

“Argomenti di Fitoterapia Biofarmaceutica”

È un testo scritto per passione e amore verso le scienze farmacologiche e fitoterapiche e si rivolge a tutti quelli che condividono la stessa passione e lo stesso amore.

Certamente maggiore comprensione del testo l'avranno medici, biologi, farmacisti e ricercatori che già in maniera tecnica hanno affrontato nel loro corso di studi, o successivamente a questo, i temi fitoterapici.

Il testo è stato comunque scritto cercando di consentire un approccio al tema fitoterapico anche ai non specialisti.

La berberina • L'estratto di riso rosso fermentato

Francesco Di Pierro

La berberina L'estratto di riso rosso fermentato

Tratto da “Argomenti di Fitoterapia Biofarmaceutica - II Edizione”

La berberina

L'estratto di riso rosso fermentato



Francesco Di Pierro

La berberina L'estratto di riso rosso fermentato

Tratto da "Argomenti di Fitoterapia Biofarmaceutica - II Edizione"

Francesco Di Pierro

CEC Editore Srl

Via Primaticcio 165, 20147 Milano

tel +39 02 415 2943

fax +39 02 416 737

info@ceceditore.com

Design CEC Editore Srl

Tutti i diritti sono riservati.

Nessuna parte del libro può essere riprodotta con fotocopie,

film o altri mezzi, oppure riportata in altri testi senza

il permesso scritto dell'autore o dell'editore.

In collaborazione con:



Indice

La berberina

pag 5

- Premessa
- Un alcaloide isochinolinico chiamato berberina
- Utilità clinica della berberina
- Assorbimento della berberina
- Il perché di uno scarso assorbimento
- L'uso della silimarina come *bioenhancer*
- L'associazione berberina-silimarina alla prova clinica
- L'uso di berberina-silimarina nel soggetto con diabete di tipo 1
- La questione etnica dei berberina-*non-responders*
- Altri possibili strumenti berberina-*enhancing*
- Conclusioni
- Curiosità
- Letteratura

L'estratto di riso rosso fermentato

pag 39

- Premessa
- L'origine del tutto
- L'estratto di riso fermentato da *Monascus purpureus*
- Dentro l'estratto da *Monascus purpureus*
- La problematica della citrinina
- Monacolina K = lovastatina
- Miglioramento qualitativo degli estratti da riso rosso fermentato
- Caratterizzazione dei derivati da riso rosso fermentato
- Conclusioni
- Curiosità
- Letteratura

“Argomenti di Fitoterapia Biofarmaceutica”

È un testo scritto per passione e amore verso le scienze farmacologiche e fitoterapiche e si rivolge a tutti quelli che condividono la stessa passione e lo stesso amore. Certamente maggiore comprensione del testo l'avranno medici, biologi, farmacisti e ricercatori che già in maniera tecnica hanno affrontato nel loro corso di studi, o successivamente a questo, i temi fitoterapici. Il testo è stato comunque scritto cercando di consentire un approccio al tema fitoterapico anche ai non specialisti.

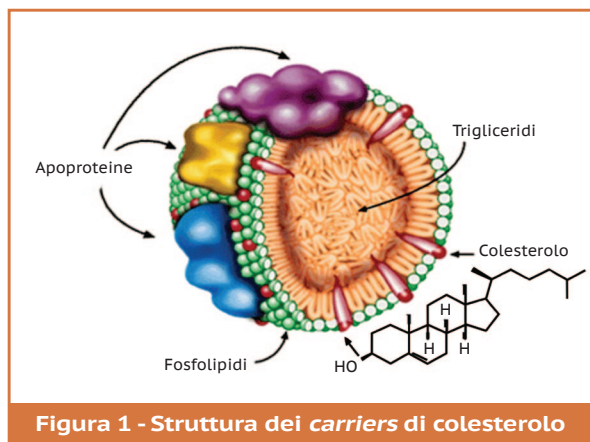
Capitolo 11

La berberina

Premessa

Come già descritto nel Capitolo 7, il colesterolo è una molecola che svolge un ruolo fisiologico essenziale: impedisce l'eccessiva fluidità delle membrane cellulari ed è un importante precursore nella sintesi di ormoni, vitamina D e sali biliari⁽¹⁾. Nel sangue il colesterolo è legato a substrati proteo-lipidici con funzioni *carrier* (Fig.1). Questi trasportatori vengono distinti in base alla densità. Sulla base di questa suddivisione il colesterolo può essere rinvenuto sotto forma di chilomicroni, particelle *remnant*, *Very Low Density Lipoproteins* (VLDL), *Low Density Lipoproteins* (LDL), *Intermediate Density Lipoproteins* (IDL) e *High Density Lipoproteins* (HDL). Soprattutto in forma di LDL, il colesterolo può andare incontro ad un processo di ossidazione che lo rende pericoloso per le arterie. Il colesterolo ossidato infatti tende ad accumularsi nelle cellule (che in questo caso prendono il nome di *foam cells* o cellule schiuma) che costituiscono la parete interna dei vasi arteriosi. L'ispessimento che ne consegue provoca il restringimento del lume dell'arteria e prende il nome di placca ateromatosa.

La diminuzione del lume limita considerevolmente il passaggio di sangue arterioso e conduce all'aterosclerosi e alle sue complicanze cardiovascolari (infarto, ictus, etc.)⁽²⁾. In quest'ottica, con il termine generico di ipercolesterolemia, si tende a far riferimento

Figura 1 - Struttura dei *carriers* di colesterolo

ad un aumento dei livelli di colesterolo totale nel sangue o, più specificamente, ad un aumento della frazione LDL. Una situazione di ipercolesterolemia si accompagna spesso anche ad un marcato incremento ematico di trigliceridi. Per tale ragione oggi si parla più correttamente di dislipidemie, termine usato per definire condizioni caratterizzate da livelli di colesterolo plasmatico superiore a 200 mg/dL e di trigliceridi superiori a 150 mg/dL⁽³⁾. Attualmente le statine (atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e simvastatina) sono i farmaci più utilizzati per ridurre la colesterolemia. La loro azione è dose-dipendente (*Tab.1*) e consiste primariamente nel ridurre la sintesi di colesterolo endogeno, di sintesi epatica, attraverso l'inibizione competitiva dell'enzima HMG-CoA (*3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzyme A*) reduttasi. La diminuzione del contenuto intracellulare di colesterolo così indotta, determina l'aumento dei recettori per le LDL e quindi una maggiore captazione, internalizzazione e riduzione del colesterolo circolante⁽⁴⁾. Nonostante la sua enorme diffusione, il trattamento con statine non è così ben tollerato come si potrebbe sperare. E questo non soltanto in relazione ai suoi noti e possibili effetti collaterali gravemente invalidanti, come l'epatotossicità o la comparsa di lesioni ai tessuti. Recenti dati infatti segnalano la comparsa di miopatia nel 10-13% dei casi totali⁽⁵⁾. Inoltre, per un numero non certo irrilevante (10-15%) di pazienti, definibili *low responders*, la terapia con statine non consente il raggiungimento di buoni risultati clinici⁽⁶⁾. La percentuale d'insuccesso sale a valori maggiori se consideriamo il numero di pazienti nei quali la terapia con statine conduce realmente al raggiungimento del *target* terapeutico in assenza di effetti collaterali importanti.

Tabella 1 - Dosi di statina e riduzione dl colesterolo LDL rispetto al basale					
Farmaco	Riduzione percentuale				
	25 - 30	31 - 35	36 - 40	41 - 50	51 - 55
Rosuvastatina	-----	-----	5 mg	10 mg	20 - 40 mg
Atorvastatina	-----	10 mg	20 mg	40 mg	80 mg
Simvastatina	10 mg	20 mg	40 mg	80 mg	-----
Pravastatina	20 mg	40 mg	-----	-----	-----
Fluvastatina	40 mg	80 mg	-----	-----	-----
Lovastatina	20 mg	40 mg	80 mg	-----	-----

Da: Mahley RW, Bersot TP. High density lipoprotein cholesterol in coronary artery patients: is it as low as expected? *Anadolu Kardiyol Derg.* 2006 Mar;6(1):94-6.

Il diabete mellito costituisce senza dubbio la patologia endocrina più diffusa nel mondo. La sua elevata incidenza, in rapida crescita soprattutto nei Paesi industrializzati a causa dell'aumentata aspettativa di vita e per la maggiore prevalenza di fattori di rischio, ad esempio obesità, è essenzialmente (90% dei casi) legata al cosiddetto tipo 2, o non insulino-dipendente. L'eziopatogenesi di tale disordine metabolico riconosce primariamente, tra le varie cause, l'alterazione della secrezione di insulina e la ridotta sensibilità dei tessuti bersaglio (muscolo, fegato, tessuto adiposo) all'azione dell'insulina stessa. In questo senso, la non sufficiente produzione di insulina (*deficit* di insulina) o la mancata risposta delle cellule bersaglio ad essa (resistenza all'insulina) impediscono l'ingresso del glucosio nelle cellule e quindi la sua corretta utilizzazione da parte dell'organismo per fini energetici e/o strutturali⁽⁷⁾. Da un punto di vista terapeutico oggi è possibile controllare abbastanza efficacemente la problematica diabetica. I farmaci più diffusi appartengono alle classi delle biguanidi (metformina), dei tiazolidinedioni (pioglitazone e rosiglitazone) e dei secretagoghi (sulfonilurea). Il meccanismo d'azione della metformina sembrerebbe implicare l'attivazione dell'Adenosine *Monophosphate activated Protein Kinase* (AMPK), un enzima che svolge un ruolo centrale nell'omeostasi energetica cellulare⁽⁸⁾. Per quanto riguarda i tiazolidinedioni, l'ipotesi più accreditata è che essi siano agonisti di un recettore nucleare principalmente localizzato negli adipociti, denominato *γ-Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* (PPAR- γ), che controlla l'espressione e la regolazione di alcuni geni coinvolti del metabolismo del glucosio e degli acidi grassi⁽⁹⁾. Nonostante la loro indubbia efficacia, questi farmaci non sono esenti da controindicazioni ed effetti collaterali (acidosi lattica, ipossia tissutale, aumento ponderale, anemia)⁽¹⁰⁾.

La sulfonilurea lavora invece attraverso un proprio recettore specifico presente sulle β -cellule la cui attivazione promuove l'uscita cellulare di ioni potassio (K⁺) e l'ingresso di ioni calcio (Ca⁺⁺). Tale attivazione *by-passa* il segnale fisiologicamente attivato da GLUT-2 (recettore per lo zucchero ematico presente sulle β -cellule) e promuove il rilascio di insulina⁽¹¹⁾.

Seppur efficaci, i secretagoghi promuovono involontariamente l'esaurimento pancreatico anticipato e possono determinare ipoglicemie. Le ricerche farmacologiche degli ultimi anni in diabetologia hanno poi permesso lo sviluppo dei farmaci incretinici. Le incretine sono due ormoni prodotti a livello gastrointestinale: il GLP-1 (*Glucagon-like peptide-1*), prodotto dalle cellule L dell'ileo e del colon; il GIP (*Glucose-dependent Insulinotropic*

Peptide), prodotto dalle cellule K del duodeno. Questi ormoni, secreti dopo i pasti, specialmente il GLP-1, hanno la funzione di controllare la glicemia in vari modi: aumentando la secrezione di insulina da parte delle cellule β ; diminuendo la secrezione di glucagone (antagonista dell'insulina) da parte delle cellule α ; rallentando la motilità e dunque lo svuotamento gastrico (rendendo più *soft* la curva glicemica post-prandiale) e diminuendo quindi l'appetito. Il GLP-1 è rapidamente degradato (in pochissimi minuti) a peptide inattivo dall'enzima DPP-4 (Di-Peptidil-Peptidasi-IV). Poiché la produzione di GLP-1 diminuisce con il diminuire della glicemia e la sua permanenza attiva è di soli 1-2 minuti, il suo controllo sulla glicemia è ben calibrato evitando così situazioni di ipersecrezione di insulina e conseguenti pericolose ipoglicemie. I farmaci incretinici sono quindi composti analoghi del GLP-1 e antagonisti del DPP-4⁽¹²⁾ Abbastanza efficaci, il loro costo è estremamente elevato. Per questo motivo un numero crescente di indagini è impegnato nella ricerca di nuovi principi attivi⁽¹³⁾.

La sindrome metabolica (anche detta sindrome pluri-metabolica, sindrome X o sindrome dell'insulino-resistenza), corrisponde all'aggregazione di più fattori di rischio cardiovascolare di tipo metabolico e non, accomunati dalla presenza di evidente insulino-resistenza. Ovviamente lo *status* di sindrome metabolica aumenta il rischio di mortalità cardiovascolare, in maniera proporzionale al numero di fattori di rischio presenti. La prima definizione di sindrome metabolica è stata data nel 1998 dall'OMS. In seguito, nuovi *Panel* hanno ridefinito i parametri, non variandoli in realtà di molto.

Qualunque sia la classificazione di riferimento scelta, la sindrome metabolica è comunque caratterizzata da obesità di tipo androide, a causa della presenza di tessuto adiposo viscerale o omentale, e insulino-resistenza. A queste due caratteristiche principali si aggiungono poi parametri come trigliceridi, pressione arteriosa e HDL che, quando anomali, aggravano la situazione. Ovviamente, l'approccio terapeutico al problema è multi-fattoriale. E, oltre a basarsi su di un atteggiamento dietetico associato ad un programma sportivo, fa ricorso all'uso di farmaci comunemente impiegati per le dislipidemie, il diabete, l'ipertensione. Non esiste infatti ad oggi una possibilità terapeutica riconducibile ad un'unica categoria di farmaci.

Strumento di rilievo terapeutico tanto per le dislipidemie quanto per il diabete, e quindi similmente per la sindrome metabolica, è sicuramente la berberina. Molecola misconosciuta in Occidente fino al 2004, ma abbondantemente impiegata da tempo in Oriente, tanto dalla medicina tradizionale

cinese, quanto, ottenuta di sintesi in forma cloridrato (HCl), dalla medicina allopatrica convenzionale; la berberina è il farmaco ideale nel controllo delle anomalie del metabolismo, in quanto è capace di controllare simultaneamente tanto il quadro lipidico quanto quello glucidico. Recenti evidenze, tanto sperimentali quanto cliniche, dimostrerebbero per la berberina anche un evidente ruolo anti-epatosteatotico. Questo andrebbe a completare un quadro d'azione estremamente funzionale per i soggetti affetti da disordini metabolici.

Un alcaloide isochinolinico chiamato berberina

La berberina ($C_{20}H_{19}NO_5$) è un alcaloide isochinolinico quaternario la cui struttura è caratterizzata dalla presenza di quattro anelli benzenici condensati con un atomo di azoto interposto tra il secondo e il terzo anello (vedi Figura 4 - Capitolo 4). È presente in diverse piante della famiglia delle *Berberidaceae* come *Berberis vulgaris*, *Berberis aquifolium*, *Berberis aristata* e in altre specie vegetali quali *Coptis chinensis*, *Hydrastis canadensis* e *Phellodendron amurense*⁽¹⁴⁾. A seconda della specie e/o varietà, la berberina risulta prevalentemente localizzata nelle radici, nei rizomi, nella corteccia o nei piccioli dove il suo contenuto è spesso elevato. Per esempio, i rizomi di *Coptis chinensis* ne contengono addirittura il 4-8% in peso, mentre nella corteccia di *Phellodendron amurense* la berberina è contenuta per valori solo leggermente inferiori. A causa dell'intensa colorazione gialla, comune a tutti i componenti della famiglia delle proto-berberine, la berberina è utilizzata come colorante con la denominazione di "giallo naturale 18".

L'impiego curativo delle specie botaniche contenenti berberina, nasce originariamente come rimedio contro diarrea e dissenteria, settore di applicazione dove vanta una lunga e secolare tradizione nella medicina cinese⁽¹⁵⁾.

Come spesso succede la medicina moderna ne ha in seguito ulteriormente validato l'uso^(16,17). L'effetto antidiarroico della berberina potrebbe essere dovuto a tre diversi fenomeni, non mutualmente escludentisi. Innanzitutto la berberina inibirebbe la risposta secretoria intestinale provocata dalla presenza di enterotossine batteriche, come quella colerica o di *E.coli*⁽¹⁸⁾.

In secondo luogo la berberina sarebbe in grado di modulare la motilità intestinale, la cui disfunzione è sicuramente una importante caratteristica patologica capace di determinare, o favorire, l'evento diarroico. È infatti stato

osservato come la berberina riduca la contrattilità della muscolatura liscia intestinale rallentando i tempi di transito^(19,20). Infine la berberina risulterebbe in grado di recuperare la funzione di barriera intestinale danneggiata in alcune patologie, come ad esempio nel morbo di *Crohn*. In un intestino con tale disfunzione si osserva un danneggiamento delle *tight junctions* capace di essere a sua volta causa di *leak-flux diarrhea*. La berberina (già a 100 μ M) si opporrebbe a tale disfunzione, forse determinando una riduzione nel rilascio di citochine pro-infiammatorie⁽²¹⁾. Diversi studi scientifici hanno comunque evidenziato le proprietà antimicrobiche dirette della berberina nei confronti di diverse specie di batteri (*Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Shigella flexneri*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Vibrio cholerae*), funghi (*Candida* spp.) e protozoi (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Leishmania donovani*, *Trichomonas vaginalis*)⁽²²⁻²⁷⁾. L'azione microbicida esercitata dalla berberina potrebbe essere a sua volta chiamata in causa per spiegare, almeno in parte, l'effetto anti-dissenteria noto. Da un punto di vista biochimico l'azione antibiotica della berberina potrebbe essere dovuta ad un effetto inibitorio giocato a qualche livello nei confronti di proteine enzimatiche e/o endotossine come l'LPS (lipopolisaccaride). Nel primo caso si tratterebbe di un'inibizione a carico di una proteina localizzabile sulla superficie del batterio e nota come sortasi⁽²⁸⁾. Biochimicamente corrisponderebbe ad una transpeptidasi coinvolta nei processi di adesione del batterio (Gram+) alle membrane delle cellule sulle quali andrebbe ad ancorarsi⁽²⁹⁾. Nel secondo, la berberina risulterebbe avere una certa affinità per l'LPS verso il quale avrebbe un comportamento antagonista. Ne limiterebbe cioè la capacità di legame con i preposti recettori posti sulle membrane di alcune cellule immunitarie che, altrimenti stimolate, condurrebbero a patologie LPS-mediate⁽³⁰⁾. Ovviamente la berberina, nel lume intestinale, agisce "topicamente" in maniera anti-batterica. Basandoci sui valori di IC₅₀ noti, compresi tra 14.6 e 809 mg/L, e sulla solubilità in *medium* acquoso a 37°C della berberina stessa, 2000 mg/L, dobbiamo considerare le proprietà anti-batteriche della berberina non solo come possibili, ma come reali e di rilevanza clinica⁽³¹⁾.

Da un uso prettamente anti-diarroico/anti-batterico si è poi passati, in anni più recenti, ad un uso della berberina come ipolipemizzante ed ipoglicemiz-

zante. E questo per *serendipity* (casualità fortuita). Infatti nel corso di un trattamento di pazienti diabetici affetti da concomitante diarrea ad eziologia batterica, alcuni ricercatori notarono che la somministrazione di berberina aveva un effetto anche ipoglicemizzante, oltre che anti-diarroico⁽³²⁾. Era il 1988 e il lavoro passò totalmente inosservato. Nel 2004 la svolta. Un gruppo di ricercatori presenta sulle pagine di *Nature* l'osservazione circa gli evidenti effetti ipolipemizzanti della berberina. Il dato risultava di grandissimo rilievo in quanto gli effetti anti-colesterolo e anti-trigliceridi erano prodotti con un meccanismo d'azione totalmente diverso da quello delle statine (le quali come già ricordato inibiscono l'enzima HMG-CoA-reduttasi). Trattando gli epatociti con berberina si assisteva infatti ad un effetto di stabilizzazione del messaggero trascritto (da DNA a mRNA) per essere poi tradotto (da mRNA a proteina) in forma di recettore per le LDL. Nel citoplasma cellulare vi erano, in seguito a trattamento con berberina, 3.5 volte più messaggeri del normale e in membrana 2.6 volte più proteina-recettoriale pronta ad internalizzare le LDL. In parole povere una cellula che, non trattata con berberina, era capace di "incastonare" in membrana 10 recettori per le LDL, quando veniva trattata con berberina ne "incastonava" ben 26. E 26 recettori internalizzano 26 LDL, 16 in più del normale per cellula. Gli Autori riferirono che in 32 pazienti ipercolesterolemici, trattati per tre mesi con 500 mg di berberina due volte al giorno, al termine del trattamento si osservava una riduzione del colesterolo totale, del colesterolo-LDL e dei trigliceridi rispettivamente del 29, 25 e 35%⁽³³⁾. Nessun effetto era invece rilevabile sul parametro HDL (Tab.2). Oggi conosciamo abbastanza nel dettaglio il meccanismo biochimico che determinava nei pazienti trattati con berberina il miglioramento della dislipidemia. La berberina aumentava cioè l'espres-

Tabella 2 - Effetto della berberina sui parametri lipidici (ematici) in pazienti ipercolesterolemici trattati con 1000 mg/die per 90 giorni (n=32) in confronto ad un gruppo placebo (n=11)

Parametri	T0		T90	
	Placebo	Berberina	Placebo	Berberina
Colesterolo totale	6.1 ± 0.6	5.9 ± 0.7	6.0 ± 0.8	4.2 ± 0.9*
HDL	1.2 ± 0.5	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.4	1.1 ± 0.3
LDL	3.7 ± 0.7	3.2 ± 0.7	3.7 ± 0.8	2.4 ± 0.6*
Trigliceridi	2.2 ± 0.8	2.3 ± 1.8	2.1 ± 0.9	1.5 ± 0.9*

