

A farnezol és a vörös pálmaolaj  
szerepe az iszkémiás/reperfúziós  
károsodás elleni védelemben

(PhD tézis rövid magyar nyelvű  
összefoglalója)

Dr. Szűcs Gergő

Szegedi Tudományegyetem, Általános  
Orvostudományi kar,  
Biokémiai Intézet,

Szeged

2013

## Bevezető

A miokardiális infarktus a vezető megbetegedési- és halálokok közé tartozik a földön. Oka a koronária erek elzáródása, ami különbség kialakulásához vezet a szív tápanyag és oxigén igénye és ellátottsága között. Oki terápiája továbbra is a perfúzió gyors helyreállítása, amit szelektív artériás trombolízissel érünk el. A korai reperfúzió részben vagy egészben megmenti az iszkémiás szívizmot, de további komplikációkat is okoz, mint pl. csökkent kontraktilitás és aritmiák. Az iszkémia és reperfúzió alatt keletkezett károsodást összefoglalóan iszkémiás/reperfúziós károsodásnak hívjuk. Az miokardiális infarktus jelentős egészségügyi, szociális és gazdasági terhet ró a betegre és a környezetére, valamint a társadalomra. Ezért az iszkémiás/reperfúziós károsodás elleni kardioprotektív szerek fejlesztése elsődleges célja a kardiovaszkuláris kutatásoknak.

A hiperkoleszterinémia az iszkémiás szívbetegségek egyik fő rizikófaktora, kialakulásában táplálkozási, életviteli és genetikus faktorok is szerepet játszanak. Jól ismert, hogy a hiperkoleszterinémia fokozza a szívinfarktus valószínűségét az ateroszklerózis által, de közvetlen szív hatásai is vannak, csökkenti a szív kontraktilitását, fokozza az oxidatív és nitrozatív stresszt, a szív sérülékenységét iszkémia/reperfúzió esetén és gátolja az endogén kardioprotektív mechanizmusok működését is (pre- és poszt-kondicionálás). A patkányokban nem alakul ki komoly ateroszklerózis koleszterinnel dúsított táp hatására, így ideális modell a hiperkoleszterinémia közvetlen szív hatásának vizsgálatára. A koleszterin a mevalonát reakcióút fő terméke, aminek a HMG-CoA reduktáz enzim a sebesség meghatározó enzime. HMG-CoA reduktáz enzim egyik endogén regulátora a koleszterin, ami down regulálja a HMG-CoA reduktáz enzim génjét. A legismertebb és legtöbbet használt koleszterin szint csökkentő gyógyszerek, a sztatinok is a HMG-CoA reduktáz enzim kompetitív inhibitorai. Nagy klinikai tanulmányok bizonyították a sztatinok hatékonyságát, azonban az extrahepatikus mellékhatások (miopátia, rabdomiolízis) miatt ésszerű más, mevalonát reakcióútra ható gyógyszerek fejlesztése.

A farnezol egy 15 szénatomos szeszkviterpenoid molekula, ami gyümölcsökben fordul elő és ismert antioxidáns. Korábban kimutattuk, hogy a farnezol visszaállítja a prekondicionálás kardioprotektív hatását koleszterinnel etetett patkányokban. Ismert, hogy emlős sejtek képesek átalakítani farnezil-pirofoszfáttá, ami a mevalonát reakcióút központi molekulája. A mevalonát reakcióútban a farnezil-pirofoszfát számos anyaggá átalakulhat: fehérjék farnezil vagy geranilgeranil csoportjává (összefoglalóan prenil csoportok), koenzim Q-vá, dolikollá, koleszterinné. A preniláció a fehérjék egyik fontos poszttranszlációs módosulása, mely a fehérjék membránba való kihorgonyozásáért

felelős. Sok intracelluláris fehérje prenilálódhat: nagy G fehérjék  $\gamma$  alegysége, kis G fehérjék (Ras, Rho, Rac, Rab), laminin. Számos iszkémiás/reperfúziós károsodásban résztvevő fehérje prenilálódhat de eddig nem ismert, hogy a preniláció szerepet játszik-e az iszkémiás/reperfúziós károsodásban. A koenzim Q a mitokondriális elektron transzport lánc, és így az energiatermelés fontos molekulája. A koenzim Q-t sok országban használják a szívelégtelenség terápiájában adjuváns szerként. A dolikolnak a glikoproteinek oligoszacharid oldalláncának a szintézisében van szerepe. Szerepe nem ismert az iszkémiás/reperfúziós károsodásban.

A vörös pálmaolajat az *Elaeis Guineensis* palma terméséből állítják elő. Ez az olaj nagy mennyiségben tartalmaz telített és telítetlen zsírsavakat, karotinoidekat, tokotrienolokat és más antioxidáns vegyületeket. A vörös pálmaolaj által tartalmazott antioxidánsoknak egymást kiegészítő hatásuk van. Korábban kimutattuk, hogy a vörös pálmaolaj csökkenti az infarktus méretet normál táppal etetett patkányokban. Ismert, hogy a vörös pálmaolaj javítja az iszkémiás szívek funkcióját. A vörös pálmaolaj védő hatását a benne levő antioxidáns anyagoknak és annak tulajdonítják, hogy számos védő hatású szignáltranszdukciós útvonalat aktivál.

