

Naturalne inhibitory PCSK9 — przegląd substancji o możliwym wpływie na PCSK9

Natural inhibitors of PCSK9: a review of substances with a possible effect on PCSK9

Stanisław Surma^{1, 2} , Krzysztof J. Filipiak³ 

¹Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

²Klub Młodych Hipertensjologów, Polskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego

³Uczelnia Medyczna im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

STRESZCZENIE

Proteinowa konwertaza subtilizyny/kexiny typu 9 (PCSK9) jest białkiem odkrytym w 2003 roku i pełniącym istotną rolę w metabolizmie lipoprotein. Główną funkcją PCSK9 jest regulacja liczby receptorów dla lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) na powierzchni hepatocytów. Efektem biologicznym PCSK9 jest zmniejszenie liczby receptorów LDL na powierzchni hepatocytów, co ogranicza ich zdolność do wychwytywania lipoprotein LDL. Inhibitory PCSK9, takie jak alirokumab, ewolokumab czy inklisiran, stanowią nową, bardzo skuteczną metodę terapii hipolipemizującej. W ostatnim czasie zidentyfikowano szereg związków pochodzenia naturalnego, które charakteryzują się zdolnością do zmniejszania aktywności PCSK9. Związki te należą do alkaloidów, polifenoli, steroli, stanoli, białek występujących w warzywach oraz innych składników odżywczych i mogą znaleźć zastosowanie we wspomaganiu farmakoterapii zaburzeń lipidowych.

Choroby Serca i Naczyń 2021, 18 (2), 60–76

Słowa kluczowe: inhibitory PCSK9 pochodzenia naturalnego, choroby układu krążenia

ABSTRACT

Protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is a protein discovered in 2003 and playing an important role in lipoprotein metabolism. The main function of PCSK9 is to regulate the number of low-density lipoprotein (LDL) receptors on the surface of hepatocytes. The biological effect of PCSK9 is to reduce the number of LDL receptors on the surface of hepatocytes, which reduces their ability to take up LDL lipoproteins. PCSK9 inhibitors such as alirocumab, evolocumab or inclisiran are a new, very effective method of lipid-lowering therapy. Recently, a number of naturally derived compounds have been identified that are characterized by the ability to reduce the activity of PCSK9. These compounds

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Krzysztof J. Filipiak, FESC
Uczelnia Medyczna im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie
Pałac Lubomirskich
Plac Żelaznej Bramy 10, 00–136 Warszawa
e-mail: krzysztof.filipiak@uczelniamedyczna.com.pl

are among the alkaloids, polyphenols, sterols, stanols, vegetable proteins and other nutrients and may find application in supporting the pharmacotherapy of lipid disorders.

Choroby Serca i Naczyń 2021, 18 (2), 60–76

Key words: naturally derived PCSK9 inhibitors, cardiovascular disease

ROLA PCSK9 W METABOLIZMIE LIPOPROTEIN

Proteinowa konwertaza subtilizyny/kexiny typu 9 (PCSK9, *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) jest białkiem odkrytym w 2003 roku, pełniącym istotną rolę w metabolizmie lipoprotein. Główną funkcją PCSK9 jest regulacja liczby receptorów dla lipoprotein o niskiej gęstości (LDL, *low-density lipoprotein*) na powierzchni hepatocytów [1]. Największe ilości PCSK9 są wytwarzane w wątrobie. Do innych tkanek wytwarzających PCSK9 należą: nerki, jelito cienkie, ośrodkowy układ nerwowy, trzustka, mięśnie gładkie naczyń krwionośnych [1, 2].

Gen *PCSK9* znajduje się na chromosomie 1 (*locus*: 1p33–34.3) i koduje on pre-proPCSK9. Nieaktywna biologicznie pre-proPCSK9 ulega obróbce potranslacyjnej w siateczce śródplazmatycznej (odcięcie peptydu sygnałowego), której efektem jest powstanie proPCSK9 (zymogen). W aparacie Golgiego w wyniku dalszych modyfikacji powstaje aktywna biologicznie PCSK9 (ryc. 1) [3–6].

Biologiczna funkcja PCSK9 dotyczy głównie metabolizmu LDL (ryc. 2).

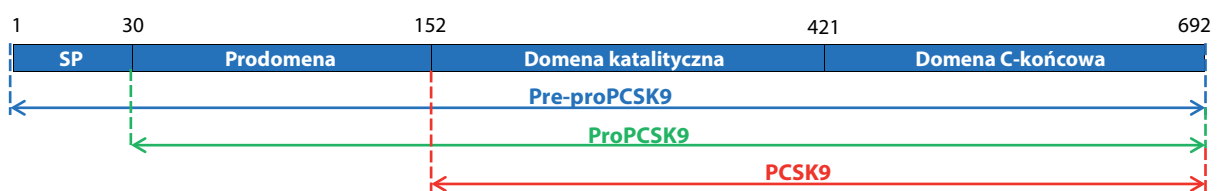
Po wydzieleniu z aparatu Golgiego PCSK9 wiąże się za pomocą domeny katalitycznej z domeną A (domena EGF-A — domena podobna do naskórkowego czynnika wzrostu [EGF, *epidermal growth factor*]) receptora LDL. Wyróżnia się dwa mechanizmy, za pomocą których PCSK9 promuje lizosomalną degradację receptora LDL. W pierwszym, szybszym, mechanizmie wewnątrzkomórkowym PCSK9 wiąże się z domeną EGF-A nowo utworzonego receptora LDL w sieci *trans* aparatu Golgiego, gdzie kompleks PCSK9–receptor LDL jest kierowany do degradacji w lizosomie [8]. W mechanizmie zewnątrzkomórkowym PCSK9 jest wydzielany do układu krążenia,

a następnie wiąże się z domeną EGF-A receptora LDL na powierzchni hepatocytów i eskortuje go do lizosomów poprzez endocytozę zależną od klatryny [9]. Powyższe zjawiska prowadzą do degradacji receptora LDL w lizosomach, przerywając jego recyrkulację na powierzchni komórki. Degradacja receptorów LDL w lizosomach skutkuje zmniejszeniem ich liczby na powierzchni hepatocytów, co z kolei prowadzi do ograniczenia wychwytu krążących cząsteczek LDL przez wątrobę [10].

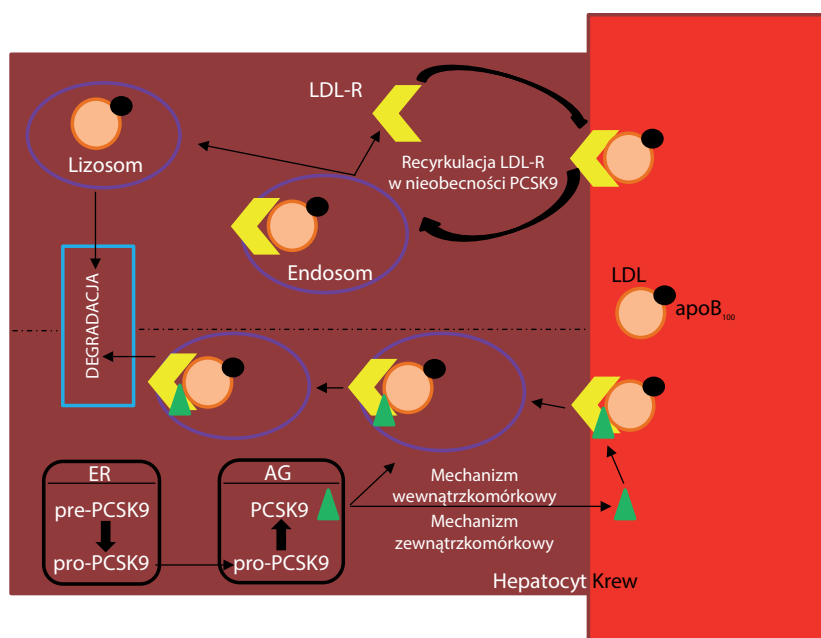
W regulacji transkrypcji genu *PCSK9* i receptora LDL uczestniczy białko typu 2 wiążące elementy odpowiedzi na sterole (SREBP2, *sterol regulatory element-binding protein 2*). Aktywność tego białka zależy od wewnątrzkomórkowego stężenia cholesterolu. Pobudzenie transkrypcji genu *PCSK9* i receptora LDL jest zwiększone w warunkach zmniejszenia stężenia cholesterolu wewnątrz komórki [11, 12]. Dlatego też stosowanie statyn prowadzi do wzrostu ekspresji genu *PCSK9* w hepatocytach (ryc. 3).

Drugim, znacznie ważniejszym, czynnikiem regulującym transkrypcję genu *PCSK9* jest czynnik jądrowy hepatocytów 1 (HNF1, *hepatocyte nuclear factor 1*), który wiąże się głównie z HNF1 α — podstawowym czynnikiem transkrypcji dla podstawowej ekspresji *PCSK9* [14]. Czynniki HNF1 α bierze również udział w indukowanej przez SREBP2 maksymalnej ekspresji genu *PCSK9* w odpowiedzi na zubożenie wewnątrzkomórkowego cholesterolu w hepatocytach [15]. Mutacja genu *HNF1* prowadzi do 90-procentowego zmniejszenia ekspresji *PCSK9* [15]. Duża zawartość HNF1 α w wątrobie sprawia, że ekspresja *PCSK9* jest w tym narządzie największa [15].

Zainteresowanie PCSK9 wynika z faktu, że mutacje polegające na wzmocnieniu jego funkcji (GOF, *gain of*



Rycina 1. Struktura pre-proproteinowej konwertazy subtilizyny/kexiny typu 9 (PCSK9, *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) proPCSK9 oraz aktywnej biologicznie PCSK9



Rycina 2. Udział proproteinowej konwertazy subtilizyny/kexiny typu 9 (PCSK9, *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) w metabolizmie lipoprotein o niskiej gęstości (LDL, *low-density lipoprotein*) (na podstawie [7]); AG — aparat Golgiego; apoB₁₀₀ — apolipoproteina B₁₀₀; ER (*endoplasmic reticulum*) — (szorstka) siateczka śródplazmatyczna; LDL-R — receptor LDL

function) są związane z hipercholesterolemią rodzinną (FH, *familial hypercholesterolaemia*). Poznanie biologicznej funkcji PCSK9 oraz udziału tego białka w patogenezie dyslipidemii spowodowało, że zmniejszenie jego aktywności stało się nową, obiecującą strategią leczenia hipolipemizującego [10]. Opracowano co najmniej dwie strategie służące obniżeniu stężenia PCSK9 w osoczu lub ograniczeniu wiązania PCSK9 z receptorem LDL. Zalicza się do nich zastosowanie przeciwciał monoklonalnych (alirokumab, ewolokumab) i antysensownych oligonukleotydów (inklisiran) [5]. Co więcej, biorąc pod uwagę to, że ekspresja PCSK9 może być również regulowana przez HNF1 w sposób niezależny od receptora LDL, ograniczenie aktywności HNF1 może być alternatywną strategią specyficznego zmniejszenia stężenia PCSK9 w osoczu [10].

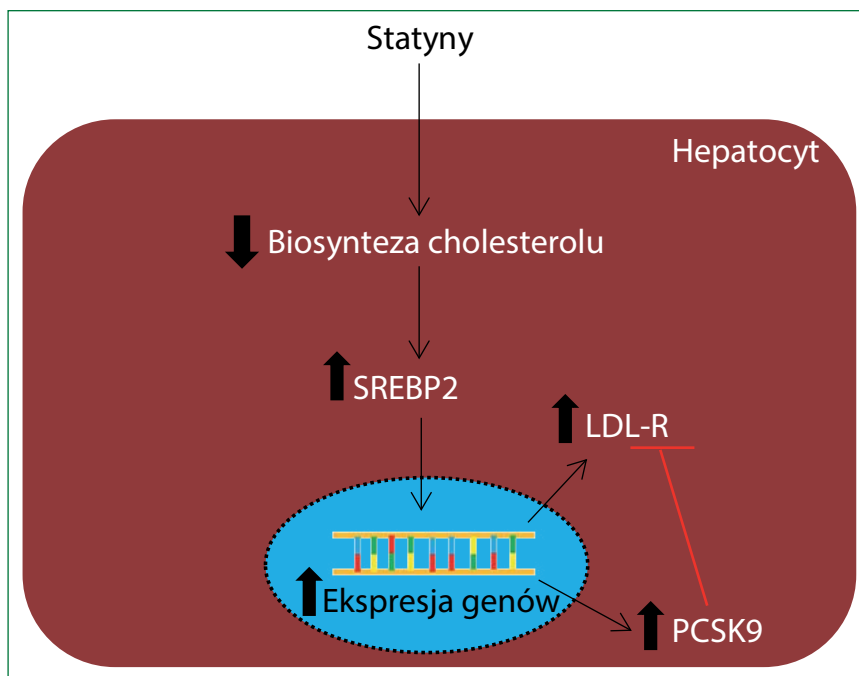
W ostatnim czasie zidentyfikowano szereg związków pochodzenia naturalnego, które charakteryzują się zdolnością do redukcji aktywności PCSK9. Związki te należą do alkaloidów, polifenoli, steroli, stanoli, białek występujących w warzywach oraz innych składników odżywczych. Mogą znaleźć zastosowanie we wspomaganiu farmakoterapii zaburzeń lipidowych. Co więcej, wspomniane właściwości tych związków mogą być kolejnym wytłumaczeniem na przykład „paradoksu francuskiego” [2, 10].

