

α -Tokoferol ve askorbik asitin HDL'nin antioksidan özelliği üzerine *in vitro* etkileri

[*In vitro* effects of α -tocopherol and ascorbic acid on antioxidant characteristics of HDL]

Gülşen Akalın Çiftçi¹,

İpek Erdoğan²,

Özkan Alataş²

¹Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

²Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

Araş. Gör. Dr. Gülşen Akalın Çiftçi

Anadolu Üniversitesi,
Eczacılık Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı,
YunusEmre Kampüsü, 26470, Eskişehir Türkiye
Tel: 0222 3350580-3728
Fax: 0222 3350750
e-posta: gakalin@anadolu.edu.tr

Kayıt Tarihi : 27 Nisan 2011; Kabul Tarihi : 18 Temmuz 2011

[Registered: 27 April 2011; Accepted: 18 July 2011]

ÖZET

Amaç: Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) proinflatuar okside fosfolipitlerin düşük yoğunluklu lipoproteinlerde (LDL) birikmesini engelleyerek oksidatif modifikasyonunu inhibe etmektedir. Antiinflatuar ve antioksidan özellikleri ateroskleroz inhibisyonunda ters kolesterol taşınma özellikleri kadar önem taşımaktadır. HDL, bu bilinen etkilerinin aksine, fonksiyonlarını kaybettiğinde prooksidan özellik kazanmaktadır. Çalışmamızın amacı, α -tokoferol ve askorbik asit gibi antioksidan vitaminlerin *in vitro* ortamda LDL'nin oksidasyonuna karşı HDL'nin antioksidan özelliğinin korunması üzerine etkilerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve yöntemler: 30 sağlıklı genç bireyin plazma HDL'leri dekstran sülfat çöktürme metodu ile elde edildi. Daha sonra bu HDL'lerin (10 μ g/ml) LDL'ye (50 μ g/ml) karşı oksidasyonu önleme kapasiteleri spektrofotometrik metod ile belirlendi. Ayrıca, aynı HDL'ler dört farklı test tüpüne eklendiler ve farklı konsantrasyonlarda α -tokoferol (sırasıyla farmakolojik ve yüksek doz olan 1.5 mg/dl ve 3 mg/dl) ve askorbik asit (sırasıyla farmakolojik ve yüksek doz olan 1.4 mg/dl ve 2.8 mg/dl) ile bir saat ayrı ayrı inkübe edildi. Daha sonra HDL'lerin tüplere eklenen 50 μ g/ml LDL'ye karşı oksidasyonu önleyici etkileri spektrofotometrik metod ile belirlendi. Ayrıca bireylerin eş zamanlı alınan serum örneklerinde HDL, LDL, TG, Lp (a), Apo A1, ApoB ve hsCRP düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: *In vitro* ortamda 1.5 mg/dl ve 3 mg/dl α -tokoferolün HDL'ler üzerine eklenmesi HDL skor değerlerini (sırasıyla ortanca değerleri 1.09 ve 1.10) kontrole kıyasla (ortanca değeri 0.87) artırmıştır. Floresan ünite değerleri (HDL skor değerleri) 1.0'den yüksek ise prooksidan HDL ve 1.0'den küçük ise antioksidan HDL olarak değerlendirilmiştir. Böylece α -tokoferol konsantrasyona bağlı olmaksızın prooksidan HDL'leri artırmıştır ($p < 0.05$). Ancak düşük doz askorbik asit (1.4 mg/dl) antioksidan özelliği etkilemezken (ortanca HDL skor değeri 0.95) yüksek doz (2.8 mg/dl) askorbik asit ilavesi prooksidan HDL'lerde (ortanca HDL skor değeri 1.05) kontrole göre (ortanca HDL skor değeri 0.87) artışa neden olmuştur ($p < 0.05$).

Sonuç: *In vitro* α -tokoferol verilmesi dozdan bağımsız olarak ve askorbik asit ise doza bağımlı olarak prooksidan etki oluşturarak HDL'lerin oksidatif özelliğinde artışa neden olmuştur.

Anahtar Kelimeler: α -tokoferol, askorbik asit, antioksidan HDL

ABSTRACT

Aim: High density lipoprotein (HDL) retards accumulation of proinflatuar oxidized phospholipids in low density lipoproteins (LDL) and have a capacity on inhibition of oxidative modification. These antioxidant and antiinflammatory properties are as important as its cholesterol efflux function on inhibition of atherosclerosis. Contrary to its known effects when HDL has lost its functions, gains prooxidant properties. The purpose of our study was to investigate effects of antioxidant vitamins like α -tocopherol and ascorbic acid on the prevention of the antioxidant characteristics of HDL against LDL oxidation *in vitro*.

