

BAZI ANTİOKSİDANLARIN OKSİDE LDL'İN TROMBİN OLUŞTURMA KAPASİTESİNE OLAN ETKİLERİ

Simin ROTA*, Nicola A. McWILLIAM*, Trevor P. BAGLIN**, Christopher D. BYRNE*

Cambridge Üniversitesi, Addenbrookes Hastanesi, Klinik Biyokimya Departmanı *
Cambridge Üniversitesi, Addenbrookes Hastanesi, Hematoloji Departmanı**

ÖZET

Aterosklerozda artmış oksidatif yük sonucu lipoproteinlerde oksidatif değişiklikler oluşur. Daha önceki çalışmamızda trombosit ve endotel hücreleri bulunmayan ortamda, VLDL ve okside LDL'nin protrombinaz kompleksi ve trombin oluşumunu desteklediğini göstermiştik. Bu çalışmada ise, antioksidan etkisi olduğu bilinen 17 beta-estradiol, probukol ve aminoguanidin'in *in vitro* olarak Cu^{2+} ile okside edilmiş LDL'nin trombin oluşturma kapasitesine olan etkilerini inceledik. LDL'nin Cu^{2+} ile oksidasyonu, LDL'nin trombin oluşturma kapasitesini okside olmamış LDL'ye oranla önemli düzeyde arttırdı ($p<0.001$). LDL'nin Cu^{2+} ile oksidasyonundan önce 17 beta-estradiol, aminoguanidin ve probukol ile ayrı ayrı inkübasyonları okside LDL'nin trombin oluşturma kapasitesini azalttı ($p<0.001$).

Anahtar sözcükler: Ateroskleroz, okside LDL, bakır, trombin, 17 beta-estradiol, aminoguanidin, probukol.

SUMMARY

In atherosclerosis, oxidative changes occur in lipoproteins as a result of enhanced oxidative stress. Previously we have shown that in the absence of platelets and endothelial cells, VLDL and oxidized LDL support the assembly of the prothrombinase complex and thrombin generation. In this study we investigated the effect of some known antioxidants such as 17 beta-estradiol, probucol and aminoguanidine to the thrombin generating capacity of Cu^{2+} oxidized LDL. The oxidation of LDL with Cu^{2+} enhanced the thrombin generation significantly ($p<0.001$) when compared to the native LDL. Incubation of LDL with 17 beta-estradiol, aminoguanidine and probucol, prior to Cu^{2+} oxidation, diminished ($p<0.001$) the thrombin generating capacity of oxidized LDL.

Key words: Atherosclerosis, oxidized LDL, copper, thrombin, 17 beta-estradiol, aminoguanidine, probucol

Ateroskleroz ve trombozisin arasındaki ilişki uzun yıllardır bilinmektedir. Bir serin proteaz olan trombin, trombozisin önemli regülatörlerinden biridir. LDL'nin oksidatif değişikliğinin aterosklerotik olayların başlamasında ve devamındaki önemli rolü yapılan çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (1). Koroner kalp hastaları ve diabetiklerden elde edilen düşük dansiteli lipoprotein (LDL) normal kişilerden elde edilenlere oranla daha kolay okside oldukları gösterilmiştir (2). LDL'de lipidlerin ve

apolipoprotein B100'ün, lipid peroksidasyonu yıkım ürünleri tarafından değişikliğe uğratılması LDL'nin biyolojik özelliklerinde değişikliğe neden olmaktadır. Okside LDL'nin aterojenik olmasında, makrofajlar tarafından artmış alımı, monositler için kemotaktik olması, doku makrofajlarının motilitesini inhibe etmesi, sitotoksik olması, immunojenik olması (1) gibi bazı potansiyel mekanizmalar rol oynarlar. Biz de daha önceki çalışmamızda, okside LDL'nin protrombinaz kompleksi ve sonucunda trombin

oluşturma kapasitesinin olduğunu ve bunun temel olarak fosfolipidler aracılığı ile oluştuğunu gösterdik (3).

