

Účinnosť berberínu u pacientov s nealkoholickým tukovým ochorením pečene

Cieľ

Randomizovaná, paralelne kontrolovaná, otvorená klinická štúdia bola vykonaná na vyhodnotenie účinku berberínu (BBR) na NAFLD.

Metódy

Randomizovaná, paralelne kontrolovaná, otvorená klinická štúdia sa uskutočnila v troch lekárskejších centrách (registračné číslo NIH: NCT00633282). Celkovo bolo zaradených 184 vhodných pacientov s NAFLD a náhodne dostávali (i) intervenciu v oblasti životného štýlu (LSI), (ii) LSI plus pioglitazón (PGZ) 15 mg qd a (iii) LSI plus BBR 0,5 g trikrát denne počas 16 týždňov. Pred liečbou a po liečbe sa hodnotil obsah tuku v pečeni (HFC), profily glukózy a lipidov v sére, pečenné enzýmy a koncentrácie BBR v sére a moči. Analyzovali sme tiež obsah BBR v pečeni a expresiu génov súvisiacich s metabolizmom glukózy a lipidov na zvieracom modeli NAFLD liečenom BBR.

Výsledky

V porovnaní s LSI liečba BBR plus LSI viedla k významnému zníženiu HFC (52,7 % oproti 36,4 %, $p = 0,008$), paralelne s lepším zlepšením telesnej hmotnosti, HOMA-IR a profilov sérových lipidov (všetky $p < 0,05$). BBR bol účinnejší ako PGZ 15 mg qd pri znižovaní telesnej hmotnosti a zlepšovaní lipidového profilu. Nežiaduce udalosti súvisiace s BBR boli mierne a vyskytovali sa hlavne v tráviacom systéme. Koncentrácie BBR v sére a moči boli u subjektov liečených BBR 6,99 ng/ml a 79,2 ng/ml. Pokusy na zvieratách ukázali, že BBR sa nachádza priaznivo v pečeni a mení génovú expresiu súvisiacu s pečenným metabolizmom.

Záver

BBR zlepšuje NAFLD a súvisiace metabolické poruchy. Terapeutický účinok BBR na NAFLD môže zahŕňať priamu reguláciu metabolizmu lipidov v pečeni.

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) je charakterizovaná akumuláciou tuku v pečeni, inzulínovou rezistenciou a zvyčajne narušeným metabolizmom glukózy a lipidov, čo je v súčasnosti hlavnou príčinou chronických ochorení pečene. Ide o významný zdravotný problém, ktorý postihuje 20–30 % bežnej populácie, z ktorých u 5–20 % sa vyvinula cirhóza pečene počas 10-ročného obdobia. Okrem toho NAFLD predpovedá diabetes 2. typu (T2DM) aj kardiovaskulárne ochorenia a metabolický komplex NAFLD priťahuje veľkú pozornosť. Na liečbu NAFLD sa vyskúšalo niekoľko farmakologických intervencií a látky zamerané na inzulínovú rezistenciu, ako sú tiazolidíndióny, priniesli sľubné výsledky.

Berberine (BBR) je aktívna jednotlivá zlúčenina izolovaná z Rhizoma Coptidis s dobre definovanou chemickou štruktúrou. Nedávno viaceré štúdie z klinických aj laboratórnych uviedli, že BBR má antidiabetické a antihyperlipidemické účinky. Zhang Y a kol. preukázali, že BBR má silný účinok na znižovanie hladiny glukózy sprevádzaný významným zvýšením

rýchlosti likvidácie glukózy prostredníctvom randomizovanej, dvojito zaslepenej a placebom kontrolovanej klinickej štúdie. Inzulínová rezistencia je často spojená s hyperglykémiou a dyslipidémiou a ektopická akumulácia tuku v pečeni zohrala kľúčovú úlohu vo vývoji inzulínovej rezistencie. V našej predchádzajúcej štúdii BBR významne znížil obsah tuku v pečeni (HFC) u potkanov NAFLD indukovaných stravou s vysokým obsahom tukov znížením metylácie promotora MTTP. Preto predpokladáme, že BBR môže zvrátiť mnohé metabolické abnormality spojené s NAFLD znížením HFC. Účinky a základné mechanizmy BBR na steatózu pečene a súvisiace metabolické abnormality sa však u pacientov s NAFLD nikdy neskúmali.

V tejto štúdii sme uskutočnili randomizovanú, multicentrickú, kontrolovanú, otvorenú klinickú štúdiu s cieľom preskúmať účinnosť a bezpečnosť BBR u pacientov s NAFLD a tiež preskúmať mechanizmus účinku BBR na zvieracom modeli NAFLD.

Metódy

Randomizovaná, paralelne kontrolovaná, otvorená klinická štúdia sa uskutočnila v troch lekárskejších centrách na liečbu pacientov s NAFLD s poruchou regulácie glukózy (IGR) alebo T2DM s LSI v kombinácii s pioglitazónom (PGZ) alebo BBR v troch centrách (registračné číslo NIH: NCT00633282). Návrh štúdie zodpovedal revidovaným štandardom CONSORT pre oznamovanie randomizovaných štúdií (kontrolný zoznam S1 CONSORT). Schematický vývojový diagram návrhu pokusu je uvedený Obr. Plánovaná veľkosť vzorky bola 180 subjektov s rovnakým priradením do každej z troch študijných skupín (60 na skupinu). Odhadli sme, že pri tejto veľkosti vzorky bude mať 90 % silu na zistenie absolútneho rozdielu v hodnote zníženia HFC 7 %, s obojstrannou chybou typu 1 0,025.

Vhodní dospelí boli identifikovaní a prijatí z nevyžiadaných odporúčaní do troch zúčastnených klinických centier od marca 2008 do augusta 2011. Obsah tuku v pečeni (HFC) bol hodnotený protónovou magnetickou rezonančnou spektroskopiou (¹H MRS) a pacienti s viac do štúdie bolo zaradených viac ako 13 % HFC. Zhoršený metabolizmus glukózy vrátane IGR alebo T2DM bol definovaný hodnotou plazmatickej glukózy nalačno (FPG) $\geq 5,6$ mmol/l a/alebo 2 hodiny po zaťažení plazmatickou glukózou (PPG) po 75-g perorálnom podaní glukózy $\geq 7,8$ mmol/l. Priebeh T2DM by mal byť u pacientov s T2DM kratší ako 1 rok. Subjekty boli vylúčené, ak mali konzumáciu alkoholu ≥ 10 g/deň u žien a ≥ 20 g/d u mužov [17], boli pozitívni na hepatitídu B alebo C alebo mali iné ochorenia pečene. Zo štúdie boli vylúčení aj pacienti, ktorí boli liečení nasledujúcimi liekmi v priebehu 4 týždňov pred zaradením, vrátane hypoglykemických liekov alebo liekov regulujúcich lipidy (statíny, fibráty), liekov, ktoré môžu ovplyvniť obsah tuku v pečeni (napr. silybín, kyselina ursodeoxycholová, bicyklol, fosfatidylcholín a vitamín E) a čínske bylinky. Z bezpečnostných dôvodov boli vylúčené osoby so závažnými metabolickými abnormalitami a orgánovou dysfunkciou, napríklad HbA1c $>7,5$ %, sérový triglycerid $\geq 5,0$ mmol/l, ALT alebo AST ≥ 2 -násobok hornej hranice normy, sérový kreatinín $\geq 1,5$ mg/dl ($133 \mu\text{mol/l}$) a krvný tlak $\geq 160/100$ mmHg pri liečbe životným štýlom a antihypertenzívami. Štúdia bola schválená etickou komisiou nemocnice Zhongshan, Univerzita Fudan a bola vykonaná v súlade s usmerneniami Helsinskej deklarácie a komisia mala na starosti štvrtročné monitorovanie výsledkov, aby sa zaistila bezpečnosť pacientov a preskúmanie terapeutickú účinnosti. Od všetkých pacientov sa získal písomný informovaný súhlas.

