## مقاله پژوهشی

# اثر افزایشی لووستاتین بر فعالیت آنزیم پاروکسوناز و اثر فرو نشانی آن بر حساسیت لیپوپروتئین کم چگالی به اکسیداسیون در نفروپاتی دیابتیک نوع ۲

**محمد نقوی بهزاد**: مرکز تحقیقات فلسفه و تاریخ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
**نریمان نظامی**: مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
**رضا پیری**: مرکز تحقیقات فلسفه و تاریخ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
**جاوید صفا**: مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
**هزاد سالاری**: مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
**نادره رشتچی زاده**: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
**امیر قربانی حق جو**: مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، نویسنده رابط:
**Email: ghorbaniamir@hotmail.com**

**دریافت: ۹۱/۶/۱۹ پذیرش: ۹۱/۹/۲۸**

## چکیده:

**زمینه و اهداف:** بیماری دیابت ملیتوس احتمال ابتلا به بیماریهای قلبی کرونری را ۲ تا ۳ برابر افزایش می دهد. هدف از این مطالعه بررسی اثر درمان لووستاتین و پرهیز از آن بر سطوح فعالیت آنزیم پاروکسوناز ۱ (PON1) و آنزیم آریل استراز (ARE) و حساسیت به اکسیداسیون لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL) در مبتلایان به نفروپاتی دیابتی نوع ۲ (T2DN) بود.

**مواد و روش ها:** لووستاتین (۲۰ میلی گرم/روز) به مدت ۹۰ روز به ۳۰ نفر مبتلا به T2DN تجویز و سپس به مدت ۳۰ روز پس از دریافت دارو قطع گردید. فعالیت آنزیمهای PON1 وARE به روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. حساسیت به اکسیداسیون LDL با ارزیابی فاز تاخیری بواسطه اندازه گیری تولید دایونهای کونژوگه تعیین شد.

**یافته ها:** پس از ۹۰ روز تجویز لووستاتین، فعالیت آنزیمهای PON1 و ARE و فاز تاخیری LDL به طور معنی داری افزایش یافته بودند ($P = ۰/۰۰۴$ ، $P = ۰/۰۰۲$ ، $P < ۰/۰۰۱$)، در حالی که پس از ۳۰ روز از قطع دارو، فعالیت هر دو آنزیم PON1 وARE و فاز تاخیری LDL تغییر قابل توجهی نکرده بود.

**نتیجه گیری:** درمان با لووستاتین فعالیت آنزیمهای PON1 وARE و حساسیت به اکسیداسیون LDL را بهبود می بخشد. با این وجود، علیرغم قطع لووستاتین به مدت ۳۰ روز، فعالیت PON1 و ARE و حساسیت به اکسیداسیون LDL در مبتلایان به T2DN بدون تغییر باقی ماند.

**کلید واژه ها:** دیابت، نفروپاتی، پراکسیداسیون لیپیدی، لووستاتین، پاروکسوناز، آریل استراز.

## مقدمه

بیماری دیابت ملیتوس، حتی با در نظرگرفتن سایر عوامل زمینه ساز، احتمال ابتلا به بیماریهای قلبی کرونری را ۲ تا ۳ برابر افزایش می دهد (۱). از میان عوامل متعدد زمینه ساز آترواسکلروز در بیماری دیابت، نقش احتمالی تغییرات اکسیداتیو لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL)، طی دهه اخیر به شدت مورد توجه قرار گرفته است و این در حالی است که شواهد همراه حاکی از افزایش استرس اکسیداتیو در بیماران دیابتی است. نتایج گزارش‌های متعدد نشان داده است که میزان LDL پلاسما در افراد مبتلا به دیابت به طور قابل توجهی بالا است (۳و۲). علاوه بر این، بررسی ها مشخص کرده اند که LDL استخراج شده از پلاسمای افراد مبتلا به دیابت کنترل نشده نسبت به اکسیداسیون مستعدتراست (۴). آنزیم پاراکسوناز سرمی (PON1) یک فسفو تری استراز متصل به

Archive of SID

www.SID.ir

HDL است که به طور عمده توسط کبد تولید می‌شود (۵). مطالعات اخیر آشکار کرده‌اند (۶) که آنزیم PON1 در ارتباط با لیپوپروتئین‌های غنی از تری گلسیرید (VLDL و chylomicrons) فعالیت دارد، نه LDL-C. آنزیم PON1 یک استراز وابسته به کلسیم است که توانایی هیدرولیز طیف وسیعی از مواد شامل ارگانوفسفات ها، آریل استرها و لاکتونها را دارا می باشد (۷،۵). مطالعات اخیر کاهش میزان و فعالیت آنزیم PON1 را در بیماران مبتلا به دیابت بویژه بیماران دچار نوروپاتی دیابتی گزارش کرده اند (۹و۸). در بین داروهای مختلف کاهنده میزان لیپید، استاتین‌ها (statins) داروهای ضد هایپرلیپیدمی هستند که به علت عوارض کم و تاثیر قوی در کاهش میزان LDL-C به طور جهانی مورد استفاده قرار می گیرند. از آنجایی که استاتینها به خوبی توسط بیمار تحمل می‌شوند و تاثیر منفی بر کنترل قند خون ندارند، در بیماران مبتلا به دیابت، استاتین‌ها داروی انتخابی برای کاهش میزان LDL-C (برخی استاتین‌ها میزان تری گلیسیرید را هم می کاهند) هستند (۱۰). داده‌های به دست آمده از آنالیزهای زیر گروهی میزان کلسترول در کارآزماییهای-بالینی استاتینها نشان می‌دهند که فواید درمان با استاتینها در مبتلایان به دیابت به همان میزان فواید آن در گروه افراد غیر دیابتی قابل توجه است. با توجه به اثرات کاهنده این داروها بر میزان پروفایل لیپیدی، متابولیت‌های استاتین‌ها به احتمال زیاد قابلیت آنتی اکسیدانی داشته باشند (۱۱). بررسیهای متعدد بالینی اثرات مفید استاتین‌ها بر میزان فعالیت آنزیم PON1 متصل به HDL-C را در بیماران مبتلا به هایپرلیپیدمی اثبات کرده-اند، هر چند نتایج این بررسی‌ها هنوز مورد بحث هستند (۱۲).

