

جداسازی لیوپروتئین با وزن مخصوص پایین (LDL) همراه با تغییر آن توسط یونهای مس و مالون دی آلدئید

دکتر رضا محمدی

دکتر محمود دوستی، عضو هیأت علمی گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

Isolation of Low Density Lipoprotein (LDL) with its Modification by Copper Ion and Malondialdehyde (MDA)

ABSTRACT

Oxidation of low density lipoproteins (LDLs) is believed to be an important step in the pathogenesis of atherosclerosis. During oxidation, LDL particle undergoes a large number of structural changes that alters its biological properties, so it becomes atherogenic.

To study atherogenic proteins, usually two forms of modified LDLs, including Cu^{2+} - oxidized LDL (ox-LDL) and malondialdehyde (MDA) modified LDL (mal-LDL) are used. In this study, LDL was isolated from 72 ml freshly prepared plasma by Sequential Floatation Ultracentrifugation (SFU), which resulted in separation of 12.5 mg LDL protein. LDL oxidation was accomplished in Phosphate Buffered Saline (PBS) with $2\mu M$ cupric sulfate, and mal-LDL was prepared by incubating LDL in PBS with 0.5 M solution of freshly prepared MDA. These modifications were evaluated by measuring optical density at 234 nm, Thiobarbitonic Acid Reactive Substances (TBARS), and electrophoretic mobility at pH 8.6.

The increase of 234nm absorption reflected initiation of LDL oxidation. TBARS of ox-LDL and mal-LDL was 80 nM MDA/mg LDL Protein and 400 nM MDA/mg LDL Protein, respectively. Electrophoretic mobility of ox-LDL and mal-LDL, in respect to native LDL (n-LDL), were increased.

Key Words: LDL; Modified LDL; Atherosclerosis; Cu ion; Malondialdehyde

چکیده

اکسیداسیون لیوپروتئین‌های با وزن مخصوص پایین (LDLs) مرحله مهمی در پاتوژنز آترواسکلروز می‌باشد. طی اکسیداسیون، ذره LDL دچار تغییرات ساختمانی (لیپیدی و پروتئینی) زیادی می‌شود که خصوصیات بیولوژیک آنرا تغییر می‌دهد، طوری که آتروژنیک می‌گردد.

برای مطالعه خصوصیات آتروژنیک، معمولاً دو شکل LDL تغییر یافته، شامل LDL اکسید شده با Cu^{2+} (ox-LDL) و Cu و LDL تغییر یافته با مالون دی آلدئید (mal-LDL) بکار می‌رود. در این مطالعه، LDL از 72 ml پلاسمای تازه تهیه شده با روش اولتراسانتریفوژ شناوری متوالی جدا شد که همراه با تخلیص

۱۲/۵ mg LDL Protein بود. اکسیداسیون LDL در بافر فسفات سالین (PBS) با محلول $2\mu M$ سولفات مس انجام گرفت و mal-LDL با انکوباسیون LDL در PBS، همراه با محلول 0/5 M تازه تهیه شده مالون دی آلدئید تهیه گردید. ارزیابی این تغییرات بوسیله اندازه‌گیری جذب نوری در 234 nm، مواد واکنش‌کننده با اسید تیوباربتوریک (TBARS)، و حرکت الکتروفوریتیک در 8/6 pH به انجام رسید. افزایش جذب نوری در 234 nm نشانه شروع اکسیداسیون بود. TBARS نمونه‌های ox-LDL و mal-LDL به ترتیب معادل 80 nM MDA/mg LDL protein و 400 nM MDA/mg LDL protein بدست آمد. حرکت الکتروفوریتیک ox-LDL

mal-LDL، در مقایسه با LDL طبیعی (n-LDL)، افزایش نشان داد.

متصل می‌گردند (۸،۴،۱).

واژه‌های کلیدی: LDL؛ LDL تغییر یافته؛

آترواسکلروز؛ Cu^{2+} ؛ مالون دی‌آلدئید

مقدمه

اخیراً توجه زیادی به ارتباط بین فرایندهای اکسیداتیو و ایجاد تنگی عروق شریانی شده است (۱-۵). تغییرات اکسیداتیو لیپوپروتئین‌های با وزن مخصوص پایین یا Low Density Lipoproteins (LDLs) منجر به ایجاد خصوصیات فیزیکوشیمیایی و فرآورده‌های بیولوژیکی جدید می‌شود که آنرا آتروژنیک‌تر می‌نماید (۲). فرایند اکسیداسیون LDL شامل سه مرحله شروع، ازدیاد، و تخریب می‌باشد (۴). اکسیداسیون در فسفولیپیدهای سطحی ذره LDL شروع می‌گردد. مکانیسم دقیق شروع اکسیداسیون LDL در داخل بدن کاملاً شناخته شده نمی‌باشد (۲،۱)، هرچند برای شروع آن، سلول می‌بایست پتانسیل اکسیدکنندگی را ایجاد نماید. یک احتمال، ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن نظیر آنیون سوپراکسید (O_2) توسط سیتوکروم P459، طی زنجیره تنفس سلولی در میتوکندری، یا توسط یون‌های فلزی نظیر مس و آهن می‌باشد (۴،۳،۲،۱). احتمال دیگر، اکسیداسیون مستقیم توسط آنزیم لیپواکسیژناز است. اکسیداسیون ممکن است در لیپیدهای موجود در LDL صورت گرفته و یا ابتدا لیپیدهای سلولی اکسیده و سپس پراکسیدهای لیپیدی حاصل به LDL موجود در محیط منتقل می‌شود (۳،۲).

