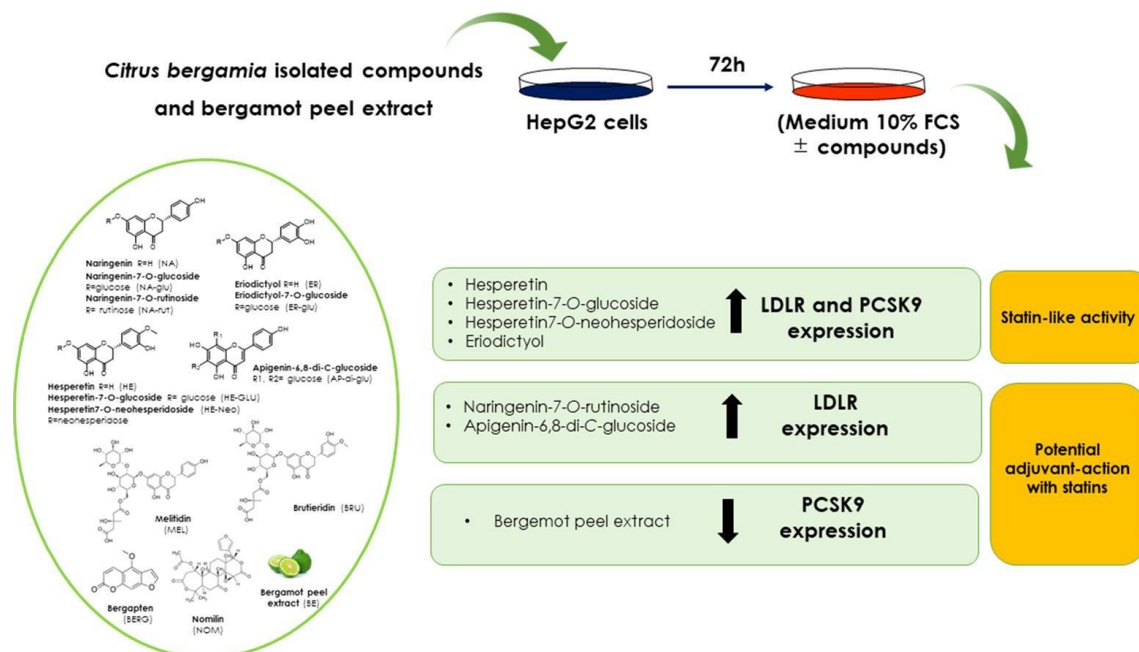


# Extrakt z kôry bergamotu ( *Citrus bergamia* ) ako nové hypocholesterolemické činidlo modulujúce expresiu PCSK9

## Abstraktné

Extrakty z citrusovej bergamie boli študované na zvládanie porúch hypercholesterolémie. Doteraz sú k dispozícii obmedzené informácie o aktivite jeho hlavných fytozložiek voči hlavným cieľom homeostázy cholesterolu. V tejto štúdii sa skúmali účinky extraktu z kôry bergamotu a izolovaných zložiek, konkrétne glykozidických a neglykozidových flavonoidov, jedného kumarínu a jedného limonoidu na receptor lipoproteínov s nízkou hustotou (LDLR) a proproteín konvertáza subtilizín/kexín typu 9 (PCSK9). hodnotené s použitím kultivovanej bunkovej línie HepG2. Okrem toho boli po prvýkrát študované účinky extraktu bergamotovej kôry, aby sa opísal potenciálny hypolipidemický účinok. Boli pozorované významné rozdiely v dôsledku glykozylácie a rôznej substitúcie na flavanónovej skupine ( *O* -metylácia). Ak vezmeme do úvahy trinásť izolovaných zlúčenín, naringenín-7-*O*- rutinozid (NA-rut) aj apigenín-6,8- *C* -glikozid indukovali expresiu LDLR, zatiaľ čo na PCSK9 sa nepozoroval žiadny účinok. Avšak hesperetín (HE) a jeho deriváty, hesperetin-7- *O* -glukozid a hesperetin-7- *O* -neohesperidozid (HE-glu, HE-neo) a eriodictyol (ER) vykazovali účinok podobný statínu, keďže došlo k významnému zvýšeniu bola detegovaná expresia LDLR aj PCSK9. Okrem toho extrakt z bergamotovej kôry (BE) najprv preukázal významné zníženie expresie PCSK9, čo naznačuje potenciálny adjuvantný účinok statínov. BE, HE-neo a NA-rut znížili intracelulárne steroly a expresiu PCSK9 transkripčného faktora HNF1-a. BE tiež významne zlepšilo vychytávanie LDL u HepG2 buniek. Na základe súčasných údajov môžu zložky bergamotovej šupky zohrávať úlohu pri liečbe hypercholesterolémie, na jednej strane môžu v kombinácii so statínmi vyvolať adjuvantný účinok, na druhej strane môžu mať účinok podobný statínom. Okrem toho môže byť BE dobrým kandidátom ako adjuvans k účinku statínov.



## Úvod

Bergamot (*Citrus bergamia* Risso et Poiteau) z *Rutaceae*, rod *Citrus*, je endemický v regióne Kalábria v južnom Taliansku. Je známy pre svoje mnohostranné využitie, napríklad v kozmetickom a voňavkárskom priemysle (Maruca, Laghetti, Mafrica, Turiano, & Hammer, 2017), v potravinárskom priemysle (Lagana, Giuffre, De Bruno, & Poiana, 2022) a v nutraceutický sektor (Di Folco et al., 2018). Vo všeobecnosti je bergamot známy svojimi zdraviu prospešnými vlastnosťami vďaka obsahu polyfenolov, konkrétne fenolových kyselín, flavanónov, flavónov, polymetoxylovaných flavónov a limonoidov (Mandalari et al., 2006, Russo et al., 2016). Bergamotová šťava sa ukázala ako vysoko účinná pri zmiernení zápalových (Risitano et al., 2014) a lipidových profilov (Miceli et al., 2007). Na druhej strane, extrakty z bergamotových šupiek vykazovali antioxidačné/protizápalové vlastnosti (Mandalari et al., 2006, Russo et al., 2016), podobne ako mnohé iné rastlinné extrakty (Mokgalaboni & Phoswa, 2023). Ukázalo sa, že perorálne podávaná bergamotová šťava znižuje celkový cholesterol (TC), cholesterol lipoproteínov s nízkou hustotou (LDLc), triglyceridy (TG) a zvyšuje hladiny cholesterolu lipoproteínov s vysokou hustotou (HDLc) na zvieracích modeloch (Miceli et al., 2007) a u dyslipidemických pacientov (až 40 % zníženie TC, LDLc a TG) (Lamiquiz-Moneo et al., 2019; V. Mollace et al., 2019), sprevádzané významným poklesom glukózy v krvi (až 23 %) (V. Mollace a kol., 2011; V. Mollace a kol., 2019). Okrem toho liečba bergamotovou šťavou spôsobuje zníženie cholesterolu s ochrannými účinkami proti poškodeniu obličiek vyvolanému hypercholesterolémiou na modeli potkanov (Trovato et al., 2010).

Na druhej strane bergamotová kôra, ktorá sa skladá z vonkajšej vrstvy (flavedo) a vnútornej vrstvy (albedo) (Rosa et al., 2022), predstavuje približne 60 % celkovej hmotnosti ovocia a je vedľajším produktom produkcie esenciálnych olejov (Mandalari et al., 2006). Bergamotové šupky obsahujú značné množstvo pektínov a vlákniny, limonoidov a flavonoidov (Mandalari et al., 2006, Russo et al., 2016). Najreprezentatívnejšími flavonoidnými derivátmi sú flavanónové rutinozidy a neoheperozidy odvodené od naringenínu, eriodictyolu a hesperetínu (Mandalari et al., 2006) a niekoľko štúdií preukázalo hypolipidemické a antiaterogénne účinky týchto zložiek. Naringín vykazuje antiaterogénny účinok prostredníctvom inhibície intercelulárnej adhéznej molekuly-1 u hypercholesterolemických králikov (Choe, Kim, Jeong, Bok, & Park, 2001) a naringenín vykazuje hypolipidemickú aktivitu a antiadipozitné účinky u potkanov prostredníctvom regulácie PPAR- $\alpha$  mechanizmus (Cho, Kim, Andrade, Burgess a Kim, 2011). Neoeriocitrín preto preukázal aktivitu ako inhibítor oxidácie LDL (Gliozzi et al., 2013, Yu et al., 2005). Okrem toho sa preukázalo, že zmes naringínu a hesperidínu významne znižuje aktivity HMG-CoA (3-hydroxy-3-metyl-glutaryl-CoA) reductázy a ACAT (acylCoA:cholesterol *O*-acyltransferáza) v experimentálnych vysoko samcov potkanov kŕmených cholesterolovou diétou (Bok et al., 1999).