هدف از مطالعه‌ی پیش رو، بررسی اثرات تجویز و قطع داروی لووستاتین بر میزان فعالیت آنزیمهای PON1 و آریل استراز و حساسیت به اکسیداسیون LDL-C در مبتلایان به نفروپاتی دیابتیک نوع ۲ به همراه تاثیر این دارو بر روی پروفایل لیپیدی است.

## مواد و روش ها

مطالعه‌ی کارآزمایی بالینی شاهد دار تصادفی کنونی از تاریخ فروردین ماه ۱۳۸۸ لغایت شهریور ۱۳۹۰ در کلینیک فوق تخصصی شیخ‌الرئیس دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام گرفت. بعد از ارزیابی‌های بالینی و آزمایش‌های اولیه، ۳۸ مرد که مبتلا به نوروپاتی دیابتی نوع ۲ (T2DN) بودند مورد مطالعه قرار گرفتند. برای حذف عوامل اخلال‌گر در مطالعه، افرادی که دیابت نوع ۲ و پروتینوری کمتر از حد نفروتیک (مثلا ۳g/dg) و کلیرانس کلیوی تخمینی بیشتر از ۳۰mg/min (محاسبه شده با فرمول Cockroft-Gault) داشتند مورد مطالعه قرار گرفتند. تمامی شرکت کننده‌ها رضایت نامه کتبی پر کرده بودند و پروتکول تحقیق که منطبق بر توافقنامه Helsinki بود، به تأیید کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز رسیده بود. سطح گلوکز پلاسما ناشتای شرکت‌کننده‌ها با تزریق انسولین یا تجویز سولفونیل اوره‌ی خوراکی مورد کنترل قرار گرفته بود. فشار خون به وسیله‌ی مهار کننده‌های آنزیم مبدل آنژیوتاسین و یا مسدود کننده‌های گیرنده آنژیوتانسین به همراه آلفا بلوکرها و داروهای مدرا (به مقدار لازم) پائینتر از ۱۲۹/۷۹ mmHg حفظ شده بود. افراد تحت مطالعه تحت رژیم درمانی با پروتئین محدود و منظم، تجویز شده توسط مشاور تغذیه، بودند. هر تغییر عمده ای در فشار خون، میزان مصرف پروتئین و فعالیت بدنی در طول تحقیق جزء موارد خروج از مطالعه در نظر گرفته شده بود. سایر موارد خروج از تحقیق عبارت بودند از: استفاده از سایر استاتینها غیر از لووستاتین، فیبراتها، آسپرین β-blaker: آلوپورینول، ویتامینها، پنتواکسی فیلین، روغن ماهی، یا دیگر آنتی اکسیدانها، سیگاری های فعال، بروز التهاب فعال (دیابتی، هپاتیت، عفونتها و ...) بیماریهای قلبی-عروقی فعال (که با علائم بالینی و یافته های الکتروکاردیوگرام تشخیص داده می‌شود) و بیماری دیابت نوع ۲ کنترل نشده (Hb Alc بیشتر از۷.۵٪ ) در طول ۳ ماه. در نهایت اطلاعات ۳۰ بیمار که مبتلا به T2DN بودند وارد مطالعه و مورد آنالیز قرار گرفت (قدرت مطالعه ۰/۸ و معنی داری ۰/۵). در حالی که ۸ بیمار، ۲ نفر به دلایل عدم همکاری، ۱ نفر استفاده از ویتامین C در طول مطالعه، ۱ نفر تغییر شیوه‌ی زندگی در طول مطالعه، ۱ نفر سیگار کشیدن در طول مطالعه، ۱ نفر سفر کردن در طول مطالعه، ۱ نفر تغییر مصرف لوستاتین به آتورواستاتین توسط متخصص غدد و ۱ نفر به علت پیشرفت بیماری به مرحله‌ی نهایی نارسایی کلیوی از مطالعه حذف شدند. بر اساس پروتکل‌های مطالعه، بیماران تحت یک دوره لووستاتین درمانی به میزان روزانه ۲۰mg و بمدت ۹۰ روز قرار گرفتند. بعد از گذشت ۳ ماه لووستانین درمانی، از بیماران خواسته شد که از روز ۹۱ ام تا روز ۱۲۰ام مصرف لووستاتین را متوقف کنند. برای بررسی میزان فعالیت آنزیمهای PON1 و ARE و حساسیت به اکسیداسیون LDL-C از بیماران در ۴ نوبت با برنامه‌ی مذکور نمونه خون گرفته شد. قبل از لوستاتین درمانی (پایه)، ۴۵ روز بعد ازشروع لووستاتین درمانی، ۹۰ روز بعد از شروع لووستاتین درمانی و ۳۰ روز بعد از توقف لوستاتین درمانی. نمونه‌های خون بعد از ناشتایی شبانه (۱۲ ساعت) در لوله‌های خالی و استیل گرفته شده و سپس بلافاصله در یخ و در دمای ۴C نگه‌داری شدند نمونه‌های سرم از سلولهای خونی به وسیله سانتریفوژ ۳۰۰۰pm برای ۱۰ دقیقه جدا شد. سپس سرم به دو قسمت تقسیم شد، یک قسمت به حالت سرم و قسمت دیگر در میکروتوب‌های محتوی EDTA در دمای -c۷۹ تا زمان آنالیز نهایی نگه‌داری شدند. تست‌های بیوشیمیایی برای اندازه گیری میزانFBG، کلسترول (Chol)، HDL و تری گلیسرید (TG) با استفاده از کیتهای تجاری و دستگاه اتوماتیک آنالیزور شیمیایی (Abbott analyzer محصول شرکت Abbott، آمریکا) انجام گرفته شد. میزان LDL با استفاده از معادله Friedwald محاسبه شد (۱۳).

