LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

27 NOV 1995

STUDIES OF DOSE- AND TIME-EFFECT RELATIONSHIPS OF COPPER-INDUCED OXIDATION OF LIPOPROTEINS

NANTEETIP LIMPEANCHOB

A THESIS SUBMITED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUEIRMENTS FOR THE DEGREE
OF MASTER OF SCIENCE
(PHARMACOLOGY)

ฉบับบัณฑิตวิทยาลัย
รับที่
.....

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1996

Copyright by Mahidol University

TH
N191B
1996

37475

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณและระยะเวลาของกระบวนการออกซิเดชันของไลโปโปรตีนด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต

ผู้วิจัย นันทิกิพ ลิ้มเพียรชอบ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เภสัชวิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

อุดม จันทรารักษ์ศรี, Ph D

ยุพิน สังวรินทะ, Ph D

สุภินันท์ อัญเชิญ, Ph D

วันที่สำเร็จการศึกษา 9 กันยายน พ ศ 2539

บทคัดย่อ

กระบวนการออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิด LDL (Low density lipoprotein) ไปเป็น modified LDL เป็นขั้นตอนสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะผนังหลอดเลือดตีบตัน (Atherosclerosis) ในการศึกษานี้ได้ใช้คอปเปอร์ซัลเฟตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL ในหลอดทดลอง LDL ถูกแยกมาจากพลาสมาโดยวิธีปั่นแยกแบบ Sequential ultracentrifugation และนำมาศึกษาถึงลักษณะการออกซิเดชันในหลอดทดลอง ด้วยการเติมคอปเปอร์ซัลเฟตในปริมาณต่างๆ กัน การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของLDL ในส่วนไขมันกระทำโดยการวัดปริมาณของ conjugated dienes และ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) และส่วนที่เกิดกับ apoprotein ซึ่งกระทำโดยติดตามค่าของ fluorescence ที่เกิดจาก tryptophan ที่ถูกทำลายหรือ ค่าจาก Schiff bases ที่เพิ่มสูงขึ้นจากส่วนของโปรตีนใน LDL ที่ถูกเปลี่ยนแปลงไป การออกซิเดชันของ LDL ด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ จะมีลักษณะเป็นแบบ all or none คือ LDL จะถูกกระตุ้นให้เกิดการออกซิเดชันได้ด้วยคอปเปอร์ในปริมาณที่มากเพียงพอปริมาณหนึ่ง (a critical amount of copper) ปริมาณคอปเปอร์ที่น้อยกว่าค่านี้จะไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้ เมื่อเพิ่มปริมาณของ LDL ในหลอดทดลอง จะต้องเพิ่มปริมาณของคอปเปอร์ซัลเฟตให้เป็นสัดส่วนกับปริมาณ LDL ที่เพิ่มขึ้น ปริมาณคอปเปอร์ซัลเฟตที่ต้องการนี้ นอกจากจะขึ้นกับความเข้มข้นของ LDL ในหลอด

ทดลองแล้ว ยังพบว่าค่านี้จะแตกต่างกันใน LDL ที่แยกมาจากต่างบุคคลกัน ดังนั้นปริมาณของคอปเปอร์ที่ต้องการใช้ในการเร่งการออกซิเดชันของ LDL อาจบ่งชี้ถึงความไวของ LDL จากแหล่งต่างๆ กันต่อการถูกออกซิไดซ์ (Oxidizability of LDL) และจากการศึกษาความไวต่อการถูกออกซิไดซ์ของ LDL จากผู้ป่วย Thalassemia ซึ่งมีภาวะ oxidative stress สูงและมีภาวะคอลเลสเตอร์รอลในเลือดต่ำ เปรียบเทียบกับคนปกติ พบว่า LDL ของผู้ป่วยมีความไวต่อการถูกกระตุ้นได้ด้วยคอปเปอร์ในปริมาณที่ต่ำกว่าปริมาณที่ใช้กับ LDL ที่ได้จากคนปกติ

นอกจากนี้ ยังพบว่า การออกซิเดชันของ HDL (High density lipoprotein) ซึ่งรวมถึง HDL_2 และ HDL_3 ด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต มีลักษณะเช่นเดียวกับการออกซิเดชันของ LDL แต่ด้วยปริมาณคอปเปอร์ซัลเฟตที่น้อยกว่า LDL ซึ่งบ่งชี้ถึงกลไกเดียวกัน คือ จะต้องมีการจับตัวกันระหว่างคอปเปอร์และ apoprotein ในอัตราส่วนที่เหมาะสมอันเป็นกระบวนการสำคัญในการเกิดการออกซิเดชันของไลโปโปรตีนด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต

การศึกษาผลของสารต้านออกซิเดชัน (antioxidants) เช่น วิตามินซี (ascorbic acid) วิตามินอี (α-tocopherol) และ probucol พบว่าสารเหล่านี้มีผลต่อ time-effect curves แต่ไม่มีผลต่อ dose-effect curves คือ สารต้านออกซิเดชันสามารถเพิ่ม lag time ของกระบวนการออกซิเดชันของ LDL ด้วยปริมาณของคอปเปอร์ซัลเฟตเท่าเดิม ส่วน EDTA ซึ่งเป็นสารที่สามารถจับกับคอปเปอร์ไอออนได้ สามารถเพิ่มค่าความต้องการใช้คอปเปอร์ซัลเฟตตามอัตราส่วนของปริมาณ EDTA ที่เติมในหลอดทดลอง

จากการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า กระบวนการออกซิเดชันของไลโปโปรตีนทั้ง LDL และ HDL ด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตนั้นมีลักษณะเฉพาะ คือ ปฏิกิริยาออกซิเดชันจะเกิดขึ้นได้ต้องมีปริมาณของคอปเปอร์และไลโปโปรตีนในอัตราส่วนที่เหมาะสม ปริมาณของคอปเปอร์ที่ใช้เพื่อเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันนั้นอาจเรียกเป็นค่า "ความต้องการคอปเปอร์" ของไลโปโปรตีน ซึ่งจะเป็นค่าเฉพาะของตัวอย่างไลโปโปรตีนนั้นๆ คือ บุคคลที่มีไลโปโปรตีนไวต่อการออกซิเดชันด้วยคอปเปอร์จะมีค่าความต้องการคอปเปอร์ในปริมาณที่น้อยกว่า การศึกษานี้อาจบอกได้ถึง ความไว หรือความต้านทาน ต่อการออกซิเดชันของไลโปโปรตีนได้ ด้วยการอ่านค่าความต้องการคอปเปอร์ ซึ่งจะเกี่ยวพันกับ ชนิด แหล่งที่มา และความเข้มข้นของไลโปโปรตีน การออกซิเดชันของ LDL ด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต เกิดจากกลไกของ free radicals เนื่องจากสามารถยับยั้งได้โดยสาร antioxidants

Thesis Title Studies of Dose- and Time-effect Relationships of Copper-induced Oxidation of Lipoproteins

Name Nanteetip Limpeanchob

Degree Master of Science (Pharmacology)

Thesis Supervisory Committee

Udom Chantharaksri, Ph.D.
Yupin Sanvarinda, Ph.D.
Supeenun Unchern, Ph.D.

Date of Graduation 9 September B.E. 2539 (1996)

ABSTRACT

Oxidative modification of low density lipoprotein(LDL) was known to play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis in both animal and human. This study was to explore the time- and dose-effect of the nature of copper-induced oxidation of LDL following the incubation of native LDL with $CuSO_4$ *in vitro*. The LDL was prepared by a sequential-density gradient ultracentrifugation method. The conjugated dienes and TBARS were measured as markers of oxidized LDL. $CuSO_4$ in the doses varying from 10 to 50 μM showed an all or none effect on the oxidation of LDL; when 100 μl (plasma equivalent) of LDL from different individual was present in the incubation mixture. Increasing amounts of LDL in the incubation mixture dampened the "oxidative capability" of $CuSO_4$ unless an additional amount or an equimolar concentration of copper was added to match the increment of LDL content, suggesting that copper-catalyzed oxidation of LDL was a specific process, i.e. in need of a critical amount of copper to interact with the lipoprotein prior to the initiation of the oxidative process. The relationship of the proportional increment of both copper and the corresponding LDL molecules

Copyright by Mahidol University

supported such contention. Thus the required amount of copper for initiating an all or none oxidation of LDL in the preparation could reflect or taken as a marker that inversely related to the "oxidizability" of LDL in the sample.

Besides the LDL, high density lipoprotein either HDL_2 or HDL_3 seem to share this common behavior of copper-induced oxidation of lipoproteins. A critical amount of the copper, presumably being needed for binding to its binding sites in the apoprotein of lipoproteins, less copper was needed for HDL than LDL. The LDL of thalassemia patients whose blood was under excessive oxidative stress but less in lipoproteins with hypocholesterolemia in particular were used in the study. The LDL preparation from thalassemia was more sensitive to the copper-catalyzed LDL oxidation (less copper was needed) than that of normal-volunteer. This again reemphasized the role of apoprotein in copper-induced oxidation of lipoproteins.

Micromolar concentrations of antioxidants (ascorbic acid and α-tocopherol) were able to shift the time-effect curves to the right without affecting the dose-effect relationship. Probucol, a highly effective antioxidant was able to do the same, but with the dose of 10-time less than those of ascorbic acid and α-tocopherol. In contrast, the EDTA which acted as a copper chelating agent was able to shift the dose-effect curve to the right. From the analysis of time-effect relationship, it always found that the effects on the formation of conjugated dienes preceeced that of TBARS, suggesting that formation of conjugated dienes was an preceeding step before the final oxidation of lipids, TBARS were formed.

It was concluded from these studies that copper-catalyzed oxidation of LDL is an unique process; it required a critical amount of copper to bind to LDL molecule before the oxidative process can be initiated. This behavior also found in the oxidation of HDL. The need of a critical amount of copper to bind to lipoproteins had been proposed

in this study as a marker in determining the susceptibility or resistance of that particular lipoprotein preparation; types, sources and concentrations of the lipoproteins. It could also be concluded that the oxidation of LDL by copper was mediated by a free radical mechanism via the formation of conjugated dienes coinciding with the lag time before the formation of TBARS and was prolonged by antioxidants.

Copyright by Mahidol University