LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

AN *IN VITRO* MODEL FOR THE STUDY OF Fe-CATALYZED OXIDATION OF LDL

KWANTA PITAKNANTAKUL

A THESIS SUBMITED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (PHARMACOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1998

ISBN 974-661-409-6

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

With compliments
of
สมเกียรติ ย. ชีวิน

TH
W91
238

Copyright by Mahidol University

3636011 SCPM/M : MAJOR : PHARMACOLOGY ; M.Sc. (PHARMACOLOGY)
KEY WORD : LOW DENSITY LIPOPROTEIN / LDL OXIDATION / IRON / ASCORBATE / REDOX CYCLING

KWANTA PITAKNANTAKUL : AN *IN VITRO* MODEL FOR THE STUDY OF Fe-CATALYZED OXIDATION OF LDL. THESIS ADVISOR : UDOM CHANTHARAKSRI Ph.D., YUPIN SANVARINDHA Ph.D., SUPEENUN UNCHERN Ph.D. 135 p. ISBN 974-661-409-6

Lipid peroxidation is one of the most commonly studied markers of oxidative damages when iron is presumed to play a pivotal role. Oxidative modification of lipids, low density lipoprotein (LDL) in humans has been taken as an important early marker in the pathogenesis of atherosclerosis. This study was aimed to explore in depth an *in vitro* model for the study of Fe-induced oxidation of LDL. Emphasis was on the delineation of basic underlying mechanisms of how iron-induced oxidative damages. The studies also provide an insightful understanding of the pathophysiology of thalassemia syndrome in which iron plays the pivotal role.

The LDL was prepared from serum of normal volunteers by a sequential-density gradient ultracentrifugation method. Conjugated dienes and TBARs were monitored as markers of the oxidized lipids. Incubation of LDL with $FeSO_4$ resulted in an extremely low level of TBARs in the medium, whereas the inclusion of ascorbic acid promoted the generation of TBARs in a dose-and time-dependent manner. The result clearly suggested that ascorbate was required for the Fe-induced oxidation of LDL. Interestingly, a complete reduction of iron by converting all iron into the Fe^{2+}-form with millimolar concentrations of ascorbate ceased the Fe-catalyzed oxidation of LDL. Thus, not just its level but the dynamic regeneration of the "active reduced form" of iron, Fe^{2+} was the essential component in mediating the oxidation of LDL. Therefore the role of ascorbate in the oxidation of lipids was partly due to its action as an iron reducing agent, and more importantly due to its ability in maintaining the "dynamic redox cycling" of iron. The latter was indeed the key factor in regulating the Fe-catalyzed oxidation of LDL. The results led us to conclude that the iron redox cycling was an essential step responsible for the regulation of Fe- induced oxidation of LDL *in vitro*.

Oxidation of LDL by Fe was mediated by a free radical mechanism, involving the Fenton reaction and decomposition of preformed lipid hydroperoxides in the LDL. The significant role of preformed lipid hydroperoxides (LOOH) within LDL in the initiation step of Fe-catalyzed oxidation of LDL was also evident as the oxidation of LDL could be completely abolished with ebselen, a glutathione peroxidase-mimetic selenoorganic compound. The evidence for the requirement of ascorbate in regenerating Fe^{2+} and the inhibitory data on LDL oxidation by SOD, catalase or hydroxyl radical scavengers (mannitol, thiourea, ethanol and DMSO) confirmed the validity of Fenton reaction in the oxidative process.

Protection against Fe-catalyzed oxidation of LDL by a number of antioxidants was demonstrated in this study. Antioxidant enzymes, SOD and catalase markedly inhibited Fe-induced oxidation of LDL. Iron chelators (desferrioxamine, CP 20 and CP 94) were also shown to have remarkable inhibitory effect in the oxidation of LDL whereby the sufficient amounts of chelators to bind all iron was necessary. The relative potency of chain-breaking antioxidant that inhibited TBARs formation was in the order of trolox > probucol > α-tocopherol. Interestingly, curcumin exerted antioxidative effect, while its action as an iron reductant was also observed. The protective action of these antioxidants against Fe-catalyzed oxidation of LDL *in vitro* rendered the possibility of their potential benefits in controlling the pathophysiological sequeleae of iron overload.

3636011 SCPM/M : สาขาวิชา : เภสัชวิทยา ; วท.ม. (เภสัชวิทยา)

ขวัญตา พิทักษ์นันทกุล : แบบจำลองการศึกษา กระบวนการออกซิเดชั่นที่ถูกเร่งโดยเหล็กของไลโปโปรตีนชนิด LDL (An *in vitro* model for the study of Fe-catalyzed oxidation of LDL) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : อุดม จันทรารักษ์ศรี Ph.D., ยุพิน สังวรินทะ Ph.D., สุภีนันท์ อัญเชิญ Ph.D. 135 หน้า. ISBN 974-661-409-6

กระบวนการออกซิเดชั่นของไขมันในไลโปโปรตีนชนิด LDL (low density lipoprotein) ไปเป็น oxidized LDL เป็นขั้นตอนพื้นฐานสำคัญของการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว (atherosclerosis) และเนื่องจากกระบวนการออกซิเดชั่นของไขมันจัดเป็นหนึ่งในกระบวนการทำลายที่เหล็กมีบทบาทสำคัญยิ่ง ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีขึ้นเพื่อนำเสนอแบบจำลองในหลอดทดลองที่สามารถใช้เพื่อศึกษาถึงบทบาทของเหล็กต่อกระบวนการออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้นที่ LDL

