

The association of *PON1* Q192R polymorphism and idiopathic male infertility in Guilan population

Behrouzi S¹, Mashayekhi F^{1*}, Bahadori M²

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2- Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

Received: 6 Jul 2014, Accepted: 17 Sep 2014

Abstract

Background: Infertility is a disease of the reproductive system defined by the failure to achieve a clinical pregnancy after 12 months of regular unprotected sexual intercourse. Male infertility affecting 15% of couples. Environmental and genetic factors are involved in male infertility. Paraoxonase (PON) is an antioxidant enzyme which plays an important role in various diseases and is associated with oxidative stress and lipid metabolism. The PON gene family consists of 3 genes, PON1, PON2, and PON3, that located on the long arm of chromosome 7. In this study, the association of PON1 gene polymorphism at position 192 Q/R with idiopathic male infertility were investigated.

Materials and Methods: Blood Samples were collected from 120 patients diagnosed with idiopathic male infertility and 124 control subjects, and genotyped by PCR-RFLP method. To estimate the association between genotype and allele frequencies in cases and controls, P-values were assessed by chi-square (χ^2) analysis.

Results: We observed a significant difference in genotype distributions of PON1 192 Q/R polymorphism between patients and controls (P= 0.0001). Our findings revealed individuals with the variant QR and RR had a significant decrease risk of idiopathic male infertility (RR: OR= 0.057, 95%CI=0.003-1.08, P= 0.05. QR: OR= 0.288, 95%CI= 0.132-0.394, P= 0.0001).

Conclusion: Our data indicate that the PON1 192 Q/R polymorphism maybe associated with decreased risk of idiopathic male infertility. Although more studies should be considered with larger number of patient and control subjects to confirm our results.

Keywords: Idiopathic male infertility, polymorphism, *PON*

*Corresponding Author:

Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Email: mashayekhi@guilan.ac.ir

ارتباط پلی مورفیسم *Q/R* 192 *PON1* و ناباروری ایدیوپاتیک مردان در جمعیت گیلان

ستاره بهروزی^۱، فرهاد مشایخی^{۲*}، محمد هادی بهادری^۳

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲-استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳-گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: ناباروری یک بیماری سیستم تولید مثلی است که به صورت عدم بارداری بعد از ۱۲ ماه رابطه جنسی منظم بدون استفاده از روش‌های پیش‌گیری تعریف می‌شود. ناباروری مردان تقریباً در ۱۵ درصد زوجین دیده می‌شود که فاکتورهای محیطی و ژنتیکی در بروز آن نقش دارند. پاراکسوناز یک آنزیم آنتی‌اکسیدانی است که نقش مهمی در بیماری‌های مختلف داشته و با استرس اکسیداتیو و متابولیسم لیپید در ارتباط است. خانواده پاراکسوناز شامل سه ژن *PON1*، *PON2* و *PON3* می‌باشد که بر روی بازوی بلند کروموزوم ۷ قرار گرفته است. در این تحقیق ارتباط پلی مورفیسم *Q/R* ۱۹۲ *PON1* با ناباروری ایدیوپاتیک مردان بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های خون از ۱۲۰ مرد مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک و ۱۲۴ مرد سالم جمع‌آوری و با استفاده از روش *PCR-RFLP* مورد بررسی قرار گرفت. همچنین به منظور بررسی ارتباط بین فراوانی ژنوتیپی و اللی در دو گروه بیمار و کنترل از آزمون کای اسکوئر استفاده گردید.

یافته‌ها: ارتباط معنی‌دار بین فراوانی ژنوتیپی گروه‌های نابارور و کنترل مشاهده شد ($p=0/0001$). یافته‌های ما نشان می‌دهد افراد با ژنوتیپ *QR* و *RR* احتمال کمتری برای ابتلای به ناباروری ایدیوپاتیک مردان دارند ($p=0/0001$ ، $RR: p=0/05$ ، $OR=0/057$ ، $95\% CI=0/003-1/08$ ، $QR: p=0/288$ ، $95\% CI=0/132-0/394$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های ما نشان داد که پلی مورفیسم *Q/R* 192 *PON1* با کاهش احتمال ابتلای به ناباروری ایدیوپاتیک مردان در ارتباط است. اگرچه به منظور تایید این نتایج، باید مطالعات گسترده‌تری با افراد کنترل و بیمار بیشتر صورت گیرد.