Okside LDL'nin in vivo olarak aterosklerotik lezyonlarda bulunduğu tesbit edilmiştir (4,5). LDL'nin oksidasyonu, ateroskleroz oluşumu ve gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Arter duvarlarında ve plak ekstraktlarında LDL oksidasyonunda etkin olan bakır iyonlarının varlığı gösterilmiştir ve bu nedenle in vitro olarak bakırla oksidasyonun in vivo oksidasyonu taklit ettiği belirtilmiştir (6).

Yapılan hayvan çalışmalarında antioksidan tedavinin ateroskleroz gelişiminde geciktirici etkilerinin olduğu gösterilmiştir(7). Ayrıca epidemiyolojik çalışmalarda da antioksidan vitaminlerin alınımının koroner kalp hastalığının morbidite ve mortalitesini düşürdüğü bildirilmektedir (8). Biz de antioksidanların in vitro olarak LDL'nin oksidasyonunu önleyerek daha önceki çalışmamızda gösterdiğimiz LDL'nin trombin oluşturma kapasitesini engelleyip engellemediklerini incelemeyi amaçladık. Bu nedenle antioksidan etkisi olduğu bilinen 17 beta-estradiol, probukol ve aminoguanidin ile inkübe edilmiş LDL'nin bakırla okside edilmesi sonucu trombin oluşturma kapasitesindeki değişiklikleri inceledik

GEREÇ ve YÖNTEM

Sağlıklı dört kadın ve beş erkekten (26-50 yaş) oluşan çalışma grubundan EDTA'lı tüpe alınan kandan ayrılan plazmadan +4°C'da 235.000xg

de 36 saat ultrasantrifüj ile lipoproteinden zengin fraksiyon elde edildi. Lipoproteinden zengin fraksiyondan jel filtrasyon ile ayrı ayrı lipoprotein fraksiyonları elde edildi. Bu fraksiyonların saflığı agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Elde edilen bu fraksiyonlardan LDL fraksiyonu çalışmada kullanıldı. LDL'nin protein içeriği modifiye Lowry metodu ile ölçüldü. Kolesterol ve trigliserid konsantrasyonları standart bir enzimatik metod ile, apo B konsantrasyonu ise poliklonal antikor apo B ve apo B standardı (The Binding Site, Birmingham, UK) kullanılarak enzim-linked immünosorbent assay (ELISA) tekniği ile ölçüldü (3)

Okside olmuş ve olmamış LDL destekli trombin oluşumunun kantitatif ölçümü:

Okside olmuş ve olmamış LDL ile oluşan trombin kantitatif olarak trombin spesifik bir kromojen olan S2238'in (Kabi Diagnostica, Kabi Vitrum, Stockholm, Sweden) kullanıldığı bir yöntemle ölçüldü. Saf protrombin, Faktör V ve Faktör Xa'nın kullanıldığı yöntemde sonuçlar nmol/L trombin olarak ifade edildi (3).

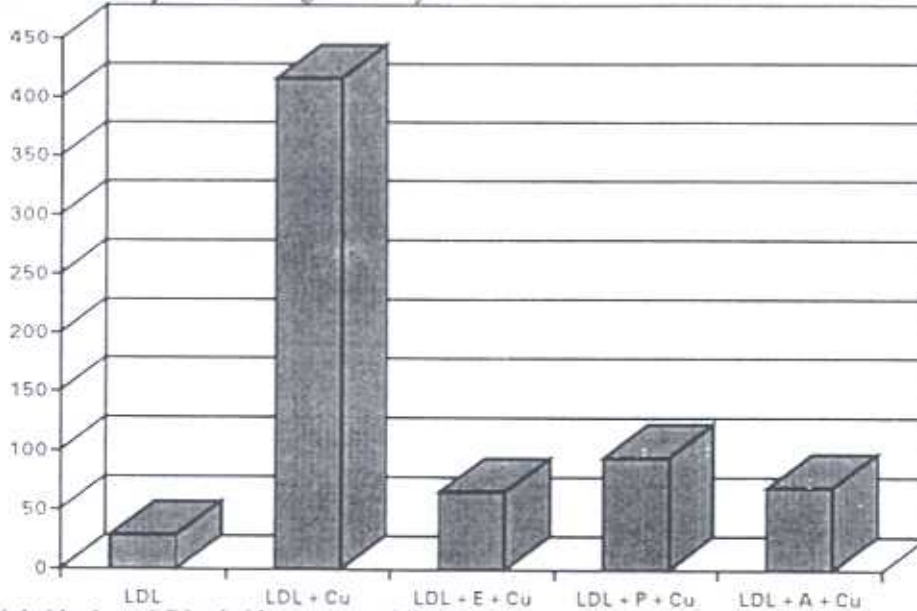
LDL'nin oksidasyonu: Deneyle 100 µg/ml protein içeren LDL fraksiyonu kullanılarak yapıldı LDL 2.5 µmol/L CuSO₄ ile (son konsantrasyon) 37°C'de 20 saat inkübasyon ile okside edildi. Oksidasyon 0.1 mol/L EDTA ilavesi ve +4°C'de soğutma ile durduruldu(3).

