

Az oxidált LDL mérési módszereinek összehasonlító vizsgálata

Molnár Jeannette és Sárdy Miklós

Semmelweis Orvostudományi Egyetem, Kóréletani Intézet, Budapest

Érkezett: 1992. február 20.

Az isémiás szívbetegségek gyakoriságának növekedése a legtöbb fejlett ipari ország egészségügyi vezetését arra ösztönözte, hogy nagy tömegű népesség vizsgálata alapján összefüggést keressen a táplálkozási szokások és a vérlipidértékek, valamint az isémiás szívbetegség gyakorisága között. Több nemzeti és nemzetközi vizsgálat alapján általánosan elfogadottak az alábbi tények [1].

1. A lakosság szérum-koleszterinszintje és az isémiás szívbetegség gyakorisága között szignifikáns pozitív korreláció figyelhető meg, azaz, minél nagyobb adott populáció koleszterinszintje, annál nagyobb az isémiás szívbetegség előfordulásának gyakorisága.
2. A szérum koleszterinszintje egyenesen arányos a táplálék zsírtartalmának telített zsírsav mennyiségével.
3. A telített zsírsav-tartalom emelkedése növeli az isémiás szívbetegség előfordulásának és a halálozás gyakoriságát.
4. A halálozás gyakorisága összefügg a napi koleszterin-bevitellel, minél nagyobb a koleszterin felvétele, annál nagyobb az isémiás szívbetegség-halálozás.

Fentiek alapján nyilvánvalónak látszik, hogy a vér koleszterinszintje egyenesen arányos és lineáris összefüggésben van a táplálék telített zsírsav-tartalmával, koleszterintartalmával, áttételesen az összenergia bevitellel, a zsírtartalommal stb.

A legújabb kutatások szerint az oxidált LDL (low density lipoprotein - kis sűrűségű lipoprotein, a továbbiakban: LDL) kulcsszerepet játszik az arterosclerosis (érelmeszesedés) kialakulásában (közvetve pedig az isémiás szívbetegség létrejöttében), mivel számos ma elfogadott elméletbe beilleszthető, fontos láncszemet képez. Eszerint az arterosclerosis folyamata úgy zajlik, hogy első lépésként oxidált LDL keletkezik a plazmában spontán módon [2,3], amely az érfalba juthat, s ez odavonzza a macrophagokat (nagy falósejtek) és migratiógátló hatásával kivándorlásukat is megakadályozza. A macrophagok csak ún. scavenger - (utcaseprő) receptoruk segítségével képesek fagocitálni az oxidált LDL-t, amelynek következménye az oxidált LDL intracelluláris felszaporodása

(foam cells = habos sejtek kialakulása), továbbá e sejtek más natív LDL-partikulumokat is oxidálnak (az atherosclerosis lipidelmélete itt kapcsolódik). Az oxidált LDL aktiválja a trombocitákat és ez a fokozott trombusképződés irányába hat (az atherosclerosis trombogén elmélete itt kapcsolódik). Nagy mennyiségű oxidált LDL felszaporodása az érfalban az LDL cytotoxikus hatása révén az endothel károsodásához vezet, amely az atherosclerosis, "response to injury" elméletének kezdő lépése.

Mindezek ismeretében az arteriosclerosis kialakulásának tanulmányozása céljából fontos lenne az oxidált LDL plazmaszintjének nyomonkövetése, de kimutatták, hogy a vérben keringő oxidált LDL nem áll arányban atherogenitásával (érelmeszesedést kiváltó képességével). Az oxidált LDL mennyisége a máj metabolikus kapacitásának függvénye (a beadott oxidált LDL-t a máj percek alatt képes - scavenger-receptorai révén - felvenni a keringésből), ezért az oxidált LDL plazmaszintjének mérése nem informatív az atherogenitás szempontjából. Ilyen méréssel csupán az egyensúlyi állapotot tükröznénk, mely a máj aktivitása és az LDL spontán oxidálódása között fennáll. Kísérleteink során tehát nem statikus, az oxidált LDL plazmaszintjét tükröző, hanem dinamikus, az oxidáció sebességét, mértékét mutató mérésekre kellett törekednünk. Ennek során az adott egyén LDL-jét standardizált módszerrel oxidáltuk, majd az oxidációt különböző időpontokban leállítva a keletkezett oxidált LDL mennyiségét mértük.