واژگان کلیدی: پلی مورفیسم، ناباروری ایدیوپاتیک مردان، *PON*

*نویسنده مسئول: رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه بیولوژی

Email: mashayekhi @ guilan.ac.ir

مقدمه

ناباروری یک بیماری سیستم تولید مثل است که به صورت عدم بارداری بعد از ۱۲ ماه یا بیشتر رابطه جنسی معمول بدون پیش گیری تعریف می شود (۱). امروزه ناباروری یکی از مشکلات عمده روحی، اقتصادی و اجتماعی در جوامع بشری محسوب می گردد که تقریباً در نیمی از موارد آن به نحوی عامل مرد دخیل است (۲). ناباروری مردان مانعی برای موفقیت در بارداری است و تقریباً در ۱۵ درصد زوج ها دیده می شود (۳). به طور معمول عوامل ژنتیکی و محیطی دو عامل ناباروری مردان هستند (۳). اثر سم های محیطی مثل حشره کش ها، گلیکول اترها و فلزات سنگین از عوامل محیطی مهم در ناباروری مردان است. اختلالات سیستمیک مثل بیماری های هیپوفیزی-هیپوتالاموسی، سرطان بیضه، آپلازی سلول جنسی و فاکتورهای ژنتیکی مثل آنپلوئیدها و جهش های تک ژنی از عوامل مهم در ایجاد ناباروری مردان می باشند (۳). با وجود پیشرفت ها در تشخیص های بالینی ۵۰ درصد از موارد ناباروری مردان ناشناخته باقی مانده است (۴). در ناباروری ایدیوپاتیک نقص در ناباروری به طور خود به خودی و یا بر اثر دلایل ناشناخته بروز می کند (۵). بیشتر نمونه های ایدیوپاتیک منشا ژنتیکی مشابه دارند (۶). ناباروری با منشا ناشناخته در مردان ممکن است بر اثر فاکتورهایی چون استرس مزمن، اختلالات هورمونی که بر اثر آلودگی های محیطی ایجاد می شوند، گونه های اکسیژن فعال و یا عوامل ژنتیکی ایجاد شود (۷). رادیکال های آزاد در میتوکندری پستانداران تولید می شوند که در واقع محصول جانبی بوده و افزایش در سطح انواع گونه های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species-ROS) اسپرمی در ۴۰ درصد مردان نابارور گزارش شده است (۸). افزایش میزان ROS منجر به آسیب، عدم کارایی اسپرم و مرگ سلول می شود (۹). پاراکسوناز (Paraoxonase-PON) یک آنزیم وابسته به لیپوپروتئین با چگالی بالا (High Density Lipoprotein-HDL) است که از اکسیداسیون لیپوپروتئین با چگالی بالا جلوگیری می کند و یک خانواده منحصر به فرد از هیدرولازهای وابسته به کلسیم می باشند و

همچنین دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بوده و سلول را از استرس اکسیداتیو محافظت می کند (۱۰). خانواده PON شامل سه ژن PON1، PON2 و PON3 است که بر روی بازوی بلند کروموزوم ۷ قرار گرفته است. پروتئین های PON در توبول های اسپرم بر و اسپرماتوزوآ سازماندهی می شوند و در ناباروری مردان تاثیر می گذارند (۱۱). PON ها قادر به هیدرولیز پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می باشند. عدم فعالیت PON1 باعث کاهش توانایی HDL برای ممانعت از اکسیداسیون لیپوپروتئین با چگالی پایین (Low Density Lipoprotein-LDL) و واکنش بین ماکروفاژها و اندوتلیوم می شود (۱۲). دو پلی مورفیسم اصلی در ناحیه کدکننده ژن PON1 انسان گزارش شده، یکی در موقعیت ۱۹۲ بوده و منجر به جایگزینی گلوتامین به آرژنین می شود و دیگری جهش جایگزینی لوسین به متیونین در موقعیت ۵۵ است (۱۳). از آنجا که پلی مورفیسم های PON1 بر فعالیت سرم خون تاثیر می گذارند و فعالیت PON1 با تغییرات غلظت لیپوپروتئین های پلاسما همراه است، پلی مورفیسم های ژن PON1 می توانند بر سطوح لیپوپروتئین پلاسما تاثیر گذار باشند. یک تفاوت مهم در کلسترول کلی و سطح کلسترول LDL بین افراد با ژنوتیپ های Leu/Leu55 و Met/Met 55 نشان داده شده که در آن افراد با PON1 Met/Me 55 مشخصات لیپوپروتئینی پلاسما بهتری دارند. همچنین نشان داده شد که هموزیگوت های Leu/Leu 55 PON1 موجب افزایش HDL پایه می باشد و پلی مورفیسم Q/R192 پیش بینی کننده های قوی تری در تغییرات کلسترول HDL نسبت به پلی مورفیسم Met/Leu55 می باشد (۱۴). با توجه به نقش PON در استرس اکسیداتیو و همچنین اثر گونه های فعال اکسیژن بر ناباروری مردان ممکن است جهش و تنوعات ژنتیکی این ژن در ناباروری مردان موثر باشد. در نتیجه جهت بررسی این فرضیه، توزیع ژنوتیپی و اللی جهش های PON1 در دو ناحیه ۱۹۲ و ۵۵ در مردان نابارور و سالم صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری

در این مطالعه مورد-شاهدی ۱۲۰ مرد مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک مراجعه کننده به بخش ناباروری بیمارستان الزهرا رشت و ۱۲۴ مرد سالم (به عنوان گروه کنترل) مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های مبتلا به آزواسپرمی، مصرف دارو، عفونت مایع منی، واریکوسل، بیماری‌های سیستمیک، سابقه التهاب بیضه، حضور آنتی بادی‌های علیه اسپرم، هیپوگنادیسم هیپوتروفیک در این تحقیق حذف شدند. گروه کنترل شامل مردان سالمی بود که حداقل دارای یک فرزند بین ۱ تا ۵ سال بودند. محدوده سنی بیماران و افراد کنترل ۲۴-۴۵ سال بود. پس از تکمیل پرسش‌نامه حاوی اطلاعات افراد و اخذ رضایت نامه، ۲۰۰ میکرولیتر خون از آنان تهیه و جهت استخراج DNA در لوله‌های حاوی EDTA به آزمایشگاه منتقل گردید.

DNA ژنومی توسط کیت GPP solution

(شرکت سیناژن، ایران) استخراج گردید. پس از ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده توسط ژل الکتروفورز ادرصد، DNA تا قبل از بررسی‌های مولکولی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تکثیر ناحیه ۱۹۲ در ژن PON با استفاده از پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت (جدول ۱). شرایط PCR جهت تکثیر ناحیه پلی مورفیک شامل: ۵ دقیقه واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ سیکل در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵ ثانیه در دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال پرایمرها (Annealing) و ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به منظور باز آرایشی رشته DNA بود. جهت اطمینان از انجام واکنش PCR، الکتروفورز محصولات توسط ژل آگارز انجام شد. در صورت استفاده از پرایمر ۱۹۲ قطعه‌ای به اندازه ۲۷۹ bp تکثیر گردید.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر قطعه پلی مورفیک

توالی پرایمرها	اندازه قطعه تکثیر یافته (bp)	دمای ذوب (Tm)	پلی مورفیسم
F:5'-CACGAAGGCTCCATCCCAC-3'	۱۹	۶۱	Q192R
R:5'-TCCTTCTGCCACCCTCGAAC-3'	۲۱	۶۱	

در پایان شناسایی پلی مورفیسم ناحیه ۱۹۲ توسط تکنیک RFLP به وسیله آنزیم ALW1 (شرکت سیناژن، ایران) صورت گرفت. بدین منظور ۴ میکرولیتر محصول PCR با ۱ واحد از آنزیم و ۱ میکرولیتر بافر مربوطه مخلوط و ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر به آن اضافه شد تا به حجم ۱۰ میکرولیتر برسد. سپس آنکوباسیون در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ناحیه ۱۹۲ به مدت ۲ ساعت صورت گرفت. جهت بررسی نحوه عمل آنزیم، از الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد استفاده گردید.

آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار MedCalc صورت گرفت. جهت بررسی معنی‌دار بودن تفاوت بین ژنوتیپ‌ها در دو گروه بیمار و کنترل از آزمون کای اسکوئر

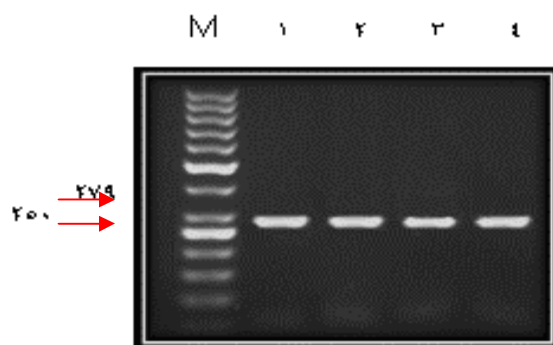
استفاده گردید و سطح معنی‌داری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در مجموع ۲۴۴ نفر شامل ۱۲۰ مرد مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک و ۱۲۴ مرد سالم به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. بازه سنی در مردان نابارور و کنترل بین ۲۴-۴۵ سال بود. اختلاف معنی‌داری در خصوص سن در دو گروه بیمار و کنترل وجود نداشت. برای بررسی وجود جهش در ناحیه ۱۹۲ ژن PON1 نمونه DNA افراد بیمار و کنترل تحت اثر آنزیم ALW1 قرار گرفتند. در

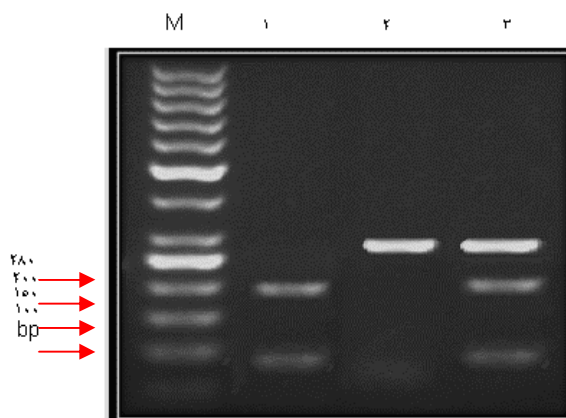
همان طور که در جدول ۲ آورده شده است از ۱۲۰ فرد بیمار، ۸۶ نفر دارای ژنوتیپ Q/Q و ۳۴ نفر ژنوتیپ Q/R بودند. هم چنین هیچ فردی با ژنوتیپ R/R مشاهده نشد. در گروه کنترل ۴۴ نفر با ژنوتیپ Q/Q، ۷۲ نفر با ژنوتیپ Q/R و ۴ نفر با ژنوتیپ R/R مشاهده گردید. جهت بررسی معنی دار بودن تفاوت بین ژنوتیپ‌ها در دو گروه بیمار و کنترل از آزمون کای اسکوار استفاده شد. مقدار χ^2 محاسبه شده برابر ۳۳/۵۴ و مقدار $p=0/0001$ به دست آمد. با توجه به مقدار p حاصله می‌توان نتیجه گرفت که بین پلی مورفیسم ناحیه ۱۹۲ ژن PON1 و ناباروری ایدیوپاتیک مردان در جمعیت مورد مطالعه، ارتباط معنی دار وجود دارد. نتایج نشان دهنده این مطلب است که افراد با ژنوتیپ RR و QR دارای اثر محافظت کنندگی در برابر ناباروری ایدیوپاتیک مردان می‌باشند ($p=0/0001$ ، $OR=0/394$ ، $95\% CI=0/003-1/08$ ، $QR: p=0/288$ ، $95\% CI=0/132$ ، $RR: p=0/05$ ، $OR=0/057$ ، $CI=$ آماری دقیق تر نشان می‌دهد که الل R می‌تواند اثر محافظت کنندگی داشته باشد ($p=0/0001$ ، $OR=0/235$ ، $95\% CI=0/149$).

شکل ۱ و ۲، تصاویر مربوط به PCR-RFLP آورده شده است.