LDL'nin antioksidanlarla inkübasyonu: Elde edilen LDL fraksiyonlarının protein konsantras-

yonları 100 µg/ml proteine getirildi ve probukol (Dimetilsulfoksit'de (DMSO) 50 µM final konsantrasyon), 17 beta-estradiol (DMSO'da 2.5 mM son konsantrasyon), aminoguanidin (PBS'de 250 mM son konsantrasyon) ile 37°C'de bir saat inkübe edildi. Bu maddelerle ayrı ayrı inkübe edilen ve kontrol olarak işlem görmemiş LDL örnekleri CuSO₄ (5µM) ile okside edildi. Oksidasyon 0.1 M EDTA ilavesi ve +4°C'de soğutma ile durduruldu. Oksidasyon durdurulduktan sonra tamponlar fosfat tamponu ile (PBS) Centricon 30 kullanılarak değiştirildi.

Analiz edilen tüm LDL fraksiyonlarının hidroperoksid düzeyleri ticari bir kit kullanılarak ölçüldü (PeroXOquant Quantitative Peroxide Assay, lipid compatible formulation. Pierce and Warriner UK).

Tüm LDL fraksiyonları agaroz jel



Şekil 1: Antioksidanların LDL oksidasyonuna etkileri
P; Probukol
A; Aminoguanidin

BULGULAR

CuSO₄ ile okside edilmiş LDL (n=9) (416±70 nmol/L) normal LDL (29±5 nmol/L) ile kıyaslandığında anlamlı olarak (p<0.001) fazla miktarda trombin oluşturdu. 17 beta-estradiol, probukol ve aminoguanidin ile inkübasyon sonrası CuSO₄ ile okside edilen LDL nin (sırası ile 66±20 nmol/L, 95±57 nmol/L, 70±20 nmol/L) sadece CuSO₄ ile okside edilen LDL'ye göre trombin oluşturabilme özelliğinde anlamlı olarak (p<0.001) azalma tesbit ettik (Şekil 1).

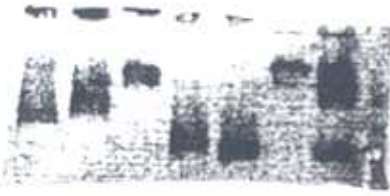
elektroforezinde yürütüldü, sonuçlar normal LDL ve okside LDL'nin jelde ilerleme hızı ile kıyaslanarak değerlendirildi.

Kontrol olarak normal LDL DMSO ile inkübe edilerek aynı deneyler tekrarlandı.

İstatistiksel değerlendirmeler (ortalama±SE) Student's t-testi ile yapıldı.

BULGULAR

Lipoproteinler agaroz jel elektroforezinde yürütüldüğünde okside LDL'nin normal LDL'ye oranla daha hızlı yürüdüğü gözlemlendi. Probukol, aminoguanidin, 17 beta-estradiol ile inkübe edilmiş olan LDL fraksiyonları elektroforezde yürütüldüğünde normal LDL'ye oranla daha hızlı, buna karşılık okside LDL'ye oranla daha yavaş ilerlediği görüldü (Şekil 2).