Materials and methods: 30 healthy young subjects plasma HDL's were obtained by dextran sulfate precipitation method. Then, oxidation prevention capacities of these HDL's (10 μ g/ml) against LDL (50 μ g/ml) were measured by spectrofluorometric method. Also same HDLs were added in to the four different test tubes and they were separately incubated for an hour with different concentrations of α -tocopherol (1.5 mg/dl and 3 mg/dl which are pharmacological and high dose respectively) and ascorbic acid (1.4 mg/dl and 2.8 mg/dl which are pharmacological and high dose respectively). Then, oxidation prevention effects of HDL against 50 μ g/ml LDL which are added to the tubes, were measured by spectrofluorometric method. Also, HDL, LDL, TG, Lp(a), Apo A1, Apo B, and hsCRP levels were measured in serum which are simultaneously obtained from subjects serum.

Results: *In vitro* 1.5 mg/dl and 3 mg/dl α -tocopherol addition onto HDL increased HDL score values (median values 1.09 and 1.10 respectively) compared to control (median value 0.87). Fluoresans unit values (HDL score values) > 1.0 indicated as prooxidant HDL; values < 1.0 indicated as antioxidant HDL. In this way α -tocopherol increased prooxidant HDL's by dose independent manner ($p < 0.05$). While low dose ascorbic acid (1.4 mg/dl) had no effect on antioxidant characteristics (median HDL score value 0.95), high dose (2.8 mg/dl) ascorbic acid addition caused increase on prooxidant HDL's (median HDL score value 1.05) compared to controls (median HDL score value 0.87, $p < 0.05$).

Conclusion: *In vitro* supplementation of α -tocopherol without depending on dose and ascorbic acid with depending on dose caused a prooxidant effect increasing the oxidative characteristics of HDLs.

Key words: α -tocopherol, ascorbic acid, antioxidant HDL

Giriş

Fizyolojik sistemlerde yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunu engelleyen antiaterojenik özellikte bir lipoproteindir. HDL serbest kolesterol'ün esterifikasyonu, lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT) ve lipoprotein lipaz enzimlerinin aktivasyonu, serbest kolesterol'ün periferden karaciğere taşınarak yıkılması, lipoprotein artıklarının dolaşımdan uzaklaştırılması gibi fonksiyonları ile ateroskleroza engellemektedir [1,2]. Ancak son zamanlarda HDL'nin bilinen bu fonksiyonlarının yanında antioksidan özellikleri önem kazanmıştır. HDL'nin yapısında bulunan Ca^{2+} 'a bağlı bir enzim olan paraoksonaz (PON), okside olmuş lipid metabolizmasında ve aterosklerozun engellenmesinde önemli rollere sahiptir. Ayrıca PON, LDL oksidasyonunun engellenmesi ve LDL oksidasyonu ile oluşan toksik metabolitlerin aktivitesinin azaltılmasında HDL üzerinde katalizör etki göstermektedir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda; PON, okside LDL'yi hidroliz ederek lipid peroksit oluşumunu anlamlı olarak azaltmış ve yağlı çizgi oluşmasını da engellemiştir [3]. Ayrıca PON, HDL üzerinde amino ucundaki hidrofobik bölgede apo A-I ile bağlantılıdır ve LDL'nin oksidasyonu sonucunda oluşan proinflamatuvar molekülleri parçalayarak vasküler hastalık riskini de azaltmaktadır [3]. Diğer taraftan, HDL'nin oksidasyonu sırasında anlamlı miktarda lizofosfatidilkolin bulunmuş ve PON-1'in fosfatidilkolin üzerine fosfolipaz A2'ye benzer aktiviteye de sahip olduğu sonucuna varılmıştır [4]. Bu nedenle, son yapılan çalışmalarda aterosklerozda HDL'nin konsantrasyonu değil de antioksidan kapasitesinin önemli olduğu üzerinde durulmuştur [5].

Çalışmamızda antioksidan etkilerinden dolayı kullandığımız α - tokoferolün immun ve inflamatuvar hücrelerin aktivitesini ve ekspresyonunu etkilediği ayrıca trombosit agregasyonunu da inhibe ettiği gösterilmiştir [6,7]. Ayrıca α - tokoferol antioksidan özelliği ile hücre membranlarını korur ve LDL'lerdeki yağ asitlerinin oksidasyonunu engeller. Ancak *in vitro* çalışmalarda yüksek konsantrasyonda kullanıldığında bir prooksidan olarak davrandığı da gösterilmiştir [8]. Bir molekül α - tokoferol bir oksidantı nötralize ettiğinde antioksidan kapasitesi kaybolacak şekilde değişir. Ancak, kanda bulunan antioksidanlar α - tokoferolün antioksidan kapasitesini geri döndürme yeteneğine sahiptir [9]. Diğer yandan askorbik asit iyi bilinen antioksidan bir vitamin olarak serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin yağ asitlerine, protein ve DNA'ya verecekleri oksidatif hasara karşı organizmayı korurken bazı durumlarda da oksidasyonu artırdığı bildirilmiştir [10, 11].

