روش محاسبه زمان تاخیری یا مقاومت در فرآیند اکسیداسیون LDL

دکتر محمدرضا نقی‌ئی*

* استادیار گروه تغذیه انسانی - دانشکده بهداشت - دانشگاه علوم پزشکی بقیةا.. (عج)

چکیده

پژوهش‌های بسیاری در زمینه فرضیه عملکرد مواد مغذی آنتی‌اکسیدانی بعنوان ریشه‌کن کننده‌های رادیکالهای آزاد مشتق شده از اکسیژن و پیشگیری از آسیب سلولی یا بافتی و بروز بیماریهای دژنراتیو نظیر آتروسکلروز حاصل از اکسیداسیون لیپوپروتئین با چگالی کم Low Density Lipoprotein (LDL) انجام گرفته است. (از میان روشهای ارائه شده برای بررسی این مطلب، مدل پایش پیوسته (Continuous Monitoring) امکان ارزیابی از تاثیر ویتامینهای محلول در چربی بر پیشگیری از اکسیداسیون LDL را فراهم می‌آورد که این مقاومت بصورت واحد زمان (دقیقه) در فاز تأخیری (Phase Lag) بیان می‌شود.) در مطالعه حاضر ضمن معرفی و ارائه روش بکار رفته، زمانهای حاصله از اکسیده شدن نمونه‌های LDL بدست آمده از افراد سالم بزرگسال اکثراً در دامنه ۴۰-۵۰ دقیقه محاسبه گردید. عقیده براین است که با تامین منابع بیشتر آنتی‌اکسیدان‌ها در رژیم و یا تجویز مکمل در صورت نیاز می‌توان این زمان را افزایش داد که معرف مقاومت بیشتر LDL در مقابله با اکسیدانها یا رادیکالهای آزاد است که با استفاده از مدل فوق قابل ارزیابی می‌باشد.

کلید واژه‌ها: آنتی اکسیدانها / لیپوپروتئین‌های ال دی ال

مقدمه

در فرآیندهای طبیعی متابولیکی بدن بعضی مواقع اکسیژن با مواد موجود در بدن واکنش داده و تولید مولکولهای بسیار ناپایدار می‌کند که به آنها رادیکالهای آزاد (مولکولهای دارای الکترون غیرزوج) گویند. یک الکترون در حالت انفرادی بسیار ناپایدار و دارای قدرت واکنش قوی می‌باشد و نیاز به این دارد که با زوج شدن با الکترون دیگر به حالت پایداری اولیه خود بازگردد. لذا، رادیکالهای آزاد به سرعت با مواد دیگر واکنش می‌دهند تا الکترون مورد نیاز خود را کسب کنند. در این حالت مولکول پایدار اهداکننده الکترون خود به یک رادیکال آزاد تبدیل شده و مقدمه‌ای برای انجام واکنش زنجیره‌ای می‌شود(۱).

آنتی اکسیدانها با اهدای یکی از الکترونهای خود رادیکالهای آزاد را خنثی کرده و به واکنشهای الکترون‌گیری خاتمه می‌دهد. در غیراینصورت رادیکالهای آزاد نظیر گردباد عمل کرده و آسیب‌هایی را به بار می‌آورند. آنها معمولاً به لیپوپروتئینها و اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه Polyunsaturated Fatty Acids (PFA) در دیواره سلولی حمله کرده و باعث پیدایش واکنشهای زنجیره‌ای بنام پروکسیداسیون چربی می‌شوند که نهایتاً ساختمان سلولی و عملکرد آن دچار اختلال می‌شود (۲). همچنین، رادیکال‌های آزاد عامل آسیب‌رسانی به پروتئینها و DNA محسوب می‌شوند.

در مجموع به این حالت تنش اکسیدکننده (oxidative stress) می‌گویند که در فرآیند پیری و پیدایش بیماریهایی نظیر سرطان، آرتریت، آب مروارید و بیماری قلبی - عروقی نقش دارد (۳ و ۴). نتایج پژوهشهای زیاد حاکی و موید این نکته است که آنتی اکسیدانهای رژیمی قادر به مقابله با این تنش اکسیدکننده می‌باشند و از اینرو، نقش ویتامینها با خواص آنتی‌اکسیدانی نظیر ویتامینهای A, E و C مطالعات بسیاری را به خود اختصاص داده‌اند. ویتامین C

فراوانترین ماده آنتی اکسیدان محلول در آب بدن می‌باشد که در محیط مایع خارج سلولی فعالیت دارد. ویتامین E فراوانترین آنتی اکسیدان محلول در چربی می‌باشد که مانع اکسیده شدن اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه می‌شود که بدین ترتیب باعث محافظت لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL) و نهایتاً مانع پیدایش آتروسکلروز می‌شود (۱).