میزان فعالیت آنزیم PON1 در حضور NaCl (فعالیت تحریک شده با نمک) و در غیاب NaCl (فعالیت پایه) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، میزان هیدرولیز پاراکسون (signal) با افزایش جذب در ۴۱۲nm و دمای ۲۵c اندازه‌گیری شد. میزان P-nitrophenol ساخته شده با ضریب جذب مولی در PH=8 محاسبه شد که مقدار آن ۱۷,۱۰۰ $M^{-1}cm^{-1}$ به دست آمد. میزان فعالیت PON به صورت V/L سری بیان شد. فنیل استات به عنوان یک ماده‌ی اولیه برای

Archive of SID

www.SID.ir

اندازه‌گیری فعالیت ARE استفاده شد. با اضافه کردن سرم واکنش شروع شده و افزایش جذب در ۲۷۰nm خوانده شد. نمونه های کنترل هم برای اندازه‌گیری هیدرولیز خود به خودی فنیل استات اضافه شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از ضرب جذب مولی فنل تولید شده محاسبه شد که برابر با ۱۳۱۰ M-1cm-1 بود. یک واحد فعالیتی ARE به صورت ۱ µmol فنول تولید شده در شرایط فوق بر دقیقه تعریف شده و به صورت KV/L در نظر گرفته شد (۱۴). حساسیت به اکسیداسیون LDL قسمت LDL با استفاده از اولتراسانتریفوژ تحت شرایط ۱۰۰۰۰۰ دور در دقیقه برای ۴ ساعت و دمای ۱۵ درجه سانتی گراد از پلاسما جدا شد. اکسیداسیون LDL (µg۵) با تولید دایِنهای کونژوگه تحت تاثیر حضور یون مس (µM۵) هر ۵ دقیقه در طیف نوری ۲۳۴ نانومتر در یک میلی لیتر محلول بافری فسفات در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد زیر اشعه UV (m) اندازه‌گیری شد و نتایج به عنوان فاز تاخیری اکسیداسیون LDL در نظر گرفته شد (۱۴). آنالیزهای آماری داده های مطالعه با استفاده از بسته نرم افزاری SPSS نسخه-ی ۱۳.۰ برای ویندوز انجام شد. نتایج بصورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شدند. برای مقایسه تغییرات طی تجویز و قطع از آزمونهای General linear model repeated measures analysis, Bonferroni tests, paired t-tests and Wilcoxon signed rank tests استفاده شد. ارتباط بین متغیرها نیز با استفاده از آزمون ارتباط Pearson بررسی شد. در صورتی که نتایج میزان p کمتر از ۰/۰۵ می شد، تفاوت و ارتباط معنی دار در نظر گرفته می شد.

## یافته ها

میانگین سنی شرکت کنندگان ۵۴/۵۴±۴/۱۴ سال، با میانگین شاخص توده بدنی kg/m ۲۶/۸۳±۳/۱۱ و میانگین طول مدت ابتلا به دیابت ۹/۷۶±۳/۱۱ سال بود. ۱۳ شرکت کننده (۳۳/۳۴ درصد) دارای فشار خون خفیف تا متوسط به مدت ۳/۹۸±۳/۱۰ سال بودند. میانگین فشار خون سیستول و دیاستول در ابتدای مطالعه به ترتیب mmHg ۱۲۴/۷۲±۱۱/۴۵ و mmHg ۷۲/۹۰±۵/۱۸ بود. میانگین کراتینین و اوره سرم و حجم، پروتئین، کراتینین و نسبت پروتئین به کراتینین ادرار ۲۴ ساعته mg/dL ۱.۶۵±۰.۹۱ ، mg/dL ۵۴/۲۳± ۳۲/۰۵ ، ML/day ±۹۳۹/۲۱ ، mg/day ۲۱۱۶/۶۷ ±۷۰۶/۸۳ mg/day ، ۱۲۱۰.۳۶ ±۳۰۹.۱۶ و ۹۷۴/۷۳ ۰/۸۱±۰/۴۸ بود. میانگین و انحراف معیار FPG، Chol، TG، HDL ، و LDL در جدول ۱ نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهند که میزان Chol و LDL بعد از ۴۵ روز درمان با لووستاتین به طور معنی داری ، بدون تغییر قابل ملاحظه‌ای در میزان TG کاهش یافته است. بعلاوه، در پایان ۴۵ روز از درمان با لووستاتین، میزان HDL افزایش یافته است. در مقایسه، میزان HDL, TG, Chol و C- در پایان روز ۹۰ درمان با لووستاتین، تفاوت قابل ملاحظه‌ای با روز ۴۵ ام درمان نداشت. سی روز بعد از اتمام تجویز لووستاتین میانگین میزان Chol، TG و LDL ولی نه HDL به طور چشمگیری در مقایسه با میزان اندازه‌گیری شده در روز ۹۰ درمان با لووستاتین افزایش یافته بود.

