View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Via Medica Journals

Folia Cardiologica 2018
tom 13, nr 3, strony 222–235
DOI: 10.5603/FC.2018.0039
Copyright © 2018 Via Medica
ISSN 2353–7752

Stanowisko grupy ekspertów wsparte przez Sekcję Farmakoterapii Sercowo-Naczyniowej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego dotyczące miejsca standaryzowanej kompozycji polifenoli z bergamoty w terapii dyslipidemii oraz jej innego potencjalnego zastosowania w praktyce klinicznej

Expert group consensus endorsed by the Polish Cardiac Society Working Group on Cardiovascular Pharmacotherapy on the place of a standardized bergamot polyphenolic fraction in the treatment of dyslipidaemia and its other potential use in clinical practice

Marcin Barylski[1], Krzysztof J. Filipiak[2], Bogusław Okopień[3], Filip M. Szymański[2], Beata Wożakowska-Kapłon[4, 5], Artur Mamcarz[6]

[1]Klinika Chorób Wewnętrznych i Rehabilitacji Kardiologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
[2]I Katedra i Klinika Kardiologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
[3]Klinika Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej Katedry Farmakologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
[4]I Klinika Kardiologii i Elektroterapii Świętokrzyskiego Centrum Kardiologii w Kielcach
[5]Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach
[6]III Klinika Chorób Wewnętrznych i Kardiologii II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Streszczenie

Sok bergamotowy charakteryzuje się unikatowym profilem flawonoidów. Jest szczególnie bogaty we flawanony i flawony. Standaryzowana kompozycja polifenoli z bergamoty zawiera takie flawonoidy jak sok bergamotowy, jednak ponad 200 razy bardziej skoncentrowane. Liczne dane wskazują na jej znakomite działanie w hiperlipidemii i umiarkowanej hiperglikemii. Ponadto wykazuje ona inne korzystne właściwości plejotropowe. Poniższy dokument stanowi opinię grupy ekspertów będącą podsumowaniem aktualnej wiedzy na temat flawonoidów bergamoty i ich możliwego zastosowania w wybranych populacjach chorych.

Słowa kluczowe: standaryzowana kompozycja polifenoli z bergamoty, zaburzenia metaboliczne, stanowisko ekspertów

Folia Cardiologica 2018; 13, 3: 222–235

Adres do korespondencji: dr n. med. Marcin Barylski FESC, Klinika Chorób Wewnętrznych i Rehabilitacji Kardiologicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Uniwersytecki Szpital Kliniczny im. Wojskowej Akademii Medycznej — Centralny Szpital Weteranów, Plac Hallera 1, 90–647 Łódź, tel. 42 639 30 80, faks 42 639 30 80, e-mail: mbarylski3@wp.pl

Wstęp

W ostatnich latach rosnącym zainteresowaniem cieszy się możliwość wykorzystania biologicznie aktywnych substancji pochodzenia roślinnego do zapobiegania różnym typom schorzeń, w tym chorobom cywilizacyjnym, oraz ich leczenia. W wielu badaniach klinicznych i epidemiologicznych dowiedziono, że dieta będąca źródłem wielu związków o dobroczynnym wpływie na organizm, w tym związków polifenolowych, przyczynia się do obniżenia ryzyka występowania między innymi chorób układu sercowo-naczyniowego, otyłości, cukrzycy typu 2 i nowotworów [1–15].

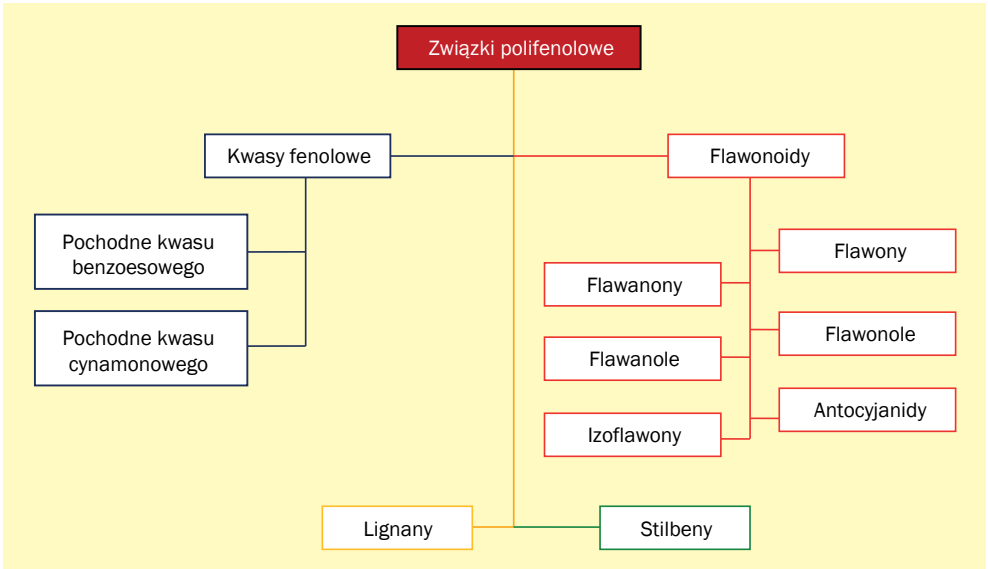
Wraz ze wzrostem świadomości społeczeństwa w zakresie zagrożeń związanych z rosnącą chemizacją środowiska, stresem, promieniowaniem jonizującym, paleniem tytoniu, siedzącym trybem życia, obecnością jonów metali w pożywieniu, jak również spożywaniem dużych ilości wysoko przetworzonej żywności, zwiększa się zainteresowanie medycyną alternatywną i działaniami profilaktycznymi służącymi poprawie jakości życia. Biologicznie czynne związki pochodzenia roślinnego są postrzegane nie tylko jako tańsza, ale przede wszystkim jako bezpieczniejsza dla zdrowia alternatywa tradycyjnych, syntetycznych farmaceutyków [1, 2, 16]. Szczególnie cennymi komponentami surowców roślinnych są substancje o właściwościach antyoksydacyjnych. Zainteresowanie tymi związkami nasiliło się na początku lat 90. XX wieku, kiedy odkryto, że u podłoża schorzeń, takich jak miażdżyca czy nowotwory, leży stres oksydacyjny spowodowany zwiększoną produkcją reaktywnych form tlenu (ROS, *reactive oxygen species*) i wolnych rodników. Do głównych antyoksydantów roślinnych należą związki polifenolowe, które stanowią grupę ponad 8 tys. związków, co czyni je najbardziej rozpowszechnionymi przeciwutleniaczami w świecie roślin.

W licznych badaniach udowodniono, że szczególnie polifenole bergamoty wykazują wiele korzystnych właściwości, wpływając między innymi na metabolizm lipidów i glukozy, co może mieć istotne znaczenie w prewencji pierwotnej chorób układu sercowo-naczyniowego.

Charakterystyka związków polifenolowych

Polifenole są związkami organicznymi z grupy fenoli zawierającymi przynajmniej dwie grupy hydroksylowe przyłączone do pierścienia benzenowego o charakterze kwasowym. Związki polifenolowe stanowią bardzo zróżnicowaną grupę zarówno pod względem masy cząsteczkowej, budowy i właściwości, jak i funkcji biologicznych. Zależnie od liczby grup hydroksylowych oraz sposobu połączenia pierścieni aromatycznych wyróżnia się cztery główne klasy tych związków: flawonoidy, kwasy fenolowe, stilbeny i lignany (ryc. 1) [1–3, 15]. Sama budowa pierścieniowa i obecność grup hydroksylowych nie pozwalają na zaliczenie danego związku do grupy polifenoli, gdyż mianem tych związków określa się wyłącznie substancje będące produktami wtórnego metabolizmu roślin. Synteza związków polifenolowych nasila się w warunkach stresowych, co stanowi naturalną odpowiedź obronną chroniącą rośliny, między innymi przed atakiem owadów, grzybów, wirusów i bakterii, jak również promieniowaniem ultrafioletowym (UV, *ultra-violet*) [1, 2].

Związki polifenolowe gromadzą się w naziemnych częściach roślin — łodygach, liściach i kwiatach, a przede wszystkim owocach. Odpowiadają one również za ich barwę, dlatego owoce o intensywnej pigmentacji



Rycina 1. Klasyfikacja związków polifenolowych (opracowano na podstawie [1–3, 15])

charakteryzują się wysoką zawartością tych związków. Bogatym źródłem polifenoli są również warzywa i przyprawy oraz popularne napoje, takie jak kawa, kakao, herbaty zielona i czarna oraz czerwone wino [1–3, 17].

Aktywność biologiczna związków polifenolowych zależy w dużej mierze od stopnia ich przyswajalności w przewodzie pokarmowym. Z kolei szybkość i wydajność absorpcji jelitowej są zdeterminowane strukturą chemiczną danego związku. Większość polifenoli występuje naturalnie w postaci glikozydów, znacznie rzadziej związki te są obecne w formie wolnych aglikonów [1, 3, 18]. Aglikony mogą ulegać wchłanianiu na drodze dyfuzji biernej, natomiast glikozydy ulegają wcześniejszej hydrolizie enzymatycznej w jelicie. Istotny wpływ na biodostępność związków polifenolowych ma mikroflora jelitowa zdolna do metabolizowania polifenoli z udziałem wytwarzanych przez bakterie enzymów, takich jak *β*-glukozydaza, *β*-glukuronidaza i hydrogenazy [1, 3, 18].

