

# הוספת מיץ רימונים לסטטינים מעכבת צבירת כולסטרול במקרופאגים: תפקיד הגנתי לפיטוסטרול ביתא-סיטוסטרול ולנוגד החימצון הפוליפנולי פוניקאלאגין

תקציר:

צבירת כולסטרול ושומנים (ליפידים) מחומצנים במקרופאגים, והפיכתם לתאי קצף, מתרחשות בשלבים המוקדמים של התפתחות טרשת העורקים. בעבודה זו נעשה שימוש בשורת תאים מקרופאגים ממקור עכבר מסוג J774A.1 ונבדקו שתי פעילויות ביולוגיות יאטרוגניות: א. יכולת התאים לייצר רדיקלים של חמצן (Reactive Oxygen Species – ROS) ובכך לגרום לעקה חימצונית בתאים; ב. יכולת התאים לייצר כולסטרול ובכך לגרום לצבירת כולסטרול בתאים. הוספת פוניקאלאגין, או ביתא סיטוסטרול, או מיץ רימונים (המכיל את שניהם) לסימוסטטין שיפרה באופן ניכר את יכולת הסטטין לעכב את ייצור הכולסטרול בתאים. כמו כן, הוספת מיץ רימונים (או פוניקאלאגין, אך לא ביתא סיטוסטרול) לסימוסטטין שיפרה את יכולת הסטטין להגן על התאים מפני עקה חימצונית.

מירה רוזנבלט  
נינה וולקובה  
מיכאל אבירם

המעבדה לחקר ליפידים, הפקולטה לרפואה של הטכניון, מכון רפפורט למחקר במדעי הרפואה, הקרייה הרפואית לבריאות האדם רמב"ם, חיפה

לסיכום, מחקר זה מספק הוכחה לכך שמיץ רימונים הוא בעל תכונות נוגדות חימצון והשפעות היפוכולסטרוליות, מספק הגנה מעבר לזו של הסטטין מפני התפתחות מחלות לב. מתן סטטין בשילוב עם מיץ רימונים לחולים עם היפרכולסטרולמיה עשוי לאפשר את הפחתת מיון הסטטין ובעקבות זאת את השפעות הלוואי הנגרמות בגינו.

מילות מפתח:

מקרופאגים; כולסטרול; עקה חימצונית; סימוסטטין; פרי הרימון.  
Macrophages, Cholesterol, Oxidative stress; Simvastatin; Pomegranate fruit

:KEY WORDS

## תוצאות

### א. השפעת השילוב של סימוסטטין ביחד עם פוניקאלאגין, ביתא-סיטוסטרול או מיץ רימונים, על מידת ייצור הכולסטרול בתאי מקרופאגים

בעוד שסימוסטטין לבדו בריכוז של (15 מיקרול/מ"ל) עיכב את קצב ייצור הכולסטרול מאצטט רדיואקטיבי בשיעור של 42% בהשוואה לתאי הבקרה, הרי שבנוכחות פוניקאלאגין (15 או 30 μM) עלה העיכוב ל-57% או ל-62%, בהתאמה (תרשים 1 א). בנוכחות ביתא-סיטוסטרול (50 or 100 μM), ההשפעה המעכבת של סימוסטטין עלתה לשיעור של 51% או 57%, בהתאמה, ובנוכחות השילוב של פוניקאלאגין (15 μM) + ביתא-סיטוסטרול (50 μM) מידת העיכוב ביצירת כולסטרול עלתה ל-67% (תרשים 1 א). באופן דומה, הדגרה של התאים עם סימוסטטין ביחד עם מיץ רימונים (10 או 25 מיקרול' של פוליפנולים) גרמה לירידה בקצב ייצור הכולסטרול על ידי המקרופאגים בשיעור של 59% (תרשים 1 א).

### ב. השפעת השילוב של סימוסטטין ביחד עם פוניקאלאגין, ביטא-סיטוסטרול, או מיץ רימונים על עקה חימצונית בתאי מקרופאגים

בעוד שהדגרת המקרופאגים עם סימוסטטין לבדו (15 מיקרול/מ"ל) עיכבה במעט (בשיעור של 11%) את כמות ה-ROS שנוצרה על ידי התאים בהשוואה לתאי הבקרה, הרי שבנוכחות פוניקאלאגין (15 or 30 μM), ההשפעה המעכבת עלתה משמעותית ל-51% או ל-79%, בהתאמה (תרשים 1 ב). הוספת ביתא-סיטוסטרול (50 or 100 μM) לסימוסטטין לא עיכבה, אלא הגבירה את שיעור ה-ROS שנוצרו בתאים בשיעור של 39% או 50%, בהתאמה. לעומת זאת,