* Dati espressi in mmol/L (M ± DS); * p<0.01 vs t=0

Da: Kong W, Wei J, Abidi P, Lin M, Inaba S et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through unique mechanism distinct from statins. *Nat Med.* 2004; 10(12): 1344-1351

sione del recettore per le LDL mediante un meccanismo post-trascrizionale che stabilizzava l'mRNA codificante il recettore stesso, ma l'aumentata espressione di tale recettore in membrana era mediata sia dall'attivazione della chinasi amino-terminale di c-Jun, una proteina anche coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare e nei processi apoptotici, che dall'attivazione di ERK, il cui ruolo risultava determinante nell'incrementare la stabilità dell'mRNA codificante il recettore per le LDL. Il meccanismo d'azione ipolipemizzante della berberina si confermava quindi totalmente diverso da quello delle statine e non risultava coinvolgere l'espressione o l'attività dell'HMG-CoA reduttasi. Il meccanismo d'azione ipolipemizzante della berberina è comunque ancora più complesso. Per capire la natura di tale complessità dobbiamo però rifarci ad un altro studio nel quale venne valutato l'effetto della co-somministrazione di berberina e simvastatina. Tale studio, eseguito sia su ratti sottoposti ad un regime alimentare ricco di grassi saturi e colesterolo, che su un gruppo di 63 pazienti ipercolesterolemici⁽³⁴⁾, dimostrò un'importante sinergia tra la berberina e le statine in generale. Negli animali veniva osservato che il trattamento con 90 mg/kg/die di berberina e 6 mg/kg/die di simvastatina per un mese, provocava una riduzione del 46.2% dei livelli LDL. L'impiego separato dei due farmaci al medesimo dosaggio, induceva invece una diminuzione del 26.8% per la berberina e del 28.3% per la simvastatina. Particolarmente interessante notare che il risultato ottenuto grazie alla co-somministrazione dei due prodotti (46.2%) era equivalente, anche se di poco superiore, a quello ottenuto grazie alla sola simvastatina impiegata a dosaggio doppio e cioè a 12 mg/kg/die (43.2%). Per quanto concerne l'associazione berberina-simvastatina in pazienti ipercolesterolemici non sottoposti a precedente terapia farmacologica, venivano impiegati i seguenti dosaggi: berberina 1000 mg/die; simvastatina 20 mg/die. Un terzo gruppo di pazienti veniva trattato con entrambi i prodotti ai medesimi dosaggi. Il trattamento con berberina o con simvastatina conduceva, rispettivamente, a riduzioni delle LDL del 23.8 e del 14.3%. Anche in questo caso la sinergia derivante dalla co-somministrazione dei due preparati risultava evidente, dando luogo ad una diminuzione del colesterolo LDL del 31.8%. Il risultato relativo al colesterolo totale seguiva un andamento totalmente analogo a quello delle LDL. Infine, mentre la berberina, la simvastatina e la loro associazione provocavano una notevole riduzione dei trigliceridi (rispettivamente del 22.1, dell'11.4 e del 38.9%), non si evidenziavano effetti significativi sul colesterolo HDL. Anche in questo studio, come in quello

precedentemente citato, non venivano rilevati effetti collaterali avversi o anomalie della funzione epatica o renale, né per i pazienti in terapia con il singolo prodotto, né per quelli in terapia combinata. La comprensione dei risultati derivanti dall'associazione berberina-simvastatina, per altro validi per qualunque altra associazione tra berberina e statina, poggia sul ruolo giocato da PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) e già affrontato nel Capitolo 4, nella parte dedicata al ruolo di *herbal bioenhancer* della berberina verso qualunque statina. Per completezza d'informazione aggiungiamo a questo riguardo un dettaglio molecolare: l'antagonismo verso PCSK9 avrebbe luogo tramite un processo noto come "ubiquitinazione" (riprenderemo più avanti nel testo il processo parlando di Nrf2 e *Brassicaceae*) e degradazione di HNF1 α (*Hepatocyte Nuclear Factor 1 α*), fenomeno che direttamente determinerebbe l'incremento del recettore per le LDL a livello post-traduzionale^(35,36). I meccanismi riportati finora e descritti dai vari Autori per spiegare l'effetto ipolipemizzante della berberina non sono gli unici possibili. Per esempio la berberina potrebbe ridurre la colesterolemia anche attraverso l'inibizione dell'assorbimento di colesterolo, come anche promuovendone la sua escrezione. Il trattamento per otto settimane con berberina, a dosaggi compresi tra i 50 e i 150 mg/kg, in un modello di ratto "aterogenico" determinò, come atteso, la riduzione della colesterolemia totale e di quella non-HDL, rispettivamente per valori compresi tra il 29 e il 33% e per valori tra il 31 e il 41%. Queste percentuali correlavano però perfettamente anche con la riduzione dell'assorbimento del colesterolo che gli Autori si premunirono di misurare e che corrispondeva a valori compresi tra il 40 e il 51%⁽³⁷⁾. Il perché molecolare potrebbe risiedere in una diminuzione della capacità di *uptake* molecolare di colesterolo da parte dell'enterocita, e/o in un'aumentata capacità di rilascio dalla sede epatica. La prima ipotesi sembrerebbe avvalorata, almeno nella modellistica animale, dall'osservazione fatta co-somministrando la berberina con i fitosteroli. Il trattamento creerebbe un'importante sinergia nel ridurre l'assorbimento del colesterolo intestinale^(37,38). Per quanto concerne la seconda ipotesi, in un modello animale di iperlipidemia caratterizzato dall'accumulo di grandi quantità di colesterolo in sede epatica, è stato osservato come la somministrazione di berberina (50-100 mg/kg) sia in grado di condurre ad una graduale riduzione del colesterolo epatico e ad un parallelo incremento di quest'ultimo a livello biliare. Il fenomeno potrebbe suggerire un ruolo rilevante nell'escrezione di colesterolo epato-bilare a cui imputare, anche solo

in parte, l'azione ipolipemizzante della berberina⁽³⁹⁾. Queste ultime ipotesi verrebbero felicemente in soccorso e spiegherebbero meglio l'azione della berberina sul quadro lipidico. I test che ad esempio hanno permesso di evidenziare l'azione della berberina sull'mRNA del recettore per le LDL, come anche la capacità di *down*-modulazione di PCSK9, sono stati ottenuti utilizzando concentrazioni di berberina intorno a 7.5 µg/mL. Queste, facilmente raggiungibili *in vitro*, sono troppo distanti dalla concentrazione plasmatica realmente determinata da trattamenti orali.

Come detto in precedenza, la scoperta della capacità della berberina di ridurre i livelli di glicemia nel sangue avvenne casualmente durante il trattamento di pazienti diabetici affetti da diarrea. Questa osservazione spinse i ricercatori a condurre uno studio clinico mirato su 60 pazienti con diabete di tipo 2⁽⁴⁰⁾, trattati con berberina per via orale tre volte al giorno, con dosaggi unitari rispettivamente di 300, 400 o 500 mg, in dipendenza dal valore di glucosio nel sangue misurato al t=0. Lo stesso trattamento veniva anche eseguito su un gruppo di controllo costituito da individui sani. Ma mentre in questi ultimi non venivano osservate modificazioni nei livelli di glucosio del sangue, in circa il 90% dei pazienti diabetici si riscontrava una riduzione statisticamente significativa della glicemia. Molti altri lavori successivi a questo ne hanno poi confermato i risultati. Da un punto di vista meccanicistico, l'effetto ipoglicemizzante della berberina (1-15 µg/mL) appare legato a diversi fattori quali l'aumento dell'espressione dei recettori GLUT-1, GLUT-4 e insulinico (InsR) e, a livello mitocondriale, l'incremento dell'attività di AMPK, a sua volta capace di determinare un aumento della glicolisi, dell'*uptake* e del consumo di glucosio. A livello intestinale apparirebbe invece manifestarsi anche un'azione *acarbose-like* di riduzione dell'attività α-glucosidasi, con riduzione dell'assorbimento di glucosio. Questo dato giustificerebbe tra l'altro l'osservazione clinica secondo cui la berberina risulterebbe particolarmente efficace sulla glicemia post-prandiale. Sulla base infine della mancata azione ipoglicemizzante della berberina sui soggetti normo-glicemici, e in base alla evidente *up*-modulazione periferica del recettore per l'insulina osservata negli iper-glicemici, oggi si è soliti definire la berberina come anti-iper-glicemico insulino-sensibilizzante^(41,42). L'azione insulino-sensibilizzante potrebbe però essere dovuta anche ad ulteriori meccanismi. Dati per ora osservati solo *in vitro* sembrerebbero indicare che l'effetto anti-diabetico della berberina potrebbe essere associato anche ad una regolazione diretta del rilascio di insulina. L'analisi dei geni modulati

dalla presenza di berberina mostra chiaramente un'inibizione, reversibile e dose-dipendente, di Ins2 che, nelle β -cellule di topo note come NIT-1, funge da promotore per il gene dell'insulina. Tale inibizione risulterebbe evidente dalla misurazione degli mRNA del gene per l'insulina⁽⁴³⁾ e potrebbe avere conseguenze anti-insulino-resistenza e anti-glucosio-intolleranza, determinando inoltre un ritardo nell'esaurimento pancreatico. Inoltre come già, almeno in parte, descritto nel Capitolo 1 al paragrafo "Curiosità", è stato recentemente descritto per la berberina un ruolo estremamente rilevante nella modulazione del microbiota in senso anti-diabetico. In ratti con diabete di tipo 2 la somministrazione di berberina revertiva completamente gli effetti determinati sul microbiota da una dieta ricca di grassi. In questo modello animale 60 gruppi tassonomici su 134, descritti come associati al fenotipo obeso, diminuivano in maniera altamente significativa. Al contrario si osservava un importante incremento dei ceppi produttori acidi grassi a corta catena e/o capaci di determinare effetti salutistici sull'ospite, soprattutto in termini glicemici e ponderali⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾. Il comportamento della berberina sull'assetto glucidico e sul peso, mediato dal microbiota, potrebbe contribuire a spiegarne gli effetti anti-diabetici osservati in clinica. Questi, confermati ormai anche da importanti revisioni metanalitiche⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾, mostrano, come per qualunque altro effetto farmacologico proprio della berberina, il problema della compatibilità con una biodisponibilità orale estremamente bassa incapace, in termini cinetici, di rendere ragione di molti degli effetti osservati.

Indipendentemente dagli aspetti meccanicistici, in termini di efficacia ed efficienza farmacologica il comportamento della berberina risulta sovrapponibile a quello della metformina. In uno studio clinico pilota⁽⁴²⁾ venivano infatti confrontati gli effetti della somministrazione di berberina o di metformina (entrambe alla dose di 500 mg, tre volte al giorno) per 90 giorni, in due gruppi di pazienti diabetici (18 per gruppo). I risultati dimostravano che entrambi i trattamenti miglioravano i parametri glicemici, con efficacia sostanzialmente analoga. Nel gruppo berberina il glucosio post-prandiale passava da 20 a 11 mmol/L, mentre il glucosio a digiuno andava da 10.5 a 7 mmol/L. Nel gruppo metformina il glucosio post-prandiale passava da 21 a 13 mmol/L, mentre il glucosio a digiuno andava da 10 a 7.5 mmol/L.

Gli effetti sul quadro lipidico erano invece ovviamente molto differenti: mentre la somministrazione di berberina induceva anche una significativa riduzione dei trigliceridi e del colesterolo (sia totale che LDL), la metformi-

na non sembrava avere effetti in alcun modo apprezzabili. Lo studio, infine, non evidenziava effetti collaterali avversi a livello epatico o renale in ambedue i gruppi.

Per una sostanza con dimostrazioni metanalitiche in merito agli effetti ipolipemizzanti⁽⁵¹⁾ ed insulino-sensibilizzanti⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾, non dovrebbe stonare il fatto di essere dotata anche di proprietà cardio-protettive⁽⁵²⁾. In effetti, risultati ottenuti primariamente, ma non solo, *in vitro* o in condizioni sperimentali sull'animale, dimostrano per la berberina effetti positivi nell'insufficienza cardiaca⁽⁵³⁻⁶³⁾, con meccanismi relazionabili ad una migliore disponibilità cardiaca di Ca^{++} e K^+ ; nell'ipertensione lieve/moderata⁽⁶⁴⁻⁶⁸⁾, con meccanismi anti- $\alpha 1$ e pro-ossido nitrico; nell'aggregazione piastrinica^(69,70), con meccanismi anti-acido arachidonico e $\alpha 2$ agonisti; e nelle aritmie⁽⁷¹⁻⁷⁴⁾, con meccanismi incidenti sui potenziali d'azione e sulle correnti di K^+ .

Le evidenze cliniche relative alla berberina vanno ben al di là dei pochi dati citati in questo testo, anche se gli stessi pochi dati sono assolutamente ben rappresentativi di quelli mancanti. Digitando la parola *berberine* su *PubMed* (dato aggiornato al gennaio del 2016), vengono visualizzati 3900 lavori di cui ben 112 risultano essere *trial* clinici. Numeri così importanti sono anche certamente legati al fatto che negli ultimi anni diversi Autori hanno iniziato ad investigare la berberina in aree diverse da quelle più tipiche dei disordini del metabolismo. Proprio grazie a questi lavori oggi conosciamo anche le proprietà della berberina relative alle potenziali applicazioni nell'area oncologica⁽⁷⁵⁻⁷⁸⁾ ed in quella neurologica⁽⁷⁹⁻⁸²⁾.

Da un punto di vista della sicurezza sull'uomo, la berberina mostra un elevato profilo di sicurezza^(83,84) come dimostrano i risultati dei test ematochimici, cardiologici, epatici e renali ai quali sono stati sottoposti i soggetti trattati con berberina ad alto dosaggio. In particolare, per quanto concerne fegato e rene, la berberina non solo risulterebbe non tossica, ma anche rispettivamente anti-steatosica⁽⁸⁵⁾ ed anti-infiammatoria⁽⁸⁶⁾. Queste ultime due caratteristiche fanno della berberina una valida opzione terapeutica nel soggetto diabetico con patologia epatica e insufficienza renale. Problematiche minori di natura gastroenterologica sono state riportate da alcuni Autori, ma tali problematiche sono tutte da mettere in correlazione con le proprietà in qualche modo ben note per la berberina: bruciori di stomaco (la berberina è una spezia); disidratazione delle feci con stipsi soprattutto nei mesi estivi (la berberina è un anti-diarroico); flatulenza e meteorismo (effetto *acarbose-like*). Sempre in tema di sicurezza va segnalata la possibilità

che la berberina manifesti possibili interazioni con alcuni farmaci. Le prove disponibili, derivate da *trial* clinici, risultano tutte eseguite su soggetti orientali. Questi studi indicano per la berberina l'interazione con i sistemi ABC e una costante ma debole capacità di inibizione del citocromo *CYP3A4*. Uno studio sembrerebbe inoltre suggerire per la berberina la capacità di diminuire, anche se debolmente, l'attività del citocromo *CYP2D6* e, ancor meno, del citocromo *CYP2C9*. Altamente improbabile per la berberina, come definito dagli stessi Autori, la capacità di inibire le funzioni dei citocromi *CYP1A2* e *CYP2C19*. Nonostante manchino *reports* e segnalazioni di individui che abbiano subito importanti conseguenze a causa di interazioni berberina-farmaco, una nota di cautela dovrebbe quindi essere espressa nel caso di somministrazioni di farmaci ritenuti substrati sensibili di *ABCB1*, *CYP3A4*, *CYP2D6* e/o *CYP2C9*⁽⁸⁷⁾, come ad esempio ciclosporina A, dextrometorfano, losartan, omeprazolo, metoprololo, midazolam, warfarina, digossina, verapamil, *etc.* Anche se non esistono segnalazioni cliniche in questo senso, un minimo di attenzione in più meriterebbe anche la somministrazione di berberina in soggetti trattati con farmaci antiaritmici come la chinidina, l'amiodarone, il sotalolo, la procainamide o la ranolazina; o con farmaci anti-istaminici come la terfenadina o l'astemizolo; o con l'antibiotico eritromicina o alcuni fluorochinolonici; o con ansiolitici maggiori; o con triciclici o inibitori della ricaptazione della serotonina; o con farmaci agenti sulla motilità gastro-intestinale come cisapride o domperidone; o con farmaci antipsicotici come l'aloiperidolo, la quetiapina, la tioridazina, il droperidolo; o con analgesici come il metadone. Questo perché alcuni risultati, comunque ottenuti quasi esclusivamente *in vitro*, segnalerebbero per la berberina la capacità teorica di provocare la cosiddetta "sindrome del QT lungo" (LQTS, *Long Q-T Syndrome*). Questa è una rara anomalia cardiaca caratterizzata da una ritardata ripolarizzazione delle cellule miocardiche associabile a sincope. La sincope è determinata il più delle volte da aritmie maligne, specialmente torsioni di punta, che possono degenerare in fibrillazione ventricolare e, talvolta, in arresto cardiaco irreversibile del soggetto colpito. Le aritmie nei pazienti affetti da LQTS sono spesso scatenate dall'esercizio fisico o dagli stimoli emotivi, ma possono, seppur raramente, essere provocate da alcuni farmaci (come quelli listati sopra). Per meglio comprendere che relazione abbia la berberina con la LQTS dobbiamo introdurre il concetto di *human ether-a-go-go-related gene*, o hERG. Questo gene codifica per la subunità α del canale IKr, canale a rettificazione ritardata rapida, che svolge un ruolo

essenziale nella fase III di ripolarizzazione del potenziale d'azione. Una riduzione dell'espressione del canale hERG, attraverso il quale transita la corrente di K^+ , può rallentare la ripolarizzazione, prolungando quindi l'intervallo QT. Già nel 2001 era stato riportato come la berberina fosse in grado, in acuto, di bloccare il canale hERG e di prolungare quindi la durata del potenziale d'azione negli ovociti di *Xenopus*⁽⁸⁸⁾. Gli Autori descrivevano quest'azione come responsabile del possibile effetto anti-aritmico della berberina. Dati successivi però dimostrarono come la presenza cronica di berberina produceva non solo l'antagonismo, ma anche la degradazione del recettore hERG nel tessuto ventricolare di ratto e di *guinea pig* con inevitabile prolungamento del QT⁽⁸⁹⁾. Sebbene sia anche nota una possibile *rescue-therapy*, lo stilbene resveratrolo, come anche l'antistaminico fexofenadina, accorciano in maniera significativa il prolungamento della durata del potenziale d'azione berberina-indotto comportandosi quindi come antagonisti del danno⁽⁹⁰⁾; stiamo ovviamente parlando di cardiotoxicità esclusivamente teorica.

La clinica, ad oggi, riporta al contrario solo gli effetti cardioprotettivi derivanti dalla somministrazione di berberina. Quanto descritto, a tratti paradossale, non è in fondo l'unico "neo" della berberina. Sempre *in vitro* alcuni Autori evidenziarono come la berberina mostrasse effetti pro-trombotici dovuti alla capacità di incrementare la produzione del cosiddetto fattore tissutale⁽⁹¹⁾ noto anche come TF. Anche in questo caso ci troviamo comunque di fronte ad un comportamento paradossale nel senso che è altresì nota l'azione anti-aggregante della berberina, determinata sia dall'interazione con alcuni aspetti biochimici dell'acido arachidonico, il cui metabolismo viene parzialmente inibito⁽⁶⁹⁾, sia a livello di adreno-recettori piastrinici α -2, sui quali la berberina ha ruolo di parziale agonista⁽⁷⁰⁾. Ma la cosa che appare maggiormente rilevante, e che accomuna questi due potenziali aspetti negativi della berberina (la demolizione di hERG e l'incremento di TF) è la difficoltà, per non dire l'impossibilità, che il fenomeno si realizzi clinicamente. I risultati che sembrano indicare nella berberina un potenziale cardiottossico o un induttore di coaguli, sono stati infatti ottenuti utilizzando la berberina, nelle preparazioni *in vitro* o *ex vivo*, a valori "micromolari" o μ M. Dopo somministrazione orale invece, nella migliore delle ipotesi, la berberina si concentra per valori "nanomolari" o nM⁽⁹²⁾. In parole più semplici, dopo somministrazione orale la berberina si trova nel sangue a concentrazioni migliaia di volte inferiori a quelle necessarie perché i due effetti tossici appena discussi possano verificarsi davvero.

Utilità clinica della berberina

I dati disponibili ad oggi raccontano di una berberina sicura da un punto di vista tossicologico, efficace sia sul quadro lipidico che su quello glucidico, documentata da sufficiente letteratura scientifica di qualità e quindi impiegabile come ipolipemizzante e antidiabetico, anche nei soggetti con diagnosi di sindrome metabolica. Va posta a questo punto una giusta domanda. Perché la medicina dovrebbe aver bisogno di una “berberina”? I farmaci ipolipemizzanti, in particolare le statine, e quelli per il controllo del diabete, dalla metformina all’insulina, non sono sufficienti? In realtà no. Il 10-15% dei pazienti è statino-sensibile e solo il 10-20% dei pazienti ipercolesterolemici raggiunge il *target* sperato in assenza di effetti collaterali importanti. In diabetologia la *multi-drug therapy* è vincente sulla monoterapia e il 100% dei pazienti diabetici evolve in uno stato di necessità insulinica che si traduce in “iniezioni per tutta la vita”. Avere a disposizione la berberina corrisponderebbe ad avere un nuovo farmaco capace, sia di esercitare un’azione ipolipemizzante nuova e soprattutto “non-statino-simile”, sia di ritardare il passaggio alla terapia iniettiva con insulina. La risposta è quindi sì, il mondo della medicina potrebbe solo trarre vantaggio dall’aver a disposizione una “berberina”.

Assorbimento della berberina

Contrariamente a quanto però sembrerebbe lecito aspettarsi in relazione ai buoni risultati clinici descritti, ma in realtà in totale accordo con quanto il lettore ha senza dubbio appreso durante lo studio di questo testo, la berberina dimostra una incompleta biodisponibilità orale che, evidentemente, ne limita l’efficacia potenziale. Se dopo somministrazione endovenosa, la berberina dimostra infatti una cinetica lineare con un valore di AUC (*Area Under the Curve*) che cresce proporzionalmente al crescere della dose iniettata, dopo somministrazione orale la quota di berberina reperibile nel plasma, inalterata o in forma glucuronidata, è piuttosto bassa. Anche i suoi principali metaboliti, berberrubina (M1), talifendina (M2), demetilenberberina (M3) e jatrorrizzina (M4), reperibili nel sangue liberi o glucuronidati, sono, di conseguenza, quantitativamente scarsi. In termini assoluti, la biodisponibilità orale sia nel ratto che nell’uomo è inferiore all’1%^(93,94). Anticipando

comunque che il comportamento cinetico della berberina è per certi versi simile nell'animale e nell'uomo, valutiamo un po' più nel dettaglio cosa succede ad esempio nel ratto. In seguito a somministrazioni orali di 25 e 100 mg/kg, la C_{max} della berberina oscilla tra 4 e 16 ng/mL e viene raggiunta dopo circa 15 minuti dalla somministrazione. Nelle successive 12 ore la concentrazione scende progressivamente fino quasi a scomparire. Tracce di berberina però restano comunque osservabili fino a 36 ore dalla somministrazione^(95,96). Parte della berberina reperibile libera nel plasma non raggiunge la circolazione senza modificazioni intermedie. Nell'intestino, infatti, una frazione del microbiota ricca di nitroreductasi, trasforma la berberina in di-idro-berberina. Come tale la molecola penetra nel tessuto intestinale con un'efficienza cinque volte maggiore rispetto alla berberina tal quale. All'interno del tessuto intestinale la di-idro-berberina viene ricommutata dalle ossidasi a berberina⁽⁹⁷⁾. La berberina, entrata o meno in circolo attraverso l'intermedio intestinale di-idro-berberina, si concentra nei vari organi secondo il seguente ordine decrescente: fegato, reni, muscolatura striato-scheletrica, polmoni, cervello, cuore, pancreas e tessuto adiposo. Considerando, dopo una somministrazione di berberina di 200 mg/kg, una AUC totale intorno ai 1400 ng/mL x h, la quota reperibile nel solo fegato corrisponde al 50% della presenza nell'intero organismo. Questo aspetto spiega abbastanza facilmente il ruolo della berberina nei confronti di colesterolo, trigliceridi e glucosio, come anche la sua azione anti-epatosteatosica⁽⁹⁸⁾. La berberina, in maniera progressiva e ad ogni passaggio epatico, viene prima demetilata dagli enzimi di Fase I e quindi coniugata con acido glucuronico dalle transferasi di Fase II. I citocromi coinvolti sono il *CYP2D6*, il *CYP1A2* e il *CYP3A4*. L'azione di tali enzimi produce quindi i quattro metaboliti visti prima, M1-M4, tanto in forma libera quanto in forma coniugata. In entrambe le forme, questi sono poi reperibili nei tessuti con una distribuzione abbastanza simile a quella vista prima per la berberina. Tra i metaboliti della berberina, l'M1 è senza dubbio quello più abbondante. La sua presenza epatica arriva ad essere anche tre volte maggiore di quella della berberina stessa. I metaboliti M1 ed M2, differentemente da M3 ed M4, restano molecole attive almeno a livello epatico dove mantengono, seppur con efficienza molto minore, le proprietà ipolipemizzanti ed anti-iperglicemiche tipiche della berberina⁽⁹⁸⁻¹⁰¹⁾. Infine, nel ratto, l'escrezione di berberina avviene per via epato-biliare e urinaria, dove il composto originario è reperibile solo nella forma dei suoi metaboliti (M1-M4), coniugati o meno, o con nuove forme demetilate, per un totale di

11 composti diversi. Nelle urine la berberina tal quale è reperibile soltanto in tracce e per valori anche inferiori allo 0.04%⁽¹⁰²⁾. Prima dell'eliminazione attraverso la bile le forme coniugate vengono idrolizzate dai batteri intestinali e reimmesse nel circolo entero-epatico. Quest'ultimo fenomeno non avviene nell'animale *germ-free* trattato con antibiotici⁽¹⁰³⁾. Nell'uomo, dopo somministrazione orale di 400-500 mg, la C_{max} della berberina libera risulta essere compresa tra 0.4 e 0.7 ng/mL, 10 volte meno di quanto osservato nel ratto. Le concentrazioni dei metaboliti M2 ed M4 rispecchiano lo stesso *range* di valori o poco più. La C_{max} viene raggiunta dopo circa 1 ora dalla somministrazione e la rilevabilità, seppur modesta, della berberina plasmatica raggiunge le 24 ore. La C_{max} del metabolita M1, parzialmente attivo, è invece 10 volte maggiore (1.4 nM) e viene raggiunta 4 ore dopo la somministrazione. Dopo somministrazione cronica (15 mg/kg per 90 giorni), le concentrazioni di berberina, M1, M2 ed M4 erano rispettivamente 4, 7, 2 e 5.5 nM^(92,104). In accordo con quanto visto la somministrazione di 900 mg/dose di berberina nell'uomo produce una rilevazione plasmatica di circa 4 nM. Questo valore spiega come solo a partire all'incirca da tale dosaggio si evidenzia l'effetto insulino-sensibilizzante della berberina. Per avere ad esempio effetto sull'*up*-modulazione dell'InsR è necessario che la berberina raggiunga una concentrazione plasmatica superiore a 2.7 nM⁽¹⁰⁵⁾.