Študovať dizajn

Jedinci, ktorí splnili všetky vstupné kritériá, boli náhodne zaradení do jednej z troch skupín pre 16-týždňovú klinickú skúšku, skupina A-LSI, skupina B-LSI plus PGZ (15 mg qd) a

skupina C-LSI plus BBR (0,5 g, tid). BBR (berberine, Huashi Pharmaceuticals Shanghai, China, Inc.) sa podával perorálne v dávke 0,5 g 30 minút pred jedlom, trikrát denne (podľa čínskeho liekopisu). Počítačom generovaná náhodná alokačná sekvencia bola získaná nezávisle štatistikom zo School of Public Health, Fudan University, Shanghai, Čína. Výskumní pracovníci randomizovali účastníkov do jedného z troch ramien. LSI (vrátane úpravy stravy a cvičenia) sa uskutočnilo podľa štandardizovaného odporúčania. Denná strava pred vstupom do štúdie bola porovnateľná medzi tromi skupinami a od všetkých účastníkov sa vyžadovalo, aby prijali diétu s obmedzeným príjmom kalórií odpočítaním 500 kcal od priemerného denného príjmu kalórií a dosiahli viac ako 150 minút týždenne strednej intenzity aeróbného cvičenia. Primárnym výsledkom bolo zníženie HFC zistené pomocou ^1H MRS; a sekundárne výsledky zahŕňali zlepšenie telesnej hmotnosti, orálny glukózový tolerančný test (OGTT), sérovú glukózu a inzulín, HbA1c, hodnotenie homeostatického modelu inzulínovej rezistencie (HOMA-IR), hodnotenie homeostatického modelu, Kunes (HOMA- β), lipidový profil (TC, TG, HDL-c, LDL-c, ApoA, ApoB, ApoE, Lpa) a pečeneňové enzýmy (ALT, AST, γ -GT, ALP). Na začiatku aj na konci liečby každý účastník absolvoval pohovor vyškoleným vyšetrovateľom, posúdenie antropometrických parametrov a krvné vyšetrenia na vyhodnotenie glukózy, lipidového profilu a pečeneňových enzýmov. HFC sa meral pomocou ^1H MRS. Pacienti boli pozorne sledovaní každé 4 týždne počas 16-týždňovej štúdie a následná návšteva bola určená hlavne na posúdenie bezpečnosti a znášateľnosti skúšaných liekov. V prípade, že sa počas liečby zistí nežiaduca udalosť, príslušný personál by mal do 24 hodín informovať zodpovedných klinických výskumníkov a hlavného skúšajúceho. Pri každej návšteve počas liečby sme hodnotili dočasné udalosti súvisiace s bezpečnosťou, dodržiavanie, počty piluliek a odber séra účastníkov. Tehotenské testy z moču sa robili pri každej návšteve u účastníčok v plodnom veku. Koncentrácie BBR a jeho metabolitov v sére a moči boli merané pomocou LC-MS/MS, ako bolo podrobne opísané vyššie.

Meranie obsahu tuku v pečeni pomocou ^1H –MRS

LFC boli pomocou ^1H -MRS s použitím 1,5T skenera magnetickej rezonancie (MR) (Siemens Avanto, Erlangen, Nemecko) vybaveného na získavanie protónovou spektroskopiou. Sagitálne, koronálne a axiálne rezy pokrývajúce celú pečeň boli predbežne získané na umiestnenie spektroskopického akvizitčného voxelu. Jeden voxel s veľkosťou 8 cm³ (2 x 2 x 2 cm) bol umiestnený do pravého laloka, aby sa zabránilo hlavným vaskulárnym štruktúram a podkožnému tukovému tkanivu. Spektrum protónov sa získalo pomocou telesovej cievky po prechode cez požadovaný objem pomocou sekvencie bodovo rozlíšenej spektroskopie (PRESS) s nasledujúcimi parametrami: čas opakovania = 1500 milisekúnd, čas ozveny = 135 milisekúnd. Zmerali sa intenzity signálu piku vody pri 4,8 ppm (S_w) a piku tuku pri 1,4 ppm (S_f) a percento tuku v pečeni sa vypočítalo pomocou vzorca $100 \times S_f / (S_f + S_w)$, ako to už opísala naša skupina.

Štúdia zvierat

Tridsaťšesť zdravých samcov potkanov SD (vo veku 5 až 6 týždňov) s hmotnosťou 190 až 210 gramov bolo získaných z Centra vývoja zvierat, Čínska akadémia vied, Šanghaj. Všetky potkany dostali voľný prístup k potrave a vode, udržiavali sa v 12/12-hodinovom cykle svetlo/tma a dostávali stravu s vysokým obsahom tukov (32,6 % uhl'ohydrátov, 51,0 % tuku, 16,4 % bielkovín) počas 6 týždňov, aby sa zistila Model NAFLD indukovaný HFD. BBR bol zakúpený od Sigma-Aldrich (MO, USA) a podávaný v jednej dávke 200 mg/kg potkanom NAFLD indukovaným HFD. Potkany boli usmrtené cervikálnou dislokáciou a vzorky séra a pečeneňového tkaniva boli odoberaté po 0, 4, 8, 12, 24 a 48 hodinách (n = 6 pre každý časový bod) po perorálnom podaní jednorazovej dávky BBR, ktorá bola najčastejšie používaná dávka

pre štúdie na zvieratách. Všetky vzorky boli skladované pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kvantitatívna analýza BBR a jeho metabolitov v krvi a moči bola vykonaná opísanou metódou. Zmrazené tkanivo sa použilo na prípravu mRNA a komplementárnej DNA na použitie pri analýze kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) v reálnom čase a podrobnosti a sekvencie primérov použitých v tejto štúdii. Proteín sa tiež extrahoval zo zmrazeného tkaniva a jeho množstvo sa kvantifikovalo pomocou analýzy Western Blot. Protilátky používané na imunoblotovanie zahŕňali anti-MTTP (Bioworld), anti-glukokinázu (Proteintech) a anti-CPT1 α (Proteintech). BBR a jeho metabolity v pečevom tkanive boli kvantifikované pomocou shimadzu trojitého-štvornásobného MS (LC-MS/MS 8040; Shimadzu Corporation, Kyoto Japan).

Návrh štúdie na zvieratách bol v súlade s NC3R ARRIVE Guideline (S1 ARRIVE Checklist). Všetky experimentálne postupy zahŕňajúce použitie zvierat boli vykonané v súlade s politikou PHS a boli schválené Výborom pre používanie a starostlivosť o zvieratá na Fudan University.