NATURALNE INHIBITORY PCSK9

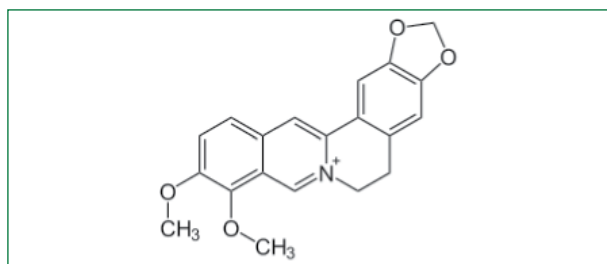
Berberyna

Rośliny należące do rodzaju *Berberis*, obejmujące blisko 550 gatunków, są szeroko rozpowszechnione na całym świecie [10]. Za najbardziej aktywny związek występujący w *Berberis* uważa się berberynę należącą do grupy alkaloidów benzyloizochinolinowych (ryc. 4). Stwierdzono, że berberyna wykazuje skuteczność w leczeniu cukrzycy i innych chorób metabolicznych [16–18]. Berberyna jest obecna w korzeniach, kłączach i korze łodygi berberysu zwyczajnego, który wykorzystuje się jako surowiec zielarski. Występuje ona także w innych gatunkach roślin kwiatowych, takich jak kłącze cynowodu chińskiego (*Coptis rhizomes*) czy susz gorzknika kanadyjskiego (*Hydrastis canadensis*) [19].

W badaniach *in vitro* przy użyciu komórek HepG2 (tj. komórek nowotworu wątroby) dowiedziono, że berberyna w stężeniu 15 µg/ml zmniejsza ekspresję genu *PCSK9* o 77%. Co więcej, ilość PCSK9 wydzielanej przez komórki HepG2 do pożywki zmniejszyła się o 87%. W tym samym badaniu stwierdzono, że berberyna zwiększa ekspresję genu receptora LDL po 12 i 24 godzinach odpowiednio o 1,9 i 2,1 razy [20]. Podobne wyniki uzyskali Li i wsp. [15], którzy wykazali, że inkubacja komórek HepG2 z berberyną zmniejszała ekspresję mRNA PCSK9 o 30% po



Rycina 3. Wpływ statyn na ekspresję genu receptora lipoprotein o niskiej gęstości (LDL-R, *low-density lipoprotein receptor*) i proproteinowej konwertazy subtilizyny/kexiny typu 9 (PCSK9, *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) (na podstawie [13]); SREBP2 (*sterol regulatory element-binding protein 2*) — białko typu 2 wiążące elementy odpowiedzi na sterole



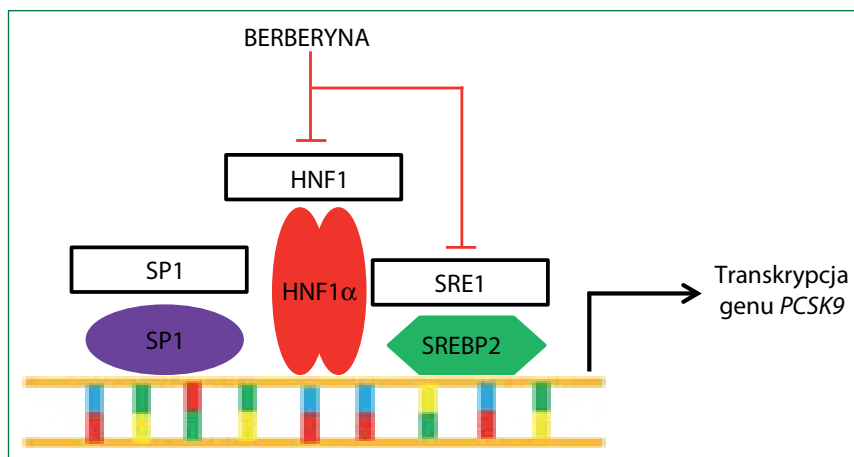
Rycina 4. Wzór chemiczny berberyny

12 godzinach, natomiast po 48 godzinach o 23%, przy stężeniu 6,7 $\mu\text{g/ml}$.

Rezultaty badań *in vivo* potwierdziły wyniki badań *in vitro*. W badaniu na myszach z dyslipidemią (C57BL/6) i zapaleniem wywołanym przez lipopolisacharyd zwierzętom podawano berberynę w dawce 10 lub 30 mg/kg mc./dobę. Wykazano, że berberyna zmniejszała ekspresję PCSK9 w wątrobie [21]. W innym badaniu — na szczurach z hipercholesterolemią — berberynę podawano w dawce 156 mg/kg mc./dobę przez 8 tygodni. Podobnie jak w uprzednio cytowanym badaniu stwierdzono istotne zmniejszenie ekspresji PCSK9 w wątrobie [22].

W badaniach klinicznych dotyczących wpływu berberyny (531,25 mg) na PCSK9 analizowano jej połączenie

z innymi związkami, takimi jak czerwony chiński ryż drożdżowy (monakolina K 3,3 mg) i ekstrakt z liści morwy białej (*Morus alba*, 200 mg). Takie połączenie podawano ochotnikom z dyslipidemią przez 4 tygodnie i nie wykazano zmniejszenia stężenia PCSK9 w osoczu [23]. Podobne wyniki uzyskano w przeprowadzonym metodą podwójnie ślepej próby, randomizowanym, kontrolowanym placebo badaniu klinicznym, w którym oceniano działanie hipolipemizujące po 12 tygodniach leczenia nutraceutykiem zawierającym chitozan, monakolinę K i berberynę u chorych z hipercholesterolemią. Wykazano zmniejszenie stężenia cholesterolu frakcji innej niż lipoproteiny o wysokiej gęstości (*non-HDL, non-high-density lipoprotein*) i cholesterolu frakcji LDL w osoczu w porównaniu z placebo, nie zaobserwowano natomiast żadnych zmian w stężeniu PCSK9 w osoczu [24]. Powyższe spostrzeżenia wynikają z faktu, że berberyna antagonizuje działanie monakoliny K w odniesieniu do ekspresji PCSK9 [10]. Co interesujące, obserwowany brak wpływu połączenia monakoliny K i berberyny na stężenie PCSK9 w osoczu zależy od stosunku obu podawanych związków w stosowanym leczeniu. Stwierdzono, że leczenie chorych z hipercholesterolemią połączeniem monakoliny K, berberyny i silimaryny prowadziło do istotnego



Rycina 5. Zmniejszanie ekspresji genu proproteinowej konwertazy subtilizyny/kexiny typu 9 (PCSK9, *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) przez berberynę (na podstawie [15]); HNF1 (*hepatocyte nuclear factor 1*) — czynnik jądrowy hepatocytów 1; HNF1 α (*hepatocyte nuclear factor 1 alpha*) — czynnik jądrowy hepatocytów 1 alfa; SP1 (*specific protein 1*) — specyficzne białko 1; SRE1 (*sterol regulatory element 1*) — element odpowiedzi na sterole 1; SREBP2 (*sterol regulatory element-binding protein 2*) — białko typu 2 wiążące elementy odpowiedzi na sterole

wzrostu stężenia PCSK9 w osoczu [25]. W innym badaniu klinicznym, przeprowadzonym w grupie 30 chorych z heterozygotyczną FH (HeFH, *heterozygous familial hypercholesterolemia*), leczonych statynami lub kombinacją statyn/ezetimibu, suplementacja nutraceutykiem zawierającym berberynę (500 mg) przez 6 miesięcy spowodowała dalsze obniżenie stężenia LDL w osoczu o 10,5% [26]. Mechanizmy leżące u podstaw tego efektu mogą obejmować zwiększoną ekspresję receptora LDL w połączeniu z ich wydłużonym okresem półtrwania, zmniejszoną ekspresję PCSK9. W tym badaniu nie oznaczano stężenia PCSK9 w osoczu, natomiast autorzy zaobserwowali odwrotną korelację między obniżeniem stężenia LDL w osoczu uzyskanego statynami lub statynami/ezetimibem a jego dodatkowym zmniejszeniem wywołanym przez podanie berberyny [26].

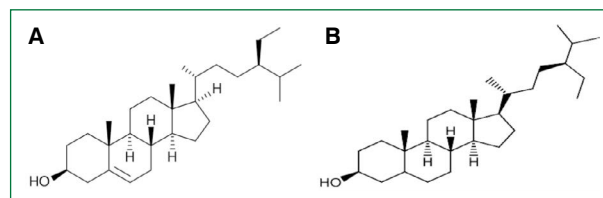
Molekularny mechanizm odpowiedzialny za wpływ berberyny na ekspresję genu *PCSK9* zależy głównie od HNF1 α , natomiast w mniejszym stopniu od SREBP2 [15]. W badaniu *in vitro* z wykorzystaniem komórek HepG2 wykazano, że berberyna o 60% zmniejszała ekspresję HNF1 α oraz nieznacznie ekspresję SREBP2, ograniczając tym samym oddziaływanie tych czynników transkrypcyjnych z promotorem genu *PCSK9* (ryc. 5) [15].

W badaniu Dong i wsp. [27], w którym wykorzystano inhibitor proteasomów — bortezomib, stwierdzono, że berberyna przyspiesza zależną od proteasomów degradację HNF1 α .

Berberyna jest zwykle bardzo dobrze tolerowana w dawkach do 1 mg/dobę; do jej możliwych działań niepożądanych należą zaparcia, biegunka, wzdęcia i poczucie gorzkiego smaku. Jednak efekty te obserwowano głównie w badaniach nad największymi dawkami berberyny [28]. Z klinicznego punktu widzenia ważne jest również, że długotrwałe podawanie tego alkaloidu zmniejsza aktywność cytochromów CYP2D6, CYP2D9 i CYP3A4 u zdrowych osób, co może być związane z modulacją niektórych interakcji międzylekowych [29].

Sterole i stanole roślinne oraz łubin i soja

Niewiele jest badań dotyczących wpływu steroli (ryc. 6A) i stanoli (ryc. 6B) roślinnych na PCSK9. Wyniki dostępnych analiz są niejednoznaczne [10]. De Smet i wsp. [30] w badaniu *in vivo* wykazali, że duże spożycie estrów stanoli roślinnych (0,25 mg cholesterolu + 50 mg estrów stanoli roślinnych rozpuszczonych w oliwie z oliwek) u myszy C57BL/6] zwiększyło ekspresję mRNA jelitowych



Rycina 6. Wzory chemiczne: **A.** Beta-sitosterol (sterol); **B.** Beta-sitostanol (stanol)

PCSK9 i receptora LDL oraz *SREBP2*, natomiast ekspresja wątrobowa tych genów uległa ograniczeniu 15 minut po przyjęciu doustnym. Równolegle wystąpiło zmniejszenie wchłaniania jelitowego cholesterolu i zmniejszenie stężenia LDL w osoczu. Z kolei Simonen i wsp. [31] w randomizowanym i przeprowadzonym metodą podwójnie ślepej próby badaniu z udziałem 92 osób zdrowych i chorych z hipercholesterolemią ocenili wpływ trwającego 6 miesięcy spożywania oleju roślinnego (20 g/d.), wzbogaconego stanolami roślinnymi (3 g/d.) jako estrami (grupa stanoli roślinnych) oraz jego niespożywania (grupa kontrolna). Długotrwałe przyjmowanie estrów stanoli roślinnych zmniejszyło stężenie LDL w osoczu o 7–10%, bez wpływu na stężenie PCSK9 w osoczu i na ekspresję receptorów LDL w wątrobie, co wskazuje, że estry stanoli roślinnych mogą obniżać stężenie LDL w osoczu, ograniczając wchłanianie cholesterolu, bez wpływu na metabolizm PCSK9.