Bu çalışmanın amacı α - tokoferol ve askorbik asit gibi antioksidan vitaminlerin LDL'nin oksidasyonuna karşı HDL'nin antioksidan özelliği üzerine etkilerini (*in vitro*) analiz etmektir. Bu amaç için farklı konsantrasyonlarda α - tokoferol ve askorbik asit test edilmiştir.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamız ESOĞÜ Tıp Fakültesi yerel etik kurulu tarafından onaylanmıştır [31.01.2011 (39) PR-08-04-25-13]. Bu çalışmamıza gönüllü 30 sağlıklı birey (25 kadın, 5 erkek) dahil edilerek bilgilendirilmiş ve olurları alınmıştır. Katılımcıların yaş ortalaması kadınlar için 27.2 ± 2.6 ve erkekler için 26.6 ± 2.2 olup hiçbirisi ilaç tedavisi almamaktadır. Çalışmamıza katılan bireylerden bir gecelik açlık sonrası venöz kan örnekleri, 1 mg/ml EDTA içeren tüplere ve jelli tüplere alınarak hem plazmaları hem de serumları $1500 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edilerek ayrıldı. Serum örneklerinden total kolesterol, HDL, LDL, Trigliserit düzeyleri fotometrik metotlarla, Lipoprotein (a), Apo A1, Apo B ve hsCRP düzeyleri ise immünotürbidimetrik metotlarla Modüler Roche analizöründe Roche Diagnostics kitleri kullanılarak ölçüldü. HDL plazma örneklerinden dekstran sülfat çöktürme metodu ile elde edildi [12]. HDL'nin antioksidan özelliğinin belirlenmesi için çalışmada kullanılan LDL klinik laboratuvarından sağlanan serum havuzundan izole edilerek [13] hem HDL hem de LDL kolesterol miktarları Modüler Roche analizör ile Roche Diagnostics kitleri kullanılarak ölçüldü. Ayrıca çalışmamızda kullanacağımız α - tokoferol ve askorbik asitin plazmada bulunması önerilen en yüksek dozları (farmakolojik doz) ve bu dozların iki katı fazla miktarları yüksek doz olarak belirlendi [14].

Diklorofloresan deneyi:

HDL'nin fonksiyonel özelliklerini belirlemek amacıyla *in vitro* şartlarda okside LDL'nin DCFH'yı okside etmesi sonucu oluşan DCF'den (florofor) kaynaklanan floresan şiddetindeki değişimin HDL varlığında ölçülmesine dayanan florometrik bir metoddur [15]. İlk olarak plazmalardan izole edilen HDL'lerin herhangi bir uygulama yapılmaksızın LDL'ye karşı davranışlarını belirlemek amacıyla 200 μ l LDL kolesterol (50 μ g/ml) ile 900 μ l test HDL kolesterolü (10 μ g/ml) vidalı kapaklı tüplerde karanlık ortamda 20-25 °C'de 1 saat inkübe edildi. 0.2 mg/ml Diklorofloresan (DCFH) solüsyonu ortama eklendi ve vortekslenerek aynı şartlarda iki saat bekletildi. Floresan okumaları belirli zaman aralıklarında 485 nm eksitasyon, 530 nm emisyon dalga boylarında spektrofotometre (Jasco FP-750) ile yapılarak bireylerin HDL'lerinin LDL oksidasyonunu önleme kapasiteleri belirlendi ve bu kapasiteler bireylerin kontrol değerleri olarak gösterildi. Daha sonra dört farklı tüpe bu bireylerin HDL'leri (10 μ g/ml) koyularak üzerlerine ayrı ayrı 1.5 ve 3 mg/dl α - tokoferol, 1.4 ve 2.8 mg/dl askorbik asit ilave edilerek, karanlık ortamda 20-25 °C'de 1 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda tüplere daha önce izole edilen HDL'lerin LDL'den 50 μ g/ml ilave edilerek aynı inkübasyon şartlarında 1 saat daha bekletildi. Ayrıca 0.2 mg/ml Diklorofloresan (DCFH) solüsyonu ortama eklenerek ve vortekslenerek aynı şartlarda iki saat daha bekletildikten sonra değişik konsantrasyonlarda

α -tokoferol ve askorbik asit ile etkileşen HDL'lerin LDL oksidasyonunu önleyici etkileri spektroflore-metre ile belirlendi. HDL yokluğunda LDL'nin DCFH ile oksidasyonundan elde edilen floresan ünite (FU) (HDL skor değeri) 1 olarak kabul edildi. Daha sonra HDL'lerin varlığında ve farklı α -tokoferol ve askorbik asit konsantrasyonlarında ölçülen FU'lar 1'den küçük ve 1'den büyük HDL skorları olarak sınıflandı. FU, HDL varlığında DCFH'nin LDL tarafından oksidasyonu sonucu oluşan floresan şiddetindeki değişimin ölçülmesiyle belirlendi ve DCFH'nin oluşturduğu floresans yoğunluğunun her bir birimi 1 ünite (FU) olarak değerlendirildi. 1'den büyükse, örnek içerisindeki HDL prooksidan HDL olarak, eğer değer 1'den düşükse antioksidan HDL olarak kabul edildi. [15].

