

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษากลไกความผิดปกติของภาวะเครียดกระตุ้นต่อการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียม โดยมีสมมุติฐานว่า reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) มีผลต่อการเกิดความผิดปกติในการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียม โดยใช้ไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำที่ถูกออกซิไดซ์ (oxLDL) ขนาด 40 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ที่มีระดับการเกิดออกซิเดชัน 3 ระดับคือ เกิดออกซิเดชันระดับต่ำ (mildly) กลาง (moderately) และ สูง (fully) กระตุ้นการแสดงออกของตัวรับ LOX-1 ในระบบการเพาะเลี้ยงของหลอดเลือดแดงของสายรก พร้อมกับการศึกษาการแสดงออกของ eNOS การหลั่งไนตริก ออกไซด์ (NO) การทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dismutase, SOD) การทำงานของ p38 mitogen - activated protein kinase (p38 MAPK) และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือด ขณะเดียวกันได้ใช้ desferoxamine (DFO) เป็น ferric chelator ของปฏิกิริยา Haber-Weiss และ ethylenediamineacetic acid (EDTA) เป็น ferrous chelator ในปฏิกิริยา Fenton's reaction ของ ROS รวมทั้งใช้ butylated hydroxytoluene (BHT) เป็นตัวกำจัด peroxy radical ของการเกิดออกซิเดชันของ oxLDL

จากการศึกษาพบว่า การแสดงออกของตัวรับ LOX-1 เพิ่มขึ้นตามขนาดและระดับออกซิเดชันของ oxLDL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รวมทั้งในกลุ่มที่ได้รับ DFO, EDTA และ BHT ก่อนด้วยเช่นกัน แสดงว่าแหล่งที่ให้ ROS ภายในเซลล์เอนโดทีเลียมมาจากการทำงานของเอนไซม์ในหลอดเลือด เช่น NAD(P)H oxidase ไม่ใช่มาจากการเร่งปฏิกิริยาของเหล็ก (metal transition catalyst) เป็นที่น่าสังเกตว่า การแสดงออกของตัวรับ LOX-1 เพิ่มขึ้นมากอย่างชัดเจน ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นผลจากทั้ง ROS และ RNS ร่วมกัน และจากผลการลดการแสดงออกของ eNOS ในขนาดที่กระตุ้นด้วย oxLDL ขนาด 40 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ที่ระดับออกซิเดชันปานกลาง และสูง รวมทั้งการลดการหลั่งของไนตริกออกไซด์ (NO) ในขณะที่ SOD ลดระดับลง แสดงให้เห็นว่ามีการสร้าง peroxynitrite จากปฏิกิริยาของ $O_2^{\bullet-}$ และ NO และ peroxynitrite รวมทั้ง ROS นี้เองจะไปทำลาย โปรตีน ไขมัน เยื่อหุ้มเซลล์ รวมทั้งไปกระตุ้นการแสดงออกของตัวรับ LOX-1 ทำลายการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียม ดังจะเห็นว่าการลดการสร้าง NO และลดการแสดงออกของ eNOS มีการส่งสัญญาณรีดอกซ์ให้มีการกระตุ้นการสร้าง p38 MAPK มากขึ้นซึ่งเป็นโปรตีนไคเนสที่มีความไวต่อสัญญาณรีดอกซ์ เป็นที่น่าสังเกตว่าการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมยังคงเป็นปกติ ถ้ากระตุ้นด้วย oxLDL ขนาด 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ที่ระดับออกซิเดชัน

ต่ำ จะเห็นการแสดงออกของ eNOS เพิ่มขึ้น และยังมีการสร้างและการหลั่ง NO และเมื่อศึกษาโครงสร้างของหลอดเลือดพบว่า ทั้งในกลุ่มปกติ และกลุ่มทดลองที่ให้ oxLDL 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับออกซิเดชันต่ำ พบว่าเซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือดปกติ และมีการจัดเรียงตัวปกติ แต่ในกรณีที่มีการสูญเสียการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียม ซึ่งจะพบในกลุ่มการทดลองที่มี NO และการแสดงออกของ eNOS ลดลง โดยพบว่าเซลล์เอนโดทีเลียมจะถูกทำลาย การจัดเรียงตัวของคอลลาเจนและไฟโบรบลาสเพิ่มขึ้น พบการแทรกตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และการเรียงตัวผิดปกติไป