Bergamota — klejnot Kalabrii

Pomarańcza bergamota (*Citrus bergamia Risso & Poiteau*), nazywana również bergamotą lub bergamotką, jest gatunkiem rośliny cytrusowej z rodziny rutowatych (*Rutaceae*). Pochodzi prawdopodobnie z Indii, a obecnie jest uprawiana niemal wyłącznie na południu Włoch w regionie Kalabrii (*Reggio di Calabria*), choć rośnie również w innych krajach śródziemnomorskich, a nawet w Ameryce Południowej [19]. Swoją nazwę wzięła od włoskiego miasta Bergamo, gdzie olejek z bergamoty sprzedawano po raz pierwszy, a które do dziś cieszy się mianem stolicy tego eterycznego olejku. To niewielkie drzewo jest trudne w uprawie (duże wymagania glebowe i klimatyczne, mała odporność na choroby), osiąga wysokość 4 m i kwitnie dwukrotnie w ciągu roku. Ma białe, silnie pachnące kwiaty, mięsiste i błyszczące liście, żółtozielone owoce przypominające małą pomarańczę oraz pachnący, kwaśny miąższ. Owoc bergamoty nie jest owocem deserowym, ponieważ jest gorzki i cierpki. Głównym surowcem pozostaje gruba i pomarszczona skórka zawierająca duże ilości olejku bergamowego, który jest uzyskiwany z jej zewnętrznej części — naowocni. Owoce zbiera się od grudnia do marca. Jedno dojrzałe 12-letnie drzewo wydaje około 350 owoców, a starsze — do 800 owoców. Z tej liczby owoców można otrzymać 0,5–1 kg olejku pozyskiwanego za pomocą maszyn *pellatrici*. W urządzeniach *pellatrici* owoce są obtaczane między dwoma tarczami, z kolcami i ostrzami na powierzchni. Olejek z wodą i startymi fragmentami naowocni jest wyciskany i odsączany, a następnie poddawany destylacji z parą wodną [20].

Skórka owoców, ale również kwiaty i liście są źródłem eterycznych olejków — wspomnianego wyżej olejku bergamowego stosowanego między innymi w produkcji herbaty *earl grey* oraz olejku nerolowego stosowanego w perfumerii (np. woda kolońska) [19]. Wykorzystuje się je również w aromaterapii oraz medycynie naturalnej.

Flawonoidy bergamoty i ich metabolizm

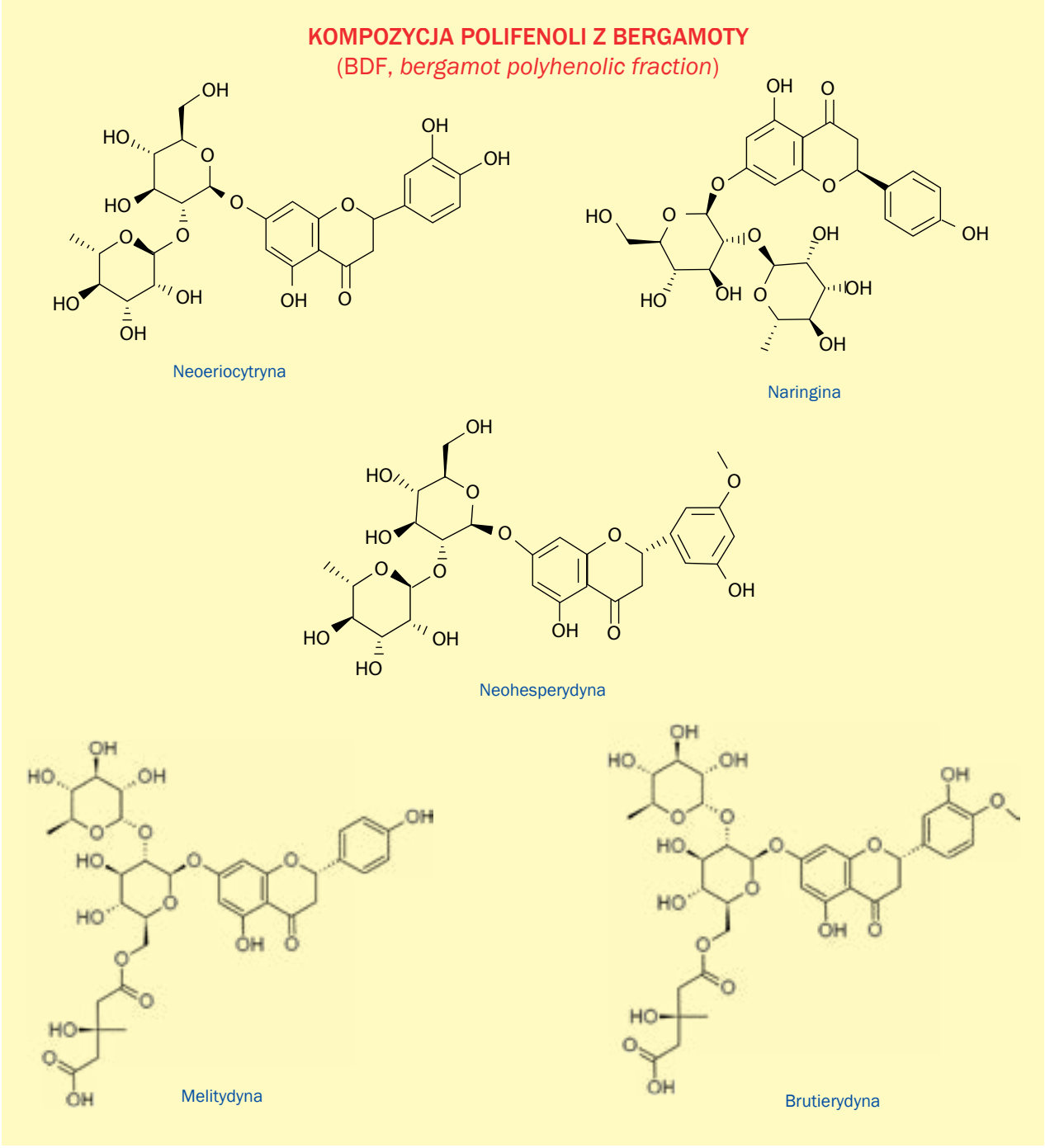
Sok bergamotowy charakteryzuje się unikatowym profilem flawonoidów i jest szczególnie bogaty we flawanony i flawony. Wykazuje on częściowe podobieństwo do soku z pomarańczy pachnącej (*chinotto, Citrus myrtifolia*) oraz pomarańczy gorzkiej (*Citrus aurantium*) [21, 22].

Zawiera stosunkowo rzadkie neoeriocytrynę i neohesperydynę oraz, jak niedawno odkryto, rzadko spotykane brutierydynę oraz melitydynę [23]. Dokładna analiza zawartości flawonoidów w 42 gatunkach cytrusów i ich odmian wykazała, że ilość flawonoidów w przeliczeniu na jednostkę objętości soku lub na jednostkę masy *albedo* (biała, wewnętrzna część skórki) jest największa właśnie w przypadku pomarańczy bergamoty. Bergamota zawiera największe stężenia flawanonów: neoeriocytryny, naringiny, neohesperydyny, melitydyny i brutierydyny, a także największą zawartość niektórych flawonów: rhoifoliny, neodiosminy, ponciriny i rutyny [24].

Sok bergamotowy można zagęścić opatentowaną metodą, obejmującą preparatywną chromatografię wykluczania przy użyciu usieciowanego polistyrenu (żelu polimerowego) oraz odsączanie eluatu w celu uzyskania proszku — skoncentrowanej mieszaniny flawonoidów bergamotowych, czyli tak zwanej kompozycji polifenoli z bergamoty (BPF, *bergamot polyphenolic fraction*) [25]. W ponad 40% BPF składa się z flawonoidów, węglowodanów, pektyn i innych związków, w przeciwieństwie do proszków z soku bergamotowego uzyskanych metodą suszenia rozpyłowego, w których maksymalne stężenie polifenoli wynosi 1%. Frakcja bergamotowo-polifenolowa dokładnie odzwierciedla profil polifenoli soku bergamotowego (ryc. 2), z tą tylko różnicą, że flawonoidy są w niej ponad 200 razy bardziej skoncentrowane [26].

Spośród flawonoidów obecnych w BPF (oraz w soku bergamotowym) 95% to flawanony, natomiast flawony można znaleźć w pozostałych 5%. Do tej pory nie opublikowano pracy dotyczącej bioprzyswajalności i właściwości farmakokinetycznych BPF. Opisano jednak parametry absorpcji, metabolizmu i wydalania kilku pojedynczych flawonoidów obecnych w soku bergamotowym.

W przewodzie pokarmowym glikozydy flawonoidowe zostają pozbawione reszt węglowodanowych przez bakterie flory jelitowej. Powstające w ten sposób aglikony wykazują znacznie większą biodostępność [27, 28]. Należy podkreślić, że BPF *a priori* zawiera znaczący odsetek polifenoli w postaci aglikonów. Aglikony flawonoidowe diosmin, hesperydyny i naringiny (odpowiednio: diosmetyna, hesperytyna i naringenina), w przeciwieństwie do glikozydów, dużo łatwiej pokonują błonę komórkową enterocytów [29]. Mimo tego biodostępność flawonoidów pozostaje



Rycina 2. Struktury chemiczne najczęstszych flawonoidów występujących w kompozycji polifenoli z bergamoty (na podstawie [26])

niska i szacuje się, że tylko 10% wszystkich spożywanych polifenoli jest absorbowanych, choć wielkość absorpcji może być indywidualnie różna [28].

Główną drogą metabolizowania polifenoli jest faza II metabolizmu. Koniugacja wolnych grup fenolowych poprzez glukuronidację i sulfację zwiększa ich polarność i rozpuszczalność w wodzie, umożliwiając tym samym usunięcie ich z organizmu [28]. Zasadniczo flawonoidy cechuje krótki okres półtrwania i nie jest jasne, czy ich metabolity zachowują jakąkolwiek aktywność biologiczną. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że sulfonowane lub metylowane metabolity resweratrolu zachowują pełną lub częściową aktywność związku macierzystego [30], jest wielce prawdopodobne, że metabolity flawonoidów cytrusowych zachowują się w podobny sposób i wpływają na modulację wewnątrzkomórkową. Dlatego większość efektów molekularnych obserwowanych *in vitro* wywołuje odpowiednią odpowiedź biologiczną *in vivo*.

