Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2013; 16(74): 67-76

Study of the relationship of activation and -107 C/T polymorphism in Paraoxonase 1 gene and fatty acid diversity in phospholipids of high density lipoprotein

Ghatreh Samani K (Ph.D) [1], Farrokhi E (M.Sc)[2]*, Hashemzadeh Chaleshtory M (Ph.D) [2], Heidarian E (Ph.D) [1]

1- Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
2- Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

Received:20 Jun 2013, Accepted: 19 Jun 2013

Abstract

Background: Paraoxonase 1 activity shows a decline in patients with coronary artery disease. The C to T change in the -107 position of promoter is the most important genetic determinant of serum levels of paraoxonase 1. Study of this polymorphism and its relationship with the type of fatty acid composition of phospholipids in HDL particles can be found in the common pursuit of better medicines and considered in drug treatment

Materials and Methods: In this descriptive study, 265 patients were selected and divided into two groups based on LDL level (131 in case and 134 in control groups). Lipid profile and paraoxanase 1 activity were measured by commercial kits and spectrophotometry method, respectively. Molecular studies were performed by PCR-RFLP after DNA extraction. Fatty acids of HDL phospholipids were measured by gas chromatography technic.

Results: PON1aryl esterase activity had no significant changes after treatment with lovastatin but paraoxonase activity had more significant increases in the CC genitype of -C/T107 polymorphism. Oleic acid, linoleic acid, and icosapentanioc acid percents in HDL phospholipids were increased by lovastatin.

Conclusion: Treatment with lovastatin in the CC genotype has probably a more protective effect against cardiovascular diseases. Following treatment, in patients with higher paraoxanase 1 activity, oleic acid and linoleic acid increased in HDL phospholipids.

Keywords: Fatty acids, high density lipoprotein, PON1, phospholipids

*Corresponding author:
Address: Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Rahmatieh, Shahrekord, Iran
Email: e_farrokhi_k@yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 16، شماره 5 (شماره پیاپی74)، تیر 1392 76-67

بررسی ارتباط فعالیت و پلی مورفیسم 107C/T- ژن پاراکسوناز-1 با نوع اسیدهای چرب در فسفولیپیدهای موجود در لیپوپروتئین با دانسیته بالا

کیهان قطره سامانی[1]، عفت فرخی[2*]، مرتضی هاشم زاده چالشتری[3]، اسفندیار حیدریان[4]

1. استادیار، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
2. دانشجوی دکترای پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
3. استاد، گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
4. دانشیار، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت91/11/1 تاریخ پذیرش: 92/3/29

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات نشان داده که فعالیت پارا کسوناز 1 در بیماران مبتلا به تنگی عروق کرونر کاهش دارد. تغییر C به T در ناحیه 107- پروموتر مهم‌ترین شاخص تعیین کننده ژنتیکی سطح پارا کسوناز 1 در سرم است. از آن جایی که ترکیب اسیدهای چرب فسفولیپیدهای لیپوپروتئین با دانسیته بالا بر فعالیت آن موثر است می‌توان با بررسی این تغییر، تاثیر بهتر داروهای رایج را پی گیری نمود ودر درمان دارویی در نظر گرفت.

روش‌کار: در این مطالعه توصیفی تحلیلی 131 نفر با لیپوپروتئین با دانسیته پایین بیش از130 میلی‌گرم در دسی‌لیتر به عنوان گروه مورد و 134 نفر با لیپوپروتئین با دانسیته پایین کمتر از 130 میلی‌گرم در دسی‌لیتر به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. پروفایل لیپیدی با استفاده از کیت‌های تجاری و فعالیت آنزیم پاراکسوناز با استفاده از روش اسپکتروفتومتری تعیین مقدار گردید و آزمایشات مولکولی پس از استخراج DNA به روش PCR-RFLP انجام شد. در صد اسیدهای چرب موجود در فسفو لیپید لیپوپروتئین با دانسیته بالا، با تکنیک گاز کروماتوگرافی تعیین گردید.

یافته‌ها: فعالیت آریل استرازی تحت درمان با لواستاتین تغییرات قابل توجهی نداشت ولی فعالیت پاراکسونازی به دنبال درمان با لواستاتین در ژنوتیپ سی سی پلی مورفیسم 107C/T- افزایش قابل توجه‌تری داشته است. درصد اسیداولئیک، لینولئیک و اسید ایکوزو پنتانوئیک به دنبال دریافت لواستاتین در فسفولیپیدهای لیپوپروتئین با دانسیته بالا افزایش نشان داده است

نتیجه‌گیری: احتمالا درمان با لواستاتین اثر محافظتی بیش‌تری در ژنوتیپ سی‌سی در مقابل بیماری قلبی عروقی خواهد داشت. در ژنوتیپ سی‌سی که به دنبال درمان فعالیت بالاتر پاراکسونازی دیده شده اسیداولئیک و لینولئیک موجود در لیپوپروتئین با دانسیته بالا نیز افزایش داشته اند.