## הקדמה

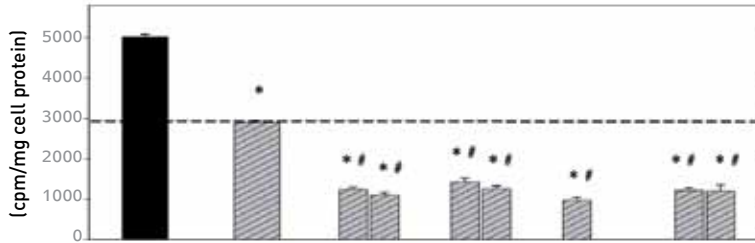
מחלות לב וכלי דם המתבטאות באוטם שריר הלב או באירוע מוח, נגרמות כתוצאה משקיעת כולסטרול וכולסטרול מחומצן בדפנות העורקים המובילים דם אל הלב (העורקים הכליליים) ואל המוח (העורקים התרדמניים). המקרופאגים ממלאים תפקיד חשוב ביותר בשלבים הראשונים של התפתחות טרשת העורקים [1-3]. טיפול בסטטינים בחולים עם היפרכולסטרולמיה מעכב את התפתחות טרשת העורקים בחולים [4], בעיקר באמצעות עיכוב האנזים מגביל הקצב בייצור הכולסטרול, HMGCoA-reductase [5] וכן באמצעות יכולת נוגדת החימצון של הסטטינים (במידה מועטה [6]. אולם הטיפול בסטטינים במינון גבוה ולתקופות ממושכות מלווה בהשפעות לוואי, כמו פגיעה בשרירים ובכבד [7,8].

הפיטוסטרולים (כמו ביתא-סיטוסטרול) הם סטרולים ממקור צמחי [9], אשר לקיחתם ללא תוספים אחרים [10, 11] או בשילוב עם מינון נמוך של סטטינים [12-14] בחולים עם היפרכולסטרולמיה, הפחיתה משמעותית את רמות הכולסטרול בדם ואת הסיכון לפתח מחלות לב וכלי דם. לפוליפנולים תזונתיים כגון הפוניקאלאגין, אשר מצוי בין היתר בפרי הרימון, יש תכונות נוגדות חימצון מרשימות במיוחד [15, 16]. בעבודה קודמת הראינו, כי מיץ רימונים מעכב את קצב ייצור הכולסטרול על ידי מקרופאגים במנגנון השונה מזה של הסטטינים [17]. מאחר שמיץ רימונים מכיל גם ביתא-סיטוסטרול וגם פוניקאלאגין, השילוב של מיץ הרימונים ביחד עם סטטינים עשוי למנוע צבירת כולסטרול וליפידים מחומצנים במקרופאגים, ולכן לעכב את הפיכתם לתאי קצף (השלב הראשוני בהיווצרות נגע הטרשת).

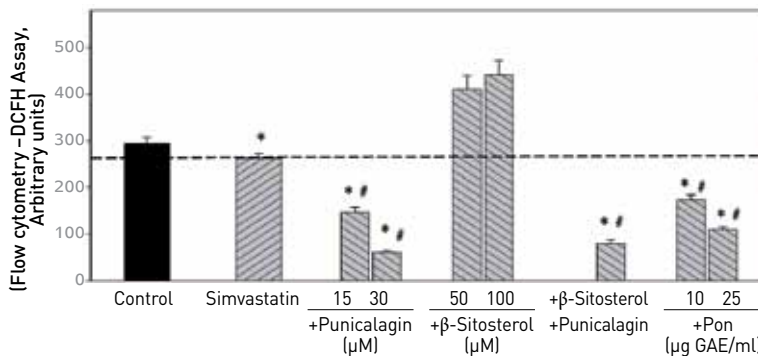
## תרשים 1:

השפעת סימוסטטין לבד או במיילב עם פוניקאלאגין או עם ביתא סיטוסטרול ROS או עם פוניקאלאגין+ביתא סיטוסטרול או מיץ רימונים על ייצור כולסטרול ROS על ידי המקרופגים

A. MACROPHAGE CHOLESTEROL BIOSYNTHESIS RATE



B. MACROPHAGE ROS FORMATION



את השפעות הלוואי, בשילוב עם מיץ רימונים, ובכך להגביר את ההשפעה המעכבת שלהם על ייצור הכולסטרול כמו גם את ההגנה מפני עקה חימצונית.

