

## SAĞLIKLI KİŞİLERDE DÜŞÜK DANSİTELİ LİPOPROTEİNLERİN KOLESTEROL İÇERİĞİ İLE PEROKSİDASYON POTANSİYELİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ

Jale BALKAN, Ümit MUTLU-TÜRKOĞLU, Gülçin TOKER, Müjdat UYSAL\*

### ÖZET

Yaşları 27-79 arasında değişen (ort. 56.6, SD 19.4) 50 sağlıklı kişinin plazmasından tamponlanmış heparin kullanılarak elde edilen düşük dansiteli lipoprotein (LDL) fraksiyonunda endojen dien konjugat düzeyleri ve bakırla inkübasyon sonrası oluşan malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçüldü. LDL'nin endojen dien konjugat düzeyleri ve bakırla inkübasyon sonrası oluşan malondialdehit düzeylerinin LDL'nin kolesterol içeriğiyle pozitif korelasyon gösterdiği saptandı. Bu bulgulara göre, LDL'nin oksidasyon potansiyelinin kolesterol içeriği ile yakın bir ilişki gösterdiğini söyleyebiliriz.

**Anahtar kelimeler:** Düşük dansiteli lipoproteinler (LDL), lipid peroksidleri, LDL-kolesterol, plazma

### SUMMARY

*The investigation of relationship between cholesterol content and peroxidation potential of low density lipoproteins in healthy subjects.* In this study, we determined endogenous diene conjugate levels and the susceptibility to copper-induced lipid peroxidation of low density lipoproteins (LDL) isolated by precipitation with buffered heparin from plasma in healthy 50 subjects, aged 27-79 years (means 56.6, SD 19.4). Positive correlations were found to exist between LDL endogenous diene conjugate levels, copper-induced malondialdehyde levels and LDL-cholesterol content. According to these findings, we can say that the oxidation potential of LDL may be related to LDL-cholesterol content.

**Key words:** Low density lipoprotein (LDL), lipid peroxidation, LDL-cholesterol, plasma

### GİRİŞ

Düşük dansiteli lipoprotein (LDL) kolesterol içeriğindeki artış ile ateroskleroz oluşumu arasında anlamlı bir ilişki bulunmaktadır (3,7). Bunun nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, oksitlenmiş LDL'nin ateroskleroz plakları oluşumunda etkin bir rol oynadığı kabul edilmektedir (11,12,17,22). Gerçekten, ateroskleroz plaklarında oksitlenmiş LDL'nin varlığı gösterilmiştir (22,23). Bu nedenle, LDL oksidasyonu üzerinde incelemeler ateroskleroz çalışmalarında özel bir önem kazanmıştır (6,11,12,22). Bu çalışmalar genellikle uzun süreli ultrasantrifüj ve dializ işlemleri gerektiren bir yöntemle plazmadan elde edilen LDL fraksiyonunda gerçekleştirilmiştir. Ancak bu

izolasyon işlemlerinin LDL'de ek oksidasyonlara ve antioksidan içeriğinde azalmalara yol açması ve uzun sürmesi sakıncalı yöntemlerdir (1,2,24). Ahotupa ve ark. (1), klinik biokimya laboratuvarlarında uygulanması kolay bir yöntemle, EDTA'lı plazmadan tamponlanmış heparinle elde ettikleri LDL'nin endojen dien konjugat düzeylerini ölçmüşler ve bu yönteminin ateroskleroz çalışmalarında LDL oksidasyonunu değerlendirmede yararlı olabileceğini vurgulamışlardır (2).

Öte yandan, LDL'yi in vitro koşulda bakırla inkübe ederek oluşan oksidasyon ürünlerini (dien konjugat, malondialdehit, lipid peroksidler ve floresan ürünler gibi) ölçmek ateroskleroz çalışmalarında önemli bir yer tut-

maktadır . Bu oksidasyon kinetiğinin incelenmesi, gerek LDL'nin lipid bileşimi ve gerekse antioksidan kapasitesi hakkında bize bilgi vermektedir (6,12,15).