Interesującą grupą związków są peptydy pokarmowe zmniejszające stężenie LDL w osoczu poprzez mechanizmy podobne do działania statyn. Zaobserwowano, że w przypadku mieszanin peptydów sojowych i łubinu uzyskano zmniejszenie aktywności reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A (HMG-CoA, 3-hydroksy-3-metyloglutaryl coenzym A) o co najmniej 50% [32]. Łubin to bogata w białko roślina strączkowo-zbożowa, powszechnie reprezentowana przez cztery gatunki: łubin biały (*Lupinus albus*), łubin żółty (*L. luteus*), łubin perłowy (*L. mutabilis*), łubin słodkolistny (*L. angustifolius*) [33].

W badaniu *in vitro* z wykorzystaniem komórek HepG2 wykazano, że połączenie białek łubinu z celulozą skutkowało zmniejszeniem stężenia PCSK9 w osoczu o 8,5% w porównaniu z grupą kontrolną [34]. Obserwację tę potwierdzono w randomizowanym badaniu z udziałem 50 chorych z zespołem metabolicznym, u których interwencja dietetyczna w postaci podawania białek łubinu (przez 12 tyg. połowa uczestników spożywała koncentrat białka łubinu: 30 g białka/d., a druga połowa wolne od laktozy odtłuszczone mleko w proszku: 30 g białka/d.). Udowodniono, że dieta wzbogacona białkami łubinu doprowadziła do 8-procentowego zmniejszenia stężenia LDL w osoczu, przy spadku o 12,7% (w porównaniu z wartością na początku badania) stężenia PCSK9 w osoczu [35]. Wyróżnia się dwa mechanizmy, dzięki którym peptydy występujące w łubinie zmniejszają stężenie PCSK9 w osoczu. Stwierdzono, że w hepatocytach HepG2 pod wpływem peptydów łubinu zmniejsza się ilość PCSK9 i HNF1 α . Co więcej, peptydy łubinu (głównie peptyd P5 —

LILPKHSDAD) ograniczają wiązanie PCSK9 z receptorem LDL, obniżając tym samym ilość krążących LDL we krwi [36].

Soja jest rośliną należącą do rodziny bobowatych. W rolnictwie największe znaczenie ma soja warzywna należąca do roślin strączkowych. Produkty spożywcze wytwarzane z soi stanowią ważny składnik diety wegetariańskiej. Na bazie nasion soi wytwarza się takie produkty, jak: olej sojowy, mączka sojowa, kasza sojowa, mleko sojowe, tofu, tempeh, lecytyna. W randomizowanym kontrolowanym badaniu klinicznym z udziałem 55 chorych z dyslipidemią wykazano, że spożycie soi w dawce 30 g/dobę przez 12 tygodni prowadziło do zmniejszenia stężenia LDL w osoczu o 3–10%, przy czym efekt ten nie był związany ze zmianami stężenia PCSK9 w osoczu [37].

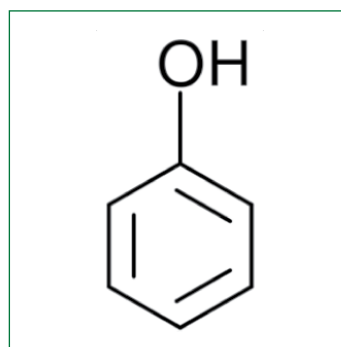
Polifenole

Polifenole (ryc. 7) to klasa związków obejmujących ogromną liczbę różnych cząsteczek, takich jak flawonoidy, lignany, stilbeny, proantocyjanidyny i polimery fenolowe. Substancje te powszechnie występują w owocach, warzywach, orzechach, nasionach, ziołach, przyprawach, a także w herbacie i czerwonym winie [38].

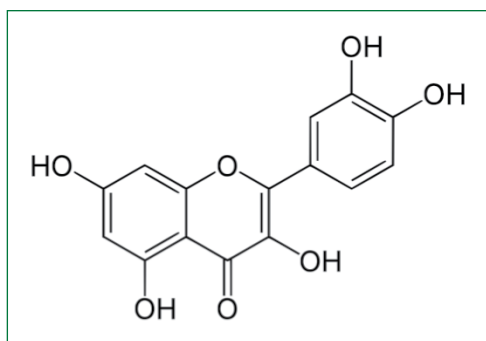
Kwercetyna

Kwercetyna (ryc. 8) powszechnie występuje w warzywach i owocach. Pomimo wyników licznych badań klinicznych wskazujących na hipolipemizujące działanie kwercetyny brakuje jednoznacznych dowodów klinicznych na wpływ kwercetyny na stężenie PCSK9 w osoczu [10].

W badaniach *in vitro* wykazano, że kwercetyna w postaci glikozydowanej inkubowana z komórkami HepG2 w zakresie stężeń 1–10 μ M zmniejszyła miano mRNA PCSK9 o 20–30%. Co więcej, stwierdzono 20–90-procentowy wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia PCSK9



Rycina 7. Wzór chemiczny fenolu będącego prekursorem polifenoli



Rycina 8. Wzór chemiczny kwercetyny

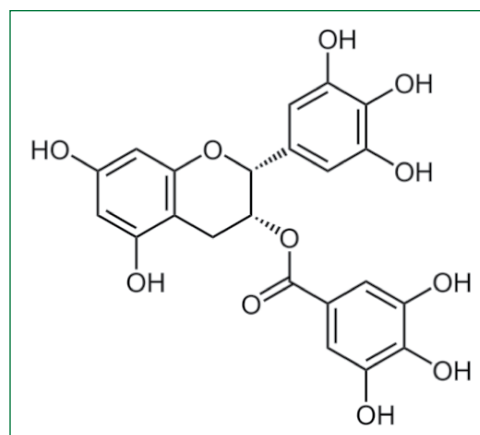
i 30–35-procentowe zmniejszenie PCSK9 wydzielanego do pożywki (poprzez wpływ na działanie sortiliny — białka zaangażowanego w wydzielanie PCSK9 z komórki) [39]. Co ciekawe, kwercetyna w stężeniu $20\ \mu\text{M}$ wpływa na ekspresję PCSK9 nie tylko w HepG2, ale także w modelu komórek piankowatych [40]. Może to ujawnić bezpośrednie właściwości przeciwmiażdżycowe kwercetyny, ponieważ PCSK9 osłabia poziom metabolizmu cholesterolu i właściwości prozapalne makrofagów [41, 42].

W modelu *in vivo* również dowiedziono, że podawanie glikozydu kwercetyny myszom karmionym dietą wysokocholesterolową zmniejszyło stężenie krążącego PCSK9, co prowadziło do zwiększonej ekspresji receptora LDL na powierzchni hepatocytów. Zmniejszenie ekspresji PCSK9, zarówno w wątrobie, jak i w aorcie, obserwowano także po suplementacji przez 12 tygodni kwercetyną ($12,5\ \text{mg/kg}$) u myszy apoE^{-/-} karmionych dietą wysokotłuszczową [43].

Galusan epigallokatechiny

Galusan epigallokatechiny (EGCG, *epigallocatechin gallate*) (ryc. 9) występuje w dużej ilości w zielonej herbacie, gdzie stanowi nawet 1/3 suchej masy. Jest silnym przeciwutleniaczem: 100 razy silniejszym niż witamina C i 25 razy silniejszym niż witamina E [10].

Pomimo udowodnionego klinicznie działania hipolipemizującego EGCG brakuje danych klinicznych dotyczących jego wpływu na PCSK9 [10]. W badaniu *in vitro* wykazano wyraźne zmniejszenie wydzielania PCSK9 w komórkach HepG2 inkubowanych z $25\ \mu\text{M}$ EGCG. Maksymalne zmniejszenie wydzielania PCSK9 było widoczne już po 3 godzinach inkubacji. W tym samym badaniu stwierdzono, że EGCG cechował potencjał przeciwdziałania indukującemu wpływowi lowastatyny na wydzielanie PCSK9. Obserwowane efekty nie były związane ze zmianami ilo-



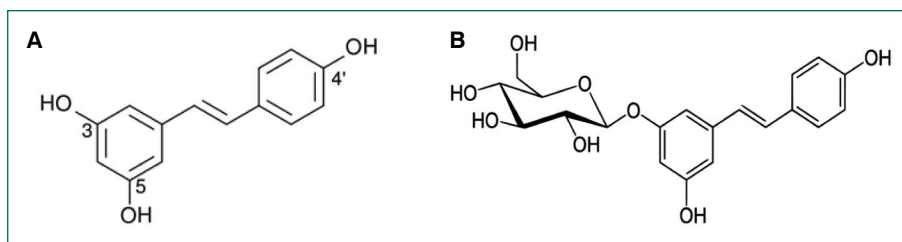
Rycina 9. Wzór chemiczny galusanu epigallokatechiny

ści mRNA PCSK9 ani stężenia wewnątrzkomórkowego prekursora/dojrzałego białka [44].

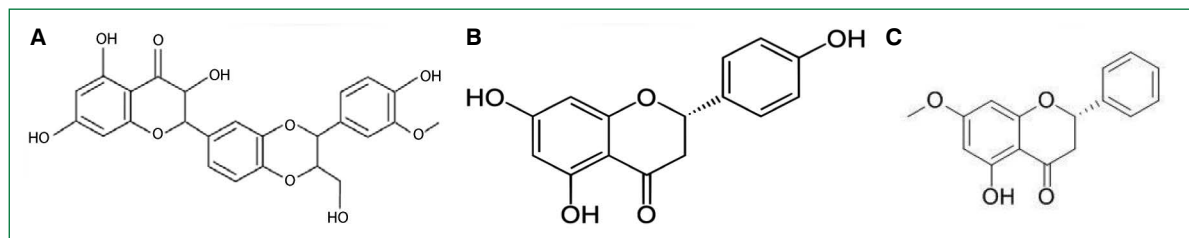
Resweratrol i polidatyna

Resweratrol jest polifenolem nieflawonoidowym powszechnie występującym w czerwonym winie, winogronach i orzeszkach ziemnych [10]. Dane dotyczące wpływu resweratrolu na PCSK9, jak dotąd, pochodzą z badań *in vitro* i *in vivo*. W badaniu *in vitro* wykazano, że resweratrol oddziałuje z promotorem genu *PCSK9* za pośrednictwem SREBP1c [45]. Ponadto stwierdzono, że inkubacja komórek L02 (prawidłowe ludzkie hepatocyty) pobudzanych wolnymi kwasami tłuszczowymi z resweratrolem w stężeniu $20\ \mu\text{M}$ zmniejszyła ekspresję PCSK9 i pobudziła wychwyt LDL (zmniejszyła się liczba kropelek lipidów wewnątrz komórki oraz obniżyło się stężenie triglicerydów w stłuszczonych komórkach), co może mieć istotne implikacje kliniczne dla patogeny niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD, *nonalcoholic fatty liver disease*), będącej ważną przyczyną uszkodzenia tego organu [45].