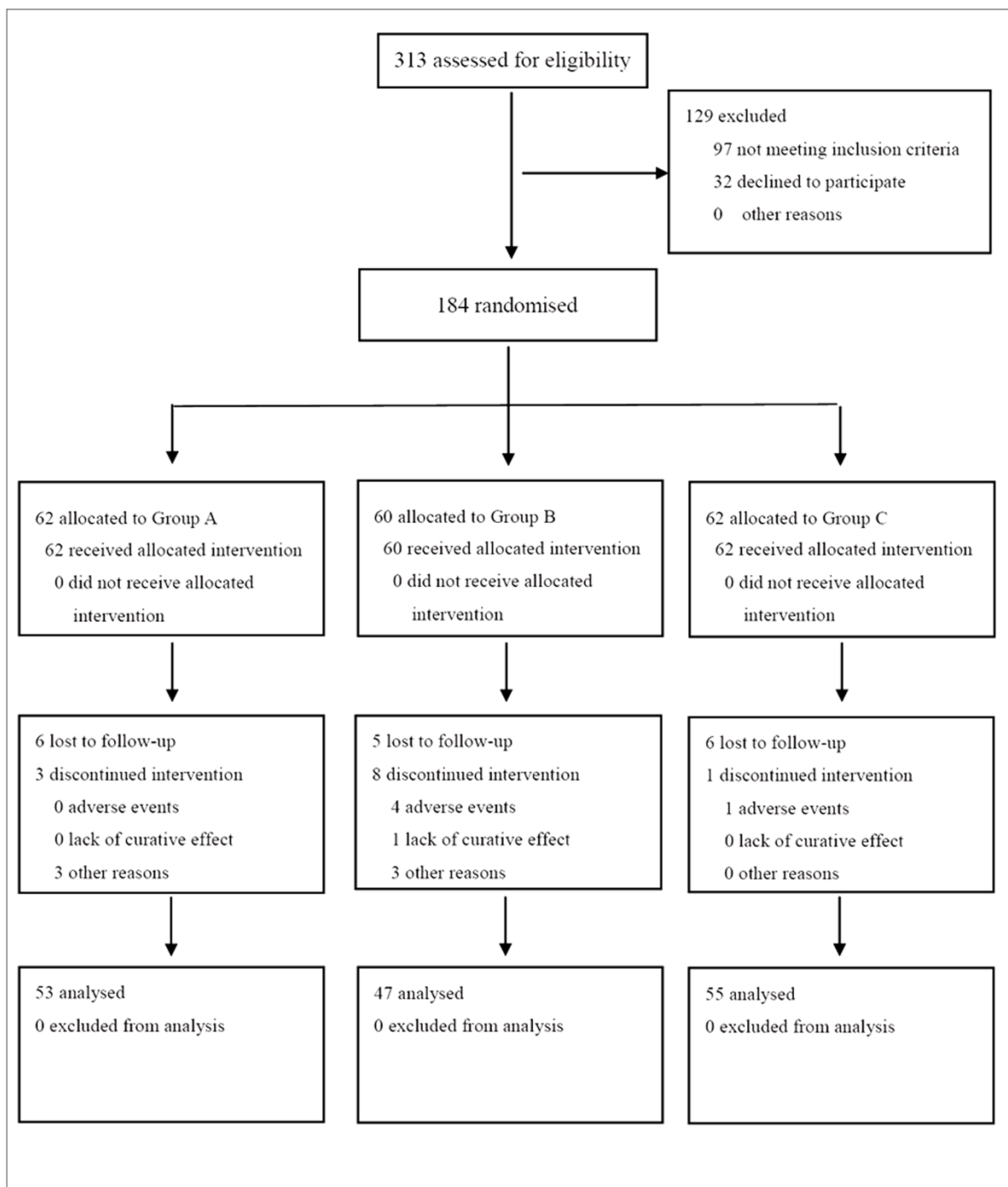
Štatistická analýza

Kategorické premenné boli normalizované vo frekvenciách (alebo percentách) a spojité premenné boli vyjadrené ako priemer \pm SD, s výnimkou skreslených premenných, ktoré boli prezentované ako medián s medzikvartilovým rozsahom uvedeným v zátvorkách. Na stanovenie normality spojitých premenných sa uskutočnil Kolmogorov-Smirnovov test. Rozdiel medzi východiskovými hodnotami a hodnotami po 16 týždňoch liečby BBR plus LSI sa porovnal s tými, ktoré boli liečené LSI alebo PGZ plus LSI, s použitím všeobecného lineárneho modelu, aby sa upravila základná hodnota. Vzhľadom na skutočnosť, že v štúdii boli plánované dve primárne porovnania, hodnoty P menšie ako 0,025 sa považovali za významné. Použili sa štatistické usmernenia na zastavenie podávania O'Brien-Fleminga, pričom jedna predbežná analýza účinnosti bola vykonaná v polovici štúdie. Pre štúdiu na zvieratách sú všetky údaje uvedené ako priemer \pm sem. Porovnania medzi rôznymi časovými bodmi po podaní BBR sa hodnotili lineárnym modelom so zmiešaným účinkom a na párové porovnania sa použila Bonferroniho korekcia. P-hodnota $< 0,05$ sa považovala za štatisticky významnú.

Výsledky

Študijné predmety

V období od marca 2008 do apríla 2011 bolo do štúdie pôvodne zaradených celkovo viac ako 313 subjektov. Po klinickom posúdení bolo identifikovaných celkovo 184 subjektov, ktoré sa zúčastnia štúdie, z ktorých 62 bolo priradených na liečbu samotným LSI, 60 na LSI plus pioglitazón, a 62 pre LSI plus BBR pri randomizácii (obr. 1). Tieto tri skupiny sa dobre zhodovali, pokiaľ ide o demografické profily, HFC a iné základné charakteristiky (tabuľka 1). Na konci štúdie 53, 47 a 55 pacientov dokončilo svoje následné návštevy (obr. 1). Súlad s intervenciou v oblasti životného štýlu a študovanými liekmi bol viac ako 90 % vo všetkých skupinách (Tabuľka S1).



Obr. 1 Diagram toku CONSORT.

184 subjektom bolo pridelených iba intervenciu v oblasti životného štýlu ($n = 62$), intervenciu v oblasti životného štýlu plus pioglitazón ($n = 60$) a intervenciu v oblasti životného štýlu plus berberín ($n = 62$). Na konci terapie 53, 47 a 55 subjektov v troch skupinách dokončilo následnú návštevu.

	LSI	LSI plus PGZ	LSI plus BBR
Sex (M/F)	32/30	28/32	38/24
Age (year)	50.64±10.69	53.52±8.62	50.72±9.76
Weight (kg)	75.73±11.13	74.98±12.73	78.71±15.99
BMI(kg/m ²)	27.27±2.80	27.47±3.74	28.08±4.17
Waist (cm)	93.34±7.81	93.09±8.91	95.88±10.98
HFC (%)	29.5(21.0–44.5)	29.8(20.5–44.0)	30.2(22.3–43.1)
Serum glucose (mmol/L)			
0min	6.09±0.96	6.28±1.08	6.37±0.92
30min	10.61±1.91	11.14±1.88	11.10±1.54
60min	12.36±2.93	12.87±3.01	12.98±2.59
120min	9.97±3.17	11.18±3.54	11.11±2.98
180min	6.23±2.42	6.78±2.85	6.92±2.50
AUCg	39.11±8.42	41.73±9.07	41.84±7.52
HbA1c(%)	6.17±0.67	6.42±0.68	6.46±0.70
Serum insulin (mU/mL)			
0min	15.0(9.3–18.6)	13.7(10.0–18.2)	13.6(8.9–17.4)
30min	66.0(38.2–89.4)	58.6(33.5–78.4)	52.0(36.2–68.4)
120min	83.5(59.2–132.1)	88.8(58.9–136.6)	81.4(49.1–113.1)
HOMA-IR	4.22±2.51	4.26±2.47	4.20±2.85
HOMA±	131.08±87.58	123.85±62.95	119.41±114.32
ΔI30/ΔG30	13.51±11.65	10.94±8.99	10.06±8.79
Lipid profile			
TC (mmol/L)	4.94±0.71	5.38±0.89	5.29±0.91
TG (mmol/L)	1.93±0.70	2.16±0.91	2.19±1.10
HDL-c (mmol/L)	1.20±0.25	1.19±0.25	1.16±0.26
LDL-c (mmol/L)	2.91±0.68	3.25±0.94	3.23±0.85
APO-A (g/L)	1.27(1.11–1.39)	1.30(1.18–1.54)	1.25(1.08–1.44)
APO-B (g/L)	1.00±0.19	1.08±0.20	1.07±0.21
APO-E (mg/L)	46(39–52)	46(39–58)	49(40–57)
LPa (mg/L)	135(90–219)	142(79–233)	105(54–183)
Liver enzyme (U/L)			
ALT	34(20–54)	41(26–65)	33(23–49)
AST	25(20–30)	28(20–43)	24(19–32)
γ-GT	36(22–60)	40(27–58)	40(27–69)