Okrem týchto aspektov sa uskutočnili *in vitro* a *in vivo* štúdie o aktivite citrusových flavonoidných derivátov a extraktov na znižovanie cholesterolu na expresiu LDL receptora (LDLR) a jeho hlavného negatívneho modulátora, proproteínovej konvertázy subtilizín/kexín typu 9 (PCSK9). Podávanie bergamotovej polyfenolovej frakcie u potkanov kŕmených hyperlipidemickou diétou bolo spojené s významným znížením sérových hladín PCSK9 v porovnaní so sérovými hladinami PCSK9 hyperlipidemických potkanov liečených extraktom z červenej kvasnicovej ryže (Mollace et al., 2022). Okrem toho frakcia obohatená o flavanóny (3-hydroxy-3-metyl-glutarylflavanóny) z ovocia bergamotu zvyšuje expresiu LDLR (mRNA a proteín) v modeli hypocholesterolemických potkanov (Di Donna et al., 2014). Na druhej strane naringín a naringenín zvýšili expresiu LDLR v bunkových líniiach HepG2 prostredníctvom posilnenia dráhy väzbového proteínu 2 regulujúceho sterol (SREBP2) (Bawazeer et al., 2017; J. Liang et al., 2016). Naringín vyvolal rovnaký účinok v

modeli obéznych myší a rovnaká štúdia preukázala schopnosť naringínu pri znižovaní plazmatických hladín PCSK9 (Sui, Xiao, Lu a Sun, 2018). Okrem toho inkubácia hesperetínu, prevládajúceho flavonoidu v citrusových plodoch, v bunkách ľudského hepatómu HepG2 zvyšuje hladiny LDLR mRNA *prostredníctvom* regulácie transkripcie génu LDLR pomocou SREBP1a a SREBP2 (Barreca et al., 2017, Bawazeer et al., 2016).

K dnešnému dňu niekoľko štúdií zvažovalo koreláciu medzi aktivitou bergamotových flavonoidových derivátov a extraktov a cholesterolom prostredníctvom skúmania indukcie LDL-receptorov alebo mechanizmov regulácie PCSK9 (Di Donna a kol., 2014; Mollace a kol., 2022). Neexistujú však žiadne práce, ktoré by súčasne skúmali izolované zložky bergamotovej kôry za rovnakých experimentálnych podmienok a skúmali oba regulačné mechanizmy LDLR a PCSK9. Okrem toho neexistujú žiadne dokumenty, ktoré by skúmali vlastnosti extraktov z bergamotovej kôry na zníženie cholesterolu. To môže byť atraktívne, pretože šupky bergamotu sú odpadovým produktom priemyslu esenciálnych olejov a môžu byť dobrými kandidátmi na výrobu nových hypocholesterolemických činidiel.

V tejto štúdii sme hodnotili účinky extraktu bergamotovej kôry a 13 zlúčenín izolovaných z extraktu bergamotovej kôry na expresiu LDLR a PCSK9 v kultivovanej bunkovej línii hepatómu Huh7 ako prediktívny model pre potenciálny hypocholesterolemický účinok.

## **Materiály a metódy**

### **Bunková kultúra**

Štúdie sa uskutočnili na bunkách HuH7, bunkovej línii ľudského hepatómu. Bunky sa kultivovali v 100 mm Petriho miskách s minimálnym esenciálnym médiom (MEM) doplneným 10 % fetálnym bovinným sérom (FBS), 1 % L-glutamínu 200 mM, 1 % penicilínu (10 000 U/ml)/streptomycínu (10 mg/ml) roztoku, 1 % neesenciálnych aminokyselín, 1 % pyruvátu sodného a udržiavaná pri teplote 37 °C v podmienkach 95 % vzduchu a 5 % CO<sub>2</sub>. Po dosiahnutí 80 % konfluencie bunky prešli. Všetky činidlá boli zakúpené spoločnosťou EuroClone SpA, plasty od Corning.

### **Extrakt z bergamotovej kôry a zmesová izolácia**

Plody bergamotu boli získané na miestnom trhu a 3 kg plodov boli použité na zber šupiek. Šupky boli rozomleté v zmesi metanol/voda (1:1 obj./obj.) a výsledný materiál bol sonikovaný počas 20 minút. Kvapalina sa prefiltrovala a vysušila vo vákuu. 2 g extraktu bergamotovej kôry (BE) sa dispergovali v 40 ml vody a uskutočnilo sa rozdelenie kvapalina-kvapalina so 40 ml etylacetátu. Separácia sa opakovala trikrát. Etylacetátové frakcie boli spojené a prefiltrované v MgSO<sub>4</sub> a vysušené vo vákuu. Etylacetátový extrakt (180 mg) sa použil na izoláciu zlúčeniny. Preparatívna HPLC sa uskutočnila s použitím kolóny Zorbax C18 a ako mobilná fáza sa použila voda 0,1 % kyselina mravčia (A) a acetonitril (B), 3,5 ml/min. Gradient rozpúšťadla začína s A:B 90:10, za 40 minút A:B 15:85 a po 5 minútach A:B 10:90. Zozbieralo sa 38 frakcií, ktoré sa pomocou TLC spojili na základe ich správania. Z frakcie 15 sa uskutočnila TLC s použitím zmesi chloroform-metanol 4:1 a izolovala sa kyselina 3-(2-glukozylxy-4-metoxifenyl)propánová (Chan, Hwang, Kuo, Hung, & Wu, 2017). Z frakcie 19 a 20 sa uskutočnila TLC s použitím zmesi chloroform-metanol 4:1 a izoloval sa naringenín-7-O-glukozid (NA-glu). Menšie škvrny v TLC sa spojili a preparatívna HPLC sa uskutočnila v rovnakej preparatívnej kolóne, ktorá bola spomenutá predtým, ako rozpúšťadlo sa použilo 30:70 voda, 0,1 % kyselina mravčia a acetonitril, izokratický. Izoloval sa hesperetin-7-O - neoesperidozid (HE-Neo). Frakcie 30 a 31 sa purifikovali pomocou TLC použitím zmesi chloroform-metanol 98:2 ako rozpúšťadla a frakcie sa spojili na základe správania TLC. Z frakcie 30 a 31 sa izoloval naringenín (NA), eriodictyol (ER) a hesperetín (HE). Frakcie 37 a 38 sa spojili a bergapten (BER) sa izoloval pomocou TLC použitím zmesi dietyléter-toluén-etylacetát 40:50:10 ako rozpúšťadla.

## **HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> analýza extraktu bergamotovej kôry**

Extrakt zo šupky bergamotu (50 mg) sa rozpustil v metanole (25 ml) s použitím ultrazvukového kúpeľa a analyzoval sa pomocou systému HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>. Systém HPLC-MS<sup>n</sup> pozostával z kvartérneho čerpadla Agilent 1260 spojeného s čerpadlom 1260 Agilent s diódovým detektorom (DAD) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) a hmotnostného spektrometra Varian MS 500 (Varian, Santa Clara, CA, USA) vybavené elektrosprejovým (ESI) iónom. Ako stacionárna fáza bola použitá kolóna Zorbax SB C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Ako mobilná fáza sa použila zmes 0,1 % kyseliny mravčej vo vode (A), acetonitrilu (B) a metanolu (C) a gradient bol nasledujúci: 0 min, 90 % A, 7,5 % B, 2,5 % C; 20 minút, 80 % B, 20 % C; 22 min, 80 % B, 20 % C; 23 min, 90 % A, 7,5 % B, 2,5 % C. Prietok bol 0,75 ml/min. Objem nástreku bol 10 µl a teplota kolóny bola nastavená na 30 °C. DAD umožnil zbierať chromatogramy v rozsahu λ 200–640 nm. Údaje MS boli získané v pozitívnom aj negatívnom iónovom režime, v rozsahu *m/z* 100–2000. Vzor fragmentácie najintenzívnejších druhov iónov sa získal pomocou turbo údajov v závislosti od funkcie skenovania (TDDS) prístroja. Identifikácia zlúčenín sa získala na základe porovnania s literatúrou a referenčnými zlúčeninami, ak sú dostupné. Na kvantifikáciu zlúčenín sa použili rutín, esperidín, nomilín, bergapten. Štandardné roztoky sa pripravili v koncentračných rozsahoch 1–100 µg/ml a vytvorili sa kalibračné krivky.

## **Solubilizácia a úprava extraktu z kôry bergamotu a izolovaných zlúčenín**

Extrakt z kôry bergamotu sa rozpustil v DMSO na zásobnú koncentráciu 80 mg/ml a použil sa v koncentrácii 100 µg/ml v kultivačnom médiu; izolované zlúčeniny sa rozpustili v DMSO, aby sa získal 80 mM zásobný roztok a zriedili sa na uvedené konečné koncentrácie v kultivačnom médiu na ošetrenie. Simvastatín sa rozpustil vo fyziologickom roztoku na 50 mM zásobnú koncentráciu a použil sa pri 40 µM, ako už bolo uvedené (Ferri et al., 2017). Ak sa nepoužili, všetky zásoby sa skladovali pri -20 °C.

## **Test životaschopnosti sulforodamínových B buniek**

Životaschopnosť buniek extraktu a izolovaných zlúčenín bola hodnotená pomocou sulforodamínového (SRB) testu podľa protokolu stanoveného Skehanom a kol. (Skehan a kol., 1990). Stručne, 8.103<sup>buniek</sup>/jamka sa naočkovovalo na 96-jamkovú tácku v 100 µl/jamku kompletného média. Nasledujúci deň bolo staré médium nahradené čerstvým médiom obsahujúcim 0,4 % FBS po premytí sterilným PBS. Kontroly boli dodané s príslušnými % DMSO, aby boli porovnateľné so zlúčeninami a ošetrením BE. Po 24 hodinách inkubácie sa uskutočnil SRB test a merali sa absorbancie pri 570 nm s Victor Nivo multiplate reader od PerkinElmer.