เป็นที่น่าสังเกตว่า การเพิ่มระดับของค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของ p38 MAPK ขึ้นกับขนาดและระดับการถูกออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของ p38 MAPK เมื่อให้ DFO, EDTA และ BHT ก่อนการทดลอง ระดับของค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของ p38 MAPK ลดลงเล็กน้อย โดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย oxLDL ที่ระดับออกซิเดชันสูงเต็มที่ ซึ่งบ่งชี้ว่า p38 MAPK เป็นโปรตีน ที่มีความไวต่อการกระตุ้นผ่าน สัญญาณรีดอกซ์

สรุปได้ว่า oxLDL กระตุ้นตัวรับ LOX-1 โดยผ่าน ROS และ RNS ร่วมกัน มีผลต่อการทำลายเซลล์เอนโดทีเลียมอย่างเห็นได้ชัดเจน และเกิดขึ้นเฉพาะ oxLDL ในขนาดตั้งแต่ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขึ้นไป และที่ระดับออกซิเดชันปานกลาง และสูง

Abstract

Our research objective is to determine underlying oxidative stress mechanism of endothelial dysfunction in atherosclerosis. We hypothesize that intracellular ROS and RNS play a crucial role in endothelial dysfunction. Various doses of 40 and 80 µg/ml oxLDL in mildly, moderately and fully degrees are used as oxidant in umbilical artery culture system. To investigate ROS, we used 10 µM DFO, ferric (Fe^{3+}) chelator in Haber-Weiss reaction and 0.3 mM EDTA, ferrous (Fe^{2+}) chelator in Fenton's reaction and also 100 µg/ml BHT for peroxy radical scavenger of oxLDL in pretreatment groups.

We found that LOX-1 expression was increased significantly as dose-degree fashion when activated by oxLDL. Surprisingly, upregulation of LOX-1 expression induced by iron chelator or even BHT pretreatment followed by oxLDL in various doses and degree was documented. These finding indicates the vascular enzymatic sources of intracellular ROS such as NAD(P)H oxidase at the endothelium. Metal-transition driven ROS does not the major vascular source generated ROS. Remarkably increased inducible expression of LOX-1 may be affected by ROS and RNS in the system. It is noteworthy that the expression of eNOS and NO production were reduced in 40 and 80 µg/ml oxLDL of moderately to fully oxidation. Moreover, reduced activity of SOD was seen clearly resulting from effects of ROS/RNS and low level of $\text{O}_2^{\bullet-}$ in the system. Dismutation rate is slower than transformation rate of $\text{O}_2^{\bullet-}$ and NO to be peroxynitrite (ONOO^-). Loss of SOD activity indicates the endothelial damage since extracellular SOD (ecSOD) is one of isoform. Both ROS and peroxynitrite, RNS, overwhelm and damage any protein, lipid, cell membrane etc. especially those of endothelium leads to reduction of NO production and eNOS expression. Notably, increased p38 MAPK activity is demonstrated from redox signalings to redox – sensitive protein kinase.

It is noticed that endothelium is still intact as seen in 40 µg/ml mildly and 10 µg/ml moderately oxLDL activation. Obviously, eNOS expression is upregulated and NO is produced indicating normal vascular function and confirmed by normal

morphology. Activation of higher doses and degrees of oxLDL leads to endothelial damage, scanty collagen and fibroblast including disoriented smooth muscle cells.

Obviously, increased mean density of p38 MAPK is presented as dose-degree dependent of oxLDL. In iron chelator (DFO, EDTA) and BHT pretreatment groups, those mean density slightly reduced especially in fully oxidation. These finding indicates the redox-sensitive protein of p38 MAPK through redox signalings.

In conclusion, activation of more than 40 µg/ml in moderately to fully oxidation through LOX-1 receptor mediated intracellular ROS and RNS leads to endothelial dysfunction in atherosclerosis.