واژگان کلیدی: اسیدهای چرب، پاراکسوناز 1، فسفولیپید، لیپوپروتئین با دانسیته بالا

***نویسنده مسئول**: شهرکرد، رحمتیه، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

Email: e_farrokhi_k@yahoo.com

مقدمه

لیپوپروتئین با دانسیته پایین اکسید شده(Oxidized low density lipoprotein- oxLDL) نقش اصلی در شروع و پیشرفت آترواسکلروز دارد. لیپوپروتئین با دانسیته بالا (High density lipoprotein- HDL) با خاصیت آنتی اکسیدانی خود از چند مسیر مانع از این عمل می‌گردد. وظیفه آنتی اکسیدانی HDL به عهده آنزیم پاراکسونار 1 (PON1) می‌باشد که به همراه HDL در خون گردش می‌کند. پاراکسونار 1 از تجمع لیپیدهای پراکسید جلوگیری نموده و تبدیل LDL به ox LDL را کاهش می‌دهد(1).

افزایش فعالیت پاراکسونار 1 باعث افزایش غلظت HDL سرم می‌گردد(2) و شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد کاهش فعالیت پاراکسونار 1 منجر به بیماری عروقی در انسان می‌گردد(3). ژن پاراکسونار 1 بر روی کروموزوم 7 قرار دارد و در بافت کبد بیان می‌گردد. مطالعات تجربی نشان داده حذف ژن پاراکسونار 1 باعث استعداد ابتلا به آترواسکلروز شده و تنگی عروق را 42 درصد افزایش می‌دهد(4). داروهای مهارکننده HMG-CoA ردوکتاز بر فعالیت، غلظت و بیان ژن پاراکسونار 1 تاثیرگذار هستند(5، 6).

آنزیم پاراکسونار 1 سوبستراهای متعددی دارد که از میان آنها پاراکسون و فنیل استات به عنوان سوبسترا برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در آزمایشگاه کاربرد دارند. تاثیر بر پاراکسون به عنوان فعالیت پاراکسونازی و تاثیر بر فنیل استات به عنوان فعالیت آریل استرازی ذکر می‌شود که بیشتر نشان دهنده مقدار پروتئین آنزیم در پلاسما می‌باشد(3). پلی مورفیسم‌های مختلف پاراکسونار 1 مسئول تغییر فعالیت و غلظت این آنزیم و همچنین مسئول تغییرات پلاسمایی HDL در جمعیت‌های مختلف می‌باشد(7، 8). در مطالعه‌ای نشان داده شده پلی مورفیسم 107C/T- در ناحیه پروموتر ژن پاراکسونار 1 باعث تغییر قابل ملاحظه‌ای در فعالیت پاراکسونار سرم گردیده است(3). تغییر در ناحیه -107C/T پروموتر مهم‌ترین شاخص تعیین‌کننده ژنتیکی سطح پاراکسونار 1 در سرم است. پلی مورفیسم 107C/T- تقریباً باعث تغییرات 13 برابری فعالیت و غلظت آنزیم در افراد مختلف می‌باشد(9).

با توجه به این که مطالعه‌ای درباره نقش پلی مورفیسم 107C/T- ژن پاراکسونار 1 بر اجزا تشکیل‌دهنده لیپوپروتئین‌های پلاسما انجام نشده، به نظر می‌رسد پلی مورفیسم مذکور علاوه بر تغییر فعالیت آنزیم، غلظت لیپوپروتئین‌ها و اجزا تشکیل‌دهنده آنها به ویژه اسیدهای چرب تشکیل دهنده فسفولیپیدها را دچار تغییر می‌کند. با توجه به این که افراد با LDL بالا شانس ابتلا به بیماری قلبی عروقی بالاتری دارند، بررسی تغییرات پاراکسونار 1 و ساختار فسفولیپیدی HDL در کاهش عوامل خطر در این افراد ارزشمند می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم 107C/T- ژن پاراکسونار 1 در بیماران با LDL بالا و تاثیر آن بر اسیدهای چرب موجود در ذرات HDL می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی تحلیلی پس از موافقت کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد(کد 4-10-88)، 265 نفر از افراد در دسترس به روش آسان از افراد مراجعه‌کننده به کلینیک داخلی بیمارستان آیت اله کاشانی شهرکرد توسط متخصص بیماری‌های داخلی انتخاب شدند. افراد مورد مطالعه در دو گروه شامل افراد مورد، که دارای LDL بالای 130 میلی‌گرم در دسی‌لیتر(131نفر) و افراد دارای LDL کمتر از 130 میلی‌گرم در دسی‌لیتر به عنوان گروه شاهد (134 نفر) قرار گرفتند. میزان 130میلی‌گرم بر اساس توصیه برنامه آموزش ملی کلسترول(National Cholesterol Education Program) انتخاب گردید. افراد گروه مورد، مجدداً به دو گروه A و B تقسیم شدند. گروهA(54 نفر) افرادی که طبق نظر پزشک متخصص داخلی علیرغم داشتن LDL 130 میلی‌گرم نیاز به دریافت دارو نداشتند و گروه B(76 نفر) که تحت درمان با لواستاتین با دوز روزانه 20 میلی‌گرم قرار گرفتند.