میانگین و انحراف معیار میزان فعالیت (PON 1) در شکل ۱ نمایش داده شده است. درمان با لووستاتین به طور معنی داری میزان فعالیت این آنزیم را افزایش و قطع دارو آن را کاهش داده است (Wilks lambda =۰/۸۴۰ , f(۳و۲۷)=۷/۷۱۵ , p=۰/۰۳۲ multivariate partial eta squared,). در طول درمان ۴۵ روزه‌ی اول لووستاتین، مزان فعالیت PON1 به طور قابل توجهی افزایش یافت، درحالی که ۴۵ روز پس از آن لووستاتین درمانی تغییری در فعالیت PON1 ایجاد نکرد. فعالیت PON1 بعد از عدم دریافت لووستاتین کاهش یافت، با این حال این تغییر از لحاظ آماری در مقایسه با اندازه‌گیری میزان ۹۰ روزه قابل ملاحظه نیست. میانگین و انحراف معیار فعالیت ARE در شکل ۲ نشان داده شده است. اثر قابل توجهی ناشی از درمان با لووستاتین و قطع آن وجود داشت (Wilks lambda =۰/۶۶۳ , f(۳و۲۷)=۴/۵۷۰ , p=۰/۰۱۰ و multivariate parital eta squared =۰/۳۳۷ ). نظیر PON1، فعالیت ARE به دنبال ۴۵ روز اول درمان با لووستاتین افزایش یافته بود و سپس در ۴۵ روز بعدی در میزانی ثابت و بالاتر از میزان قبل از دریافت دارو قرار گرفت. همچنین قطع لووستاتین تغییری در سطح ARE ایجاد نکرد. فاز تاخیری اکسیداسیون LDL در شکل ۳ نشان داده شده است (f(۳و۲۷)=۱۱/۴۸۶ , p=۰/۰۰۱ , Wilks lambda =۰/۴۳۹ و Multirariate partiel eta =۰/۵۶۱ , squared). فاز تاخیری اکسیداسیون LDL از آغاز درمان لووستاتین تا روز ۹۰ مداخله طولانی شد، ولی بعد از ۳۰ روز پس از قطع لووستاتین تغییری نکرد. اگرچه تغییرات فعالیت آنزیمهای PON1 و ARE ارتباطی با تغییرات میزان HDL در طول مدت زمان مداخله نداشت (p =۰/۲۳۶ و p=۰/۱۸۵)، ولی تغییرات فعالیت آنزیمهای PON1 و ARE بعد از قطع درمان رابطه‌ی خطی مستقیمی با تغییرات میزان HDL داشت (r=۰.۴۵۴ ، p=۰.۰۱۲ ; r=۰.۷۰۹ ، p<۰.۰۰۱)

**جدول ۱: تغیرات گلوکز و لیپید پلاسما در افراد مبتلا به نوروپاتی دیابتیک۲ بعد از ۳ ماه مصرف لووستاتین و یک ماه پرهیز بعد از آن.**

| زمان های ارزیابی | شروع درمان | ۴۵ روز بعد از شروع درمان | ۹۰ روز بعد از شروع درمان | ۳۰ روز بعد از قطع درمان | p values | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | $p^a$ | $p^b$ | $p^c$ | $p^d$ | $p^e$ |
| FBG (mg/dL) | ۱۵۹/۱۷±۶۷/۵۳ | ۱۵۲/۴۵±۵۸/۴۰ | ۱۵۱/۵۸ ±۵۷/۶۵ | ۱۵۶/۶۰±۵۷/۲۷ | ۰/۵۰۴ | ۰/۱۸۰ | ۰/۴۸۸ | ۰/۴۹۱ | ۰/۹۳۳ |
| Wilks' lambda = ۰/۹۲۵, F (۳ ،۲۶)= ۰/۶۹۹, p =۰/۵۶۱,multivariate partial eta squared=۰/۰۷۵ | | | | | | | | | |
| Chol (mg/dL) | ۱۹۹/۰۰±۴۳/۳۳ | ۱۶۴/۶۶±۳۵/۱۹ | ۱۶۵/۴۳±۴۰/۴۱ | ۱۹۸/۴۰ ±۴۸/۱۸ | >۰/۰۰۱ | ۰/۸۵۱ | >۰/۰۰۱ | >۰/۰۰۱ | ۰/۹۳۳ |
| Wilks' lambda =۰/۲۵۷, F (۳ ،۲۷)=۲۶/۰۵۴, p = ۰/۰۰۱, multivariate partial eta squared =۰/۷۴۳ | | | | | | | | | |
| TG (mg/dL) | ۱۷۵/۳۷±۹۴/۹۷ | ۱۷۲/۰۶ ±۹۴/۷۲ | ۱۷۰/۹۰±۹۵/۲۴ | ۲۰۶/۵۰±۱۴۲/۰۲ | ۰/۱۵۶ | ۰/۴۳۰ | ۰/۱۰ | ۰/۲۰۵ | ۰/۱۹۴ |
| Wilks' lambda =۰/۶۹۴, F (۳ ،۲۷)=۳/۹۶۱, p =۰/۰۱۸,multivariate partial eta squared=۰/۳۰۶ | | | | | | | | | |
| HDL-C (mg/dL) | ۴۰/۰۰±۵.۳۰ | ۴۲/۸۰±۵/۱۴ | ۴۲/۴۷±۴/۳۸ | ۴۰/۶۰±۴/۴۹ | ۰/۰۰۵ | ۰/۶۹۴ | ۰/۰۷۱ | ۰/۰۰۸ | ۰/۶۱۵ |
| Wilks' lambda =۰/۶۷۴, F (۳ ،۲۷)=۴/۳۵۷, p =۰/۰۱۳,multivariate partial eta squared=۰/۳۲۶ | | | | | | | | | |
| LDL-C (mg/dL) | ۱۱۵/۸۶±۴۷/۳۳ | ۸۴/۴۷±۲۹/۲۲ | ۸۲/۲۲±۳۶/۶۸ | ۱۰۶/۹۸ ±۳۸/۴۷ | >۰/۰۰۱ | ۰/۵۷۲ | >۰/۰۰۱ | >۰/۰۰۱ | ۰/۲۰۸ |
| Wilks' lambda =0.350, F (3, 26)=16.127, p b 0.001,multivariate partial eta squared =0.650 | | | | | | | | | |