Il perché di uno scarso assorbimento

Per meglio comprendere il perché dello scarso profilo cinetico della berberina è necessario affrontare il tema della resistenza ai farmaci anti-tumorali. In generale l'attività dei farmaci dipende dalla loro capacità di attraversare le barriere biologiche (mucose, epiteli, plessi, membrane) per poi raggiungere i loro siti bersaglio. I farmaci ad elevato tenore lipofilo sono in grado di attraversare tali barriere in assenza di sistemi di trasporto specializzati, tramite la diffusione passiva attraverso le membrane citoplasmatiche, nucleari, mitocondriali. Al contrario, i composti altamente idrofili richiedono meccanismi di trasporto specifici per facilitare il loro trasporto.

In realtà il fattore limitante la quantità di farmaco che raggiunge un determinato *target* è rappresentato non tanto dalla sua capacità ad entrare nella cellula, ma dalla sua tendenza a lasciarla. Il fenomeno dipende da meccanismi di estrusione farmacologica presenti nelle membrane plasma-

tiche, che svolgono un ruolo critico, limitando l'assorbimento e l'accumulo di sostanze esogene all'interno delle cellule e conferendo in tal modo resistenza a diversi farmaci. Questo fenomeno, già descritto nel Capitolo 1 e nel Capitolo 4, è chiamato *Multi Drug Resistance* (MDR), ed è particolarmente evidente nelle cellule tumorali le quali, divenendo MDR+, acquisiscono la capacità di estrarre dal proprio interno il composto ad azione antitumorale. Le molecole responsabili del fenomeno MDR sono trasportatori a struttura proteica ATP-dipendente codificati dai geni ABC (*ATP-Binding Cassette*). I trasportatori ABC svolgono un ruolo fisiologico di detossificazione e protezione dell'organismo da sostanze xenobiotiche, mediante il trasporto unidirezionale dei composti dal citoplasma ad un compartimento intracellulare (reticolo endoplasmatico, mitocondri, perossisomi, etc.), oppure allo spazio extracellulare al di fuori della cellula, per la successiva eliminazione dall'organismo attraverso l'urina e/o la bile. Come già menzionato nel testo, almeno sei forme di geni ABC sono associate all'estruzione di farmaci antitumorali. In particolare, il gene ABCB1, anche noto come MDR1, è il trasportatore meglio caratterizzato da un punto di vista biochimico. Esso codifica per una glicoproteina-P (gp-P) di 170 KDa, che svolge un ruolo importante nello sviluppo della resistenza a molti chemioterapici antitumorali, precludendone l'accumulo a livello delle cellule neoplastiche. L'estruzione via gp-P non è però descritta solo per farmaci ad azione antitumorale, ma anche per calcio-antagonisti, cardiotonici, inibitori di proteasi, immunosoppressori, farmaci ad azione sul sistema nervoso centrale e steroidi. Da alcuni anni è stato descritto come la gp-P sia particolarmente abbondante anche sulla membrana, soprattutto sul versante apicale, degli enterociti. Qui la sua attività conduce all'espulsione, direttamente nel lume intestinale, di alcuni composti, tra cui la berberina, penetrati, dopo somministrazione orale, per diffusione passiva all'interno delle cellule del pavimento enterocitario. Quindi la ridotta presenza plasmatica della berberina non è tanto dovuta ad un suo scarso assorbimento diretto, quanto ad una sua massiva ri-estruzione nel lume intestinale.

Fenomeno, questo, assolutamente successivo ad un iniziale assorbimento del composto a livello della mucosa stessa⁽¹⁰⁶⁾. Il fenomeno della ri-estruzione intra-luminale della berberina è confermato dai risultati derivanti dal contemporaneo utilizzo di due noti e potenti inibitori di tale processo in quanto anche loro substrati specifici per la medesima proteina: ciclosporina A e verapamil. La loro presenza infatti rende altamente biodisponibile la

berberina per valori anche 10 volte superiori al controllo⁽¹⁰⁶⁾. Il tema della possibile inibizione/attivazione della gp-P è divenuto particolarmente interessante dalla messa a punto del modello sperimentale con la linea cellulare Caco-2, sulle cui membrane citoplasmatiche tale molecola-estrusore, come anche altre molecole a funzione simile appartenenti alla prima descritta famiglia dei recettori MDR, è particolarmente espressa. Sfruttando questa linea cellulare è stato possibile evidenziare e selezionare attivatori e inibitori delle pompe di estrusione molecolare.

L'uso della silimarina come *bioenhancer*

Tra gli inibitori di gp-P vi sono certamente i flavanolignani estratti dal cardo mariano: la cosiddetta silimarina⁽¹⁰⁷⁾. Ma non è l'unica soluzione. Diversi gruppi di ricerca nel mondo stanno lavorando, finalizzando i loro sforzi per trovare un modo efficace e sicuro per evitare il problema della estrusione gp-P-mediato della berberina. Alcuni si sono focalizzati sulla sintesi di nuovi analoghi della berberina che ne conservino le attività senza più interagire con il meccanismo dell'estrusione enterocitaria⁽¹⁰⁸⁾; altri si sono concentrati sull'impiego di potenziali altri *bioenhancer* (vedi Capitolo 4) capaci di antagonismo diretto sulla gp-P⁽¹⁰⁹⁾. Al di là delle soluzioni che vari gruppi di ricerca internazionali hanno cercato, e potenzialmente trovato, l'effetto di estrusione enterocitario è davvero imponente per la berberina. In alcuni test è stato osservato come fino al 90% della berberina somministrata per via orale potrebbe essere bloccata dai sistemi ABC⁽¹¹⁰⁾. E solo un ulteriore 9% circa verrebbe bloccato dagli enzimi epatici di fase I⁽¹⁰³⁾, rendendo l'azione degli enzimi di fase II assolutamente minimale e incapace di peggiorare ulteriormente la scarsa biodisponibilità orale della berberina. Secondo questa visione, in questo senso comunque corretta, risulterebbe inutile il ricorso alla piperina per potenziare l'effetto farmaco-clinico della berberina. Secondo altri Autori però il mancato assorbimento intestinale della berberina non corrisponderebbe al 90% della dose somministrata bensì al 99%. Questo valore risulterebbe determinato per un 56% da un vero e proprio mancato assorbimento (dovuto principalmente all'azione della gp-P, ma anche alla formazione di macro-aggregati di berberina o in relazione ad un probabile effetto sequestrante esercitato dalla bile), e per il 43% all'azione delle ossidasi di Fase I localizzate già a livello intestinale, le quali produ-

rebbero i metaboliti visti prima (M1-M4). L'azione degli enzimi epatici (Fase I e II) si ridurrebbe quindi a valori minimali ed irrilevanti compresi tra 0.1 e 1.0%⁽⁹⁴⁾. Come detto in precedenza è possibile antagonizzare la gp-P ricorrendo all'uso della silimarina. Ovviamente la silimarina non è l'unico derivato erbale a determinare tale antagonismo. Capaci di una medesima azione sono anche ad esempio i ginsenosidi, le catechine gallate e la naringenina. Tra questi derivati però, la silimarina risulta essere il meno biodisponibile oralmente. Quindi il più sicuro, in quanto la sua azione si concentrerebbe quasi esclusivamente a livello intestinale.

L'associazione berberina-silimarina alla prova clinica

L'associazione berberina-silimarina è stata oggetto di diversi studi che ne hanno dimostrato sicurezza ed efficacia, quando impiegata come ipolipemizzante, tanto nel paziente *naïve*, quanto nel paziente già in terapia con statine e, soprattutto, quando intollerante a queste ultime⁽¹¹¹⁻¹¹⁴⁾. Questi lavori hanno dimostrato infatti come nel paziente dislipidemico, ma non altrimenti trattato, la somministrazione di berberina e silimarina riduca in maniera statisticamente significativa il colesterolo totale (-25% circa), il colesterolo LDL (- 30% circa) e i trigliceridi (- 20% circa) con un buon segnale anche sul colesterolo HDL. Nei medesimi pazienti, euglicemici, il trattamento migliorava inoltre il profilo di secrezione insulinica rilevato mediante test del glucagone e lettura del C-peptide. Sempre in pazienti dislipidemici ed euglicemici, ma in sovrappeso, il trattamento determinava anche un'evidente riduzione dello stato infiammatorio omentale, quest'ultimo rilevato attraverso la lettura di adipocitochine come il RBP-4 (*retinol binding protein-4*), la resistina e l'adiponectina. L'associazione berberina-silimarina risultava clinicamente interessante anche quando somministrata a pazienti ipercolesterolemici intolleranti ad alti dosaggi di statina. Riducendo la statina al 50% della dose iniziale ed aggiungendo al trattamento l'associazione berberina-silimarina non si assisteva ad alcun peggioramento del profilo lipidico e scompariva la sintomatologia tipica dell'intolleranza⁽¹¹⁵⁻¹¹⁶⁾. L'efficacia e la sicurezza dell'associazione berberina-silimarina risultava evidente allo stesso modo quando impiegata come *add-on therapy* sul paziente diabetico, comunque con alterazioni anche del quadro lipidico e quindi già in terapia con statine, mal controllato dalla terapia farmacologica in

corso e quindi non a *target*⁽¹¹⁷⁻¹¹⁸⁾, tanto per gli aspetti lipidici che per gli aspetti glucidici. In questi pazienti si osservavano risposte statisticamente significative riguardanti la colesterolemia totale e LDL, la trigliceridemia, i valori di glicemia e di emoglobina glicata. Nel caso di soggetti totalmente o parzialmente statino-intolleranti, la somministrazione di berberina e silimarina si dimostrava capace di un vera e propria terapia di sostituzione, nel paziente a cui la statina veniva tolta completamente, e di ottimi risultati, come terapia *add-on*, nel caso di soggetti trattati con bassi dosaggi di statina o con solo ezetimibe. Infine un ultimo ed importante studio fu promosso con il fine di valutare l'impatto clinico, sul quadro lipidico e su quello glucidico, determinato dall'aggiunta di silimarina ad una terapia adiuvante eseguita con sola berberina. I dati dimostrarono (*Tab.3*) che, nonostante la scarsa biodisponibilità, la berberina (1000 mg/*die*) risultava essere un efficace *add-on therapy* per il paziente mal controllato da un punto di vista metabolico. Infatti, sia l'emoglobina glicata (HbA1c), che la colesterolemia LDL si riducevano rispettivamente del 7 e 12% circa. L'aggiunta però della silimarina (210 mg/*die*) consentiva di migliorare entrambi i parametri di un ulteriore 5%⁽¹¹⁹⁾. Questo studio può essere considerato, a ragione, la prova scientifica di come il ricorso a strumenti di *herbal bioenhancing*, in questo caso l'uso della silimarina come anti-gp-P, consenta il significativo miglioramento dei risultati clinici ottenibili con strumenti fitoterapici altrimenti caratterizzati da un basso profilo di assorbimento orale.

L'uso di berberina-silimarina nel soggetto con diabete di tipo 1

Il diabete di tipo 1 è una grave malattia del metabolismo dovuta ad un importante *deficit* insulinico. È detto anche diabete giovanile o diabete insulino-dipendente. Il diabete di tipo 1 si sviluppa in genere durante gli anni dell'adolescenza, ma può comparire anche in bambini piccolissimi, in età neonatale, o in giovani adulti. Circa il 30% dei casi di diabete di tipo 1 è, in effetti, diagnosticato in età adulta. Il diabete di tipo 1 è una malattia autoimmune. Il sistema immunitario del soggetto riconosce come estranee le cellule che producono insulina (cellule pancreatiche β) e le attacca fino a distruggerle, portando a un *deficit* assoluto di questo ormone. Diversi sono i fattori che possono contribuire allo scatenarsi di questo attacco autoimmune. I più noti sono la predisposizione genetica e/o l'esposizione ad alcune

Tabella 3 - Effetto additivo in pazienti con diabete di tipo 2 trattati con Berberina o con Berberina-Silimarina (t=120 giorni)												
Parametro	Berberina (A)						Berberina + Silimarina (B)					
	Prima	dopo	variazione (%)	p	prima	dopo	variazione (%)	p	variazione (%)	p	B verso A (dopo)	
Peso (kg)	80.55±19.38	80.84±17.65	0.36	ns	76.81±20.55	77.86±16.38	1.36	ns	-3.69	ns		
BMI (Kg/m ²)	30.53±6.85	30.22±7.01	-1.07	ns	29.90±7.20	29.25±5.33	-2.18	ns	-3.21	ns		
WL (cm)	100.32±17.19	93.43±31.50	-5.88	ns	98.81±14.27	96.05±11.18	-2.80	ns	0.64	ns		
GB (mg/dL)	157.344±28.22	128.95±30.01	-19.05	0.006	158.32±34.39	131.20±31.70	-18.13	0.007	1.74	ns		
HbA1c (%)	7.81±0.88	7.25±0.39	-7.18	<0.001	8.02±0.35	7.03±0.27	-12.35	<0.001	-3.04	<0.05		
CT (mg/dL)	179.81±23.98	158.30±35.23	-11.97	0.007	177.54±31.65	157.93±32.05	-11.05	0.005	-0.24	ns		
HDL (mg/dL)	50.98±13.16	49.22±14.19	-3.46	ns	51.88 ±12.65	50.39±14.25	-2.88	ns	2.37	ns		
LDL (mg/dL)	96.75±27.69	85.02±28.52	-12.13	ns	94.39±29.81	78.37±28.19	-16.92	0.004	-7.83	ns		
TG (mg/dL)	157.32±91.29	123.99±78.00	-21.57	0.003	155.44±71.22	120.33±65.77	-22.59	0.022	-2.96	ns		
AST (U/L)	28.35±19.33	22.88±16.56	-19.30	0.032	27.34±12.86	21.66±17.34	-20.88	0.018	-5.34	ns		
ALT (U/L)	32.64±22.31	28.39±17.29	-13.03	0.046	34.00±23.53	29.51±19.83	-13.21	0.040	3.94	ns		

DMT2: Diabete Mellito di tipo 2; BMI: Body Mass Index (Indice di Massa Corporea); WL: Waistline (Girovita); GB: Glicemia basale; HbC1A: Emoglobina glicata; CT: Colesterolo Totale; HDL: High Density Lipoprotein (Lipoproteina ad alta densità); LDL: Low Density Lipoprotein (Lipoproteine a bassa densità); TG: Trigliceridi; AST: Aspartato transferasi; ALT: Alanina Transferasi; U: Unità; L: Litro; ns: non significativo. Tutti i risultati sono espressi come media ± deviazione standard.

infezioni virali. In Italia le persone con diabete di tipo 1 sono circa 300.000 e l'incidenza di questa condizione è in aumento in tutto il mondo. Tra il 2001 e il 2009 l'incidenza di diabete di tipo 1 nei soggetti al di sotto dei 20 anni è aumentata del 23%, il che significa che il numero dei giovani ai quali viene diagnosticato il diabete di tipo 1 cresce del 3% circa annuo. Pur non esistendo una cura definitiva, la terapia con insulina iniettabile è in grado di tenere sotto controllo l'evoluzione della malattia. L'insulina è un ormone peptidico dalle proprietà anaboliche, prodotto dalle cellule β delle isole di *Langerhans* all'interno del pancreas. È formata da due catene unite da ponti disolfuro. Una prima catena A costituita da 21 aminoacidi e una seconda catena B di 30. La funzione più nota dell'insulina è la regolazione dei livelli di glucosio ematico. Espleta tale funzione coordinandosi con il glucagone, suo ormone antagonista. Insieme a GH, IGF-1 e testosterone riveste un ruolo essenziale anche nella proteino-sintesi. È infine il principale ormone coinvolto nella lipidogenesi e nel fenomeno di stoccaggio di quest'ultimo all'interno del tessuto adiposo⁽¹²⁰⁾. Essendo un disordine provocato dall'assenza di insulina endogena, l'insulina iniettabile è il farmaco di prima scelta nel caso di diabete mellito di tipo 1. La terapia a base di insulina non è però priva di effetti indesiderati. Dosaggi mal calibrati, in relazione al pasto, possono generare ipoglicemie. Essendo poi fortemente anabolica, l'uso di insulina determina incrementi del peso corporeo e contribuisce ad innalzare il rischio cardio-vascolare. Come stabilito ad esempio da una relazione dello *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS), il ricorso all'insulina genera un aumento medio di circa 4 kg nei soli primi tre anni di utilizzo⁽¹²¹⁾. Nel tempo inoltre la necessità di insulina tende ad aumentare. Ma gli effetti dell'insulina non sono lineari al crescere della dose. Una dose elevata di insulina viene infatti assorbita più lentamente di una dose più modesta; può poi determinare un picco plasmatico più tardivo di quanto atteso o può durare più a lungo di quanto ipotizzato dall'utilizzatore. Da quanto detto appare ovvio il tentativo di ridurre l'uso dell'insulina al quantitativo minimo necessario. Ancora più ovvio appare la ricerca di insulino-risparmiatori da impiegarsi nel diabete di tipo 1 o nel diabete di tipo 2 ormai evoluto a necessità insulinica. La berberina, molecola ad azione ipolipemizzante, anti-iperglicemica ed insulino-sensibilizzante, è anche dotata di proprietà "riparanti" gli isolotti β pancreatici distrutti o esauriti. Questo fenomeno potrebbe essere direttamente collegato con le sue proprietà antiossidanti ed anti-lipoperossidanti⁽¹²²⁾. Sulla base di queste caratteristiche l'associazione

berberina-silimarina è stata somministrata ad un'ottantina di pazienti con diabete di tipo 1, ambo sessi, di circa 30 anni d'età, in terapia con insulina iniettabile da circa 15 anni. Nei sei mesi precedenti l'arruolamento questi soggetti avevano fatto uso, mediamente, di circa 2900 unità di insulina, con all'incirca un 60% equamente diviso tra colazione, pranzo e cena, ed un ulteriore 40% prima di andare a dormire. Nei successivi sei mesi il gruppo trattato con placebo non aveva mutato i quantitativi di insulina che risultavano assolutamente sovrapponibili a quelli impiegati nel semestre precedente. Nello stesso intervallo di tempo invece il gruppo trattato con berberina e silimarina ricorreva all'impiego di circa 2500 unità di insulina, senza peraltro modifiche nella distribuzione percentuale nel corso della giornata. Il gruppo trattato però non dimostrava solo una riduzione (15% circa) di insulina iniettata, ma anche un miglior controllo glicemico, con riduzioni statisticamente significative dell'emoglobina glicata (-5%), della glicemia a digiuno (-10% circa) e di quella post-prandiale (-15% circa), valori accompagnati, ovviamente, ad un netto cambiamento in termini di assetto lipidico, con importanti riduzioni della colesterolemia totale e LDL (-18% circa) e della trigliceridemia (-20% circa). Immutati erano invece i risultati di transaminasi, CPK e creatinina. Questo studio⁽¹²³⁾ dimostra quindi che la somministrazione di berberina e silimarina nel diabete di tipo 1, non solo determina una riduzione della dose di insulina necessaria ad ottenere un buon controllo glicemico, ma che quest'ultimo risulta addirittura migliorato in maniera significativa rispetto a quanto ottenuto nel gruppo di controllo. Non meno importante, il trattamento determina, a causa dell'effetto ipolipemizzante della berberina, anche un miglior compenso dell'assetto lipidico, contribuendo ulteriormente a ridurre il rischio cardio-vascolare dei soggetti trattati.

La questione etnica dei berberina-*non-responders*

La lunga esperienza clinica ormai maturata sull'uso della berberina e dell'associazione berberina-silimarina ha messo in luce anche le ombre (mi scuso per l'involontario gioco di parole) di tale approccio terapeutico. Se sul paziente orientale il concetto di *non-responder* alla berberina non sembrerebbe configurarsi, almeno su base documentale, a questa figura corrisponderebbe il 10-15% dei pazienti caucasici (europei, americani) trattati per

alterazione del quadro lipidico. Al contrario, soggetti diabetici non rispondenti alla terapia con berberina o, ancor di più, con l'associazione berberina-silimarina, non sembrerebbero configurarsi nemmeno tra i pazienti caucasici, almeno per percentuali significative. Deve però essere segnalato che mentre nei soggetti orientali la berberina è in grado di ridurre l'emoglobina glicata anche di 2 punti percentuali, nel paziente caucasico tale riduzione non supera i valori compresi tra 0.8 e 1.2. Quali fenomeni potrebbero essere responsabili di tali differenze? Per quanto concerne la maggiore efficacia anti-diabetica osservata nel paziente orientale, questa potrebbe essere ricondotta ad una diversa sensibilità etnico-biochimica di PPAR- γ .