İstatistiksel Analizler

Tüm veri analizleri SigmaStat 3.5 paket programları ile yapılmıştır. Normal dağılım gösteren veriler ortalama ve normal dağılım göstermeyen veriler ortanca değer, minimum ve maksimum değerler olarak ifade edilmiştir. Bağımlı ölçümlerden oluşan ve normal dağılım göstermeyen verilere, Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks (bu testin çoklu karşılaştırmalarında Tukey metodundan yararlanılmıştır) ile analiz edilmiştir. $P < 0.05$ olasılık değerleri önemli olarak kabul edilmiştir.

Bulgular

Çalışmaya dahil edilen bireylerin lipit profil değerleri Tablo 1'de gösterilmektedir. Bireylerin lipit parametreleri referans sınırlar içinde bulunmaktadır. Bu normal değerlere sahip kişilerin ortanca HDL skor değeri 0.87 olarak tespit edilmiştir. (Şekil 1,2 ve Tablo 2,3). Bu bireylerin HDL'leri *in vitro* ortamda 1.5 mg/dl ve 3 mg/dl α -tokoferol ile birlikte inkübe edildiğinde ortanca HDL skor değerleri sırasıyla 1.09 ve 1.10 olarak değişmiştir (Şekil 1 ve Tablo 2). Askorbik asitin 1.4 mg/dl' si ve 2.8 mg/dl'si izole HDL'ler ile muamele edildiğinde

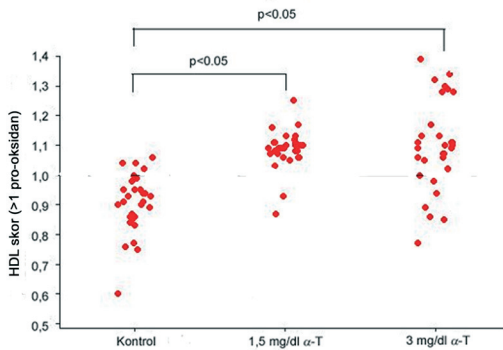
ise, HDL skor ortanca değerleri sırasıyla 0.95 ve 1.05 olarak belirlenmiştir (Şekil 2 ve Tablo 3). *In vitro* ortamda α -tokoferolün farmakolojik etki dozu (1.5 mg/dl) ve yüksek dozu (3 mg/dl) kontrole göre prooksidan HDL düzeyini (HDL skor değerini) 1'in üzerine çıkartarak anlamlı bir şekilde artırmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 1 ve Tablo 2). Ancak askorbik asitin sadece yüksek dozu (2.8 mg/ml) prooksidan HDL düzeyini (ortanca HDL skor değeri 1.05) kontrole göre (ortanca HDL skor değeri 0.87) anlamlı bir şekilde artırmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 2 ve Tablo 3).

Tablo 1. Çalışmaya katılan bireylerin biyokimyasal parametreleri (ortalama \pm SD) (n=30)

Parametreler	ortalama \pm SD
Total kolesterol (mg/dl)	157.3 \pm 32.6
HDL (mg/dl)	61.16 \pm 14.8
LDL (mg/dl)	87.50 \pm 29.5
Trigliserit (mg/dl)	84.00 \pm 63.0
Lipoprotein (a) (mg/dl)	18.80 \pm 17.7
Apo A1 (mg/dl)	159.7 \pm 24.2
Apo B (mg/dl)	67.20 \pm 23.7
hsCRP (mg/dl)	1.48 \pm 0.17

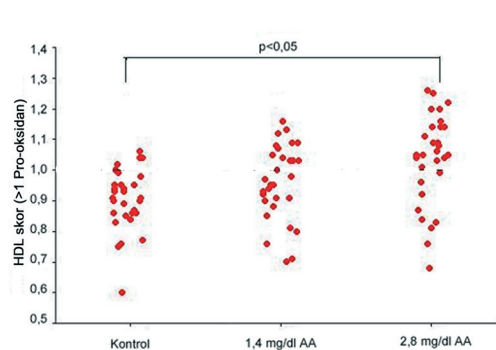
Tartışma

Çalışmamızda 30 sağlıklı bireyin serumlarından izole edilen HDL'lerin *in vitro* ortamda antioksidan kapasiteye sahip oldukları gösterilmiştir. Bu bireylerin tamamının lipit profilleri normal sınırlar arasında idi ve ortanca HDL skor değeri (0.87) 1'den düşük olduğundan antioksidan özelliklerini korumaktaydılar [5]. Bu HDL'ler farmakolojik etki ve daha yüksek konsantrasyonda α -tokoferol ile inkübe edildiğinde prooksidan özellik göstermiştir. Çalışmamızda kullandığımız α -tokoferolün doğal olarak bulunan formu RRR- α -tokoferol ya da sentetik olan 7 ayrı stereoizomerin karışımı olan RRR- α -tokoferol stereoizomeri halinde bulunur. Bu iki türün *in vitro* antioksidan etkisi aynı görülmüştür



Şekil 1. HDL'nin antioksidan özelliği üzerine α -tokoferolün farklı konsantrasyonlarının etkileri.