معیارهای ورود به مطالعه داشتن LDL بالای 130 میلی‌گرم در دسی‌لیتر برای گروه مورد و داشتن LDL کمتر از 130 میلی‌گرم در دسی‌لیتر برای گروه شاهد بود. بدیهی است افرادی که دارای بیماری‌های متابولیک نظیر دیابت و بیماران کبدی، کلیوی و اختلالات تیروئید بودند، از مطالعه حذف گردیدند.

نمونه‌گیری وآزمایشات بیوشیمیایی

اطلاعات افراد تحت مطالعه نیز از طریق پرسش نامه جمع‌آوری شد. از تمام افراد مورد مطالعه نمونه خون جهت آزمایشات مولکولی و آزمایشات بیوشیمیایی گرفته شد. سپس سرم آنها جدا گردید و در دمای 20- درجه تا زمان مناسب نگهداری شدند. سطح سرمی گلوکز، کلسترول توتال، تری گلیسرید،HDL -C ، LDL -C، کراتینین، آپولیپوپروتئین A1 (ApolipoproteinA1- ApoA1) و آپولیپو پروتئین B (Apo B) در تمامی نمونه‌ها با استفاده از کیت‌های تجاری ساخت شرکت پارس آزمون توسط دستگاه اتوآنالیز BT3000 (ایتالیا) در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی شهرکرد اندازه‌گیری گردید. اندازه‌گیری oxLDL در سرم با استفاده از کیت‌های الایزا(شرکت Mercodia) بر طبق دستور العمل کیت انجام شد.

فعالیت آریل استرازی(EC3112) آنزیم پاراکسوناز 1 با اندازه‌گیری تجزیه فنیل استات به فنل قابل اندازه‌گیری است. پس از اضافه نمودن سرم رقیق شده به فنیل استات آماده شده در بافر تریس، اختلاف جذب در دقیقه در 270 نانومتر در ضریب جذب مولی(1310) ضرب شده و فعالیت بر حسب واحد درمیلی لیتر محاسبه گردید. فعالیت پاراکسونازی(EC 3181) آنزیم پاراکسوناز 1 با استفاده از سوبسترای پاراکسون قابل اندازه‌گیری می‌باشد. سرم رقیق شده به سوبسترا اضافه شد و جذب نوری در 412 نانومتر در مقابل بلانک قرائت گردید. تغییرات جذب، درضریب جذب مولی(17100) ضرب گردید و فعالیت بر حسب واحد درمیلی‌لیتر محاسبه گردید(6).

بر روی نیم میلی‌لیتر از سرم جدا شده با استفاده از روش رسوبی، HDL جدا گردیده و کلیه فسفولیپیدهای موجود در HDL به روش کروماتوگرافی لایه نازک(Thin Layer Chromatography-TLC) با استفاده از پلیت‌های ژل 60G و بافر(هگزان: اتیل اتر: استیک اسید) به نسبت (80 : 20 :1) جدا گردید(10).

اسیدهای چرب موجود در فسفولیپید تحت ترکیب با عوامل متیل‌دار مانند متیل استر با استفاده از کاتالیز کلرید استیل در متانول به اسیدهای چرب متیله تبدیل شد(11). مشتقات اسیدهای چرب متیله تولید شده از فسفولیپیدهای استخراج شده توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی SRI,Torance,CI با ستون R CN100, Tekno Kroma 0/25 × 60 با استفاده از دتکتور یونی با سرعت جریان مایع 20cm/s در دمای 210 درجه سانتی‌گراد تفکیک گردید. زمان احتباس و ارتفاع منحنی حاصل از نمونه‌ها در مقایسه با استاندارد مشخص تعیین مقدار شد.