La berberina è infatti capace di un'azione agonista anche su tale proteina. E, come è noto, i farmaci anti-diabetici agenti su PPAR- γ determinano risposte migliori sul paziente orientale che non su quello caucasico. Questo spiegherebbe anche perché gli Autori talvolta riportino un'azione della berberina anche a livello di adipogenesi, ma solo su soggetti orientali! L'azione anti-adipogenetica è infatti anch'essa sotto il diretto controllo di PPAR- γ . Per quanto concerne invece la differente responsività ipolipemizzante, la spiegazione maggiormente plausibile riguarda l'assorbimento intestinale del principio attivo. Anche l'espressione fenotipica di gp-P enterocitaria segue infatti le stesse regole di una qualunque altra espressione fenotipica di carattere. È quindi assumibile l'esistenza di soggetti, principalmente caucasici, con un'espressione fenotipica di gp-P enterocitaria assolutamente più elevata e quindi con maggiore potere estrusore. In effetti parte dei soggetti *non-responder* all'associazione berberina-silimarina risponde bene semplicemente aumentando la quota di silimarina, composto assolutamente inattivo da questo punto di vista, di altri 400 mg/die. Questo risultato giustifica l'ipotesi, valida per alcuni soggetti, di un maggior potere di estrusione gp-P-mediato. L'aggiunta di silimarina non recupera però l'effetto ipolipemizzante della berberina in tutti i soggetti definibili *non-responders*. Esiste tuttavia un modo per rendere tutti, o quasi, i soggetti dei buoni *responders*. Per comprendere il come, deve essere elucidato un fenomeno non discusso prima. La berberina è in parte sequestrata dai sali biliari senza che questi ne migliorino l'assorbimento⁽¹²⁴⁾. Limitare quindi l'azione dei sali biliari lascia fuori dal sequestro quote di berberina. E infatti soggetti che normalmente non rispondono alla sola berberina, riducono in maniera importante la colesterolemia, semplicemente associando 2 g di resina a scambio ionico a 500 mg di berberina. Da notare che: innanzitutto questi pazienti prima non

rispondevano a 1000 mg di berberina, mentre ora rispondono alla metà del dosaggio; inoltre 2 g/die di resina a scambio ionico non sono normalmente sufficienti a ridurre la colesterolemia soprattutto in soggetti ipo-responsivi. A riprova della validità dell'associazione tra resina a scambio ionico e berberina, entrambi a basso dosaggio, vi è il recente sviluppo, in Cina, di un nuovo farmaco già contenente tale associazione⁽¹²⁵⁾.

Altri possibili strumenti berberina-enhancing

Questi risultati lasciano trasparire nuove possibilità terapeutiche. Ad esempio il chitosano cationico, anche detto “coleosoma” (che non è un chitosano convenzionale), è un potente bile-precipitante di grado alimentare. Potrebbe diventare uno strumento utile per rendere più responsivi, e quindi meglio controllati, i pazienti iperlipemici statino-intolleranti e berberina *non-responders*. Se invece statino-tolleranti, ma non a *target* nonostante il ricorso alla terapia con statine, la terapia additiva a base di sola berberina (in soggetti *responders*), o quella a base di berberina e agenti bile-sequestranti (in soggetti *non-responders* alla sola berberina), potrebbero diventare due praticabili, efficaci e sicure possibilità arricchenti l'armamentario clinico disponibile⁽¹²⁶⁻¹²⁸⁾. Altra possibilità di *bioenhancing* sulla berberina è il ricorso al caprato di sodio. Chimicamente è un surfactante anionico corrispondente al sale sodico dell'acido caprico, un acido grasso anche noto come acido decanoico o E570. Il caprato di sodio, co-somministrato a 50 mg/kg insieme a 100 mg/kg di berberina, ne incrementa l'assorbimento del 28% rispetto ai valori di controllo con un incremento dell'AUC totale di quasi quattro volte. A tale incremento di biodisponibilità orale corrisponde ovviamente un proporzionale incremento dell'attività biologica, particolarmente evidente sul profilo glucidico. Il caprato di sodio, da un punto di vista funzionale, può definirsi un incrementatore di permeazione farmacologica. Biochimicamente determina infatti un “rilassamento” delle *tight junction* intercellulari attraverso le quali la berberina può permeare con maggiore efficienza. Qualche Autore ha fatto però anche notare come berberina e caprato di sodio possano interagire originando un complesso a lipofilità aumentata, capace quindi di permeare meglio nel doppio strato della membrana dell'enterocita, evitando anche la ri-estruzione gp-P-mediata. Geneticamente parlando, i surfactanti anionici non sono però considerati mole-

cole totalmente sicure. Il fatto che “danneggino”, seppur reversibilmente, le *tight junctions*, non viene visto proprio come un fenomeno esclusivamente benevolo per l'epitelio e l'ospite. È anche vero che, nel particolare, il caprato di sodio è ritenuto essere una molecola con un accettabile profilo di sicurezza, almeno in riferimento ai dosaggi convenzionalmente impiegati dall'industria farmaceutica e alimentare dove il caprato di sodio viene utilizzato come eccipiente. La sua efficienza come incrementatore di permeabilità tissutale, anche nel caso specifico della berberina, si rivela però a dosaggi estremamente più alti. Per ovvie ragioni quindi, ad oggi, nessuno ne ha fatto ancora ricorso⁽¹²⁹⁻¹³³⁾.

Conclusioni

Le evidenze sperimentali e cliniche ad oggi disponibili in letteratura mostrano interessanti prospettive di impiego clinico della berberina nel trattamento dell'ipercolesterolemia e del diabete, nonostante la sua biodisponibilità orale sia piuttosto bassa. Essendo quest'ultimo parametro legato al ruolo farmaco-estrusore della gp-P presente sul lato apicale degli enterociti della mucosa intestinale, il concomitante impiego di un inibitore della gp-P, la silimarina, consente il miglioramento cinetico della berberina e il conseguente miglioramento della sua resa farmaco-clinica. I risultati dimostrano che l'utilizzo dell'associazione nel paziente ipercolesterolemico non altrimenti trattato, determina una riduzione della dislipidemia per valori compresi tra il 25 e il 30%. Nel paziente non a *target* per i parametri lipidici nonostante la terapia con statine, l'aggiunta della medesima associazione, senza modifiche alla terapia preesistente, consente un'ulteriore riduzione per valori compresi tra il 12 e 15%. Notevoli vantaggi si hanno poi nell'utilizzo dell'associazione berberina-silimarina per migliorare la tollerabilità spesso non ottimale, delle statine. L'aggiunta di questo trattamento consente di ridurre anche del 50% l'impiego della statina senza che i vantaggi ipolipemizzanti vengano persi. I *non-responders*, situazione evidenziabile solo nei soggetti ipercolesterolemici *naive*, sono responsivi alla terapia aggiungendo ulteriori 400 mg di silimarina o 2 g di resina a scambio ionico. In questo secondo caso l'effetto ipocolesterolemizzante si osserva anche dimezzando il dosaggio di berberina a 500 mg/*die* (con silimarina a 105 mg/*die*). Per questioni etiche, soggetti diabetici non in trattamento con altro/i farmaco/i non sono mai

stati sottoposti a terapia con l'associazione berberina-silimarina. Quest'ultima è stata quindi testata solo come terapia additiva per ritardare il ricorso alla somministrazione insulinica. In questo caso l'aggiunta del trattamento consente di ridurre, nel paziente non a *target*, l'emoglobina glicata dello 0.8-1.2% e il parametro di insulino-resistenza (HOMAIR) di circa il 30%. Infine, l'effetto insulino-risparmiatore dell'associazione berberina-silimarina è deducibile dal trattamento di soggetti con diabete mellito di tipo 1 nei quali l'aggiunta del trattamento migliora il compenso glicemico, nonostante la dose di insulina venga ridotta globalmente del 15% circa.

Curiosità

Come detto in precedenza, tra gli erballi, oltre alla silimarina, altri composti estrattivi dimostrano, almeno *in vitro*, una capacità di inibizione della gp-P. Tra questi ad esempio troviamo la naringenina, le catechine gallate del tè non fermentato, la tetrandrina estratta da *Stephania tetrandra* e persino i ginsenosidi del ginseng. La silimarina risulta però ad oggi la scelta ottimale. E questo per due ragioni. La prima è legata ai suoi aspetti di scarsissima biodisponibilità orale⁽¹³⁴⁾. Alcuni Autori hanno recentemente ottenuto un miglioramento, maggiore di 100 volte, della biodisponibilità orale della silimarina, dimostrando indirettamente che il suo assorbimento è inferiore all'1%⁽¹³⁵⁾. Digitando su *PubMed* le parole "Legalon®" (farmaco di riferimento a base di silimarina) e *bioavailability*, il sistema fornisce 126 lavori (risultato aggiornato al gennaio 2016), che descrivono la scarsissima biodisponibilità del prodotto e la sua modestissima, se non nulla, efficienza farmacocinetica. Si presti attenzione: alcuni lavori evidenziano come con alcuni accorgimenti galenici sia possibile incrementare il grado di "dissoluzione" del prodotto, cioè la capacità della silimarina di uscire dalla compressa e dissolvere nel *medium* acquoso. Dissoluzione però non significa "assorbimento".

Spesso il dato viene invece strumentalizzato, a fini commerciali, lasciando intendere che una migliore dissoluzione sia in qualche modo predittiva di migliore assorbimento, con successiva maggiore presenza plasmatica. Altre volte, peggio, si lascia intendere che "dissoluzione" e "assorbimento" siano farmacocineticamente equivalenti. Ovviamente, in entrambi i casi, quanto dichiarato o lasciato intendere è falso. Ad ogni modo, il reale e scarso assorbimento orale della silimarina si evidenzia anche dall'elevatissimo

grado di sicurezza tossicologica. Somministrazioni croniche superiori ai 1500 mg/die sono descritte non determinare particolare effetto su alcun parametro biochimico. La sua non biodisponibilità fa però della silimarina una sostanza ideale per fronteggiare i mancati assorbimenti di altre sostanze, quando questi siano essenzialmente riconducibili a problematiche intestinali. Se la silimarina fosse in qualche modo assorbita potrebbe, in linea teorica, modificare gli aspetti di permeazione della berberina anche nei confronti di altri sistemi, come ad esempio nel caso della barriera emato-encefalica, anch'essa primariamente costituita da sistemi di estrusione ABC. Nessuno potrebbe infatti immaginare le conseguenze tossicologiche determinate da un ingresso nel sistema nervoso centrale della berberina. Con questo non si vuol ipotizzare un suo effetto tossico a questo livello. Semplicemente si sottolinea il suo non conoscimento e quindi la sua non prevedibilità. Questa affermazione non deve suonare strana. Gli studi compiuti con la berberina in ambito neurologico, e questo vale identicamente per l'ambito oncologico, hanno chiaramente dimostrato comportamenti molecolari interessanti, ma evidenti per concentrazioni micromolari. Ma, come più volte descritto, la capacità di concentrazione plasmatica della berberina è di tipo nanomolare, migliaia di volte meno il valore richiesto. E nessun approccio di *bioenhancing* ha mai prodotto, nemmeno lontanamente, concentrazioni simili. La seconda ragione è che la silimarina è, come in altre parti del testo spiegato, una miscela

di flavanolignani (principalmente silibina, silidianina e silicristina) rappresentata al 50% dalla sola silibina. Nella silimarina quindi, una molecola su due è silibina. Se osserviamo la struttura chimica della silibina noteremo l'estremo grado di sovrapposizione molecolare che questa possiede con la 5'-metossi-idnocarpina (Fig.2).

La 5'-metossi-idnocarpina è un flavanolignano presente in *Berberis fremontii*. Come lasciato intendere dal nome botanico, nella stessa pianta è anche presente la berberina-

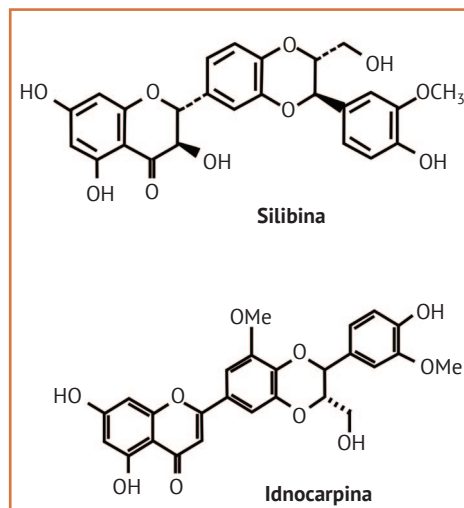


Figura 2 - «Quasi-sovrapposizione» molecolare tra silibina e idnocarpina

na. Come è stato lungamente descritto in questo capitolo, la berberina risulta essere, oltre che un ipolipemizzante anti-iperglicemico, anche un buon microbica. Batteri però, come ad esempio *Staphylococcus aureus*, di cui esistono ceppi particolarmente resistenti alle terapie antibiotiche a causa di una forte espressione di proteine MDR (in particolare gp-P), estrudono però la berberina rendendola inefficace. Su questi ceppi l'uso di un estratto di *Berberis fremontii*, contenente sia berberina che 5'-metossi-idnocarpina, dimostra attività anti-batterica. Lo stesso estratto, deprivato di 5'-metossi-idnocarpina, molecola irrilevante da un punto di vista microbica, non dimostra invece alcuna proprietà antibiotica. Il fatto è che questo flavanolignano inibisce specificamente l'estruzione della berberina dal corpo cellulare del batterio. La sua presenza nell'estratto contrasta la berberina-resistenza del batterio gp-P-mediata e restituisce all'estratto, e quindi alla berberina, il suo ruolo antibiotico atteso, *by-passando* la problematica della resistenza⁽¹³⁶⁾. In base a queste due considerazioni, scarsa biodisponibilità orale e quasi sovrapposibilità chimica con un noto e potente inibitore dei sistemi MDR estrudenti specificamente la berberina (la 5'-metossi-idnocarpina), la silimarina può essere considerata ad oggi l'approccio più ragionevole, o uno dei più ragionevoli, per incrementare l'assorbimento della berberina e quindi la sua efficacia farmacologica.

Letteratura

- 1 Piscopo S. The Mediterranean diet as a nutrition education, health promotion and disease prevention tool. *Public Health Nutr.* 2009; 12(9A): 1648-1655.
- 2 Rizzo M, Kotur-Stevuljevic J, Berneis K, Spinis G, Rini GB. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look. *Transl Res.* 2009; 153(5): 217-223.
- 3 López Menchaca R, Suárez Fernández C. New challenges in the treatment of dyslipidemia and cardiovascular risk. *Rev Clin Esp.* 2009; 209(5): 241-244.
- 4 Chiarello M. La terapia con statine nella riduzione del rischio cardiovascolare *Ital Heart J.* 2001; 3(2): 221-223
- 5 Sathasivam S. Statin induced myopathy. *BMJ.* 2008; 337: 2286-9-
- 6 McKenney J. Combination therapy for elevated low-density lipoprotein cholesterol: the key to coronary artery disease risk reduction. *Am J Cardiol.* 2002; 90:8k-20k.
- 7 Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106: 171-176.
- 8 Zhou O, Muers R, Li J, Chen Y. Role of AMP activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001;8(8): 167-174.
- 9 Lupi R, Del Guerra S, Marselli L, et al. Rosiglitazone prevents the impairment of human islet function induced by fatty acids: evidence for a role of PPAR 2 in the modulation of insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004; 286: E560-E567
- 10 May LD, Kram MT, Rubin DE. Mixed hepato-cellular-cholestatic liver injury after pioglitazone therapy. *Ann Intern Med.* 2003; 136: 449-452.
- 11 Hirst JA, Farmer AJ, Dyar A, Lung TW, Stevens RJ. Estimating the effect of sulfonylurea on HbA1c in diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia.* 2013;56(5):973-84.
- 12 Giorda CB1, Nada E, Tartaglino B. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of DPP-4 inhibitors and GLP-1 receptor agonists in patients with type 2 *diabetes mellitus* and renal or hepatic impairment. A systematic review of the literature. *Endocrine.* 2014 Feb 8.
- 13 Majumdar SK1, Inzucchi SE. Investigational anti-hyperglycemic agents: the future of type 2 diabetes therapy? *Endocrine.* 2013;44(1):47-58.

- 14 Birdsall TC, Kelly CS. Berberine: therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. *Altern Med Rev*. 1997; 2: 94-103.
- 15 Chang IIM, But PPII. *Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica* vol. 2. World Scientific; 1986. Singapore.
- 16 Rabbani GH, Butler T *et al*. Randomized controlled trial of berberine sulfate therapy for diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis*. 1987;155(5):979-84.
- 17 Chen C, Tao C, Liu Z, Lu M, Pan Q, Zheng L. A randomized clinical trial of berberine hydrochloride in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Phytother Res*. 2015;29(11):1822-7.
- 18 Swabb EA, Tai YH, Jordan L. Reversal of cholera toxin-induced secretion in rat ileum by luminal berberine. *Am J Physiol*. 1981;241(3):G248-52.
- 19 Yuan J, Shen XZ, Zhu XS. Effect of berberine on transit time of human small intestine. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 1994;14(12):718-20.
- 20 Eaker EY, Sninsky CA. Effect of berberine on myoelectric activity and transit of the small intestine in rats. *Gastroenterology*. 1989;96(6):1506-13.
- 21 Li N, Gu L, Qu L, Gong J, Li Q, Zhu W. Berberine attenuates pro-inflammatory cytokine-induced tight junction disruption in an *in vitro* model of intestinal epithelial cells. *Eur J Pharm Sci*. 2010;40(1):1-8.
- 22 Karaosmanoglu K, Sayar NA, Kurnaz IA, Akbulut BS. Assessment of berberine as a multi-target antimicrobial: a multi-omics study for drug discovery and repositioning. *OMICS*. 2014;18(1):42-53.
- 23 Freile ML, Giannini F, Pucci G, Sturniolo A, Rodero L, Pucci O. Antimicrobial activity of aqueous extracts and of berberine isolated from *Berberis heterophylla*. *Fitoterapia*. 2003;74(7-8):702-5.
- 24 Bandyopadhyay S, Patra PH, Mahanti A, Mondal DK, Dandapat P, Bandyopadhyay S. Potential antibacterial activity of berberine against multi drug resistant enterovirulent *Escherichia coli* isolated from yaks (*Poephagus grunniens*) with haemorrhagic diarrhoea. *Asian Pac J Trop Med*. 2013;6(4):315-9.
- 25 Xie Q, Johnson BR, Wenckus CS, Fayad MI, Wu CD. Efficacy of berberine, an antimicrobial plant alkaloid, as an endodontic irrigant against a mixed-culture biofilm in an *in vitro* tooth model. *J Endodont*. 2012;38(8):1114-7.
- 26 Cernakova M, Kostalova D. Antimicrobial activity of berberine: a constituent of *Mahonia aquifolium*. *Folia microbiol* 2002;47(4): 375-8.
- 27 Lianci P, Shuai K, Zhongqiong Y, Renyong J. Antibacterial activity and mechanism of berberine against *Streptococcus agalactiae*. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(5):5217-5223.
- 28 Kim SH, Shin DS, Oh MN, Chung SC, Lee JS, Oh KB. Inhibition of the bacterial surface protein anchoring transpeptidase sortase by isoquinoline alkaloids. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004;68(2):421-4.
- 29 Paterson GK, Mitchell TJ. The biology of Gram-positive sortase enzymes. *Trends Microbiol*. 2004;12(2):89-95.
- 30 Chu M, Ding R, Chu ZY, Zhang MB, Liu XY, Xie SH. Role of berberine in anti-bacterial as a high-affinity LPS antagonist binding to TLR4/MD-2 receptor. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:89.
- 31 Battu SK, Repka MA, Maddineni S, Chittiboyina AG, Avery MA, Majumdar S. Physicochemical Characterization of Berberine Chloride: A Perspective in the Development of a Solution Dosage Form for Oral Delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2010;11(3):1466-75.
- 32 Ni Y, Liu A, Gao Y, Wang W, Song Y. Therapeutic effect of berberine on 60 patients with non-insulin dependent *diabetes mellitus* and experimental research. *Chinese J Integ Med*. 1988; 1(2): 91-95.
- 33 Kong W, Wei J, Abidi P, Lin M, Inaba S. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through unique mechanism distinct from statins. *Nat Med*. 2004; 10(12):1344-1351.
- 34 Kong W, Wei J, Zuo Z *et al*. Combination of simvastatin with berberine improves the lipid-lowering efficacy. *Metabolism*. 2008; 57(8): 1029-1037.
- 35 Li H, Dong B, Park SW, Lee HS, Chen W, Liu J. Hepatocyte nuclear factor 1 α plays a critical role in PCSK9 gene transcription and regulation by the natural hypocholesterolemic compound berberine. *J Biol Chem*. 2009;284(42):28885-95.
- 36 Cameron J, Ranheim T, Kulseth MA, Leren TP, Berge KE. Berberine decreases PCSK9 expression in HepG2 cells. *Atherosclerosis* 2008;201(2):266-73.
- 37 Wang Y, Yi X, Ghanam K, Zhang S, *et al*. Berberine decreases cholesterol levels in rats through multiple mechanisms, including inhibition of cholesterol absorption. *Metabolism*. 2014;63(9):1167-77.
- 38 Wang Y, Jia X, Ghanam K, Beaupaire C, Zidichouski J, Miller L. Berberine and plant stanols synergistically inhibit cholesterol absorption in hamsters. *Atherosclerosis*. 2010;209(1):111-7.
- 39 Li X, Zhao Z, Huang M, Feng R, He C, Ma C. Effect of Berberine on promoting the excretion of cholesterol in high-fat diet-induced hyperlipidemic hamsters. *J Transl Med*. 2015;13(1):278.
- 40 Zhang H1, Wei J, Xue R, Wu JD, Zhao W, Wang ZZ, Wang SK, Zhou ZX, Song DQ, Wang YM, Pan HN, Kong WJ, Jiang JD. Berberine lowers blood glucose in type 2 *diabetes mellitus* patients through increasing insulin receptor expression. *Metabolism*. 2010;59(2):285-92.
- 41 Affuso F, Mercurio V, Fazio V, Fazio S. Cardiovascular and metabolic effects of Berberine. *World J Cardiol*. 2010;2(4):71-7.
- 42 Yin J, Xing H, Ye J. Efficacy of berberine in patients with type 2 *diabetes mellitus*. *Metabolism*. 2008;57(8):712-717.
- 43 Shen N, Huan Y, Shen ZF. Berberine inhibits mouse insulin gene promoter through activation of AMP activated protein kinase and may exert beneficial effect on pancreatic β -cell. *Eur J Pharmacol*. 2012;694(1-3):120-6.
- 44 Zhang J, Guo Z, Xue Z, Sun Z, Zhang M, Wang L. A phyto-functional core of gut microbiota in healthy young Chinese cohorts across lifestyles, geography and ethnicities. *ISME J*. 2015;9(9):1979-90.
- 45 Zhang X, Zhao Y, Xu J, Xue Z, Zhang M, Pang X. Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet-

