Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 11:41 IRDT on Tuesday September 10th 2013

بررسی پلی‌مورفیسم L55M ژن پاراکسوناز۱ با ترکیب اسیدهای چرب فسفولیپیدهای موجود در لیپوپروتیین‌های با دانسیته بالا

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۷/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۲۱

کیهان قطره سامانی[۱]
عفت فرخی[۲*]
مرتضی هاشم‌زاده چالشتری[۳]
فاطمه آزادگان[۳]

۱- مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۲- دانشجوی PhD پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۳- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

* نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی
تلفن: ۳۳۴۶۶۹۲-۰۳۸۱
E-mail: e_farrokhi_k@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: آنزیم پاراکسوناز۱ به‌همراه لیپو پروتیین‌های با دانسیته بالا (HDL) در خون گردش می‌کند و مانع از اکسید شدن لیپو پروتیین‌های با دانسیته پایین (LDL) می‌گردد. هدف از این مطالعه تعیین اثر پلی‌مورفیسم L55M ژن آنزیم پاراکسوناز۱ بر ترکیبات HDL خون و پاسخ‌دهی به درمان با لواستاتین در افراد با کلسترول خون بالا می‌باشد.
روش بررسی: در این مطالعه توصیفی تحلیلی ۱۳۴ نفر با LDL کم‌تر از ۱۳۰mg/dl (گروه شاهد) و ۱۳۱ نفر با LDL بالای ۱۳۰mg/dl (گروه مورد) انتخاب شدند. اسیدهای چرب موجود در فسفولیپید HDL به‌روش گاز کروماتوگرافی اندازه‌گیری گردید. پروفایل لیپیدی، آپولیپوپروتیین A1 و B با استفاده از کیت‌های تجاری و هم‌چنین LDL اکسید شده به‌روش الایزا و فعالیت پاراکسوناز با استفاده از روش‌های استاندارد تعیین شد. هم‌چنین پلی‌مورفیسم L55M ژن پاراکسوناز۱ با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز- پلی‌مورفیسم طولی قطعات محدود تعیین شد. ***یافته‌ها:*** فراوانی آلل L در پلی‌مورفیسم L55M در گروه شاهد ۰/۵۳ بود که وقتی با میانگین فراوانی گروه مورد (۰/۶۴۶) مقایسه گردید اختلاف در فراوانی آلل L در بین دو گروه مشاهده شد (P=۰/۰۴) فعالیت پاراکسونازی به‌دنبال درمان با لواستاتین در ژنوتیپ LL افزایش قابل توجه‌تری داشت. هم‌چنین درصد اسید اولئیک و اسید لینولییک و اسید ایکوزاپنتانوییک بعد از درمان در ژنوتیپ‌های LL نسبت به قبل از درمان افزایش نشان داد. ***نتیجه‌گیری:*** آلل L از پلی‌مورفیسم L55M در افراد با LDL بالای ۱۳۰ mg/dl فراوانی بیش‌تری دارد و ژنوتیپ‌های پاراکسوناز۱ نقش تعدیل‌کننده در تاثیر لواستاتین بر فعالیت پاراکسونازی در این مطالعه داشتند.

کلمات کلیدی: پاراکسوناز۱، پلی‌مورفیسم L55M، اسید چرب، HDL.

مقدمه

آترواسکلروز (Atherosclerosis) علت بسیاری از مرگ و میرها در جهان است و پایین بودن سطح لیپوپروتیین با دانسیته بالا (HDL) یکی از قوی‌ترین ریسک فاکتورها در این رابطه است.[۱] عمل اصلی ذرات HDL انتقال کلسترول اضافی از بافت‌ها به کبد جهت دفع از مسیر صفرا می‌باشد که انتقال معکوس کلسترول Reverse Cholesterol Transfer (RCT) نامیده می‌شود.[۲] نقش دیگر HDL مهار اکسیداسیون ذرات لیپوپروتیین با دانسیته پایین (LDL) می‌باشد. ثابت شده که برای شروع و پیشرفت آترواسکلروز، LDL اکسید شده (oxLDL) نقش اصلی را دارد[۳] و HDL با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود از چند مسیر مانع از اکسیداسیون LDL می‌گردد. بیش‌تر وظیفه آنتی‌اکسیدانی HDL بر عهده آنزیم پاراکسوناز۱ (PON1) Paraoxonase-1 می‌باشد که به‌همراه HDL در خون گردش می‌کند. مطالعات In vitro نشان داده که PON1 از تجمع لیپیدهای پراکسید جلوگیری نموده و تبدیل LDL به ox LDL را کاهش می‌دهد.[۴] PON1 حتی خود ذرات HDL را از اکسیدشدن محافظت می‌نماید و باعث افزایش غلظت HDL سرم نیز می‌گردد.[۵] داروهای پایین‌آورنده LDL که مهارکننده HMG-CoA ردوکتاز هستند بر فعالیت، غلظت و بیان ژن PON1 تاثیرگذار هستند. بنابراین PON1 نقش اصلاحی (Modifier) در موفقیت درمان با

www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 11:41 IRDT on Tuesday September 10th 2013