α -tokoferol (1.5 ve 3 mg/ml) varlığında ve yokluğunda (kontrol) HDL'nin antioksidan özelliği. HDL Skor (FU) $>$ 1 prooksidan HDL; HDL Skor (FU) $<$ 1antioksidan HDL. α -T: α -Tokoferol



Şekil 2. HDL'nin antioksidan özelliği üzerine askorbik asitin farklı konsantrasyonlarının etkileri.

Askorbik asit (1.4 ve 2.8 mg/ml) varlığında ve yokluğunda (kontrol) HDL'nin antioksidan özelliği. HDL Skor (FU) $>$ 1 prooksidan HDL; HDL Skor (FU) $<$ 1 antioksidan HDL. AA: Askorbik asit

Tablo 2. α -Tokoferol uygulamasının HDL skor değerlerine (FU) ilişkin tanımlayıcı istatistikleri (n=30)

Grup	Ortanca	Minimum	Maksimum	anlamlılık (p)
Kontrol	0.87	0.59	1.06	
1.5 mg/dl α -T	1.09	0.87	1.25	a
3 mg/dl α -T	1.10	0.77	1.39	a

a: kontrole göre anlamlı farklılık olduğunu göstermektedir (p<0.05)

α -T uygulandıktan sonra HDL Skor (FU)>1 prooksidan HDL; HDL Skor (FU)<1 antioksidan HDL olarak değerlendirildi. α -T: α -Tokoferol.

Tablo 3. Askorbik Asit uygulamasının HDL skor değerlerine ilişkin tanımlayıcı istatistikleri (n=3)

Grup	Ortanca	Minimum	Maksimum	anlamlılık (p)
Kontrol	0.87	0.59	1.06	
1.4 mg/dl AA	0.95	0.70	1.16	
2.8 mg/dl AA	1.05	0.68	1.26	a

a: kontrole göre anlamlı farklılık olduğunu göstermektedir (p<0.05)

AA uygulandıktan sonra HDL Skor (FU)>1 prooksidan HDL; HDL Skor (FU)<1 antioksidan HDL olarak değerlendirildi. AA: Askorbik asit

[16]. Fakat *in vivo* ortamda çoğu hücrenin çekirdeği ve sitoplazmasında değişik moleküllerle etkileşimleri farklı olacağından çoğu özelliklerinde değişiklikler gözlenmiştir [17]. Normal şartlarda ve konsantrasyonlarda α -tokoferolün *in vitro* LDL'yi konjuge diene ve lipit peroksidasyonu oluşumuna karşı koruduğu kanıtlanmıştır [18]. Bu durum α -tokoferolün aterosklerotik lezyonların ilerlemesini okside LDL'lerin oluşumu basamağında engelleyerek durdurduğunu göstermektedir. Ancak bazı durumlarda α -tokoferolün LDL ve HDL içinde var olan konsantrasyonunda bile lipit peroksidasyonuna neden olduğu *in vitro* şartlarda gösterilmiştir [19]. Bu peroksidasyon α -tokoferol radikali alfa tokoferoksil ile oluşturulmaktadır [20]. *In vitro* şartlarda α -tokoferol radikali ile oluşan lipit peroksidasyonu *in vivo* ortamda da gösterilmiştir [21]. Özellikle bu oksidasyon *in vitro* şartlarda oluşan tokoferol-aracılıklı peroksidasyon modeli ile uyumludur [21]. Bu modelde, lipit oksidasyonu alfa-tokoferoksil radikali ile başlatılır ve ilerletilir. Ayrıca α -tokoferol, faz ve zincir transfer ajanı olarak az miktarda tüketilerek sıvı fazdaki radikallerin lipoprotein partiküllerine transferini sağlar. Oluşan α -tokoferoksil radikali yapısında en azından bir çift bağ bulunduran yağ asitlerinden H atomunu alarak LDL lipit peroksidasyonu reaksiyonlarını başlatır ve önemli miktarda lipit hidroperoksitleri oluşumuna neden olur [20,22,6]. Çalışmamızda kullandığımız dozların oksidasyonu artırıcı etkileri tokoferol aracılıklı peroksidasyon modeli ile açıklanabilir. Bu dozlar *in vitro* ortamda hem HDL'nin hem de LDL'nin yapısında bulunan lipitlerde peroksidasyona neden olmuş olabilir. HDL oksidasyonunu ön-

leyememiş hem de LDL oksidasyonunu artırmış olabilir. Ayrıca çalışmamızda HDL skor değerlerinin artması HDL'nin yapısında bulunan antioksidan bir enzim olan paraoksonazın lipit peroksidasyonunu engellemeye yeterli olmadığını göstermektedir [6].