پس از دو ماه از دریافت دارو مجدداً از گروه B، 5 میلی‌لیتر خون به صورت ناشتا گرفته شده و دوباره پروفایل لیپیدی و فعالیت آنزیم پاراکسوناز و ترکیب اسیدهای چرب HDL اندازه‌گیری و تعیین مقدار گردید و نتایج حاصل با قبل از درمان مقایسه شد و تاثیر پلی مورفیسم 107C/T- در پاسخ دهی به درمان توسط لوواستاتین مشخص گردید.

آزمایشات مولکولی

در این مطالعه برای استخراج DNA بر روی نمونه‌های خون که با اتیلن دی آمین ترا استیک اسید(EDTA) 0/5 مولار گرفته شد، از روش فنل کلروفرم استفاده گردید و ژن مربوط با استفاده از روش PCR تکثیر شد. توالی پرایمرهای مورد نیاز جهت تکثیر پروموتر ژن پاراکسوناز 1 جهت بررسی پلی مورفیسم 107C>T- به صورت زیر می‌باشد:

5'AGC TAG CTG CCG ACC CGG
پرایمر رفت: 'CGG GGA GGA G 3

5'GGC TGC AGC CCT CAC CAC
پرایمر برگشت: 'AAC CC 3

این پرایمرها قطعاتی به طول 240 جفت باز را تکثیر می‌نمایند. لازم به ذکر است جهت ایجاد محل برش آنزیم محدودکننده BsrBI، در دومین نوکلئوتید در انتهای '3 پرایمر رفت به جای نوکلئوتید G، نوکلئوتید A قرار گرفته است.

مواد و مقادیر مورد نیاز برای هر واکنش PCR (سیناژن - ایران) بدین شرح بود:

3 میکرولیتر $MgCl_2$ (50 mM)، 2/5 میکرولیتر بافر(10X)، 0/3 میکرولیتر پرایمر F(10پیکومول)، 0/3 میکرولیتر پرایمر R (10پیکومول)، 0/1 میکرولیتر DNA Taq Polymerase، 0/5 میکرولیتر dNTP و 1 میکرولیتر DNA(حدود 25 نانوگرم) که با آب مقطر دیونیزه(ddH2O) به حجم 25 میکرولیتر رسانده شد.

شرایط دمایی بهینه شامل 36 سیکل مشتمل بر دمای واسرشت 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه، دمای اتصال 64 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه و دمای بازآرایی 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه بود. محصول PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید 8 درصد (29:1) با میلی‌آمپر 40 به مدت 1/5 ساعت الکتروفورز گردید و پس از رنگ‌آمیزی نیترات نقره مورد بررسی قرار گرفت.

جهت انجام RFLP 10 میکرولیتر از محصول PCR تحت تاثیر 10 واحد آنزیم محدود کننده BsrBI (Fermentase-Canada) به مدت یک شب (Over night) در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن وجود قطعات به اندازه های 240 و 212 و 28 جفت بازی بر روی ژل پلی اکریل آمید 8 درصد (29:1) با میلی‌آمپر 40 به مدت 1/5ساعت بررسی گردیدند.

برای تعیین ویژگی‌های بیوشیمیائی و تعیین اسیدهای چرب موجود در HDL و برای پارامترهای کمی در دو گروه مورد و شاهد به ترتیب از آزمون آماری آنووا و تی تست استفاده شد. آزمون آماری کای دو برای بررسی شیوع پلی مورفیسم‌ها و آزمون تی زوجی (Paired t-test) برای مقایسه قبل و بعد از دریافت دارو به کار رفت. برای تجزیه و تحلیل‌های آماری نرم افزار SPSS نسخه 16 مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

افراد مورد بررسی در دو گروه مورد و شاهد به گونه‌ای انتخاب شدند که از نظر متغیرهای دموگرافیک، مصرف سیگار، فشار خون و شاخص توده بدنی همسان باشند. نتایج آزمایشات بیوشیمیایی در دو گروه مورد و شاهد نشان داد، سطح کلسترول، LDL و Apo B در گروه مورد بالاتر از شاهد بوده و بعد از درمان، لواستاتین باعث کاهش کلسترول تام، LDL-C، Apo B و LDL oxشده است. فعالیت پاراکسونازی PON1 نیز به دنبال درمان با لواستاتین افزایش یافت. با مقایسه تاثیر لواستاتین بر ترکیبات اسید چرب موجود درفسفو لیپید HDL دیده می‌شود که درصد اسید استئاریک(0: 18)، اسید اولئیک(19: 18)، اسید لینو لئیک(۹،۱۲ 2 :18) و اسید ایکوزو پنتا انوئیک(5 :20) نسبت به قبل از درمان افزایش نشان داده است(جدول 1).