Çalışmamızda tamponlanmış heparin kullanılarak sağlıklı kişilerin plazmasından elde edilen LDL fraksiyonunda gerek endojen dien konjugatı düzeyleri ve gerekse bakırla inkubasyon sonucu oluşan malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçülerek, bu düzeylerin LDL'nin kolesterol içeriği ile ilgisi araştırıldı.

## MATERYAL ve METOD

Bu çalışma yaşları 27-79 arasında değişen (Ort. SD;  $56.6 \pm 19.4$ ), 25 erkek ve 25 kadın olmak üzere 50 sağlıklı kişide gerçekleştirildi. Bu kişilerin benzer sosyoekonomik koşullara ve besin alışkanlıklarına sahip olmasına özen gösterildi. Daha önceden miyokart infarktüsü geçirenler, diabetes mellitus, karaciğer, böbrek ve tiroid hastalığı olanlar araştırma dışında bırakıldı. İncelenen kişiler antioksidan vitaminler ve lipid düşürücü ilaçlar kullanmamaktaydı.

Kan örnekleri bir gece açlıktan sonra EDTA'lı tüplere alındı. 30 dakika içinde plazmaları ayrıldı ve kullanılıncaya kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ ' de saklandı. LDL eldesi için; 1 ml serum, 7 ml 0.064 M trisodyum sitrat ve 50 000 IU/L heparin içeren tamponla (pH 5.05) karıştırıldı, oda ısısında 10 dakika bekletildi , 1000xg'de 10 dakika santrifüj edildi ve pellet 1 ml 0.1 M Na-fosfat tamponunda (pH 7.4) süspand edilerek LDL fraksiyonu elde edildi (21). LDL fraksiyonunun kolesterol içeriği enzimatik yöntemle belirlendi.

a) LDL'nin endojen dien konjugatı düzeylerinin belirlenmesi için LDL fraksi-

yonundan 0.1 ml alındı ve kloroform-metanol karışımı (2:1) ile lipitleri ekstre edildi ve azot altında kurutuldu. Daha sonra kuru lipit kalıntısı sikloheksana alınarak dien konjugatları 234 nm'de spektrofotometrede ölçüldü, sonuçlar ekstinksyon katsayısı ( $2.95 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) kullanılarak hesaplandı ve nmol/ml LDL olarak verildi (1).

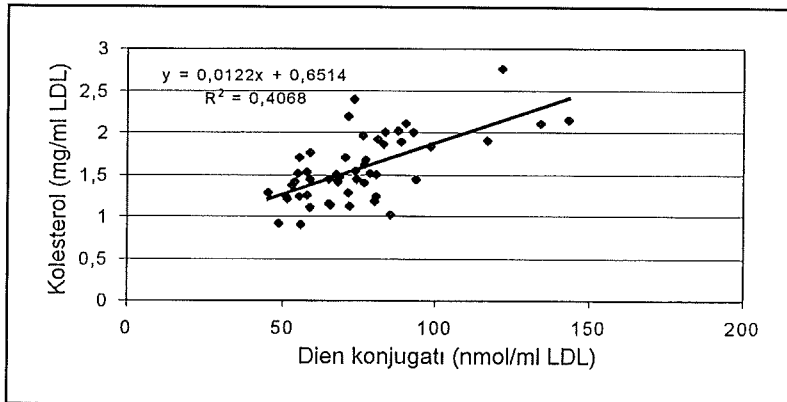
b) LDL'nin lipid peroksidasyonuna duyarlılığın ölçülmesi için ortamda 100 µg kolesterol bulunacak şekilde LDL fraksiyonu alındı ve son konsantrasyon 50 µM olacak şekilde bakır sülfatla 75, 180 dakika ve 24 saat süreyle  $37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi (8,24). İnkübasyon sonrası oluşan MDA düzeyleri Buege ve Aust (4) tarafından önerilen yöntemle tayin edildi. Sonuçlar nmol MDA/ml LDL olarak verildi.