Polidatyna będąca glikozydem resweratrolu (prekursor resweratrolu) (ryc. 10) i ważnym bioaktywnym składnikiem rdestowca ostrokończystego (*Polygonum cuspidatum*) również charakteryzuje się właściwościami hipolipemizującymi [10]. Podobnie jak w przypadku resweratrolu dane dotyczące wpływu polidatyny na PCSK, jak dotąd, pochodzą z badań *in vitro* i *in vivo* [10]. W badaniach *in vitro* wykazano, że polidatyna ograniczała interakcję PCSK9 z receptorem LDL [46]. Co więcej, przeprowadzono badanie *in vitro* z wykorzystaniem komórek HepG2 indukowanych kwasem palmitynowym opornych na insulinę, które



Rycina 10. Wzory chemiczne: A. *Trans-resweratrol*; B. Polidatyna



Rycina 11. Wzory chemiczne: A. Silibiny A; B. Naringeniny; C. Pinostrobin

inkubowano z polidatyną w stężeniu $20 \mu\text{M}$ przez 24 godziny. Wykazano, że ekspresja PCSK9, która była podwyższona w komórkach insulinoopornych, jest zmniejszana w wyniku inkubacji tych komórek z polidatyną [47]. Z kolei w warunkach *in vivo* stwierdzono zmniejszenie ekspresji PCSK9 w wątrobie i stężenia PCSK9 w surowicy myszy z cukrzycą (db/db) C57BL/6 leczonych polidatyną w dawce 100 mg/kg przez 6 dni/tydzień przez 4 tygodnie. Obserwowanemu efektowi towarzyszyła poprawa metabolizmu glukozy poprzez zależną od PCSK9 regulację w górę (*up-regulation*) glukozykinazy [47].

Inne polifenole

Do innych związków polifenolowych, które wpływają na PCSK9, zalicza się: silibininę A, naringeninę i pinostrobinę [10] (ryc. 11).

Na podstawie badań przesiewowych leków wykazano, że silibinin A jest represorem promotora genu *PCSK9* [48]. W modelu komórek HepG2 wzrastające stężenia silibiny A, od 10 do $100 \mu\text{M}$, prowadziły do zmniejszenia ekspresji mRNA PCSK9 i ekspresji białka w zależności od dawki. Ta aktywność była zależna od supresji kinazy białkowej aktywowanej mitogenem p38 (MAPK, *mitogen-activated protein kinases*). Co ważne, silibinin A była w stanie osłabić pobudzenie ekspresji PCSK9 indukowanego przez atorwastatinę, z całkowitym efektem przeciwdziałającym obserwowanym przy stężeniu $50 \mu\text{M}$, co sugeruje że silibinin A może zostać w przyszłości

zastosowana w celu osłabienia wpływu statyn na ekspresję PCSK9 [48, 49].

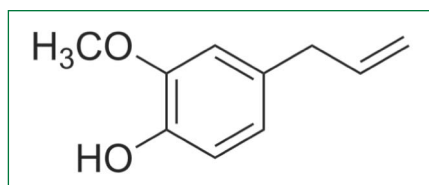
Innym polifenolem jest naringenina występująca w grejpfrutach i innych owocach cytrusowych. W badaniach *in vivo* wykazano, że podawanie naringeniny w dawkach 25 , 50 lub $100 \text{ mg/kg mc./dobę}$ przez 8 tygodni, zmniejszyło ekspresję PCSK9, SREBP1 i SREBP2 w wątrobie otyłych myszy C57BL/6J. Stężenia PCSK9 i LDL w osoczu również były mierzone i stwierdzono, że ich zmniejszenie jest zależne od zastosowanej dawki naringeniny [50].

Pinostrobin, flawanon występujący w miodzie i innych roślinach, między innymi w sośnie wejmutce, nikli indyjskiej czy imbirze chińskim (*Pinus strobus* L. Pinaceae, *Cajanus cajan* [L.] Millsp., Fabaceae, *Boesenbergia rotunda* [L.] Mansf. i *Boesenbergia pandurata* [Roxb.] Schltr., Zingiberaceae), również była badana pod kątem wpływu na PCSK9. W badaniach *in vitro* wykazano, że inkubacja komórek HepG2 z 20 i $40 \mu\text{M}$ pinostrobin skutkowała zależnym od dawki zmniejszeniem ekspresji PCSK9 [51].

Eugenol

Eugenol jest głównym składnikiem olejku goździkowego. Jest to nutraceutyk fenolowy (ryc. 12) charakteryzujący się działaniem hipolipemizującym. Uznano go za bezpieczny składnik odżywczy, przy dopuszczalnym dziennym spożyciu do $2,5 \text{ mg/kg mc.}$ u ludzi [10].

W ostatnio opublikowanym badaniu Zia i wsp. [52] dokonywano pomiaru ekspresji PCSK9 u chorych na



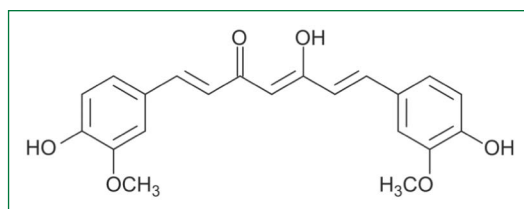
Rycina 12. Wzór chemiczny eugenolu

ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL, *acute lymphoblastic leukemia*) i stwierdzono, że jest ona istotnie zwiększona. Postawiono hipotezę, że eugenol będący przeciwutleniaczem zapobiega utlenianiu LDL (*ox*-LDL, *oxidized LDL*). W przypadku braku *ox*-LDL receptor zmiatający LOX1 (*lectin-type oxidized LDL receptor 1*), który reguluje ekspresję PCSK9, nie zostanie aktywowany. Ponieważ stężenie LDL w osoczu będzie zmniejszone, to nie będzie już w stanie wspierać wzrostu komórek białaczkowych. Hipotezę zweryfikowano w badaniach eksperymentalnych — wykazano hydrofobowe interakcje między eugenolem a makrocząsteczkami PCSK9 i LOX1. Ekspresja zarówno PCSK9, jak i LOX1 została znacznie zmniejszona przez eugenol [52]. Efekt ten może być wynikiem interakcji fizycznej między dwiema cząsteczkami lub pośredniego wpływu hamującego wywołanego przez eugenol na szlaku SREBP [53]. Stwierdzono, że PCSK9 może być celem terapeutycznym eugenolu w ALL [52].

Kurkumina

Kurkumina (ryc. 13) jest jednym z głównych bioaktywnych składników polifenolowych kurkumy przyprawowej, pozyskiwanej z kłącza ostryżu długiego *Curcuma longa* L. [10]. W badaniach *in vitro* wykazano, że inkubacja komórek HepG2 z kurkumina w stężeniach 10 μ M i 20 μ M przez 24 godziny znacznie zmniejszyła ekspresję mRNA o odpowiednio 31% i 48%. W tym badaniu czynnik transkrypcji HNF1 α był zaangażowany w zależny od kurkuminy wpływ na ekspresję PCSK9. Co interesujące, kurkumina prawie całkowicie zniosła niekorzystne oddziaływanie lowastatyny na ekspresję PCSK9. W związku z tym kurkumina może przeciwdziałać niekorzystnemu wpływowi statyny na stężenie PCSK9 w osoczu [54].

Dostępne obecnie dowody *in vivo* wpływu kurkuminy na PCSK9 pochodzą z badania na szczurach z marskością wątroby wywołaną tetrachlorometanem. Wykazano, że leczenie kurkumina 200 mg/kg mc./dobę przez 12 tygodni wywołało wzrost ekspresji receptora LDL w wątrobie szczurów przy jednoczesnym zmniejszeniu ekspresji PCSK9 w komórkach tego narządu [55].



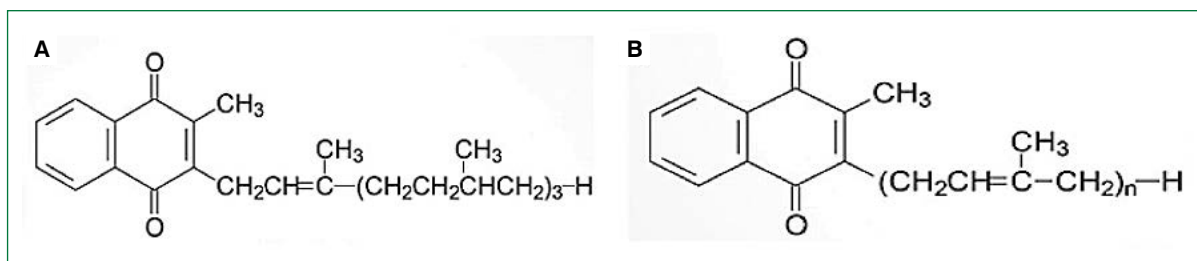
Rycina 13. Wzór chemiczny kurkuminy

Cebula siedmiolatka

Cebula siedmiolatka (walijska) to wieloletnia roślina powszechnie uprawiana na całym świecie, zwłaszcza w Azji. Ekstrakt etanolowy z cebuli walijskiej zawiera 0,5 g/100 g tłuszczu ogółem i jest bogaty w witaminy B₂ (riboflawina 1,3 mg/100 g), B₃ (niacyna 284,3 mg/100 g), B₆ (pirydoksyna 5,4 mg/100 g) i B₉ (kwas foliowy 2,2 mg/100 g) oraz żelazo mineralne (20,8 mg/100 g). Dodatkowo cebula walijska zawiera 0,53 \pm 0,02 mg/g kwasu ferulowego i 0,61 \pm 0,01 mg/g kwercetyny [10, 56].

W komórkach HepG2 wykazano, że ekstrakt etanolu z cebuli walijskiej modyfikuje ekspresję różnych genów zaangażowanych w metabolizm lipidów i cholesterolu w odpowiedzi na surowicę pozbawioną lipidów [56]. Ekstrakt był aktywny w stężeniu od 50 μ g/ml do 200 μ g/ml i skutecznie kontrolował ekspresję receptora LDL. Ponadto stwierdzono, że przy tych samych stężeniach nastąpiło znacznie zmniejszenie miana mRNA PCSK9, co wynika ze zmniejszenia aktywności SREBP2 i HNF1. Wykazano również, że ekstrakt etanolowy z cebuli walijskiej dodatkowo przeciwdziała indukcji PCSK9 przez statyny [56].

Wśród aktywnych składników zidentyfikowanych w ekstrakcie kemferol, kwercetyna i kwas p-kumarowy znacznie zmniejszyły stężenie PCSK9 w warunkach wyczerpania lipidów w komórkach HepG2, aczkolwiek ten efekt obserwowano przy znacznie wyższych stężeniach *in vitro* (40 μ M). Kwas ferulowy z kolei nie charakteryzował się żadnym istotnym wpływem na PCSK9 [56]. Hipolipemizujący wpływ ekstraktu etanolowego z cebuli walijskiej badano u myszy C57BL6/J pozostających na diecie wysokotłuszczowej (60% energii w postaci tłuszczu, 20% w postaci białka i 20% w postaci węglowodanów). Ekstrakt z walijskiej cebuli rozpuszczono w solance i podawano z karmą myszom w dawce 400 mg/kg mc./dobę przez 6,5 tygodnia. Ta interwencja doprowadziła do znacznego zmniejszenia masy ciała i spożycia pokarmu, ze znacznym zmniejszeniem stężeń triglicerydów (~46%), cholesterolu całkowitego (~11%) i LDL (~24%)



Rycina 14. Wzory chemiczne: A. Witaminy K1; B. Witaminy K2

[57]. Co interesujące, autorzy zaobserwowali również zmniejszenie ekspresji SREBP1c w wątrobie, potwierdzając dane uzyskane w badaniach *in vitro* [57], co sugeruje możliwy wpływ na PCSK9, chociaż taka analiza nie była wykonana [56].

Orzechy nerkowca

Orzechy nerkowca są nasionami drzewa o nazwie nanercz zachodni (*Anacardium occidentale*). W randomizowanym badaniu klinicznym z udziałem 42 osób dorosłych badano wpływ orzechów nerkowca na stężenie PCSK9 w osoczu. Badanej grupie podawano 42 g orzechów nerkowca dziennie przez 4 tygodnie. Wykazano zmniejszenie stężenia PCSK9 w osoczu o 6,7% (270,8 ng/ml vs. 252,6 ng/ml) [58]. Efekt ten nie wiązał się z jakąkolwiek znaczącą zmianą stężenia LDL w osoczu. Aktywny biologicznie składnik orzechów nerkowca odpowiedzialny za wpływ na PCSK9 nie został, jak dotąd, poznany [10].