بعد از ایجاد پراکسیدهای لیپیدی در داخل فسفولیپیدهای ذره LDL، در اثر فعالیت فسفولیپاز A2 موجود در آپوپروتئین B100 (apo B100) ذره LDL، لیسیتین موجود در لیپید تشکیل‌دهنده LDL، با آزاد شدن اسید چرب اکسید شده از کربن موقعیت ۲ گلیسرول و تبدیل آن به لیزولیسیتین، تجزیه می‌گردد (۷،۶،۴). با این عمل، پراکسیدهای لیپیدی آزاد شده و با انتشار راحت‌تر در محیط لیپیدی در ذره LDL داخل می‌گردد. بعد از مرحله ازدیاد، تخریب وسیع اجزاء تشکیل‌دهنده ذره LDL صورت می‌گیرد که شامل قطعه قطعه شدن پراکسیدهای لیپیدی حاصل به قطعات آلدئیدی نظیر Malondialdehyde و 4-hydroxynonenal (4-HNE) می‌باشد که شدیداً واکنشگر (reactive) و فعال بوده و به عامل E - آمینو ریشه‌های جانبی لیزین موجود در apo B100

علاوه بر تغییرات فوق، کلسترول موجود در LDL اکسید شده و تولید استروئول‌های اکسیده می‌نماید (۹،۴). همچنین apo B100 تجزیه شده و پپتیدهای کوچکتر حاصل می‌شود (۱۰،۲). ماحصل فرایندهای فوق ایجاد یک ملکول LDL تغییر یافته به طریق اکسیداتیو بنام Oxidatively modified LDL (ox-LDL) می‌باشد که دارای خصوصیات جدید می‌باشد. این خصوصیات را می‌توان به سه گروه تقسیم نمود. تغییرات شیمیایی شامل از دست رفتن آنتی‌اکسیدانها (آلفا - توکوفرول و بتا - کاروتن) (۴)، کاهش اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه (۱۱،۸،۴). افزایش لیزولیسیتین (۵،۲)، افزایش کلسترول اکسید شده (۱۱،۲)، قطعه قطعه شدن apo B100 و کاهش محتوی هیستیدین، لیزین، و پرولین (۲)، و افزایش مواد واکنش‌کننده با اسید تیوباریتوریک یا thiobarbitoric acid و reactive substances (TBARS) بوده که همراه با تغییرات فیزیکی در ذره LDL بصورت افزایش بار منفی (۱۵،۱۱،۲) و افزایش وزن مخصوص (۱۱) (از ۱/۰۶ به ۱/۰۸ mg/ml) (۲) می‌باشد. مجموع این تغییرات منجر به ایجاد خصوصیات جدید بیولوژیکی می‌گردد که ox-LDL را آتروژنیک می‌نماید. این خصوصیات عبارتند از:

عدم شناسایی توسط گیرنده اختصاصی LDL (۱۱،۲) (LDL receptor)، شناسایی توسط گیرنده غیراختصاصی (۱۲،۳،۲) (Scavenger receptor)، فعالیت کموتاکتیک برای منوسیتها (۲)، مهار حرکت ماکروفاژها (۳)، سیتوتوکسیسیتی (۲،۱)، ایمونوژنیسیتی (۴)، تغییر بیان بعضی ژنها (۴)، تسریع انقباض عروقی (۳،۱)، و تسریع تجمع پلاکتی (۴).

اکسیداسیون LDL را می‌توان در خارج بدن توسط سلول‌های کشت شده و در حضور غلظت‌های نانومولار Cu^{2+} و یا حتی در محیط فاقد سلول و تنها در حضور غلظت‌های میکرومولار Cu^{2+} در بافر Phosphate buffered saline (PBS) انجام داد (۱،۴). طی فرایند اکسیداسیون یکی از تغییرات اساسی ایجاد شده در LDL، مشتق‌سازی عوامل E - آمینو ریشه‌های جانبی لیزین apo B100 می‌باشد که مهمترین خصوصیت آتروژنیک ox-LDL یعنی افزایش برداشت توسط ماکروفاژها همراه با تشکیل سلول کفی شکل را سبب می‌شود (۱۵). همچنین این تغییر منجر به ایجاد شاخص‌های جدید آنتی‌ژنیک و بدن‌بال آن تولید اتوآنتی‌بادی ضد آن می‌گردد (۱۶). از اینرو برای بررسی اختصاصی‌تر خصوصیات حاصل از این تغییر، می‌توان در آزمایشگاه و بدون انجام فرایند

ب) جداسازی

برای جداسازی LDL از نمونه پلاسما تازه تهیه شده، روش اولتراسانتریفوژ شناوری مرحله‌ای و متوالی یا Sequential Floatation Ultracentrifugation (SFU) مورد استفاده قرار گرفت (۲۲،۲۱). با توجه به وزن مخصوص LDL و برای جلوگیری از آلودگی نمونه با IDL و Lipoprotein a [LP(a)] جداسازی در دامنه وزن مخصوص ۱/۰۵۵-۱/۰۲۰ انجام گرفت (۲۴). در اولین مرحله جداسازی، ابتدا وزن مخصوص پلاسما توسط محلول غلیظ ۳۸٪ وزنی برمید سدیم با وزن مخصوص ۱/۳۸۶ g/ml (حاصل از انحلال ۵۲۶/۷ g برمید سدیم و ۱۰۰ ml EDTA در یک لیتر آب مقطر) از ۱/۰۰۶ تا ۱/۰۲۰ g/ml افزایش داده شد. سپس پلاسما در لوله‌های پلی‌آلومری از نوع quick-seal تقسیم و در اولتراسانتریفوژ Beckman با استفاده از روتور زاویه ثابت 90 Ti در ۹۹۳۰۰ rpm (۹۹۳۰۰ g)، برای مدت ۱۸ ساعت در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. بعد از اولین مرحله اولتراسانتریفوژ، VLDL و IDL به علت داشتن وزن مخصوص کمتر از ۱/۰۲۰ g/ml، بصورت یک لایه نسبتاً شیری و کدر در سطح شناور شد که با دقت و احتیاط کامل با استفاده از پی‌پت پاسستور کاملاً جدا گردید. در مرحله دوم جداسازی، مجدداً وزن مخصوص پلاسما با استفاده از محلول غلیظ ۳۸٪ وزنی برمید سدیم از ۱/۰۲۰ به ۱/۰۵۵ g/ml بصورت یک لایه زرد شفاف شناور در سطح ظاهر شد که با دقت و احتیاط کامل و با استفاده از پی‌پت پاسستور استخراج گردید.