α -Tokoferolün erişkinlerde alınması önerilen günlük miktarı (RDA) erkekler için 10 mg ve kadınlar için 8 mg olarak belirlenmiş ve bu miktarlar optimum plazma konsantrasyonuna ulaşmada yeterli görülmüştür (23). Belirtilen dozlarda α -tokoferol organizmada antioksidan olarak koruyucu görev almaktadırlar. Bazı çalışmalarda yüksek doz α -tokoferol alımı kalp hastalıkları, tip II diyabet, hipertansiyon, kanser, kognitif bozukluklar ve alzheimer hastalığı riskini azaltmıştır (23). Ancak, farklı zamanlarda yapılan çalışmalarda ise α -tokoferolün kardiyovasküler hastalıklar ve kanseri önlemedeki etkilerinin tartışmalı olduğu ve yüksek dozlarda mortalite riskini artırdığı kanıtlanmıştır [24,25,6]. Ayrıca bazı araştırmacılar uzun dönem yüksek doz α -tokoferol alımına karşı uyarılmışlardır [26]. Bu çalışmalar yüksek doz α -tokoferolün bir prooksidan gibi davranarak organizmada oksidasyonu artırdığını ve HDL'nin antioksidan özelliğini değiştirdiğini göstermektedir. *In vitro* çalışmalarda da yüksek dozda α -tokoferolün LDL üzerinde α -tokoferoksil radikali oluşturmalarından dolayı prooksidan hale dönüştükleri gösterilmiştir [27, 28]. Çalışmamızda hem plazmada oluşabilecek en yüksek konsantrasyon hem de iki katı fazla konsantrasyonda oksidasyonun kontrole göre artması bu görüşü desteklemektedir. Böylelikle α -tokoferol bir prooksidan gibi davranarak HDL'leri proaterojenik hale dönüştürmüştür.

In vivo ortamda ise yüksek doz vitamin E'nin bu özellikleri diğer yağda çözünen antioksidanların yerine geçmesi ve doğal dengeyi bozarak ilaç ve endojen toksik ajanları detoksifiye eden sitozolik glutatyon-S-transferazi da inhibe etmesinden kaynaklanmaktadır [29,30].

Çalışmamızda kullandığımız diğer vitamin askorbik asit de α -tokoferol gibi serbest peroksil radikallerinin zararlı etkilerine karşı organizmayı koruyan suda çözünen doğal bir antioksidan olarak bilinmektedir [31]. Normal şartlarda faz transfer ajanı olarak lipoprotein içindeki bir radikalın sıvı ortama geçişini sağlayarak lipid peroksidasyonunu engeller [6]. Bu etkilerini α -tokoferol ile membran iç ve dış yüzeyinde etkileşerek göstermektedir [11]. Ancak askorbik asitin hem düşük hem de yüksek konsantrasyonlarda prooksidan olarak davranıldığı da saptanmıştır [31]. Ortaya çıkan bu prooksidan etkilerin hücrelerde genetik hasara neden olduğu saptanmıştır [31]. Çalışmamızda yüksek konsantrasyonlarda askorbik asit prooksidan olarak davranmıştır. Girotti ve arkadaşları da oksidasyon sırasında lipid hidroperoksitleri mevcutken askorbik asitin lipid peroksidasyonunu tetikleyebileceğini ve bu etkilerinin 10 mM'dan daha az konsantrasyonda olabileceğini göstermiştir [32]. Ayrıca *in vitro* çalışmalarda da sistemde endojen peroksit, oksijen, demir veya Cu gibi metal iyonlarının varlığında askorbatın prooksidan hale dönüşerek lipid peroksidasyonuna neden olduğu gösterilmiştir [11,12].