شکل ۱. تکثیر ناحیه ۱۹۲ توسط PCR. قطعه ای به طول ۲۷۹ جفت

باز در نمونه های ۱-۴ (کنترل) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر گردید. ستون M: مارکروزول مولکولی



شکل ۲. محصولات حاصل RFLP. ستون ۱ هموزیگوت RR، ستون ۲ هموزیگوت QQ و ستون ۳ هتروزیگوت QR می‌باشد. M = مارکروزول مولکولی

جدول ۲. توزیع ژنوتیپی و الی پلی مورفیسم 192Q/R ژن PON1 در افراد بیمار و کنترل

	p	OR (95% CI)	گروه بیمار (تعداد=۱۲۰) (%)n	گروه کنترل (تعداد=۱۲۴) (%)n	الل
		(reference)(۱/۰۰)	۸۶/۰(۲۰۶)	۶۶/۰(۱۶۴)	Q
	(۰/۰۰۰۱)	۰/۲۰-۰/۵۰(۰/۳۲)	۱۴/۰(۳۴)	۳۴/۰(۸۴)	R
		(reference)(۱/۰۰)	۷۱/۶۶(۸۶)	۳۶/۶۶(۴۴)	QQ
	(۰/۰۰۰۱)	۰/۱۳-۰/۳۹(۰/۲۲)	۲۸/۳۳(۳۴)	۶۳/۳۳(۷۶)	QR
	(۰/۰۰۵۶)	۰/۰۰۳-۱/۰۸(۰/۰۵)	۰/۰(۰)	۳/۳۳(۴)	RR
	(۰/۰۰۰۱)	۰/۱۲-۰/۳۷(۰/۲۱)	۲۸/۳(۳۴)	۶۴/۵(۸۰)	RR=QRvsQQ
	(۰/۱۴۲)	۰/۰۰۵-۲/۰۸(۰/۱۱)	۱۰۰(۱۲۰)	۹۶/۷(۱۲۰)	RRvsQQ=QR

بحث

با توجه به این که ناباروری یک بیماری چند عاملی است و تحت تاثیر عوامل مختلف ژنتیکی و محیطی قرار دارد لذا نقش سایر ژن‌های دخیل در فرایند استرس اکسیداتیو، عوامل محیطی و حتی سایر پلی مورفیسم‌های شناخته شده این ژن، در ایجاد و بروز ناباروری ایدیوپاتیک مردان قابل تامل و بررسی بیشتر می‌باشد. هم‌چنین ممکن است نتایج به دست آمده با تغییر خزانه ژنتیکی و یا تغییر اندازه جمعیت مورد مطالعه تغییر کند، لذا حصول نتایج قطعی نیازمند مطالعات با جامعه آماری بیشتری خواهد بود.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده وجود ارتباط بین فراوانی ژنوتیپی این پلی مورفیسم با ناباروری ایدیوپاتیک مردان می‌باشد ($p=0/0001$) و افرادی با ژنوتیپ QR و RR احتمال کمتری برای ابتلای به ناباروری ایدیوپاتیک مردان دارند.

تشکر و قدردانی

ضمن تشکر صمیمانه از دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان در فراهم آوردن تجهیزات و همکاری کارکنان بخش ناباروری بیمارستان الزهرا (س) در تهیه نمونه‌ها، مقاله حاضر بخشی از پایانامه کارشناسی ارشد ستاره بهروزی، دانشجوی رشته بیولوژی سلولی تکوینی، دانشگاه گیلان می‌باشد.

منابع

1. Kara E, Simoni M. Genetic screening for infertility: When should it be done? Middle East Fertility Society Journal. 2010;15(3):139-45.
2. Ferlin A, Arredi B, Foresta C. Genetic causes of male infertility. Reproductive Toxicology. 2006;22(2):133-41.
3. Avenarius MR, Hildebrand MS, Zhang Y, Meyer NC, Smith LL, Kahrizi K, et al. Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein. The American Journal of Human Genetics. 2009;84(4):505-10.

بررسی نتایج این پژوهش نشان می‌دهد، با توجه به مقدار $p=0/0001$ به دست آمده، بین فراوانی ژنوتیپی پلی مورفیسم 192Q/R ژن PON1 با ناباروری ایدیوپاتیک مردان ارتباط معنی‌دار وجود دارد. این نتایج بیان می‌کنند افراد با ژنوتیپ QR و RR دارای احتمال کمتری برای ابتلای به ناباروری ایدیوپاتیک مردان می‌باشند. هم‌چنین نتایج نشان می‌دهد که ال R دارای اثر محافظت‌کنندگی در برابر ناباروری مردان است.