Mechanizmy molekularne działania flawonoidów

Zaproponowano kilka mechanizmów wyjaśniających hipoglikemizujące oraz hipolipemizujące działanie flawonoidów, ale aktywacja kinazy białkowej aktywowanej przez adenozynomonofosforan (AMPK, *adenosine monophosphate-activated protein kinase*), która działa jako integrator sygnałów regulacyjnych, monitorujących systemowy i komórkowy stan energetyczny ustroju, wydaje się najbardziej prawdopodobna. Kinaza ta jest kluczowym regulatorem metabolizmu glukozy i kwasów tłuszczowych we wszystkich tkankach. Jest również ważnym celem działania metforminy, doskonale znanego leku przeciwcukrzycowego. Liczne dowody wskazują, że niektóre flawonoidy (np. naringina) obecne w bergamocie mogą aktywować AMPK, ale nie jest jasne, jak dokładnie wygląda mechanizm molekularny, ponieważ ani metformina, ani flawonoidy nie wiążą się bezpośrednio z AMPK [31].

Z historycznego punktu widzenia szlak metaboliczny AMPK pierwotnie uważano za sensor i regulator równowagi energetycznej ustroju na poziomie komórkowym, natomiast współcześnie wiadomo, że jest również zaangażowany w utrzymanie równowagi energetycznej na poziomie całego organizmu [32]. Większość procesów komórkowych wymaga energii i odbywa się dzięki hydrolizie adenozynotrifosforanu (ATP, *adenosine triphosphate*) do adenozynodifosforanu (ADP, *adenosine diphosphate*) i fosforanu (lub rzadziej do AMP i pirofosforanu). Kinaza białkowa aktywowana przez AMP jest filogenetycznie konserwatywną kinazą białkową serynowo-treoninową (LKB1, *liver kinase B1*), uznawaną za czujnik systemowych i komórkowych zasobów energetycznych, odgrywającą kluczową rolę w ochronie funkcji komórek w warunkach niedoborów energetycznych i głównym metabolicznym przełącznikiem pośredniczącym w adaptacji komórek do różnych warunków środowiska [33]. Jej aktywność wzrasta w następstwie wystąpienia stresu metabolicznego, który albo ingeruje w tworzenie ATP w procesach katabolicznych (np. niedobór glukozy, niedotlenienie, niedokrwienie), albo przyspiesza zużycie ATP (np. skurcz mięśni). Nawet minimalny niedobór ATP powoduje aktywację AMPK. Aktywowana AMPK przełącza komórki ze stanu anabolicznego w kataboliczny, zamykając szlaki zużywające ATP, przywracając tym samym równowagę energetyczną. W efekcie zahamowane zostają synteza glukozy, tłuszczów, białek oraz wzrost komórek, a pobudzane są wychwyt i oksydacja kwasów tłuszczowych oraz wychwyt glukozy i glikoliza [34, 35]. Ponadto przewlekła aktywacja AMPK naśladuje efekt intensywnego wysiłku fizycznego poprzez indukcję ekspresji heksokinazy mięśniowej oraz transporterów glukozy (GLUT-4, *glucose transporter type 4*) [36].

Znaczenie AMPK w kontroli produkcji glukozy przez wątrobę podkreślają wyniki badań przeprowadzonych *in vitro* i *in vivo*, które dowodzą, że farmakologiczna aktywacja AMPK prowadzi do zahamowania wątrobowej produkcji glukozy. Początkowo w badaniach na zwierzętach wykazano, że dożylne podanie aktywatora AMPK (AICAR, *5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-B-D-ribonucleoside*) szczurom zdrowym oraz obciążonym insulinoopornością prowadziło do zahamowania wątrobowej produkcji glukozy.

Kinaza białkowa aktywowana przez AMP odgrywa szczególną rolę w nasilaniu oksydacji kwasów tłuszczowych w mięśniach szkieletowych poprzez fosforylację karboksylazy acetylokoenzymu A (ACC, *acetyl-CoA carboxylase*) [37]. Fosforylacja ACC przez AMPK redukuje jej aktywność i prowadzi do zmniejszenia produkcji malonylo-CoA będącego inhibitorem palmitylotransferazy karnitynowej (CPT-1, *carnitine palmitoyltransferase I*). Redukcja malonylo-CoA zmniejsza hamowanie CPT-1 i promuje, pośredniczony przez CPT-1, transport kwasów tłuszczowych do mitochondrium w celu ich oksydacji. Pośredniczone przez AMPK zmniejszenie zawartości wewnątrzkomórkowej malonylo-CoA i kwasów tłuszczowych prowadzi z kolei do poprawy wrażliwości na insulinę, ponieważ zarówno malonylo-CoA, jak i nadmiar metabolitów lipidowych, w tym tłuszczowych acylo-CoA, ceramidów i diacylogliceroli, powodują oporność na insulinę w mięśniach szkieletowych [38].

Również w wątrobie AMPK reguluje kilka kluczowych białek zaangażowanych w metabolizm lipidów. Fosforyluje i inaktywuje zarówno ACC, jak i reduktazę hydroksymetyloglutarylo-CoA (HMG-CoA, *hydroxymethylglutaryl-CoA*), ograniczając w ten sposób ilość enzymu potrzebną odpowiednio do syntezy kwasów tłuszczowych i cholesterolu. Podobnie jak ma to miejsce w mięśniach szkieletowych również w wątrobie inaktywacja ACC przez AMPK prowadzi do zmniejszenia produkcji malonylo-CoA, podwyższenia aktywności CPT-1 i zwiększenia oksydacji kwasów tłuszczowych. Uogólniając, aktywacja AMPK w wątrobie powoduje stymulację oksydacji kwasów tłuszczowych oraz zablokowanie syntezy cholesterolu i triglicerydów (TG, *triglycerides*). Ponadto AMPK hamuje ekspresję mRNA białka wiążącego elementy regulatorowe genów enzymów biorących udział w syntezie steroli (SREBP-1, *sterol regulatory element-binding protein 1*), zaangażowanych w patogenezę insulinooporności, dyslipidemii i cukrzycy typu 2 [34, 39]. Aktywacja AMPK jest zatem molekularnym celem wielu naturalnych polifenoli i może odpowiadać za ich liczne, korzystne terapeutyczne właściwości, szczególnie w kontekście zaburzeń metabolicznych: otyłości, cukrzycy, hiperlipidemii i niealkoholowego stłuszczenia wątroby.

Jak wspomniano wcześniej, sok bergamotowy oraz BPF zawierają dwa rzadkie flawonoidy — brutierydynę i melitydynę, które mogą działać w mechanizmie „statynopodobnym", jako bezpośrednie inhibitory reduktazy HMG-CoA [23, 40]. Należy jednak pamiętać, że silne hamowanie HMG-CoA, wykazane u pacjentów otrzymujących BPF w badaniu przeprowadzonym przez Mollace'a i wsp. [25], mogło

również wynikać z opisanej wcześniej aktywacji AMPK. Jak dowiedziono, silne hipolipemizujące działanie wyciągów z innych owoców cytrusowych (mandarynek, cytryn) niezawierających brutierydyny i melitydyny, ale głównie hesperydynę, naringinę i pektyny, jest powodowane hamowaniem nie tylko reduktazy HMG-CoA, ale również innego enzymu z grupy transferaz odpowiedzialnego za estryfikację cholesterolu — acylotransferazy acylo-CoA-cholesterolu (ACAT) [41]. Co ciekawe, w badaniach klinicznych nie wykazano istotnego wpływu wyselekcjonowanych flawonoidów [42] na profil lipidowy, w przeciwieństwie do produktów złożonych, które korzystnie modyfikowały stężenia cholesterolu i TG. Fakt ten sugeruje, że trudno jest wskazać jeden aktywny związek odpowiedzialny za zahamowanie reduktazy HMG-CoA. Efekt ten jest prawdopodobnie spowodowany interakcją różnych mechanizmów molekularnych, ale może się też wiązać z działaniem polifenoli, których jeszcze precyzyjnie nie scharakteryzowano.

Innym potencjalnym celem działania flawonoidów bergamotowych mogą być fosfodiesterazy (PDE, *phosphodiesterases*) cyklicznych nukleotydów, które katalizują hydrolizę przekaźników II rzędu, tj. cyklicznego AMP (cAMP, *cyclic AMP*) lub cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP, *cyclic guanosine monophosphate*), regulując ich stężenia wewnątrzkomórkowe i powodując odpowiednie reakcje fizjologiczne. Fosfodiesterazy cyklicznych nukleotydów są produktami różnych genów kodujących białka o masach od 60 do 130 kDa i sklasyfikowano je w 11 rodzinach (PDE1–PDE11) [43]; PDE3B i niektóre izoformy PDE4 charakteryzują się wysokim powinowactwem do cAMP i odgrywają kluczową rolę w regulowaniu metabolizmu i lipolizy [44]. Szybkość hydrolizy TG (lipolizy) jest dodatnio skorelowana ze wzrostem stężenia wewnątrzkomórkowego cAMP, który aktywuje kinazę białkową A (PKA, *protein kinase A*). Aktywowana PKA fosforyluje i aktywuje hormonozależną lipazę (HSL, *hormone-sensitive lipase*), która bezpośrednio przeprowadza proces hydrolizy TG [45].