## **Western blotting na intracelulárnu detekciu PCSK9, LDLR, SREBP-2 a HNF-1α**

Na analýzu westernovým prenosom sa použili netoxické zlúčeniny a koncentrácie extraktu (100 µM a 100 µg/ml). 3,105<sup>buniek</sup>/jamka sa naočkovovalo na 6-jamkovú tácku v 2 ml/jamku kompletného média. Nasledujúci deň bolo staré médium nahradené čerstvým médiom obsahujúcim 0,4 % FBS po premytí sterilným PBS. Simvastatín 40 µM sa použil ako pozitívna kontrola ako induktor PCSK9 a LDLR. Neošetreným kontrolám a kontrolám Simvastatínu sa dodalo vhodné % DMSO, aby boli porovnateľné so zlúčeninami a ošetrením extraktom z bergamotu. Po inkubácii sa bunková monovrstva dvakrát premyla studeným PBS, potom sa lýzovala na ľade počas 30 minút s domácim miernym lyzačným pufrom NP-40 (pripraveným podľa receptu Abcam). Kvantifikácia proteínov vo vzorkách sa uskutočňovala testom kyseliny bicinchonovej (SERVA) a vzorky pre elektroforetický beh sa vyrovnali na rovnakú koncentráciu zriedením vhodným množstvom lyzačného pufru a pridaním

podomácky vyrobeného nanášacieho pufru Laemli (pripraveného podľa receptu Abcam). Denaturácia proteínu sa potom zvýšila o 5 minút pri 95 ° C. Celkové množstvo  $\geq 20$  ug proteínu/vzorky sa nanieslo do SDS-PAGE jamiek a nechalo sa oddeliť za denaturačných podmienok (Bio-Rad prístroj). Proteíny boli potom polosuché prenesené do nitrocelulózy membrány (Bio-Rad prístroj), na ktorej boli membrány blokované 5 % odtučneným roztokom odstredeného mlieka v TBS-Tween 20 1X (ďalej len blokovací roztok) počas 1 hodiny pri teplote miestnosti. Nasleduje inkubácia cez noc s primárnymi protilátkami pre PCSK9 alebo LDLR alebo SREBP2 alebo HNF-1 $\alpha$  alebo GAPDH ako kontrolou nanášania. Deň potom sa membrány trikrát premyli (vždy 15 minút) s TBS-Tween 20 1X (TBST20 1X) a potom sa inkubovali s HRP-konjugovanými sekundárnymi protilátkami počas 90 minút pri teplote miestnosti, nasledovali tri ďalšie premytia s TBST20 1X 15 minút každý a ECL náročné na c100 Azure systém od Aurogene. Boli použité nasledujúce primárne protilátky: anti-LDLR (Millipore, Darmstat, Nemecko; myšacia monoklonálna protilátka, klon 2H7.1; riedenie 1:1000); anti-PCSK9 (Abcam, kód. ab181142; riedenie 1:1000), anti-SREBP2 (GeneTex, kód. GTX82865; riedenie 1:1000), anti-HNF-1 $\alpha$  (GeneTex, kód. GTX113850: 10001), riedenie 1001 anti GAPDH (GeneTex, cod. GTX100118; riedenie 1:5000), sekundárna anti-myšia protilátka bola od Jackson ImmunoResearch (kód. 115-036-062; riedenie 1:5000) a anti-kráľčia protilátka bola od Jackson ImmunoResearch (cod 113-036-045, riedenie 1:5000).

### **Fluorescenčný test na bunkovú absorpciu LDL**

Bunky Huh7 sa naočkovali na 6-jamkovú tácku (3.105 buniek /jamka v kompletnom médiu) a po 24 hodinách sa ošetrili v médiu MEM/0,4 % FBS. 24 hodín po ošetrení boli bunky premyté PBS a inkubované s 10 ug/ml LDL-DyLight™ 550 v 0,4 % FCS médiu. Po 3 hodinách inkubácie pri 37 ° C boli bunky premyté PBS, oddelené trypsinom a resuspendované v MEM/10 % FBS. Po centrifugácii (4 minúty pri 3500 ot./min.) sa peleta resuspenduje v PBS a každá vzorka sa preniesie do cytofluorometrovej skúmavky. Fluorescencia sa merala pomocou prietokového cytometra (BD FACSAria™ IIIu, DB Life Sciences, San Jose, CA, 95131, USA) pri excitačnej a emisnej vlnovej dĺžke 484 nm.

### **Stanovenie cholesterolu**

Bunky Huh7 sa inkubovali za rovnakých experimentálnych podmienok, aké sú opísané pre analýzu Western blot. Na konci doby inkubácie sa bunkové monovrstvy premyli PBS (fosfátový tlmivý roztok) a inkubovali sa 2 hodiny pri teplote miestnosti s 0,1 M NaOH. Alikvotná časť týchto vzoriek sa použila na stanovenie proteínu (BCA test) a druhá alikvotná časť na analýzu cholesterolu. Celkový obsah cholesterolu v bunkách ošetrených rôznymi zlúčeninami sa meral pomocou kvapalinovej chromatografie spojenej s hmotnostnou spektrometriou so zdrojom chemickej ionizácie pri atmosférickom tlaku (LC-APCI-MS). Systémom na analýzu bol kvapalinový chromatograf Agilent 1260 spojený s hmotnostným spektrometrom Varian MS 500 s analyzátorom iónovej pasce. Na chromatografickú separáciu sa použil Agilent XDB C-18 3,0 x 150 mm (5u). Elúcia sa uskutočnila s použitím zmesi acetonitrilu 87 % metanolu 10 % a vody 0,1 % kyseliny mravčej 3 %, v izokratickom režime počas 15 minút. Spektrá boli získané v rozsahu  $m/z$  350–550. Cholesterol sa detegoval ako  $[M-H_2O + H]^+$  pri  $m/z$  369,5. Kalibračná krivka cholesterolu bola vytvorená v rozsahu 50,0–0,5  $\mu\text{g/ml}$ . Vzorky sa pripravili nasledovne: uskutočnilo sa rozdelenie kvapalina/kvapalina pridaním chloroformu k lyzátom. Vzorky sa vysušili a potom sa zriedili rovnakým objemom chloroformu a nakoniec sa použili na chromatografiu.

## Štatistická analýza

Štatistická analýza sa uskutočnila s použitím balíka štatistických analýz Prism, verzia 8.2.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Keď to bolo možné, hodnoty  $p$  sa stanovili Studentovým  $t$  testom. Inak boli rozdiely medzi liečebnými skupinami hodnotené jednosmernou ANOVA. Hodnota pravdepodobnosti  $p < 0,05$  sa považovala za štatisticky významnú. Experimenty sa uskutočňovali trojmo.

## Výsledky

### Chemická charakterizácia extraktu z kôry bergamotu.

Pomocou HPLC-DAD-MS n analýzy sa identifikovalo celkom 19 zložiek. Z toho bolo zistených 17 zlúčenín zodpovedajúcich derivátom flavonoidov, štyri flavóny a štrnásť flavanónov. Na druhej strane boli identifikované neflavonoidové deriváty, limonoid (nomilín) a furokumarín (bergapten). Z flavonoidov sú najhojnejšie zastúpené hesperetin-7-*O*-neohesperidozid (88,70 mg/g), naringenín-7-*O*-rutinozid (44,78 mg/g) a eriodictyol-7-*O*-neohesperidozid (33,51 mg/g). V značnom množstve sú prítomné aj 3-hydroxy-3-methylglutarylflavanóny, najmä eriodictyol-7-*O*-neohesperidozid-6''-*O*-HMG je 21,12 mg/g a melitidín 19,30 mg/g. Z neflavonoidov je nomilín prítomný v miernom množstve, 0,88 mg/g, a bergapten je prítomný v malom množstve 0,40 mg/g.

### HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> charakterizácia a kvantifikácia BE zložiek.

Prázdna bunka	<i>flavonoidy</i>	Prázdna bunka	Prázdna bunka	Prázdna bunka	Prázdna bunka	Prázdna bunka
<i>retenčný čas</i>	<i>flavóny</i>	<i>[M-H]<sup>-</sup></i>	<i>[M+H]<sup>+</sup></i>	<i>fragmentácia</i>	<i>mg/g</i>	<i>ident.<sup>b</sup></i>
7.7	luteolín-6,8-di- <i>C</i> -glukozid	609		519 489 399 369	2,28 ± 0,05	( Baron a kol., 2021 )
8.2	apigenín-6 – 8-di- <i>C</i> -glukozid <sup>a</sup> (AP-di-glu)	593		503 473 383 353	5,61 ± 0,04	( Baron a kol., 2021 )
8.5	diosmetín-6–8-di- <i>C</i> -glukozid	623		503 413 383	12,19 ± 0,06	( Baron a kol., 2021 )
9,0	luteolín-7- <i>O</i> -neohesperidozid	593		285	3,06 ± 0,06	( Baron a kol., 2021 )
Prázdna bunka	<i>flavanóny</i>					
8.7	eriodictyol-7- <i>O</i> -glukozid (ER-glu)	477		287	5,38 ± 0,05	( Baron a kol., 2021 )
9.4	eriodictyol-7- <i>O</i> -rutinozid	595		477 461 459 417 357 287	2,4 ± 0,02	( Baron a kol., 2021 )
9.8	eriodictyol-7- <i>O</i> -neohesperidozid	595		477 461 459 357 271 235	33,51 ± 0,03	( Baron a kol., 2021 )