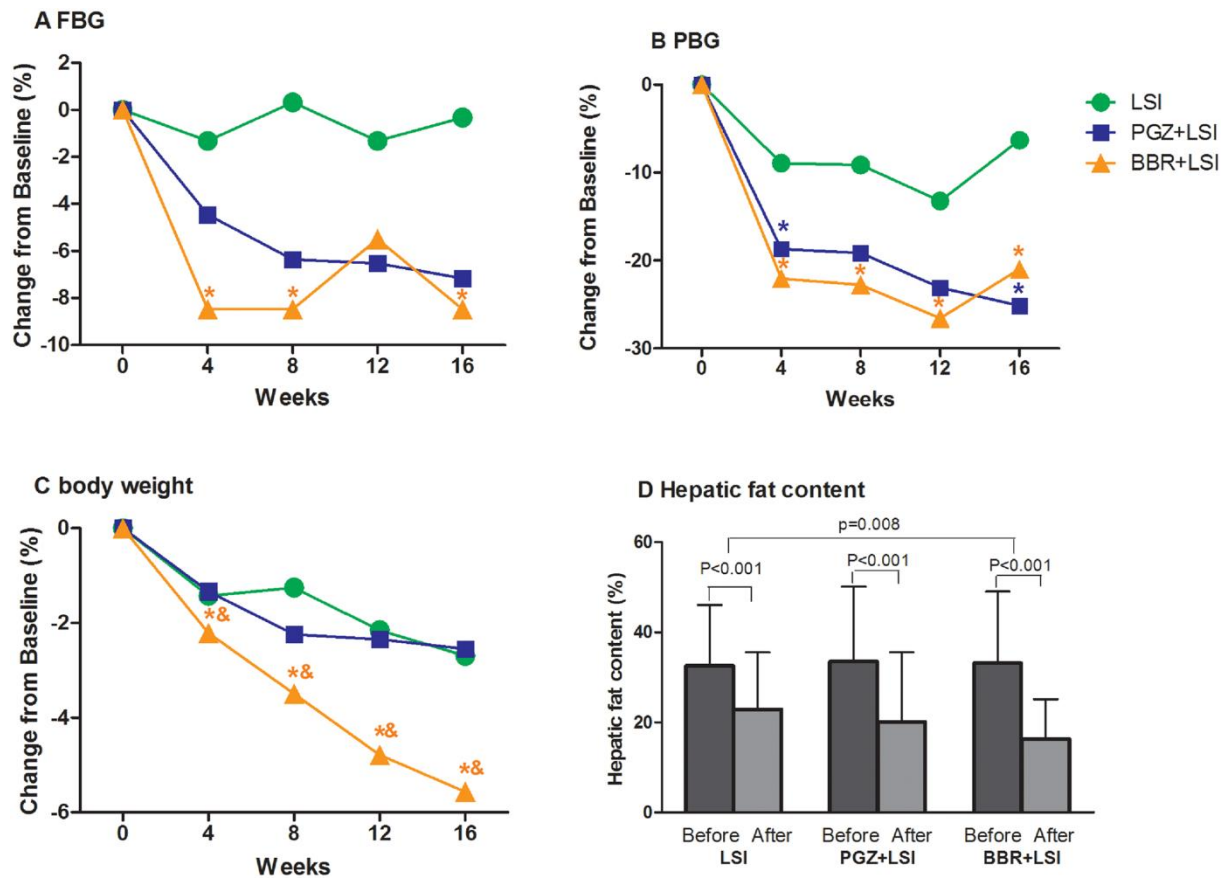
doi:10.1371/journal.pone.0134172.t001

Tabuľka 1. Základné charakteristiky subjektov štúdie.

Údaje boli prezentované ako priemer ± SD, s výnimkou skreslených premenných, ktoré boli prezentované ako medián s medzikvartilovým rozsahom uvedeným v zátvorkách.

Obsah tuku v pečeni a pečeňových enzýmov

Po liečbe sa HFC znížil o 57,2 % v skupine LSI plus BBR ($P < 0,001$) a o 36,4 % v skupine LSI ($P < 0,001$). Liečba LSI plus BBR spôsobila väčšie zníženie HFC v porovnaní s liečbou samotným LSI ($p = 0,008$, Obr. 2). Okrem toho účinok BBR na HFC nebol menší ako účinok PGZ (15 mg denne) ($p = 0,054$). Pečeňové enzýmy boli tiež znížené vo všetkých skupinách po liečbe a zníženie ALT a AST nepreukázalo žiadny významný rozdiel medzi skupinami LSI plus BBR a LSI plus PGZ v 16. týždni ($p = 0,855$ a $p = 0,632$, v uvedenom poradí) (tabuľka 2).



Obr. 2. Zníženie hladiny glukózy v krvi, telesnej hmotnosti a obsahu tuku v pečeni po liečbe.

Priemerné hodnoty sú uvedené pre percentuálne zmeny od základnej hodnoty A) FBG, B) PBG, C) telesnej hmotnosti a D) priemernej hodnoty HFC troch skupín pred a po liečbe. * $p < 0,05$ v porovnaní so skupinou LSI, & $p < 0,05$ v porovnaní so skupinou LSI plus PGZ.