پ) تعیین مقدار LDL جدا شده

هنگام اکسیداسیون LDL با Cu^{2+} و یا طی مشتق‌سازی آن با MAD، برای ایجاد شرایط مناسب می‌بایست مقدار مشخصی از LDL مورد استفاده قرار گیرد. از اینرو تعیین مقدار LDL در نمونه جدا شده و تنظیم غلظت آن برای مراحل بعدی امری ضروری است. بخاطر تنوع ترکیب و اندازه LDL، بنظر می‌رسد بهترین معیار مقدار LDL، اندازه‌گیری apo B100 می‌باشد، زیرا در هر ذره LDL یک مول از این پروتئین وجود دارد (۲۵). جهت اندازه‌گیری پروتئین LDL نیاز به یک روش با حساسیت بالا می‌باشد. روش پیشنهادی روش لوری (Lowry) می‌باشد، که دامنه حساسیت آن ۱-۳۰۰ $\mu\text{g/ml}$ است (۲۰). این روش ترکیبی از دو واکنش بیوره و فولین - سیوکالتو می‌باشد که در آن ابتدا یون مس با پیوندهای پپتیدی ایجاد کمپلکس رنگی نموده و در مرحله بعد با اضافه نمودن

اکسیداسیون، عمل مشتق‌سازی را با MDA انجام داد و بدین ترتیب تولید نوع تغییر یافته دیگری از LDL بنام malonaldehyde modified LDL (mal-LDL) نمود.

روش و مواد

الف) نمونه

به علت محتوی آنتی‌اکسیدانی یا ماهیت اسیدهای چرب غیراشباع موجود در ذره LDL، حساسیت افراد مختلف ممکن است متفاوت باشد، از اینرو عمل جداسازی LDL بر روی مخلوطی از نمونه‌های پلاسما گرفته شده از داوطلبین (pooled plasma) صورت گرفت (۱۳، ۱۷). همچنین به علت وجود احتمال اکسیداسیون، تخریب پروتئولیتیک و آلودگی باکتریال LDL پلاسمایی طی مرحله جداسازی و بعد از آن، مخلوطی از عوامل آنتی‌اکسیدان، آنتی‌پروتئولیتیک و آنتی‌باکتریال به نمونه پلاسما تهیه شده اضافه گردید (۱۸). عوامل محافظ مورد استفاده شامل Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) با غلظت نهایی ۱/۲ g/l بعنوان ضدانعقاد، ضداکسیداسیون (۱۹) و ضد پروتولیز (۲۰)، Phenyl Methyl Sulfonyl Floride (PMSF) با غلظت نهایی ۱ mM (محلول در متانل خالص) بعنوان پروتولیز، Butylated Hydroxy Toluene (BHT) با غلظت نهایی ۱۰ mM (محلول در اتانل خالص) بعنوان آنتی‌اکسیدان، و سه عامل آنتی‌باکتریال سدیم ازید با غلظت نهایی ۰/۱ g/l، جنتامایسین با غلظت نهایی ۸۰ mg/l و کلرامفنیکل با غلظت نهایی ۸۰ mg/l بود (۱۸).

در عمل ابتدا مخلوطی از عوامل فوق به غیر از PMSF به نحوی به یک ارلن مایر اضافه شده که بعد از اضافه نمودن ۲۰۰ ml خون تام، غلظت هر یک از عوامل فوق به میزان ذکر شده رسید. نمونه خون از ۱۰ نفر داوطلب مرد سالم جوان با میانگین سنی $1/8 \pm 21/3$ سال بعد از ناشتای شبانه، گرفته شد. بعد از مخلوط نمودن خون تام با عوامل محافظ، بلافاصله نمونه خون به لوله‌های سانتریفوژ منتقل و در ۳۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس پلاسما از گلبولهای خونی جدا و PMSF تازه تهیه شده طوری به آن اضافه گردید که غلظت نهایی ذکر شده بدست آمد (۱۸). حجم پلاسما جدا شده معادل ۷۸ ml بود که ۷۲ ml آن برای جداسازی LDL تحت اولتراسانتریفوژ قرار گرفت.

معرف فولین، شدت رنگ تشدید می‌گردد. جذب نوری (OD) در طول موج ۷۵۰ nm اندازه‌گیری شد و محلول سرم آلبومین گاوی (Bovine Serum Albumin, BSA) با غلظت ۳۰۰ μg/ml برای رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت (۲۰).