Askorbik asitten bir elektronun uzaklaştırılması bir askorbik asit serbest radikalının oluşumuyla sonuçlanır. Reaktif oksijen türleri ya da askorbil serbest radikali tarafından bir diğer elektronun uzaklaştırılması ise Dihidroksiaskorbat (DHA) oluşumu ile sonuçlanır. DHA'dan enzim bağımlı olan ve olmayan yoldan askorbat tekrar oluşturulabilir ve askorbil radikali NADH-bağımlı semihidroaskorbat redüktaz ve NADPH bağımlı selenoenzim tiyoredoksin redüktaz tarafından indirgenir [33]. DHA askorbata nonenzimatik olarak GSH ile ya da tiyoredoksin ve GSH bağımlı enzim glutaredoksin ile indirgenebilir [34]. Oluşan DHA'nın hücrelerce alınması ve eritrositlerde GSH ile redüksiyona uğratılması Hinner ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir [35]. *In vivo* ortamdan farklı olarak *in vitro* ortamda bu enzim sistemlerinin bulunmaması ve ortama eklenen askorbik asitin DHA'ya dönüşümü ve bu esnada oluşan hidrojen peroksitlerin LDL oksidasyonunu artırması söz konusudur. Bu oksidasyonun kullanılan dozlar ile paralel olarak artması bunu doğrulamaktadır. Normal şartlarda askorbik asit bakır ile LDL oksidasyonu başlamadan önce ortama konursa bir antioksidan olarak rol oynar. Ancak önceden hafifçe bir oksidasyon bulunuyorsa bile bir prooksidan hale dönüşmektedir [36]. Çalışmamızda askorbik asit ilavesi ile oksidasyonun konsantrasyona bağımlı olarak artması bazı bireylerin LDL'lerinde oksidasyona yatkınlık olduğunu hatta bazılarında oksidasyonun bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca HDL bu oksidasyonu engelleyememiş ve prooksidan özelliğinde artış göstermiştir.

Askorbik asit için alınması önerilen günlük miktar (RDA) 60 mg olarak belirlenmiştir. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar yetersiz sebze ve meyve tüketenlerde günlük ihtiyaç için 200 mg askorbik asit alınmasının plazma konsantrasyonunun devam ettirilmesinde yeterli olacağını göstermektedir [37]. Belirtilen askorbik asit konsantrasyonları organizmada antioksidan özellikleri ile koruyucu fonksiyonunu yerine getirebilmektedir ve HDL'nin antioksidan özelliğinin korunmasında olası faydaları bulunmaktadır. Ancak dozun artırılmasıyla askorbik asit'in prooksidan gibi davranarak beklenmeyen yan etkileri nedeniyle tehlike yaratabileceği de bildirilmiştir [37]. Çalışmamızda plazmada bulunan en yüksek askorbik asit konsantrasyonu ve bunun iki katı konsantrasyonunda çalışıldı. Ancak askorbik asit'in konsantrasyona bağımlı olarak prooksidan HDL'yi artırdığı ve böylelikle ateroskleroza karşı koruyucu etkisinin kalmadığı gözlemlendi.

Sonuç olarak, α -tokoferol ve askorbik asit plazmada bulunması önerilen en yüksek konsantrasyonlarının üzerinde prooksidan özelliği artırarak HDL'yi proaterojenik hale dönüştürmektedirler. Bu bakımdan α -tokoferol ve askorbik asitin önerilen dozlarda ve vücut gereksinimlerine göre alınması ateroskleroza karşı korunmada büyük önem taşımaktadır.

Çıkar çatışması

Bu çalışmada yazarlar konuyla ve/veya herhangi başka bir yazar ile ilgili maddi veya manevi bir çıkar ilişkisi içinde bulunmamaktadır.

Kaynaklar

- [1] Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, Maroni J, Szarek M, et al. (2007) HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events; Treating to New Targets Investigators. *Engl J Med.* 357(13):1301-10.
- [2] Ansell BJ, Watson KE, Fogelman AM, Navab M, Fonarow GC. (2005) High-density lipoprotein function recent advances. *J Am Coll Cardiol.* 15;46(10):1792-8.
- [3] Marta T, Latorre G, Senti M, Marrugata J. (2004) The Antioxidant Function of High Density Lipoproteins: A New Paradigm in Atherosclerosis. *Rev Esp Cardiol.* 57(6):557-69.
- [4] Jarvik GP, Hatsukami TS, Carlson C, Richter RJ, Jampsa R et al. (2003) Paraoxonase activity, but not haplotype utilizing the linkage disequilibrium structure, predicts vascular disease. *Arterioscler Thromb Vas Biol.* 23(8):1465-71.
- [5] Ansell BJ. (2007) The two faces of the 'good' cholesterol. *Cleve Clin J Med.* 74(10):697-700.
- [6] Upston JM, Terentis AC, Stocker R. (1999) Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. *FASEB J.* 13(9):977-94.
- [7] Freedman JE, Keane JF Jr. (2001) Vitamin E inhibition of platelet aggregation is independent of antioxidant activity. *J Nutr.* 131(2):374-7.
- [8] Bowry VW, Mohr D, Cleary J, Stocker R. (1995) Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 17;270(11):5756-63.
- [9] Kagan VE, Serbinova EA, Forte T, Scita G, Packer L. (1992) Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. *J Lipid Res.* 33(3):385-97.