از میان روشهای مختلف مطالعه مقاومت LDL در مقابل اکسیداسیون روش اندازه‌گیری پیوسته اکسیداسیون LDL (۵) امکان مطالعه آنتی اکسیدانهای چربی دوست یا محلول در چربی را فراهم می‌آورد که دراینجا این اثر بصورت محاسبه زمان تاخیری یا مقاومت ارائه می‌گردد.

دراین مدل تعیین زمان تاخیری Lag time حاصل که معرف محتوی یا غلظت آنتی اکسیدانها در LDL می‌باشد بیانگر مقاومت در مقابل اکسیداسیون می‌باشد که رابطه مستقیم با غلظت آنتی اکسیدانها دارد.

هدف از ارائه نوشتار حاضر معرفی مدلی است که با استفاده از آن بتوان در مطالعات بعدی تاثیر آنتی اکسیدانهای محلول در چربی نظیر ویتامین E در دوزها و زمانهای مختلف را مورد بررسی قرار داد و یا مقایسه‌ای از زمان تاخیری در افراد دچار آتروسکلروز یا سکته قلبی (M.I) با افراد سالم را بدست آورد.

مواد و روش‌ها

افراد شرکت کننده: شرکت کنندگان شامل هشت مرد داوطلب سالم با میانگین سنی ۲۸±۷/۶ سال، وزن ۷۵±۶/۶ کیلوگرم و نمایه توده بدنی (BMI, Kg/m^2) Body Mass Index ۲۴/۷±۱/۷ بودند که در مطالعات یکطرفه کور شرکت نمودند. تمامی آنها غیرسیگاری بوده و هیچ نوع دارو یا مکمل غذایی بویژه آنتی‌اکسیدان (ویتامین C, E یا بتا-کاروتن و غیره) مصرف نمی‌کردند.

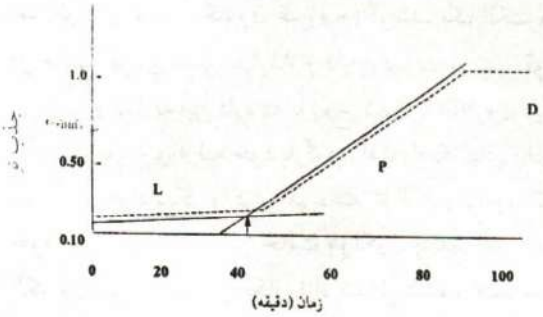
نمونه خون: در روز نمونه‌گیری ۲۰ml خون ناشتا از سیاهرگ دست در حالت نشسته جمع‌آوری و در لوله‌ای حاوی EDTA (۱ mg/ml) قرار داده شد. پلاسمای خون جدا و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد تا زمان آنالیز نگهداری شدند.

جداسازی LDL: LDL با استفاده از چرخش واحد در اولتراسانتریفیوژ به روش ارائه شده (۶) از پلاسما جدا گردید. بطور خلاصه، ۳ ml پلاسما با KBr در چگالی ۱/۲۱g/ml(d) در لوله‌های Quickseal تنظیم گردید و با ۷ml سالین با چگالی ۱/۰۰۶g/ml حاوی ۰/۱ درصد EDTA پوشانده شد. سپس لوله‌ها با محلول چگالی سالین لبریز شده و در ۷۰۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۳/۵ ساعت در ۴°C با استفاده از ظرف چرخان (rotor) ۷۰/۱Ti در اولتراسانتریفیوژ L Beckman۸-M به چرخش درآمد. لایه زرد تفکیک شده LDL توسط آسپیراسیون از جدار لوله جدا گردید و با استفاده از کیسه دیالیز بمدت ۱۸ ساعت در ۴°C با ۶ تعویض سالین نرمال (۰/۹٪ Nacl, PH=۷/۴) دیالیز گردید. غلظت پروتئین در LDL دیالیز شده با روش تغییر یافته (۷Lowry) تعیین گردید.

اکسیداسیون LDL: اکسیداسیون LDL با تولید Conjugated dienes با استفاده از یون مس بعنوان عامل اکسیده‌کننده، بوسیله اندازه‌گیری پیوسته تغییرات در جذب نوری در ۲۳۴ nm (۵) انجام گرفت. مخلوط LDL تازه (معادل ۲۰۰ میکروگرم پروتئین LDL) در سالین نرمال با سولفات مس (غلظت نهایی ۵umol/L) در کووت بمدت ۱/۵ ساعت در یک اسپکتروفتومتر UV متصل به تنظیم حرارت الکترونیکی در محیط ۳۷°C قرار گرفت. جذب نور بصورت خودکار درفواصل ۵ دقیقه‌ای ثبت شد و فازتاخیری محاسبه گردید. هر نمونه دوبار مورد آزمایش قرار گرفت.