ت) تهیه ox-LDL

اکسیداسیون LDL در حضور یون Cu^{2+} بعنوان یک اکسیدکننده نسبتاً قوی، صورت گرفت. برای این عمل ابتدا می‌بایست عوامل آنتی‌اکسیدان شامل EDTA و BHT از نمونه LDL استخراج شده جدا گردد. جداسازی با روش دیالیز در مقابل PBS با غلظت فسفات ۱۰ mM، pH ۷/۲ و حاوی عوامل ضدباکتریال با غلظتهای ذکر شده صورت گرفت (۲۶). بعد از دیالیز، غلظت پروتئینی LDL دیالیز شده با روش لوری اندازه‌گیری شد و غلظت آن بر اساس میزان پروتئین در ۵۰ μg/ml تنظیم گردید (۱۷). عمل اکسیداسیون LDL با استفاده از محلول ۲ μm سولفات مس در ۳۷ درجه سانتیگراد برای مدت ۱۸ ساعت صورت گرفت. بعد از این مدت، برای توقف اکسیداسیون، EDTA با غلظت نهایی ۱/۲ g/l به نمونه LDL اکسید شده اضافه گردید (۲۷، ۲۸، ۲۹).

ث) تهیه mal-LDL:

برای تغییر و مشتق‌سازی ریشه‌های جانبی لیزین در apo B100 موجود در LDL با MDA، نیاز به محلول ۰/۵ M تازه تهیه شده MDA می‌باشد. MAD تازه از هیدرولیز اسیدی محلول مالون دی‌آلدئید بیس دی‌متیل استال حاصل می‌گردد. در عمل ۸/۸ ml محلول مالون دی‌آلدئید بیس دی‌متیل استال با ۱/۲ ml اسید کلریدریک ۴ N و ۴۰ ml آب مقطر مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس pH محلول با استفاده از سود ۱ N تا ۷/۴ افزایش داده شد و نهایتاً توسط آب مقطر حجم محلول به ۱۰۰ ml رسانده شد (۳۰). برای تهیه mal-LDL، محلول LDL با محلول تازه تهیه شده MDA، با نسبت ثابت ۱۰۰ μl محلول MDA به ازاء هر میلی‌گرم LDL، مخلوط و به مدت ۳ ساعت در ۲۱ درجه سانتیگراد قرار داده شد (۲۷، ۲۸، ۳۰). بعد از مشتق‌سازی LDL با MDA، مقادیر اضافی و آزاد MDA با روش دیالیز در مقابل PBS با غلظت فسفات ۱۰ mM، pH ۷/۲ و حاوی عوامل آنتی‌اکسیدان و آنتی‌باکتریال با غلظتهای ذکر شده، برداشت گردید (۳۰).

ج) ارزیابی LDL جدا شده و LDLهای تغییر یافته همانطور که در مقدمه اشاره شد، بدنال اکسیداسیون LDL، تغییرات فیزیکی و شیمیایی در آن صورت می‌گیرد که می‌توان از آنها جهت ارزیابی کیفیت اکسیداسیون و تغییرات LDL استفاده نمود. در این مطالعه سه روش متداول مورد بررسی قرار گرفت (۲۹):

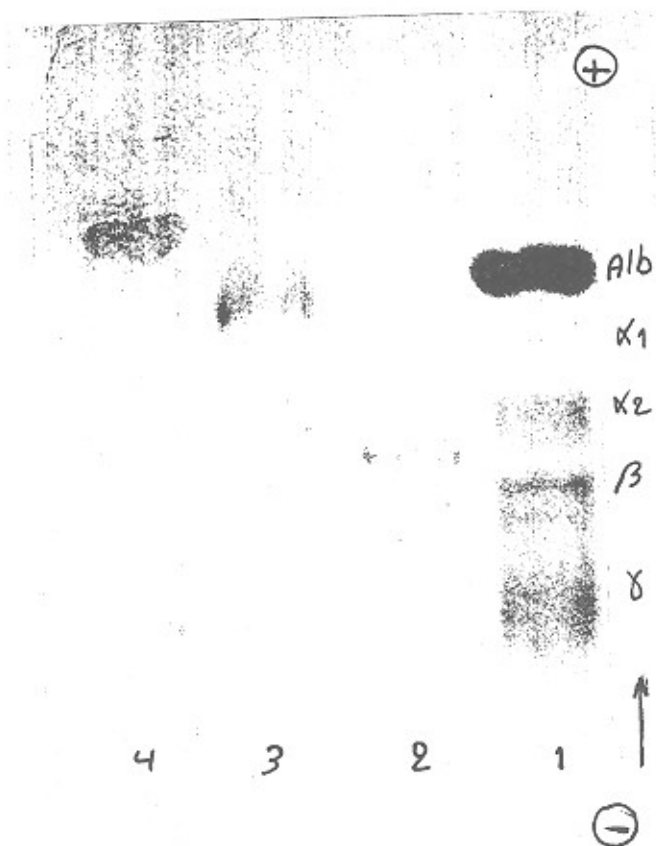
۱) افزایش جذب نوری در طول موج ۲۳۴ nm: شروع پراکسیداسیون لیپیدی در اسیدهای چرب غیراشباع حاوی چند پیوند دوگانه در LDL، همراه با تغییر آرایش پیوندهای دوگانه و به هم نزدیک شدن این پیوندها (تشکیل Conjugated diene) می‌باشد. این تغییر همراه با افزایش جذب نوری در طول موج ۲۳۴ nm است که بعنوان معیاری از شروع اکسیداسیون LDL مورد استفاده قرار گرفت (۲۵، ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۱).