Şekil 2: LDL elektroforezi: Sağ baştan itibaren sırası ile; Kontrol, işlem görmemiş LDL, Cu+LDL, Cu+LDL, 17-beta estradiol+Cu+LDL, probukol+Cu+LDL, aminoguanidin+Cu+LDL

TARTIŞMA

Çalışmamızda antioksidan etkisi olduğu bilinen probukol, aminoguanidin ve 17 beta-estradiol ile inkübasyonu sonrası okside edilen LDL'nin trombin oluşturma kapasitelerini incelediğimizde her üç maddenin de LDL'nin trombin oluşturma kapasitesini azalttığını saptadık. LDL'nin trombin oluşturabilmesinin esas olarak negatif yüklü fosfolipidlere protrombinaz kompleksinin bağlanması ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Normal LDL trombin oluşturamazken okside LDL'nin artmış negatif yük nedeni ile trombin oluşturabildiği düşünülmektedir (3). Lipoproteinler agaroz jel elektroforezinde yürütüldüğünde okside LDL'nin normal LDL'ye oranla daha hızlı yürüdüğü gözlenmiştir. Bu da

okside LDL'nin daha fazla negatif yük taşıdığını göstermektedir. Okside edilen LDL fraksiyonları elektroforezde yürütüldüğünde probukol, aminoguanidin, 17 beta-estradiol ile inkübe edilmiş olan LDL'ye oranla da daha hızlı ilerlediği görülmüştür. Elektroforetik yürüme hızı göz önüne alındığında probukol, aminoguanidin ve 17 beta-estradiol ile inkübe edildikten sonra okside LDL'nin trombin oluşumunu inhibe edebileceği düşünülebilir. Her üç madde ile bizim elde ettiğimiz neticeler de bunu doğrulamaktadır.

Probukol antiaterojenik bir ilaç olarak da bilinmektedir ve bu etkisi kolesterol düşürücü etkisinin yanında antioksidan özelliğine de bağlanmıştır (2). Probukol halen en potent lipofilik antioksidan olarak bilinmektedir. Probukol'un, in vitro oksidatif modifikasyonu LDL partikülü içine taşınarak engellediği ileri sürülmektedir(1). Probukol'un antioksidan etkisini lipid serbest radikallerini yakalayarak yapabileceği ileri sürülmektedir (9,10). Probukol'un lipid peroksidasyonunu önlediği ancak protein modifikasyonunu önlemediği de bildirilmektedir (11). Ayrıca yapılan çalışmalarda probukol'un LDL oksidasyonunda lag fazını uzattığı tesbit edilmiştir (12). Çalışmamızda da probukol'un antioksidan etkisi saptanmış ve esas olarak negatif fosfolipidlerin etkili olduğu düşünülen trombin oluşumunu da azaltmıştır.

Aminoguanidin'in glikasyon ve oksidasyonu engellediği ileri sürülmektedir. Aminoguanidin'in muhtemelen LDL'nin yağ asidi peroksidasyonundan kaynaklanan aldehid ve diğer yıkım ürünlerine bağlandığı ve apoB'nin oksidatif modifikasyonunu engellediği düşünülmektedir (13). Antioksidan etkili probukol ve aminoguanidin'in etki mekanizmalarındaki bazı farklılıklara rağmen her ikisi de okside LDL'nin trombin oluşturma kapasitesini azaltmışlardır. İki maddenin de aynı sonucu doğurması okside LDL'nin hangi mekanizmalarla trombin oluşturduğunun aydınlatılması gereğini bir kere daha ortaya koymuştur. Bu mekanizmaların gösterilmesi ile hastalığın patogenezi hakkındaki yeni bilgilerin edinilmesi yanında probukol ve aminoguanidin'in tedavideki yerlerinin belirlenmesi açısından da faydası olacağı düşüncesindeyiz.

17 beta-estradiol ile yapılan çalışmalarda in vivo ve in vitro olarak oksidasyonu engellediği gösterilmiştir. Probukol'ün aksine, LDL'nin oksidasyonunda lag fazını uzatmadığı gösterilmiştir (14). Ancak bu konuda çelişkili bilgiler mevcuttur, nitekim yapılan bir diğer çalışmada ise lag fazının uzadığı bildirilmektedir (15). 17

beta-estradiol'ün yağ asidi peroksidasyonu yanın- da kuvvetli bir kolesterol peroksidasyonu inhibis- yonuna da neden olduğu bildirilmektedir (14).