Prázdna bunka	<i>flavonoidy</i>	Prázdna bunka	Prázdna bunka	Prázdna bunka	Prázdna bunka	Prázdna bunka
<b>10.0</b>	eriodictyol-7-O-neohesperidozid-6"-O - HMG	739		677 637 595	21,12 ± 0,03	( On a kol., 2018 )
<b>10.5</b>	<b>naringenín-7- O - rutinozid</b> (NA-rut)	579		459 433 417 271	44,78 ± 0,06	( Baron a kol., 2021 )
<b>10.6</b>	<b>naringenín-7- O - glukozid</b> (NA-glu)	433		271	11,78 ± 0,05	( Baron a kol., 2021 )
<b>11.0</b>	<b>hesperetin-7- O - neohesperidozid</b> (HE-neo)		611	575 449 303	88,70 ± 0,10	( Baron a kol., 2021 )
<b>11.1</b>	<b>hesperetin-7- O - glukozid</b> (HE-glu)	463		301	1,88 ± 0,02	( Baron a kol., 2021 )
<b>11.2</b>	<b>melitidín</b> (MEL)	723		621 579 459 271	19,30 ± 0,04	( Baron a kol., 2021 )
<b>11.6</b>	<b>brutieridín</b> (BRU)	753		689 651 609 301	12,28 ± 0,05	( Baron a kol., 2021 )
<b>12.1</b>	hesperetin-7- O -glukozid-6"-O-HMG	607		543 503 463 301	0,78 ± 0,02	( Baron a kol., 2021 )
<b>13.1</b>	<b>eriodictyol</b> (ER)	287			2,79 ± 0,04	( Baron a kol., 2021 )
<b>14.4</b>	<b>naringenín</b> (NA)	271		177 151	4,02 ± 0,03	( Baron a kol., 2021 )
<b>14.9</b>	<b>hesperetin</b> (HE)	301			1,95 ± 0,03	( Baron a kol., 2021 )
Prázdna bunka	<i>neflavonoidy</i>					
Prázdna bunka	<i>limonoidy</i>					
<b>19.6</b>	<b>nomilín</b> (NIE)		515	411 369 187 161	0,88 ± 0,01	std
Prázdna bunka	<i>furokumaríny</i>					
<b>18.1</b>	<b>bergapten</b> (BERG)		217	202 174 146 118 90	0,40 ± 0,01	std

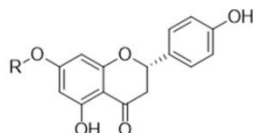
a - zložky označené tučným písmom boli izolované

b - *ident* ., metóda identifikácie: [odkaz] alebo std (štandard).

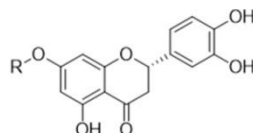
## Izolácia a objasnenie štruktúry flavonoidných a neflavonoidných zložiek z bergamotovej kôry

Rozsiahle chromatografické postupy umožnili izoláciu troch naringenínov, dvoch eriodictyolu, troch derivátov hesperetínu a melitidínu a brutieridínu, dvoch hydroxymetylglutarylesterov. Ďalej sa izoloval jeden di-C-glykozid apigenínu, furokumarín bergapten a limonoid nomilín v dostatočnom množstve (>10 mg) a dobrej čistote (>98 % na základe HPLC testu) na uskutočnenie biologických testov.

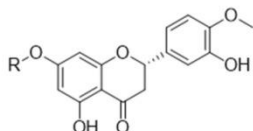
### Štruktúry izolovaných zlúčenín:



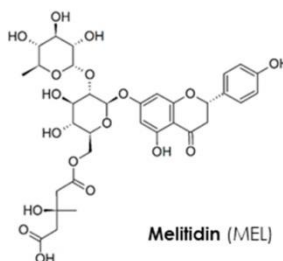
Naringenin (NA) R=H  
Naringenin-7-O-glucoside (NA-glu) R=glucose  
Naringenin-7-O-rutinoside (NA-rut) R=rutinoside



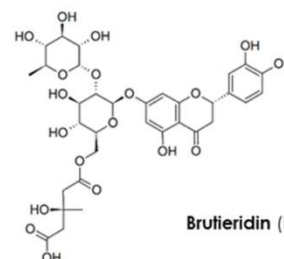
Eriodictyol (ER) R=H  
Eriodictyol-7-O-glucoside (ER-glu) R=glucose



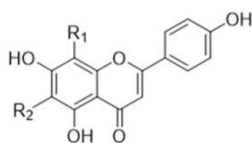
Hesperetin (HE) R=H  
Hesperetin-7-O-glucoside (HE-glu) R= glucose  
Hesperetin-7-O-neohesperidoside (HE-Neo) R=neohesperidoside



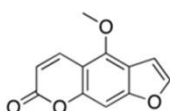
Melitidin (MEL)



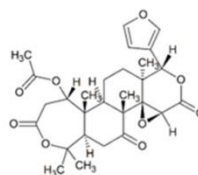
Brutieridin (BRU)



Apigenin-6,8-di-C-glucoside (AP-di-glu)  
R1, R2= glucose



Bergapten (BERG)



Nomilín (NOM)



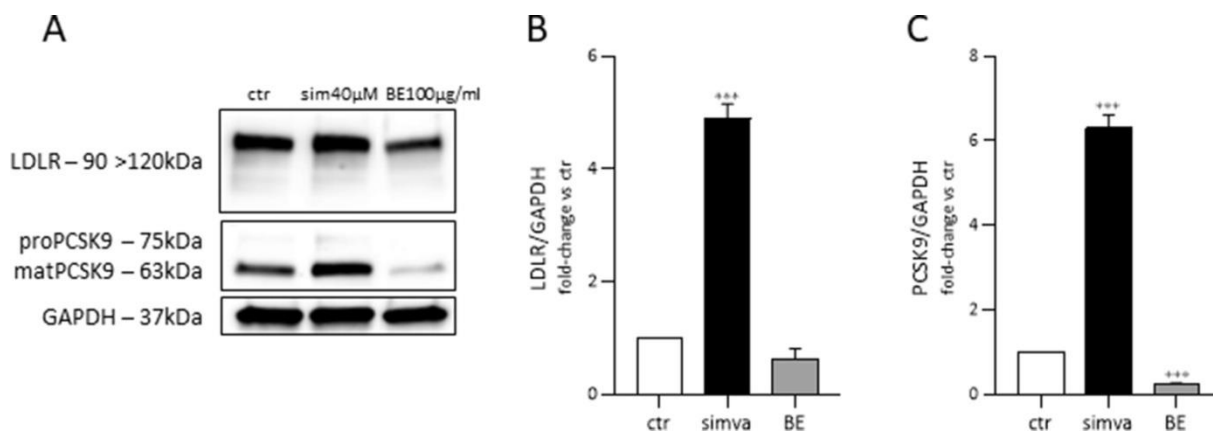
Bergamot peel extract (BE)

Chemické štruktúry izolovaných zlúčenín z BE. Trieda flavanónov zahŕňa NA, NA-glu, NA-rut, ER, ER-glu, HE, HE-glu, HE-Neo, MEL, BRU; trieda flavónov zahŕňa AP-di-glu; trieda neflavonoidov zahŕňa BERG, NOM.

### Extrakt z kôry bergamotu zvyšuje pomer LDLR/PCSK9

Netoxická koncentrácia (stanovená analýzou SRB) 100 ug/ml extraktu z bergamotu bola testovaná na bunkovej línii ľudského hepatómu HuH7 a jej účinok sa porovnával so simvastatínom 40 uM, známym pozitívnym modulátorom LDLR aj PCSK9. Po 24 hodinách inkubácie bola expresia LDLR mierne a nie významne znížená v porovnaní s kontrolou ( $p = 0,1$ ), naopak, ako sa pozorovalo pri simvastatíne (+4,9-násobok,  $p = 0,001$ ). Na druhej strane, extrakt z kôry bergamotu spôsobil významný pokles hladín proteínu PCSK9 v porovnaní s kontrolou (-74 %,  $p = 6,15E-06$ ), pričom vykazoval opačné správanie oproti simvastatínu (+6-násobok oproti ctr,  $p = 0,0008$ ). Tieto výsledky teda demonštrujú čistý priaznivý pomer LDLR/PCSK9 v bunkách ošetrovaných extraktom bergamotu v porovnaní s kontrolnými bunkami.





Účinok BE na expresiu LDLR a PCSK9 v ľudskej bunkovej línii HuH7. Bunky sa inkubovali so simvastatínom 40  $\mu$ M alebo extraktom z kôry bergamotu 100  $\mu$ g/ml počas 24 hodín.