۲) واکنش تیوباریتوریک اسید (TBA): با ادامه یافتن پراکسیداسیون لیپیدی در اسیدهای چرب غیراشباع موجود در LDL و با قطعه قطعه شدن پراکسیدهای لیپیدی حاصل، ایجاد قطعات آلدئیدی نظیر MDA می‌گردد که از جستجوی آنها می‌توان بعنوان معیاری از پراکسیداسیون لیپیدی استفاده نمود. روش مورد استفاده برای جستجوی این قطعات، واکنش TBA می‌باشد که در آن یک ملکول MDA با دو ملکول TBA در pH ۲-۳ و آب جوش واکنش نموده و تولید کمپلکس صورتی با حداکثر جذب نوری (OD) در طول موج ۵۳۵ nm می‌نماید. از MDA تازه تهیه شده با غلظتهای ۱۰-۱ μM برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد (۵).

۳) الکتروفورز: برای تعیین خلوص پروتئینی LDL جدا شده و نیز برای تعیین کیفیت LDL تغییر یافته به روش اکسیداتیو با Cu^{2+} ، یا به روش تغییر و مشتق‌سازی با MDA، از جداسازی الکتروفورتیک اجزاء نمونه تهیه شده بر اساس بار الکتریکی استفاده گردید. همانطور که در مقدمه اشاره شد، بدنال اتصال MDA حاصل از تجزیه پراکسیدهای لیپیدی به عوامل E- آمینو ریشه‌های جانبی لیزین apo B100 موجود در LDL، بار مثبت گروه E- آمینولیزین از بین رفته که همراه با افزایش بار منفی ذره LDL (۴)، حرکت سریعتر در میدان الکتروفورتیک خواهد بود (۱۲، ۱۵، ۳۱). الکتروفورز بر روی پلیت استات سلولز، با استفاده از بافر باریتال با pH ۸/۶، در ولتاژ ۱۸۰ V برای مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت.

یافته‌ها

اکسید شده نسبت به LDL طبیعی افزایش یافته و بین باندهای آلفا یک گلبولین و آلبومین قرار گرفت که دلیلی بر افزایش بار منفی ox-LDL طی اکسیداسیون می‌باشد.



شکل ۱- الکتروفورز پروتئین بر روی استات سلولز pH ۸/۶

خط اول از سمت راست نمونه سرم طبیعی با پنج باند مشخص به ترتیب از بالا به پایین (از بیشترین تا کمترین حرکت بطرف قطب مثبت) شامل آلبومین، آلفا یک گلبولین، آلفا دو گلبولین، بتا گلبولین و گاما گلبولین. خط دوم نمونه LDL استخراج شده با حرکت در ناحیه بین بتا گلبولین و آلفا دو گلبولین خط سوم ox-LDL تهیه شده با حرکت در ناحیه بین آلفا یک گلبولین و آلبومین. خط چهارم mal-LDL تهیه شده با حرکت در ناحیه بعد از آلبومین

پ) mal-LDL تهیه شده

mal-LDL شکلی از LDL می‌باشد که در آن ریشه‌های جانبی لیزین apo B100 توسط MDA مازاد اضافه شده و بدون انجام اکسیداسیون در ذره LDL در محیط آزمایشگاه مشتق‌سازی می‌گردد. در عمل مقادیر مازاد MDA تازه تهیه شده (جهت به حداکثر رساندن مشتق‌سازی ریشه‌های جانبی لیزین) به نمونه LDL در حضور عوامل اکسیداسیون (برای مهار اکسیداسیون LDL) اضافه شد. تحت این شرایط حدود ۷۰٪ ریشه‌های جانبی لیزین با MDA مشتق‌سازی می‌گردد. بعد از برداشت MDA اضافی از مخلوط