جدول 1. تغییرات oxLDL، فعالیت آنزیم و درصد اسیدهای چرب در گروه B از گروه مورد

متغیر	قبل از لواستاتین	بعد از لواستاتین	p
اسید پالمتیک (16 :0)	32 ± 3/4	31 ± 3/5	0/41
اسید پالمیتولئیک (16: 1)	1/1 ± 0/6	1/1 ± 0/7	0/25
اسید استئاریک (18 :0)	16 ± 1/4	18 ± 1/5	* 0/039
اسید اولئیک (1^{9} :18)	7/8 ± 1/9	9/8 ± 1/8	*0/026
اسید لینو لئیک ($2^{9,12}$:18)	18/2 ± 2/5	21/1 ± 2/4	* 0 /019
اسید آراشیدونیک (4 :20)	7/5 ± 1/9	8/2 ± 2/4	0/072
اسید ایکوزو پنتانوئیک (5 :20)	1/1 ± 0/4	1/2 ± 0/7	*0/007
اسید دو کوزو هگزانوئیک (6 :22)	0/95 ± 0/6	0/99 ± 0/6	/09
LDLاکسید شده (واحد در لیتر)	86 ± 14/4	73 ± 15/3	*0/007
فعالیت آریل استرازی آنزیم (واحد آنزیمی در میلی‌لیتر)	106 ± 25/6	108 ± 32/1	0/09
فعالیت پاراکسونازی آنزیم (واحد آنزیمی در میلی‌لیتر)	205 ± 117	261 ± 114	*0/04

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشد. *
p<0/05 با استفاده از paired T test

غلظت اسیدهای چرب میکرومول در لیتر می‌باشد.

با توجه به جدول 2، HDL ، ApoA1 ، فعالیت آریل استرازی و پاراکسونازی تحت تاثیر ژنوتیپ‌های مختلف از پلی مورفیسم 107C/T- قرار گرفته است که نتایج بیانگر این می‌باشد که فعالیت پاراکسونازی به دنبال درمان با لواستاتین در ژنوتیپ CC از 107C/T- از دو ژنوتیپ دیگر افزایش قابل توجه‌تری داشته‌اند.

جدول 2. مقایسه ویژگی‌های بیوشیمیائی بر اساس ژنوتیپ‌های بررسی شده در گروهB تحت مطالعه

متغییر	پلی مورفیسم107C/T-		
	CC	CT	TT
HDL-C قبل (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	44 ± 11/2	44 ± 9/8	39 ± 9/9
HDL-C بعد (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	43 ± 10/6	44 ± 11/5	44 ± 9/7
ApoA1 قبل(میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	129 ± 18/6	125 ± 20/8	131 ± 21/3
ApoA1 بعد(میلی‌گرم در دسی لیتر)	134 ± 19/9	121 ± 22/9	132 ± 22/6
آریل استرازی (واحد آنزیمی در میلی‌لیتر) قبل	92 ± 31/1	69 ± 28/1	67 ± 27/9
آریل استرازی (واحد آنزیمی در میلی‌لیتر) بعد	103 ± 37/4	81 ± 27/4	71 ± 33/7
پاراکسونازی(واحد آنزیمی در میلی‌لیتر) قبل	*229 ± 137	218 ± 112	158 ± 131
پاراکسونازی(واحد آنزیمی در میلی‌لیتر) بعد	310 ± 115	264 ± 141	166 ± 128

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشد. 0/05>
pمعنی دار می‌باشد
*p<0/05 با استفاده از paired T test

تغییرات اسیدچرب در فسفولیپیدهای موجود در HDL بعد از درمان در ژنوتیپ های پلی مورفیسم مورد مطالعه در جدول 3 نشان داده شده است.