Az oxidált LDL mérésére az irodalom körülbelül 30 különböző módszert említ. Ha ezek közül találnánk egy olyan alkalmas eljárást, amellyel az oxidációra hajlamos LDL-lel rendelkező egyéneket ki lehetne szűrni, elvileg lehetőség nyílna arra, hogy hatásos gyógyszerekkel, ill. készítményekkel mindjárt az arteriosclerotikus folyamat kezdő lépésnél, az oxidációnál avatkozzunk be s ezzel az érelmeszesedést talán hatásosan lehetne megelőzni.

Elképzelhető, hogy azon egyéneknél, akik oxidálódásra "hajlamosabb", azaz az idő függvényében gyorsabban és nagyobb mértékben oxidálódó LDL-lel rendelkeznek, az arteriosclerosis is súlyosabb mértéket ölt vagy gyorsabban progrediál azonos körülmények között. Ezen egyének gyógyszeres kezelése ma már megoldható lenne: az erősen antioxidáns probucollal vagy enyhébb esetben C- illetve E-vitaminnal a legújabb kutatások szerint sok esetben szignifikánsan lassítani lehet az LDL oxidációját és ezzel az érfali folyamat progrediálását, rosszabbodását [4,5].

Vizsgálati anyag és módszerek

1. A mérendő oxidált LDL előállítás a humán plazmából

A vérminták három, különböző véradótól származtak, amely plazmával minden egyes mérés kapcsán a következő lépéseket kellett megtennünk, hogy az

oxidáció standard laboratóriumi körülmények közt folyhasson:

- A plazmát először ultracentrifugáltuk VTi 50-es vertikális rotorban, 45000-es fordulatszámmal, 15 °C-on, 3,5 órán át, majd a nyert LDL-t dializáltuk pH=7,4-es fiziológiás sóval szemben, 4 °C-on, 48 órán át, 12 óránként cserélve a puffert.
- Egy-egy frakcióhoz 10 µmol aszkorbinsavat tettünk.
- A 0 perces minta kivétele után a mintát 2,5 µmólos CuCl₂ oldattal oxidáltuk.
- Adott időpontokban mintát vettünk, melynek további oxidációját BHT-vel (butil-hidroxi-toluol) gátoltuk.
- Az így kapott mintákkal végeztük valamennyi mérésünket.

Az oxidált LDL mérésére az irodalomban mintegy 30 különféle eljárás szerepel. A következő szempontok szerint választottunk ki hármat a lehetséges módszerek közül:

- legyen megbízható, specifikus, pontos és érzékeny;
- legyen kis anyagigényű, olcsó;
- legyen egyszerű eszközzel is elvégezhető.

2. A gélelektroforézis

A gélelektroforézis az LDL azon tulajdonságán alapul, hogy oxidációja során negatív töltések szaporodnak fel benne, így elektroforetikus mobilitása az oxidáció mértékével arányos.

A futtató kádat Veronál pufferrel töltöttük fel. Ugyanezen pufferrel készítettük el az agaróz gél. Ezután mintegy 3½ - 4 órán át futtattuk a toluidinkékkel kevert mintákat 135 V-os feszültséggel. Az erősen negatív töltésű toluidinkék a futás sebességének indikátorául szolgált, valamint a relatív mobilitás kiszámításához volt rá szükség, mint viszonyítási alap. Ezt követően az LDL fehérjét 10 %-os triklór-ecetsavval kicsaptuk, hogy a további diffúziót gátoljuk, s az LDL lipid-alkotóelemeit a gél száradása után Fat Red festékkel tettük láthatóvá.