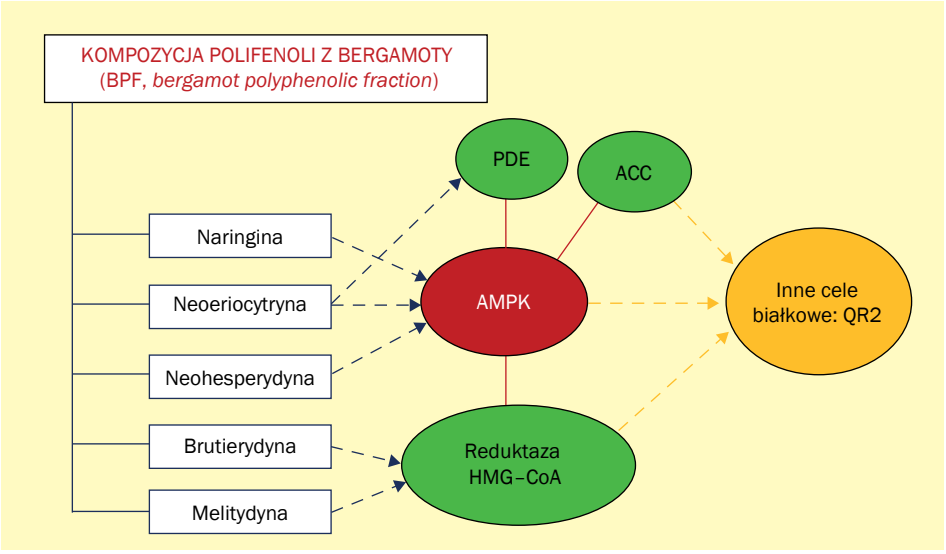
Niektóre flawonoidy mogą indukować lipolizę w tkance tłuszczowej, prawdopodobnie hamując PDE i zmniejszając rozkład cAMP. Może to tłumaczyć korzystne działanie w otyłości niektórych suplementów diety bogatych we flawonoidy cytrusowe [45]. Szlaki sygnałowe cAMP modulują także glukoneogenezę, glikogenolizę i wydzielanie insuliny [46].

Liczne rozważania w zakresie chemii obliczeniowej sugerują, że zawarta w soku bergamotowym neoriocytryna może być silnym inhibitorem PDE3. Istnieją dwie różne izoformy PDE3 — PDE3A i PDE3B. Wykazują one specyficzne różnice w ekspresji. Izoformę PDE3A cechuje znaczna ekspresja głównie w układzie sercowo-naczyniowym, na przykład w płytkach krwi, komórkach mięśni gładkich naczyń i komórkach mięśnia sercowego [47]. Izoforma PDE3B natomiast ulega ekspresji w komórkach ważnych dla metabolizmu energetycznego: hepatocytach, brunatnych i białych adipocytach, komórkach β trzustki [48, 49].

Charakterystyczną cechą izoformy PDE3B jest sytuacja, w której farmakologiczne osłabienie jej działania powoduje zwiększenie katabolizmu i w konsekwencji redukcję gromadzenia się tkanki tłuszczowej i magazynowania glukozy [50]. Co ciekawe, brak aktywności PDE3B w wątrobie prowadzi do poważnego rozregulowania metabolizmu glukozy, TG i cholesterolu, co sugeruje, że modulacyjna rola PDE3B ma kluczowe znaczenie dla homeostazy lipidów i glukozy [50, 51]. Dysregulacja PDE3B może również odgrywać istotną rolę w rozwoju stłuszczenia wątroby u osób z zespołem metabolicznym lub cukrzycą typu 2 [51]. Jest wielce prawdopodobne, że flawonoidy bergamotowe pośredniczą w korzystnym wpływie na homeostazę lipidów i glukozy poprzez modulację PDE3B, ale tę hipotezę należy formalnie zweryfikować w badaniach eksperymentalnych.

Kolejnym mechanizmem molekularnym kardioprotekcyjnego działania flawonoidów, który zidentyfikowano, jest wpływ na metabolizm nukleotydów adenozynowych w śródbłonku naczyniowym. W licznych badaniach wykazano, że resweratrol, kwercetyna oraz inne flawonoidy, w tym te występujące w soku bergamotowym, są silnymi inhibitorami oksydoreduktazy chinonowej (QR2, *quinone reductase 2*), co powoduje wzrost aktywności komórkowych enzymów antyoksydacyjnych i zwiększenie odporności komórek na stres oksydacyjny. Narażenie kardiomiocytów na stres, a następnie poddanie ich działaniu flawonoidów zmniejsza stres oksydacyjny, powoduje wzrost aktywności enzymów zapobiegających powstawaniu wolnych rodników i nasila syntezę tlenku azotu (NO, *nitric oxide*) [52]. Nie wiadomo, czy QR2 jest bezpośrednio zaangażowana w metabolizm lipidów i glukozy, ale wstępne dane sugerują, że hamowanie QR2 przez specyficzne inhibitory (NMDPEF, *N-[2-(2-methoxy6H-dipyrido{2,3-a:3,2-e}pyrrolizin-11-yl) ethyl]-2-furamide*) i flawonoidy (resweratrol, BPF) zmniejsza wykorzystanie glukozy i glikolizę poprzez promowanie mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej, co skutkuje redukcją wytwarzania kwasu mlekowego w środowisku komórkowym. Zatem modulacja aktywności QR2 przez flawonoidy prawdopodobnie przyczynia się do korzystnego działania przeciwcukrzycowego i hipolipemizującego tych związków.

Warto podkreślić, że farmakologiczne i molekularne efekty działania „fitokompleksu" lub mieszaniny substancji czynnych występujących w roślinach mogą być zupełnie inne niż efekty działania pojedynczych flawonoidów, ze względu na synergistyczne działanie mieszaniny. Wydaje się więc oczywiste, że polifenole bergamotowe i sama BPF powinny być badane w ustalonych układach modelowych *in vitro* oraz *in vivo*, aby uzyskać bardziej szczegółowy wgląd w mechanizmy ich działania. Najważniejsze potencjalne cele molekularne flawonoidów bergamotowych przedstawiono na rycinie 3 [26].



Rycina 3. Potencjalne cele molekularne flawonoidów bergamotowych (na podstawie [26]); PDE (*phosphodiesterase*) — fosfodiesteraza; ACC (*acetyl-CoA carboxylase*) — karboksylaza acetylokoenzymu A; AMPK (*adenosine monophosphate-activated protein kinase*) — kinaza białkowa aktywowana przez adenozynomonofosforan; QR2 (*quinone reductase*) — reduktaza chinonowa; HMG-CoA (*hydroxymethylglutaryl-CoA*) — hydroksymetyloglutarylo-koenzym A

Kompozycja polifenoli z bergamoty w badaniach klinicznych

Działanie hipolipemizujące/ /hipoglikemizujące

Do randomizowanego badania, przeprowadzonego przez Mollace i wsp. [25] metodą podwójnie ślepej próby i kontrolowanego placebo, zakwalifikowano 237 chorych z hipercholesterolemią. Pacjentów podzielono na 3 grupy: grupę A — 104 osoby z izolowaną hipercholesterolemią (stężenie cholesterolu frakcji LDL [LDL-C, *low-density lipoprotein-cholesterol*] ≥ 130 mg/dl), grupę B — 42 osoby z hiperlipidemią mieszaną, grupę C — 59 osób z zespołem metabolicznym (hiperlipidemią mieszaną i glikemią > 110 mg/dl). Każda grupa została podzielona na 3 podgrupy, w których pacjenci otrzymywali BPF w dawce 500 mg/dobę, 1000 mg/dobę lub placebo. Pozostałych 32 pacjentów, którzy przerwali terapię simwastatyną z powodu bólów mięśniowych i znaczącego podwyższenia stężenia kinazy kreatynowej, przydzielono do grupy D. Przyjmowali oni BPF w dawce 1500 mg/dobę, utrzymując jednocześnie dietę na poziomie 1600 kcal/ /dobę [25].

Z badania wykluczono osoby z jawną chorobą wątroby, przewlekłą chorobą nerek, niedoczynnością tarczycy, miopatią, niekontrolowaną cukrzycą, ciężkim nadciśnieniem tętniczym, po udarze mózgu i ostrym zdarzeniu wieńcowym w ciągu ostatnich 30 dni, po rewaskularyzacji wieńcowej w ciągu ostatnich 3 miesięcy lub nadużywające alkoholu. Żaden z pacjentów nie stosował hormonalnej terapii zastępczej ani suplementów antyoksydacyjnych lub witaminowych w ciągu 2 miesięcy poprzedzających badanie.

Wszystkim badanym przez kolejne 30 dni codziennie podawano BPF lub placebo (przed posiłkiem). W celu monitorowania możliwych działań niepożądanych kontrolowano stężenie aminotransferaz alaninowej i asparaginianowej, kinazy kreatynowej, azotu mocznika, kreatyniny oraz liczby krwinek przed terapią i po niej. Dodatkowo kontrolowano funkcję śródbłonka naczyniowego za pomocą obrazowania ultrasonograficznego tętnicy ramiennej, oceniając wzrost jej średnicy podczas przekrwienia reaktywnego.

Trzydziestodniowa terapia BPF (500 mg lub 1000 mg) skutkowała znacznym obniżeniem stężeń cholesterolu całkowitego (TC, *total cholesterol*) i LDL-C oraz istotnym wzrostem stężenia cholesterolu frakcji HDL (HDL-C, *high-density lipoprotein-cholesterol*) (tab. 1). W grupie przyjmującej placebo nie odnotowano istotnych zmian parametrów lipidowych [25].

Znaczącą redukcję zaobserwowano również w przypadku TG (tab. 2). W szczególności bardzo dobrą odpowiedź na terapię BPF odnotowano wśród chorych z zespołem metabolicznym w grupie C. Po leczeniu BPF w dużej dawce wyjściowe średnie wartości TC 278 mg/dl, LDL-C 188 mg/ /dl oraz TG 267 mg/dl uległy obniżeniu odpowiednio do 199 mg/dl, 126 mg/dl oraz 158 mg/dl. Zmniejszeniu stężenia LDL-C towarzyszyło zależne od dawki zwiększenie stężenia HDL-C u wszystkich pacjentów. U 10% osób z najlepszą odpowiedzią na leczenie wzrost stężenia HDL-C był niezwykle wysoki — 64,6%. Dodatkowo u pacjentów z zespołem metabolicznym uzyskano bardzo istotne ($p < 0,0001$) obniżenie stężenia glukozy we krwi (średnia redukcja o 18,9% w grupie leczonej BPF w dawce 500 mg oraz o 22,4% w grupie leczonej BPF w dawce 1000 mg).