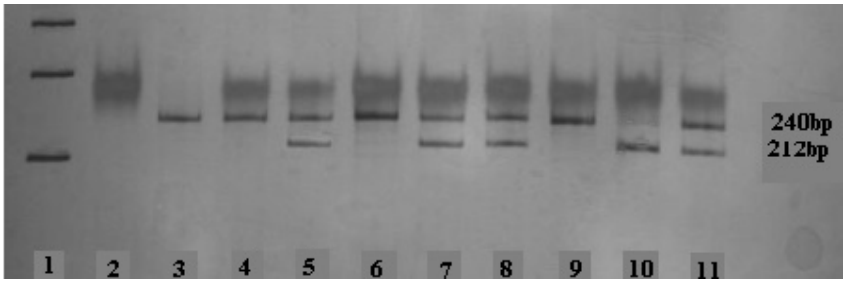
در پلی مورفیسم 107C/T- درصد اسیداولئیک است.
و لینولئیک به دنبال دریافت لواستاتین افزایش نشان داده

جدول 3: اسیدهای چرب موجود در فسفو لیپیدهای HDL در گروه B از گروه مورد بر اساس دسته‌بندی پلی مورفیسم

متغیر	پلی مورفیسم 107C/T-			متغیر	پلی مورفیسم 107C/T-		
	CC	CT	TT		CC	CT	TT
اسید پالمتیک (16 :0)	31±2/8	30±2/9	32±3/2	اسید لینو لئیک (18: 2 [9،12])	17/9(2/7)	19(2/9)	18/5(2/8)
قبل از دارو	30±2/5	31±2/8	32±3/5	قبل از دارو	22/1(2/9)*	/9(3/1)	19/9(2/5)
بعد از دارو				بعد از دارو		20	
اسید پالمیتولئیک (16: 1)	1/2±0/9	1±0/7	1/1±0/6	اسید آراشیدونیک (20: 4)	7/9±2/4	7/5±2/1	7/6±2/2
قبل از دارو	1/2±0/7	1/1±0/6	1/1±0/7	قبل از دارو	8/2±3/1	7/9±2/5	8/1±2/7
بعد از دارو				بعد از دارو			
اسید استئاریک (18 :0)	17±1/9	16±2/7	16±3/4	اسید ایکوزو پنتانوئیک (20: 5)	1/1±0/4	1/1±0/3	1/1±0/4
قبل از دارو	18±2/1	17±2/6	17±1/3	قبل از دارو	1/2±0/4	1/1±0/5	1/1±0/5
بعد از دارو				بعد از دارو			
اسید اولئیک (18 :1)	8±2/1	8/1±2/9	7/9±3/4	اسید دو کوزو هگزانوئیک (22: 6)	0/9±0/4	0/8±0/7	0/9±0/5
قبل از دارو	10/2±2/5*	9/3±2/1	9/2±3/1	قبل از دارو	1/1±0/5	1±0/6	1±0/6
بعد از دارو				بعد از دارو			

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشد. *
p <0/05 می‌باشد.

پس از انجام RFLP بر روی محصولات PCR، آنزیم BsrBI در محل GAGCGG در محصولات PCR برش ایجاد می‌کند. در نمونه‌هایی که آلل C دارند (ژنوتیپ CC و CT) دارند برش ایجاد می‌گردد و دو محصول با اندازه‌های 28 و 212 جفت بازی ایجاد می‌گردد. بنابر این وجود باند در محل 212 در ژل، بیانگر ژنوتیپ CC می‌باشد. نمونه‌هایی هم که ژنوتیپ CT دارند در محل‌های 212 و 240 دارای باند الکتروفوزی می‌باشند(باند 28 از ژل خارج گردیده و دیده نمی‌شود). در صورت وجود ژنوتیپ TT محصول PCR برش نخورده و در همان محل 240 نوکلئوتیدی باقی می‌ماند. تصویر مربوط به محصولات RFLP پلی مورفیسم 107C>T- در شکل 1 آورده شده است.



تصویر 1. ژل پلی اکریل آمید PCR-RFLP مربوط به پلی مورفیسم 107C>T- . شماره 1 مارکر، 2 کنترل منفی(بدون DNA)، 3 کنترل Uncut(بدون آنزیم)، 4، 6 و 9 ژنوتیپ TT ، 5 ،7، 8 و 11 ژنوتیپ CT، 10 ژنوتیپ CC

درصد ژنوتیپ‌های CT،TT و CC درگروه مورد(131 نفر) به ترتیب 32/2، 47/5 و20/3 و در افراد شاهد(134 نفر) 21/6، 54/9 و23/5 بود. فراوانی ژنوتیپ‌های در پلی مورفیسم 107C/T- نشان داد که فراوانی آلل T از پلی مورفیسم 107C/T- در گروه شاهد 0/49 و در گروه مورد 0/56 می‌باشد که وقتی با آزمون آماری کای دو مقایسه شدند اختلاف معنی‌داری در دو گروه مشاهده نگردید(p = 0/37).