3. A jodometria

A jodometriás módszer azon a kémiai reakción alapul, hogy a lipidperoxidok, melyek az oxidáció során keletkeznek, a jodid ionokat jodin (I₃) molekulákká képesek átalakítani, s a jodin fotometrálnak 365 nm-n. A módszer tehát a lipidperoxidok mérésén alapul [6].

A jodometriához egyszerű, a kereskedelemben is forgalomban lévő kettet (Merck) használtunk, ami jelentősen leegyszerűsítette és meggyorsította a laboratóriumi munkát. Miután 100 µl mintához 1 ml reagenst adtunk, 30 percig az előírásnak megfelelően 20 °C-on sötétben tároltuk, ezután került sor a reagenssel mint vakkal szembeni fotometrálásra 365 nm-en. A kalibrációt hidrogénperoxid oldattal vettük fel.

Egy-egy mintából mindig több mérést végeztünk, s ezek számítani átlaga adta a végső eredményt.

4. A TBARS-módszer

A TBARS a tiobarbitursav reaktív termékek angol betűszava. Az LDL oxidációja során nem csak a fehérje, hanem a lipid alkotórészek is átalakulnak, melynek során a zsírsavak fragmentálódnak és rövid szénláncú aldehidek, 4-hidroxi-nonénal, malondialdehid (MDA) stb. keletkeznek.

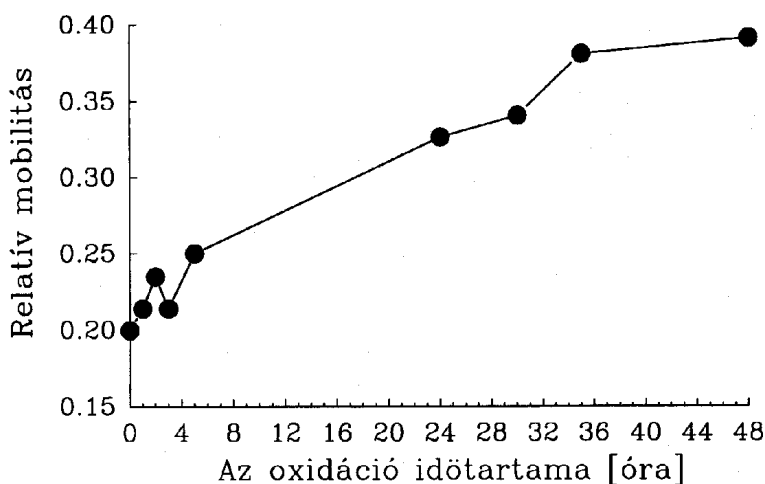
Az MDA és a tiobarbitursav kémiai reakciójának végtermékei a tiobarbitursav reaktív termékek, amelyek fotomérálhatók [7].

Reagensként 10 %-os perklórsavat használtunk 2-tiobarbitursavval telítve. 0,5 ml oxidált LDL tartalmú mintához 4,5 ml reagenst tettünk, majd 100 °C-os vízfürdőbe helyeztük 20 percig. Hűtés után 3000 g-vel 5 perc centrifugálás következett. Vakka (0,5 ml víz + 4,5 ml reagens) szemben 532 nm-en fotoméráltuk.