- induced obesity in rats. *Sci Rep*. 2015;5:14405.
- 46 Xie W, Gu D, Li J, Cui K, Zhang Y. Effects and action mechanisms of berberine and *Rhizoma coptidis* on gut microbes and obesity in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *PLoS one*. 2011;6(9):e24520.
 - 47 Zhang X, Zhao Y, Zhang M, Pang X, Xu J, Kang C. Structural changes of gut microbiota during berberine-mediated prevention of obesity and insulin resistance in high-fat diet-fed rats. *PLoS One*. 2012;7(8):e42529.
 - 48 Dong H, Wang N, Zhao L, Lu F. Berberine in the treatment of type 2 *diabetes mellitus*: a systemic review and meta-analysis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:591654.
 - 49 Xiao-chen Wei, Li-qin Zhu, Chun-ge Wang. Efficacy and Safety of Berberine in Patients with Type 2 *Diabetes Mellitus*: A Meta-Analysis. *Chinese Herbal Med*. 2015,7(4):344-353.
 - 50 Lan J, Zhao Y, Dong F, Yan Z, Zheng W, Fan J, Sun G. 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.
 - 51 Dong H, Zhao Y, Zhao L, Lu F. The effects of berberine on blood lipids: a systemic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Planta Med*. 2013;79(6):437-46.
 - 52 Xia Le-Min, Luo Mei-Hong. Study progress of berberine for treating cardiovascular disease. *Chronic Diseases and Translational Medicine* (2016). In press.
 - 53 Guang Z, Xian HD, Sheng YX. The observation of experiment and clinic in therapy for heart failure with Berberine. *Chin J Intern Med*. 1991;30:581–582.
 - 54 Zhang W, Chen SG, Ju HS. Mechanisms of protective effects of berberine on ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart Methods *Find Exp Clin Pharmacol*. 1992;14:677–684.
 - 55 Li BX, Yang BF, Zhou J. Inhibitory effects of berberine on IK1, IK and HERG channels of cardiac myocytes. *Acta Pharmacol Sin*. 2001;22:125–131.
 - 56 Wang YX, Zheng YM. Ionic mechanism responsible for prolongation of cardiac action-potential duration by berberine. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997;30:214–222.
 - 57 Wang YX, Yao XJ, Tan YH. Effects of berberine on delayed after depolarisations in ventricular muscles *in vitro* and *in vivo*. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1994;23:716–722.
 - 58 Hong Y, Hui SS, Chan BT, Hou J. Effect of berberine on catecholamine levels in rats with experimental cardiac hypertrophy. *Life Sci*. 2003;72:2499–2507.
 - 59 Hong Y, Hui SC, Chan TY, Hou JY. Effect of berberine on regression of pressure overload induced cardiac hypertrophy in rats. *Am J Chin Med*. 2002;30:589–599.
 - 60 Huang WM, Yan H, Lin JM, Yu C, Zhang H. Beneficial effects of berberine on hemodynamics during acute ischemic left ventricular failure in dogs. *Chin Med J*. 1992;105:1014–1019.
 - 61 Ko WH, Yao XQ, Lau CW. Vasorelaxant and antiproliferative effects of berberine. *Eur J Pharmacol*. 2000;399:187–196.
 - 62 Marin-Neto JA, Maciel BC, Secches AL, Gallo L. Cardiovascular effects of berberine in patients with severe congestive heart failure. *Clin Cardiol*. 1988;11:253–260.
 - 63 Zeng XH, LI YY. Clinical observations of the effect of berberine for congestive heart failure. *US Chin J Angiocardiomyopathy*. 2001;6:308–311.
 - 64 Huang GL. Therapeutic evaluation in the treatment of Amlodipine combined with berberine on light, moderate hypertension complicated with gout. *China Pharmaceuticals*. 2013;22:32–33.
 - 65 Sun SP, Huang ZS, Ruan WJ. Effect observation of combination therapy in the treatment of elderly hypertensive patients with gout. *Forefront of Medicine*. 2013;394–395.
 - 66 Zhong SL, Zhou YS, Chen HM, Yang GS. Clinical observation on 96 cases of elderly patients with hypertension of berberine treatment. *China Journal of Gerontology*. 1997;17:349–350.
 - 67 Han ZX, Huang JX, Zhang ZS, Ji S J, Xu J. Elderly hypertensive disease observation of Betaloc treated with Berberine. *Medical Research Communications*. 1999;28:43.
 - 68 L.S. Zhang. Clinical usage of berberine. *Chin Rem Clin*. 2004;41:78.
 - 69 Huang HL, Chu ZL, Wei SJ, Jiang H, Jiao BH. Effects of berberine on arachidonic acid metabolism in rabbit platelets and endothelial cells. *Thromb Res*. 2002;106:223–227.
 - 70 Huang CG, Chu ZL, Yang ZM. The progress in pharmacological researches on Berberine. *Comun Inform Pharm*. 1991;9:10–12.
 - 71 Ming HW, Zhong XS, Qiou XY. The mechanical study of anti-arrhythmias—the observation to changes of delaying-activating fluxes of potassium ions with voltage clamp. *Chin J Cardiol*. 1992;5:310–311.
 - 72 Chen SX. The blocking effect on channels of calcium ions by berberine in the rat Aorta. *J Nanjing Univ TCM*. 1996;12:20–22.
 - 73 Wang LH. Berberine elicits anti-arrhythmic effects via IK1/Kir2.1 in the rat type 2 diabetic myocardial infarction model. *Phytother Res*. 2011;25:33–37.
 - 74 Lau CW. Cardiovascular actions of berberine. *Cardiovasc Drug Rev*. 2001;19:234–244.
 - 75 Liu B, Wang G, Yang J, Pan X, Yang Z, Zang L. Berberine inhibits human hepatoma cell invasion without cytotoxicity in healthy hepatocytes. *PLoS One*. 2011;6(6):e21416.
 - 76 Wang L, Liu L, Shi Y, Cao H, Chaturvedi R, Calcutt MW. Berberine induces caspase-independent cell death in colon tumor cells through activation of apoptosis-inducing factor. *PLoS One*. 2012;7(5):e36418.
 - 77 He W, Wang B, Zhuang Y, Shao D, Sun K, Chen J. Berberine Inhibits Growth and Induces G1 Arrest and Apoptosis in Human Cholangiocarcinoma QBC939 Cells. *J Pharmacol Sci*. 2012;119(4):341-8.
 - 78 Ho Y, Yang J, Li T, Lin J, Lin J, Lai K. Berberine suppresses *in vitro* migration and invasion of human SCC-4 tongue squamous cancer cells through the

- inhibitions of FAK, IKK, NF- κ B, u-PA and MMP-2 and -9. *Cancer Lett.* 2009;279(2):155-62.
- 79 Li H, Li XL, Zhang M, Xu H, Wang CC, Wang S, Duan RS. Berberine ameliorates experimental autoimmune neuritis by suppressing both cellular and humoral immunity. *Scand J Immunol.* 2014;79(1):12-9.
- 80 Jiang Y, Wu A, Zhu C, Pi R, Chen S, Liu Y, Ma L, Zhu D, Chen X. The protective effect of berberine against neuronal damage by inhibiting matrix metalloproteinase-9 and laminin degradation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurol Res.* 2013;35(4):360-8.
- 81 Gao F, Gao Y, Liu YF, Wang L, Li YJ. Berberine exerts an anticonvulsant effect and ameliorates memory impairment and oxidative stress in a pilocarpine-induced epilepsy model in the rat. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2014;10:2139-45.
- 82 Jiang W, Wei W, Gaertig MA, Li S, Li XJ. Therapeutic Effect of Berberine on Huntington's Disease Transgenic Mouse Model. *PLoS One.* 2015;10(7):e0134142.
- 83 Hu Y, Ehli EA, Kittelsrud J, Ronan P. Lipid-lowering effect of berberine in human subjects and rats. *Phytomedicine.* 2012;19(10):861-7.
- 84 Cicero AF, Ferroni A, Ertek S. Tolerability and safety of commonly used dietary supplements and nutraceuticals with lipid-lowering effects. *Expert Opin Drug Saf.* 2012;11(5):753-66.
- 85 Liu Y, Zhang L, Song H, Ji G. Update on berberine in nonalcoholic fatty liver disease. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:308134.
- 86 Yang Y, Ni W, Cai M, Tang L, Wei W. The renoprotective effects of berberine via the EP4-G α s-cAMP signaling pathway in different stages of diabetes in rats. *J Recept Signal Transduct Res.* 2014;22:1-11.
- 87 Hermann R, von Richter O. Clinical Evidence of Herbal Drugs As Perpetrators of Pharmacokinetic Drug Interactions. *Planta Med.* 2012;78(13):1458-1477.
- 88 Li BX, Yang BF, Zhou J, Xu CQ, Li YR. Inhibitory effects of berberine on IK1, IK, and HERG channels of cardiac myocytes. *Acta Pharmacol Sin.* 2001;22(2):125-31.
- 89 Zhang K, Zhi D, Huang T, Gong Y, Yan M, Liu C, Wei T, Dong Z, Li B, Yang B. Berberine induces hERG channel deficiency through trafficking inhibition. *Cell Physiol Biochem.* 2014;34(3):691-702.
- 90 Yan M, Zhang K, Shi Y, Feng L, Lv L, Li B. Mechanism and pharmacological rescue of berberine-induced hERG channel deficiency. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:5737-47.
- 91 Holy EW, Akhmedov A, Lüscher TF, Tanner FC. Berberine, a natural lipid-lowering drug, exerts prothrombotic effects on vascular cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46(2):234-40.
- 92 Spinozzi S, Colliva C, Camborata C, Roberti M, Ianni C, Neri F. Berberine and its metabolites: relationship between physicochemical properties and plasma levels after administration to human subjects. *J Nat Prod.* 2014;77(4):766-72.
- 93 Chen W, Miao YQ, Fan DJ, Yang SS, Lin X, Meng LK, Tang X. Bioavailability study of berberine and the enhancing effects of TPGS on intestinal absorption in rats. *AAPS PharmSciTech.* 2011;12(2):705-11.
- 94 Liu YT, Hao HP, Xie HG, Lai L, Wang Q, Liu CX. Extensive intestinal first-pass elimination and predominant hepatic distribution of berberine explain its low plasma levels in rats. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(10):1779-84.
- 95 Liu Y, Hao H, Xie H, Lv H, Liu C, Wang G. Oxidative demethylation and subsequent glucuronidation are the major metabolic pathways of berberine in rats. *J Pharm Sci-US.* 2009;98(11):4391-401.
- 96 Gong Z, Chen Y, Zhang R, Wang Y, Guo Y, Yang Q. Pharmacokinetic comparison of berberine in rat plasma after oral administration of berberine hydrochloride in normal and post inflammation irritable bowel syndrome rats. *Int J Mol Sci.* 2014;15(1):456-67.
- 97 Feng R, Shou J, Zhao Z, He C, Ma C, Huang M. Transforming berberine into its intestine-absorbable form by the gut microbiota. *Sci Rep.* 2015;5:12155.
- 98 Tan X, Ma J, Feng R, Ma C, Chen W, Sun Y. Tissue Distribution of Berberine and Its Metabolites after Oral Administration in Rats. *PLoS One.* 2013;8(10):e77969.
- 99 Guo Y, Li F, Ma X, Cheng X, Zhou H, Klaassen CD. CYP2D plays a major role in berberine metabolism in liver of mice and humans. *Xenobiotica.* 2011;41(11):996-1005.
- 100 Li Y, Ren G, Wang Y, Kong W, Yang P, Wang Y. Bioactivities of berberine metabolites after transformation through CYP450 isoenzymes. *J Transl Med.* 2011;9(1):62.
- 101 Zuo F, Nakamura N, Akao T, Hattori M. Pharmacokinetics of berberine and its main metabolites in conventional and pseudo germ-free rats determined by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(12):2064-72.
- 102 Tan B, Ma Y, Shi R, Wang T. Simultaneous quantification of three alkaloids of *Coptidis Rhizoma* in rat urine by high-performance liquid chromatography: application to pharmacokinetic study. *Biopharm Drug Dispos.* 2007;28(9):511-6.
- 103 Tsai PL, Tsai TH. Hepatobiliary excretion of berberine. *Drug Metab Dispos.* 2004;32(4):405-12.
- 104 Hua W, Ding L, Chen Y, Gong B, He J, Xu G. Determination of berberine in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *J Pharmaceut Biomed.* 2007;44(4):931-7.
- 105 Kong W, Zhang H, Song D, Xue R, Zhao W, Wei J. Berberine reduces insulin resistance through protein kinase C-dependent up-regulation of insulin receptor expression. *Metabolism.* 2009;58(1):109-19.
- 106 Pan GY, Wang GJ, Liu XD, Fawcett JP, Xie YY. The involvement of P-glycoprotein in berberine absorption. *Pharmacol Toxicol.* 2002; 91(4): 193-197.
- 107 Zhou S, Lim LY, Chowbay B. Herbal modulation of P-glycoprotein. *Drug Metab Rev.* 2004; 36(1): 57-104.
- 108 Shan YQ1, Ren G, Wang YX, Pang J, Zhao ZY, Yao J, et al. Berberine analogue IMB-Y53 improves glucose-lowering efficacy by averting cellular efflux especially P-glycoprotein efflux. *Metabolism.* 2013 Mar;62(3):446-56.

- 109 Shan YQ1, Zhu YP, Pang J, et al. Tetrandrine potentiates the hypoglycemic efficacy of berberine by inhibiting P-glycoprotein function. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(10):1562-9.
- 110 Chae HW, Kim IW, Jin HE, Kim DD, Chung SJ, Shim CK. Effect of ion-pair formation with bile salts on the *in vitro* cellular transport of berberine. *Arch Pharm Res.* 2008 Jan;31(1):103-10.
- 111 Derosa G, Bonaventura A, Bianchi L, Romano D, D'Angelo A, Fogari E, Maffioli P. Effects of *Berberis aristata/Silybum marianum* association on metabolic parameters and adipocytokines in overweight dyslipidemic patients. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2013;27(3):717-28.
- 112 Derosa G, Bonaventura A, Bianchi L, Romano D, D'Angelo A, Fogari E, Maffioli P. *Berberis aristata/Silybum marianum* fixed combination on lipid profile and insulin secretion in dyslipidemic patients. *Expert Opin Biol Ther.* 2013;13(11):1495-506.
- 113 Derosa G, Romano D, D'Angelo A, Maffioli P. *Berberis aristata* combined with *Silybum marianum* on lipid profile in patients not tolerating statins at high doses. *Atherosclerosis.* 2015;239(1):87-92.
- 114 Derosa G, Romano D, D'Angelo A, Maffioli P. *Berberis aristata/Silybum marianum* fixed combination (Berberol®) effects on lipid profile in dyslipidemic patients intolerant to statins at high dosages: a randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Phytomedicine.* 2015;22(2):231-7.
- 115 Derosa G, Romano D, D'Angelo A, Maffioli P. *Berberis aristata* combined with *Silybum marianum* on lipid profile in patients not tolerating statins at high doses. *Atherosclerosis.* 2015;239(1):87-92.
- 116 Derosa G, Romano D, D'Angelo A, Maffioli P. *Berberis aristata/Silybum marianum* fixed combination (Berberol®) effects on lipid profile in dyslipidemic patients intolerant to statins at high dosages: a randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Phytomedicine.* 2015;22(2):231-7.
- 117 Di Pierro F, Villanova N, Agostini F, Marzocchi R, Soverini V, Marchesini G. Pilot study on the additive effects of berberine and oral type 2 diabetes agents for patients with suboptimal glycemic control. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2012;5:213-7.
- 118 Di Pierro F, Bellone I, Rapacioli G, Putignano P. Clinical role of a fixed combination of standardized *Berberis aristata* and *Silybum marianum* extracts in diabetic and hypercholesterolemic patients intolerant to statins. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2015;8:89-96.
- 119 Di Pierro F, Putignano P, Villanova N, Montesi L, Moscatello S, Marchesini G. Preliminary study about the possible glycemic clinical advantage in using a fixed combination of *Berberis aristata* and *Silybum marianum* standardized extracts versus only *Berberis aristata* in patients with type 2 diabetes. *Clin Pharmacol.* 2013; 19(5):167-74.
- 120 American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2014. *Diabetes Care* 2014;37(1):S14e80.
- 121 United Kingdom Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. *Lancet* 1998;353: 837e53.
- 122 Zhou J, Zhou S, Tang J, Zhang K, Guang L, Huang Y. Protective effect of berberine on β cells in streptozotocin- and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2009;606:262e8.
- 123 Derosa G, D'Angelo A, Maffioli P. The role of a fixed *Berberis aristata/Silybum marianum* combination in the treatment of type 1 *diabetes mellitus*. *Clin Nutr.* 2015;S0261-5614(15)00225-3.
- 124 Megyesi M, Biczók L. Berberine alkaloid as a sensitive fluorescent probe for bile salt aggregates. *J Phys Chem B.* 2007;111(20):5635-9.
- 125 Chen F, Zhang Y, Liu Q, Pang MZ, Yang XG, Pan WS. Optimization of a novel muco-adhesive drug delivery system with Long-exchange resin core loaded with berberine hydrochloride using central composite design methodology. *Yao Xue Xue Bao.* 2008;43(9):963-8.
- 126 Cano-Cebrian MJ. Intestinal absorption enhancement via the paracellular route by fatty acids, chitosans and others: a target for drug delivery. *Curr Drug Deliv.* 2005;2(1):9-22.
- 127 Artursson, P. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm Res.* 1994;11(9):1358-61.
- 128 Kato Y, Onishi H, Machida Y. Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field. *Curr Pharm Biotechnol.* 2003;4(5):303-9.
- 129 Anderberg EK, Lindmark T, Artursson P. Sodium caprate elicits dilatations in human intestinal tight junctions and enhances drug absorption by the paracellular route. *Pharm Res.* 1993;10(6):857-64.
- 130 Lv X, Li J, Zhang M, Wang C, Fan Z, Wang C. Enhancement of sodium caprate on intestine absorption and antidiabetic action of berberine. *AAPS PharmSciTech.* 2010;11(1):372-82.
- 131 Zhang M. Sodium caprate augments the hypoglycemic effect of berberine via AMPK in inhibiting hepatic gluconeogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;363(1-2):122-30.
- 132 Zhaojie M. Amorphous solid dispersion of berberine with absorption enhancer demonstrates a remarkable hypoglycemic effect via improving its bioavailability. *Int J Pharm.* 2014;467(1-2):50-9.
- 133 Maher S, Leonard TW, Jacobsen J, Brayden DJ. Safety and efficacy of sodium caprate in promoting oral drug absorption: from *in vitro* to the clinic. *Adv Drug Deliver Rev.* 2009;61(15):1427-49.
- 134 Javed S, Kohli K, Ali M. Reassessing bioavailability of silymarin. *Altern Med Rev.* 2011;16(3):239-49.
- 135 Iosio T, Voinovich D, Perissutti B, Serdoz F, et al. Oral bioavailability of silymarin phytocomplex formulated as self-emulsifying pellets. *Phytomedicine.* 2011;18(6):505-12.
- 136 Stermitz FR, Lorenz P, Tawara JN, Zenewicz LA, Lewis K. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(4):1433-7.

Capitolo 12

L'estratto di riso rosso fermentato

Premessa

Difficile stabilire se l'estratto di riso rosso fermentato sia a pieno titolo un fitoterapico. Anche se infatti origina in qualche modo dal *Regno Vegetale*, il riso appunto, ad essere estratto è solo quanto deriva dalla fermentazione di quest'ultimo, operata da un fungo che "vegetale" non è. Se non è assolutamente chiara la sua appartenenza, o meno, al mondo dei fitoterapici, lo è invece la sua appartenenza al mondo dei nutraceutici. In molti Paesi d'Europa, Italia compresa, è addirittura il nutraceutico più venduto in assoluto. E se l'essere o meno un fitoterapico non è certo la cosa più curiosa del prodotto, l'essere un nutraceutico lo è a pieno titolo. L'estratto di riso rosso fermentato contiene infatti una molecola registrata come farmaco in tutto il mondo e nota come lovastatina. È quindi, ad oggi, l'unico nutraceutico al mondo autorizzato per essere venduto liberamente anche nei supermercati, pur contenendo al suo interno un medicinale. E non ne contiene solo tracce. Inizialmente limitata a 3 mg/dose, oggi i nutraceutici a base di riso rosso fermentato possono contenere fino a 10 mg/dose di lovastatina. A questo dosaggio la lovastatina è descritta ridurre il colesterolo, nel paziente *naïve* e con colesterolemia totale non severa (240 mg/dL), per valori compresi tra il 19 e il 24%⁽¹⁾. Quello che è veramente curioso, è notare come in un mondo dove l'opinione pubblica sempre più glorifica, anche irrazionalmente, ciò che risulta essere "naturale" a discapito, sempre irrazionalmente, di tutto ciò che è "di sintesi", percezione che ha certamente contribuito all'indubbio successo commerciale globale dei nutraceutici, il più acquistato tra questi ultimi è poi l'unico al mondo a contenere al suo interno una molecola ottenuta, mediante sintesi chimica, già dal 1983⁽²⁾.

Ma il suo enorme successo commerciale è anche dovuto alla sua applicazione. Nel mondo economicamente sviluppato le malattie cardiovascolari sono senza dubbio la prima causa di morte. Alcuni parametri, come la co-

lesterolemia, sono sicuramente predittivi di un rischio più o meno pronunciato di incorrere in eventi cardiovascolari, anche mortali. E le statine sono molecole davvero capaci di arginare tale rischio. Lo sono così tanto che la consapevolezza di cosa sia una statina, farmaco capace di ridurre il colesterolo ed il rischio di incorrere in eventi cardiovascolari mortali, si è diffuso anche tra i soggetti che non hanno nulla a che fare con il mondo sanitario. Le statine hanno però una brutta fama e la percentuale di quelli che si dichiarano ad esse intolleranti è sicuramente maggiore di quella evidenziata dai *trial* clinici e, apparentemente, cresce anno dopo anno. Di qui il grandissimo interesse nei confronti di una preparazione, il riso rosso fermentato, per tutti una statina “naturale” e, quindi, “sicuramente” migliore.