Tabela 1. Procentowe zmiany stężeń TC, LDL-C oraz HDL-C u pacjentów poddanych 30-dniowej terapii BPF (na podstawie [25])

Grupy pacjentów	Dawka dobowa BPF [mg]	Średnia zmiana (%)		
		TC	LDL-C	HDL-C
Grupa A Izolowana hipercholesterolemia	500	–20,7 ± 1,9	–23,0 ± 1,9	25,9 ± 2,3
	1000	–30,9 ± 1,5	–38,6 ± 1,5	39,0 ± 2,8
	Placebo	–0,4 ± 0,4	–1,7 ± 0,5	0,5 ± 1,1
Grupa B Hiperlipidemia mieszana	500	–21,9 ± 1,8	–25,3 ± 2,0	17,3 ± 1,4
	1000	–27,7 ± 3,4	–33,4 ± 3,9	35,8 ± 4,2
	Placebo	–0,5 ± 0,5	–0,5 ± 0,7	–1,3 ± 1,8
Grupa C Zespół metaboliczny	500	–24,7 ± 2,6	–26,8 ± 3,6	16,5 ± 1,6
	1000	–28,1 ± 2,6	–33,2 ± 3,0	29,6 ± 1,8
	Placebo	0,5 ± 0,5	–0,9 ± 1,4	2,9 ± 2,0
Grupa D Nietolerancja statyn	1500	–25,0 ± 1,6	–27,6 ± 0,5	23,8 ± 1,7
Grupy A + B + C	500	–21,8 ± 1,4	–24,1 ± 1,5	22,3 ± 1,3
	1000	–29,4 ± 1,3	–36,0 ± 1,4	40,1 ± 1,9
	Placebo	–0,1 ± 0,3	–1,1 ± 0,5	1,2 ± 0,9

BPF (*bergamot polyphenolic fraction*) — kompozycja polifenoli z bergamoty; HDL-C (*high-density lipoprotein-cholesterol*) — cholesterol frakcji lipoprotein o dużej gęstości; LDL-C (*low-density lipoprotein-cholesterol*) — cholesterol frakcji lipoprotein o małej gęstości; TC (*total cholesterol*) — cholesterol całkowity

Tabela 2. Procentowe zmiany stężeń TG oraz glukozy u pacjentów poddanych 30-dniowej terapii BPF (na podstawie [25])

Grupy pacjentów	Dawka dobowa BPF [mg]	Średnia zmiana (%)	
		TG	Glukoza
Grupa B Hiperlipidemia mieszana	500	–28,2 ± 3,9	–
	1000	–37,9 ± 3,3	–
	Placebo	0,1 ± 0,5	–
Grupa C Zespół metaboliczny	500	–32,7 ± 2,5	–18,9 ± 1,2
	1000	–41,0 ± 2,6	–22,4 ± 1,0
	Placebo	0,0 ± 0,6	–0,5 ± 0,7

BPF (*bergamot polyphenolic fraction*) — kompozycja polifenoli z bergamoty; TG (*triglycerides*) — triglicerydy

W grupie przyjmującej placebo nie odnotowano istotnych zmian stężenia glukozy (tab. 2) [25].

Maksymalny wpływ na wszystkie parametry lipidowe zaobserwowano u osób przyjmujących BPF w dawce 1000 mg/dobę, ale różnice istotne statystycznie między dawką 500 mg a 1000 mg wystąpiły tylko w przypadku stężenia HDL-C [25].

W grupie 32 chorych nietolerujących statyn przyjmowanie BPF w dawce 1500 mg/dobę (3 kapsułki) skutkowało obniżeniem stężeń TC średnio o 25% i LDL-C o 27,6% oraz wzrostem stężenia HDL-C o 23,8% (tab. 1). Co niezwykle istotne, nie obserwowano żadnych działań niepożądanych [25]. Dodatkowo w grupach przyjmujących BPF w dawkach 500 mg i 1000 mg stwierdzono poprawę w zakresie przekrwienia reaktywnego w obrębie tętnicy ramiennej, co wskazywałoby na korzystny wpływ BPF na śródbłonek naczyniowy u chorych z zaburzeniami gospodarek lipidowej i węglowodanowej [25]. U 6 pacjentów z grupy przyjmującej 500 mg BPF oraz u 11 pacjentów z grupy otrzymującej 1000 mg BPF wystąpiła umiarkowanego stopnia zgaga, jednak żaden z badanych nie przerwał terapii [25].

Jak sugerują autorzy badania, doustne suplementy diety zawierające BPF cechuje siła hipolipemizująca porównywalna z siłą małych dawek silnych statyn, co stanowiłoby w ich przypadku bezpieczną alternatywę terapeutyczną dla pacjentów z istotną nietolerancją statyn [25]. Dodatkowo redukcja stężenia glukozy we krwi o 15–25% sugeruje możliwość fitoterapeutycznego podejścia do kontroli stanów przedcukrzycowych u pacjentów z zespołem metabolicznym.

Działanie hipolipemizujące addytywne ze statyną/właściwości antyoksydacyjne

W 2013 roku na łamach „International Journal of Cardiology" opublikowano wyniki prospektywnego, randomizowanego, otwartego, prowadzonego w grupach równoległych i kontrolowanego placebo badania wpływu BPF na profil lipidowy u osób z mieszaną dyslipidemią, leczonych bądź

Tabela 3. Wpływ 30-dniowej terapii rosuwastatyną w dawkach 10 mg i 20 mg, BPF w dawce 1000 mg oraz terapii złożonej (1000 mg BPF + 10 mg rosuwastatyny) na profil lipidowy u 77 chorych z dyslipidemią mieszaną (na podstawie [53])

Grupy pacjentów	TC [mg/dl]	LDL-C [mg/dl]	HDL-C [mg/dl]	TG [mg/dl]
Wyjściowo	278 ± 4	191 ± 3	38 ± 2	238 ± 5
Placebo	275 ± 4	190 ± 2	38 ± 3	235 ± 5
Rosuwastatyna 10 mg	195 ± 3*	115 ± 4*	42 ± 3*	200 ± 4*
Rosuwastatyna 20 mg	174 ± 4*	87 ± 3*	48 ± 3*	202 ± 5*
BPF 1000 mg	191 ± 5*	113 ± 4*	45 ± 4*	165 ± 3*
Rosuwastatyna 10 mg + BPF 1000 mg	172 ± 3*	90 ± 4*	52 ± 4*	152 ± 5*

*p < 0,05 *v.* placebo; BPF (*bergamot polyphenolic fraction*) — kompozycja polifenoli z bergamoty; TC (*total cholesterol*) — cholesterol całkowity; LDL-C (*low-density lipoprotein-cholesterol*) — cholesterol frakcji lipoprotein o małej gęstości; HDL-C (*high-density lipoprotein-cholesterol*) — cholesterol frakcji lipoprotein o dużej gęstości; TG (*triglycerides*) — triglicerydy

nieleczonych rosuwastatyną. Dodatkowo badano wpływ takiej terapii na biomarkery naczyniowego stresu oksydacyjnego, tj. stężenie malonodialdehydu (MDA, *malondialdehyde*) — markera peroksydacji lipidów, ekspresję receptora LOX-1 dla utlenionych LDL (*lectin-type oxidized LDL receptor 1*) oraz stężenia kinazy białkowej B (PKB, *protein kinase B*) w obwodowych komórkach jednojądrzastych [53].

Do badania zakwalifikowano 77 pacjentów z mieszaną dyslipidemią (LDL-C > 160 mg/dl, TG > 225 mg/dl), których następnie poddano randomizacji do 5 grup terapeutycznych: grupy kontrolnej przyjmującej placebo (n = 15), 2 grup otrzymujących rosuwastatynę w dawce 10 mg (n = = 16) lub 20 mg (n = 16), grupy otrzymującej BPF w dawce 1000 mg (n = 15) oraz grupy otrzymującej BPF w dawce 1000 mg i rosuwastatynę w dawce 10 mg (n = 15) [53]. Po 30 dniach terapii wykazano, że stosowanie 1000 mg BPF, 10 mg i 20 mg rosuwastatyny znacząco obniżało stężenia TC, LDL-C i TG oraz zwiększało stężenie HDL-C. W grupie przyjmującej placebo nie odnotowano istotnych zmian parametrów lipidowych (tab. 3) [53].

Terapia złożona 1000 mg BPF i 10 mg rosuwastatyny wykazała nasilenie efektu hipolipemizującego w porównaniu z monoterapią statyną w tej samej dawce, a wielkość redukcji stężeń TC i LDL-C była zbliżona do uzyskiwanej za pomocą 20 mg rosuwastatyny. Dodatkowo obserwowano znaczące obniżenie stężenia TG (42 ± 5%) i wzrost stężenia HDL-C (34 ± 2%), a efekt ten również był większy niż w przypadku monoterapii rosuwastatyną w dawce 10 mg (tab. 3) [53]. Leczenie hipolipemizujące we wszystkich 4 grupach terapeutycznych (rosuwastatyna 10 mg, rosuwastatyna 20 mg, BPF 1000 mg, BPF 1000 mg + rosuwastatyna 10 mg) skutkowało również znaczącym zmniejszeniem stężenia MDA oraz ekspresji LOX-1. Wpływ BPF w połączeniu z rosuwastatyną skutkował także zwiększoną ekspresją PKB, co w praktyce oznacza lepsze działanie naczyniochronne [53].

Egzogenna podaż naturalnych przeciwutleniaczy, takich jak polifenole pochodzące z bergamoty, wpływa więc korzystnie na modulację biomarkerów ryzyka kardiometabolicznego i wykazuje dodatkowy potencjał wazoprotekcyjny u pacjentów z hiperlipidemią.

Wpływ na małe gęste LDL i niealkoholową stłuszczeniową chorobę wątroby

Małe gęste LDL (sd-LDL, *small dense LDL*) oraz niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (NAFLD, *nonalcoholic fatty liver disease*) są ważnymi biomarkerami ryzyka kardiometabolicznego, dlatego Gliozzi i wsp. [54] przeprowadzili badanie w celu określenia wpływu kompozycji polifenoli z bergamoty na profil podfrakcji lipoprotein i NAFLD u pacjentów z zespołem metabolicznym. Zakwalifikowano do niego 107 osób z zespołem metabolicznym i NAFLD, których następnie podzielono na 2 grupy — otrzymującą BPF w dawce 2 razy 650 mg/dobę lub placebo przez 120 dni.