## מחבר מכותב: מיכאל אבירם

המעבדה לחקר ליפידים, הקריה הרפואית לבריאות האדם רמב"ם, בת גלים 31096

טלפון: 04-8542970

פקס: 04-8542130

דוא"ל: aviram@tx.technion.ac.il

## ביבליוגרפיה

1. Tiwari RL, Singh Y & Barthwal MK, Macrophages: an elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis. Med Res Rev, 2008; 28: 483-544.
2. Lusis AJ, Atherosclerosis. Nature, 2000; 407: 233-241.
3. Aviram M, Macrophage foam cell formation during early atherogenesis is determined by the balance between pro-oxidants and anti-oxidants in arterial cells and blood lipoproteins. Antioxid Redox Signal, 1999; 1: 585-594.
4. Bożentowicz-Wikarek M, Kocelak P, Smertka M & al, Effectiveness of lipid-lowering therapy with statins for secondary prevention of atherosclerosis - guidelines

השילוב של פוניקאלאגין (Mμ15) + ביתא-סיטוסטרול (Mμ50) ביחד עם סימוסטטין גרם לירידה משמעותית בכמות ה-ROS שנוצרו, בשיעור של 73% (תרשים 1 ב). הדגרת מקרופאגים עם סימוסטטין ביחד עם מיץ רימונים (10 או 25 מיקרוג' של פוליפנולים) גרמה לירידה בשיעור של 41% ו 63% ביכולת התאים ליצור ROS, בהתאמה (תרשים 1 ב).

מקרופאגים מסוג J774A.1 הודגרו למשך 20 שעות במצע (Control) או עם סימוסטטין לבדו (15 מיקרוג' / מ"ל), או עם סימוסטטין בשילוב פוניקאלאגין, ביתא-סיטוסטרול, פוניקאלאגין+ביתא-סיטוסטרול, או עם מיץ רימונים (POM), המכיל גם ביתא סיטוסטרול וגם פוניקאלאגין. (1) התאים נשטפו והודגרו למשך שלוש שעות עם התאים, השומנים (הליפידים) מוצו על ידי תערובת של הקסן: איזופרופנול (3:2), v: v רמת הכולסטרול המסומן נקבעה לאחר הרצת השומנים בשיטת כרומטוגרפיה על פלטות של סיליקה ג'ל. (2) רמת הרדיקלים החופשיים של חמצן (ROS) שנוצרה בתאים נקבעה ב-FACS תוך שימוש בחומר DCFH-DA. התוצאות המובאות הן ממוצע ± סטיית תקן של שלושה ניסויים שונים.

## דיון

במחקרנו הנוכחי הדגמנו בפעם הראשונה, כי הוספת מיץ רימונים לסימוסטטין במערכת של מקרופאגים בתרבות, משפרת את יכולת הסטטין לעכב את ייצור הכולסטרול בתאים ולהגן על התאים מפני עקה חימצונית. ניתן לייחס השפעות אלו לנוגד החימצון פוניקאלאגין ולפיוסטרול ביתא-סיטוסטרול, המצויים שניהם במידה ניכרת במיץ הרימונים.

במחקר הנוכחי נעשה שימוש במקרופאגים מסוג J774A.1, מאחר שתאים אלו יוצרים תאי קצף הדומים לאלו שקיימים בחולי טרשת. במחקרנו הראינו, כי סימוסטטין או ביתא סיטוסטרול מעכבים את ייצור הכולסטרול על ידי המקרופאגים כתלות בריכוז, בדומה לנצפה בסוגי תאים אחרים [18, 19]. בעוד שסימוסטטין מעכב את האנזים מגביל הקצב ביצירת כולסטרול ה-HMGCoA-reductase (היוצר חומצה מיוואלונית), העיכוב על ידי ביתא סיטוסטרול או על ידי מיץ רימונים מתרחש בשלבים שלאחר היווצרות המוואלונט [17]. מאחר שהחומרים הללו פועלים במנגנונים שונים, שילוש של סימוסטטין ביחד עם מיץ רימונים מגביר משמעותית את ההשפעה המעכבת של סימוסטטין על ייצור הכולסטרול בתאי מקרופאגים. סטטינים (או המטבוליטים שלהם) הם נוגדי חימצון חלשים, ואכן הראינו בעבר כי טיפול בסטטינים גרם לירידה במידת החימצון של ה-LDL בחולים עם יתר כולסטרול בדם [20]. ה-LDL המחומצן נקלט ביתר על ידי תאי מקרופאגים המצויים בדופן העורק וגורם לצבירת כולסטרול, אוקסיסטרולים ושומנים מחומצנים נוספים בתאים ולהפיכתם לתאי קצף [3]. בעבודה הנוכחית הראינו, כי הוספת מיץ רימונים לסימוסטטין (המעכב במידה מעטה את ייצור ה-ROS במקרופאגים) תרמה לעיכוב ניכר ביותר בעקה החימצונית בתאים, כפי שנצפה גם על ידי המרכיב נוגד החימצון העיקרי שבמיץ הרימונים – הפוניקאלאגין [15, 16].