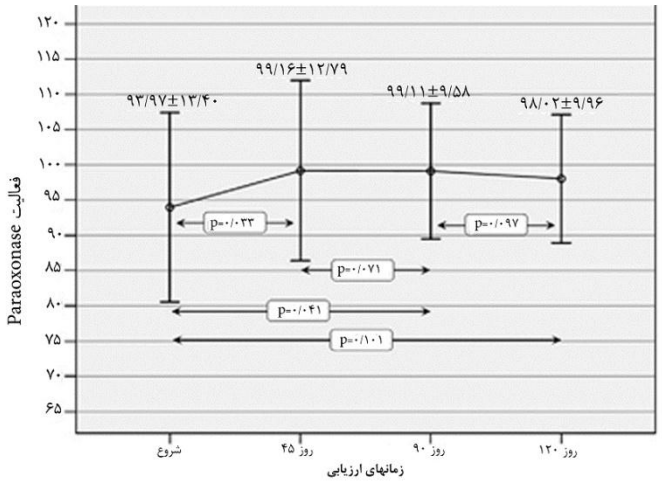
FBG:گلوکز خون در حالت ناشتا ,LDL-C:لیپوپروتین با چگالی کم .. HDL-C:لیپوپروتین با چگالی زیاد ،Chol:کلسترول کل ،TG:تری گلیسرید.

[a] مقایسه بین میزان اولیه و چهل و پنجمین روز بعد از درمان. [b] مقایسه بین میزان نودمین و چهل و پنجمین روز بعد از درمان. [c] مقایسه بین میزان نودمین روز درمان و سی امین روز بعد از پرهیز.

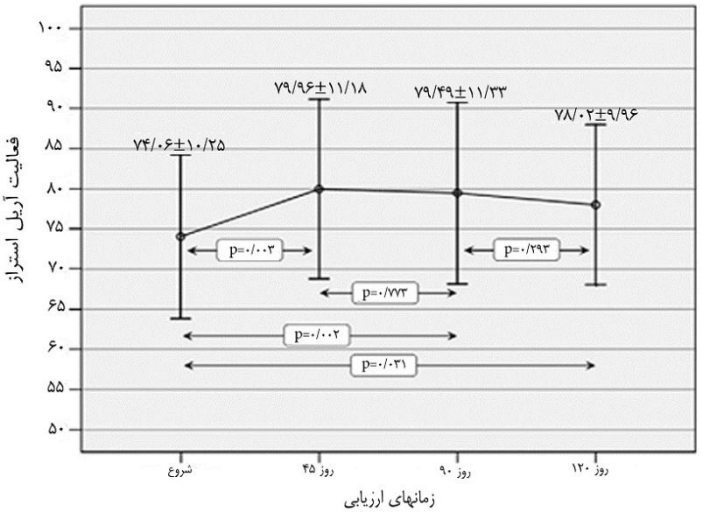
[d] مقایسه بین میزان اولیه و نودمین روز بعد از درمان. [e] مقایسه بین میزان اولیه وسی امین روز بعد از پرهیز .

Archive of SID

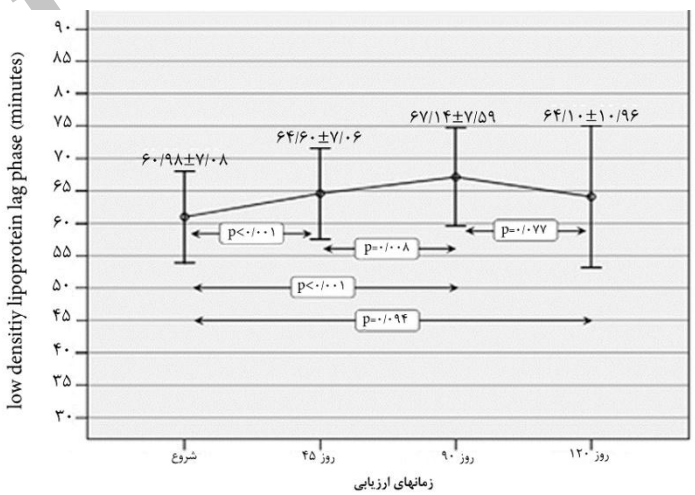
www.SID.ir




نمودار ۱. میزان های فعالیت paraxonase سرمی در افراد مبتلا به نوروپاتی دیابتیک نوع۲ قبل (اولیه) و چهل وپنجمین و نودمین روز بعد از درمان. میزان فعالیت سرمی paraoxonase به طور قابل توجهی افزیش یافت و همان طور در طول درمان باقی ماند.(مراحل با paired t-test مقایسه شده اند)




