistenia, že podávanie ST knockoutovaným myšiam *Pcsk9* vyvolalo prehnané zvýšenie LDLR v pečeni a zvýšilo klírens LDL z ich plazmy, a od pozorovania, že pacienti s HeFH, ktorí tiež niesli stratu funkčných mutácií PCSK9, vykazovali väčšie než očakávané zníženie hladín LDL-C počas liečby ST, boli v experimentálnych zvieracích modeloch prijaté nové stratégie na inhibíciu alebo zníženie produkcie alebo aktivity PCSK9; to poskytuje základ pre budúce terapie zamerané na zvýšenie účinku na zníženie LDL-C v súčasnosti používaných farmakologických liečebných postupov. Tieto stratégie zahŕňajú umlčanie génu PCSK9 modifikovanými antisense oligonukleotidmi alebo krátkou interferujúcou RNA (siRNA) namierenou proti mRNA PCSK9, monoklonálne protilátky namierené proti cirkulujúcemu proteínu PCSK9, ktoré inhibujú jeho väzbu na LDLR, a malé peptidy, ktoré zabraňujú dozrievaniu PCSK9 alebo jeho interakcii s LDLR. Doteraz získané výsledky ukázali, že inhibícia PCSK9 viedla k zvýšeniu pečňových LDLR a k významnému zníženiu hladín LDL-C a k silnému dodatočnému zníženiu LDL-C u zvierat dostávajúcich ST.

In vitro štúdie na bunkových líniách odvodených od ľudského hepatómu (bunky HepG2 a Huh7) ukázali, že BBR znižuje hladiny mRNA a proteínov PCSK9 spôsobom závislým od času a dávky. BBR pôsobí tak, že indukuje koordinovanú redukciu bunkového množstva proteínov HNF1 α a SREBP2 a následne znižuje väzbu týchto proteínov, ktoré synergicky transaktivujú transkripciu génu *PCSK9* na príslušné sekvencie HNF1 a SRE-1 v promótoch; tento mechanizmus má za následok silné potlačenie produkcie PCSK9. Okrem toho BBR pôsobí proti stimulačnému účinku ST na transkripciu PCSK9 a zvyšuje hladiny LDLR mRNA a LDLR-proteínu. Predchádzajúca štúdia na potkanoch s hyperlipidémiou ukázala, že kombinácia BBR so simvastatínom v nízkych dávkach spôsobila zníženie plazmatického LDL-C a TG významne vyššie ako pri monoterapii s ktorýmkoľvek z týchto liečiv a podobné tomu, ktorý vyvolala dvojitá dávka samotného simvastatínu, a že kombinovaná liečba up-regulovala LDLR mRNA v pečeni potkanov na úroveň 1,6-krát vyššiu ako pri monoterapiách. Tieto výsledky boli potvrdené u čínskych pacientov so stredne závažnou HCH liečených simvastatínom 20 mg/deň plus BBR 1 g/deň alebo niektorým z týchto liečiv samotných; u týchto pacientov kombinácia znížila LDL-C a TG v oveľa vyššej miere ako monoterapia. Tieto zistenia naznačujú, že BBR môže posilniť in vivo redukciu plazmatického LDL-C indukovanú liečbou ST.

Na týchto základoch sme testovali účinok suplementácie BBR u našich pacientov s HeFH. Bohužiaľ, v čase zberu údajov sme neboli schopní zmerať plazmatické koncentrácie PCSK9 pred a po suplementácii BBR, a preto nemôžeme dokázať, že ďalšie zníženie LDL-C dosiahnuté pomocou BBR bolo skutočne sprostredkované inhibíciou expresie PCSK9. U týchto pacientov s HeFH sme však pozorovali inverznú koreláciu medzi znížením hladín LDL-C získaným s ST alebo ST + EZE a dodatočným znížením vyvolaným BBR. Vzhľadom na to, že predchádzajúce štúdie našli priamy vzťah medzi znížením hladín LDL-C vyvolaným ST a zvýšením PCSK9 v plazme, naše zistenie vyššie uvedenej inverznej korelácie môže poskytnúť nepriamy dôkaz o BBR sprostredkovanom inhibícii PCSK9. Skutočne, v prítomnosti postupne vyšších hladín PCSK9 očakávame, že inhibičný účinok fixnej dávky BBR na produkciu PCSK9 sa bude postupne znižovať, čo zodpovedá proporcionálnemu zníženiu dodatočného účinku na zníženie LDL-C. Naše zistenia však môžu vysvetliť

sprievodné alebo odlišné mechanizmy, ako je zvýšená expresia LDLR, spojená s ich predĺženým polčasom rozpadu.

Záver

Medzi dostupnými alternatívnymi liečbami znižujúcimi lipidy u jedincov s primárnou HCH neznášanlivosťou ST alebo odmietajúcich terapiu týmito liekmi sme hodnotili účinky nutraceutickej pilulky obsahujúcej BBR a červenú kvasnicovú ryžu a EZE a preukázali sme vyššiu účinnosť prvej produkt. Navyše pri ich kombinácii sme pozorovali pokles plazmatických LDL-C a TG porovnateľný s poklesom vyvolaným podávaním miernych dávok ST. U pacientov s HeFH na stabilnej liečbe overenými liekmi znižujúcimi LDL-C viedla suplementácia nutraceutickou tabletkou k ďalšiemu zníženiu LDL-C lepšiemu ako pri zdvojnásobení dávky ST.

Zdroj: Livia Pisciotta, Antonella Bellocchio , a Stefano Bertolini, Department of Internal Medicine, University of Genoa, Viale Benedetto XV n. 6, 16132, Genoa, Italy, *Nutraceutical pill containing berberine versus ezetimibe on plasma lipid pattern in hypercholesterolemic subjects and its additive effect in patients with familial hypercholesterolemia on stable cholesterol-lowering treatment.*

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3477057/>