LDL'nin oksidatif modifikasyonuna duyarlılığını partikül büyüklüğü, apoB'nin özellikleri, yağ asitlerinin konumu (partikülün yüzeyinde veya merkezde olması) gibi faktörler etkileyebilir. Ayrıca antioksidanların etki mekanizmaları da halen tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Okside LDL'nin trombin oluşturabilme özelliğinin mekanizmasının da henüz açıklığa kavuşturulmadığı göz önüne alınacak olunursa bu konularda çalışmalara devam edilmesi gerektiği görüşündeyiz.

Sonuç olarak çalışmamızda, aterosklerozun gelişiminde rolü olan okside LDL tarafından desteklenen trombin oluşumunun değişik antioksidanlar ile azaltılabildiğini çalışmamızda in vitro olarak gösterdik. Antioksidanların LDL'yi oksidasyondan koruma ve okside LDL'nin trombin oluşturma mekanizmalarını açıklayabilecek çalışmaların yapılmasının hastalığın patogenezi ve muhtemel tedavi şemalarının oluşturul- masında faydalı olacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1991;88: 1785-1792.
2. Babiy AV, Gebicki JM, Sullivan DR, Willey K. Increased oxidizability of plasma lipoproteins in diabetic patients can be decreased by probucol therapy and is not due to glycation. *Biochem Pharmac* 1992;43: 995-1000.
3. Rota S, McWilliam NA, Baglin TP, Byrne CD. Atherogenic lipoproteins support assembly of the prothrombinase complex and thrombin generation: Modulation by oxidation and vitamin E. *Blood* 1998;91: 508-515.
4. Patel RP, Diezfallus U, Dzeletovic S, Wilson MT, Darley-Usmar VM. Formation of oxysterols during oxidation of low density lipoprotein by peroxynitrite, myoglobin, and copper. *J Lipid Res* 1996;37: 2361-2371.
5. Bellomo G, Maggi E, Poli M, Agosta FG, Bollati P, Finardi G. Autoantibodies against oxidatively modified low-density lipoproteins in NIDDM. *Diabetes* 1995;44: 60-66.
6. Yan LJ, Lodge JK, Traber MG, Matsugo S, Packer L. Comparison between copper-mediated and hypochlorite-mediated modifications of human low density lipoproteins evaluated by protein carbonyl formation. *J Lipid Res* 1997;38: 992-1001.
7. Maxwell SRJ. Can antioxidants prevent coronary heart disease. *Br J Cardiol* 1997;4: 217-219.
8. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JE. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* 1997;337: 408-416.
9. Tikhaze A., Lankin V, Konovalova G, Mikhin V, Gurevic S. The influence of antioxidative drug probucol on the enzymatical lipoperoxides utilization. 11th International Symposium on Atherosclerosis 3P48, Paris, October 1997.
10. Bridges AB, Scott NA, Belch JJ. Probucol a superoxide free radical scavenger in vitro. *Atherosclerosis* 1991;89: 263-265.
11. Yan LJ, Lodge JK, Traber MG, Packer L. Apolipoprotein B carbonyl formation is enhanced by lipid peroxidation during copper-mediated oxidation of human low density lipoproteins. *Arch Biochem Biophys* 1997;339: 165-171.
12. Puhl H, Waeg G, Esterbauer H. Inhibition of LDL oxidation by vitamin E and other antioxidants. (eds) Weber PC, Leaf A. *Atherosclerosis Reviews*. New York, Raven Press 1993; 25: 277-285.
13. Lopes-Virella MF, Klein RL, Virella G. Modification of lipoproteins in diabetes. *Diabetes/Metab Rev* 1996; 12: 69-90.
14. Ayres S, Tang M, Subbiah MT. Estradiol-17 beta as an antioxidant: some distinct features when compared with common fat-soluble antioxidants. *J Lab Clin Med* 1996;128: 367-275.
15. McManus J, McEneny J, Young IS, Thompson W. The effect of various oestrogens and progestogens on the susceptibility of low density lipoproteins to oxidation in vitro. *Maturita* 1996;25: 125-131.