نمودار ۲. میزان های فعالیت arylesterase سرمی در افراد مبتلا به نوروپاتی دیابتیک نوع۲ قبل(اولیه) و چهل و پنجمین و نودمین روز بعد از درمان. میزان فعالیت سرمی arylesterase به طور قابل توجهی افزیش یافت و همان طوردر طول درمان باقی ماند. (مراحل با paired t-test مقایسه شده اند).




نمودار ۳. میزان فاز تاخیری اکسیداسیون LDL در افراد مبتلا به نفروپاتی دیابتیک نوع۲ قبل(اولیه) و چهل و پنجمین و نودمین روز بعد از درمان. فاز LDL-C lag به طور قابل توجهی طولانی تر شد. (مراحل با paired t-test مقایسه شده اند)

www.SID.ir

## بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که لووستاتین میزان Chol و LDL را کاهش داده و سطح HDL را افزایش می‌دهد، بدون اینکه تأثیری در میزان TG داشته باشد. این موضوع می تواند حاکی از بهبود قابل توجه الگوی آترواسکلروز زای پروفایل لیپید در مبتلایان به T2DN باشد. قطع لووستاتین این اثر اصلاح بخش بر الگوی لیپیدی را باز می‌گرداند. همان طور که از اندازه‌گیری‌های پایه‌ای مطالعه حاضر مشهود است افراد مبتلا به T2DM و به ویژه T2DN اغلب مبتلا به اختلالات لیپیدی و لیپوپروتئینی متعددی هستند (۱۵). پروفایل لیپیدی بیماران مبتلا به T2DM به طور عمده با افزایش میزان LDL و TG و کاهش سطح HDL در پلاسما مشخص می‌شود (۱۶). این اختلالات به عنوان عوامل خطر عمده در بروز بیماری‌های عروق کرونری شناخته می‌شوند و میزان شیوع درگیری عروق کرونری در بیماران مبتلا به دیابت ۲ تا ۴ برابر بیماریهای عروق مغزی و عروق محیطی است (۱۷). استاتینها داروهای مقرون به صرفه و ارزشمندی در کنترل اختلالات پروفایل لیپیدی به شمار می روند و به عنوان خط اول درمان در کنترل پروفایل لیپیدی بیماران مطرح هستند (۱۸).

علاوه بر این، نتایج حاصل تحقیق حاضر نشان داد که لووستاتین فعالیت آنزیم PON1 را بعد از ۴۵ روز درمان افزایش داده که این میزان فعالیت همچنان تا نودمین روز درمان و حتی ۳۰ روز بعد از قطع دارو افزایش یافته باقی ماند (شکل ۱). الگوی مشابه نیز برای فعالیت آنزیم ARE نشان داده شد (شکل ۲).

فعالیت PON1 در افراد دیابتی کاهش یافته و این کاهش در بیماران مبتلا به عوارض عروقی DM از جمله مبتلایان به DN به میزان بیشتری بارز است. در چنین شرایطی، استرس اکسیداتیو نقش بسیار مهمی ایفا می کند و هم چنین به عنوان یک عامل بیماری-زای رایج در DM و عوارض ناشی آن از جمله نفروپاتی در نظر گرفته می‌شود (۱۹،۲۸).

مسیرهای بیوشیمیایی متعددی ممکن است در حالت هایپرگلیسمی ناشی از DN تشدید شده و تولید رادیکالهای آزاد را افزایش دهند برای مثال گلوکز اتوکسیداز، مسیر Polyol، سنتز پروستانوئید و گلیکاسیون پروتئینها. این رادیکالهای آزاد موجب پراکسیداسیون لیپیدی به ویژه اکسیداسیون لیپیدهای حاوی اسید چرب غیر اشباع می‌شوند. محصول واکنش بین آنیون سوپراکسید و نیتریک اسید پراکسی نیترات نامیده می شود که در واقع یک اکسیدان قوی LDL-C محسوب می شود (۳).

غیرفعال شدن PON1 در نتیجه واکنش متقابل فسفولیپیدهای اکسید شده موجود در اکسید LDL، اکسید استرهای کلسترول یا لیزوفساتیدیل کولین با گروه سولفیدریل آزاد در PON1 cys284 است (۲۰). بنابراین اگر LDL و بعد از آن اکسید LDL کاهش یابد، فعالیت آنزیم PON1 افزایش می‌یابد. تعداد زیادی از مطالعات انجام شده بر روی تاثیر انواع مختلف استاتین با بررسی فعالیت آنزیم PON1 نسبت به فنیل استات و پاراکسون در بیماران مبتلا به اختلالات لیپیدی نشان داده اند که این داروها فعالیت سرمی آنزیم PON1 را افزایش می‌دهند (۲۱). در حقیقت استاتینها با کاهش LDL سرمی اثر مفیدی بر فعالیت PON1 دارند چرا که تعداد LDL اکسیده که باید توسط PON1 تخریب شوند کاهش یافته است (۲۲و۱۱).