Korelasyon katsayıları Spearman metoduna göre hesaplandı.

## BULGULAR

Çalışmamızda 50 sağlıklı kişide LDL-kolesterol düzeyleri 0.9-2.75 mg/ml LDL arasında ( $1.57 \pm 0.40 \text{ mg/ml LDL}$ ) bulundu. LDL fraksiyonunun endojen dien konjugat düzeyleri ise 45.4 -143.7 nmol/ml LDL arasında ( $75.1 \pm 20.8 \text{ nmol/ml LDL}$ ) saptandı ve LDL'nin endojen dien konjugat düzeyleri ile LDL-kolesterol düzeyleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulundu (Şekil 1). LDL fraksiyo-

Şekil 1. LDL'nin endojen dien konjugatı düzeyleri ile kolesterol içeriği arasındaki korelasyon

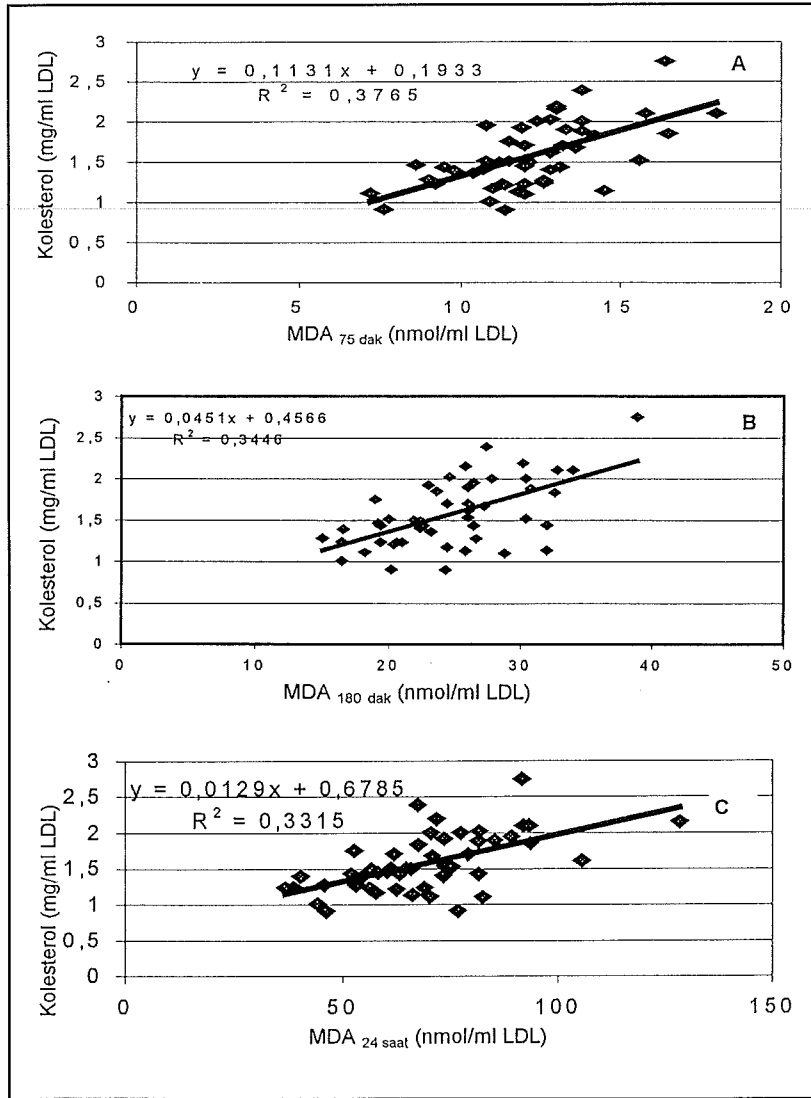


nu bakırla inkübe edildiğinde inkübasyon-  
dan 75 dakika sonra MDA düzeyleri  $12.2 \pm$   
 $2.16$  nmol/ml LDL, 180 dakika sonra  $24.6 \pm$   
 $5.18$  nmol/ml LDL, 24 saat sonra  $68.7 \pm$   
 $17.7$  nmol/ml LDL olarak ölçüldü. Bakırla  
inkübasyon sonrası oluşan MDA düzeyleri  
de LDL'nin kolesterol içeriği ile anlamlı poz-  
itif korelasyonlar gösterdi (Şekil 2 A-C).