L'origine del tutto

L'*annus mirabilis* per le statine è stato il 1976. In quell'anno i laboratori Sankyo^(3,4) isolarono dal *Penicillium citrinum* quattro composti che dimostravano, sui microsomi di fegato di ratto, una potente azione inibitoria verso HMG-CoA (*3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A*) reduttasi. Erano quindi per questo capaci di ridurre la sintesi di colesterolo⁽⁵⁾. Si trattava di due composti con sigla ML-236-A, rispettivamente nella forma acida (ad anello aperto) e in quella lattonica (ad anello chiuso), e di due composti con sigla ML-236-B, anche questi presenti sia come acido che come lattone. Tra questi due il composto ML-236-B, che altro non era che il derivato metilbutirrato del composto ML-236-A, era più attivo di circa un ordine di grandezza. Questi risultati, chiarissimi *in vitro*, venivano confermati anche dopo somministrazione orale nel ratto⁽⁶⁾. Purtroppo però per i suoi scopritori, la struttura di ML-236-B appariva quasi del tutto identica a quella di un'altra sostanza, nominata compactina, isolata indipendentemente, sempre nel 1976, da altri ricercatori a partire da colture di *Penicillium brevicompactum*⁽⁷⁾. La compactina si differenziava da ML-236-B solamente per la presenza di un idrogeno al posto di un metile in posizione C3 dell'esa-idro-naftalene, la struttura a doppio anello che costituisce la struttura base di ogni statina. La compactina aveva però, in sostanza, azione biologica identica a quella di ML-236-B. Questa attività era stata tuttavia dimostrata solo sui fibroblasti umani e non sugli epatociti⁽⁸⁾. E i risultati di tali esperimenti erano stati deludenti. I fibroblasti, subita l'inibizione della loro HMG-CoA reduttasi, ne au-

mentavano infatti immediatamente la sintesi, vanificando ogni tentativo di blocco molecolare esogeno. Anche le esperienze condotte successivamente *in vivo*, nel ratto, avevano dato esito negativo, in quanto l'inibizione di HMG-CoA reduttasi innescava allo stesso modo una iperproduzione, anche di dieci volte, del medesimo enzima che ne vanificava l'effetto⁽⁹⁾. Questo effetto non si manifestava però in tutti i modelli animali^(10,11). E non avveniva per fortuna nemmeno nell'uomo, dove sia ML-236-B che la compactina dimostravano effetti positivi nel trattamento dell'ipercolesterolemia, anche se a dosaggi piuttosto elevati, spesso compresi tra 50 e 150 mg/die⁽¹²⁾. Lo sviluppo della compactina fu comunque interrotto nel 1980, perché si dimostrò capace di indurre linfomi nel cane quando veniva somministrata cronicamente (per due anni), a dosaggi compresi tra i 100 e i 200 mg/kg. L'effetto linfoma-inducente scompariva però a dosi di 20 mg/kg⁽⁹⁾. Questo effetto tossico avrebbe poi indotto i tossicologi, nelle successive ricerche sulle statine, a ridurre le dosi impiegate negli studi di tossicità cronica. Le ricerche sui modelli animali di ipercolesterolemia continuarono quindi su ML-236-B e su nuovi possibili derivati⁽¹³⁾. Sempre nel 1976, i ricercatori della *Merck Sharp & Dohme* isolarono dall'*Aspergillus terreus* una sostanza che inibiva la sintesi di colesterolo, che denominarono mevinolina⁽¹⁴⁾. Questa era identica, stavolta totalmente, a ML-236-B. Altri ricercatori, lavorando su colture di *Monascus ruber*, isolarono nello stesso anno una sostanza con lo stesso identico effetto su HMG-CoA reduttasi. Gli scopritori la denominarono monacolina K. Presto, anche per questa sostanza, si scoprì però la totale sovrapposibilità chimica con ML-236-B e, quindi, con la mevinolina. ML-236-B, mevinolina e monacolina K erano quindi la stessa identica sostanza scoperta indipendentemente, nel medesimo anno, da tre gruppi di ricerca diversi che operavano con tre diverse colture di fungo. Quella sostanza (Fig.1), noi tutti, la chiamiamo lovastatina⁽¹⁵⁾.

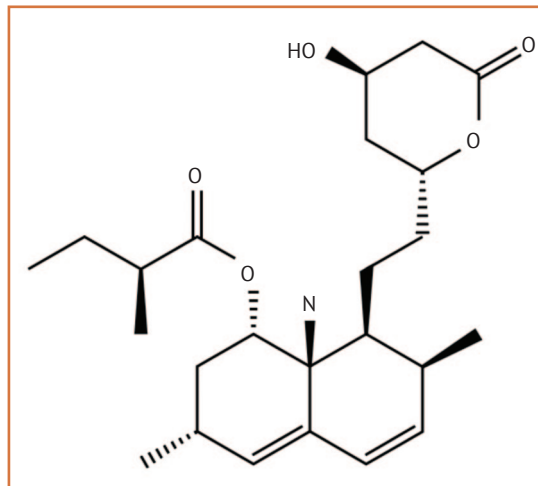


Figura 1 - Struttura chimica della lovastatina (forma lattonica)

Nel 1987, dopo che ampi *trial* clinici avevano dimostrato la sua efficacia e la sua tollerabilità, la *Food & Drug Administration* (FDA) americana ne approvò il dossier e la molecola entrò quindi in commercio, decretando l'inizio dell'era delle statine.

L'estratto di riso fermentato da *Monascus purpureus*

Oggi con "riso rosso fermentato" si intende una preparazione estrattiva ottenuta a partire da un prodotto derivato dal riso e "inquinato" con il lievito *Monascus purpureus* (Fig.2). Caratterizzato dal medesimo colore rosso della tonaca dei monaci buddisti, dal quale deriva il suo nome, il riso rosso fermentato è anche noto come *Hung-Chu*, *Hong Qu*, *Ang-kak*, *riso Ankak*, *Hongqu*, *Koji*, *Beni-Koji*, *Red Yeast rice*, *Red Mold rice*. Il Genere *Monascus* annovera in realtà ben 58 diverse specie registrate nell'*American Type Culture Collection* (Bethesda, USA) ma tra queste, la documentazione scientifica è maggiormente riferibile a tre sole specie: *pilosus*, *ruber* e, appunto, *purpureus*. Il lievito in questione venne isolato per la prima volta a Taiwan nel 1930 da due ricercatori giapponesi. Il suo uso alimentare è però di gran lunga antecedente e risale addirittura all'800 a.C. quando veniva impiegato come conservante per carne e pesce. Il suo uso medicinale risale invece alla fine del 1500 con la stesura della prima Farmacopea Cinese nella quale

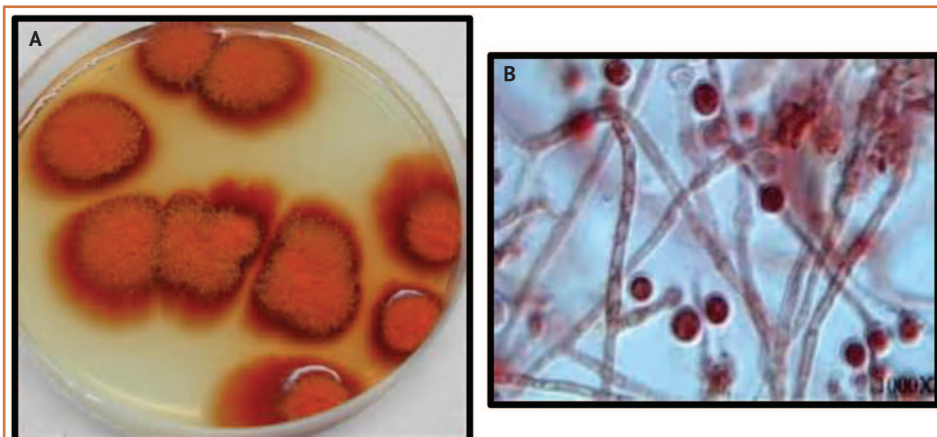


Figura 2 - Aspetto di una coltura di *Monascus purpureus* in piastra (A) e ad alto ingrandimento (B)

vennero descritte la proprietà pro-flebologiche del *Monascus*, per altro oggi non più rivendicate. La preparazione di questo riso fa parte della tradizione culturale cinese. Si stima che il consumo asiatico *pro-capite* oscilli tra i 15 e i 55 g/die. Per un confronto indicativo, si noti come il consumo *pro-capite* di pasta alimentare in Italia sia di circa 80 g/die. Preparare il riso rosso fermentato, anche per scopi medicinali, è davvero alla portata di tutti e la sua esecuzione è ancora identica a quella descritta nel XVII secolo. Si cuoce il riso a vapore sino ad ottenerlo semi-gelificato (il chicco si deve appiattire con la leggera pressione di un dito). Quindi lo si inquina con lo *starter* di *Monascus*. Si tiene il tutto coperto con panni di cotone, per non disperdere l'umidità, a una temperatura controllata di 30-35°C. Ci vogliono di norma circa sette giorni in queste condizioni perché il centro del chicco diventi rosso. Trascorso tale periodo il preparato viene essiccato al sole per circa 20-24 ore o in stufa a 35-45°C per un tempo inferiore.

La sua umidità finale non deve superare il 10% circa. Così ottenuto il preparato si deve poter frantumare tra le dita (Fig.3A). Come anticipato, si tratta di un alimento tradizionale ampiamente consumato in alcuni paesi asiatici, in particolare in Cina, Giappone e Corea, dove viene utilizzato da secoli. L'alimento stesso può essere però impiegato a scopi terapeutici. Ad ogni modo, quando l'uso è medicinale, si preferisce estrarre l'alimento con una miscela di acqua ed etanolo o metanolo. Quanto ottenuto dopo essiccamento corrisponde ad una polvere rossa, l'estratto vero e proprio, che è possibile impiegare per formulare capsule o compresse (Fig.3B).



Figura 3 - Riso rosso fermentato (A) ed estratto di riso rosso fermentato (B)

Dentro l'estratto da *Monascus purpureus*

La percezione che il consumatore, e con lui purtroppo molto spesso anche lo specialista medico, farmacista o biologo che li consiglia, ha dei prodotti contenenti estratti da *Monascus*, come vengono generalmente chiamati, è che questi contengano, come principio attivo, monacolina K standardizzata. Non solo. Si ritiene inoltre che il valore percentuale, (questo quando è dichiarato corrisponde a 1.5 o a 3.0%) descritto nel retro dell'astuccio alla voce "principi attivi", sia da attribuirsi di nuovo alla sola monacolina K. Questi convincimenti sono totalmente sbagliati. E la cosa fantastica è che lo sanno tutti. Dal Ministero della Salute, all'EFSA, passando anche per l'Unione dei Consumatori.

Se osserviamo "al microscopio" l'estratto di riso rosso fermentato troviamo infatti, non una, ma ben dieci monacoline diverse, tra cui ovviamente la K; troviamo inoltre le di-idro-monacoline, frutto della degradazione delle monacoline stesse, e un polichetide noto come citrinina, oltre a sei diversi pigmenti, i gialli ankaflavina e monascina, i rossi rubropunctamina e monascorubraminamonascina e gli arancio rubropunctatina e monascorubrina; troviamo inoltre acido γ -amino-butirrico e acido dimerunico, quest'ultimo riconosciuto antiossidante; quindi fitosteroli, saponine, isoflavoni, alcaloidi e acidi grassi saturi ed insaturi; ovviamente troviamo anche amido, residuo di una fermentazione che per quanto sia completa non riesce davvero a fermentare tutto, e infine proteine⁽¹⁵⁾. Le dieci monacoline, di cui cinque in forma lattonica (cioè ad anello chiuso) e cinque in forma acida (cioè ad anello aperto), sono denominate rispettivamente monacolina K (KA la forma acida), monacolina J (JA la forma acida), monacolina M (MA la forma acida), monacolina L (LA la forma acida) e monacolina X (XA la forma acida) (Fig.4). Per ulteriore precisione, le monacoline K e KA vengono anche dette primarie, le monacoline J, JA, L, LA, M, MA, X ed XA, secondarie.

In vitro tutte le monacoline risultano inibire, seppur in maniera piuttosto variabile, l'enzima HMG-CoA reduttasi. L'azione delle forme lattoniche però è ritenuta meno rilevante, se non addirittura irrilevante, ai fini clinici. Dopo metabolismo epatico queste vengono infatti commutate nelle rispettive forme acide. Le forme acide sono quindi le uniche a poter essere considerate reali effettori, nei confronti di HMG-CoA reduttasi, di inibizione. Quanto detto vale ovviamente anche per la lovastatina di sintesi. Anch'essa presenta la struttura lattonica. Quindi si trasforma nella controparte acida e solo

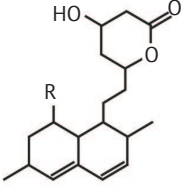
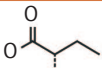
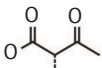
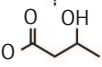
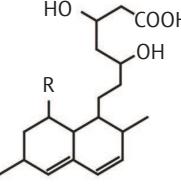
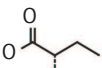
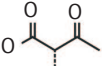
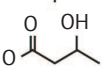
Stuttura	Nome	R	MW
	1. Monacolina K (MK)		404
	2. Monacolina J (MJ)	OH	320
	3. Monacolina L (ML)	H	304
	4. Monacolina M (MM)		418
	5. Monacolina M (MM)		406
	1a. MK in forma acida (MKA)		422
	2a. MJ in forma acida (MJA)	OH	338
	3a. ML in forma acida (MLA)	H	322
	4a. MX in forma acida (MXA)		436
	5a. MM in forma acida (MMA)		424

Figura 4 - Struttura chimica delle dieci monacoline reperibili nell'estratto ottenuto mediante fermentazione di *Monascus purpureus*

in questa forma prende contatto, a livello epatico, con l'enzima HMG-CoA reduttasi, inibendolo. Tornando a quanto concerne l'azione ipocolesterolemizzante dei derivati da *Monascus*, tra le monacoline primarie la monacolina KA è quindi il vero principio attivo, essendo la ben più famosa monacolina K semplicemente il suo precursore. Le altre quattro monacoline acide, che insieme alle rispettive quattro lattoniche sono definite secondarie, sono dotate di minore attività inibente rispetto a quanto esercitato da KA (precisamente dal 50 al 75% meno attive). Nel complesso quindi la loro presenza tende a diluirne il più potente effetto farmacologico. Le di-idro-monacoline infine, principalmente la K ma anche la L, la J e tutte le altre, sono invece quasi totalmente inattive e, secondo alcuni Autori, addirittura citotossiche su cellule umane⁽¹⁶⁻²⁰⁾.

Le monacoline visualizzabili negli estratti di riso rosso fermentato sono quindi, nel complesso, circa una dozzina. In realtà, almeno teoricamente, dovrebbero essere quindici. Di ogni monacolina dovrebbe essere infatti reperibile la forma lattonica (K, J, L, M, X), quella acida (KA, JA, LA, MA, XA) e quella di-idro (DMK, DMJ, DML, DMA, DMX). Alcune volte però la di-idro-monacolina L, come anche la J, sono contenute per valori così minimali

da non essere chiaramente osservabili. Le altre di-idro-monacoline molto spesso non sono invece affatto rilevabili. Tra tutte fa quindi eccezione la DMK che è sempre visibile. Più comunemente quindi le analisi in HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) di un estratto di riso rosso fermentato presentano undici picchi caratteristici (Fig.5).

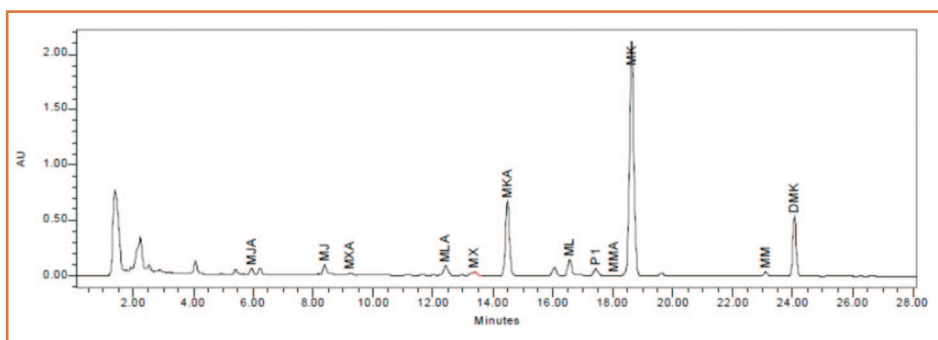


Figura 5 - Analisi dell'estratto da *Monascus purpureus* dove sono osservabili 11 picchi molecolari di monacoline. Le di-idro-monacoline diverse dalla K (DMK) non sono qui, come spesso accade, rilevabili

Indipendentemente dalla minore efficienza delle monacoline secondarie nell'inibire l'enzima epatico preposto alla sintesi del colesterolo, e dall'eventuale citotossicità delle di-idro-monacoline, queste molecole nel loro insieme, volendo quindi anche comprendere la K e la KA, non sono comunemente standardizzate. Nelle materie prime usate per formulare, come all'interno delle forme farmaceutiche finite, capsule o compresse, queste sostanze possono variare, singolarmente, anche di centinaia di volte^(21,22). Il problema riguarda qualunque Paese, Italia compresa, in quanto le materie prime usate per formulare sono tutte di derivazione cinese e quindi risentono tutte delle stesse problematiche. Ci sono cioè undici-dodici monacoline, e non una, e queste non sono standardizzate. Al contrario nei diversi prodotti, o nei diversi lotti dello stesso prodotto, possono variare in maniera inaccettabile. In termini di monacoline totali, ad esempio, è stata osservata una variazione compresa tra 0.3 e 11.15 mg/capsula; in termini di monacolina K la variazione osservata risultava essere tra 0.10-10.09 mg/capsula mentre, in termini di monacolina KA, la forbice analitica era compresa tra 0.00 e 2.30 mg/capsula (in merito al significato di 0.00 mg/capsula come contenuto reale in monacolina KA si rimanda il lettore alle spiegazioni fornite nei paragrafi successivi).

Infine, il problema analitico. Tanto nelle materie prime, quanto nei prodotti finiti, le varie monacoline, nel loro insieme, vengono valutate comunque “come se fossero” solo monacolina K! Incredibile ma vero. Vengono cioè analizzati i prodotti finiti considerando le diverse monacoline come se fossero tutte una sola monacolina, la K. Dov'è il problema? Consideriamo una materia prima che nella realtà contenga ad esempio un 75% in monacoline K e KA e un 25% riconducibile a tutte le altre monacoline secondarie, comprese le di-idro-monacoline. Dal momento che tutte insieme vengono lette analiticamente come monacolina K, se le intenzioni del formulatore fossero quelle di preparare un prodotto capace di contenere 10 mg/dose di monacolina K, i dati clinici disponibili sono relativi alla lovastatina pura di sintesi ed è quindi corretto che lui si affidi nel formularne una copia “naturale” ad un metodo analitico in grado di analizzare la sua presenza; si ritroverebbe suo malgrado a sviluppare un prodotto il cui contenuto in monacolina K (+ KA) finirebbe per essere “solo” 7.5 mg/dose. Si presti attenzione che è irrilevante ai fini della comprensione del problema la distinzione tra K e KA in quanto l'una, a livello plasmatico, si trasforma comunque nell'altra. Inoltre, siccome la materia prima manca di un vero e proprio processo di standardizzazione, pur utilizzando la stessa “marca” di prodotto, o lo stesso fornitore, al cambiare del lotto, il formulatore, sempre in maniera inconsapevole, formulerebbe un prodotto contenente un nuovo diverso quantitativo reale di monacolina K (+ KA), maggiore o minore di prima. La variazione in sé è irrilevante. I prodotti saranno comunque sotto dosati e non riproducibili l'uno con l'altro.

Come anticipato, l'Italia non è esente dal problema. E non bisogna essere “affiliati” a PubMed per saperlo. Attraverso denunce anche pubbliche, come quella fatta ad esempio da Altroconsumo nel 2013⁽²³⁾, è stata dimostrata la presenza di molti prodotti che, pur rivendicando 3 o 10 mg di monacolina K per compressa, i due dosaggi maggiormente utilizzati nelle forme finite, ne contenevano mediamente il 20-25% in meno. Si presti attenzione. La frode non è volontaria. Anzi, apparentemente non esiste alcuna frode nella misura in cui lo stesso Ministero della Salute ammette l'analisi cumulativa di tutte le monacoline “come se fossero” monacolina K. Ovviamente però, da un punto di vista scientifico, è inaccettabile somministrare un prodotto, ritenuto ad esempio contenere 10 mg di principio attivo, ma che in realtà oggi ne contiene 8.5 mg, domani 7.4 mg e dopodomani magari 9.2! Come allo stesso modo, da un punto di vista clinico, è impossibile basarsi

sui risultati clinici pubblicati a partire da preparazioni di questo tipo. Come suggerito in maniera provocatoria, ma forse nemmeno tanto, da molti Autori, se il paziente necessitasse davvero di una statina sarebbe forse meglio avvalersi di una preparazione medicinale a tutti gli effetti, contenente lovastatina di sintesi. Questa, essendo altamente standardizzata, risulterebbe assolutamente preferibile^(24,25).

La problematica della citrinina

I “guai” dell’estratto di riso rosso fermentato non finiscono però qui. Al suo interno, come elencato in uno dei paragrafi precedenti, può essere presente anche la citrinina (Fig.6). La citrinina è un metabolita secondario tossico, chimicamente un polichetide, prodotto, naturalmente e per fermentazione, da diverse specie di *Aspergillus* e di *Penicillium* e, appunto, dal *Monascus (purpureus)*. Per comprendere cosa possa essere un polichetide, il lettore consideri che l’eritromicina, la claritromicina, l’azitromicina, il tacrolimus, l’anfotericina B e l’intera famiglia delle tetracicline appartengono al gruppo dei polichetidi. Originariamente isolata da *Penicillium citrinum*, da cui prese il nome, la citrinina è

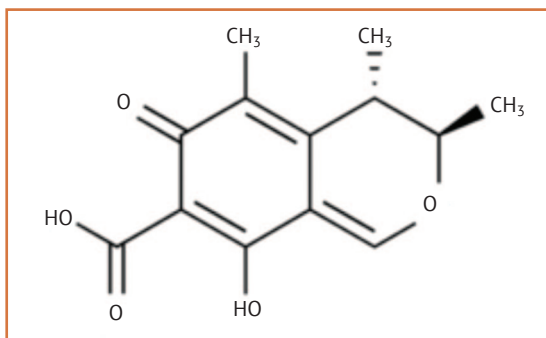


Figura 6 - Struttura chimica della citrinina

oggi nota per essere un composto primariamente nefrotossico, ma probabilmente anche epatotossico e potenzialmente cancerogeno per l’uomo e per gli animali. Inizialmente investigata in quanto, come altri polichetidi, dimostrava una buona azione antibiotica, la sua evidente tossicità la esclude però successivamente da qualsiasi possibile utilizzo terapeutico. Il meccanismo attraverso il quale la citrinina espleta i suoi effetti tossici non è pienamente compreso, soprattutto non è noto se la sua tossicità sia la conseguenza di un violento stress ossidativo o piuttosto di un aumento della permeabilità delle membrane mitocondriali dovuta a cause non direttamente ossidative. Alcuni Autori hanno comunque fatto notare come probabilmente, per eserci-

tare i suoi effetti dannosi, la citrinina debba anche subire alcune complesse biotrasformazioni a livello cellulare. Altamente stabile al calore, si degrada a temperature superiori ai 100°C. Cuocere i prodotti non è però consigliabile. E non tanto perché le stesse monacoline potrebbero inattivarsi. Ma perché la citrinina, degradata dalla temperatura, produrrebbe due metaboliti parimenti tossici, noti come H1 e H2. Di questi, almeno uno è considerato ancora più nefrotossico della citrinina stessa. Oltre ad essere pericolosamente nefrotossica, la citrinina, la cui presenza negli alimenti spesso si accompagna a quella dell'ocrotossina A con la quale produce sinergie mortali, è imputata di aver causato la *yellow rice disease* (la citrinina è di colore giallo) in Giappone nel biennio 1952-53, con numerosi casi di avvelenamento grave, e di essere la causa della sempre mortale Nefropatia Endemica dei Balcani. Pur non essendo nota la dose letale nell'uomo, nell'animale questa è compresa tra i 57 e i 134 mg/kg^(26,27). Attualmente, il livello massimo di citrinina negli alimenti è ben regolamentato e negli integratori alimentari deve essere inferiore alle 2 ppm, o parti per milione⁽²⁸⁾, concentrazione alla quale la sua potenziale tossicità dovrebbe risultare assente o quasi.

Da quanto detto, appare chiaro come la possibile presenza di citrinina negli integratori nutraceutici sia da considerarsi una questione di grande rilievo che, ancor di più, sottolinea l'insensatezza di un uso così diffuso di estratto da riso rosso fermentato. La logica nutraceutica presuppone, ed impone, un elemento di grande salubrità delle preparazioni che non possono assolutamente essere dotate di caratteristiche tossicologiche rilevanti. Quanto sia percentualmente ampia la presenza di citrinina nelle preparazioni di *Monascus* non è un'informazione facile da ottenere. Alcuni Autori però, cercando di rispondere a questa domanda, analizzarono i lotti delle dodici materie prime di *Monascus* maggiormente impiegate nella fabbricazione di integratori alimentari, soprattutto europei e americani, scoprendo che il 33% di questi risultava contenere citrinina in maniera rilevabile e pericolosa⁽²²⁾.