بحث

باتوجه به یافته‌های این مطالعه(جدول 1) مصرف لواستاتین براسیدهای چرب فسفولیپید ذرات HDL نیز موثر بوده به ویژه باعث افزایش اسیدهای چرب غیر اشباع در فسفولیپید این ذرات شده است به علاوه فعالیت آنزیم‌های متصل به این ذرات نیز دچار تغییر شده است. نتایج نشان داد در صورتی که ترکیب شیمیایی پاراکسون به عنوان سوبسترا باشد فعالیت آنزیم پاراکسوناز1، افزایش می‌یابد(p < 0/04) و اما اگر فنیل استات به عنوان سوبسترا قرار گیرد (فعالیت آریل استرازی) تغییر در فعالیت به دنبال درمان دیده نمی‌شود (p < 0/09) با توجه به اینکه فعالیت آریل استرازی تقریباً غلظت پروتئین پاراکسوناز 1 را نشان می‌دهد(8)، می توان نتیجه‌گیری نمود که لواستاتین تنها باعث افزایش فعالیت پاراکسوناز 1 شده و این در حالی است که بر غلظت این پروتئین تاثیر کمتری داشته است. دلیل افزایش فعالیت علیرغم عدم افزایش توده پروتئین این آنزیم به دنبال مصرف لواستاتین به این دلیل می‌تواند باشد که LDLهای اکسیده شده که یکی از سوبستراهای اصلی این آنزیم هستند کاهش یافته‌اند.

LDL اکسید شده در تشکیل آترووم و پلاک آترو اسکلروزی نقش اساسی دارد وآنزیم پاراکسوناز 1 متصل به HDL خط اولیه دفاعی در برابر تولید LDL اکسیده است(12). تحت تاثیر درمان با لواستاتین تغییرات غلظتی در لیپوپروتئین‌ها به دلیل ماهیت عملکردی این دسته داروها اتفاق می‌افتد و غلظت LDL-C و به دنبال آن ApoBو LDL اکسید شده نیز کاهش می‌یابد پس طبیعی است که مصرف این دسته داروها در کاهش ریسک بیماری قلبی عروقی موثر باشد و مطالعات قبلی این مسئله را نشان داده است(13).

با توجه به جدول 2 در این مطالعه تغییر فعالیت آریل استرازی مستقل از ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم - 107C/T عمل نموده است. به عبارت دیگر فعالیت آریل استرازی پاراکسوناز 1 نسبت به قبل درمان در این پلی مورفیسم تغییر قابل ملاحظه‌ای در ژنوتیپ‌ها نداشته است. این در حالی است که فعالیت پاراکسونازی در ژنوتیپ سی سی این پلی مورفیسم با درمان افزایش بهتری نشان داده است. که نشان دهنده نقش تعدیل‌کنندگی 107C/T- بر پاسخ به لواستاتین در فعالیت پاراکسونازی است.

در یک مطالعه که بر روی ژمفیبروزیل صورت گرفته تاثیر قابل توجهی در فعالیت پاراکسوناز 1 دیده نشده است(14). ولی در این مطالعه فعالیت آنزیم پاراکسوناز 1 تحت تاثیر لواستاتین قرار گرفته است. در مطالعات قبلی فعالیت آنتی اکسیدانی در سرم افراد که تحت درمان با استاتین‌ها قرار گرفته‌اند افزایش نشان داده است(15) این افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی گزارش شده در اثر مصرف استاتین‌ها ممکن است به دلیل افزایش فعالیت آنزیم پاراکسوناز 1 بوده باشد که دراین مطالعه دیده شده است.

LDL اکسید شده باعث غیرفعال شدن آنزیم پاراکسوناز 1 می‌گردد (16). پاسخ کلی افزایش فعالیت در اثر درمان با استاتین که در مطالعه حاضر دیده می‌شود احتمالاً به دلیل کاهش این LDLهای اکسید شده به دنبال کاهش کلسترول تام و LDL بعد از مصرف لواستاتین می‌تواند باشد. مصرف ویتامین‌های آنتی اکسیدان مانند C و E باعث افزایش فعالیت PON1 می‌گردند(17). پس با توجه به مطالب فوق فعالیت آنزیم پاراکسوناز 1 تحت تاثیر رژیم غذایی و دارویی می‌تواند دست خوش تغییر گردد.

ثابت شده که ترکیبات موجود در HDL در افراد مختلف با ژنوتیپ‌های متفاوت به ترکیبات رژیم غذایی غنی

از اسید چرب غیر اشباع پاسخ متفاوتی می‌دهند و باعث کاهش متفاوت در کلسترول پلاسما می‌شود(18). پس دور از انتظار نیست که افراد با ژنوتیپ‌های متفاوت پاراکسوناز 1 پاسخ متفاوتی به درمان با لواستاتین از خود نشان دهند که این پاسخ متفاوت با تغییر در اسیدهای چرب در ساختمان HDL می‌تواند همراه باشد که دراین مطالعه نیز نشان داده شده است.

