

Proučavanje spore oksidacije lipoproteina velike gustoće (HDL) metodom elektronske paramagnetske rezonancije

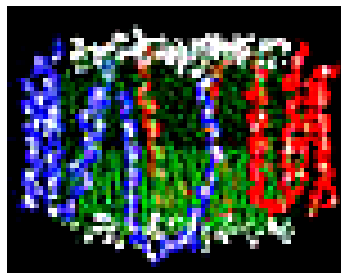
¹Nataša Stojanović, ²Dubravka Krilov i ¹Janko N. Herak

¹Zavod za biofiziku, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet

²Zavod za fiziku i biofiziku, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet

Brojna epidemiološka i klinička ispitivanja pokazuju da postoji inverzni odnos između velike koncentracije HDL-kolesterola i rizika nastanka kardio-vaskularnih bolesti.

Ta činjenica se objašnjava zaštitnom ulogom HDL čestica u sprečavanju nastanka ateroskleroznih promjena na stijenkama krvnih žila. HDL čestice pokazuju antioksidacijska i protuupalna svojstva i imaju važnu ulogu u reverznom prijenosu kolesterola. HDL čestice su velike gustoće i male veličine i čine vrlo heterogenu skupinu u odnosu na fizičko-kemijska svojstva, metabolizam i biološku aktivnost.



Danas je prihvaćeno stajalište da oksidirani lipoproteini male gustoće (LDL) doprinose nastanku i razvoju ateroskleroze, kronične upalne bolesti koja pogoduje daljnjem razvoju kardio-vaskularne bolesti. Poznato je da su i HDL čestice su također podložne oksidaciji. Postoji malo podataka o ulozi oksidiranih HDL čestica u razvoju ateroskleroze, iako postoje neke naznake da proces oksidacije može utjecati na zaštitnu aktivnost ovih čestica.

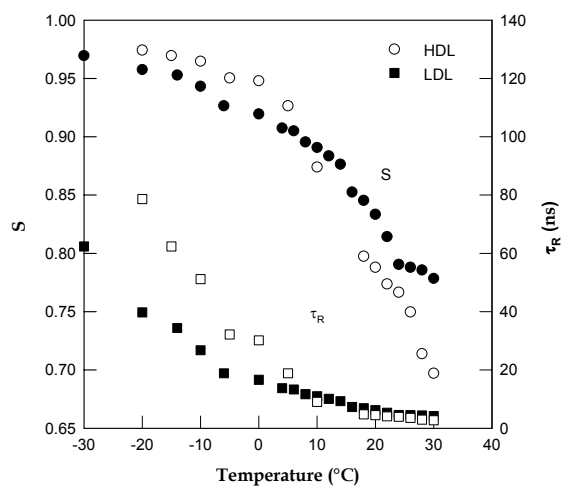
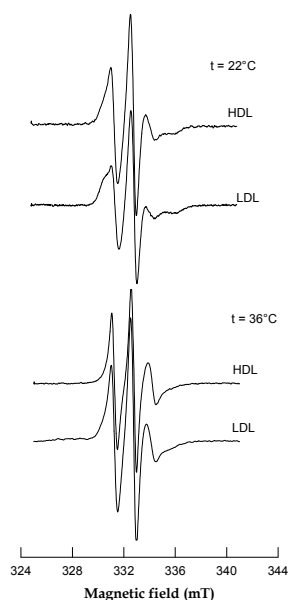
U našoj grupi već smo duže vrijeme proučavali vrlo sporu oksidaciju LDL u zatvorenom sistemu s ograničenom količinom kisika, znači u uvjetima sličnim *in vivo*. Oksidaciju smo izazivali dodatkom malih količina iona bakra u naše uzorke. Ovdje ćemo prikazati rezultate sličnog istraživanja oksidacije na uzorcima dva tipa HDL čestica, HDL₂ i HDL₃. Oksidacijski proces smo pratili metodom elektronske paramagnetske rezonancije (EPR), mjerenjem vremenske promjene dvaju oksidacijskih pokazatelja: potrošnje kisika, pomoću EPR oksimetrije (spinska proba CTPO) i koncentracije uhvaćenih slobodnih radikala, pomoću spinske stupice (PBN).