Monacolina K = lovastatina

Dopo aver descritto come il prodotto nutraceutico più venduto in senso assoluto presenti gravissime problematiche (nomenclatura del principio attivo, mancata standardizzazione, errata analisi chimica e conseguente errata

titolazione, presenza di sostanze forse citotossiche, le di-idro-monacoline, e sicuramente nefrotossiche, la citrinina), è necessario ricordare un ulteriore aspetto in qualche modo negativo del prodotto.

La monacolina K, anche se le si attribuisce strumentalmente il termine “naturale”, è comunque una statina. Le statine sono note, anche, per produrre in una discreta percentuale di utilizzatori, sofferenza muscolare e tossicità epatica. E in rari casi possono determinare anche reazioni avverse gravissime, come ad esempio la rabdomiolisi. Pur non essendo affatto chiaro come questo grave fenomeno avverso possa aver luogo, è noto come l'uso di inibitori del *CYP3A4* possa aumentare sensibilmente il rischio che ciò accada. Questo avviene perché l'impiego di tali inibitori eleva la concentrazione plasmatica della statina impedendone la metabolizzazione. Questo produce ovviamente un aumento del rischio tossicologico. Gli inibitori del *CYP3A4*, farmaci per altro molto diffusi, non creano però interazioni con tutte le statine. Lo fanno primariamente con quelle a struttura lattonica come l'atorvastatina, la cerivastatina e la simvastatina. Come già descritto le forme lattoniche delle statine devono essere considerate dei *pro-drug*. Attraverso modificazioni chimiche, ma soprattutto enzimatiche, queste vengono commutate a livello epatico in forme più idrosolubili (per precisione: l'atorvastatina viene metabolizzata a derivati orto- e para-idrossilati; mentre la simvastatina viene metabolizzata primariamente nel derivato β -idrossiacido). La lovastatina non fa eccezione. Essendo chimicamente sovrapponibile alla simvastatina, dalla quale differisce solo per la presenza di un H al posto di un CH_3 , la sua struttura lattonica viene metabolizzata dal *CYP3A4* a forma idrossiacido, sua forma attiva. Quanto detto per la lovastatina vale ovviamente per la monacolina K e per l'estratto di riso rosso fermentato dove, tra l'altro, la monacolina K è sempre e comunque la monacolina più presente⁽²⁹⁻³²⁾. Quanto descritto suggerisce la necessità di allontanare il più possibile, tanto da chi prescrive quanto da chi utilizza, l'idea di intrinseca salubrità del riso rosso fermentato in quanto “statina naturale”. Il significato benevolo di cui l'accezione “naturale” sembra intrisa, in realtà non esiste. Esistono solo le statine, soprattutto lattoniche. Con i loro pro e i loro contro. Viene spontaneo a questo punto domandarsi a cosa mai potrebbe servire allora, nell'armamentario medico, un derivato estrattivo ottenuto da fermentazione di *Monascus purpureus*. Per poter rispondere a quest'ultima domanda in maniera precisa dobbiamo prima analizzare altri aspetti non ancora affrontati.

Miglioramento qualitativo degli estratti da riso rosso fermentato

Quanto finora descritto evidenzia chiaramente l'esistenza di una serie impressionante di errori, strumentalizzazioni e fraintendimenti che avvolgono la questione "estratti di riso rosso fermentato". Questi, per riassumere, presentano tutti i seguenti problemi:

- 1 variabilità nel contenuto in monacoline K e KA;
- 2 presenza variabile di monacoline (J, L, M, X) considerate secondarie in quanto meno concentrate e molto meno attive e quindi ad azione diluente l'effetto farmacologico operato dalle monacoline K e KA;
- 3 presenza variabile di di-idro-monacoline inattive e citotossiche;
- 4 errata titolazione delle materie prime e dei prodotti finiti all'interno dei quali tutte le monacoline, sia primarie che secondarie (nelle loro forme lattonica, acida e di-idro), vengono considerate come monacolina K;
- 5 possibile presenza di citrinina, un polichetide potentemente nefrotossico;
- 6 insensata strumentalizzazione della monacolina K che, descritta come "naturale", verrebbe percepita come non tossica o meno tossica delle statine in genere.

Esiste però almeno un aspetto positivo, già visto in precedenza ma forse senza le adeguate sottolineature, che potrebbe valorizzare gli estratti da *Monascus*. Questo aspetto deve essere tenuto in debita considerazione soprattutto quando ci si domanda in che termini, almeno in linea teorica, un derivato da riso rosso fermentato, potrebbe risultare vantaggioso, rispetto ad una qualunque statina, nel controllo del paziente dislipidemico. Per comprenderlo appieno dobbiamo analizzare la situazione farmacocinetica e farmacodinamica della lovastatina. Nei medicinali la lovastatina è l'unica molecola considerabile come principio attivo ed è la sua sola azione a caratterizzare quella del farmaco *in toto*. Negli integratori, dove i composti sono ottenuti per via fermentativa ed estrattiva a partire dagli amidi del riso, l'azione globale del prodotto è invece dovuta alla presenza contemporanea di monacolina K e di monacolina KA. E l'omologo di quest'ultima è assente nelle preparazioni farmaceutiche. Non manca però nel plasma dei pazienti trattati con lovastatina (farmaceutica). Per comprendere come questo avvenga, osserviamo da un punto di vista cinetico ciò che succede in un paziente trattato con lovastatina. La lovastatina, che è una forma

lattonica ad anello chiuso e molto poco idrofila, mostra un assorbimento intestinale del 30%. Più dell'80% di questo valore viene però metabolizzato in sede epatica e solo quindi il 5% della dose orale somministrata raggiunge effettivamente la circolazione plasmatica e può essere considerato il vero valore di biodisponibilità orale della lovastatina. Un valore tanto basso (è davvero tutto relativo... per un erbale sarebbe altissimo) non è in realtà un problema, dal momento che il ruolo più importante dell'azione ipocolesterolemizzante si gioca a livello epatico e la quota che raggiunge il fegato è comunque il 30% della dose somministrata. La rilevazione cinetica nel distretto plasmatico, dopo passaggio epatico quindi, mostra che il 62% circa della lovastatina presente è in forma di β -idrossiacido (ad anello aperto, idrofila, attiva), mentre il 38% circa è ancora in forma lattonica e quindi inattiva. Col trascorrere del tempo quindi, ad ogni passaggio epatico la forma lattonica residua verrà commutata nella forma attiva di β -idrossiacido che, almeno a livello teorico, potrà lavorare anche su altri distretti diversi da quello epatico. Si noti che il bilancio plasmatico totale di un individuo è dato dalla capacità di sintesi totale di colesterolo. E questa, anche se per la maggior parte è un fenomeno epatico, avviene in ogni organo. A livello plasmatico più del 95% della lovastatina, tanto nella forma lattonica quanto in quella di β -idrossiacido, risulta comunque coniugato con proteine vettrici e non è quindi in una forma, per così dire, davvero libera di agire. Al termine di questo processo, considerando l'AUC totale e i dati relativi all'escrezione, primariamente fecale e quindi urinaria, in termini farmacodinamici la quota teorica di lovastatina idrossiacido considerabile come efficiente, arriverà ad essere stata, secondo alcuni Autori, il 25% di quella potenziale e in questa quantità avrà avuto modo di agire inibendo la HMG-CoA reduttasi⁽³³⁾. Da quanto detto, possiamo estrapolare a grandi linee che i medesimi fenomeni accadano, in termini farmacocinetici e farmacodinamici, anche alla componente "monacolina K" dell'estratto di riso rosso fermentato. Come però abbiamo detto più volte, quando operiamo con il derivato da *Monascus*, somministriamo anche monacolina KA, cioè la forma β -idrossiacido, ad anello aperto ed attiva della lovastatina, quella, per intenderci, che nel paziente trattato con lovastatina "medicinale" si origina soprattutto per metabolismo epatico dall'azione ossidativa del CYP3A4. Che biodisponibilità mostra questa frazione? Il dato non è noto con precisione ma è estrapolabile curiosando i termini farmacocinetici della molecola ad essa più simile: la pravastatina. Questa chimicamente è già in forma attiva come

β -idrossiacido e in posizione C3, dove la compactina possedeva un H e la lovastatina un CH₃, possiede invece un OH. Per il resto è identica in tutto e per tutto alla monacolina KA. La pravastatina mostra un assorbimento intestinale del 34% circa e un metabolismo, apparentemente non mediato da citocromi epatici o da sistemi enzimatici noti, del 50% circa con una risultante, in termini di biodisponibilità orale, del 18%⁽³⁴⁾. Ovviamente nel caso della pravastatina tutto il farmaco si trova in sede plasmatica già in forma attiva. Differentemente dalla lovastatina, e in questo senso anche da ogni altra statina, solo il 50% della pravastatina viaggia nel plasma legata alle proteine, mentre l'altro 50% risulta libero. A calcoli fatti, considerando l'AUC totale e i dati di escrezione, anch'essi indicanti aspetti di primaria escrezione fecale e quindi urinaria, l'efficienza teorica della dose di pravastatina somministrata arriverà ad essere del 75%⁽³³⁾.

In linea teorica quindi la somministrazione di un derivato da riso rosso fermentato non sarebbe sovrapponibile ad una somministrazione di lovastatina. La somministrazione di sole monacoline K e KA ricorderebbe molto più da vicino una teorica co-somministrazione di lovastatina e pravastatina. Questa avrebbe dei vantaggi rispetto ad una più semplice somministrazione di sola lovastatina. Innanzitutto originerebbe nel tempo almeno due picchi plasmatici di concentrazione di attivo. La pravastatina come abbiamo già visto è una molecola già in forma attiva. La lovastatina deve invece attivarsi. Questa attivazione, la commutazione da forma lattonica a forma β -idrossiacido, necessita di circa quattro ore per avvenire⁽³⁵⁾. Un medesimo dosaggio distribuito in due picchi plasmatici potrebbe costituire un vantaggio come molto spesso avviene per diverse statine^(36,37). Se anche poi volessimo semplicemente ritenere la somministrazione di monacoline K e KA come una forma a cessione programmata di KA, anche in questo caso sappiamo che una statina formulata come *extended release* si dimostra, a parità di dosaggio somministrato, più efficace di una statina *normal release*⁽³⁷⁾. Altro aspetto è poi il metabolismo epatico. Somministrando monacoline K e KA, parte della forza farmacologica esercitata sarebbe riconducibile ad una sostanza con scarso metabolismo epatico (la KA è già in forma di β -idrossiacido), almeno per quanto riguarda il *CYP3A4*. E anche questo potrebbe risultare un buon vantaggio. Le statine, come la pravastatina, somministrabili in forma di β -idrossiacido, e quindi con scarsa se non nulla interazione con *CYP3A4*, sono effettivamente considerate più sicure in caso di co-somministrazione con altri farmaci⁽³⁸⁾. In buona sostanza potrebbe

effettivamente essere utile avere a disposizione un derivato da *Monascus* con cui operare. Un buon preparato però in questo senso dovrebbe rispettare, o avvicinarsi il più possibile, le seguenti caratteristiche:

- 1 assenza di citrinina (perché nefrotossica);
- 2 assenza di idro-monacoline (perché inutili e citotossiche);
- 3 assenza di monacoline secondarie (perché meno attive e quindi “diluenti”);
- 4 presentare un profilo altamente standardizzato nelle sole monacoline K e KA in rapporto tra loro di 1:1 (per ottimizzare alcuni aspetti cinetici);
- 5 presentare un titolo in principio attivo, espresso come somma di K + KA, decisamente più alto degli attuali 1.5-3.0% (per ridurre al massimo il contenuto in molecole potenzialmente interagenti, come ad esempio i pigmenti, e per ridurre il volume di prodotto da ingerire ed avere quindi migliore formulabilità in termini di prodotto finito).

Inutile sottolineare come, ad di là delle logiche scientifiche e di prodotto, una preparazione di questo tipo presenterebbe davvero aspetti di notevole tutela per il consumatore, soprattutto in considerazione di quello che è purtroppo il vero e attuale “panorama” *Monascus*. Quanto elencato in questi cinque punti è stato comunque effettivamente ottenuto con un lavoro di ricerca multidisciplinare durato più di tre anni. Perché così tanto tempo? Per sviluppare un prodotto con queste caratteristiche si decise di partire da estratti di riso rosso fermentato già disponibili. L'indagine di tutte, o quasi, le materie prime disponibili necessitò di un lungo periodo analitico e portò effettivamente all'identificazione di una tipologia di preparazione da *Monascus* con caratteristiche tali da potersi considerare un nuovo materiale di partenza sul quale lavorare.

Caratterizzazione dei derivati da riso rosso fermentato

Il processo di caratterizzazione analitica dei derivati da *Monascus*, finalizzato a trovare una materia prima sulla quale lavorare per arrivare a concentrare le monacoline K e KA, impone una prima importante riflessione in merito alle possibili frodi di prodotto. Queste sono purtroppo molto frequenti e il fenomeno va ad aggiungersi alle già numerose problematiche poste in essere dagli estratti di riso rosso fermentato. Smascherarle non è però così semplice. Come è intuibile la sofisticazione del *Monascus* si

attua semplicemente aggiungendo lovastatina sintetica. Alcuni Autori la chiamano però “adulterazione” in quanto viene aggiunta una molecola, la lovastatina, che è effettivamente presente, anche se nell'estratto si chiama in modo diverso (monacolina K). Altri preferiscono però il termine “sofisticazione” in quanto si aggiunge una molecola che, a voler essere precisi, da un punto di vista “atomico” è comunque diversa da quella presente naturalmente nell'estratto. Tale diversità, adeguatamente rilevata, consentirebbe di smascherare con estrema precisione tutti i prodotti oggetto di frode. Per comprendere a quale “diversità” stiamo facendo riferimento dobbiamo rifarci ad un concetto di chimica molto noto: quello degli isotopi. Definiamo isotopo un elemento che presenta un numero di neutroni maggiore, o minore, del dovuto. Il carbonio, su cui si fonda l'intera chimica organica, e quindi anche la chimica delle monacoline, possiede un nucleo atomico con 6 protoni. Il numero dei neutroni può invece variare, di qui il concetto di isotopo. In natura troviamo carbonio con 6 neutroni (stabile, definito C_{12} , presente al 98.89%), carbonio con 7 neutroni (stabile, definito C_{13} , presente all' 1.11%) e carbonio con 8 neutroni (instabile, con tempo di decadimento di 5570, presente in natura solo in tracce e usato per datare oggetti antichi). L'analisi isotopica del carbonio, dimostrando rapporti diversi tra i vari isotopi rispetto a quello effettivamente presente in natura, smaschererebbe le molecole sintetiche aggiunte. Volendo esaminare con il controllo isotopico un numero consistente di materie prime, il costo analitico risulterebbe però totalmente inaccettabile. Se però si accetta un limitatissimo margine di errore nell'identificazione delle frodi, si può operare in maniera diversa. Come è noto il fungo opera fermentando l'amido del riso. Questa fermentazione conduce alla creazione di nuovi metaboliti come ad esempio le monacoline. Il fungo però crea tutti i metaboliti visti, non solo alcuni. E quindi, ad esempio, le monacoline secondarie (J, L, M ed X) sono sempre presenti nei prodotti, anche se in quantità minori rispetto a K e KA. Il limite di sensibilità analitico in HPLC per questi composti è circa dell'1%. Questo vuol dire che la somma di tutte le monacoline secondarie, forme di-idro comprese, non può essere inferiore al 2% di tutte le monacoline. Normalmente è assolutamente superiore a questo valore, però volendo smascherare le frodi nella maniera più sicura possibile e tenendo in giusta considerazione i limiti analitici del sistema, poniamo la soglia al 2%. Un limite più basso, come ad esempio l'1%, potrebbe risultare troppo vicino al valore di rilevabilità e alla sensibilità analitica e quindi indurre all'errore interpretativo. Questo

vuol dire che se non si rileva almeno il 2% come monacoline secondarie è perché “qualcos’altro”, rilevabile nell’altro 98%, è stato aggiunto. È ovvio. Se dall’esterno viene aggiunta lovastatina di sintesi, crescerà il valore analitico percentuale della quota K + KA, questo perché sto aggiungendo monacolina K, a discapito del valore percentuale di tutte le altre monacoline. Se non ne rilevo, di queste, almeno il 2%, mi trovo di fronte ad una probabilissima frode legata all’aggiunta di lovastatina. Allo stesso modo posso analizzare i rapporti tra K e KA. Come abbiamo già visto il fungo metabolizza l’amido primariamente producendo, all’interno del gruppo delle monacoline, monacolina K. Però produce anche monacolina KA. Mai meno del 30% rispetto alla somma di K + KA. Cioè il fungo, nella peggiore delle ipotesi, ogni dieci monacoline primarie, produrrà sette molecole di monacolina K e tre molecole di monacolina KA. Difficilmente originerà tra le due sostanze rapporti più distanti di questo. A meno che qualcuno dall’esterno non aggiunga lovastatina. In questo caso il rapporto tra i due si allontanerà a favore della monacolina K. In questo secondo caso la chimica analitica parla di sofisticazione possibile. Perché non parliamo di evento estremamente probabile come nel caso delle monacoline secondarie? Lo stoccaggio e il trasporto di materie prime di origine cinese spesso non sono adeguati all’importanza di cosa si stocca e si trasporta. La forma KA della monacolina potrebbe quindi, almeno in parte, degradarsi e dare origine a rapporti più distanti, anche di poco, del 7:3 visto prima. È altamente improbabile ma pur possibile. Certo è che se all’interno dello stesso lotto di materia prima si osservano entrambe le anomalie la frode appare certa. Analizzando chimicamente 32 lotti di materia prima i risultati sono stati sconcertanti. Come mostrato in *Tabella 1* il 50% dei prodotti era oggetto di frode. Quattro di essi dimostravano anomalie nel contenuto in monacoline secondarie. Sette preparati evidenziavano contenuti in monacolina KA troppo bassi per essere veri. Cinque preparati presentavano addirittura entrambe le anomalie. In un caso addirittura (vedi *Tab.1*; campione analitico 8) le analisi dei due rapporti davano sempre come risultato il nulla analitico. In situazioni come queste non ci si trova di fronte a casi emblematici difficili da comprendere, ma solo di fronte a frodi sfrontate. Come dimostra l’analisi HPLC del prodotto (*Fig.7*), nel prodotto non vi è nulla se non lovastatina. Chi lo ha “costruito” ha preso il niente, lo ha colorato di rosso e gli ha aggiunto la lovastatina sintetica. Poi ha venduto il tutto come estratto di riso rosso fermentato. In un precedente paragrafo era stata descritta la possibilità che vari cam-

Tabella 1 - Analisi HPLC effettuata su 32 diversi lotti di estratto di *Monascus* di diversi produttori e distributori. L'estratto di *Monascus* non è adulterato se (a) il rapporto tra la somma di tutte le monacoline secondarie e la somma di monacolina K + KA è > 0.02 e (b) il rapporto tra monacolina KA e la somma di monacolina K+KA è >0.30. Qualora fossero rilevati altri rapporti, il prodotto è quasi certamente adulterato; nel caso in cui differisca soltanto il primo dei due valori, è probabile che il prodotto sia adulterato, mentre è possibile che il prodotto sia adulterato nel caso in cui differisca soltanto il secondo dei due valori. La presenza di valori anomali è indicata mediante asterisco dopo il numero del lotto analizzato

Numero lotto	Monacoline secondarie/ MKA+MK	MKA/ MKA+MK	Contenuto di citrinina (ppm)	Sede del produttore	Sede del distributore
LB3-001**	0.010	0.0251	<2	Cina	Cina
LB3-002	0.024	0.6788	<2	Cina	Cina
LB3-003	0.041	0.7840	<2	Cina	Cina
LB3-004	0.034	0.7968	<2	Cina	Cina
LB4-005*	0.058	0.0033	<2	Cina	Cina
LB3-006	0.058	0.3165	<2	Cina	Cina
LB3-007	0.060	0.0057	<2	Cina	Europa
LB3-008**	0.000	0.0000	<2	Cina	Cina
LB3-009*	0.061	0.0032	<2	Cina	Cina
LB3-010	0.353	0.3524	<2	Cina	Europa
LB3-011	0.032	0.8521	<2	Cina	Europa
LB3-012*	0.023	0.0287	<2	Cina	Europa
LB3-013*	0.071	0.0050	<2	Cina	Europa
LB3-014*	0.012	0.9529	<2	Cina	Cina
LB3-015*	0.179	0.0448	>2	Cina	Europa
LB3-016*	0.014	0.7361	<2	Cina	Europa
LB3-017*	0.039	0.0251	<2	Cina	Cina
LB3-018**	0.002	0.1224	<2	Cina	Cina
LB3-019	0.067	0.4598	<2	Cina	Cina
LB3-020	0.132	0.4917	<2	Cina	Cina
LB3-021**	0.002	0.0571	<2	Cina	Cina
LB3-022	0.342	0.3584	<2	Cina	Cina
LB3-023*	0.012	0.3687	<2	Cina	Cina
LB3-024**	0.006	0.1165	>2	Cina	Cina
LB3-025	0.176	0.3821	<2	Cina	Cina
LB3-026	0.024	0.4532	<2	Cina	Cina
LB3-027	0.024	0.4532	>2	Cina	Cina
LB3-028	0.145	0.5432	<2	Cina	Cina
LB3-029	0.156	0.3567	<2	Cina	Cina
LB3-030*	0.016	0.3224	<2	Cina	Cina
LB3-031	0.121	0.3842	<2	Cina	Cina
LB3-032	0.056	0.4589	>2	Cina	Cina

Da: Nannoni G et al. *Nutrafoods*. 2015;14(4):197-205

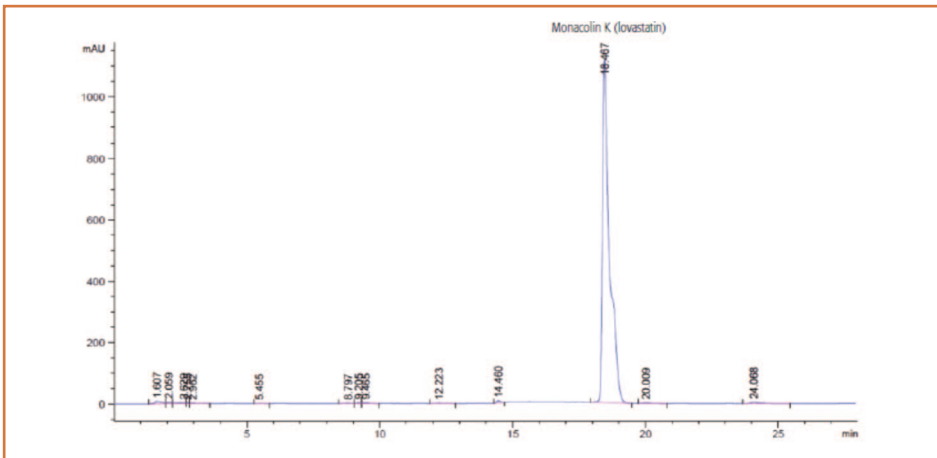


Figura 7 - L'analisi HPLC di un estratto di *Monascus* sicuramente adulterato mostra che l'unico picco visibile corrisponde alla lovastatina (non vi sono altri picchi)

pioni di riso rosso fermentato presentassero *range* analitici molto (troppo) ampi. Si era presentato il caso della forbice analitica relativa alla monacolina KA che variava da 0.00 a 2.30 mg/capsula. I casi in cui la monacolina KA risulta essere assente totalmente sono i casi nei quali il produttore ha usato il nulla e vi ha aggiunto la lovastatina di sintesi come nel caso appena visto. Per avere invece un'idea di come debba apparire un derivato da riso rosso fermentato si osservi la *Figura 8*, nella quale viene mostrata l'analisi HPLC del campione n°4 descritto in *Tabella 1*. Spiegazione fornita.