Kenaf

Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) i odtłuszczona mączka z nasion kenafu (DKSM, *defatted kenaf seed meal*) to tanie odpady rolnicze, ale potencjalnie funkcjonalne składniki żywności charakteryzujące się właściwościami hipolipemizującymi [10]. Fenole i saponiny to dwie główne klasy bioaktywne w DKSM, które nadają doskonale właściwości przeciwutleniające w porównaniu ze zwykłymi mąkami jadalnymi, tj. pszenną, ryżową i batatową [10]. W badaniach *in vivo* nad szczurami Sprague-Dawley z hipercholesterolemią, którym przez 10 tygodni podawano kenaf, wykazano zmniejszenie stężenia PCSK9 w surowicy. Efekty te można prawdopodobnie przypisać składnikom fenolowym i saponinom. W szczególności wydaje się, że saponiny, oddziałując z SREBP, są najbardziej prawdopodobnymi składnikami kenafu wpływającymi na ekspresję PCSK9 [59].

Witamina MK7

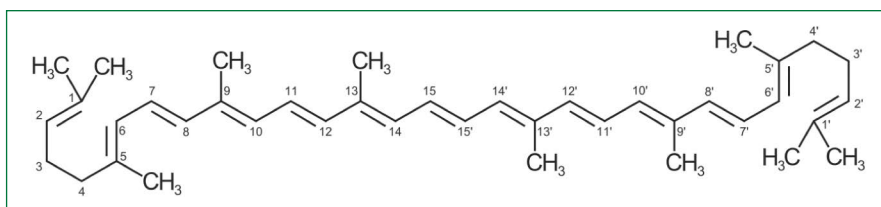
Witamina K występuje w dwóch postaciach pokarmowych, tj. witaminy K1 (filochinon) i witaminy K2 (MK, menachinony) (ryc. 14). Witamina K2 znajduje się głównie w sfermentowanej żywności, takiej jak ser i japoński produkt sojowy „natto” [60].

W badaniach *in vitro* przeprowadzonych z wykorzystaniem ludzkich komórek wątrobiaka Huh7 stwierdzono, że witamina K MK7 zmniejsza biosyntezę cholesterolu o 39%. W odpowiedzi na zmniejszenie syntezy cholesterolu witamina K MK7 pobudza receptor LDL, podobnie jak w przypadku statyn, a efektowi temu zapobiegała koinkubacja witaminy ze skwalenem. Jednak — inaczej niż w przypadku statyny, która pobudza ekspresję PCSK9 — wykazano, że witamina K MK7 zmniejsza syntezę PCSK9 i jej wydzielanie przez Huh7 [61]. Efekt działania MK7 jest bardzo podobny do efektu oddziaływania berberyny, lecz dokładny mechanizm nie został w pełni poznany [10].

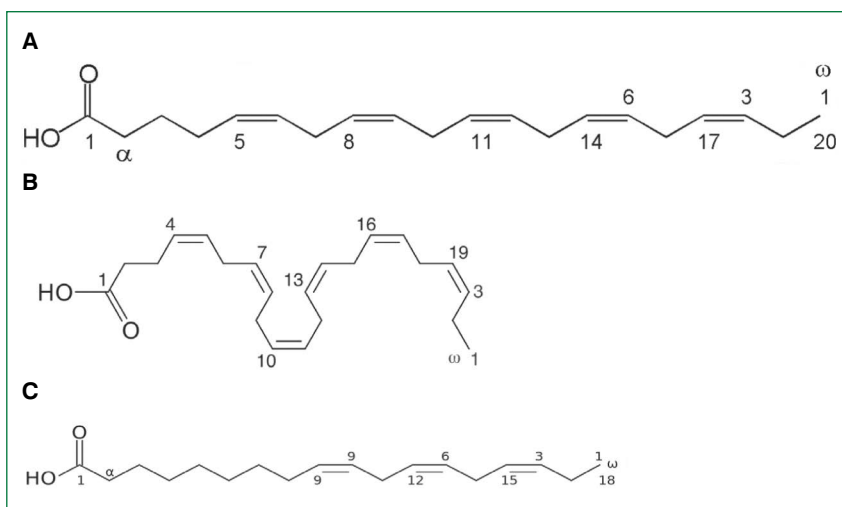
Likopen

Likopen (ryc. 15) należy do rodziny przeciwutlenia-czy rozpuszczalnych w tłuszczach zwanych karotenoidami, które występują w owocach i warzywach [10]. Duże ilości likopenu występują głównie w pomidorach lub produktach zawierających pomidory, które stanowią około 80% likopenu w diecie [10].

W badaniu *in vivo* po raz pierwszy wykazano, że podawanie likopenu szczurom z hipertriglicerydemią w dawce 5, 10 i 50 mg/kg mc./dobę zmniejszało ekspresję PCSK9 w wątrobie poprzez pobudzanie ubikwitynacji HNF1 α [62]. Efekt ten częściowo wyjaśniał zmniejszone stężenie lipidów w osoczu szczurów, którym podawano likopen. Stwierdzono, że podawanie likopenu w największej dawce znacznie zmniejszyło stężenia LDL, lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL, *very-low-density lipoprotein*) i triglicerydów w osoczu (o odpowiednio ~85,3%, ~55,5% i 55,5%) [62].



Rycina 15. Wzór chemiczny likopenu



Rycina 16. Wzory chemiczne: **A.** Kwasy eikozapentaenowego (EPA, *eicosapentaenoic acid*); **B.** Kwasy dokozaheksaenowego (DHA, *docosahexaenoic acid*); **C.** Kwasy alfa-linolenowego (ALA, *alpha-lipoic acid*)

W badaniach eksperymentalnych wykazano, że likopen ogranicza oddziaływanie PCSK9 z domeną EGF-A (*epidermal growth factor*) receptora LDL. W innym badaniu tych samych autorów wykazano, że likopen, poprzez zmniejszanie ekspresji HNF1 α i prawdopodobnie poprzez zwiększenie stężenia receptora farnesoidowego X (FXR, *farnesoid X receptor*) i/lub receptora aktywowanego proliferatorami peroksysomów (PPAR, *peroxisome proliferator-activated receptor*), dwukrotnie zmniejsza pobudzaną przez lipopolisacharyd ekspresję PCSK9 w wątrobie szczurów [63].

Kwasy omega-3

Omega-3 wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA, *polyunsaturated fatty acid*) występują w dużych ilościach w tłustych rybach, oleju rybnym i innych owocach morza. Wywierają one szereg efektów kardioprotekcyjnych, między innymi korzystnie modulują kilka czynników ryzyka chorób układu krążenia, takich jak stężenie lipidów we krwi, ciśnienie tętnicze, częstość rytmu serca i zmienność rytmu serca, agregacja płytek, funkcja śródbłonna i stan

zapalny [64]. Do PUFA zalicza się między innymi kwas eikozapentaenowy (EPA, *eicosapentaenoic acid*) i kwas dokozaheksaenowy (DHA, *docosahexaenoic acid*) — które często znajdują się w oleju rybnym oraz kwas alfa-linolenowy (ALA, *alpha-lipoic acid*) — powszechnie występujący w olejach roślinnych [10] (ryc. 16).

Yuan i wsp. [65] badali ochronny wpływ spożycia oleju rybnego wzbogaconego n-3 PUFA (10% w diecie) u samców szczurów karmionych dietą wysokotłuszczową i wysokocholesterolową w stylu zachodnim (WD, *Western diet*). Wyniki pokazały, że długotrwałe (16 tygodni) spożycie oleju rybnego wzbogaconego n-3 PUFA może chronić przed hipercholesterolemią indukowaną WD poprzez zmniejszenie ekspresji PCSK9 w wątrobie [65]. Zmniejszona ekspresja PCSK9 wiązała się z 84-procentową redukcją stężenia LDL w osoczu szczurów karmionych olejem rybnym w porównaniu ze szczurami z grupy kontrolnej [65]. Podobnie Sorokin i wsp. [66] wykazali, że zarówno miano mRNA, jak i stężenie krążącej PCSK9 było znacznie zmniejszone (o 70%) u samic myszy ApoE^{-/-} leczonych dietą bogatą w kwasy ome-

ga-3 FA (OR, *omega-3 FA rich*) (1,8 g kwasów omega-3/kg diety/d.) lub dieta bogata w kwasy omega-3 FA i kwas acetylosalicylowy ([ASA, *acetylsalicylic acid*] ORA, *omega-3 FA rich plus ASA*) (0,1 g ASA/kg diety/d.) przez 13 tygodni. W szczególności stwierdzono, że stężenia krążącej PCSK9 były niższe w grupie stosującej dietę ORA niż w grupie stosującej dietę OR, chociaż leczenie ASA nie wykazało istotnego wpływu na stężenie PCSK9 w osoczu [66]. Ponadto zmniejszenie stężeń PCSK9 zarówno w przypadku diety OR, jak i diety ORA wiązało się z niższymi o 40% stężeniami VLDL i LDL w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast zmniejszenie powierzchni blaszek miażdżycowych stwierdzono jedynie w grupie stosującej dietę ORA [66]. Powyższe wyniki potwierdził Rodríguez-Pérez i wsp. [67], którzy przeanalizowali dane z *Canola Oil Multicenter Intervention Trial* (COMIT), randomizowanej podwójnie zaślepionej, kontrolowanej próby żywienia krzyżowego, w której ochotnicy spożywali diety wzbogacane odpowiednio o: 1) olej rzepakowy; 2) olej rzepakowy bogaty w DHA; oraz 3) olej rzepakowy o wysokiej zawartości kwasu oleinowego. Wykazano, że wzbogacenie oleju rzepakowego w DHA (o 6%) obniża stężenia krążącej PCSK9 i triacyloglicerolu w porównaniu z dietami rzepakową i oleinową [67]. Co więcej, stwierdzono, że stężenia krążącej PCSK9 są istotnie dodatnio skorelowane ze stężeniami LDL, triglicerydów i apolipoproteiny B₁₀₀ (apoB₁₀₀), nie znaleziono natomiast związku między stężeniami PCSK9 i HDL [67]. Ponadto wykazano, że stężenia krążącej PCSK9 dodatnio korelują z wartościami markerów syntezy cholesterolu w osoczu, w tym latosterolu i desmosterolu, we wszystkich trzech grupach interwencyjnych, co sugeruje, że stężenia krążącej PCSK9 są wrażliwe na syntezę cholesterolu [68]. Za molekularny mechanizm działania PUFA przyjmuje się zmniejszanie aktywności SREBP1c [69]. W tym kontekście Graversen i wsp. [70] wykazali, że codzienne spożycie 2,2 g morskich kwasów tłuszczowych n-3 PUFA (zawierających 38,5% EPA, 25,9% DHA i 6,0% kwasu dokozapentaenowego (DPA, *docosapentaenoic acid*) przez 12 tygodni może zmniejszyć stężenie PCSK9 w krążeniu odpowiednio o 11,4% i 9,8% u kobiet w okresach przed i po monopauzie. Dla kontrastu, stężenia LDL w osoczu nie zmieniły się znacząco [70]. Należy zauważyć, że n-3 PUFA mogą zmniejszać aktywność SREBP2 poprzez zwiększenie zawartości cholesterolu w wątrobie, co prowadzi do ograniczonej ekspresji PCSK9 jako docelowego genu *SREBP2* [68]. Sugerowano również, że

n-3 PUFA mogą aktywować PPAR α , który osłabia ekspresję PCSK9 [71, 72].

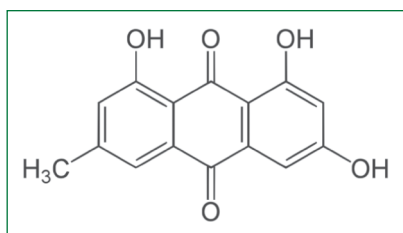
Inne związki

Probiotyki

Mikrobiota jelitowa ma istotny wpływ na metabolizm cholesterolu, a tym samym na patogenezę miażdżycy [73]. Dostępne są wyniki jednego badania klinicznego dotyczącego wpływu podawania probiotyków na PCSK9 [74]. W badaniu tym oceniono skuteczność oddziaływania na obniżenie stężenia LDL w osoczu, a także innych markerów ryzyka sercowo-naczyniowego oraz bezpieczeństwo połączenia nutraceutycznego zawierającego *Bifidobacterium longum* BB536, ekstrakt z czerwonego sfermentowanego ryżu, niacynę i koenzym Q₁₀. Wyniki tego randomizowanego, przeprowadzonego metodą podwójnie ślepej próby i kontrolowanego placebo badania wykazały, że podawanie przez 12 tygodni powyższego połączenia nutraceutycznego znacznie zmniejszyło stężenia cholesterolu całkowitego (~16,7%), LDL (~25,7%) i apoB₁₀₀ (~17%) w osoczu przy jednoczesnym braku wpływu na stężenie PCSK9 w osoczu. Obserwowany brak wpływu zastosowanej interwencji to prawdopodobnie wynik antagonistycznego działania *Bifidobacterium longum* BB536 i monakoliny K zawartej w czerwonym sfermentowanym ryżu na ekspresję PCSK9 [74].