## לסיכום

הממצאים של מחקרנו הנוכחי בתרבות תאי מקרופאגים (כמודל של יצירת "תאי קצף" והתחלת יצירת נגע הטרשת) יכולים להיות בעלי חשיבות רבה בטיפול בחולים עם היפרכולסטרולמיה, שכן ניתן יהיה לתת לחולים מינון נמוך יותר של סטטינים (למנוע

- vs. reality. *Pharmacol Rep*, 2012; 64: 377-385.
5. *Alberts AW*, Lovastatin and simvastatin--inhibitors of HMG CoA reductase and cholesterol biosynthesis. *Cardiology*, 1990; 77 Suppl 4: 14-21.
6. *Sobal G & Sinzinger H*, Effect of simvastatin on the oxidation of native and modified lipoproteins. *Biochem Pharmacol*, 2005; 70: 1185-1191.
7. *Davignon J*, Pleiotropic effects of pitavastatin. *Br J Clin Pharmacol*, 2012; 73: 518-535.
8. *Goldfine AB*, Statins: is it really time to reassess benefits and risks? *N Engl J Med*, 2012; 366: 1752-1755.
9. *Ostlund RE Jr*, Phytosterols in human nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 2002; 22: 533-549.
10. *Moruisi KG, Oosthuizen W & Opperman AM*, Phytosterols/stanols lower cholesterol concentrations in familial hypercholesterolemic subjects: a systematic review with meta-analysis. *J Am Coll Nutr*, 2006; 25: 41-48.
11. *Ortega RM, Palencia A & López-Sobaler AM*, Improvement of cholesterol levels and reduction of cardiovascular risk via the consumption of phytosterols. *Br J Nutr*, 2006; 96 Suppl 1: S89-S93.
12. *De Jong A, Plat J, Bast A & al*, Effects of plant sterol and stanol ester consumption on lipid metabolism, antioxidant status and markers of oxidative stress, endothelial function and low-grade inflammation in patients on current statin treatment. *Eur J Clin Nutr*, 2008; 62: 263-273.
13. *Scholle JM, Baker WL, Talati R & Coleman CI*, The effect of adding plant sterols or stanols to statin therapy in hypercholesterolemic patients: systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Nutr*, 2009; 28: 517-524.
14. *Thompson GR*, Additive effects of plant sterol and stanol esters to statin therapy. *Am J Cardiol*, 2005; 96: 37D-39D.
15. *Kulkarni AP, Mahal HS, Kapoor S & Aradhya SM*, In vitro studies on the binding, antioxidant, and cytotoxic actions of punicalagin. *J Agric Food Chem*, 2007; 55: 1491-1500.
16. *Seeram NP, Adams LS, Henning SM & al*, In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem*, 2005; 16: 360-367.
17. *Fuhrman B, Volkova N & Aviram M*, Pomegranate juice inhibits oxidized LDL uptake and cholesterol biosynthesis in macrophages. *J Nutr Biochem*, 2005; 16: 570-576.
18. *Field FJ, Born E & Mathur SN*, Effect of micellar beta-sitosterol on cholesterol metabolism in CaCo-2 cells. *Lipid Res*, 1997; 38: 348-360.
19. *Cohen LH, van Vliet A, Roodenburg L & al*, Pravastatin inhibited the cholesterol synthesis in human hepatoma cell line Hep G2 less than simvastatin and lovastatin, which is reflected in the upregulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and squalene synthase. *Biochem Pharmacol*, 1993; 45: 2203-2208.
20. *Hussein O, Shneider J, Rosenblat M & Aviram M*, Further contributions of valsartan to antioxidative effect of fluvastatin therapy against LDL oxidation: studies in hypercholesterolemic and hypertensive patients. *J Cardiovascular Pharmacology*, 2002; 40:28-34.