الف) LDL استخراج شده

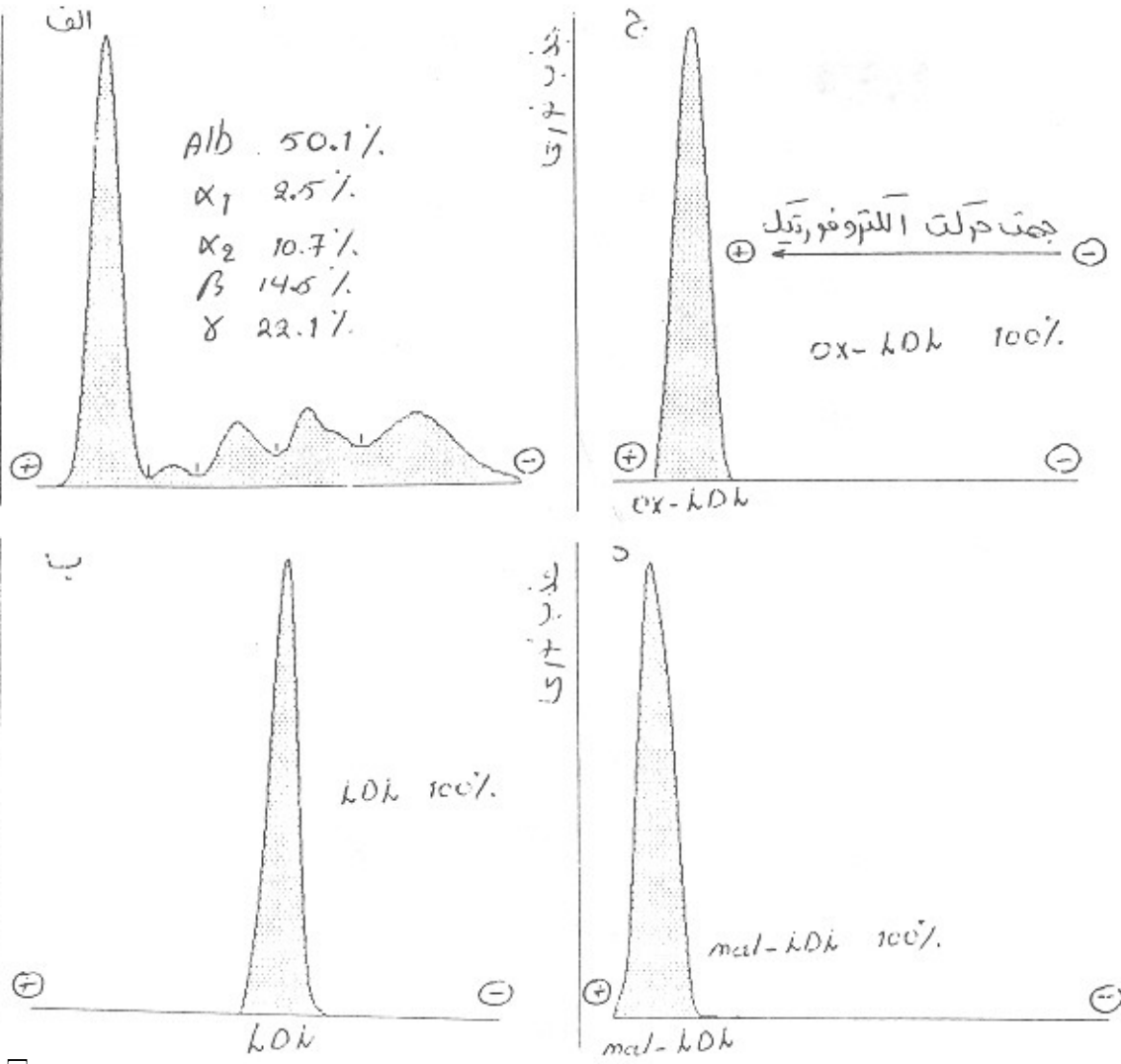
برای جداسازی LDL، ۷۲ ml پلاسما تازه تهیه شده حاوی عوامل آنتی‌اکسیدان، آنتی‌پروتولیتیک و آنتی‌باکتریال، تحت عمل اولتراسانتریفیوژ با روش SFU قرار گرفت. بعد از جداسازی، تعیین مقدار LDL بدست آمده، با اندازه‌گیری پروتئین نمونه با روش لوری انجام شد، میزان بدست آمده بر حسب پروتئین LDL معادل ۱۲/۵ mg بود. برای تأیید کیفیت LDL جدا شده دو روش مورد استفاده قرار گرفت، یکی بررسی حرکت الکتروفورتیک پروتئین(های) موجود در نمونه استخراج شده و دیگری واکنش TBA. در الکتروفورز پروتئین بر روی استات سلولز در pH ۸/۶ و ولتاژ ۱۸۰ V، تنها یک باند در ناحیه بین بتا گلبولین و آلفا دو گلبولین مشاهده گردید (شکل ۱ و ۲-ب) که اولاً به علت عدم وجود باند دیگر، خلوص لیپوپروتئینی را نشان می‌دهد و ثانیاً به علت عدم تغییر حرکت الکتروفورتیک LDL استخراج شده، پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش بار منفی آن رد می‌شود. واکنش TBA انجام شده نیز منفی بود که تأیید دیگری برای عدم وجود پراکسیداسیون لیپیدی در نمونه استخراج شده می‌باشد.

ب) ox-LDL تهیه شده

برای ارزیابی کیفیت اکسیداسیون LDL توسط یونهای Cu^{2+} در محیط آزمایشگاه، سه روش متکی بر تغییرات ساختمانی ذره LDL طی اکسیداسیون، شامل بررسی جذب نوری در طول موج ۲۳۴nm، واکنش TBA و بررسی حرکت الکتروفورتیک، مورد استفاده قرار گرفت. حدود ۳۰ دقیقه بعد از اضافه نمودن سولفات مس به نمونه LDL، جذب نوری در طول موج ۲۳۴ nm شروع به افزایش نموده و ظرف ۹۰ دقیقه به حداکثر میزان خود رسید. افزایش جذب نوری در طول موج ۲۳۴ nm همزمان با شروع پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه و به هم نزدیک شدن پیوندهای دوگانه آنها می‌باشند. نتایج بدست آمده قابل مقایسه با سایرین است (۲۵). در واکنش TBA میزان MDA موجود در نمونه ox-LDL معادل LDL protein MDA/mg ۸۰ nm بود که نشانه اکسیداسیون مناسب LDL می‌باشد. تأیید بیشتر اکسیداسیون مناسب LDL، با الکتروفورز ox-LDL تهیه شده بر روی استات سلولز در pH ۸/۶ و ولتاژ ۱۸۰ V صورت گرفت. همانطور که در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است، حرکت الکتروفورتیک LDL

می‌باشد. در الکتروفورز پروتئین بر روی استات سلولز در pH ۸/۶ نیز mal-LDL تولید شده حرکت الکتروفوریک بیشتری نسبت به ox-LDL نشان داد و در ناحیه بعد از آلبومین ظاهر شد (شکل ۱ و ۲-د) که این نیز دلیلی بر مشتق‌سازی مناسب apo B100 با MDA بوده و بنابراین دلیل افزایش بیشتر بار منفی mal-LDL می‌باشد.