اغلب مطالعات انجام گرفته (۲۳،۲۱،۲۴) رابطه معنی‌داری بین فعالیت سرمی آنزیم PON1 و سطح HDL نشان نمی دهند و تنها افزایش آماری قابل توجه فعالیت سرمی PON1 مشاهده شده است. با توجه به اینکه PON1 به طور کامل با HDL در سرم مرتبط است، انتظار می‌رود که فاکتورهای موثر بر سطح HDL در غلظت و فعالیت PON1 تغییراتی ایجاد می‌کنند (۲۲). در مطالعه حاضر اگرچه مداخله‌ی لوواستاتین غلظت HDL را افزایش می دهد، ارتباطی بین سطح HDL و فعالیت PON1 یافته نشد. به نظر می‌رسد افزایش فعالیت PON1 تحت تاثیر درمان با لووستادین مستقل از سطح HDL متاثر از خواص آنتی اکسیدانی استاتین است. در مطالعه حاضر حساسیت به اکسیداسیون LDL اندازه-گیری شده با معیار تولید دایونهای کونژوگه با استفاده از یون مس، نتایج به عنوان فاز تاخیری ارائه شده‌اند درمان با لووستاتین فاز تاخیری LDL را طولانی می‌کند که بدین فعالیت لووستاتین حساسیت و گرایش LDL نسبت به اکسیداسیون را کاهش می-دهد. فعالیت PON1 ارتباط معکوس با غلظت پراکسید لیپید بعد از درمان با لووستاتین دارد. اخیرا مطالعات که از انواع مختلفی از استاتین‌ها (از جمله سیمواستاتین) استفاده کردند نشان داد که حساسیت به اکسیداسیون LDL بعد از دریافت این داروها کاهش یافته است (۲۳).

تمام کلاسهای لیپوپروتئین‌های سرم انسانی مستعد تغییرات اکسیداتیو هستند که از اثرات طولانی بیولوژیکی بهره می برند (۲۵). نتیجه‌ی بسیار مهم، احتمالا برداشت (جذب) کنترل نشده‌ی LDL اکسیده با گیرنده‌های فاگوسیتوزی ماکروفاژها در فضای زیراندوتلیال شریانی است که در نهایت منجر به تشکیل سلول کف آلود و آتروسکروز می‌شود. افزایش اکسیداسیون لیپوپروتئین در دیابتی‌ها بواسطه چندین مطالعه ثابت شده است که نمونه آنها کاهش مقاومت در برابر عوامل محرک اکسیداسیون در شرایط آزمایشگاهی افزایش تیتر آنوآنتی‌بادی‌ها بر ضد LDL اکسیده در سرم بیماران دیابتی است. علاوه بر این، غلظت‌های کم ویتامین-های آنتی اکسیدانی (به ویژه α– توکوفرال) و افزایش غلظت محصولات پراکسیداسیون لیپید در پلاسما به ویژه لیپید پراکسیداز و F2 ایزوپروستان در بیماران دیابتی شرح داده شده است. با توجه به این،PON1 ممکن است یک مانع دفاعی عمده در برابر ایجاد پراکسیدهای لیپیدی با منشا LDL اکسید شده باشد. بنابراین افزایش HDL و افزایش فعالیت PON1 در درمان با لووستاتین می‌تواند نقش اساسی در کاهش حساسیت LDL به اکسیداسیون در مطالعه‌ی حاضر داشته باشد. علاوه براین درمان با لووستاتین منجر به کاهش سطح محصولات LDL و متعاقب آن کاهش تعداد ذرات LDL مستعد به اکسیداسیون می‌شود. همچنین اثر مهاری لووستاتین بر اکسیداسیون LDL ممکن است به دلیل افزایش

Archive of SID

www.SID.ir

حذف LDL های قدیمی باشد که نسبت به LDL های تازه سنتز نشده بیشتر مستعد اکسیداسیون هستند (۲۶).
کاهش بیان و فعالیت گلوتاتین پراکسیداز، سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز در موش ها باعث افزایش اکسیداسیون LDL در آنها می شود (۲۷). برخلاف این پدیده، مطالعات نشان داده اند که استاتین-ها تولید رادیکالهای آزاد را کاهش و فعالین سوپراکسیداز دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتین پراکسیداز را افزایش می‌دهد (۲۸-۲۶). افزون بر این یافته ها اخیراً پیشنهاد شده است که استاتین‌ها در ذرات لیپوپروتئینی به عنوان آنتی اکسیدان عمل می‌کنند و LDL مقاوم به اکسیداسیون ایجاد می‌کنند (۳۰و۲۹). به این ترتیب از طریق اصلاح تعادل بین استرس اکسیداتیو و آنتی اکسیدان کاهش اکسیداسیون LDL و کاهش حساسیت آن نسبت به اکسیداسیون می‌شود. محدودیتهای عمده ی مطالعه عبارتند از: حجم پائین جامعه آماری مطالعه، دوز پایین لووستاتین، جامعه مورد مطالعه افراد مذکر، کوتاه بودن زمان مطالعه و فقدان اندازه گیری فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتین پراکسیداز و اندازه‌ی ظرفیت آنتی اکسیدان. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، این اولین مطالعه‌ای است که تلاش می‌کند اثرات لووستاتین بر فعالیت آنزیمهای PON1 و ARE، و حساسیت به اکسیداسیون LDL را در افراد مبتلا به T2DN نشان دهد.