با توجه به چند عاملی بودن ناباروری تاکنون نقش ژن‌های مختلفی در ایجاد آن مورد بررسی قرار گرفته که یکی از این ژن‌ها PON1 می‌باشد (۶). ژن PON1 بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۷ انسانی قرار گرفته و دارای پلی مورفیسمی در موقعیت ۱۹۲ بوده که منجر به جایگزینی گلوتامین با آرژنین می‌گردد (۱۳). وولک و همکاران PON1 را به عنوان یک فاکتور خطر در استعداد ابتلا به ناباروری معرفی کردند (۱۵). هم‌چنین لیندراس و همکاران نشان دادند بین ال 192R و کاهش تحرک اسپرم ارتباط وجود دارد (۱۱). فورلانگ و همکاران ارتباط بین تغییرات HDL وابسته به PON1 را در مردان مبتلا به پارکینسون گزارش کردند (۱۶). فعالیت پایین پاراکسوناز سرم (PON) نیز به عنوان یک فاکتور خطر ابتلا به آلزایمر توسط لازاروس و همکاران در سال ۲۰۱۰ شناخته شد (۱۰). با توجه به نقش مهم PON و پلی مورفیسم‌های آن در بسیاری از بیماری‌ها مانند اختلالات عصبی در اوتیسم، آلزایمر، پارکینسون، اسکیزوفرنی، اسکروزیس آمیوتروفیک جانبی، افسردگی و سکنه مغزی ایسکمیک حاد، برخی بیماری‌های مربوط به زنان مانند اندومتریوز، در این پژوهش ما برای نخستین بار به بررسی نقش احتمالی تغییرات این ناحیه پلی مورفیک (192Q/R) ژن PON1 به عنوان یکی از عوامل تاثیرگذار بر ناباروری ایدیوپاتیک مردان پرداختیم که برای این منظور تغییرات توزیع ژنوتیپی و اللی این جایگاه را در ۱۲۰ مرد مبتلای به ناباروری ایدیوپاتیک و ۱۲۴ مرد سالم مورد ارزیابی قرار دادیم.

4. Hildebrand MS, Avenarius MR, Fellous M, Zhang Y, Meyer NC, Auer J, et al. Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *European Journal of Human Genetics*. 2010;18(11):1178-84.
5. Hamada A, Esteves SC, Agarwal A. The role of contemporary andrology in unraveling the mystery of unexplained male infertility. *Open Reprod Sci J*. 2011;3:27-41.
6. Jungwirth A, Diemer T, Dohle G, Giwercman A, Kopa Z, Krausz C, et al. Guidelines on male infertility. *European Association of Urology Guideline*. 2013.
7. Oberley TD. Oxidative damage and cancer. *The American journal of pathology*. 2002; 160(2): 403-4.
8. Olayemi F. review on some causes of male infertility. *African journal of biotechnology*. 2010; 9(20): 2834-42.
9. Lazaros L, Markoula S, Kyritsis A, Georgiou I. Paraoxonase gene polymorphisms and stroke severity. *European Journal of Neurology*. 2010;17(5):757-9.
10. Lazaros LA, Xita NV, Hatzi EG, Kaponis AI, Stefos TJ, Plachouras NI, et al. Association of Paraoxonase Gene Polymorphisms With Sperm Parameters. *Journal of andrology*. 2011;32(4):394-401.
11. Kim DS, Burt AA, Ranchalis JE, Richter RJ, Marshall JK, Eintracht JF, et al. Additional common polymorphisms in the PON gene cluster predict PON1 activity but not vascular disease. *Journal of lipids*. 2012;2012.
12. Gupta N, Gill K, Singh S. Paraoxonases: structure, gene polymorphism & role in coronary artery disease. 2009: 361-8.
13. Malin R, Laaksonen R, Knuuti J, Janatuinen T, Vesalainen R, Nuutila P, et al. Paraoxonase genotype modifies the effect of pravastatin on high-density lipoprotein cholesterol. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2001; 11(7): 625-33.
14. Volk M, Jaklič H, Zorn B, Peterlin B. Association between male infertility and genetic variability at the PON1/2 and GSTM1/T1 gene loci. *Reproductive biomedicine online*. 2011;23(1):105-10.
15. Furlong C, Suzuki S, Stevens R, Marsillach J, Richter R, Jarvik G, et al. Human PON1, a biomarker of risk of disease and exposure. *Chemico-biological interactions*. 2010; 187(1): 355-61.