نتایج

فواصل زمانی بدست آمده در طی فرآیند اکسیداسیون ترسیم و در شکل یک ارائه گردیده است.



L=Lag phase P= Propagation phase

D= Decomposition phase

شکل ۱: اندازه‌گیری تغییرات شیمیایی و فیزیکی اکسیداسیون LDL توسط پایش پیوسته تغییرات جذب نوری در ۲۳۴nm

بر روی شکل محل تلاقی تانژانت دوخط (مرحله تأخیری و مرحله تکثیری Propagation Phase) را زمان تأخیری می‌نامند که نشان دهنده زمان حفاظت اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه توسط آنتی اکسیدانها می‌باشد و دراین مطالعه میانگین زمان تاخیری اندازه‌گیری شده بر روی نمونه‌ها ۶±۴۳/۶ بود (شکل ۱).

زمان تاخیری بدست آمده برای نمونه‌ها به تفکیک در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: زمان تاخیری بدست آمده برای نمونه‌ها

n	زمان تاخیری (دقیقه)
۱	۴۰
۲	۵۰
۳	۵۰
۴	۴۰
۵	۵۰
۶	۳۴
۷	۴۵
۸	۴۰

میانگین ±انحراف معیار ۶±۴۳/۶

بحث و نتیجه گیری

مراحل اصلی اکسیداسیون LDL توسط یون Cu^{++} به سه فاز متوالی تقسیم‌بندی می‌شود (شکل ۱): فاز تاخیری، فاز تکثیری و فاز انحلال یا تجزیه Decomposition Phase در طی فاز تاخیری عمل اکسیداسیون انجام نمی‌گیرد اما LDL بصورت پیشرونده‌ای از محتوی آنتی اکسیدانی خود، در ابتدا آلفا - توکوفرول و نهایتاً بتا - کاروتن تخلیه می‌شود. لذا در این مرحله عمدتاً تغییری در جذب نور دیده نمی‌شود که معرف مقاومت نسبت به اکسیداسیون می‌باشد. در مرحله تکثیری LDL در معرض تخریب خودکار واکنشهای زنجیره‌ای پروکسیداسیون چربی قرار می‌گیرد که سرعت این واکنش بصورت تصاعدی افزایش می‌یابد. حاصل این واکنش اکسیده شدن اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه و متعاقباً تولید هیدروپروکسیدهای چربی یا Conjugated dienes می‌باشد. نقطه زمانی تولید ماکزیمم dienes بعنوان نقطه انتهایی فاز تکثیری و شروع فاز تجزیه تعریف می‌شود.

دراین مرحله تولید فرآورده‌های آلدئیدی، پیدایش کروموفورهای فلورسنتی در apo B و LDL، افزایش شارژ منفی در سطح، متلاشی شدن و تغییرات در ساختار apo B نظیر از دست دهی گروههای آزاد آمین حاکم می‌گردد (۸). نتیجه نهایی کدر شدن رنگ محیط واکنش می‌باشد.

محاسبه زمان فاز تاخیری یک روش مناسب و عملی برای تعیین مقاومت LDL بدست آمده از افراد مختلف نسبت به اکسیداسیون و مطالعه تاثیر مواد اکسیدکننده و آنتی‌اکسیدان می‌باشد. بنظر می‌رسد در افرادی که در حالت سلامتی بسر می‌برند و دارای فعالیت عادی و رژیم غذایی متعادل و متنوع می‌باشند این زمان رقمی در دامنه ۴۰ الی ۵۰ دقیقه می‌باشد که در شرایط عادی توسط Abbey و همکاران (۹) نیز در همین حدود (میانگین=۴۸ دقیقه) اعلام شده است. با تامین منابع آنتی اکسیدانی در رژیم غذایی و یا تجویز مکمل در صورت نیاز می‌توان این زمان را افزایش داد.