Vizsgálati eredmények

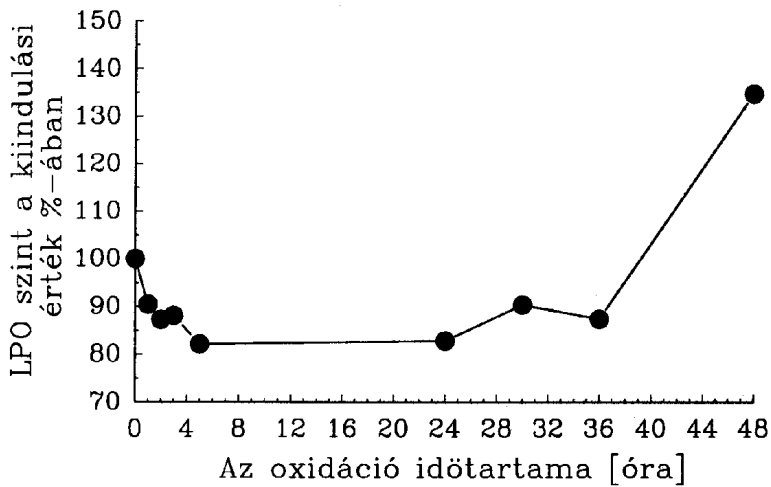
A próbamérésektől eltekintve három, különböző véradótól származó LDL-mintát vizsgáltunk meg és hasonlítottunk össze. Mindhárom görbe azonos tendenciát mutatott, részleteikben azonban eltértek egymástól. Ez a tény jól korrelál az irodalomban is említett megállapítással, mely szerint minden egyes LDL-mintának saját jellemző karaktere van az oxidációra való hajlamot illetően. A három minta közül egynek az eredményeit elemezzük a következőkben, amely tendenciájában a másik kettőt is jellemzi. Az előbb említett három kiválasztott eljárással a következő eredményeket kaptuk az oxidáció időbeli lefolyását vizsgálva:

Az LDL relatív elektroforetikus mobilitása 36 órán át folyamatosan nőtt, majd 36 óra után az emelkedés üteme lelassult (1. ábra).



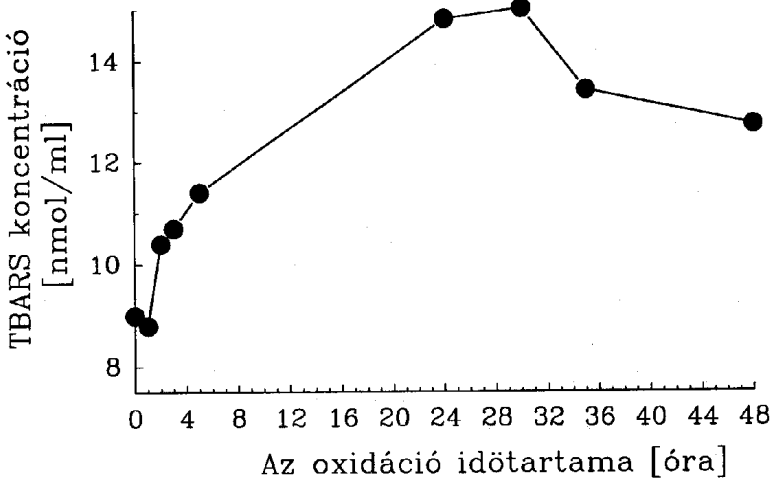
1. ábra: Az LDL elektroforetikus mobilitása az oxidáció időtartamának függvényében

A lipid-peroxid koncentrációt vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a koncentráció-emelkedés csak 24 óra elteltével volt látható (2. ábra).



2. ábra: Az LPO koncentráció függése az oxidáció időtartamától

A TBARS koncentráció az oxidáció első 24 órájában folyamatosan nő, a 24 - 28 órás időtartam alatt a növekedés lelassul, majd csökken (3. ábra).



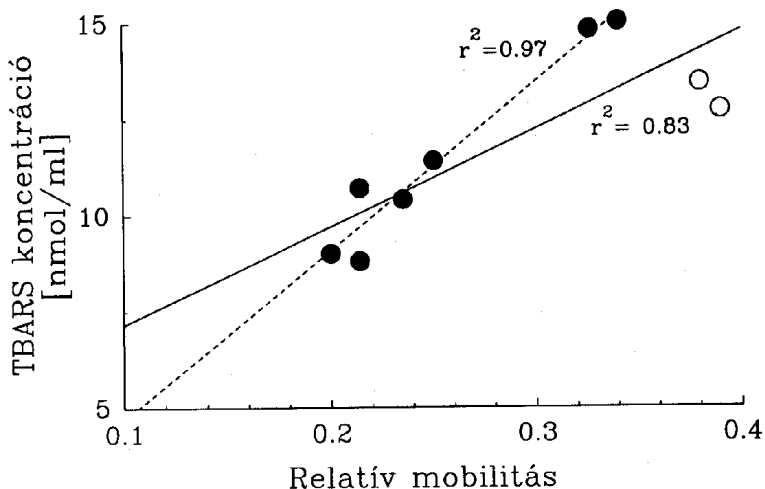
3. ábra: A TBARS koncentráció függése az oxidáció időtartamától