LDL เตรียมได้จากพลาสมาของคนปกติด้วยวิธี sequential density gradient centrifugation ระดับของ TBARs และ conjugated diene เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับส่วนไขมันของ LDL การออกซิเดชั่นของ LDL โดยใช้เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) เป็นตัวเหนี่ยวนำ ส่งผลให้เกิด TBARs ในระดับที่ต่ำมาก แต่เมื่อเติมวิตามินซี (ascorbate) ลงไป พบว่าระดับของ TBARs เพิ่มขึ้นสูงมากอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองนี้บ่งชี้อย่างชัดเจนว่าวิตามินซีเป็นปัจจัยร่วมกับเหล็กที่สำคัญต่อกระบวนการออกซิเดชั่นของ LDL โดยวิตามินซีจะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนเหล็กที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์ (Fe^{3+}) ให้กลับมาอยู่ในรูปรีดิวซ์ (Fe^{2+}) อันเป็นปฏิกริยาร่วมที่สำคัญเมื่อใช้เหล็กเหนี่ยวนำให้เกิดการออกซิเดชั่นของ LDL เป็นที่น่าสนใจว่าวิตามินซีที่ความเข้มข้นระดับสูงถึงมิลลิโมล่าร์ขึ้นไปนอกจากจะทำให้เหล็กถูกเปลี่ยนกลับมาอยู่ในรูป Fe^{2+} จนหมดแล้ว ยังส่งผลให้กระบวนการออกซิเดชั่นของ LDL ถูกยับยั้งด้วย ดังนั้นบทบาทของวิตามินซีในกระบวนการออกซิเดชั่นของ LDL ด้วยเหล็ก จึงไม่ได้จำกัดอยู่เพียงแค่การเปลี่ยนให้เหล็กกลับมาอยู่ในรูป Fe^{2+} เท่านั้น หากแต่มีความสำคัญในแง่ของการทำให้เหล็กสามารถเปลี่ยนรูปไปมาระหว่าง รูปออกซิไดซ์และ รูปรีดิวซ์ (redox cycling) ซึ่งถือเป็นกุญแจสำคัญในปฏิกิริยาควบคุมการออกซิเดชั่นของ LDL ด้วยเหล็ก ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงใดๆ ที่ส่งผลกระทบต่อ ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นหรือรีดักชั่นของเหล็ก ย่อมส่งผลกระทบต่อกระบวนการ redox cycling ของเหล็ก อันจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของกระบวนการออกซิเดชั่นของ LDL หรืออาจสรุปได้ว่ากระบวนการ redox cycling ของเหล็กเป็นปัจจัยสำคัญยิ่งยวดที่ควบคุมกระบวนการออกซิเดชั่นของ LDL ด้วยเหล็ก

เหล็กทำให้เกิดการออกซิเดชั่นขึ้นที่ LDL โดยเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ (free radical chain reactions) ซึ่งมีสองกลไกที่เกี่ยวข้องคือ Fenton reaction และ การสลายตัวของ preformed lipidhydroperoxideภายในLDL (Decomposition of preformed lipid hydroperoxide within LDL) ความต้องการวิตามินซีเพื่อเปลี่ยนเหล็กในรูปออกซิไดซ์ให้กลับมาอยู่ในรูป Fe^{2+} ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในการเกิด Fenton reaction, การยับยั้งการออกซิเดชั่นของ LDL โดยเอนไซม์ SOD, catalase และสารที่เป็น $HO^{\bullet}$ radical scavengers อันได้แก่ mannitol, thiourea ,ethanol และ DMSO ล้วนเป็นข้อสนับสนุนว่า Fenton reaction เป็นกลไกหนึ่งในกระบวนการออกซิเดชั่นของ LDL ด้วยเหล็ก การที่ ebselen ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์เหมือนเอนไซม์ glutathione peroxidase สามารถยับยั้งกระบวนการออกซิเดชั่นของ LDL ด้วยเหล็กได้ ยืนยันถึงความสำคัญของ lipid hydroperoxide ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการออกซิเดชั่นของ LDL ด้วยเหล็ก

สารต้านออกซิเดชั่น (antioxidant) หลายชนิดสามารถแสดงผลยับยั้งกระบวนการออกซิเดชั่นของ LDL ด้วยเหล็กได้เป็นที่น่าพอใจ เช่น เอนไซม์ SOD และ catalase, สารขับเหล็ก (iron chelator) อันได้แก่ DFO, CP20 และ CP94 รวมถึงสารต้านออกซิเดชั่นในกลุ่ม chain breaking antioxidant ซึ่งมีประสิทธิภาพเรียงตามลำดับจากมากไปน้อย คือ trolox > probucol > α-tocopherol ส่วน curcumin ซึ่งเป็นสารสำคัญในขมิ้นชันนั้นนอกจากมีคุณสมบัติในการเปลี่ยนเหล็กในรูปออกซิไดซ์ให้กลับมาอยู่ในรูปรีดิวซ์ได้แล้ว ยังพบว่าเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการต้านการออกซิเดชั่นของ LDL ด้วยเหล็กอีกด้วย