افراد داوطلب سالم که دوزهای ۱۵۰، ۲۲۵، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ واحد بین‌المللی آلفا - توکوفرول بمدت سه هفته دریافت کردند به ترتیب با افزایش زمان فاز تاخیری از ۱۸ الی ۷۵ درصد روبرو شدند(۸). یافته‌های پژوهشها براین باورند که ویتامین E برعلیه بروز بیماریهای قلبی - عروقی نقش محافظتی بعهده دارد. بنظر می‌رسد پاتوژنز آتروسکلروز با مسئله تغییر اکسیداتیو LDL مرتبط می‌باشد. تشکیل پروکسیدهای چربی و فرآورده‌های فعال نظیر آلدئیدها و اکسی استرولهای سایتوتوکسیک عامل تحریک بکارگیری مونوسیت و احتباس در فضای ساب اندوتلیال و نهایتاً تبدیل به سلولهای فوم می‌باشد. بعلاوه ممکن است این فرآورده‌ها مستقیماً اثر سمی بر سلولهای اندوتلیال بر جای گذاشته و منجر به ضایعه لایه intima و پیدایش نکروز و نهایتاً پرولیفراسیون سلولهای ماهیچه صاف بشوند (۱۰). نقش محافظتی ویتامین E در پیشگیری از اکسیداسیون LDL با فعالیت سینرژیسمی ویتامین C حمایت می‌شود؛ و این عمل دفاعی در محیط چربی سلولها توسط ویتامین E و در قسمت مایع سلولها توسط ویتامین C انجام می‌پذیرد. بعلاوه، ویتامین C عامل احیای فرم ویتامین E اکسید شده (پس از اهدای الکترون) و بازگرداندن مجدد آن بحالت آنتی‌اکسیدان می‌باشد (۱۱). اقدامات مداخله‌ای با عواملی که دارای خواص آنتی اکسیدانی هستند اشاره بر این فرضیه دارند که از بروز فرآیند آتروژنز ازطریق

پیشگیری یا به تاخیر انداختن اکسیداسیون LDL یا افزایش مقاومت در مقابل رادیکالهای آزاد ممانعت بعمل می‌آورند (۱۲) که با استفاده از روش فوق و تعیین زمان فاز تاخیری می‌توان نسبت این مقاومت را ارزیابی نمود./N23

منابع

1. Whitney EN, Rolfes SR, Cataldo CB. Antioxidant Nutrients and Nonnutrients in Disease Prevention. 7th ed. New York: West Publishing, 1998: 421-428.
2. Burton GW, Traber MG. Vitamin E: Antioxidant Activity Biokinetics and Bioavaiability. Ann Rev Nutr 1990: 10: 357-82.
3. Packer L. Protective Role of Vitamin E in Biological Systems. Am J Clin Nutr 1991: 53: 1050S-1055S.
4. Tangney CC. Vitamin E and Cardiovascular Disease. Nutr Today 1997: (Jan/Fe): 13-22.
5. Esterbauer H, et al. Continuous Monitoring of in Vitro Oxidation of Human Low Density Lipoprotein. Free Rad Res Comm 1989: 6: 67-75.
6. Gatto LM, Samman S. The Effect of Zinc Supplementation on Plasma Lipids and LDL Oxidation in Males. Free Rad Biol Med 1995: 19: 517-521.
7. Markwell MA, et al. A Modification of the Lowry Procedure to Simplify Protein Determination in Membrane and Lipoprotein Samples. Ann Biochem 1978: 87: 206-210.
8. Esterbauer H, et al. The Role of Lipid Peroxidation and Antioxidants in Oxidative Modification of LDL. Free Rad Biol Med 1992: 13: 341-390.
9. Abbey M, Nestel PJ, Baghurst PA. Antioxidant Vitamins and Low Density Lipoprotein Oxidation. Am J Clin Nutr 1993: 58: 525-32.
10. Wilcox JG, et al. Cardio Protective Effects of Individual Conjugated Equine Estrogens Through Their Possible Modulation of Insulin Resistance and Oxidation of Low Density Lipoprotein. Fertil Steril 1997: 67: 57-62.
11. Kritchevsky D. Antioxidant Vitamins in the Prevention of Cardiovascular Disease. Nutr Today 1992: (Jan/Feb): 30-33.
12. Riemersma RA. Epidemiology and the Role of Antioxidants in Preventing Coronary Heart Disease: A Brief Overview. Proc Nutr Soc 1994: 53: 59-65.

Determination of the Lag Time or Susceptibility in LDL Oxidation Procedure

Naghii M.R

ABSTRACT

Much researches has focused on the theory that antioxidant nutrients act as scavengers of oxygen derived free radicals, thereby helping to prevent cell and tissue damage that otherwise would give rise to degenerative diseases such as atherosclerosis caused by LDL oxidation.

Findings from extensive studies suggested that the determination of lag objective procedure for determining the susceptibility of LDL towards oxidation as well as of pro and antioxidants, particularly fat soluble vitamines. In this study, the Lag-time or oxidation resistance for LDL samples, obtained from 8 healthy male adult subjects was found to be between 40-50 minutes.

It is evident that the intake of dietary antioxidants or supplements can increase the resistance or Lag- time and the measurement of Lag- phase could be a highly promising routine method for measuring the total antioxidant status of LDL and its susceptibility towards oxidative conditions.

Key Words: Antioxidants/ Lipoproteins, LDL