واکنش توسط روش دیالیز، میزان MDA مشتق‌سازی شده در LDL با آزمایش TBA مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان آن برحسب MDA برابر LD Protein ۴۰۰ nM/mg بدست آمد. مقایسه این مقدار بدست آمده با مقدار حاصل از اکسیداسیون LDL توسط یون Cu^{2+} (یعنی ۸۰ nM MDA/mg LDL protein) نشان‌دهنده مشتق‌سازی مناسب ریشه‌های جانبی لیزین apo B100 با MDA



شکل ۲- نمودار الکتروفورز پروتئین

الف - نمونه سرم طبیعی با پنج باند مشخص

ب - نمونه LDL جدا شده با حرکت در ناحیه بین بتا گلوبولین آلفا دو گلوبولین

ج - نمونه ox-LDL تهیه شده با حرکت در ناحیه بین آلفا یک گلوبولین و آلبومین

د - نمونه mal-LDL تهیه شده با حرکت بعد از ناحیه آلبومین

بحث

می‌باشد (۳۴،۳۳). این بیماری یک فرایند پیشرونده می‌باشد که عموماً در دوران کودکی شروع شده و تظاهرات بالینی آن در اواسط تا اواخر دوران بزرگسالی ظاهر می‌شود (۲۳).

تنگی شریانه‌های قلبی در اثر رسوب لیپیدها (آترواسکلروز) بعنوان عامل اصلی مرگ و میر در جوامع غربی مطرح

بدین ترتیب برای mal-LDL می‌توان نقشی در پاتوژنز آترواسکلروز در نظر گرفت. تغییر LDL توسط MDA اهمیت خاصی دارد زیرا علاوه بر تولید آن طی پراکسیداسیون لیپیدها، بطور فیزیولوژیک، طی کاتابولیسم اسید آراشیدونیک توسط پلاکتهای خونی در محل صدمه آندوتلیوم شریانی، تولید می‌گردد.

در این مقاله روش استخراج و تخلیص LDL با روش اولتراسانتریفوژ از نمونه پلاسما و تغییر آن به ox-LDL و mal-LDL شرح داده شده است. نتایج حاصل از افزایش جذب نوری در ۲۳۴ nm بدنال شروع اکسیداسیون LDL توسط یونهای Cu^{2+} موافق با نتایج گزارش شده توسط Kleinvelde et al (۳۰) و Hininger et al (۲۵) می‌باشد. هرچند نتایج گزارش شده در مورد میزان TBARS بسیار متفاوت بوده و دامنه آن از ۳ تا ۴۰۰ nM MDA/mg LDL protein می‌باشد (۵، ۶، ۲۹، ۳۰). این تفاوت ممکن است ناشی از شرایط متفاوت مورد استفاده برای اکسیداسیون LDL نظیر غلظت Cu^{2+} و غلظت LDL باشد. نتایج بدست آمده افزایش حرکت الکتروفوریتیک LDL تغییر یافته مشابه سایرین می‌باشد (۱۲، ۱۵، ۳۱، ۳۴). Holvoet et al افزایش حرکت الکتروفوریتیک ox-LDL و mal-LDL نسبت به LDL طبیعی را نشان داده و گزارش نموده است که این افزایش حرکت برای mal-LDL نسبت به ox-LDL بیشتر می‌باشد (۲۴).

ox-LDL و mal-LDL تهیه شده را می‌توان برای بررسی بیشتر خصوصیات آتروژنیک مورد استفاده قرار داد. از جمله این بررسیها جستجوی اتوانتی‌بادیهای ضد ox-LDL و mal-LDL در سرم بیماران مبتلا به تنگی شریانهای قلبی و مقایسه آن با افراد کنترل فاقد تنگی است. بدین ترتیب ox-LDL و mal-LDL تهیه شده را می‌توان بعنوان آنتی‌ژن برای راه‌اندازی یک روش Indirect ELISA جهت جستجوی این اتوانتی‌بادیها بکار برد. این کار تحقیقاتی در دستور کار مطالعات بعدی قرار دارد.

منابع

- 1- Witztum J. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 1994; 344: 793-795.
- 2- Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T., et al. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N.Engl. J. Med.* 1989; 320: 915-924.
- 3- Navab M., Judith A., Watson D., et al. The yin and yang of oxidation in the development of fatty streak. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996; 16: 831-842.
- 4- Witztum J, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 1991; 88: 1785-1792.
- 5- Weisser B., Locher R., Mengdon T., et al. Oxidized low density lipoproteins in atherogenesis: possible mechanisms of action. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1992; 19 (supple 2): 4-7.
- 6- Parthasarathy S., Barnett J. Phospholipase A2 activity of low density lipoprotein: evidence for an intrinsic phospholipase A2 activity of apoprotein B-100. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990; 87: 9741-9745.
- 7- Steinbrecher U., Parthasarathy S., Leake D., et al. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid

تا کتون دو فرضیه شامل «فرضیه ارتشاح لیپیدی» و «فرضیه صدمه آندوتلیال» در ایجاد تنگی شریانهای قلبی بیشتر مورد توجه بوده است که اولی به نقش هیپرکلسترولمی و دومی به نقش صدمه آندوتلیال به عنوان عامل اصلی و کلیدی در ایجاد ضایعه اشاره دارد (۲، ۴). اخیراً توجه زیادی به ارتباط بین فرایندهای اکسیداتیو و ایجاد تنگی شریانی شده است. هر سه سلول شرکت کننده در فرایند آتروژنز، یعنی سلولهای آندوتلیال شریانی، سلولهای عضله صاف، و ماکروفاژها، قادر به اکسید نمودن LDL می‌باشند (۳).

فرضیه ارتشاح لیپیدی ممکن است برای ایجاد رگه چربی کافی بوده و فرضیه صدمه آندوتلیال ممکن است علت پیشرفت رگه چربی به ضایعات پیشرفته تر باشد. از طرفی دیگر با در نظر گرفتن خصوصیات ox-LDL، عناصر کلیدی این دو فرضیه یکی شده و منجر به پیشرفت ضایعه می‌گردد. بدین ترتیب ox-LDL بعنوان یک عامل مهم و احتمالاً اجباری در ایجاد ضایعات آترواسکلروتیک ایفاء نقش می‌نماید (۱). از اینرو، علاوه بر غلظت پلاسمایی LDL، می‌بایست عوامل دیگری که حساسیت LDL به اکسیداسیون را تعیین می‌نمایند، نظیر غلظت عوامل آنتی‌اکسیدان در گردش خون و در خود ذره LDL و محتوی اسید چرب، LDL، بعنوان عوامل مؤثر در ایجاد تنگی عروق شریانی مورد توجه قرار گیرند.