Mjerenjem potrošnje kisika i porasta broja radikala s vremenom inkubacije, ispitivali smo utjecaj količine dodanih iona bakra na dinamiku oksidacije u disperzijama HDL₂ i HDL₃ čestica. U oba tipa HDL čestica potrošnja kisika je brža u uzorcima s većom količinom bakra. Kisik se troši u lančanim reakcijama peroksidacije lipida pa ovi rezultati potvrđuju utjecaj bakra i u inicijaciji i propagaciji oksidacije. Oksidacija je brža u HDL₂ nego u HDL₃ uzorcima. Slične razlike između dva tipa HDL čestica se opažaju kod mjerenja porasta slobodnih radikala, koji je brži za veću koncentraciju bakra u uzorcima a također je brži u HDL₂ česticama. Uhvaćeni slobodni radikali mogu se opaziti u EPR spektrima tek nakon znatnog smanjenja koncentracije kisika. Radikali se mogu nalaziti u lipidnoj i/ili proteinskoj

domeni HDL čestica. U našim ranijim istraživanjima LDL oksidacije oko 90% uhvaćenih radikala je bilo vezano na proteinsku domenu. Kako je protein/lipid omjer u HDL veći nego u LDL i uz to je poznato da apolipoproteine AI and AII u HDL oksidiraju lipidni hidroperoksidi, možemo očekivati još veći udio proteinski vezanih radikala u HDL uzorcima.

Mjerenja potrošnje kisika u uzorcima s različitom koncentracijom HDL pokazala su, naprotiv, da se kisik brže troši u uzorcima s manjom koncentracijom čestica, za oba tipa čestica. Takvo ponašanje smo opažali u nekoliko neovisnih eksperimenata s uzorcima različitih donora. Suprotno tome, porast uhvaćenih slobodnih radikala je veći u uzorcima veće koncentracije HDL. Ovakvo različito ponašanje dva oksidacijska pokazatelja tijekom spore i blage oksidacije HDL možemo objasniti uzajamnom interakcijom čestica, zbog prijenosa oksidacijskih produkata s jedne čestice na drugu.

Vjerojatno je da se većina slobodnih radikala koji podržavaju lipidnu peroksidaciju stabilizira u proteinskoj domeni HDL čestice ili nestaju u reakcijama rekombinacije kao produkti koji više nisu slobodni radikali. U skladu s tom pretpostavkom očekujemo da je ukupni broj uhvaćenih slobodnih radikala veći u uzorcima s većom koncentracijom HDL. S druge strane, u disperzijama s većom koncentracijom HDL, vjerojatnije je da će nastali lipidni hidroperoksilni radikali izravno reagirati s površinski smještenim proteinima na susjednim česticama, a ne s kisikom pa se zato kisik sporije troši. To se slaže s opažanjem drugih istraživača da se u blago oksidiranom HDL apolipoproteini lakše odvajaju od čestica, nego u nativnom HDL.



Željeli smo usporediti i dinamičke parametre LDL i HDL čestica i u tu svrhu smo snimali EPR spektre uhvaćenih radikala na različitim temperaturama. Na lijevoj slici se vidi da su linije spektara HDL uzorka uvijek uže nego LDL uzorka što ukazuje na slobodnije gibanje spinske stupice. Iz EPR spektara smo odredili temperaturnu ovisnost dva pokazatelja gibanja: parametra uređenosti (S) i rotacijskog korelacijskog vremena (τ_R). Rezultati su prikazani na desnoj slici. Iz slike se vidi da se u mjerenom temperaturnom intervalu oba

parametra jače mijenjaju u HDL uzorcima. Kako rotacija vezane stupice ovisi o svojstvima okoline, očito da okolina u HDL uzorcima ima veći utjecaj na spinsku stupicu, što znači da se ona nalazi bliže površini čestice nego u LDL uzorcima.

Možemo zaključiti da je oksidacija izazvana ionima bakra u HDL složen proces i da naš prethodno razrađeni teorijski model LDL oksidacije nije prikladan za opis kinetike HDL oksidacije. Probabilistički kinetički model se osniva na tretiranju LDL čestica kao odvojenih odjeljaka u kojima se odvijaju povremeni nizovi oksidacijskih reakcija a između dva niza oksidacija postoji samo vrlo slaba interakcija između čestica. Za modeliranje oksidacije u HDL disperzijama trebalo bi istodobno uzeti u račun događaje unutar pojedine čestice i između dvije čestice.