	LSI	LSI plus PGZ	LSI plus BBR	P value (LSI plus BBR vs. LSI)	P value (LSI plus BBR vs. LSI plus PGZ)
Number	53	47	55	-	-
Weight (kg)	-1.99(-2.76~-1.23)	-1.94(-2.75~-1.12)	-4.29(-5.04~-3.54)	<0.001	<0.001
BMI(kg/m ²)	-0.72(-0.99~-0.44)	-0.67(-0.97~-0.38)	-1.51(-1.79~-1.25)	<0.001	<0.001
Waist (cm)	-2.14(-3.03~-1.26)	-2.60(-3.55~-1.66)	-4.84(-5.70~-3.97)	<0.001	0.001
HFC(%)	-11.4(-14.8~-7.9)	-12.1(-15.8~-8.5)	-17.4(-20.8~-14.0)	0.008	0.054
Blood glucose (mmol/L)					
0min	-0.15(-0.41~-0.12)	-0.38(-0.66~-0.10)	-0.47(-0.73~-0.20)	0.096	0.658
30min	-0.63(-1.06~-0.19)	-0.91(-1.38~-0.45)	-1.03(-1.46~-0.60)	0.196	0.725
60min	-1.23(-1.80~-0.65)	-1.18(-1.79~-0.57)	-1.86(-2.42~-1.29)	0.125	0.112
120min	-1.05(-1.73~-0.37)	-2.44(-3.17~-1.72)	-2.19(-2.87~-1.51)	0.020	0.609
180min	-0.90(-1.35~-0.44)	-1.48(-1.97~-1.00)	-1.57(-2.02~-1.11)	0.042	0.799
AUCg	-3.33(-4.93~-1.73)	-5.51(-7.21~-3.81)	-6.14(-7.72~-4.55)	0.015	0.594
HbA1c(%)	-0.30(-0.43~-0.16)	-0.44(-0.58~-0.30)	-0.47(-0.60~-0.33)	0.078	0.793
Serum insulin (mU/mL)					
0min	-0.85(-2.43~-0.72)	-1.66(-3.35~-0.02)	-1.59(-3.14~-0.03)	0.515	0.949
30min	-3.10(-11.54~-5.35)	1.24(-7.73~-10.22)	6.93(-1.35~-15.20)	0.098	0.362
120min	4.5(-10.9~-19.9)	-15.4(-32.0~-1.1)	-13.6(-28.9~-1.7)	0.102	0.874
HOMA-IR	-0.26(-0.72~-0.20)	-0.69(-1.18~-0.20)	-1.06(-1.51~-0.61)	0.014	0.298
Lipid profile					
TC(mmol/L)	-0.12(-0.31~-0.07)	-0.11(-0.31~-0.10)	-0.52(-0.71~-0.33)	0.004	0.004
TG(mmol/L)	-0.02(-0.24~-0.21)	-0.12(-0.36~-0.12)	-0.45(-0.68~-0.23)	0.007	0.050
HDL-c(mmol/L)	0.005 (-0.034~-0.044)	0.065 (0.023~-0.107)	0.010 (-0.029~-0.049)	0.861	0.061
LDL-c(mmol/L)	-0.14(-0.32~-0.04)	-0.05(-0.25~-0.14)	-0.24(-0.42~-0.07)	0.442	0.154
APO-A(g/L)	-0.01(-0.07~-0.05)	-0.00(-0.06~-0.07)	-0.09(-0.15~-0.03)	0.055	0.036
APO-B(g/L)	-0.05(-0.09~-0.01)	-0.05(-0.09~-0.00)	-0.12(-0.16~-0.08)	0.022	0.023
APO-E(mg/L)	-7.0(-10.7~-3.2)	-8.9(-13.0~-4.8)	-10.9(-14.6~-7.2)	0.143	0.476
LP(a)(mg/L)	4.53(-22.3~-31.3)	17.8(-11.2~-46.9)	23.6(-2.9~-50.1)	0.319	0.774
Liver enzyme (U/L)					
ALT	-14.1(-18.0~-10.2)	-20.5(-24.8~-16.2)	-21.0(-24.9~-17.1)	0.015	0.855
AST	-6.5(-8.2~-4.8)	-8.3(-10.2~-6.4)	-8.9(-10.7~-7.2)	0.050	0.632
γ-GT	-8.4(-13.9~-3.0)	-14.3(-20.2~-8.5)	-11.7(-17.1~-6.3)	0.403	0.517

doi:10.1371/journal.pone.0134172.t002

Tabuľka 2. Zmeny klinických a biochemických parametrov po liečbe.

Všetky parametre boli upravené podľa veku, BMI a základného parametra a reprezentované ako priemer (95 % CI). Hodnota P po úprave podľa veku, BMI, východiskových údajov.

Reakcie v energetickom metabolizme

V porovnaní so samotným LSI vykazoval BBR mimoriadne zníženie telesnej hmotnosti [-4,29(-5,04 --3,54)kg oproti -1,99(-2,76 --1,23)kg, $p < 0,001$], BMI [-1,51(-1,79 --1,25)kg/m² vs -0,72(-0,99 --0,44) kg/m², $p < 0,001$], obvod pásu[-4,84(-5,70 --3,97)cm oproti -2,14(-3,03 --1,26)cm, $p < 0,001$], HFC [-17,4(-20,8 --14,0)% vs -11,4(-14,8 --7,9)%, $p = 0,008$], glukóza 2 hodiny po zaťažení [-2,19(-2,87 --1,51)mmol/L oproti -1,05(-1,73 --0,37)mmol/l, $p = 0,020$], plocha pod krivkou OGTT [-6,14(-7,72 --4,55) oproti -3,33(-4,93 --1,73), $p = 0,015$], HOMA-IR [-1,06(-1,51 --0,61) vs -0,26(-0,72--0,20), $p = 0,014$], sérový cholesterol [-0,52(-0,71 --0,33) mmol/l vs -0,12(-0,31 --0,07)mmol/l, $p = 0,004$], APO-B [-0,12(-0,16 --0,08)g/l oproti -0,05(-0,09-0,01)g/l, $p = 0,022$] a triglyceridy [-0,45 (-0,68 --0,23)mmol/l oproti -0,02(-0,24--0,21)mmol/l, $p = 0,007$]([tabuľka 2](#)), čo jasne ukazuje významný prínos BBR v metabolizme. Zníženie hladiny glukózy v krvi v skupine LSI plus BBR sa vyskytlo počas prvých 4 týždňov liečby a trvalo počas celého skúšania; v tejto skupine bol tiež pozorovaný významný a časovo závislý pokles telesnej hmotnosti ([obr. 2](#)). V porovnaní so skupinou PGZ plus LSI (pozitívna referencia štúdie), BBR plus LSI

vykazovali porovnateľné účinky pri kontrole glykémie a citlivosti na inzulín, zatiaľ čo BBR má ďalšie výhody v telesnej hmotnosti a sérových lipidoch (tabuľka 2).

Nežiaduce udalosti

Celkovo sa u účastníkov vyskytlo 61 nežiaducich udalostí súvisiacich s liekom (AE). Najčastejšími nežiaducimi udalosťami súvisiacimi s BBR boli anorexia a žalúdočná nevoľnosť (30,95 % nežiaducich účinkov súvisiacich s BBR), hnačka (26,19 %) a zápcha (14,29 %), ktoré bolo možné dobre tolerovať počas prvých dvoch týždňov štúdie. U subjektov neboli pozorované žiadne závažné AE, ako je kongestívne zlyhanie srdca, zlomeniny kostí, pečeneová toxicita. AE sa vyskytli v skupine PGZ hlavne zahŕňali bolesť svalov, únavu a srdcové symptómy (tabuľka S2). V dôsledku AE štyria pacienti prerušili liečbu PGZ a jeden BBR.

Koncentrácie BBR v sére a moči

Jedenásť subjektov zo skupiny LSI plus BBR a jedenásť subjektov zo skupiny LSI bolo náhodne vybraných na meranie koncentrácií BBR v sére a moči a jeho metabolitov pred a po 16-týždňovej intervencii. Na konci 16-týždňovej liečby boli stredné hladiny BBR v sére a moči 6,99 ng/ml a 79,2 ng/ml, v uvedenom poradí, u subjektov liečených BBR (tabuľka 3), ktorých východiskové koncentrácie BBR neboli detekovateľné. Na rozdiel od toho, BBR tiež nebol detekovateľný pred a po intervencii v skupine LSI. Analýza moču ukázala, že BBR sa vylučoval hlavne ako jeho prototyp s koncentraciami v rozmedzí od 4,49 ng/ml do 645,48 ng/ml. Aj keď sa v moči pacientov zistilo päť metabolitov BBR (M1, M2, M4, M12, M13), všetky metabolity vykazovali veľmi nízke koncentrácie v rozmedzí od 0,01 do 10,15 ng/ml (približne 70-krát nižšie ako BBR). Všetky výsledky ukázali, že botanická zlúčenina BBR bola dobre absorbovaná, metabolizovaná a vylučovaná hlavne ako jej prototyp z moču.