Dioscorea

Wodne ekstrakty z korzenia niektórych gatunków ignamu *Dioscorea zingiberensis* oraz z kłącza *Dioscorea nipponica* Makino (*Dioscoreaceae*) są znane w medycynie chińskiej od prawie 30 lat. W badaniu *in vivo* na myszach apoE^{-/-} karmionych dietą wysokotłuszczową przez 18 tygodni *dioscorea* wykazała silne działanie zmniejszające stężenie lipidów w osoczu [75]. Co ważniejsze, *dioscorea* zmniejszała ekspresję mRNA wątrobowej PCSK9 i obniżała stężenie PCSK9 w osoczu. Analiza składu ekstraktu z *Dioscorea nipponica* ujawniła obecność protodioscyny, pseudoprodioscyny i dioscyny. Te saponiny steroidowe uważa się za główne aktywne składniki. Jednak niektóre terpenoidy dioscynowe są sprzężone z polisacharydami i nie mogą być wchłaniane na poziomie żołądkowo-jelitowym, podczas gdy ich odpowiednie aglikony mogą być biodostępne. Wykazano, że protodioscyna, pseudoprodioscyna i metyloprotodioscyna zmniejszały ekspresję PCSK9 w warunkach *in vitro*, osłabiając aktywność SREBP w komórkach HepG2 [76].



Rycina 17. Wzór chemiczny emodiny

Emodina

Emodina (ryc. 17) jest jedną z aktywnych pochodnych antrachinonu z rabarbaru dłoniastego (*Rheum palmatum* L.) i niektórych innych ziół chińskich [10]. U myszy C57BL/6J karmionych dietą wysokotłuszczową przez 12 tygodni wykazano, że podawanie emodiny w dawce 40 i 80 mg/kg mc./dobę obniżało stężenie lipidów w osoczu i wiązało się ze zmniejszeniem aktywności SREBP [77]. Niedawno dowiedziono, że 100 mg/kg mc./dobę aloesu, który zawiera również emodinę, zmniejsza stężenia cholesterolu całkowitego i frakcji LDL w osoczu szczurów z hipercholesterolemią wywołaną dietą. W badaniach *in vitro* z wykorzystaniem komórek HepG2 wykazano, że aloes zmniejszał aktywność SREBP i HNF1. Zgodnie z powyższym ograniczenie aktywności obu tych czynników transkrypcyjnych spowodowało obniżenie ekspresji PCSK9 związane ze zwiększoną ekspresją wychwyty receptora LDL i LDL [78].

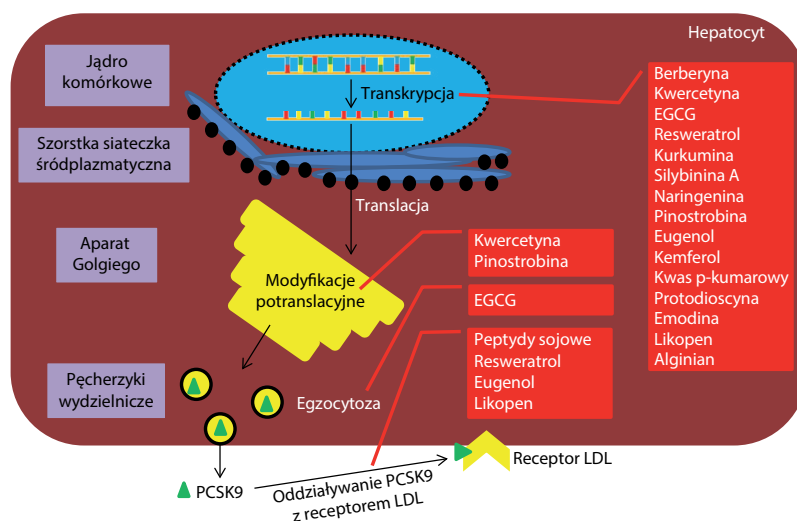
Oligosacharyd alginianu

Oligosacharyd alginianu (AOS, *alginate oligosaccharide*) jest pochodną kwasu alginowego występującego w algach i trawach morskich. Yang i wsp. [79] w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem komórek HepG2 oraz badaniach *in vivo* na myszach ICR oceniali wpływ AOS na ekspresję genu receptora LDL i PCSK9. Wykazano, że AOS zwiększał ekspresję receptora LDL i wewnątrzkomórkowy wychwyt LDL przez hepatocyty w sposób zależny od dawki i czasu. Ponadto stwierdzono, że AOS pobudzał aktywność SREBP2 poprzez zwiększanie aktywności kinaz PI3/Akt, poprzez co nasilał ekspresję genu receptora LDL. Co więcej, AOS zmniejszał aktywność HNF1 α , dzięki czemu ograniczał ekspresję PCSK9 [79].

Podsumowanie mechanizmów działania naturalnych inhibitorów PCSK9 przedstawiono na rycinie 18, natomiast podsumowanie badań klinicznych tych związków zestawiono w tabeli 1.

OGRANICZENIA BADAŃ NATURALNYCH INHIBITORÓW PCSK9

W przedstawionych w niniejszej pracy badaniach *in vitro* istnieje szereg ograniczeń, które uniemożliwiają bezpośrednie ekstrapolowanie ich wyników na wpływ na człowieka. Do najważniejszych z tych ograniczeń



Rycina 18. Mechanizm działania naturalnych inhibitorów proproteinowej konwertazy subtilizyny/kexiny typu 9 (PCSK9, *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) (na podstawie [10]); EGCG (*epigallocatechin gallate*) — galusan epigallokatechiny; LDL (*low-density lipoproteins*) — lipoproteiny o niskiej gęstości

Tabela 1. Podsumowanie badań klinicznych dotyczących naturalnych inhibitorów proproteinowej konwertazy subtylizyny/kexiny typu 9 (PCSK9, *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*)

Substancja	Liczba uczestników badania	Dawka	Obniżenie stężenia w osoczu		Piśmiennictwo
			PCSK9	LDL	
Berberyna	30 chorych z HeFH	500 mg przez 6 mies.	Prawdopodobne	-10,5%	[26]
Sterole i stanole roślinne	92 zdrowych z hipercholesterolemią	20 g oleju roślinnego + 3 g stanoli roślinnych przez 6 mies.	Brak	-7-10%	[31]
Łubin	50 chorych z zespołem metabolicznym	30 g koncentratu białka łubinu przez 3 mies.	-12,7%	-8%	[35]
Soja	55 chorych z dyslipidemią	30 g białka soi przez 3 mies.	Brak	-3-10%	[37]
Orzechy nerkowca	42 dorosłych	32 g orzechów nerkowca przez 1 mies.	-6,7%	Brak	[58]
Olej rzepakowy wzbogacony DHA	54 chorych z obecnością ≥ 1 składowej zespołu metabolicznego	Nie zdefiniowano	Znaczące	Znaczące	[67]
Kwasy tłuszczowe n-3 PUFA z ryb morskich	23 kobiety przed menopauzą	2200 mg przez 3 mies.	-11,4%	Znaczące	[70]
	22 kobiety po menopauzie		-9,8%	Znaczące	
Probiotyki	33 chorych cechujących się niskim ryzykiem sercowo-naczyniowym	<i>Bifidobacterium longum</i> BB536 + ekstrakt z czerwonego sfermentowanego ryżu (10 mg/d. monakoliny K) + niacyna + koenzym Q ₁₀ przez 3 mies.	Brak (możliwy antagonizm między probiotykiem o monakoliną)	-25,7%	[74]

HeFH (*heterozygous familial hypercholesterolemia*) — heterozygotyczna rodzinna hipercholesterolemia; DHA (*docosahexaenoic acid*) — kwas dokozaheksaenowy; n-3 PUFA (*polyunsaturated fatty acid*) — omega-3 wielonienasycone kwasy tłuszczowe

należy zaliczyć fakt, że często stosowane dawki są znacznie większe od wykrywanych w warunkach *in vivo*. Ponadto wiele z wyżej opisanych związków cechuje się niską biodostępnością (często są substratami dla glikoproteiny P czy białek oporności wielolekowej [MDR, *multidrug resistance*]). Na przykładu u ludzi maksymalne stężenie (C_{max}) berberyny w osoczu oznaczano na poziomie 0,4 ng/ml po podaniu pojedynczej dawki doustnej wynoszącej 400 mg. Kolejnym ograniczeniem jest trudność w przewidywaniu możliwego metabolizmu danej substancji przez mikrobiotę jelit człowieka (dotyczy to również badań *in vivo*, ponieważ mikrobiota jelit szczura czy myszy znacznie różni się od mikrobioty jelit człowieka). Wiadomo, że komórki HepG2, będące częstym modelem wykorzystywanym w badaniach *in vitro*, charakteryzują się niską aktywnością wielu enzymów biorących udział w metabolizmie ksenobiotyków. Zjawisko to może być przyczyną mylących wyników w badaniach farmakologicznych nad związkami, które do osiągnięcia swojej aktywności wymagają biotransformacji [10].

PODSUMOWANIE

Proproteinowa konwertaza subtylizyny/kexiny typu 9 bierze istotny udział w metabolizmie lipidów, a zmniejszenie jej aktywności jest udowodnioną klinicznie metodą leczenia hipolipemizującego.

Liczne związki pochodzenia naturalnego charakteryzują się właściwościami hipolipemizującymi zależnymi od zmniejszenia aktywności PCSK9.

Związki pochodzenia naturalnego będące inhibitorami PCSK9 mogą znaleźć zastosowanie we wspomaganiu terapii hipolipemizującej.

KONFLIKT INTERESÓW

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

PIŚMIENICTWO

- Maxwell KN, Fisher EA, Breslow JL. Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(6): 2069-2074, doi: [10.1073/pnas.0409736102](https://doi.org/10.1073/pnas.0409736102), indexed in Pubmed: 15677715.
- Momtazi AA, Banach M, Pirro M, et al. Regulation of PCSK9 by nutraceuticals. *Pharmacol Res*. 2017; 120: 157-169, doi: [10.1016/j.phrs.2017.03.023](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.03.023), indexed in Pubmed: 28363723.

3. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(3): 928–933, doi: [10.1073/pnas.0335507100](https://doi.org/10.1073/pnas.0335507100), indexed in Pubmed: [12552133](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12552133/).
4. Tavori H, Christian D, Minnier J, et al. PCSK9 association with lipoprotein(a). *Circ Res*. 2016; 119(1): 29–35, doi: [10.1161/CIRCRESAHA.116.308811](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308811), indexed in Pubmed: [27121620](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27121620/).
5. Ruscica M, Simonelli S, Botta M, et al. Plasma PCSK9 levels and lipoprotein distribution are preserved in carriers of genetic HDL disorders. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018; 1863(9): 991–997, doi: [10.1016/j.bbalip.2018.05.015](https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.05.015), indexed in Pubmed: [29852278](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29852278/).
6. Macchi C, Banach M, Corsini A, et al. Changes in circulating proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 levels — experimental and clinical approaches with lipid-lowering agents. *Eur J Prev Cardiol*. 2019; 26(9): 930–949, doi: [10.1177/2047487319831500](https://doi.org/10.1177/2047487319831500), indexed in Pubmed: [30776916](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30776916/).
7. Awan Z, Baass A, Genest J. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): lessons learned from patients with hypercholesterolemia. *Clin Chem*. 2014; 60(11): 1380–1389, doi: [10.1373/clinchem.2014.225946](https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.225946), indexed in Pubmed: [25248569](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25248569/).
8. Poirier S, Mayer G, Poupon V, et al. Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced low density lipoprotein receptor degradation: evidence for an intracellular route. *J Biol Chem*. 2009; 284(42): 28856–28864, doi: [10.1074/jbc.M109.037085](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.037085), indexed in Pubmed: [19635789](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19635789/).
9. Qian YW, Schmidt RJ, Zhang Y, et al. Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis. *J Lipid Res*. 2007; 48(7): 1488–1498, doi: [10.1194/jlr.M700071-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.M700071-JLR200), indexed in Pubmed: [17449864](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17449864/).
10. Adorni MP, Zimetti F, Lupo M, et al. Naturally occurring PCSK9 inhibitors. *Nutrients*. 2020; 12(5): 1440, doi: [10.3390/nu12051440](https://doi.org/10.3390/nu12051440).
11. Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, et al. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol*. 1985; 1: 1–39, doi: [10.1146/annurev.cb.01.110185.000245](https://doi.org/10.1146/annurev.cb.01.110185.000245), indexed in Pubmed: [2881559](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2881559/).
12. Horton JD, Shah NA, Warrington JA, et al. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(21): 12027–12032, doi: [10.1073/pnas.1534923100](https://doi.org/10.1073/pnas.1534923100), indexed in Pubmed: [14512514](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14512514/).
13. Nozue T. Lipid lowering therapy and circulating PCSK9 concentration. *J Atheroscler Thromb*. 2017; 24(9): 895–907, doi: [10.5551/jat.RV17012](https://doi.org/10.5551/jat.RV17012), indexed in Pubmed: [28804094](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28804094/).
14. Schulz R, Schlüter KD, Laufs U. Molecular and cellular function of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). *Basic Res Cardiol*. 2015; 110(2): 4, doi: [10.1007/s00395-015-0463-z](https://doi.org/10.1007/s00395-015-0463-z), indexed in Pubmed: [25600226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25600226/).
15. Li H, Dong B, Park SW, et al. Hepatocyte nuclear factor 1alpha plays a critical role in PCSK9 gene transcription and regulation by the natural hypocholesterolemic compound berberine. *J Biol Chem*. 2009; 284(42): 28885–28895, doi: [10.1074/jbc.M109.052407](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052407), indexed in Pubmed: [19687008](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19687008/).
16. Dong H, Wang N, Zhao Li, et al. Berberine in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a systemic review and meta-analysis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012; 2012: 591654, doi: [10.1155/2012/591654](https://doi.org/10.1155/2012/591654), indexed in Pubmed: [23118793](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23118793/).
17. Lan J, Zhao Y, Dong F, et al. Meta-analysis of the effect and safety of berberine in the treatment of type 2 diabetes mellitus, hyperlipemia and hypertension. *J Ethnopharmacol*. 2015; 161: 69–81, doi: [10.1016/j.jep.2014.09.049](https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.09.049), indexed in Pubmed: [25498346](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25498346/).
18. Wang L, Ye X, Hua Y, et al. Berberine alleviates adipose tissue fibrosis by inducing AMP-activated kinase signaling in high-fat diet-induced obese mice. *Biomed Pharmacother*. 2018; 105: 121–129, doi: [10.1016/j.biopha.2018.05.110](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.110), indexed in Pubmed: [29852389](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29852389/).
19. Andola HC, Gaira KS, Rawal RS, et al. Habitat-dependent variations in berberine content of *Berberis asiatica* Roxb. ex. DC. in Kumaon, Western Himalaya. *Chem Biodivers*. 2010; 7(2): 415–420, doi: [10.1002/cbdv.200900041](https://doi.org/10.1002/cbdv.200900041), indexed in Pubmed: [20151388](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20151388/).
20. Cameron J, Ranheim T, Kulseth MA, et al. Berberine decreases PCSK9 expression in HepG2 cells. *Atherosclerosis*. 2008; 201(2): 266–273, doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2008.02.004](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.02.004), indexed in Pubmed: [18355829](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18355829/).
21. Xiao HB, Sun ZL, Zhang HB, et al. Berberine inhibits dyslipidemia in C57BL/6 mice with lipopolysaccharide induced inflammation. *Pharmacol Rep*. 2012; 64(4): 889–895, doi: [10.1016/s1734-1140\(12\)70883-6](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(12)70883-6), indexed in Pubmed: [23087140](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23087140/).
22. Liu DI, Xu LJ, Dong H, et al. Inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9: a novel mechanism of berberine and 8-hydroxy dihydroberberine against hyperlipidemia. *Chin J Integr Med*. 2015; 21(2): 132–138, doi: [10.1007/s11655-014-1775-1](https://doi.org/10.1007/s11655-014-1775-1), indexed in Pubmed: [24893659](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24893659/).
23. Adorni MP, Ferri N, Marchianò S, et al. Effect of a novel nutraceutical combination on serum lipoprotein functional profile and circulating PCSK9. *Ther Clin Risk Manag*. 2017; 13: 1555–1562, doi: [10.2147/TCRM.S144121](https://doi.org/10.2147/TCRM.S144121), indexed in Pubmed: [29270015](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29270015/).
24. Spigoni V, Aldigeri R, Antonini M, et al. Effects of a new nutraceutical formulation (berberine, red yeast rice and chitosan) on non-HDL cholesterol levels in individuals with dyslipidemia: results from a randomized, double blind, placebo-controlled study. *Int J Mol Sci*. 2017; 18: 1498.
25. Formisano E, Pasta A, Cremonini AL, et al. Efficacy of Nutraceutical Combination of Monacolin K, Berberine, and Silymarin on Lipid Profile and PCSK9 Plasma Level in a Cohort of Hypercholesterolemic Patients. *J Med Food*. 2020; 23(6): 658–666, doi: [10.1089/jmf.2019.0168](https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0168), indexed in Pubmed: [31663806](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31663806/).
26. Pisciotta L, Bellocchio A, Bertolini S. 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. *Lipids Health Dis*. 2012; 11: 123, doi: [10.1186/1476-511X-11-123](https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-123), indexed in Pubmed: [22998978](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22998978/).
27. Dong B, Li H, Singh AB, et al. Inhibition of PCSK9 transcription by berberine involves down-regulation of hepatic HNF1α protein expression through the ubiquitin-proteasome degradation pathway. *J Biol Chem*. 2015; 290(7): 4047–4058, doi: [10.1074/jbc.M114.597229](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.597229), indexed in Pubmed: [25540198](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25540198/).
28. Dong H, Zhao Y, Zhao Li, et al. The effects of berberine on blood lipids: a systemic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Planta Med*. 2013; 79(6): 437–446, doi: [10.1055/s-0032-1328321](https://doi.org/10.1055/s-0032-1328321), indexed in Pubmed: [23512497](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23512497/).
29. Guo Y, Chen Y, Tan ZR, et al. Repeated administration of berberine inhibits cytochromes P450 in humans. *Eur J Clin Pharmacol*. 2012; 68(2): 213–217, doi: [10.1007/s00228-011-1108-2](https://doi.org/10.1007/s00228-011-1108-2), indexed in Pubmed: [21870106](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21870106/).
30. De Smet E, Mensink RP, Konings M, et al. Acute intake of plant stanol esters induces changes in lipid and lipoprotein metabolism-related gene expression in the liver and intestines of mice. *Lipids*. 2015; 50(6): 529–541, doi: [10.1007/s11745-015-4020-1](https://doi.org/10.1007/s11745-015-4020-1), indexed in Pubmed: [25931382](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25931382/).
31. Simonen P, Stenman UH, Gylling H. Serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 concentration is not increased by plant stanol ester consumption in normo- to moderately hypercholesterolaemic non-obese subjects. The BLOOD FLOW intervention study. *Clin Sci (Lond)*. 2015; 129(5): 439–446, doi: [10.1042/CS20150193](https://doi.org/10.1042/CS20150193), indexed in Pubmed: [25857271](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25857271/).
32. Lammi C, Zanoni C, Scigliuolo GM, et al. Lupin peptides lower low-density lipoprotein (LDL) cholesterol through an up-regulation of the