A. Reprézentaívna analýza westernovým prenosom na expresiu LDLR a PCSK9 po ošetrovaniach. GAPDH sa použil ako kontrola zaťaženia;

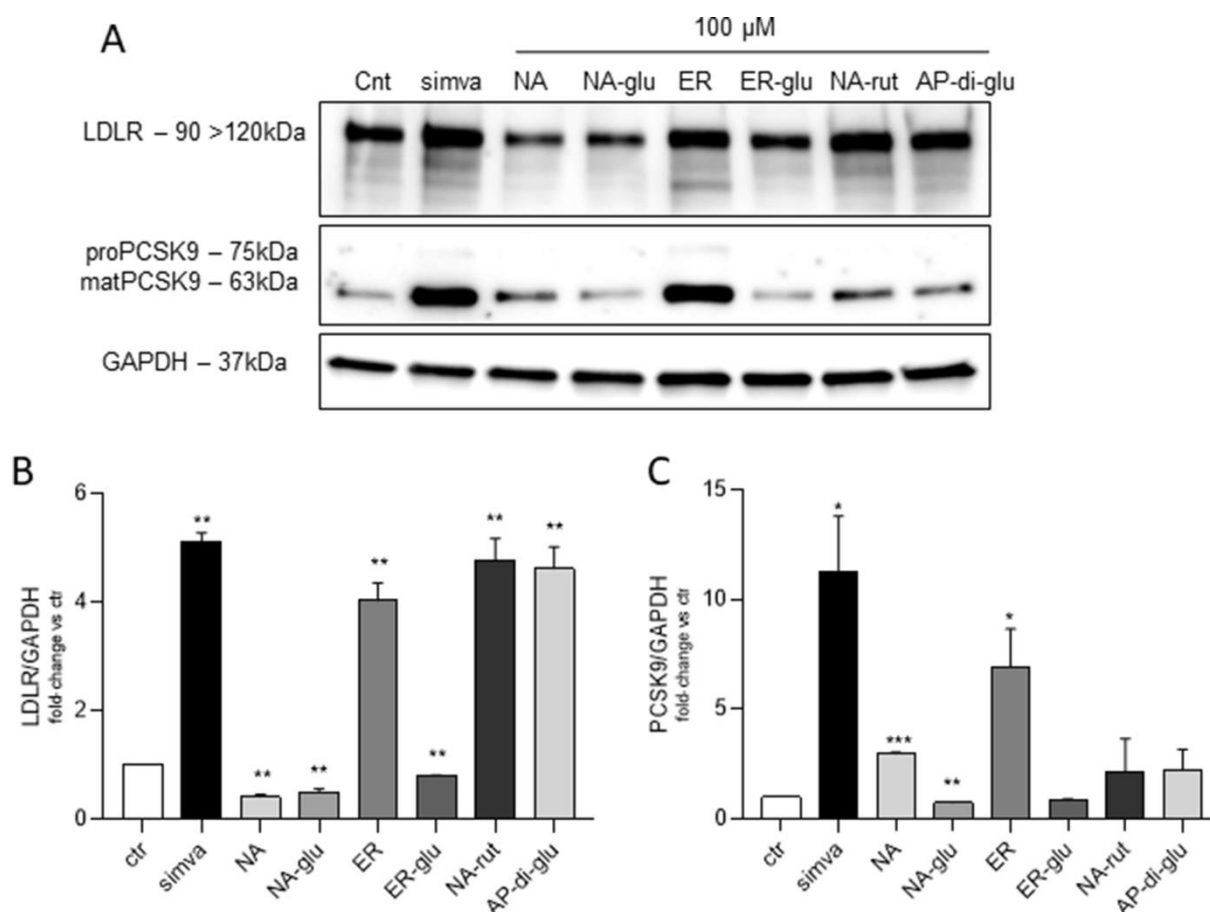
B. Denzitometrická analýza pomeru LDLR/GAPDH;

C. Denzitometrická analýza pomeru PCSK9/GAPDH.

Údaje sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD z troch nezávislých experimentov. \*\*\*  $p < 0,001$  vs kontrola podľa Studentovho T-testu. Ctr: kontrola; simva: simvastatín; BE: extrakt z bergamotovej kôry; LDLR: receptor lipoproteínov s nízkou hustotou; proPCSK9: nezrelá proteín konvertáza subtilizín/kexín typu 9; matPCSK9: zrelý PCSK9; GAPDH: glyceraldheydefosfátdehydrogenáza.

### Flavanóny a flavóny izolované z bergamotového extraktu rozdielne ovplyvňujú expresiu LDLR a PCSK9 v bunke HuH7

Aglykón a glykozylátové flavanóny izolované z bergamotovej šupky boli testované na HuH7 bunkách počas 24 hodín v netoxickej koncentrácii a ich účinok na expresiu LDLR a PCSK9 proteínu bol porovnaný s aktivitou simvastatínu 40  $\mu$ M. na rovnakých cieľoch (LDLR: +5-násobok,  $p < 0,001$  vs ctr; PCSK9: +11-násobok,  $p < 0,05$  vs ctr). Naringenín-7- *O* -glukozid (NA-glu) spôsobil 0,5-násobný pokles expresie LDLR v porovnaní s kontrolou ( $p < 0,01$ ) a podobný účinok sa pozoroval aj u jeho aglykónového náprotivku, naringenínu (NA), (-0,58-násobok,  $p < 0,01$  vs ctr) zatiaľ čo sa zdá, že majú opačný účinok na expresiu PCSK9, pričom NA, ktorá vyvolala pozitívnu indukciu (+3-násobok,  $p < 0,001$  vs ctr), zatiaľ čo NA-glu stanovil miernu inhibíciu v porovnaní s kontrolou (-25 %,  $p < 0,01$ ).

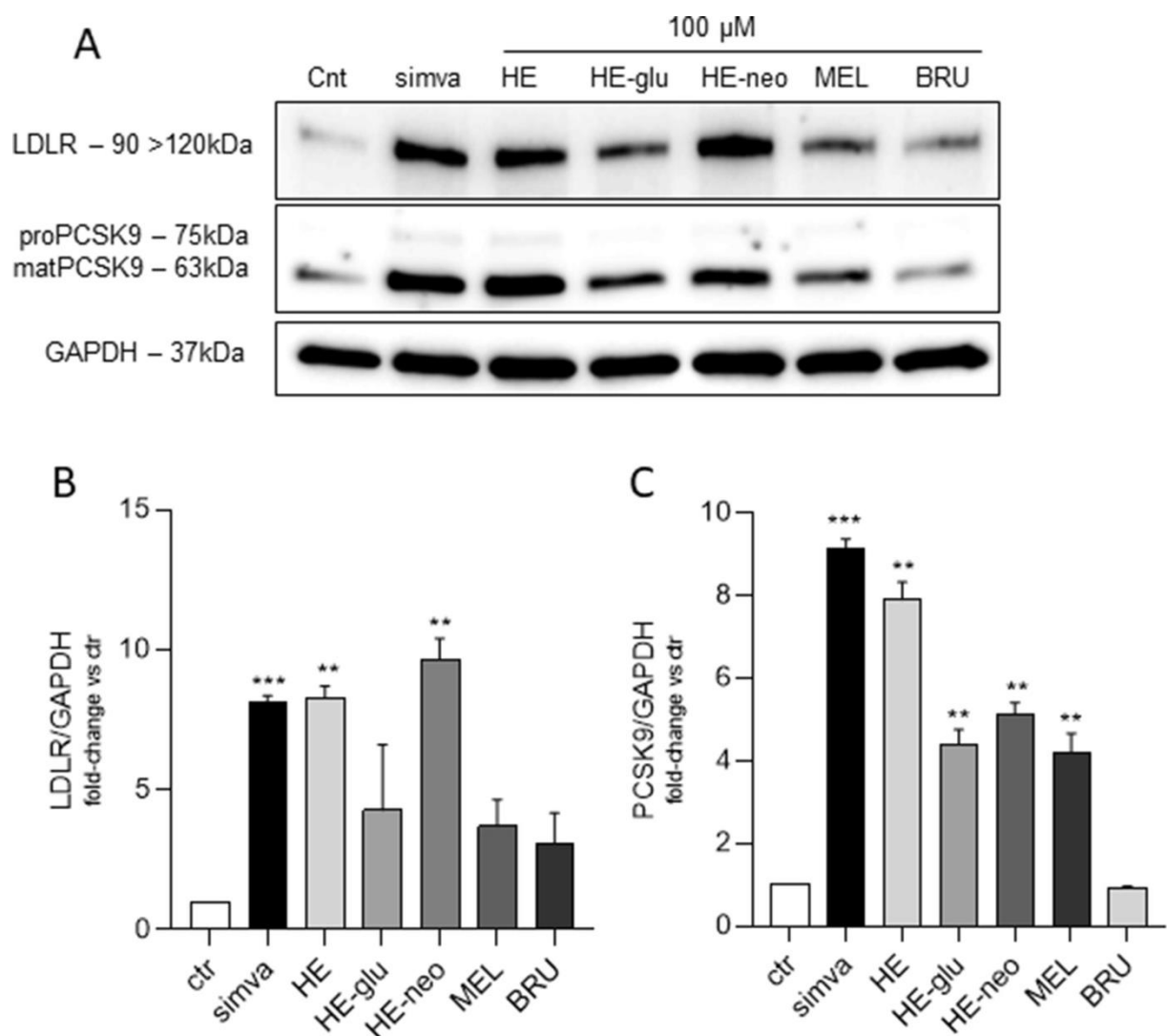


Aktivita BE flavanónov a flavónov na expresiu LDLR a PCSK9 v ľudskej bunkovej línii HuH7 – časť I. Bunky boli inkubované so simvastatínom 40  $\mu$ M alebo 100  $\mu$ M flavanónov alebo flavónov izolovaných z extraktu bergamotu počas 24 hodín. ER a ER-glu sa použili pri 12,5  $\mu$ M a 25  $\mu$ M, v danom poradí. A. Reprerzentatívna analýza westernovým prenosom na expresiu LDLR a PCSK9 po ošetrovaniach. GAPDH sa použil ako kontrola zaťaženia; B. Denzitometrická analýza pomeru LDLR/GAPDH; C. Denzitometrická analýza pomeru PCSK9/GAPDH. Údaje sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD z troch nezávislých experimentov. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  oproti kontrole podľa Studentovho T-testu. Ctr: kontrola; simva: simvastatín; NA: naringenín; NA-glu: naringenín-7- O -glukozid; ER: eriodictyol; ER-glu: eriodictyol-7-0 -glukozid ; NA-rut: Naringenín-7- O -rutinozid; AP-di-glu: apigenín-6,8-C-glykozid; LDLR: receptor lipoproteínov s nízkou hustotou; proPCSK9: nezrelá proteín konvertáza subtilizín/kexín typu 9; matPCSK9: zrelý PCSK9; GAPDH: glyceraldheydefosfátdehydrogenáza.