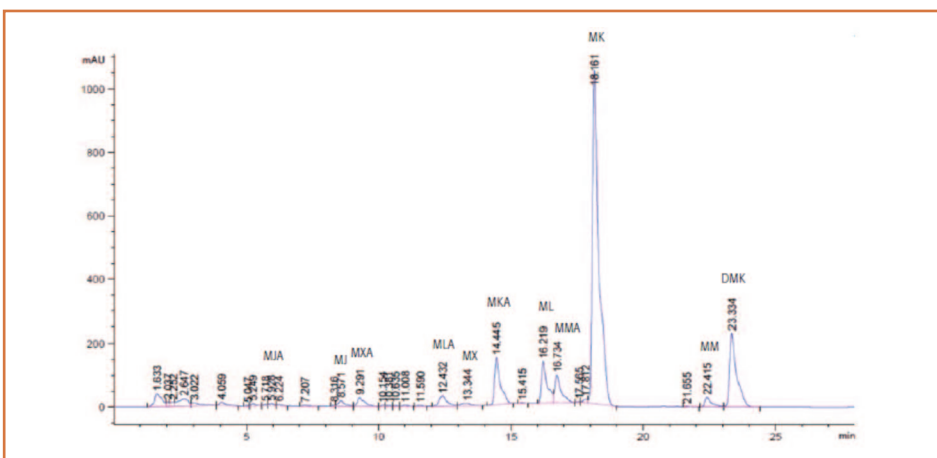


Figura 8 - Estratto di *Monascus* titolato al 1,5% di Monacolina K (l'analisi HPLC mostra che le monocoline K e KA combinate, costituiscono circa il 70% del contenuto totale di monacolina dell'estratto)

Come è stato però ampiamente discusso, grande preoccupazione deriva dalla possibile presenza di citrinina nei derivati da riso rosso fermentato. Gli aspetti regolatori prevedono una sua concentrazione inferiore alle 2 ppm. Quattro dei 32 prodotti dimostravano però presenze maggiori di quanto ammesso (vedi *Tab.1*). Le analisi effettuate dimostravano quindi l'affidabilità, come materia prima di partenza, di 14 prodotti su 32. Un prodotto di questi, il campione 11 della *Tabella 1*, in base ad un profilo chimico considerato ottimale e cioè contenente circa il 70% di monacoline K + KA ma con un livello elevato di monacolina KA sulla somma di K + KA, è stato scelto e processato con soli metodi fisici, quali temperatura, pressione, colonne di separazione, resine adsorbenti e filtri, che lo hanno trasformato in un nuovo prodotto (*Fig.9*) con le seguenti caratteristiche chimiche:

- 1 titolo in monacoline totali: 20%
- 2 monacoline primarie presenti: MK e MKA (1:1)
- 3 Monacoline secondarie e di-idro-monacoline totali: < 2%
- 4 contenuto in citrinina: < 50 *ppb* (parti per miliardo).

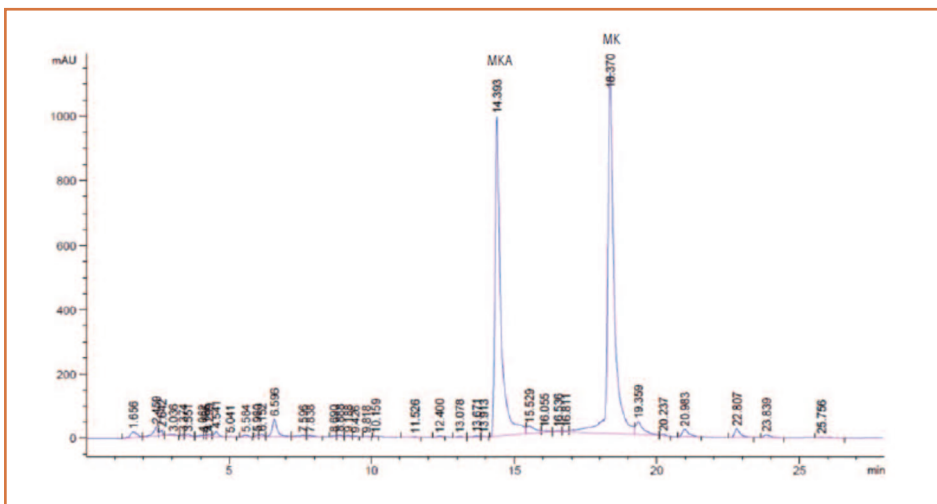
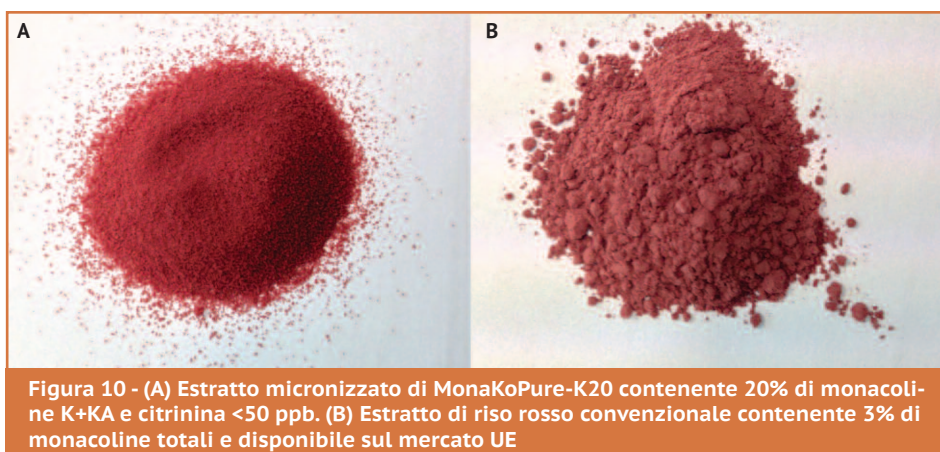


Figura 9 - Estratto secco standardizzato di MonaKoPure-K20 (l'analisi HPLC mostra soltanto le monacoline K e KA)

Il prodotto (MP-K20®), altamente micronizzato (*Fig.10*) per migliorare bagnabilità intestinale e assorbimento orale, costituisce un importante passo in avanti nella ricerca sul riso rosso fermentato⁽³⁹⁾ e, oltre a garantire certamente una maggiore tutela per il consumatore e una migliore definizione



scientifico del prodotto, determina vantaggi clinicamente rilevanti come:

- 1 la possibilità di intervento farmacologico con una statina a basso dosaggio;
- 2 la possibilità d'impiego di una miscelazione preconstituita di una statina lipofila e di una idrofila;
- 3 la possibilità di sinergia con altri ingredienti all'interno dello stesso preparato con buona *compliance* del paziente.

Soprattutto in quest'ultimo caso, ben descritto nel *Capitolo 11* ma comunque spesso citato da molti Autori⁽⁴⁰⁾, ci si potrebbe avvantaggiare della sinergia esistente tra qualunque statina e la berberina. Dati preliminari dimostrerebbero senza ombra di dubbio tale effetto.

La somministrazione giornaliera, su un campione di 23 soggetti ambo sessi, dislipidemici e non altrimenti trattati, di un preparato contenente 500 mg di berberina da *Berberis aristata*, 105 mg di silimarina da *Silybum marianum* e 10 mg di monacoline da MP-K20® (come somma di sole K e KA) produceva dopo soli 30 giorni di trattamento una riduzione della colesterolemia totale ed LDL e della trigliceridemia rispettivamente del 34, del 38 e del 35% con un incremento delle HDL del 7%. Nel gruppo controllo (n=25) i valori di colesterolo totale, LDL e trigliceridi risultavano ridotti del 4% con un incremento delle HDL del 5%.

Questi valori sono di gran lunga superiori a quelli rivendicati con preparazioni a base di solo riso rosso fermentato, con dosaggi in monacoline totali anche sensibilmente maggiori di 10 mg/dose/die, o con preparazioni multi-componente dove oltre al riso rosso fermentato sono presenti berberina e policosanoli⁽⁴¹⁻⁴³⁾.

Conclusioni

Gli estratti di riso rosso fermentato sono ampiamente utilizzati a livello internazionale nel settore nutraceutico, nonostante presentino una serie di rilevanti problematiche come la totale mancanza di standardizzazione, l'errata titolazione e la presenza potenziale di sostanze certamente tossiche. Inoltre sono percepiti come “statine naturali” per via della monacolina K, mentre la presenza di monacoline all'interno dei preparati è assolutamente più complessa di quanto l'utilizzatore o il prescrittore percepiscano. Non meno del 50% dei preparati a base di riso rosso reperibili sul mercato, anche italiano, è oggetto di frode messa in atto attraverso l'aggiunta di lovastatina di sintesi per migliorare la titolazione del prodotto, senza incidere sui costi, e per conferire al medesimo ulteriore efficacia. Sono reperibili, anche sul mercato italiano, preparazioni vendute come estratti di riso rosso fermentato ma contenenti solo coloranti e lovastatina pura. In realtà gli estratti di riso rosso fermentato, risolti i loro numerosi problemi, offrirebbero certamente vantaggi tanto per l'utilizzatore, ad esempio miglior sicurezza, quanto per il clinico. Quest'ultimo avrebbe ad esempio la possibilità di un intervento farmacologico con una statina a basso dosaggio (cosa che altrimenti potrebbe ottenere solo prescrivendo mezza compressa di lovastatina da 20 mg), o la possibilità d'impiego di una miscelazione preconstituita di una statina lipofila e di una idrofila (cosa che altrimenti potrebbe ottenere solo prescrivendo al paziente lovastatina o simvastatina a basso dosaggio associata a pravastatina o fluvastatina sempre a basso dosaggio), o la possibilità di sinergia con altri ingredienti all'interno dello stesso preparato con buona *compliance* del paziente (cosa che altrimenti potrebbe ottenere solo prescrivendo una statina ed un integratore a base di berberina). Recentemente è stato sviluppato un preparato altamente innovativo, denominato MP-K20®, con un titolo in monacoline totali del 20% interamente riferibile alle sole MK e MKA, presenti nell'estratto in maniera equi-ponderale, con assenza di monacoline secondarie e un contenuto in citrinina inferiore alle 50 *ppb*, inferiore cioè di tre ordini di grandezza rispetto a quanto richiesto dalle normative vigenti.

Curiosità

Una delle critiche che spesso, anche giustamente, viene mossa al mondo di quei nutraceutici che effettivamente sono in grado di ridurre in manie-

ra significativa la colesterolemia, ad esempio la berberina, è che in realtà questo non debba necessariamente trasformarsi in una riduzione del rischio cardiovascolare. Le statine si sono dimostrate abbassare la colesterolemia e, proporzionalmente, il rischio di eventi cardiovascolari anche mortali. Questo, per altri composti non è necessariamente valido. Andrebbe prima dimostrato. La messa a punto di un estratto di riso rosso solo contenente monacoline K e KA, essendo queste rispettivamente corrispondenti alla lovastatina pura in forma di lattone e alla lovastatina pura in forma di β -idrossiacido, consente invece di ipotizzare che il calo della colesterolemia ottenuto determini un calo di incidenti cardiovascolari. Sfruttando i dati relativi alla riduzione del rischio cardiovascolare disponibili in letteratura e relativi a forme farmaceutiche ormai abbandonate, contenenti cioè “solo” 10 mg di lovastatina, si deduce che a parità di dosaggio, l'uso di un nutraceutico contenente MP-K20® condurrebbe - per ogni 21% di riduzione delle LDL, o per ogni 1.0 mmol/L come più spesso descritto dagli Autori anglosassoni - ad una riduzione del rischio di incorrere in eventi ischemici fatali e non fatali dell'11% il 1° anno, del 24% il 2° anno, del 33% tra il 3° e il 5° anno e del 36% per il 6° e i successivi⁽⁴⁴⁾.

Un'ultima curiosità. Se paragoniamo la dissoluzione della lovastatina in preparazioni farmaceutiche (*Mevacor* e *Lovasta*) a base di sola lovastatina, con quella di preparazioni nutraceutiche (*LipoCol*, *Cholestin* o *Xuezhikang*) contenenti riso rosso fermentato; se valutiamo cioè “l'uscita” dei rispettivi principi attivi dalla matrice delle rispettive compresse, scopriamo che questa è sempre migliore, avviene quindi più rapidamente ed è più completa, nelle preparazioni nutraceutiche a base di riso rosso fermentato. Questo avviene perché, come dimostra la cristallografia a raggi X e la calorimetria differenziale a scansione, la cristallinità delle monacoline è inferiore a quella della lovastatina. Questa differenza, come verrà anche descritto ad esempio nel capitolo successivo parlando di escina, ha come conseguenza una migliore “liquefazione” del principio attivo nei solventi, come ad esempio nel succo enterico, che può anche trasformarsi in una migliore biodisponibilità orale. La cristallinità di una sostanza ha infatti il suo *alter ego* nella conformazione amorfa. E molto spesso le sostanze amorfe sono più biodisponibili delle controparti “cristallo”. Effettivamente, al di là del risultato relativo al parametro “dissoluzione”, quando è stata paragonata clinicamente la biodisponibilità orale della lovastatina lattonica e della lovastatina acida, dopo

somministrazione della forma farmaceutica, con la biodisponibilità orale della monacolina K e della monacolina KA, dopo somministrazione di nutraceutici a base di riso rosso fermentato, questa è risultata essere migliore nel secondo caso. In particolare AUC e C_{max} erano più elevate e la T_{max} era anticipata e, soprattutto, meno variabile. In definitiva, a parità di dosaggio somministrato, la *performance* cinetica delle monocoline K e KA è migliore di quella delle corrispettive molecole farmaceutiche⁽⁴⁵⁾.

Letteratura

- Rubinstein A, Lurie Y, Groskop I, Weintrob M. Cholesterol-lowering effects of a 10 mg daily dose of lovastatin in patients with initial total cholesterol levels 200 to 240 mg/dl (5.18 to 6.21 mmol/liter). *Am J Cardiol*. 1991;68(11):1123-6.
- Hirama M, Iwashita; Iwashita, Mitsuko. Synthesis of (+)-Mevinolin starting from Naturally occurring building blocks and using an asymmetry inducing reaction. *Tetrahedron Lett*. 1983;24(17):1811-1812.
- Endo A, Kuroda M, Tanzawa K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A, and ML-236-B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *Atheroscl Suppl*. 2004;5:39-42.
- Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*. *J Antibiot (Tokio)*. 1976;29:1346-1348.
- Endo A. Monakolin K. A new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J Antibiot (Tokio)*. 1979;32:852-854.
- Endo A, Tsujiya Y, Kuroda M, Tanzawa K. Inhibition of cholesterol synthesis *in vitro* and *in vivo* by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Eur J Biochem*. 1977;77:31-36.
- Brown AG, Smale TC, King TJ. Crystal molecular structure of compactin, a new antifungal metabolite from *Penicillium brevicompactum*. *J Chem Soc Perkin*. 1976;11:1165-1170.
- Brown MS, Faust J, Goldstein JL. Induction of 3-hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML-236B), a competitive inhibitor of the reductase. *J Biol Chem*. 1978;253:1121-1128.
- Endo A. A historical perspective on the discovery of statins. *Proc Jpn Acad Ser*. 2010;86:484-493.
- Tsujita Y, Kuroda M, Tanzawa K. Hypolipidemic effects in dogs of ML-236B, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Atherosclerosis*. 1979;32:307-313.
- Kuroda M, Tsujita Y. Hypocholesterolemic effects in monkeys of ML-236B, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3 methylglutaryl coenzyme A reductase. *Lipids*. 1979;14:585-589.
- Yamamoto A, Sudo H, Endo A. Therapeutic effects of ML-236B in primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 1980;35:259-266.
- Li C, Zhu Y, Wang Y. *Monascus purpureus*-fermented rice (red yeast rice). A natural food product that lowers blood cholesterol in animal models of hypercholesterolemia. *Nutr Res*. 1998;18:71-81.
- Alberts AW, Chen J, Kuron G. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor hydroxy methylglutaryl-coenzyme A reductase and cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci*. 1980;77:3957-3961.
- Ma J, Li Y, Ye Q. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J Agric Food Chem*. 2010;48:5220-5225.
- Sviridov DD, Endo A, Pavlov MYu, Repin VS, Smirnov VN. Comparison of the effect of six compactin-related compounds on cholesterol synthesis in five human cell types. *Lipids*. 1990;25(11):685-90.
- Endo A, Komagata D, Shimada H. Monacolin M, a new inhibitor of cholesterol biosynthesis. *J Antibiot (Tokyo)*. 1986;39(12):1670-3.
- Endo A, Hasumi K, Nakamura T, Kunishima M, Masuda M. Dihydromonacolin L and monacolin X, new metabolites which inhibit cholesterol biosynthesis. *J Antibiot (Tokyo)*. 1985;38(3):321-7.
- Endo A, Hasumi K, Negishi S. Monacolins J and L, new inhibitors of cholesterol biosynthesis produced by *Monascus ruber*. *J Antibiot (Tokyo)*. 1985;38(3):420-2.
- Zhu L, Yau LF, Lu JG, Zhu GY, Wang JR, Han QB, Hsiao WL, Jiang ZH. Cytotoxic dehydromonacolins from red yeast rice. *J Agric Food Chem*. 2012;60(4):934-9.
- Huang HN, Hua YY, Bao GR, Xie LH. The quantification of monacolin K in some red yeast rice from Fujian province and the comparison of the other product. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2006;54(5):687-9.
- Gordon RY, Cooperman T, Obermeyer W, Becker DJ. Marked variability of monacolin levels in commercial red yeast rice products: buyer beware! *Arch Intern Med*. 2010;170(19):1722-7.
- www.4.ti.ch/fileadmin/DSS/DSP/UFC/PDF/Informazioni/Medicamenti_riflettori/ Altroconsumo_agosto_2013.pdf.

- 24 Gordon RY, Becker DJ. The role of red yeast rice for the physician. *Curr Atheroscler Rep.* 2011;13(1):73-80.
- 25 No authors listed. Rhabdomyolysis linked to Chinese red yeast rice. *Prescrire Int.* 2008;17(94):64.
- 26 Flajs D, Peraica M. Toxicological properties of citrinin. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2009;60(4):457-64.
- 27 Doughari JH. The Occurrence, Properties and Significance of Citrinin Mycotoxin. *J Plant Pathol Microbiol.* 2015;6:321-326.
- 28 European Union Guideline N. 212/2014. Commission held in March 6th, 2014. Official Report (EU): L 67/3IT. L 67/3-4.
- 29 Klimek M, Wang S, Ogunkanmi A. Safety and efficacy of red yeast rice (*Monascus purpureus*) as an alternative therapy for hyperlipidemia. *P T.* 2009;34(6):313-27.
- 30 Kuncel RW. Agents and mechanisms of toxic myopathy. *Curr Opin Neurol.* 2009;22(5):506-15.
- 31 Halbert SC, French B, Gordon RY, Farrar JT, Schmitz K, Morris PB, Thompson PD, Becker DJ. Tolerability of red yeast rice (2,400 mg twice daily) versus pravastatin (20 mg twice daily) in patients with previous statin intolerance. *Am J Cardiol.* 2010;105(2):198-204.
- 32 Prasad GV, Wong T, Meliton G, Bhaloo S. Rhabdomyolysis due to red yeast rice (*Monascus purpureus*) in a renal transplant recipient. *Transplantation.* 2002;74(8):1200-1.
- 33 Pan HY, DeVault AR, Wang-Iverson D, Ivashkiv E, Swanson BN, Sugerman AA. J Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of pravastatin and lovastatin. *Clin Pharmacol.* 1990;30(12):1128-35.
- 34 Singhvi SM, Pan HY, Morrison RA, Willard DA. Disposition of pravastatin sodium, a tissue-selective HMG-CoA reductase inhibitor, in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 1990;29(2):239-43.
- 35 Keskitalo JE, Kaisa J, Neuvonen N. Nonsignificant effect of ABCB1 aplotypes on the pharmacokinetics of fluvastatin, pravastatin, lovastatin, and rosuvastatin. *Brit J Clin Pharmacol.* 2009;68:207-213.
- 36 Liu M, Wang XL, Zhang D, Yang M, Han J, Zhang YN, Wang ZL, Liu HC. Pharmacokinetics of niacin, simvastatin and their metabolites in healthy Chinese subjects after single and multiple doses of a fixed dose combination tablet of niacin extended release/simvastatin. *Drug Res.* 2014;64(6):296-300.
- 37 Davidson MH, Lukacsko P, Sun JX, Phillips G, Walters E, Sterman A, Niecestro R, Friedhoff L. A multiple-dose pharmacodynamic, safety, and pharmacokinetic comparison of extended- and immediate-release formulations of lovastatin. *Clin Ther.* 2002;24(1):112-25
- 38 Olbricht C, Wanner C, Eisenhauer T, Kliem V, Doll R, Boddaert M, O'Grady P, Krekler M, Mangold B, Christians U. Accumulation of lovastatin, but not pravastatin, in the blood of cyclosporine-treated kidney graft patients after multiple doses. *Clin Pharmacol Ther.* 1997;62(3):311-21.
- 39 Nannoni G, Ali A, Di Piero F. Development of a new highly standardized and granulated extract from *Monascus purpureus* with a high content of monacolin K and KA and free of inactive secondary monacolins and citrinin. *Nutrafoods.* 2015;14(4):197-205.
- 40 McCarty MF, O'Keefe JH, DiNicolantonio JJ. Red Yeast Rice Plus Berberine: Practical Strategy for Promoting Vascular and Metabolic Health. *Altern Ther Health Med.* 2015;21 Suppl 2:40-5.
- 41 Heber D, Yip I, Ashley JM. Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast-rice dietary supplement. *Am J Clin Nutr* 1999;69:231-236.
- 42 Lin CC, Li TC, Lai M. Efficacy and safety of *Monascus purpureus* rice in subjects with hyperlipidemia. *Eur J Endocrinol.* 2005;153:679-686.
- 43 Trimarco B, Benvenuti C, Rozza F, Cimmino CS, Giudice R, Crispo S. Clinical evidence of efficacy of red yeast rice and berberine in a large controlled study versus diet. *Med J Nutrition Metab.* 2011;4(2):133-139.
- 44 Law MR, Wald NJ, Rudnicka AR. Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2003;326(7404):1423.
- 45 Chen CH, Yang JC, Uang YS, Lin CJ. Improved dissolution rate and oral bioavailability of lovastatin in red yeast rice products. *Int J Pharm.* 2013;444(1-2):18-24.