نتیجه گیری

با توجه به یافته‌های این مطالعه، به نظر می‌رسد درمان با لواستاتین اثر محافظتی بیشتری در ژنوتیپ CC در مقابل بیماری قلبی عروقی داشته است و در ژنوتیپ CC که به دنبال درمان فعالیت بالاتر پاراکسونازی دیده شده اسیداولئیک و لینولئیک موجود در HDL نیز افزایش داشته‌اند.

منابع

1. Mackness MI, Mackness B. Effect of dilution on high-density lipoprotein associated paraoxonase-1 activity. Clin Biochem. 2011; 44 (14-15):1270-1.
2. Oda MN, Bielicki JK, Ho TT, Berger T, Rubin EM, Forte TM. Paraoxonase 1 overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. Biochemical and biophysical research communications. 2002;290(3):921-7.
3. Rozek LS, Hatsukami TS, Richter RJ, Ranchalis J, Nakayama K, McKinstry LA, et al. The correlation of paraoxonase (PON1) activity with lipid and lipoprotein levels differs with vascular disease status. Journal of lipid research. 2005;46(9):1888-95.
4. Shih DM, Gu L, Xia Y-R, Navab M, Li W-F, Hama S, et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. Nature. 1998;394(6690):284-7.
5. Deakin S, Leviev I, Guernier S, James RW. Simvastatin Modulates Expression of the PON1 Gene and Increases Serum Paraoxonase A Role for Sterol Regulatory Element–Binding Protein-2. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2003;23(11):2083-9.
6. Elkiran ET, Mar N, Aygen B, Gursu F, Karaoglu A, Koca S. Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lung cancer in a Turkish population. BMC cancer. 2007;7(1):48-9.
7. Srinivasan SR, Li S, Chen W, Tang R, Bond M, Boerwinkle E, et al. Q192R polymorphism of the paraoxanase 1 gene and its association with serum lipoprotein variables and carotid artery intima-media thickness in young adults from a biracial community: The Bogalusa Heart Study. Atherosclerosis. 2004;177(1):167-74.
8. van Himbergen TM, Roest M, de Graaf J, Jansen EH, Hattori H, Kastelein JJ, et al. Indications that paraoxonase-1 contributes to plasma high density lipoprotein levels in familial hypercholesterolemia. Journal of lipid research. 2005;46(3):445-51.
9. Van Himbergen T, Van Tits L, Roest M, Stalenhoef A. The story of PON1: how an organophosphate-hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. Neth J Med. 2006;64(2):34-8.
10. Brekke O-L, Espevik T, Bardal T, Bjerve KS. Effects of n− 3 and n− 6 fatty acids on tumor necrosis factor cytotoxicity in WEHI fibrosarcoma cells. Lipids. 1992;27(3):161-8.
11. Lepage G, Roy C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. Journal of lipid research. 1986;27(1):114-20.
12. Loued S, Isabelle M, Berrougui H, Khalil A. The anti-inflammatory effect of paraoxonase 1 against oxidized lipids depends on its association with high density lipoproteins. Life Sciences. 2012;90(1):82-8.
13. R Schaefer J. Lipid management for the prevention of cardiovascular disease. Current pharmaceutical design. 2011;17(9):852-60.
14. Durrington P, Mackness M, Bhatnagar D, Julier K, Prais H, Arrol S, et al. Effects of two different fibric acid derivatives on

lipoproteins, cholesteryl ester transfer, fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and paraoxonase activity in type IIb hyperlipoproteinaemia. Atherosclerosis. 1998;138(1):217-25.
15. Girona J, La Ville AE, Solà R, Plana N, Masana Ls. Simvastatin decreases aldehyde production derived from lipoprotein oxidation. The American journal of cardiology. 1999;83(6):846-51.
16. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Erogul J, Sorenson R, Bisgaier CL, et al. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. Free Radical Biology and Medicine. 1999;26(7):892-904.
17. van der Gaag MS, van Tol A, Scheek LM, James RW, Urgert R, Schaafsma G, et al. Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity; a diet-controlled, andomized intervention study in middle-aged men. Atherosclerosis. 1999;147(2):405-10.
18. Noori M, Darabi M, Rahimipour A, Rahbani M, Abadi NA, Darabi M, et al. Fatty acid composition of HDL phospholipids and coronary artery disease. Journal of Clinical Lipidology. 2009;3(1):39-44.