	Compound	M.W (m/z)	Concentration (ng/mL) [Median (P ₂₅ -P ₇₅)]
Serum	BBR	336	6.99(4.65–9.82)
Urine	BBR	336	79.16 (3.37–326.16)
	M1	322	0.56 (0–3.01)
	M2	322	0.66 (0–2.04)
	M4	338	0.03(0–0.08)
	M12	498	0(0–0.02)
	M13	402	0.17(0–0.57)

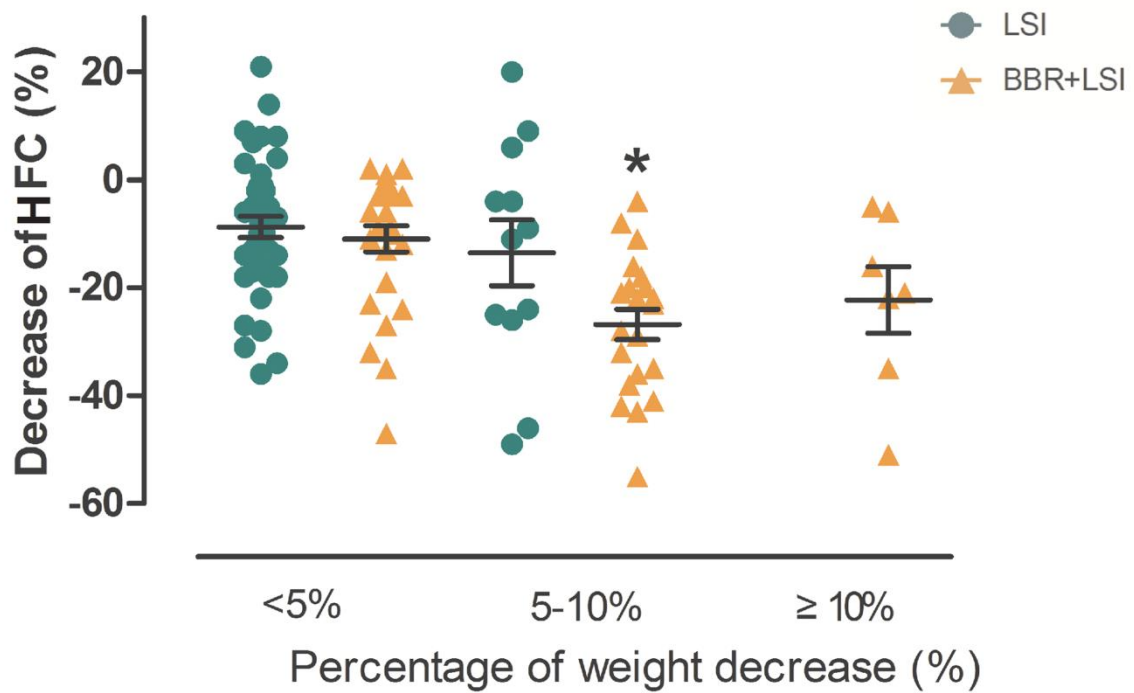
doi:10.1371/journal.pone.0134172.t003

Tabuľka 3. Obsah BBR a jeho metabolitov v ľudskej krvi a moči

BBR a jeho metabolity v pečeni po perorálnom podaní na zvieracom modeli

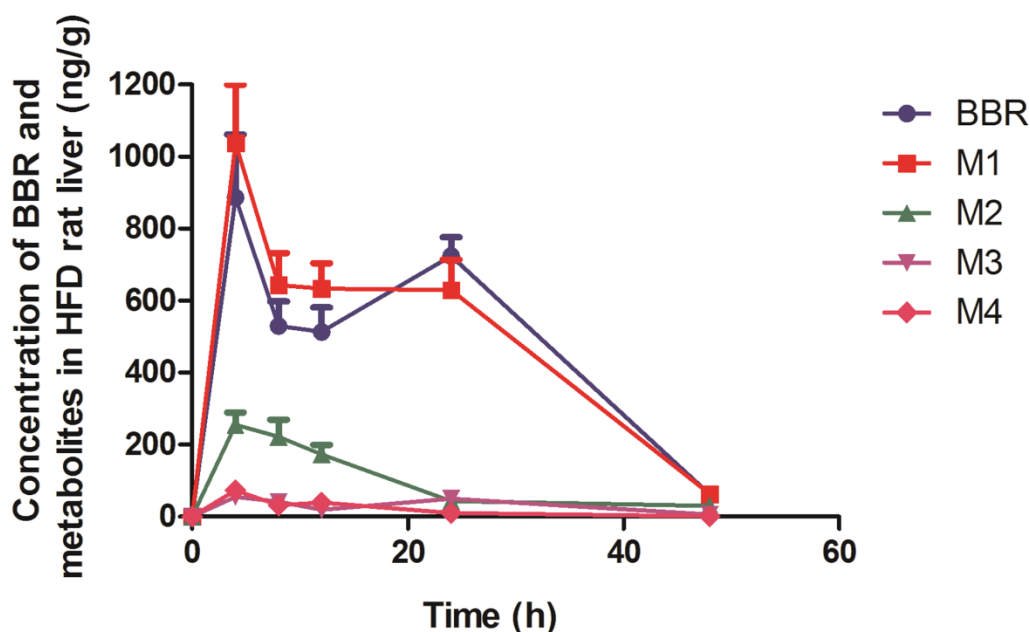
Je zrejmé, že subjekty v skupine BBR plus LSI stratili výrazne viac obsahu tuku v pečeni ako skupina LSI s rovnakým stupňom straty telesnej hmotnosti (obr. 3), čo naznačuje, že prínosy BBR na NAFLD a súvisiace metabolické ochorenia môžu zahŕňať priame pôsobenie na energetický metabolizmus pečene. Aby sme ďalej pochopili terapeutické účinky BBR, uskutočnili sme experimenty na zvieracom modeli NAFLD indukovanom HFD ošetrením potkanov jednou dávkou BBR, aby sa vylúčila interferencia zmeny telesnej hmotnosti. Ako je znázornené na obr. 4 , BBR a jeho metabolity boli distribuované v pečeni. Okrem toho boli koncentrácie BBR v pečeni potkana 50-krát vyššie ako koncentrácie v plazme (tabuľka 4). Prvý vrchol BBR ($886,80 \pm 174,55$ ng/g) v pečeni sa vyskytol 4 hodiny po perorálnom podaní

lieku a druhý vrchol 24 hodín ($724,44 \pm 51,89$ ng/g), po ktorom nasledoval významný pokles. Metabolity BBR vykazovali podobný vzťah medzi časom a koncentráciou ako BBR.



Obr. 3. Porovnanie poklesu HFC (%) medzi skupinami LSI a LSI plus BBR pri rôznych stupňoch zmeny telesnej hmotnosti (<5 %, 5–10 % a ≥10 % zmeny telesnej hmotnosti).

* $p < 0,05$ v porovnaní so skupinou LSI s rovnakým stupňom úbytku hmotnosti.