- LDL receptor/sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) pathway at HepG2 cell line. *J Agric Food Chem.* 2014; 62(29): 7151–7159, doi: [10.1021/jf500795b](https://doi.org/10.1021/jf500795b), indexed in Pubmed: [24972343](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24972343/).
33. Sirtori CR, Lovati MR, Manzoni C, et al. Proteins of white lupin seed, a naturally isoflavone-poor legume, reduce cholesterolemia in rats and increase LDL receptor activity in HepG2 cells. *J Nutr.* 2004; 134(1): 18–23, doi: [10.1093/jn/134.1.18](https://doi.org/10.1093/jn/134.1.18), indexed in Pubmed: [14704287](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14704287/).
 34. Lammi C, Zanoni C, Calabresi L, et al. Lupin protein exerts cholesterol-lowering effects targeting PCSK9: from clinical evidences to elucidation of the in vitro molecular mechanism using HepG2 cells. *Journal of Functional Foods.* 2016; 23: 230–240, doi: [10.1016/j.jff.2016.02.042](https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.02.042).
 35. Pavanello C, Lammi C, Ruscica M, et al. Effects of a lupin protein concentrate on lipids, blood pressure and insulin resistance in moderately dyslipidaemic patients: A randomised controlled trial. *Journal of Functional Foods.* 2017; 37: 8–15, doi: [10.1016/j.jff.2017.07.039](https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.039).
 36. Lammi C, Zanoni C, Aiello G, et al. Lupin peptides modulate the protein-protein interaction of PCSK9 with the low density lipoprotein receptor in HepG2 cells. *Sci Rep.* 2016; 6: 29931, doi: [10.1038/srep29931](https://doi.org/10.1038/srep29931), indexed in Pubmed: [27424515](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27424515/).
 37. Ruscica M, Pavanello C, Gandini S, et al. Effect of soy on metabolic syndrome and cardiovascular risk factors: a randomized controlled trial. *Eur J Nutr.* 2018; 57(2): 499–511, doi: [10.1007/s00394-016-1333-7](https://doi.org/10.1007/s00394-016-1333-7), indexed in Pubmed: [27757595](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27757595/).
 38. Durazzo A, Lucarini M, Souto EB, et al. Polyphenols: a concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytother Res.* 2019; 33(9): 2221–2243, doi: [10.1002/ptr.6419](https://doi.org/10.1002/ptr.6419), indexed in Pubmed: [31359516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31359516/).
 39. Mbikay M, Sirois F, Simoes S, et al. Quercetin-3-glucoside increases low-density lipoprotein receptor (LDLR) expression, attenuates pro-protein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) secretion, and stimulates LDL uptake by Huh7 human hepatocytes in culture. *FEBS Open Bio.* 2014; 4: 755–762, doi: [10.1016/j.fob.2014.08.003](https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.08.003), indexed in Pubmed: [25349780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25349780/).
 40. Li S, Cao H, Shen D, et al. Quercetin protects against oxLDL-induced injury via regulation of ABCA1, LXR α and PCSK9 in RAW264.7 macrophages. *Mol Med Rep.* 2018; 18(1): 799–806, doi: [10.3892/mmr.2018.9048](https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9048), indexed in Pubmed: [29845234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29845234/).
 41. Adorni MP, Cipollari E, Favari E, et al. Inhibitory effect of PCSK9 on Abca1 protein expression and cholesterol efflux in macrophages. *Atherosclerosis.* 2017; 256: 1–6, doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2016.11.019](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.11.019), indexed in Pubmed: [27940374](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27940374/).
 42. Ricci C, Ruscica M, Camera M, et al. PCSK9 induces a pro-inflammatory response in macrophages. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 2267, doi: [10.1038/s41598-018-20425-x](https://doi.org/10.1038/s41598-018-20425-x), indexed in Pubmed: [29396513](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29396513/).
 43. Jia Q, Cao H, Shen D, et al. Quercetin protects against atherosclerosis by regulating the expression of PCSK9, CD36, PPAR γ , LXR α and ABCA1. *Int J Mol Med.* 2019; 44(3): 893–902, doi: [10.3892/ijmm.2019.4263](https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4263), indexed in Pubmed: [31524223](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31524223/).
 44. Kitamura K, Okada Y, Okada K, et al. Epigallocatechin gallate induces an up-regulation of LDL receptor accompanied by a reduction of PCSK9 via the annexin A2-independent pathway in HepG2 cells. *Mol Nutr Food Res.* 2017; 61(8), doi: [10.1002/mnfr.201600836](https://doi.org/10.1002/mnfr.201600836), indexed in Pubmed: [28181408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28181408/).
 45. Jing Yi, Hu T, Lin C, et al. Resveratrol downregulates PCSK9 expression and attenuates steatosis through estrogen receptor α -mediated pathway in L02 cells. *Eur J Pharmacol.* 2019; 855: 216–226, doi: [10.1016/j.ejphar.2019.05.019](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.05.019), indexed in Pubmed: [31085239](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31085239/).
 46. Li Li, Shen C, Huang YX, et al. A new strategy for rapidly screening natural inhibitors targeting the PCSK9/LDLR interaction in vitro. *Molecules.* 2018; 23(9), doi: [10.3390/molecules23092397](https://doi.org/10.3390/molecules23092397), indexed in Pubmed: [30235833](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30235833/).
 47. Wang Yu, Ye J, Li J, et al. Polydatin ameliorates lipid and glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus by downregulating proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). *Cardiovasc Diabetol.* 2016; 15: 19, doi: [10.1186/s12933-015-0325-x](https://doi.org/10.1186/s12933-015-0325-x), indexed in Pubmed: [26833058](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26833058/).
 48. Dong Z, Zhang W, Chen S, et al. Silibinin A decreases statin-induced PCSK9 expression in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Mol Med Rep.* 2019; 20(2): 1383–1392, doi: [10.3892/mmr.2019.10344](https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10344), indexed in Pubmed: [31173243](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31173243/).
 49. Barzaghi N, Crema F, Gatti G, et al. Pharmacokinetic studies on Idb 1016, a silybin-phosphatidylcholine complex, in healthy human subjects. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1990; 15(4): 333–338, doi: [10.1007/BF03190223](https://doi.org/10.1007/BF03190223), indexed in Pubmed: [2088770](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2088770/).
 50. Sui GG, Xiao HB, Lu XY, et al. Naringin activates AMPK resulting in altered expression of SREBPs, PCSK9, and LDLR to reduce body weight in obese C57BL/6J mice. *J Agric Food Chem.* 2018; 66(34): 8983–8990, doi: [10.1021/acs.jafc.8b02696](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02696), indexed in Pubmed: [30092639](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30092639/).
 51. Gao WY, Chen PY, Chen SF, et al. Pinostrobin inhibits proprotein convertase subtilisin/kexin-type 9 (PCSK9) gene expression through the modulation of FoxO3a protein in HepG2 cells. *J Agric Food Chem.* 2018; 66(24): 6083–6093, doi: [10.1021/acs.jafc.8b02559](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02559), indexed in Pubmed: [29862818](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29862818/).
 52. Zia S, Batool S, Shahid R. Could PCSK9 be a new therapeutic target of eugenol? In vitro and in silico evaluation of hypothesis. *Med Hypotheses.* 2020; 136: 109513, doi: [10.1016/j.mehy.2019.109513](https://doi.org/10.1016/j.mehy.2019.109513), indexed in Pubmed: [31812013](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31812013/).
 53. Jo HK, Kim GoW, Jeong KJu, et al. Eugenol ameliorates hepatic steatosis and fibrosis by down-regulating SREBP1 gene expression via AMPK-mTOR-p70S6K signaling pathway. *Biol Pharm Bull.* 2014; 37(8): 1341–1351, doi: [10.1248/bpb.b14-00281](https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00281), indexed in Pubmed: [25087956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25087956/).
 54. Tai MH, Chen PK, Chen PY, et al. Curcumin enhances cell-surface LDLR level and promotes LDL uptake through downregulation of PCSK9 gene expression in HepG2 cells. *Mol Nutr Food Res.* 2014; 58(11): 2133–2145, doi: [10.1002/mnfr.201400366](https://doi.org/10.1002/mnfr.201400366), indexed in Pubmed: [25164566](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25164566/).
 55. Cai Yu, Lu Di, Zou Y, et al. Curcumin protects against intestinal origin endotoxemia in rat liver cirrhosis by targeting PCSK9. *J Food Sci.* 2017; 82(3): 772–780, doi: [10.1111/1750-3841.13647](https://doi.org/10.1111/1750-3841.13647), indexed in Pubmed: [28196290](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28196290/).
 56. Choi HK, Hwang JT, Nam TG, et al. Welsh onion extract inhibits PCSK9 expression contributing to the maintenance of the LDLR level under lipid depletion conditions of HepG2 cells. *Food Funct.* 2017; 8(12): 4582–4591, doi: [10.1039/c7fo00562h](https://doi.org/10.1039/c7fo00562h), indexed in Pubmed: [29130084](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29130084/).
 57. Sung YY, Yoon T, Kim SJ, et al. Anti-obesity activity of *Allium fistulosum* L. extract by down-regulation of the expression of lipogenic genes in high-fat diet-induced obese mice. *Mol Med Rep.* 2011; 4(3): 431–435, doi: [10.3892/mmr.2011.451](https://doi.org/10.3892/mmr.2011.451), indexed in Pubmed: [21468588](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21468588/).
 58. Baer DJ, Novotny JA. Consumption of cashew nuts does not influence blood lipids or other markers of cardiovascular disease in humans: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2019; 109(2): 269–275, doi: [10.1093/ajcn/nqy242](https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy242), indexed in Pubmed: [30753323](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30753323/).
 59. Chan KW, Ismail M, Mohd Esa N, et al. Dietary supplementation of defatted kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seed meal and its phenolics-saponins rich extract effectively attenuates diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Food Funct.* 2018; 9(2): 925–936, doi: [10.1039/c7fo01109a](https://doi.org/10.1039/c7fo01109a), indexed in Pubmed: [29313544](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29313544/).
 60. van Ballegooijen AJ, Beulens JW. The role of vitamin K status in cardiovascular health: evidence from observational and clinical studies. *Curr Nutr Rep.* 2017; 6(3): 197–205, doi: [10.1007/s13668-017-0208-8](https://doi.org/10.1007/s13668-017-0208-8), indexed in Pubmed: [28944098](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28944098/).
 61. Lupo MG, Biancorosso N, Brilli E, et al. Cholesterol-lowering action of a novel nutraceutical combination in uremic rats: insights into the molecular mechanism in a hepatoma cell line. *Nutrients.* 2020; 12(2), doi: [10.3390/nu12020436](https://doi.org/10.3390/nu12020436), indexed in Pubmed: [32050453](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32050453/).

62. Alvi SS, Ansari I, Khan I, et al. Potential role of lycopene in targeting proprotein convertase subtilisin/kexin type-9 to combat hypercholesterolemia. *Free Radic Boil.* 2017; 108: 394–403, doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.012](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.012), indexed in Pubmed: 28412198.
63. Alvi SS, Ansari IA, Ahmad MK, et al. Lycopene amends LPS induced oxidative stress and hypertriglyceridemia via modulating PCSK-9 expression and Apo-CIII mediated lipoprotein lipase activity. *Biomed Pharmacother.* 2017; 96: 1082–1093, doi: [10.1016/j.biopha.2017.11.116](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.116), indexed in Pubmed: 29174038.
64. Chang CL, Deckelbaum RJ. Omega-3 fatty acids: mechanisms underlying 'protective effects' in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2013; 24(4): 345–350, doi: [10.1097/MOL.0b013e3283616364](https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283616364), indexed in Pubmed: 23594712.
65. Yuan F, Wang H, Tian Yu, et al. Fish oil alleviated high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease via regulating hepatic lipids metabolism and metaflammation: a transcriptomic study. *Lipids Health Dis.* 2016; 15: 20, doi: [10.1186/s12944-016-0190-y](https://doi.org/10.1186/s12944-016-0190-y), indexed in Pubmed: 26832365.
66. Sorokin AV, Yang ZH, Vaisman BL, et al. Addition of aspirin to a fish oil-rich diet decreases inflammation and atherosclerosis in ApoE-null mice. *J Nutr Biochem.* 2016; 35: 58–65, doi: [10.1016/j.jnutbio.2016.05.012](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.05.012), indexed in Pubmed: 27394692.
67. Rodríguez-Pérez C, Ramprasath VR, Pu S, et al. Docosahexaenoic acid attenuates cardiovascular risk factors via a decline in proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) plasma levels. *Lipids.* 2016; 51(1): 75–83, doi: [10.1007/s11745-015-4099-4](https://doi.org/10.1007/s11745-015-4099-4), indexed in Pubmed: 26620373.
68. Bjermo H, Iggman D, Kullberg J, et al. Effects of n-6 PUFAs compared with SFAs on liver fat, lipoproteins, and inflammation in abdominal obesity: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2012; 95(5): 1003–1012, doi: [10.3945/ajcn.111.030114](https://doi.org/10.3945/ajcn.111.030114), indexed in Pubmed: 22492369.
69. Jump DB, Jump DB, Botolin D, et al. Polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Lipids.* 1996; 31(Suppl): S7–S11, doi: [10.1007/BF02637044](https://doi.org/10.1007/BF02637044), indexed in Pubmed: 8729087.
70. Graversen CB, Lundbye-Christensen S, Thomsen B, et al. Marine n-3 polyunsaturated fatty acids lower plasma proprotein convertase subtilisin kexin type 9 levels in pre- and postmenopausal women: a randomised study. *Vascul Pharmacol.* 2016; 76: 37–41, doi: [10.1016/j.vph.2015.07.001](https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.07.001), indexed in Pubmed: 26143741.
71. Kourimate S, Le May C, Langhi C, et al. Dual mechanisms for the fibrin-mediated repression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Biol Chem.* 2008; 283(15): 9666–9673, doi: [10.1074/jbc.M705831200](https://doi.org/10.1074/jbc.M705831200), indexed in Pubmed: 18245819.
72. Lambert G, Jarnoux AL, Pineau T, et al. Fasting induces hyperlipidemia in mice overexpressing proprotein convertase subtilisin kexin type 9: lack of modulation of very-low-density lipoprotein hepatic output by the low-density lipoprotein receptor. *Endocrinology.* 2006; 147(10): 4985–4995, doi: [10.1210/en.2006-0098](https://doi.org/10.1210/en.2006-0098), indexed in Pubmed: 16794006.
73. Mann GV. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. *Am J Clin Nutr.* 1974; 27(5): 464–469, doi: [10.1093/ajcn/27.5.464](https://doi.org/10.1093/ajcn/27.5.464), indexed in Pubmed: 4596028.
74. Ruscica M, Pavanello C, Gandini S, et al. a ceutical approach for the management of cardiovascular risk — a combination containing the probiotic *Bifidobacterium longum* BB536 and red yeast rice extract: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutr J.* 2019; 18(1): 13, doi: [10.1186/s12937-019-0438-2](https://doi.org/10.1186/s12937-019-0438-2), indexed in Pubmed: 30795775.
75. Qu L, Li D, Gao X, et al. Di'ao Xinxuekang Capsule, a Chinese medicinal product, decreases serum lipids levels in high-fat diet-fed ApoE-/- mice by downregulating PCSK9. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 1170, doi: [10.3389/fphar.2018.01170](https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01170), indexed in Pubmed: 30443213.
76. Gai Y, Li Y, Xu Z, et al. Pseudoprotodioscin inhibits SREBPs and microRNA 33a/b levels and reduces the gene expression regarding the synthesis of cholesterol and triglycerides. *Fitoterapia.* 2019; 139: 104393, doi: [10.1016/j.fitote.2019.104393](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104393), indexed in Pubmed: 31669721.
77. Li J, Ding L, Song B, et al. Emodin improves lipid and glucose metabolism in high fat diet-induced obese mice through regulating SREBP pathway. *Eur J Pharmacol.* 2016; 770: 99–109, doi: [10.1016/j.ejphar.2015.11.045](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.11.045), indexed in Pubmed: 26626587.
78. Su ZL, Hang PZ, Hu J, et al. Aloe-emodin exerts cholesterol-lowering effects by inhibiting proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in hyperlipidemic rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2020; 41(8): 1085–1092, doi: [10.1038/s41401-020-0392-8](https://doi.org/10.1038/s41401-020-0392-8), indexed in Pubmed: 32203084.
79. Yang JiH, Bang MiAe, Jang CHo, et al. Alginate oligosaccharide enhances LDL uptake via regulation of LDLR and PCSK9 expression. *J Nutr Biochem.* 2015; 26(11): 1393–1400, doi: [10.1016/j.jnutbio.2015.07.009](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.07.009), indexed in Pubmed: 26320675.