A TBARS koncentráció és az elektroforetikus mobilitás korrelációanalízise látható a 4. ábrán. Tömör karikákkal az első 24 órás, üres körökkel a 24 óra utáni mérési eredmények szerepelnek. A korreláció az első 24 órás mintákat figyelembe véve igen szoros, míg ha a 24 óra utáni mintákat is figyelembe vesszük, a korreláció mértéke jóval kisebb.

Következtetések

A gélelektroforézis pontos, megbízható és kis anyagigényű módszernek bizonyult, de kivitelezése viszonylag hosszadalmas és körülményes, ezért szűrésre csak korlátozottan alkalmazható.

A jodometria egyszerű, könnyen elsajátítható és gyorsan elvégezhető, de az LDL oxidálódásának időbeli lefolyását kísérleteink során nem tükrözte mindig elég pontosan.



4. ábra: Az LDL elektroforetikus mobilitása és a TBARS koncentráció összefüggése

A TBARS módszer szintén viszonylag egyszerű és gyorsan elvégezhető, valamint közepes anyagigényű. További előnye, hogy pontossága megközelíti az elektroforézisét az első 24 órában. A 4. ábrán látható, hogy a gélelektroforézissel és a TBARS módszerrel kapott eredmények jól korrelálnak egymással ($r^2 = 0,97$) az első 24 órában. A jodometria viszont csak 24 óra eltelte után mutatott oxidációt jelző változást, ami talán azzal magyarázható, hogy ez a módszer olyan tulajdonságát méri az LDL-nek, amelynek változása jóval lassúbb.

Célkitűzésünk egy szűrésre alkalmas módszer kiválasztása volt. A felsorolt szempontoknak ugyan egyik módszer sem felelt meg tökéletesen, de a TBARS-módszerről megállapítható, hogy kielégíti a követelményeket azzal a megszorítással, hogy csak az első 24 óra eredményeit vesszük figyelembe. Ehhez azt kell megjegyezni, hogy az irodalomban nem tartják elég specifikusnak és sztöchiometrikusnak ahhoz, hogy pontos oxidált LDL-szintmérést lehessen vele meghatározni, ám méréseinkből kiderült, hogy az oxidációs folyamat időbeli lefolyását mégis jól tükrözi. Ezért további méréseinket a gélelektroforézisnél gyorsabban elvégezhető, de tendenciájában e megbízható módszerrel azonos eredményt adó TBARS módszerrel fogjuk végezni.

A vizsgálati eredményeknél említettük azt a megfigyelést, hogy standard laboratóriumi körülmények között, vagyis általunk beállított környezetben, más-más plazmából (más-más egyéntől) származó LDL-molekulák különböző mértékben oxidálódtak az idő függvényében. Ez a megfigyelés egybevág irodalmi adatokkal is [8]. Ennek a megfigyelésnek magyarázata lehet az a feltételezés, hogy az LDL-molekulák oxidációra való hajlama nem csupán az adott egyénre jellemző mikro- és makrokörnyezet függvénye, hanem valamilyen molekuláris adottság is szerepet játszik. Ennek a kutatása részét képezi következő kísérleteinknek.