Obr. 4. Koncentrácia BBR a jeho metabolitov (M1, M2, M3, M4) v pečeni v a plazme potkana HFD (priemer \pm SEM, n=6).

Time point	Liver Concentration (ng/ml)	Plasma Concentration (ng/ml)
0h	0	0
4h	782.37(362.51–1132.86)	0.78(0.00–2.74)
8h	472.11(295.77–660.08)	0.30(0.00–1.39)
12h	576.76(380.19–769.51)	6.77(0.40–31.40)
24h	734.46(486.33–921.22)	3.24(1.05–26.56)
48h	51.71(24.35–109.61)	4.14(3.75–5.32)

doi:10.1371/journal.pone.0134172.t004

Tabuľka 4. Koncentrácia BBR v pečeni v plazme potkanov HFD.

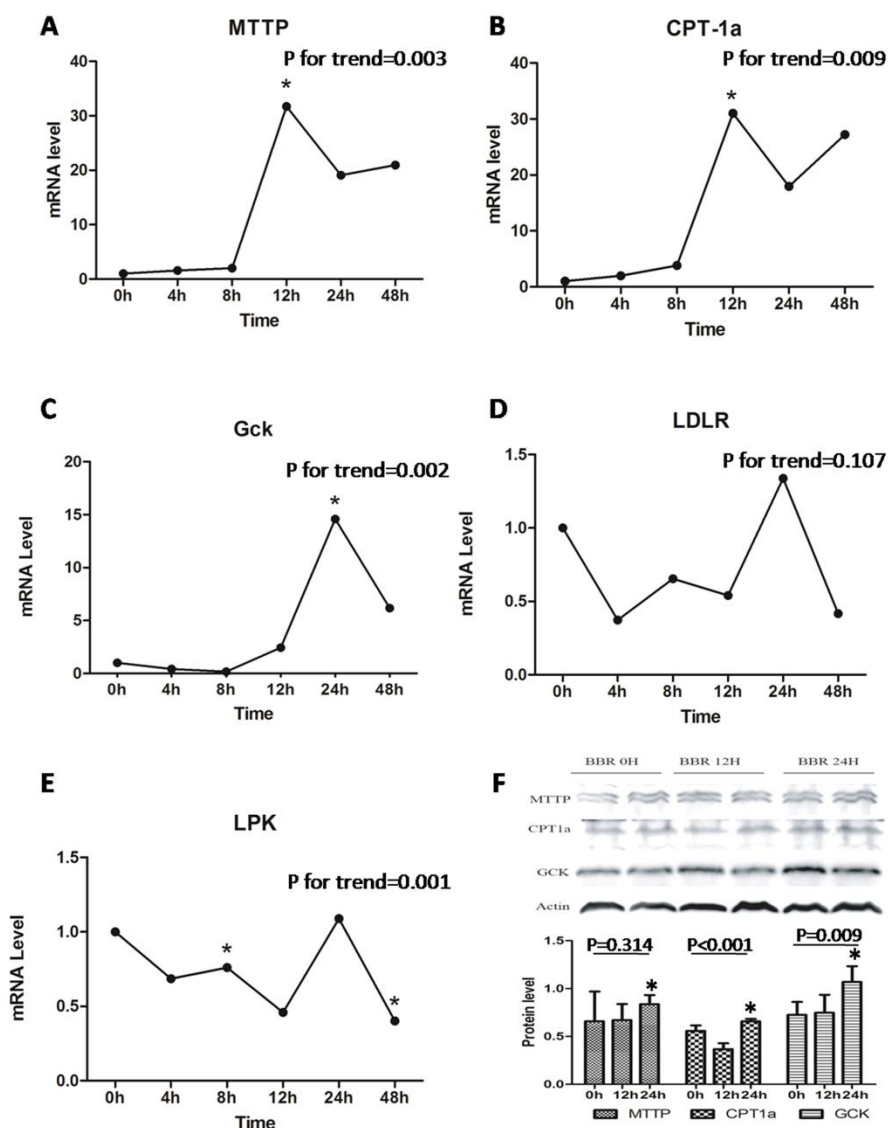
Účinky BBR na expresiu pečňových génov

Po preukázaní výhodnej distribúcie BBR v pečeni ďalej určujeme účinok BBR na metabolizmus glukózy a lipidov v pečeni. Jedna jediná dávka liečby BBR významne zvýšila triglyceridy v sére a znížila koncentráciu ALT a AST v sére do 48 hodín bez zmeny telesnej hmotnosti ([tabuľka 5](#)). Ako je znázornené na [obr. 5A–5E](#) , relatívna mRNA CPT-1a, MTTP a GCK bola významne zvýšená ($P < 0,05$) v pečeni potkana kŕmeného HFD perorálne liečeného jednou dávkou BBR. Analýza Western blot ukázala výsledok konzistentný s výsledkom v PCR v reálnom čase ([obr. 5F](#)). Expresia CPT-1, MTTP a GCK dosiahla vrchol 24 hodín po perorálnom podaní BBR, paralelne s druhým vrcholom koncentrácie BBR v pečeni ([tabuľka 4](#)). Tieto údaje naznačujú pleiotropný účinok BBR na sieť energetického metabolizmu v pečeni, čo môže zodpovedať za jeho priamy terapeutický účinok na NAFLD.

	HFD-0h	HFD-4h	HFD-8h	HFD-12h	HFD-24h	HFD-48h	P for trend
Body weight (g)	428.50±20.79	391.00±20.15	400.00±39.59	426.67±21.96	429.00±35.38	402.50±31.50	0.103
Liver weight (g)	13.96±0.90	12.42±1.26	13.13±1.50	13.96±1.28	14.46±2.46	12.09±1.79	0.096
Brown fat (g)	0.47±0.14	0.31±0.07	0.39±0.16	0.41±0.10	0.42±0.08	0.37±0.06	0.227
Epididymal fat (g)	6.38±3.11	4.46±0.67	5.34±1.73	5.72±1.75	6.09±1.78	5.40±1.51	0.587
TC	1.64±0.34	1.73±0.24	1.89±0.46	1.69±0.51	2.04±0.36	2.12±0.32	0.177
TG	0.36±0.08	0.70±0.23	0.49±0.19	0.34±0.09	0.70±0.28	0.83±0.17	<0.001
HDL-c	0.90±0.19	0.93±0.19	1.09±0.28	0.97±0.31	1.09±0.21	1.08±0.19	0.551
ALT	92.67±52.79	47.17±5.91	39.33±7.23	46.17±6.59	79.17±18.71	75.67±17.0	0.002
AST	376.67±197.57	143.83±13.18	126.17±24.26	139.17±24.98	270.33±41.00	297.83±89.60	<0.001

doi:10.1371/journal.pone.0134172.t005

Tabuľka 5. Fenotyp HFD – indukovaných NAFLD potkanov po liečbe jednodávkovým BBR.



Obr.

AE) Zmenená expresia génov úzko súvisiacich s metabolizmom glukózy a lipidov v pečeni SD potkanov. Vzorky boli vyšetrené do 48 hodín po jednorazovom podaní BBR orálnou cestou. Kvantitatívna PCR v reálnom čase sa použila na detekciu A) expresie mRNA v pečeni A) MTTP, B) CPT-1a, C) GCK, D) LDLR a E) LPK v rôznych časových priebehoch. F) Kvantifikácia mRNA MTTP, CPT-1, C) GCK, D) LDLR a E) LPK sa skúmali do 48 hodín po

jednorazovom podaní BBR orálnou cestou. liMTTP, mikrozomálny triglyceridový transferový proteín; CPT-1a, karnitín palmitoyltransferáza-1a; GCK, glukokináza; LDLR, nízko hustotný lipoproteínový receptor; LPK, pečeneňová pyruvátkináza.