A mátrix metalloproteázok a cink-függő endopeptidázok közé tartoznak és az extracelluláris mátrix bontásáról ismertek. Szerepük van az extracelluláris mátrix átépítésében az embrionális fejlődés, angiogenezis, morfogenezis, sebgyógyulás és a szövetek regenerációja során és szerepet játszanak patológiás folyamatokban is, mint a rák, kardiovaszkuláris betegségek, gyulladásos folyamatok és a diabétesz mellitusz. Nemrég kiderült, hogy a mátrix metalloproteázok nem csak extracelluláris de intracelluláris fehérjék degradációjában is szerepet játszhatnak, mint a troponin I. Mátrix metalloproteázok inaktív zimogén formában termelődnek és fiziológiásan az inhibitoros domén limitált proteolízisével aktiválódnak. Azonban patológiás körülmények között az oxidatív vagy nitrozatív ágensek, mint a peroxinitrit megváltoztatják a fehérje térszerkezetét és az inhibitoros domén eltávolítása nélkül egy teljes és aktív mátrix metalloproteáz alakul ki. Az antioxidáns hatású vegyületek megelőzhetik ezt a patológiás aktiválódást és így gátolhatják az mátrix metalloproteázok patológiás folyamatokban betöltött szerepét.

## Célkitűzések

Ezen tanulmány célja volt, 1) hogy vizsgáljuk a szubkrónikus farnezol kezelés kardioprotektív hatását és, 2) hogy a mevalonát reakció út modulálása vagy a farnezol antioxidáns hatása játszik szerepet a farnezol kardioprotektív hatásban. További célunk az volt, 3) hogy a vörös pálmaolaj előkezelés kardioprotektív hatását vizsgáljuk koleszterinnel etetett patkányokban és, 4) hogy vizsgáljuk a vörös pálmaolaj hatását a mátrix metalloproteáz aktivitásra iszkémia előtt és után.

## Módszerek

Az első tanulmány során a szubkrónikus farnezol kezelés hatását vizsgáltuk a szívek iszkémiás toleranciájára és biokémiai paramétereire. Kísérletünkben hím Wistar patkányokat 12 napig per os 0,2, 1, 5, ill. 50 mg/tkg/nap farnezollal ill. annak vivőanyagával (2,5% metilcellulóz) kezeltünk. A 13 napon vizsgáltuk a farnezol kezelés hatását a szívek iszkémiás toleranciájára és a biokémiai paraméterekre. Szíveket izoláltuk, és vagy I) 30 perc regionális iszkémiának és 120 perc reperfúciónak tettük ki az infarktus méret méréséhez, vagy II) 10 perc perfúzió után lefagyasztottuk őket és biokémiai paraméterek mérésére használtuk fel a mintákat. A lefagyasztott szív mintákból a mevalonát reakcióút termékeinek (fehérje preniláció, koleszterin, koenzim Q9 és Q10, dolikol) mennyiségét határoztuk meg. A lefagyasztott mintákból mértük a nitrotirozin szintjét is, ami a peroxinitrit és így az oxidatív/nitrozatív stressz marker vegyülete. Az infarktus méretét trifenil-tetrazolium-kloridos módszerrel és Infarctsize 2.4 software használatával határoztuk meg. A mevalonát reakcióút intermedierjeinek a mennyiségét HPLC-vel és plate-re alkalmazott fotometriás módszerrel határoztuk meg, a nitrotirozin szintet ELISA-val mértük. A farnezol közvetlen kardiomiocitákra kifejtett hatásának a vizsgálatához egynapos neonatális kardiomiocita kultúrákat kezeltünk két napig 0,0032-250  $\mu\text{M}$  farnezollal. A 2 napos kezelés után a kardiomiocita kultúrákat 4 órás szimulált iszkémiának és 2 órás szimulált reperfúciónak tettük ki, és calein-AM festéssel mértük a sejtek viabilitását.

Második tanulmány során a vörös pálmaolaj kezelés hatását vizsgáltuk 2% koleszterinnel dúsított táppal etetett patkányokban. A patkányokat négy csoportba osztottuk és a következő kezelés kapták:

1. csoport: normál patkány táp 9 hétig.
2. csoport: 2% koleszterinnel dúsított patkány táp 9 hétig.
3. csoport: normál patkány táp 200  $\mu\text{l}$ /nap vörös pálmaolajjal kiegészítve 9 hetes kezelés utolsó 5 hetében.

4. csoport: 2% koleszterinnel dúsított patkánytáp 200 µl/nap vörös pálmaolajjal kiegészítve 9 hetes kezelés utolsó 5 hetében.