## TARTIŞMA

LDL oksidasyonun damarların intima taba-  
kasında gerçekleştiği kabul edilmektedir

Şekil 2. LDL'nin in vitro bakır ile inkübasyonu sonucu 75 dakika (A), 180 dakika  
(B) ve 24 saat sonra (C) oluşan MDA düzeyleri ile LDL fraksiyonunun kolesterol  
içeriği arasındaki korelasyonlar



(7,12,16,17). Plazmanın güçlü antioksidan po-  
tansiyeli nedeniyle <sup>(10)</sup>, bu oksidasyonun  
plazmada oluşmadığı benimsenmektedir  
<sup>(2,11)</sup>. Bununla birlikte, arter duvarında oksit-  
lenen LDL'nin bir bölümü tekrar genel dola-  
şıma katılmaktadır <sup>(2,11)</sup>. Bu nedenle, plaz-  
mada endojen oksitlenmiş LDL düzeyleri-  
nin ölçülmesi, bir bakıma damar duvarında  
gerçekleşen oksidasyon hakkında bize bilgi  
vermektedir. Bu düşünceyle çalışmamızda  
50 sağlıklı kişide Ahotupa ve ark. <sup>(1)</sup> tarafın-  
dan önerilen izolasyon yöntemi ile elde edi-  
len LDL fraksiyonunda endojen dien konju-  
gat düzeyleri ölçüldü. El-

de edilen sonuçlar litera-  
türdeki sonuçlarla uyum  
göstermektedir <sup>(1,2)</sup>. Ayırı-  
ca, LDL'nin endojen dien  
konjugatı düzeylerinin  
LDL'nin kolesterol içeri-  
ği ile anlamlı pozitif ko-  
relasyon gösterdiği bu-  
lunmuştur. Öte yandan,  
çalışmamızda LDL tane-  
cikleri in vitro koşulda  
bakırla belirli zaman di-  
limlerinde inkübe edile-  
rek, oluşan MDA düzey-  
leri ölçülmüş ve böylece  
LDL'nin oksidasyona du-  
yarlılığı belirlenmek ist-  
enmiştir. Sonuçlarımıza  
göre, bakırla inkübe edi-  
len LDL taneciklerinde  
MDA düzeylerinin inkü-  
basyon süresine bağlı  
olarak giderek arttığı ve  
bu artışın da LDL-koles-  
terol düzeyleri ile anlamlı  
pozitif korelasyon göster-  
diği bulundu. Bu sonuçla-  
ra göre, LDL-kolesterol  
düzeylerindeki artış,  
LDL'nin gerek endojen  
lipid peroksit düzeylerini  
ve gerekse oksidasyona

duyarlılığını tayin eden önemli bir faktör olarak gözükmektedir.

İnsanlarda hiperkolesterolemi, ateroskleroz ve lipit peroksidasyonu arasındaki ilişkiler, biz (5,13,14,18,19) ve diğer araştırmacılar (16,22) tarafından incelenmiştir. Bazı aksi görüşlere rağmen (9,16,20), bu çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular da LDL fraksiyonunda kolesterol içeriği arttıkça, LDL'deki oksidasyon ürünlerinin ve/veya oksidasyona eğilimin arttığını açıkça göstermektedir.