Eriodictyol (ER) silne zvýšil expresiu LDLR (+4-krát,  $p < 0,01$ ) a PCSK9 (+7-krát,  $p < 0,05$ ) v porovnaní s kontrolou, čím sa ukázalo správanie podobné statínu . Na druhej strane jeho glukozid, eriodictyol-7- O -glukozid (ER-glu), nevyvolal žiadnu významnú zmenu na LDLR ani na hladinách proteínu PCSK9 v porovnaní s kontrolou. Za zmienku však stojí opačný spôsob pôsobenia ER a ER-glu na PCSK9 Inkubácia s naringenínom-7- O - rutinozidom (NARI), tiež známym ako narirutin, spôsobila 4,8-násobné zvýšenie expresie LDLR a 2-násobné zvýšenie PCSK9 hladiny proteínu v porovnaní s kontrolou), vykazujúce odlišné správanie v porovnaní s jeho aglykónom, naringenínom a naringenínom-7-0 - glukozidom (NA-glu) Podobnú aktivitu preukázal apigenín-6,8-di-C-glukozid (AP-di-glu), ktorý v porovnaní s kontrolou vykazuje signifikantnú + 4,6-násobnú zmenu v expresii LDLR ( $p < 0,01$ ) a 2,2-násobné zvýšenie intracelulárnych hladín PCSK9.

Hesperetin (HE) a jeho glykozylované deriváty hesperetin-7-*O*-glukozid (alebo hesperidín) (HE-glu) a hesperetín-7-*O*-neohesperidozid (Neohesperidín) (HE-Neo) boli izolované a úspešne testované na netoxickom koncentrácii 100  $\mu$ M.

HE je 4'-metoxy derivát ER a významne indukuje hladiny proteínu LDLR (+8,3-násobok,  $p < 0,01$  vs. ctr) a PCSK9 (+7,89-násobok zmeny v porovnaní s ctr,  $p < 0,01$ ) podobne ako ER. Pridanie neohesperidózového cukru k HE v polohe 7-*O* (HE-Neo) stimulovalo viac expresiu proteínu LDLR ako HE (+9,7-násobok,  $p < 0,01$  vs ctr), ale s nižšou účinnosťou v porovnaní s HE na PCSK9 hladiny (+5,11-násobná zmena oproti ctr,  $p < 0,01$ ). Okrem toho 7-*O* glykozylácia HE (HE-glu) vyvolala správanie podobné statínu zvýšením LDLR (+4,27-násobok oproti ctr) a PCSK9 (+4,41-násobok oproti ctr,  $p < 0,01$ ) proteínov. v porovnaní s kontrolou, aj keď v menšom rozsahu v porovnaní s HE, HE-Neo a simvastatínom (LDLR: +8,12-násobok oproti ctr,  $p < 0,001$ ; PCSK9: +9,12-násobok oproti ctr,  $p < 0,001$ ).



*Aktivita BE flavanónov na expresiu LDLR a PCSK9 v ľudskej bunkovej línii HuH7 – časť II. Bunky sa inkubovali so simvastatínom 40  $\mu$ M alebo 100  $\mu$ M flavanónov izolovaných z bergamotového extraktu počas 24 hodín. A. Repräsentatívna analýza westernovým prenosom na expresiu LDLR a PCSK9 po ošetreniach. GAPDH sa použil ako kontrola zaťaženia; B. Denzitometrická analýza pomeru LDLR/GAPDH; C. Denzitometrická analýza pomeru*

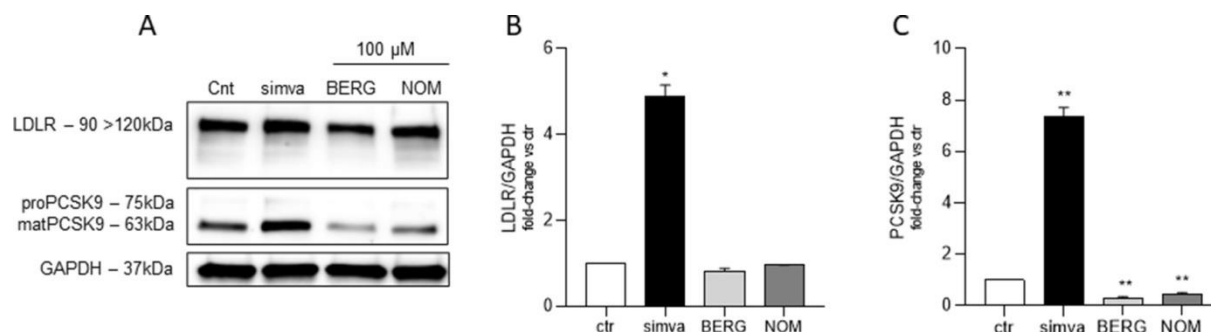
*PCSK9/GAPDH*. Údaje sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD z troch nezávislých experimentov.  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  vs kontrola podľa Studentovho T-testu. Ctr: kontrola; simva: simvastatín; ON: hesperetin; HE-glu: hesperetin-7-O-glukozid; HE-Neo: hesperetin-7-O-neohesperidozid; MEL: melitidín; BRU: brutieridín; LDLR: receptor lipoproteínov s nízkou hustotou; proPCSK9: nezrelá proteín konvertáza subtilizín/kexín typu 9; matPCSK9: zrelý PCSK9;

GAPDH: glyceraldheydefosfátdehydrogenáza.

Melitidín (MEL) a brutieridín (BRU) sú flavanónové diglykozidy NA a HE nesú časť kyseliny 3-hydroxy-3-metylglutarovej (HMG) V skutočnosti obaja vykazovali správanie podobné statínom. MEL produkoval +3,7-násobné zvýšenie LDLR a +4,32-násobnú zmenu v hladinách expresie PCSK9 ( $p < 0,05$ ) oproti kontrole a BRU stimuloval expresiu LDLR +3,1-násobne v porovnaní s kontrolou pričom nebol pozorovaný žiadny účinok na hladiny PCSK9.

### Neflavonoidové zlúčeniny izolované z bergamotového extraktu znižujú expresiu PCSK9 v bunke HuH7

Z extraktu bergamotu boli izolované dve neflavonoidové zlúčeniny, a to bergapten (BERG), patriaci do rodiny furanokumarínov, a nomilín (NOM), limonoid (tj vysoko okysličený triterpén). V porovnaní so simvastatínom 40  $\mu$ M, ktorý silne stimuloval LDLR (+4,9-násobok,  $p < 0,01$  vs ctr) a PCSK9 (+7,34-násobok,  $p < 0,01$  vs ctr), ako sa očakávalo, BERG a NOM spôsobili významný pokles intracelulárnych hladín PCSK9 (-30 %,  $p < 0,01$ ; -53 %,  $p < 0,01$ , v tomto poradí), ale žiadne účinky na LDLR, čím sa pomer LDLR/PCSK9 vyvažuje v prospech LDLR.



*Aktivita BE neflavonoidov na expresiu LDLR a PCSK9 v ľudskej bunkovej línii HuH7 – časť III. Bunky sa inkubovali so simvastatínom 40  $\mu$ M alebo 100  $\mu$ M neflavonoidov izolovaných z bergamotového extraktu počas 24 hodín. A. Reprezentatívna analýza westernovým prenosom na expresiu LDLR a PCSK9 po ošetreniach. GAPDH sa použil ako kontrola zaťaženia; B. Densitometrická analýza pomeru LDLR/GAPDH; C. Densitometrická analýza pomeru PCSK9/GAPDH. Údaje sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD z troch nezávislých experimentov.  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  vs kontrola podľa Studentovho T-testu. Ctr: kontrola; simva: simvastatín; BERG: bergapten; NOM: nomilín; proPCSK9: nezrelá proproteínkonvertáza subtilizín/kexín typu 9; matPCSK9: zrelý PCSK9;*

Náš *in vitro* prístup bol zameraný na identifikáciu možných zložiek bergamotu s hypocholesterolemickým účinkom. Prediktívny účinok na znižovanie lipidov určite súvisí s hladinami expresie LDLR, pomocou ktorých všetky rôzne triedy liekov pôsobia na kontrolu hladín LDL cholesterolu, vrátane statínov. Na druhej strane, a na rozdiel od statínov, inhibičný účinok na hladiny PCSK9 by tiež predpovedal hypocholesterolemický účinok a

súčasne by tento účinok mohol byť prospešný ako synergista k účinku statínu. Z tohto dôvodu boli účinky na dve dráhy vyjadrené ako pomer LDLR/PCSK9 a porovnané s referenčným liekom simvastatínom.