Irodalom

1. Szollár L., Kórélettan c. egyetemi tankönyv 416-419; Medicina Könyvkiadó, 1988, Budapest
2. Goldstein JL., Frei B., Stocker R., Ames BN., Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma Proc. Natl. Acad. Sci, 1988; 85 : 9748-52
3. Nagelkerke JF, Havekes L., van Berkel TJ.; In vivo catabolism of biologically modified LDL. Arteriosclerosis 1984.; 4:256-64
4. Parthasarathy S., Young SG, Witztum IL, Pittman RC, Steinberg D.; ProbucoI inhibits oxidative modification of low density lipoprotein, J. Clin. Invest, 1986; 77: 641-4
5. Yamamoto A., Matsuzawa Y., Yokoyama S., Funahashi T., Yamamura T, Kiskino B. Effects of probucoI on xanthomata regression in familial hypercholesterolemia Am. J. Cardiol., 1986; 57: 29H -35H
6. El-Saadani M., Esterbauer M., El-Sayed M., Goher M., Nassar AY., Jürgens G, A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent, J. Lipid Res., 1989; 30 : 627-9
7. Placer ZA, Cushman L, Johnson BC, Estimation of products of lipid peroxidation (malondialdehyd) in biochemical systems; Anal. Biochem. 1966; 16: 359- 64
8. Esterbauer H., Dieber-Rotheneder M., Waeg G., Striegl G., Jürgens G., Biochemical, structural and functional properties of oxidized low-density lipoprotein; Chem Res. Toxicol., 1990; 3: 77-92

Az oxidált LDL mérési módszereinek összehasonlító vizsgálata

Molnár J. és Sárdy M.

Az oxidált LDL mérési módszerei közül hármát hasonlítottunk össze. Az oxidált LDL kulcsszerepet játszik az atherosclerosis kialakulásában. Ezért fontos mennyiségének mérése. Jóllehet sokféle módszert közöltek már az irodalomban, ezek közül azonban egyik sem általánosan elfogadott. Célunk egy lehetőleg egyszerű és megbízható eljárás kiválasztása volt későbbi kísérleteink számára. A három módszerrel, a gélelektroforézissel, a jodometriával és a TBARS szintjének mérésével tendenciájában azonos, részleteiben azonban eltérő eredményeket kaptunk. Ennek valószínű oka az, hogy ezen eljárások az oxidált LDL más-más tulajdonságát számszerűsítik. Az első 24 órában az elektroforézis és a TBARS mérés igen jó korrelációt mutatott, de a jodometriával csak később sikerült növekedést kimutatni. Későbbi vizsgálataink számára a TBARS mérését tartjuk a legjobbnak.

Assessment of measuring methods of oxidized LDL

Molnár J. and Sárady M.

Oxidized LDL plays a key role in atherosclerosis, therefore it is important to measure its quantity. Though a number of different measuring methods are described in the literature, none is generally accepted. Our aim was to select a possibly simple and reliable procedure for the further experiments. The results of the three investigated methods (gelectrophoresis, jodometry and measuring of the TBARS-level) indicated a similar tendency, yet in detail rather different characteristics could be found. The most likely explanation for this may be that these procedures represent different properties of oxidized LDL. The results of the gelectrophoresis and the TBARS-method revealed a close correlation in the first 24 hours, but the quantity of oxidized LDL measured by jodometry increased only later. Finally the TBARS-method was preferred for our further investigations.

Vergleichende Prüfung der Meßmethoden für oxidiertes LDL

Molnár, J. und Sárady, M.

Oxidiertes LDL spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung von Atherosklerose, deshalb ist es wichtig, die Menge des oxidierten LDL exakt zu ermitteln. Obwohl in der Literatur mehrere Meßmethoden beschrieben werden, gibt es noch keine allgemein anerkannte Methode dafür. Das Ziel unserer Untersuchungen war, ein möglichst einfaches und zuverlässiges Verfahren für die weiteren Experimente auszuwählen. Mit den von uns geprüften drei Methoden, der Gelelektrophorese, der Jodometrie und der Messung der TBARS-Konzentration wurden in der Tendenz ähnliche, im Detail jedoch unterschiedliche Resultate ermittelt. Die Erklärung dafür ist wahrscheinlich, daß mit diesen Verfahren je eine andere Eigenschaft des oxidierten LDL erfaßt wird. In den ersten 24 Stunden stimmten die Ergebnisse der Elektroforese und der TBARS-Methode sehr gut überein, aber mit der Jodometrie konnte erst danach die erwartete Zunahme nachgewiesen werden. Für unsere weiteren Versuche wurde schließlich die TBARS-Methode ausgewählt.