W grupie leczonej BPF zaobserwowano istotne obniżenie stężeń: TC, LDL-C, TG, glukozy, transaminaz, gamma-glutamylotranspeptydazy i biomarkerów zapalnych — białka C-reaktywnego o wysokiej czułości (hs-CRP, *high-sensitivity C-reactive protein*) i czynnika martwicy nowotworu α (TNF-α, *tumor necrosis factor α*) oraz wartości w teście *Steato* (tab. 4) [54]. Ponadto stwierdzono istotne zmiany średniego rozmiaru lipoprotein o bardzo małej gęstości (VLDL, *very low-density lipoprotein*), LDL i HDL (p < 0,05) [54]. Szczególnie BPF obniżyła stężenie lipoprotein o pośredniej gęstości (IDL, *intermediate-density liporotein*) o 51%, zwiększyła stężenie dużych LDL o 38% i zmniejszyła stężenie małych LDL o 35%. Co więcej, 120-dniowa terapia BPF skutkowała wzrostem stężenia antyaterogennych cząstek HDL o 20%, głównie ze względu na zwiększenie stężenia dużego HDL (tab. 5) [54]. Dodatkowo odnotowano zmniejszenie wskaźnika wątrobowo-nerkowego z 2,8 ± 0,4 do 1,5 ± 0,5 (p < 0,05), co dowiodło, że podawanie BPF pacjentom z łagodną do ciężkiej NAFLD związaną z zespołem metabolicznym może prowadzić do redukcji stłuszczenia.

W trakcie badania nie odnotowano żadnych działań niepożądanych związanych z przyjmowaniem BPF, co po raz kolejny potwierdziło znaczny profil bezpieczeństwa

Tabela 4. Wpływ 120-dniowej terapii BPF w dawce 2 razy 650 mg/dobę na parametry biochemiczne krwi, biomarkery zapalne oraz parametry ultrasonograficzne u pacjentów z zespołem metabolicznym i niealkoholową stłuszczeniową chorobą wątroby (na podstawie [54])

Biomarker	Wyjściowo	BPF
Pacjenci otrzymujący BPF w dawce 2 × 650 mg/d. przez 120 dni	107	
Wiek (lata)	56 ± 12	
Płeć (M/K)	64/43	
BMI [kg/m^2]	29,4 ± 2,01	28,2 ± 1,53
Glukoza [mg/dl]	118 ± 1,4	98 ± 0,8*
TC [mg/dl]	245 ± 8,3	182 ± 7,1*
LDL-C [mg/dl]	162 ± 4,3	101 ± 1,8*
HDL-C [mg/dl]	38 ± 3,8	49 ± 4*
TG [mg/dl]	232 ± 5,1	160 ± 4,8*
Steato test	0,74 ± 0,12	0,44 ± 0,09*
AlAT [j./l]	54 ± 5,4	36 ± 5,3*
AspAT [j./l]	52 ± 6,4	41 ± 5,2*
GGTP [j./l]	38 ± 5,2	29,33 ± 1,1*
hs-CRP [mg/l]	1,2 + 0,8	0,94 + 0,6*
TNF-α [pg/ml]	14,4 ± 1,9	10,7 ± 1,7*
Wskaźnik wątrobowo-nerkowy	2,8 ± 0,4	1,5 ± 0,5*

*p < 0,05 (w porównaniu z wartością wyjściową); BPF (*bergamot polyphenolic fraction*) — kompozycja polifenoli z bergamoty; M — mężczyźni; K — kobiety; BMI (*body mass index*) — wskaźnik masy ciała; TC (*total cholesterol*) — cholesterol całkowity; LDL-C (*low-density lipoprotein-cholesterol*) — cholesterol frakcji lipoprotein o małej gęstości; HDL-C (*high-density lipoprotein-cholesterol*) — cholesterol frakcji lipoprotein o dużej gęstości; TG (*triglycerides*) — triglicerydy; AlAT (*alanine aminotransferase*) — aminotransferaza alaninowa; AspAT (*aspartate aminotransferase*) — aminotransferaza asparaginianowa; GGTP (*gamma-glutamyl transpeptidase*) — gamma-glutamylotranspeptydaza; hs-CRP (*high-sensitivity C-reactive protein*) — białko C-reaktywne o wysokiej czułości; TNF-α (*tumor necrosis factor α*) — czynnik martwicy nowotworu α

Tabela 5. Wpływ 120-dniowej terapii BPF w dawce 2 razy 650 mg/dobę na wielkość lipoprotein i stężenia ich poszczególnych frakcji we krwi u pacjentów z zespołem metabolicznym i niealkoholową stłuszczeniową chorobą wątroby (na podstawie [54])

Wielkość lipoprotein [nm]	Wyjściowo	BPF
VLDL	55,3 ± 6,4	44,5 ± 5,2*
LDL	22,6 ± 1,7	18,0 ± 0,8*
HDL	7,5 ± 0,8	9,6 ± 0,9*
Stężenie frakcji lipoprotein [nmol/l]		
Całkowite VLDL	83 ± 14	54 ± 12*
Duże VLDL	4,2 ± 2	1,8 ± 1,3*
Średnie VLDL	31 ± 9	14 ± 8*
Małe VLDL	43 ± 9	38 ± 10
Całkowite LDL	1477 ± 75	1293 ± 101*
IDL	77 ± 16	38 ± 10*
Duże LDL	424 ± 87	653 ± 95*
Małe LDL	986 ± 105	612 ± 98*
Całkowite HDL	30 ± 2	36 ± 3*
Duże HDL	5 ± 3	15 ± 4*
Średnie HDL	7 ± 4	7 ± 3
Małe HDL	18 ± 5	14 ± 4*

*p < 0,05 (w porównaniu z wartością wyjściową); BPF (*bergamot polyphenolic fraction*) — kompozycja polifenoli z bergamoty; VLDL (*very low-density lipoprotein*) — lipoproteiny o bardzo małej gęstości; LDL (*low-density lipoprotein*) — lipoproteiny o małej gęstości; HDL (*high-density lipoprotein*) — lipoproteiny o dużej gęstości; IDL (*intermediate-density liporotein*) — lipoproteiny o pośredniej gęstości

Tabela 6. Wpływ 120-dniowej terapii BPF w dawce 2 razy 650 mg/dobę na zaburzenia erekcji u chorych na cukrzycę typu 2 oceniany na podstawie kwestionariusza IIEF (na podstawie [56])

Liczba punktów		
Grupa kontrolna	Chorzy na cukrzycę	Chorzy na cukrzycę przyjmujący BPF
27 ± 3	12 ± 4*	18 ± 3**

Interpretacja wyniku uzyskanego w IIEF:
- erekcja prawidłowa: 26–30 pkt.
- łagodne zaburzenia erekcji: 17–25 pkt.
- umiarkowane zaburzenia erekcji: 11–16 pkt.
- ciężkie zaburzenia erekcji: 6–10 pkt.

*p < 0,05 grupa kontrolna *v.* chorzy na cukrzycę; **p < 0,05 chorzy na cukrzycę *v.* chorzy na cukrzycę przyjmujący BPF; BPF (*bergamot polyphenolic fraction*) — kompozycja polifenoli z bergamoty; IIEF (*International Index of Erectile Function*) — międzynarodowy kwestionariusz służący do identyfikowania zaburzeń erekcji

ekstraktu z bergamoty [54]. W podsumowaniu badania autorzy stwierdzili, że polifenole pochodzące z bergamoty podawane pacjentom z zespołem metabolicznym i NAFLD prowadzą do poprawy profilu lipidowego i glikemii oraz znacznego ograniczenia stłuszczenia wątroby. Efekt ten, wraz ze zmniejszeniem stężenia proaterogennych małych gęstych LDL i wzrostem stężenia antyaterogennych cząstek HDL rzuca nowe światło na potencjalne zastosowanie wyciągu bergamotowego w obniżaniu ryzyka sercowo-naczyniowego u pacjentów z zespołem metabolicznym.

Przeciwdziałanie zaburzeniom erekcji u chorych na cukrzycę typu 2

Przewlekła hiperglikemia powoduje dysfunkcję śródbłonka, co zwiększa nie tylko ryzyko chorób układu sercowo-naczyniowego, ale również zaburzeń erekcji. Dysfunkcja śródbłonka w cukrzycy objawia się zmniejszoną biodostępnością NO, czego skutkiem jest niewystarczające rozluźnienie mięśni gładkich naczyń ciał jamistych prącia. Inne potencjalne mechanizmy zaangażowane w dysfunkcję śródbłonka obejmują między innymi: akumulację końcowych produktów zaawansowanej glikacji, zwiększone stężenie wolnych rodników tlenowych zmniejszających biodostępność NO, zaburzenia śródbłonkowej i neuronalnej syntezy NO [55].

Biorąc pod uwagę fakt, że BPF zmniejsza stres oksydacyjny, powoduje wzrost aktywności enzymów zapobiegających powstawaniu wolnych rodników i nasila syntezę NO, postawiono hipotezę, że BPF może również korzystnie wpływać na zaburzenia erekcji. Do badania włączono 40 osób z cukrzycą typu 2 i zaburzeniami erekcji (od łagodnych do ciężkich), którym następnie podawano BPF w dawce 2 razy 650 mg/dobę lub placebo przez 120 dni [56]. Zaburzenia erekcji oceniano na podstawie międzynarodowego kwestionariusza służącego do identyfikowania zaburzeń erekcji (IIEF, *International Index of Erectile Function*) (tab. 6). Dodatkowo, za pomocą badania doplerowskiego, mierzono szczytową prędkość skurczową (PSV, *peak systolic velocity*) w tętnicy grzbietowej prącia (średnia PSV u pacjentów włączonych do badania wynosiła 22 ± 6 cm/s, co sugerowało upośledzony dopływ krwi do prącia) [56]. Terapia BPF skutkowała poprawą erekcji — punktacja w kwestionariuszu IIEF zwiększyła się z 12 ± 4 do 18 ± 3 (tab. 6). Poprawie tej towarzyszył również wzrost PSV w tętnicy prącia do 29 ± ± 5 cm/s. Ponadto stwierdzono poprawę funkcji śródbłonka naczyniowego w postaci wzrostu przekrwienia reaktywnego [56]. Co ciekawe, w leczeniu zaburzeń seksualnych BPF wydaje się działać synergistycznie z innymi ekstraktami roślinnymi, takimi jak *Tribulus terrestris* i *Epimedium*, zdolnymi do zwiększania stężenia testosteronu lub hamowania fosfodiesterazy typu 5 (PDE5) [56].