## نتیجه گیری

در مجموع، لووستاتین موجب بهبود پروفایل لیپیدی و فعالیت آنزیم PON1 شده و حساسیت به اکسیداسیون LDL را در مبتلایان به T2DN کاهش می‌دهد که این تغییرات تاثیر قابل توجه و سودمندی در پیشگیری و پیشرفت CAD دارد. علاوه بر آن، به نظر می رسد که لووستاتین با بهبود اختلالات لیپیدی در بیماران دیابتی نقش موثری را در کنترل عامل خطری مهم در پیشرفت DN ایفا می کند.

## تقدیر و تشکر

این مقاله با حمایت مالی مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (تبریز- ایران) انجام گرفته است.

## References

1. Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannel WB. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study. *Diabetes* 1974; **23**(2): 105-111.
2. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; **48**(1): 1-9.
3. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; **19**(3): 257-267.
4. Tsai EC, Hirsch IB, Brunzell JD, Chait A. Reduced plasma peroxyl radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes* 1994; **43**(8): 1010-1014.
5. Shamir R, Hartman C, Karry R, Pavlotzky E, Eliakim R, Lachter J, et al. Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radical Biology & Medicine* 2005; **39**(3): 336-344.
6. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) is present in postprandial chylomicrons. *Atherosclerosis* 2005; **180**(1): 55-61.
7. Rosenblat M, Karry R, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) is a more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux, when present in HDL than in lipoprotein-deficient serum: relevance to diabetes. *Atherosclerosis* 2006; **187**(1): 74-81.
8. Lehmann R, Schleicher ED. Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clinica Himica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 2000; **297**(1-2): 135-144.
9. Aguilar-Salinas CA, Gomez-Perez FJ, Posadas-Romero C, Vazquez-Chavez C, Meaney E, Gulias-Herrero A, et al. Efficacy and safety of atorvastatin in hyperlipidemic, type 2 diabetic patients. A 34-week, multicenter, open-label study. *Atherosclerosis* 2000; **152**(2): 489-496.
10. Pyorala K, Pedersen TR, Kjekshus J, Faergeman O, Olsson AG, Thorgeirsson G. Cholesterol lowering with simvastatin improves prognosis of diabetic patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Diabetes Care* 1997; **20**(4): 614-620.
11. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. *Current Opinion in Lipidology* 2005; **16**(4): 393-399.
12. Mackness M, Mackness B. Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important? *Free Radical Biology & Medicine* 2004; **37**(9): 1317-1323.
13. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 1972; **18**(6): 499-502.
14. Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 2001; **306**(1-2): 1-17.
15. Shoji T, Emoto M, Kawagishi T, Kimoto E, Yamada A, Tabata T, et al. Atherogenic lipoprotein changes in diabetic nephropathy. *Atherosclerosis* 2001; **156**(2): 425-433.
16. Vinik AI, Colwell JA. Effects of gemfibrozil on triglyceride levels in patients with NIDDM.

Archive of SID
www.SID.ir

Hyperlipidemia in Diabetes Investigators. *Diabetes Care* 1993; **16**(1): 37-44.

17. Harris SB, Macaulay AC. Diabetes management: new evidence-based recommendations. Highlights of the 1998 Canadian clinical practice guidelines. Canadian Diabetes Association. *Canadian Family Physician Medecin De Famille Canadien* 1998; **44**: 2465-2466, 2469-2479.
18. Martikainen JA, Soini E, Paulsson T. Cost-effectiveness of single agent, uptitration and switching statin treatment strategies for lipid lowering in Sweden. *Current Medical Research and Opinion* 2010; **26**(2): 389-396.
19. Ha H, Kim KH. Role of oxidative stress in the development of diabetic nephropathy. *Kidney International. Supplement* 1995; **51**: 18-21.
20. Aviram M. Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? *Molecular Medicine Today* 1999; **5**(9): 381-386.
21. Van Himbergen TM, Vvan Tits LJ, Ter Avest E, Roest M, Voorbij HA, de Graaf J, et al. Paraoxonase (PON1) is associated with familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2008;**199**(1):87-94.
22. 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): 2083-2089.
23. Tomas M, Senti M, Garcia-Faria F, Vila J, Torrents A, Covas M, et al. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2000; **20**(9): 2113-2119.
24. Harangi M, Seres I, Varga Z, Emri G, Szilvassy Z, Paragh G, et al. Atorvastatin effect on high-density lipoprotein-associated paraoxonase activity and oxidative DNA damage. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2004; **60**(10): 685-691.
25. Chisolm GM, Hazen SL, Fox PL, Cathcart MK. The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Biochemical and biological mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; **274**(37): 25959-25962.
26. Aviram M. Interaction of oxidized low density lipoprotein with macrophages in atherosclerosis, and the antiatherogenicity of antioxidants. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry: Journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies* 1996; **34**(8): 599-608.
27. Guo Z, Van Remmen H, Yang H, Chen X, Mele J, Vijg J, et al. Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2001; **21**(7): 1131-1138.
28. Endres M, Laufs U. Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke; A Journal of Cerebral Circulation* 2004; **35**: 2708-2711.
29. Girona J, La Ville AE, Sola R, Plana N, Masana L. Simvastatin decreases aldehyde production derived from lipoprotein oxidation. *The American Journal of Cardiology* 1999; **83**(6): 846-851.
30. Rosario RF, Prabhakar S. Lipids and diabetic nephropathy. *Current Diabetes Reports* 2006; **6**(6): 455-462.

Archive of SID

www.SID.ir