Diskusia

Priaznivé účinky BBR na metabolizmus glukózy a lipidov boli plne preukázané. Mechanizmus jeho terapeutického účinku je však stále nejasný. V našej súčasnej štúdií sme zistili, že BBR bol po perorálnom podaní absorbovateľný a hlavne lokalizovaný v pečeni (50-krát vyšší ako v plazme). Svojou preferenčnou distribúciou v pečeni BBR výrazne zlepšila steatózu pečene u pacientov s NAFLD z našej randomizovanej klinickej štúdie a priamo regulovala expresiu pečeneňových génov súvisiacich s glukózou a metabolizmom lipidov. Podľa našich najlepších vedomostí je naša súčasná štúdia prvou humánnou štúdiou zameranou na terapeutické účinky BBR na NAFLD a tiež meriame jeho koncentráciu v sére, moči a pečeni, ako aj expresiu pečeneňových génov súvisiacu s metabolizmom glukózy a lipidov po BBR. liečbe.

V tejto štúdií liečba BBR počas 16 týždňov v kombinácii s LSI významne znížila obsah tuku v pečeni u pacientov s NAFLD, paralelne s globálnym metabolickým prínosom, ktorý sa odráža v znížení telesnej hmotnosti a zlepšení profilov glukózy a lipidov. V porovnaní so samotným LSI vykazoval BBR extra výhody pri zlepšení telesnej hmotnosti, HFC, HOMA-IR a hladín lipidov. Dokonca aj v porovnaní s PGZ (15 mg/deň) [24] mala BBR nielen podobné zníženie hladiny glukózy v krvi a HFC, ale aj priaznivé účinky na telesnú hmotnosť. Hoci boli pozorované gastroenterické AE súvisiace s BBR, boli mierne a tolerovateľné. BBR bol absorbovateľný po perorálnom podaní u našich pacientov v štúdií a štúdie na modeloch potkanov ukázali, že BBR sa nachádzal priaznivo v pečeni a mohol zmeniť génovú expresiu súvisiacu s pečeneňovým metabolizmom.

Pacienti v berberínovej skupine stratili výrazne viac tuku v pečeni a vykazovali väčšie zníženie hladiny glukózy v krvi, triglyceridov a cholesterolu ako skupina LSI, čo bolo v súlade s tými v predchádzajúcich štúdiách. Pozoruhodný pokles telesnej hmotnosti bol tiež pozorovaný u účastníkov skupiny BBR. Niekoľko štúdií uvádza, že BBR má extrémne nízku biologickú dostupnosť menej ako 1 % u zvierat liečených BBR , preto sa verilo, že BBR nie je absorbovateľný v ľudskom gastrointestinálnom trakte a jeho priaznivé účinky na pečeneňový tuk, inzulínovú rezistenciu ako aj metabolizmus glukózy a lipidov záviseli hlavne od jeho účinku na črevnú mikrobiotu a všetky zlepšenia pečeneňového tuku a metabolizmu mohli závisieť od významného úbytku hmotnosti po liečbe BBR. Naša súčasná štúdia však zistila, že subjekty v skupine BBR plus LSI stratili výrazne viac obsahu tuku v pečeni ako skupina LSI s rovnakým stupňom zníženia telesnej hmotnosti (obr. 3), čo naznačuje, že zlepšenie steatózy pečene po liečbe BBR nielen v súvislosti s výrazným znížením telesnej hmotnosti. Preto sme ďalej analyzovali koncentrácie BBR v sére a moči pomocou presnej analýzy LC-MS/MS v našej štúdií na ľuďoch a zistili sme, že BBR bol absorbovaný perorálnym podaním, metabolizovaný v pečeni a vylučovaný močom hlavne vo svojom prototypu pomocou LC-MS/MS analýza, ktorá naznačila jeho priamy účinok na pečeň.

Aby sme ďalej preskúmali možný mechanizmus, ktorý je základom priameho účinku BBR na NAFLD u ľudí, merali sme distribúciu BBR (a jeho metabolitov) po liečbe BBR na zvieracom modeli NAFLD indukovanom HFD. V porovnaní s jeho koncentráciou v krvi, BBR (a jeho metabolity) uprednostňovali lokalizáciu v pečeni s koncentráciou 50-krát vyššou

ako v plazme ([tabuľka 4](#)). V skutočnosti bol fenomén selektívneho obohacovania pečene zaznamenaný v BBR a iných botanických liečivých alkaloidoch.

Avšak pečeno selektívne obohatenie BBR je pravdepodobne pečenoým first-pass efektom, ktorý neznamená bioaktivitu na metabolizmus glukózy a lipidov, preto sme skúmali pečenoú expresiu skupiny génov súvisiacich s energetickým metabolizmom MTTP, CPT-1a a GCK v čase 0, 4, 8, 12, 24 a 48 hodín po perorálnom podaní jednej dávky BBR. Expresia týchto génov v pečeni bola po liečbe BBR významne zvýšená, bez významnej zmeny telesnej hmotnosti v každom časovom bode, čo naznačuje priamy účinok BBR na pečenoú expresiu génov súvisiacich s metabolizmom. MTTP bol na zostavenie a sekréciu lipoproteínov obsahujúcich apoB (VLDL a LDL), CPT-1a bol súčasťou komplexu prenosu mastných kyselín vonkajšej membrány a katalyzoval primárny regulovaný krok v celkovej mitochondriálnej oxidácii mastných kyselín. Up-regulácia týchto génov po liečbe BBR môže podporovať export a β -oxidáciu pečenoého tuku a čiastočne zodpovedať za jeho terapeutický účinok v jeho terapeutickom účinku na zlepšenie steatózy pečene. GCK slúžil na reguláciu rýchlosti metabolizmu glukózy a tiež sa zvýšil po liečbe BBR. Uvádza sa, že BBR môže znížiť inzulínovú rezistenciu aktiváciou pečenoovej AMPK a up-regulácia pečenoého GCK môže súvisieť s aktiváciou pečenoovej dráhy AMPK. Preto môže mať BBR viaceré účinky na pečenoé gény spojené s metabolizmom lipidov alebo glukózy. Je pravdepodobné, že významný anti-NAFLD účinok BBR súvisí s jeho obľúbeným umiestnením v pečeni a jeho priamymi účinkami na viaceré pečenoé gény, ktoré sa spájajú s energetickým metabolizmom.

Obmedzením tejto štúdie je, že žiadny z týchto pacientov nebol vyšetrený biopsiou pečene z dôvodu etiky a je potrebné ďalej študovať účinky BBR na ľudský pečenoý histologický zápal, fibrózu, ako aj gény súvisiace s energetickým metabolizmom.

Záver

Perorálne podávanie BBR významne znížilo HFC, telesnú hmotnosť a zlepšilo metabolický profil lipidov a glukózy u pacientov s NAFLD. Terapeutická účinnosť BBR na NAFLD a súvisiaci metabolizmus glukózy a lipidov súvisiaci s jeho obľúbeným umiestnením v pečeni a jeho priamymi účinkami na viaceré pečenoé gény, ktoré sa spájajú s energetickým metabolizmom. Preto je BBR sľubným prostriedkom na liečbu NAFLD, ako aj s nimi súvisiacich metabolických ochorení.

Zdroj: *Efficacy of Berberine in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*,

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0134172>