### KAYNAKLAR

1. Ahotupa M, Ruutu M, Mantyla E: Simple methods of quantifying oxidation products and antioxidant potential of low density lipoproteins. *Clin Biochem* 29: 139 (1996).
2. Ahotupa M, Vasankari TJ: Baseline diene conjugation in LDL lipids: An indicator of circulating oxidized LDL. *Free Radical Biol Med* 27: 1141 (1996).
3. Bettridge DJ, Morrell JM: Lipids and Coronary Heart Disease. Chapman and Hall Medical, London (1998).
4. Buege JA and Aust JD: Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol* 52: 302 (1978).
5. Doğru-Abbasoğlu S, Kanbağlı Ö, Bulur H, Babalık E, Öztürk S, Aykac-Toker G, Uysal M: Lipid peroxides and antioxidant status in serum of patients with angiographically defined coronary atherosclerosis. *Clin Biochem* 32: 671 (1999).
6. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G: The role of peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biol Med* 13: 341 (1992).
7. Grundy SM: Atlas of Lipid Disorders, Cholesterol, Atherosclerosis and Coronary Heart Disease, Gower Medical Publ., New York (1990).
8. Gugliucci A, Menini T, Stahl AJC: Susceptibility to copper-enhanced autoxidation of VLDL+LDL fractions from diabetic patients. *Biochem Mol Biol Inter* 32: 139 (1994).
9. Halevy D, Thiery J, Nagel D, Arnold S, Erdmann E, Höfling B, Cremer P, Seidel D. Increased oxidation of LDL in patients with coronary artery disease is independent from dietary vitamins E and C. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1432 (1997).
10. Halliwell B and Gutteridge JMC: The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280: 1 (1990).
11. Itabe H: Oxidized phospholipids as a new landmark in atherosclerosis. *Prog Lipid Res* 37: 181 (1998).
12. Jialal I, Devaraj S: Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem* 42: 498 (1996).
13. Mehmetçik G, Toker G, Uysal M: Endogenous and copper-induced lipid peroxidation and antioxidant activity of serum in hypercholesterolemic subjects. *Horm Metab Res* 29: 63 (1997).
14. Özdemirler G, Öztezcan S, Toker G, Uysal M: Peroxidation status of erythrocytes and apolipoprotein B containing lipoproteins in hypercholesterolemic subjects. *Internat J Vit Nutr Res* 67: 130 (1997).
15. Sattler W, Malle E, Kostner GM: Methodological approaches for assessing lipid and protein oxidation and modification in plasma and isolated lipoproteins. *Method Mol Biol* 110: 167 (1998).
16. Schwenke DC: Antioxidants and atherogenesis. *J Nutr Biochem* 9: 424 (1998).
17. Uysal M: Ateroskleroz, kalb-damar hastalıkları ve serbest radikaller. *Aktüel Tıp Dergisi* 5: 15 (2000).
18. Uysal M, Kanbağlı Ö, Doğru-Abbasoğlu S, Mehmetçik G, Özdemirler G, Aykac-Toker G: Aterosklerozla ilişkili hastalıklarda lipit peroksidasyonu ve antioksidan sistem üzerine incelemeler. *Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 20: 141 (1999).
19. Uzel N, Sivas A, Uysal M, Öz H: Studies on serum peroxides in normolipidemic and hyperlipidemic individuals. *IRCS Med Sci* 13: 1039 (1985).
20. Van de Vijver LPL, Kardinaal AFM, Van Duyvenvoorde W, Kruijssen DACM, Grobbee DE, Van Poppel G, Princen HMG: LDL oxidation and extent of coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 193 (1998).
21. Wieland H, Seidel D: A simple specific method for precipitation of low density lipoproteins. *J Lipid Res* 24: 904 (1983).
22. Yla-Herttuala S: Is oxidized low-density lipoprotein present in vivo? *Curr Opin Lipidol* 9: 337 (1998).
23. Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D: Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 84: 1086 (1989).
24. Zhang A, Vertommen J, Van Gaal L, De Leeuw I: A rapid and simple method for measuring the susceptibility of low-density-lipoprotein and very-low-density-lipoprotein to copper-catalyzed oxidation. *Clin Chim Acta* 227: 159 (1994).