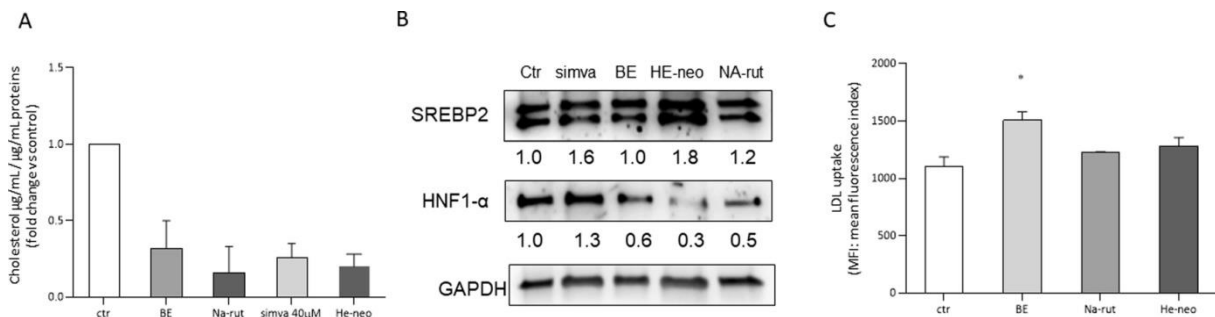
Pomer hladín expresie LDLR/PCSK9 po inkubácii s uvedenými zlúčeninami. Cont: kontrola; Simva: simvastatín; BE: extrakt z bergamotovej kôry; NA: naringenín; NA-glu: naringenín-7-*O*-glukozid; NA-rut: naringenín-7-*O*-rutinozid; ER: eriodictyol; ER-glu: eriodictyol-7-*O*-glukozid; AP-di-glu: apigenín-6,8-*C*-glykozid; ON: hesperetin; HE-glu: hesperetin-7-*O*-glukozid; HE-Neo: hesperetin-7-*O*-neohesperidozid; MEL: melitidín; BRU: brutieridin; BERG: bergapten; NOM: nomilín. \**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001 oproti kontrole.

Ukážka	Pomer LDLR/PCSK9	<i>P</i> vs
<i>Pokr</i>	1,00 ± 0,00	
<i>Simva</i>	0,67 ± 0,21	*
<i>BE</i>	2,44 ± 0,68	ns
<i>NA</i>	0,14 ± 0,01	***
<i>NA-glu</i>	0,69 ± 0,09	*
<i>NA-rút</i>	3,11 ± 2,42	ns
<i>ER</i>	0,59 ± 0,10	*
<i>ER-glu</i>	0,98 ± 0,08	ns
<i>AP-di-glu</i>	2,35 ± 1,20	ns
<i>ON</i>	1,05 ± 0,01	*
<i>HE-glu</i>	0,95 ± 0,46	ns
<i>HE-neo</i>	1,89 ± 0,04	***
<i>MEL</i>	0,89 ± 0,32	ns
<i>BRU</i>	3,40 ± 1,38	ns
<i>BERG</i>	2,77 ± 0,27	ns
<i>ŽIADNE M</i>	2,04 ± 0,19	*

Porovnanie flavanónu odhalilo, že vo všeobecnosti glykozylácia zlepšuje pomer LDLR/PCSK9, najmä pre naringenín a eriodictyol, zatiaľ čo u hesperetínu sa to pozoruje iba pri neohesperidóze. Na druhej strane, malé zmeny v štruktúre flavanónu sa zdajú byť kritické pre tento index selektivity a hesperetín a deriváty vykazujú hodnoty selektivity okolo 1. Na hore uvedenej tabuľke môžeme vidieť ako umožňuje stanoviť rozdielnú aktivitu derivátov v porovnaní so simvastatínom, ako je brutieridín a naringenín -7-*O*-rutinozid, ktorý má hodnoty >3.

### Účinok extraktu bergamotovej kôry, Na-rut a He-neo na intracelulárne hladiny cholesterolu a expresiu SREBP2, HNF-1 $\alpha$

Aby sme začali skúmať mechanizmus účinku BE a najúčinnějších izolovaných zlúčenín, určili sme intracelulárne hladiny cholesterolu buniek Huh7 po 72 hodinách inkubácie s BE, Na-rut a He-neo. Ako sa očakávalo, simvastatín výrazne znížil intracelulárne hladiny cholesterolu o viac ako 80 %. Podobný účinok bol tiež pozorovaný po inkubácii s BE, Na-rut a He-neo. Zníženie intracelulárnych sterolov v reakcii na simvastatín a He-neo bolo spojené so zvýšenou expresiou aktivovanej formy SREBP2. Najmä hladiny SREBP2 sa zvýšili 1,6-násobne a 1,8-násobne po simvastatíne a He-neo buniek Huh7. Menší účinok bol pozorovaný pri Na-rut a žiadny účinok pri BE. Avšak BE a jeho aktívne zložky sa správali odlišne od simvastatínu tým, že silne potláčali expresiu HNF1-a kľúčový transkripčný regulátor expresie PCSK9 (Shende et al., 2015). Je zaujímavé, že iba BE bol schopný významne zvýšiť absorpciu LDL-DyLight™ 550 bunkami Huh7, čo naznačuje potenciálny účinok na znižovanie lipidov.



Účinok BE, Na-rut a He-neo na intracelulárny cholesterol, expresiu SREBP2 a HNF1-a a vychytávanie LDL v bunkovej línii Huh7. Bunky sa inkubovali v MEM/0,4 % FCS so simvastatínom 40  $\mu$ M alebo v prítomnosti alebo neprítomnosti BE (100  $\mu$ g/ml) alebo izolovaných zlúčenín (100  $\mu$ M). A) Po 24 hodinách sa extrahovali celkové lipidy a hladiny cholesterolu sa stanovili analýzou hmotnostnou spektrometriou. Tieto hodnoty boli normalizované koncentraciami bunkových proteínov. Každý stĺpec predstavuje priemer  $\pm$  SD troch nezávislých stanovení. B) Repräsentatívna analýza westernovým prenosom na expresiu SREBP2 a HNF1-a po 24-hodinovom ošetrení. GAPDH sa použil ako kontrola zaťaženia; C) Po 24 hodinách inkubácie s BE, Na-rut a He-neo boli bunky inkubované s 10  $\mu$ g/ml LDL-DyLight a intenzita fluorescencie (MFI: stredný fluorescenčný index) bola stanovená analýzou prietokovou cytometriou po 3 hodinách inkubácie. Údaje sú uvedené ako priemer  $\pm$  SD z troch stanovení. Rozdiely medzi ošetreniami boli hodnotené Studentovým t testom. \* $p$  < 0,05 oproti kontrole. Ctr: kontrola; simva: simvastatín; BE: extrakt z bergamotovej kôry; Na-rut: Naringenín-7-*O*-rutinozid; HE-Neo: hesperetin-7-*O*-neohesperidozid.

## Diskusia

Bergamotové šupky sú bohatým zdrojom bioaktívnych zložiek, najmä derivátov flavonoidov (flavanóny a flavóny), limonoidov a furokumarínov, ktoré sú vysoko koncentrované (Mandalari et al., 2006, Russo et al., 2016). Hoci hypolipidemická aktivita derivátov bergamotového flavonoidu (Cho et al., 2011, Choe et al., 2001) a extraktov (Lamiquiz-Moneo et al., 2020, Miceli et al., 2007; V. Mollace et al., 201) bolo hlásené, že zahrnutý molekulárny mechanizmus je potrebné ďalej objasniť. Vzhľadom na to môže byť skúmanie účinkov extraktu bergamotovej kôry a izolovaných zlúčenín z bergamotovej kôry na dvoch kľúčových hráčov homeostázy cholesterolu, LDLR a PCSK9, platným *in vitro* testom na predpovedanie potenciálnej hypocholesterolemieckej aktivity.

Na rozdiel od predchádzajúcich článkov sme tu testovali naraz účinky 13 izolovaných zložiek z bergamotových šupiek a extraktu z bergamotovej šupky na *in vitro* bunkovú líniu HuH7 za rovnakých experimentálnych podmienok (24 hodín inkubácie, MEM s 0,4 % FBS). Okrem toho žiadne štúdie neuviedli experimenty testujúce súčasne účinky zložiek alebo extraktov bergamotu na LDLR aj PCSK9. V súvislosti s tým sa v literatúre uvádza zvýšená regulácia hladín LDLR na dosiahnutie hypolipidemických vlastností (Luo, Yang, & Song, 2020). Okrem toho, na rozdiel od statínov a niekoľkých tried liekov, sú účinky na zníženie cholesterolu dané aj poklesom hladín PCSK9 (Adorni et al., 2020, Luo et al., 2020, Seidah et al., 2017). Z tohto dôvodu bol v tejto práci pomer LDLR/PCSK9 použitý na vyjadrenie účinkov zlúčenín bergamotu a extraktu z kôry na dva kľúčové mediátory metabolizmu cholesterolu. Okrem toho môže byť táto hodnota užitočná na porovnanie aktivity referenčného terapeutického liečiva, simvastatínu, s novými potenciálnymi hypocholesterolemickými činidlami a všeobecnejšie na vyhodnotenie potenciálneho synergického účinku zložiek a bergamotového extraktu s aktivitou statínov. V tejto súvislosti literatúra preukázala zvýšené účinky kombinácie nutraceutík so simvastatínom u pacientov s ischemickou chorobou srdca (Campolongo et al., 2016). Okrem toho, potenciálne hypolipidemické účinky extraktov z bergamotovej kôry neboli doteraz skúmané, hoci extrakty z dužiny boli rozsiahle študované (Lamiquiz-Moneo et al., 2019, Miceli et al., 2007; V. Mollace et al., 2019).