Inne działania plejotropowe

Jak wykazano na modelach zwierzęcych, działanie antyoksydacyjne BPF wydaje się wpływać również na zmniejszone przewodnictwo bólu przewlekłego, oddziałując na ROS i reaktywne formy azotu (RNS, *reactive nitrogen species*), które odpowiadają za jego potencjalizację. Zatem BPF może znaleźć zastosowanie jako adiuwant w leczeniu bólu przewlekłego, który pozwoli ograniczyć zwiększanie dawek opioidów [57]. Potrzebne są jednak dalsze badania kliniczne, w których taka hipoteza zostanie jednoznacznie potwierdzona.

Kompozycja polifenoli z bergamoty skutecznie ogranicza także skutki działania promieniowania UV typu B (UVB) na keratynocyty *in vitro*. Przejawia się to poprawą żywotności komórek, zmniejszeniem ekspresji interleukiny 1β, a także zwiększeniem aktywności telomerazy. Wydaje się, że BPF moduluje podstawowe ścieżki transdukcji sygnału komórkowego, co prowadzi do antyproliferacyjnej, przeciwstarzeniowej i immunomodulującej odpowiedzi. Implikuje to potencjalną wartość bioflawonoidu bergamotowego, który wspiera endogenny system antyoksydacyjny skóry, zmniejszając fotostarzenie się skóry, a tym samym ryzyko rozwoju zmian nowotworowych [58].

Polifenole, dzięki swoim właściwościom przeciwutleniającym oraz przeciwzapalnym, mogą wykazywać również działanie protekcyjne na mięsień sercowy w trakcie chemioterapii. W badaniu na modelu mysim dowiedziono

kardioprotekcyjnego wpływu BPF podczas stosowania doksorubicyny, wyrażający się istotnym zmniejszeniem wymiaru końcowoskurczowego lewej komory (LVESd, *left ventricular end-systolic diameter*), poprawą frakcji skracania lewej komory (LVFS, *left ventricular fractional shortening*) oraz zwiększeniem frakcji wyrzutowej lewej komory (LVEF, *left ventricular ejection fraction*). Ponadto analiza histologiczna wykazała mniejszą apoptozę kardiomiocytów, ograniczenie zwłóknienia oraz zmniejszenie reaktywnego przerostu [59].

Potencjalne miejsce BPF w praktyce klinicznej

Przytoczone dane pochodzące z randomizowanych badań klinicznych potwierdzają skuteczność stosowania standaryzowanej BPF przede wszystkim w obniżaniu stężenia cholesterolu we krwi. Dostępne dane naukowe potwierdzają działanie hipolipemizujące tej substancji, które pozwala na redukcję stężenia LDL-C o 25% w stosunku do wartości wyjściowej w przypadku dawki 500 mg, a nawet 40% przypadku dawki 1000 mg [25, 53, 54]. Do szczególnych grup, dla których preparat BPF może być przeznaczony, należą:

- osoby z grupy niskiego (< 1% w skali SCORE [*Systematic COronary Risk Evaluation*]) lub umiarkowanego (1–4% w skali SCORE) ryzyka sercowo-naczyniowego, u których stężenie LDL-C jest podwyższone o 20–40%, gdy nie ma potrzeby stosowania intensywnego leczenia hipolipemizującego;
- osoby nieakceptujące terapii statyną i kategorycznie odmawiające jej stosowania;
- chorzy nietolerujący statyn;
- osoby, u których nie można zintensyfikować terapii statyną (addytywne działanie BPF);
- chorzy z zespołem metabolicznym i zaburzeniami gospodarki węglowodanowej pod postacią nieprawidłowej glikemii na czczo (IFG, *impaired fasting glucose*) lub nieprawidłowej tolerancji glukozy (IGT, *impaired glucose tolerance*);
- chorzy z zespołem metabolicznym i NAFLD.

Warto pamiętać, że BPF może być również korzystnym uzupełnieniem terapii w przypadku zaburzeń erekcji w cukrzycy typu 2, może ograniczać skutki działania promieniowania UVB, jak również działać kardioprotekcyjnie w trakcie chemioterapii doksorubicyną, choć miejsce BPF w tych właśnie wskazaniach klinicznych wymaga dalszych badań.

Podsumowanie

Polifenole z bergamoty wywierają pozytywny wpływ na gospodarki lipidową i węglowodanową, a ich silne właściwości antyoksydacyjne dodatkowo oddziałują korzystnie na śródbłonek naczyniowy. Biorąc pod uwagę fakt, że efekty farmakologiczne preparatów nutraceutycznych na bazie flawonoidów bergamotowych wydają się porównywalne z syntetycznymi lekami w małej dawce, a działania niepożądane tych preparatów są znikome, BPF może w niektórych przypadkach być ważną alternatywą dla leków konwencjonalnych.

Konflikt interesów

Zespół ekspertów dąży do zapewnienia niezależności i obiektywizmu we wszystkich swoich działaniach edukacyjnych. Celem jego starań, które doprowadziły do powstania niniejszego opracowania, nie jest promowanie, popieranie ani zalecanie w szczególny sposób produktu handlowego, którego opis znalazł się w artykule. Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

Abstract

Bergamot juice has a particularly high content and a unique composition of flavonoids. It is particularly rich in flavanones and flavones. Standardized bergamot polyphenolic fraction has the same polyphenol profile as in the juice, but flavonoids are over 200 times more concentrated. Many data show its brilliant performance in hyperlipidaemia and moderate hyperglycaemia. In addition, it has other beneficial pleiotropic properties. The following document contains the opinion of an expert group summarizing current knowledge on bergamot flavonoids and their possible use in selected populations of patients.

Key words: standardized bergamot polyphenolic fraction, metabolic disorders, expert consensus

Folia Cardiologica 2018; 13, 3: 222–235

Piśmiennictwo

1. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, et al. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. Angew Chem Int Ed Engl. 2011; 50(3): 586–621, doi: 10.1002/anie.201000044, indexed in Pubmed: 21226137.
2. Koszowska A, Dittfeld A, Puzoń-Brończyk A, et al. Polifenole w profilaktyce chorób cywilizacyjnych. Post Fitoter. 2013; 4: 263–266.
3. Paszkiewicz M, Budzyńska A, Różalska B, et al. The immunomodulatory role of plant polyphenols. Post Hig Med Dosw. 2012; 66: 637–646, doi: 10.5604/17322693.1009908.
4. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. Pharmacol Res. 2013; 68(1): 125–131, doi: 10.1016/j.phrs.2012.10.018., indexed in Pubmed: 23174266.
5. Yamagata K, Tagami M, Yamori Y. Dietary polyphenols regulate endothelial function and prevent cardiovascular disease. Nutrition. 2015; 31(1): 28–37, doi: 10.1016/j.nut.2014.04.011, indexed in Pubmed: 25466651.
6. Wang S, Moustaid-Moussa N, Chen L, et al. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. J Nutr Biochem. 2014; 25(1): 1–18, doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.09.001, indexed in Pubmed: 24314860.
7. Bozzetto L, Annuzzi G, Pacini G, et al. Polyphenol-rich diets improve glucose metabolism in people at high cardiometabolic risk: a controlled randomised intervention trial. Diabetologia. 2015; 58(7): 1551–1560, doi: 10.1007/s00125-015-3592-x, indexed in Pubmed: 25906754.
8. Bogdanski P, Suliburska J, Szulinska M, et al. Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients. Nutr Res. 2012; 32(6): 421–427, doi: 10.1016/j.nutres.2012.05.007, indexed in Pubmed: 22749178.
9. Hokayem M, Blond E, Vidal H, et al. Grape polyphenols prevent fructose-induced oxidative stress and insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. Diabetes Care. 2013; 36(6): 1454–1461, doi: 10.2337/dc12-1652, indexed in Pubmed: 23275372.
10. Fujiki H, Imai K, Nakachi K, et al. Innovative strategy of cancer treatment with the combination of green tea catechins and anticancer compounds. Cancer Cell Microenviron. 2015(2): e886, doi: 10.14800/ccm.886.
11. Karimi Z, Jessri M, Houshiar-Rad A, et al. Dietary patterns and breast cancer risk among women. Public Health Nutr. 2014; 17(5): 1098–1106, doi: 10.1017/S1368980013001018, indexed in Pubmed: 23651876.
12. Hui C, Qi X, Qianyong Z, et al. Flavonoids, flavonoid subclasses and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. PLoS One. 2013; 8(1): e54318, doi: 10.1371/journal.pone.0054318, indexed in Pubmed: 23349849.
13. Wang J, Tang L, Wang JS. Biomarkers of dietary polyphenols in cancer studies: current evidence and beyond. Oxid Med Cell Longev. 2015; 2015: 732302, doi: 10.1155/2015/732302, indexed in Pubmed: 26180594.
14. Henning SM, Wang P, Said JW, et al. Randomized clinical trial of brewed green and black tea in men with prostate cancer prior to prostatectomy. Prostate. 2015; 75(5): 550–559, doi: 10.1002/pros.22943, indexed in Pubmed: 25545744.
15. Mężyńska M, Brzóska MM. Związki polifenolowe w leczeniu i profilaktyce wybranych chorób cywilizacyjnych — dowody z badań epidemiologicznych. Pol Prz Nauk Zdr. 2016; 3(48): 269–276.
16. http://www2.mz.gov.pl/wwwfiles/ma_struktura/docs/program_10062010.pdf. Narodowy program przeciwdziałania chorobom cywilizacyjnym(15.05.2018).
17. Pérez-Jiménez J, Neveu V, Vos F, et al. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. Eur J Clin Nutr. 2010; 64 Suppl 3: S112–S120, doi: 10.1038/ejcn.2010.221, indexed in Pubmed: 21045839.
18. Makowska-Wąs J, Janeczko Z. Biodostępność polifenoli roślinnych. Post Fitoter. 2004; 3: 126–127.
19. Podbielkowski Z. Słownik roślin użytkowych. PWRiL, Warszawa 1989.
20. Klimek R. Olejki eteryczne. Wydawnictwo Przemysłu Lekkiego i Spożywczego, Warszawa 1957.
21. Barreca D, Bellocco E, Caristi C, et al. Flavonoid composition and antioxidant activity of juices from Chinotto (Citrus x myrtifolia Raf.) fruits at different ripening stages. J Agric Food Chem. 2010; 58(5): 3031–3036, doi: 10.1021/jf9044809, indexed in Pubmed: 20155909.
22. Barreca D, Bellocco E, Caristi C, et al. Distribution of C- and O-glycosyl flavonoids, (3-hydroxy-3-methylglutaryl)glycosyl flavanones and furocoumarins in Citrus aurantium L. juice. Food Chemistry. 2011; 124(2): 576–582, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.06.076.
23. Di Donna L, De Luca G, Mazzotti F, et al. Statin-like principles of bergamot fruit (Citrus bergamia): isolation of 3-hydroxymethylglutaryl flavonoid glycosides. J Nat Prod. 2009; 72(7): 1352–1354, doi: 10.1021/np900096w, indexed in Pubmed: 19572741.
24. Nogata Y, Sakamoto K, Shiratsuchi H, et al. Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. Biosci Biotechnol Biochem. 2006; 70(1): 178–192, doi: 10.1271/bbb.70.178, indexed in Pubmed: 16428836.
25. Mollace V, Sacco I, Janda E, et al. Hypolipemic and hypoglycaemic activity of bergamot polyphenols: from animal models to human studies. Fitoterapia. 2011; 82(3): 309–316, doi: 10.1016/j.fitote.2010.10.014, indexed in Pubmed: 21056640.
26. Janda E, Lascala A, Martino C, et al. Molecular mechanisms of lipid- and glucose-lowering activities of bergamot flavonoids. PharmaNutrition. 2016; 4: S8–S18, doi: 10.1016/j.phanu.2016.05.001.
27. Selma MV, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. J Agric Food Chem. 2009; 57(15): 6485–6501, doi: 10.1021/jf902107d, indexed in Pubmed: 19580283.
28. Gao S, Hu M. Bioavailability challenges associated with development of anti-cancer phenolics. Mini Rev Med Chem. 2010; 10(6): 550–567, indexed in Pubmed: 20370701.
29. Kim DH, Jung EA, Sohng IS, et al. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. Arch Pharm Res. 1998; 21(1): 17–23, indexed in Pubmed: 9875509.
30. Calamini B, Ratia K, Malkowski MG, et al. Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. Biochem J. 2010; 429(2): 273–282, doi: 10.1042/BJ20091857, indexed in Pubmed: 20450491.
31. Hwang JT, Kwon DY, Yoon SH. AMP-activated protein kinase: a potential target for the diseases prevention by natural occurring polyphenols. N Biotechnol. 2009; 26(1-2): 17–22, doi: 10.1016/j.nbt.2009.03.005, indexed in Pubmed: 19818314.
32. Kahn BB, Alquier T, Carling D, et al. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. Cell Metab. 2005; 1(1): 15–25, doi: 10.1016/j.cmet.2004.12.003, indexed in Pubmed: 16054041.

33. Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. Endocrinology. 2003; 144(12): 5179–5183, doi: 10.1210/en.2003-0982, indexed in Pubmed: 12960015.
34. Zhou G, Myers R, Li Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J Clin Invest. 2001; 108(8): 1167–1174, doi: 10.1172/JCI13505, indexed in Pubmed: 11602624.
35. Hardie DG, Hawley SA. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. Bioessays. 2001; 23(12): 1112–1119, doi: 10.1002/bies.10009, indexed in Pubmed: 11746230.
36. Holmes BF, Kurth-Kraczek EJ, Winder WW. Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. J Appl Physiol (1985). 1999; 87(5): 1990–1995, doi: 10.1152/jappl.1999.87.5.1990, indexed in Pubmed: 10562646.
37. Winder WW, Hardie DG. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. Am J Physiol. 1996; 270(2 Pt 1): E299–E304, doi: 10.1152/ajpendo.1996.270.2.E299, indexed in Pubmed: 8779952.
38. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. J Clin Invest. 2000; 106(2): 171–176, doi: 10.1172/JCI10583, indexed in Pubmed: 10903330.
39. Velasco G, Geelen MJ, Guzmán M. Control of hepatic fatty acid oxidation by 5'-AMP-activated protein kinase involves a malonyl-CoA-dependent and a malonyl-CoA-independent mechanism. Arch Biochem Biophys. 1997; 337(2): 169–175, doi: 10.1006/abbi.1996.9784, indexed in Pubmed: 9016810.
40. Leopoldini M, Malaj N, Toscano M, et al. On the inhibitor effects of bergamot juice flavonoids binding to the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR) enzyme. J Agric Food Chem. 2010; 58(19): 10768–10773, doi: 10.1021/jf102576j, indexed in Pubmed: 20843083.
41. Bok SH, Lee SH, Park YB, et al. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. J Nutr. 1999; 129(6): 1182–1185, doi: 10.1093/jn/129.6.1182, indexed in Pubmed: 10356084.
42. Demonty I, Lin Y, Zebregs YE, et al. The citrus flavonoids hesperidin and naringin do not affect serum cholesterol in moderately hypercholesterolemic men and women. J Nutr. 2010; 140(9): 1615–1620, doi: 10.3945/jn.110.124735, indexed in Pubmed: 20660284.
43. Francis SH, Blount MA, Corbin JD. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. Physiol Rev. 2011; 91(2): 651–690, doi: 10.1152/physrev.00030.2010, indexed in Pubmed: 21527734.
44. Peluso MR. Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. Exp Biol Med (Maywood). 2006; 231(8): 1287–1299, indexed in Pubmed: 16946397.
45. Dallas C, Gerbi A, Tenca G, et al. Lipolytic effect of a polyphenolic citrus dry extract of red orange, grapefruit, orange (SINETROL) in human body fat adipocytes. Mechanism of action by inhibition of cAMP-phosphodiesterase (PDE). Phytomedicine. 2008; 15: 783–792.
46. Collins S, Surwit RS. The beta-adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis. Recent Prog Horm Res. 2001; 56: 309–328, indexed in Pubmed: 11237219.
47. Omori K, Kotera J. Overview of PDEs and their regulation. Circ Res. 2007; 100(3): 309–327, doi: 10.1161/01.RES.0000256354.95791.f1, indexed in Pubmed: 17307970.
48. Shakur Y, Holst LS, Landstrom TR, et al. Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 2001; 66: 241–277, indexed in Pubmed: 11051766.
49. Zhao AZ, Zhao H, Teague J, et al. Attenuation of insulin secretion by insulin-like growth factor 1 is mediated through activation of phosphodiesterase 3B. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94(7): 3223–3228, indexed in Pubmed: 9096374.
50. Choi YH, Park S, Hockman S, et al. Alterations in regulation of energy homeostasis in cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B-null mice. J Clin Invest. 2006; 116(12): 3240–3251, doi: 10.1172/JCI24867, indexed in Pubmed: 17143332.
51. Berger K, Lindh R, Wierup N, et al. Phosphodiesterase 3B is localized in caveolae and smooth ER in mouse hepatocytes and is important in the regulation of glucose and lipid metabolism. PLoS One. 2009; 4(3): e4671, doi: 10.1371/journal.pone.0004671, indexed in Pubmed: 19262749.
52. Boutin JA, Chatelain-Egger F, Vella F, et al. Quinone reductase 2 substrate specificity and inhibition pharmacology. Chem Biol Interact. 2005; 151(3): 213–228, doi: 10.1016/j.cbi.2005.01.002, indexed in Pubmed: 15733542.
53. Gliozzi M, Walker R, Muscoli S, et al. Bergamot polyphenolic fraction enhances rosuvastatin-induced effect on LDL-cholesterol, LOX-1 expression and protein kinase B phosphorylation in patients with hyperlipidemia. Int J Cardiol. 2013; 170(2): 140–145, doi: 10.1016/j.ijcard.2013.08.125, indexed in Pubmed: 24239156.
54. Gliozzi M, Carresi C, Musolino V. The effect of bergamot-derived polyphenolic fraction on LDL small dense particles and non-alcoholic fatty liver disease in patients with metabolic syndrome. Adv Biol Chem. 2014; 4: 129–137.
55. Malavige LS, Levy JC. Erectile dysfunction in diabetes mellitus. J Sex Med. 2009; 6(5): 1232–1247, doi: 10.1111/j.1743-6109.2008.01168.x, indexed in Pubmed: 19210706.
56. Mollace V, Malara N, Gratteri S, et al. Bergamot polyphenolic fraction counteracts erectile dysfunction occurring in patients suffering from type 2 diabetes. PharmaNutrition. 2016; 4: S41–S46, doi: 10.1016/j.phanu.2015.11.006.
57. Lauro F, Ilari S, Giancotti L, et al. The protective role of bergamot polyphenolic fraction on several animal models of pain. PharmaNutrition. 2016; 4: S35–S40, doi: 10.1016/j.phanu.2016.04.001.
58. Nisticò S , Bottoni U, Gliozzi M, et al. Bergamot polyphenolic fraction counteracts photoageing in human keratinocytes. PharmaNutrition. 2016; 4: S32–S34, doi: 10.1016/j.phanu.2015.11.004.
59. Carresi C, Gliozzi M, Giancotta C, et al. Studies on the protective role of Bergamot polyphenols in doxorubicin-induced cardiotoxicity. PharmaNutrition. 2016; 4: S19–S26, doi: 10.1016/j.phanu.2015.11.005.