- [10] Nègre-Salvayre A, Affany A, Hariton C, Salvayre R. (1991) Additional antilipoperoxidant activities of alpha-tocopherol and ascorbic acid on membrane-like systems are potentiated by rutin. *Pharmacol.* 42(5):262-72.
- [11] Stadtman ER. (1991) Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. *Am J Clin Nutr.* 54(6 Suppl):1125-28.
- [12] Aslan D. (2005) Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler, Beşinci Baskıdan Çeviri. n. 486-487, Palme Yayıncılık, Ankara.
- [13] Hirano T, Ito Y, Saegusa H, Yoshino G. (2003) A novel and simple method for quantification of small, dense LDL. *J Lipid Res.* 44(11):2193-201.
- [14] Kayaalp O. (1998) Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji 2. Cilt.n.1544-1552, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti.
- [15] Navab M, Hama SY, Hough GP, Subbanagounder G, Reddy ST, et al. (2001) A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. *J Lipid Res.* 42(8):1308-17.
- [16] Kamal-Eldin A, Appelqvist LA. (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids.* 31(7):671-701.
- [17] Zingg JM, Azzi A. (2004) Non-antioxidant activities of vitamin E. *Curr Med Chem.* 11(9):1113-33.
- [18] Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Striegl G, Waeg G. (1991) Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr.* 1991 53(1 Suppl):314-321. *Am J Clin Nutr.* 53(1):314-21.
- [19] Francis GA. (2000) High density lipoprotein oxidation: in vitro susceptibility and potential in vivo consequences. *Biochim Biophys Acta.* 1483(2):217-35.
- [20] Kim HJ, Lee HO, Min DB. (2007) Effects and prooxidant mechanisms of oxidized alpha-tocopherol on the oxidative stability of soybean oil. *J Food Sci.* 72(4):C223-30.
- [21] Upston JM, Terentis AC, Morris K, Keane Jr JF, Stocker R. (2002) Oxidized lipid accumulates in the presence of alpha-tocopherol in atherosclerosis. *Biochem J.* 363(Pt 3):753-60.
- [22] Neuzil J, Shane RT, Stocker R. (1997) Requirement for, promotion, or inhibition by α -Tocopherol of radical-induced initiation of plasma lipoprotein lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 22(1-2):57-71.
- [23] Weber P, Bendich A, Machlin LJ. (1997) Vitamin E and Human health: Rationale for determining recommended intake levels. *Nutrition.* 13(5):450-60.
- [24] Heart Protection Study Collaborative Group. (2002) MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 360(9326):23-33.
- [25] Miller ER 3rd, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, et al. (2005) Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med.* 142:37-46.
- [26] Roberts HJ. (1981) Perspective on vitamin E as therapy. *JAMA.* 246:129-31.
- [27] Bowry VW, Mohr D, Cleary J, Stocker R. (1995) Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 270:5756-63.
- [28] Nair PP, Judd JT, Berlin E, Taylor PR, Shami S, et al. (1993) Dietary fish oil-induced changes in the distribution of α -tocopherol, retinol, and β -carotene in plasma, red blood cells, and platelets: modulation by vitamin E. *Am J Clin Nutr.* 58(1):98-102.
- [29] Huang HY, Appel LJ. (2003) Supplementation of diets with alpha-tocopherol reduces serum concentrations of gamma- and delta-tocopherol in humans. *J Nutr.* 133:3137-40.
- [30] van Haaften RI, Haenen GR, van Bladeren PJ, Bogaards JJ, Evelo CT, et al. (2003) Inhibition of various glutathione S-transferase isoenzymes by RRR-alpha-tocopherol. *Toxicol In Vitro.* 17:245-51.
- [31] Mikirova NA, Jackson JA, Riordan NH. (2007) The effect of high dose IV vitamin C on plasma antioxidant capacity and level of oxidative stress in cancer patients and healthy subjects. *J Orthomol Med.* 22(3):153-60.
- [32] Girotti AW, Thomas IP, Jordan IE. (1985) Prooxidant and antioxidant effects of ascorbate on photosensitized peroxidation of lipids in erythrocyte membranes. *Photochem Photobiol.* 41(3): 267-76.
- [33] Bianchi J, Rose RC. (1986) Dehydroascorbic acid and cell membranes: possible disruptive effects. *Toxicol.* 40(1):75-82.
- [34] Regulus P, Desilets JF, Klarskov K, Wagner JR. (2010) Characterization and detection in cells of a novel adduct derived from the conjugation of glutathione and dehydroascorbate. *Free Radic Biol Med.* 49(6):984-91.
- [35] Hinnering I, Waters R, Osman M, Garrel C, Fernholz K, et al. (2005) Acute prooxidant effects of vitamin C in EDTA chelation therapy and long-term antioxidant benefits of therapy. *Free Radic Biol Med.* 38(12):1565-70.
- [36] Otero P, Viana M, Herrera E, Bonet B. (1997) Antioxidant and prooxidant effects of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and flavonoids on LDL submitted to different degrees of oxidation. *Free Radic Res.* 27(6):619-26.
- [37] Levine M, Rumsey SC, Daruwala R, Park JB, Wang Y. (1999) Criteria and recommendations for vitamin C intake. *JAMA.* 281(15):1415-23.