Az állatok szívét a 9. hét végén izoláltuk és Langendorff szerint perfundáltuk. ezután a szíveket 10 perc perfúziónak 30 perc iszkémiának és 120 perc reperfúziónak tettük ki. A protokoll végén mértük az infarktus méretét. Az infarktus méretét trifenil-tetrazolium-kloridos módszerrel és Infarctsize 2.4 software használatával határoztuk meg. A perfúzió során az iszkémia előtti és utáni 10 percben gyűjtöttük a koronária perfuzátumot és mátrix metalloproteáz 2 aktivitást határoztunk meg belőle zymográfiával. A perfúzió előtt vért vettünk az állatokból és a szérumból és mértük a szérum triglicerid és koleszterin szintet.

## Eredmények

Első tanulmány során vizsgáltuk a farnezol kardioprotektív hatását. Eredményeink szerint 1 mg/tkg/nap farnezol szignifikánsan csökkentette az infarktus méretet, míg a 0,2, 5 és 50 mg/tkg/nap farnezol dózisok hatástalannak bizonyultak. Az infarktus méret eredmények U alakú görbét mutatnak. További munkánk során vizsgáltuk a kardioprotektív (1 mg/tkg/nap) farnezol dózis hatását a mevalonát reakcióút intermedierekre. Eredményeink szerint a farnezol kezelés szignifikánsan fokozta a fehérjék geranylgeranylációját, de nem változtatta szignifikánsan a fehérjék farnezilációját, a szív koleszterin, koenzim Q9, Q10 és dolikol tartalmát. Munkánk során vizsgáltuk a farnezol antioxidáns hatását, ezért a szívben mértük a nitrotirozin mennyiségét, ami a peroxinitrit marker vegyülete. Kardioprotektív farnezol dózis (1 mg/tkg/nap) nem csökkentette a szív nitrotirozin szintjét, azonban a legnagyobb farnezol dózis (50 mg/tkg/nap) szignifikánsan csökkentette azt. Munkánk során vizsgáltuk a farnezol kardiocitoprotektív hatását is. A farnezol kardiomiocitákat védő hatása harang alakú görbét mutatott, amiben a 0,016, 0,08 és 0,4 µM dózisok voltak védő hatásúak, és ezek az eredmények megerősítették az ex-vivo szívperfúzió során kapott eredményeket. A 250 µM farnezol dózis drámaian csökkentette a sejtek viabilitását.

Második tanulmány során a 9 hétig 2% koleszterinnel dúsított diéta önmagában fokozta az infarktus méretet. A vörös pálmaolaj kezelés szignifikánsan csökkentette az infarktus méreteket a normál, illetve a 2% koleszterinnel dúsított táppal etetett csoportban a megfelelő kontrol csoportokhoz képest. A vörös pálmaolaj szignifikánsan csökkentette a 75 kDa-os mátrix metalloproteáz 2 izoforma aktivitását az iszkémia előtt a 2% koleszterinnel dúsított táppal etetett patkányokban. A vörös pálmaolaj csökkentette a 72 kDa-os mátrix metalloproteáz 2 izoforma aktivitását iszkémia után a normál patkányokban. A szérum triglicerid és koleszterin szintek nem változtak a kísérlet alatt. A vörös pálmaolajjal kezelt normál patkányok test- és szívsúlya szignifikánsan kisebb volt a

többi csoporthoz képest. A koronária átáramlás szignifikánsan csökkent iszkémia után az iszkémia előtti értékhez képest kivéve a vörös pálmaolajjal kezelt normál patkányokban.

## **Összefoglalás**

1) Munkánk során először demonstráltuk, hogy a szubkrónikus farnezol előkezelés csökkentette az iszkémiás/reperfúziós károsodást. Azt is kimutattuk, hogy a farnezol hatása direkt védő hatás fejt ki a kardiomiocitákra.

2) Továbbá kimutattuk, hogy a farnezol védő hatásában a fokozott fehérje geranilgeraniláció játszik szerepet, viszont a farnezol antioxidáns hatása nem.

3) A második tanulmány során kimutattuk, hogy a vörös pálmaolaj előkezelés kardioprotektív hatású 2% koleszterinnel dúsított táppal etetett patkányokban.

4) Továbbá a vörös pálmaolaj védő hatásában szerepe lehet a miokardiális mátrix metalloproteáz 2 gátlásának.

A miokardiális infarktus a vezető megbetegedési és halálokok közé tartozik a földön. A vérkeringés gyors helyreállítása csökkenti az akut miokardiális infarktus halálozását, de az még így is nagyon magas. Ezért a miokardiális infarktus megelőzése elsődleges fontosságú. Ebben a tanulmányban két előkezelést mutattam be, ami képes csökkenteni az iszkémiás/reperfúziós károsodást miokardiális infarktus esetén. Mivel mindkét anyag természetes és élelmiszerekben megtalálható, ez javíthatja a betegek együttműködését a prevenció alatt. A farnezol és a vörös pálmaolaj hatásmechanizmusának a vizsgálatához azonban további vizsgálatok kellenek. Ezek a vizsgálatok további, hatékonyabb infarktus megelőző módszerek kifejlesztéséhez vezethetnek.