علاوه بر خصوصیات آتروژنیک ذکر شده در بالا، یکی دیگر از خصوصیات مهم ox-LDL که ممکن است در این فرایند شرکت نماید، خاصیت ایمونوژنیسیتهی ox-LDL می‌باشد. بدنال مشتق‌سازی عوامل ۴- آمینو ریشه‌های جانبی لیزین apo B100 توسط MDA، ایجاد شاخص‌های آنتی‌ژنیکی جدید می‌شود که سیستم ایمنی را تحریک نموده و منجر به تولید اتوانتی‌بادیهای ضد این شاخص‌ها می‌گردد. اتوانتی‌بادیهای تولیدی می‌توانند از طریق ایجاد کمپلکس ایمنی و تسریع برداشت آنها توسط ماکروفاژها، در آتروژنز نقش داشته باشد.

- peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1984; 81: 3883-3887.
- 8- Palinski W., Rosenfeld M., Yla-Hertuala S., et al. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989; 86: 1372-1376
 - 9- Aviram M. Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1993; 98: 1-9.
 - 10- Fong L., Parthasarathy S., Witztum J., et al. Nonenzymatic oxidative cleavage of peptide bonds in apoprotein B100. *J. Lipid Res.* 1987; 28: 1466-1477.
 - 11- Kanzhi L., Cuddy E., Grant N. Oxidative status of lipoproteins in coronary disease patients. *Am. Heart J.* 1992; 123: 285-290.
 - 12- Haberland M., Fogelman A., Edwards P. Specificity of receptor mediated recognition of malondialdehyde - modified low density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1982; 79: 1712-1716.
 - 13- Haberland M., Christopher LI, Fogelman A. Role of lysines in mediating interaction of modified low density lipoproteins with the scavenger receptor of human monocyte macrophages. *J. Biol. Chem.* 1984; 259:11305-11311.
 - 14- Parthasarathy S., Fong L., Quinn M., et al. Oxidative modification of LDL: comparison between cell-mediated and copper mediated modification. *Eur. Heart J.* 1990; 11 (suppl E): 83-87.
 - 15- Fogelman A., Shechter I., Seager J. et al. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1980; 77: 2214-2218.
 - 16- Gonen B., Fallon J., Baker S., Immunogenicity of malondialdehyde-modified low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 1987; 65: 265-272.
 - 17- Seccia M., Albano E., Maggi E., et al. Circulating autoantibodies recognizing peroxidase-oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17: 134-140
 - 18- Edelstein C. and Scaru A. Precautionary measures for collecting blood destined for lipoprotein isolation. *Methods in Enzymology* 1986; 128: 151-155.
 - 19- Lamb D. and Leake D. The effect of EDTA on oxidation of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 1992; 94: 35-42.
 - 20- Copeland R. *Methods for protein analysis.* New York, Chapman & Hall 1994; 1-44.
 - 21- Havel J., Eder A., and Bragdon J. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin Invest.* 1955; 34: 1345-1353.
 - 22- Bergmark C., Faire U., Lefvert A., et al. Patients with early-onset peripheral vascular disease have increased levels of autoantibodies against oxidized LDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995; 15: 441-445.
 - 23- Schumaker V. and Puppione D. Sequential flotation ultracentrifugation. *Methods in Enzymology* 1989; 128: 155-170.
 - 24- Palinski W., Yla-Herttuala S., Rosenfeld M., et al. Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 1990; 10: 325-335.
 - 25- Hininger I., David A., Laporte F., et al. Measurement of low density lipoprotein oxidation. Analysis of free radicals in biological systems Switzerland, Birkhauser Verlag Basel 1995; 203-211.
 - 26- Steinbercher U. Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residue of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 3603-3608.
 - 27- Maggi E., Chiesa R., and Melissano G. Autoantibodies against oxidatively - modified LDL in uremic patients undergoing dialysis. *Kidney International.* 1994; 46: 896-876.
 - 28- Maggi E., Marchesi E., Ravetta V., et al. Presence of autoantibodies against oxidatively modified low density lipoprotein in essential hypertension : a biochemical signature of an enhanced in vivo low density lipoprotein oxidation. *Journal of Hypertension* 1995; 13: 129-138.
 - 29- Maggi E., Chiesa R., Melissano G., et al. LDL oxidation in patients with severe carotid atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb.* 1994; 14: 1892-1899.
 - 30- Kleinveld H., Hak-Lemmers H., Stalenhoef A., et al. Improved measurement of low density lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low density lipoprotein. *Clin. Chem.* 1992; 38: 2066-2072.
 - 31- Minh N., Sack M., Moutsatsos G., et al. Autoantibody titers to oxidized low density lipoprotein in patients with coronary atherosclerosis. *AM. Heart J.* 1996; 131: 663-667.
 - 32- Brown M. and Goldstein J. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Scientific American* 1984; 251: 52-66.
 - 33- Braunwald E. *Heart Disease*, 5th edition, Philadelphia, Saunders, 1997; 1105-1125.
 - 34- Holvoet P., Perez g., Zhao Z., et al. Malondialdehyde - modified low density lipoprotein in patients with atherosclerosis disease. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 2611-2619.