V tejto štúdii sme izolovali desať flavanónov (sedem glykozylátov a tri aglykóny) a jeden glykozylovaný flavón. Z nich päť preukázalo významnú indukciu LDLR, tj naringenín-7-0-rutinozid, eriodiktyol, apigenín-6,8-*C*-glykozid, hesperetin a hesperetin-7-0-neohesperidozid. Avšak eriodictyol, hesperetin a hesperetin-7-0-neohesperidozid indukovali expresiu PCSK9, čo je účinok podobný simvastatínu.

Podrobnejšie sme pozorovali, že hesperetin-7-*O*-neohesperidozid a menej silne naringenín-7-*O*-rutinozid indukovali expresiu SREBP2, hlavného transkripčného faktora podieľajúceho sa na regulácii LDLR a významne znížili hladiny intracelulárnych sterolov. Tieto účinky boli podobné ako pri simvastatíne, čo naznačuje možné poškodenie syntézy cholesterolu. Obe zlúčeniny však silne ovplyvnili HNF1-a, ktorý sa namiesto toho podieľa hlavne na expresii PCSK9. Konečná rovnováha medzi týmito dvoma transkripčnými faktormi mohla určiť rozdielny účinok hesperetin-7-0-neohesperidozidu a naringenínu-7-0-rutinozidu na LDLR a PCSK9. Naopak, BE nezmenila dráhu SREBP2, ale silne znížila expresiu HNF1-a, čím poskytla možné vysvetlenie jeho inhibičného účinku na PCSK9.

Ak vezmeme do úvahy iba zlúčeniny, ktoré selektívnejšie vyvolávajú LDLR, zdá sa, že ich glykozylácia je príliš potrebná pre ich aktivitu v porovnaní s ich aglykónovými náprotivkami. V tomto smere viaceré štúdie preukázali vyššiu stabilitu glykozylovaných flavonoidov v porovnaní s aglykónmi. Kvercetín 3-*O*-ramnosylglukozid (rutín) vykazoval vyššiu stabilitu vo vodnom roztoku (100 °C vo vodnom modelovom systéme) (Buchner, Krumbein, Rohn, & Kroh, 2006), za oxidačných podmienok (fosfátový pufor, pri pH 8,0, prebublávanie vzduchu

do roztoku) a pri oxidatívnej degradácii (prídavok  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$ ) ( Makris & Rossiter, 2000 ) v porovnaní s kvercetínom. Na druhej strane sa ukázalo, že glykozylácia zlepšuje stabilitu flavonoidov pri inkubácii v Dulbeccovom modifikovanom Eaglovom médiu (DMEM) pri 37 °C ( Al-Sharea et al., 2016 ). Ďalej sa preukázalo, že konjugácia cukrov môže zvýšiť rozpustnosť liečiv a môže zlepšiť absorpciu *in vitro* ( Fernandez et al., 2000 ).

Bez ohľadu na úlohu glykozylácie sú najslubnejšie zlúčeniny, ktoré sme identifikovali s potenciálnym adjuvantným účinkom so statínmi, ako sú tie, ktoré nemenia expresiu PCSK9, naringenín-7-*O*-rutinozid a apigenín-6,8-*C*-glukozid .

Naopak, hesperetin, hesperetin-7-*O*-glukozid, hesperetin-7-*O*-neohesperidozid významne indukovali expresiu proteínu LDLR aj PCSK9, čím sa prejavili účinky podobné statínu. Z tohto dôvodu je pomer LDLR/PCSK9 nižší ako u iných zložiek a extraktu a je podobný simvastatínu. Tieto flavanóny majú hydroxylovú substitúciu, ktorá zrejme významne mení účinok na naše biologické ciele, t.j. LDLR a PCSK9. Predchádzajúce štúdie naznačujú, že *O*-metylácia metabolicky stabilizuje flavonoidy, okrem toho, že zvyšuje ich *in vitro* biologickú dostupnosť a distribúciu v tkanivách ( Banach et al., 2018 , Xiao a Hogger, 2015 ). Navyše metabolická stabilita pečene a črevná absorpcia sú priaznivejšie v metylovaných polyfenoloch ako v nemetylovaných polyfenoloch ( Wen & Walle, 2006 ). Aj keď tieto zložky vykazovali nižší pomer LDLR/PCSK9 ako ostatné, môžu byť užitočné ako látky podobné statínom.

Brutieridín, diglykozid hesperetínu, nesúci časť kyseliny 3-hydroxy-3-metylglutarovej (HMG), vykazoval nevýznamný účinok na hladiny LDLR a PCSK9. Zdá sa, že naše výsledky sú v rozpore s predchádzajúcimi štúdiami, kde *in vivo* liečby s frakciou obohatenou 3-hydroxy-3-metylglutarylflavanónmi (62 % brutieridínu) viedli k zvýšeniu LDLR, HMGR (3-hydroxy-3-metylglutaryl -koenzým A reductáza) a expresia mRNA a proteínov FASN (syntáza mastných kyselín) vzhľadom na hypercholesterolemickú skupinu ( Di Donna et al., 2014 ). Najrozumnejšie vysvetlenie nedostatku účinku v našom *in vitro* systéme by mohlo súvisieť s nízkou bunkovou biologickou dostupnosťou v dôsledku jeho vysokej hydrofilnosti, podobne ako u statínov ( Corsini, Raiteri, Soma, Fumagalli a Paoletti, 1991 ).

Nakoniec eriodictyol, neo -metylovaný flavanónový aglykón, vykazoval silný účinok podobný statínu s významnou indukciou LDLR aj PCSK9. Okrem flavanónov a flavónov sme izolovali dve neflavonoidové zlúčeniny, a to bergapten a nomilín. Bergapten, najprv izolovaný z bergamotového esenciálneho oleja, bol široko spájaný s mnohými biologickými účinkami, vrátane modulácie LDLR v bunkách HepG2 ( Pattanayak, Bose, Sunita, Siddique a Lapenna, 2018 ). Pattanayak et al pozorovali pokles LDLR prostredníctvom LXR-sprostredkovaného zvýšenia hladín IDOL (indukovateľný degradátor LDLR), známeho modulátora LDLR, teda predpokladajú úlohu bergapténu pri liečbe preťaženia cholesterolom pri hepatocelulárnom karcinóme. Tieto pozorované rozdiely môžu byť pravdepodobne spôsobené bunkovou líniou použitou v týchto štúdiách, ako aj experimentálnymi podmienkami *in vitro* . Okrem toho sme tu prvýkrát preukázali, že bergapten významne znižuje hladiny PCSK9, čím sa pomer LDLR/PCSK9 (2,77) zvyšuje v prospech LDLR, čo naznačuje možný aditívny účinok so statínmi. Avšak vzhľadom na známu fototoxicitu bergapténu táto zlúčenina nie je prvou voľbou pre potenciálne použitie ako činidlo znižujúce hladinu cholesterolu (Y. Liang et al., 2021 ).

Nomilín je typický limonoid *citrusových* druhov, ktorý preukázal hypoglykemický účinok a zlepšil glukózovú toleranciu u myší kŕmených diétou s vysokým obsahom tukov ( Ono, Inoue, Hashidume, Shimizu, & Sato, 2011 ), spolu s trendom poklesu triglyceridov. V tejto práci sme pridali pohľad na hypolipidemickú aktivitu nomilínu, čo ukazuje veľmi účinný inhibičný účinok na PCSK9, zatiaľ čo žiadne evidentné účinky na hladiny LDLR. Pomer nomilín LDLR/PCSK9 bol 2,04, čo z neho robí cenného synergistu k účinku statínov. Tento dôkaz vydláždil cestu k ďalším výskumom *in vivo* hypocholesterolemických účinkov nomilínu.



Okrem tohto dôkazu neboli šupky bergamotu ešte skúmané na potenciálne hypocholesterolemické účinky. Naše výsledky ukázali, že extrakt z bergamotovej kôry významne znížil expresiu PCSK9 a čo je dôležitejšie, zvýšil vychytávanie LDL bunkami Huh7, čím podporili jeho použitie na liečbu hypercholesterolémie s potenciálnym adjuvantným účinkom na statíny.

**Na záver, na základe našich údajov môžeme zaradiť extrakt z kôry *Citrus bergamia* a jeho zložky ako dobrých kandidátov na vývoj nových látok znižujúcich cholesterol na prevenciu miernej hypercholesterolémie.**

Najmä najslubnejšie zlúčeniny pôsobiace ako potenciálny adjuvantný účinok so statínmi sú naringenín-7-*O*-rutinozid a apigenín-6,8-*C*-glukozid, zatiaľ čo hesperetin a jeho deriváty, menovite hesperetin-7-*O*-glukozid, hesperetin-7-*O*-neohesperidozid a eriodictyol preukázali významný účinok podobný statínu, čím sa zaradili medzi potenciálne prírodné látky na riadenie homeostázy cholesterolu. Nakoniec tu bol najprv skúmaný extrakt z kôry bergamotu pre svoje potenciálne hypolipidemické účinky a preukázal potenciálny adjuvantný účinok na statíny.

Uznávame, že naša analýza *in vitro* nemôže predpovedať účinok v štúdií *in vivo*. Naš záver, že extrakt z bergamotovej kôry môže zlepšiť hypolipidemický účinok statínov, musí byť teda potvrdený v klinickom prostredí.

Zdroj:

Irene Ferrarese, Maria Giovanna Lupo, Ilaria Rossi, Stefania Sut, Francesca Loschi, Pietro Allegrini, Antonella Riv, Nicola Ferri, Stefano Dall'Acqua

**Bergamot (*Citrus bergamia*) peel extract as new hypocholesterolemic agent modulating PCSK9 expression**

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464623003249>