استاتین‌ها دارد.[۶و۷] فعالیت PON1 در بیماران قلبی عروقی کاهش داشته و با ضخامت حاصل از آتروم در عروق قلبی نسبت عکس دارد.[۸] مطالعات نشان داده در دیابت ملیتوس فعالیت PON1 بسیار پایین‌تر از گروه کنترل است.[۹] پلی‌مورفیسم‌های مختلف PON1 مسئول تغییر فعالیت و غلظت این آنزیم و هم‌چنین مسئول تغییرات پلاسمایی HDL در جمعیت‌های مختلف می‌باشد.[۱۰و۱۱] پلی‌مورفیسم L55M که در سمت N ترمینال آنزیم PON1 قرار دارد، بر غلظت آنزیم تاثیرگذار می‌باشد و از آنجایی‌که بخش N ترمینال این آنزیم نقش اصلی در اتصال آنزیم به HDL را به‌عهده دارد، بنابراین تغییر در این قسمت PON1 بر قدرت اتصال آن به HDL تاثیر می‌گذارد.[۱۲] با توجه به این‌که تاکنون در خصوص تاثیر پلی‌مورفیسم‌های ژن PON1 و فعالیت آنزیم PON1 بر اسیدهای چرب تشکیل‌دهنده لیپوپروتیین‌های پلاسما مطالعه‌ای صورت نگرفته، و ترکیبات HDL بر فعالیت آن تاثیرگذار است این مطالعه با هدف تعیین اثر پلی‌مورفیسم L55M ژن آنزیم پاراکسوناز۱ بر ترکیبات HDL خون و پاسخ‌دهی به درمان با لواستاتین در افراد با کلسترول خون بالا انجام گرفته است.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی تحلیلی در تابستان سال ۱۳۸۹، پس از موافقت کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ۲۶۵ نفر از افراد در دسترس، مراجعه‌کننده به کلینیک داخلی توسط متخصص بیماری‌های داخلی انتخاب شدند. افراد مورد مطالعه در دو گروه شامل افراد مورد، که دارای LDL بالای ۱۳۰mg/dl (۱۳۱ نفر) و افراد دارای LDL کم‌تر از ۱۳۰mg/dl به‌عنوان گروه شاهد (۱۳۴ نفر) قرار گرفتند. افراد گروه مورد، مجدداً به دو گروه A و B تقسیم شدند. گروه A افرادی‌که طبق نظر پزشک متخصص داخلی علی‌رغم داشتن LDL ۱۳۰ میلی‌گرم نیاز به دریافت دارو نداشتند و گروه B که تحت درمان با لواستاتین قرار گرفتند. بدیهی است افرادی که دارای بیماری‌های متابولیک نظیر دیابت و بیماران کبدی و کلیوی و غیره بودند از مطالعه حذف گردیدند.

نمونه‌گیری و آزمایشات بیوشیمیایی: در مرحله اول از تمام افراد مورد مطالعه هفت میلی‌لیتر خون ناشتا گرفته شد. دو میلی‌لیتر از خون جهت آزمایشات مولکولی به لوله مخصوص، حاوی EDTA (با غلظت ۰/۵ مولار) و پنج میلی‌لیتر خون جهت آزمایشات بیوشیمیایی به لوله شیشه‌ای منتقل شده و در کم‌تر از نیم ساعت سرم نمونه‌ها با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۳۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه از قسمت لخته جدا گردید و در دمای ۲۰ °C- تا زمان مناسب نگه‌داری شدند و اطلاعات افراد تحت مطالعه نیز از طریق پرسش‌نامه جمع‌آوری شد. آزمایشات در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام گردید. سطح سرمی گلوکز، کلسترول توتال، تری‌گلیسرید، HDL-C، LDL-C، کراتینین، آپولیپوپروتیین A1 (Apo A1) و آپولیپوپروتیین B (Apo B) در تمامی نمونه‌ها با استفاده از کیت‌های تجاری ساخت شرکت پارس آزمون توسط دستگاه اتوآنالیز BT3000 (Italy) اندازه‌گیری گردید. اندازه‌گیری oxLDL در سرم با استفاده از کیت‌های الایزا (Mercodia Co., Sweden) و فعالیت پاراکسونازی (EC 3181) و آریل استرازی PON1 (EC3112) با استفاده از روش‌های دستی استاندارد اندازه‌گیری گردید.

کلیه فسفولیپیدهای موجود در HDL به‌روش کروماتوگرافی لایه نازک (Thin layer chromatography) جدا گردید.[۱۳] سپس اسیدهای چرب موجود در فسفولیپید تحت ترکیب با عوامل متیل دار مانند متیل استر با استفاده از کاتالیزور کلرید استیل در متانول به اسیدهای چرب متیله تبدیل شد.[۱۴] مشتقات اسیدهای چرب متیله تولیدشده از فسفولیپیدهای استخراج شده توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی (SRI, Torance, CI) با ستون ۶۰×۰/۲۵ تفکیک گردید. نتایج حاصل از این مرحله با استفاده از آزمون آماری Student's t-test برای پارامترهای کمّی و آزمون آماری χ^2 برای بررسی شیوع پلی‌مورفیسم مذکور تجزیه و تحلیل شد. پس از دو ماه از دریافت داروی لواستاتین (با نام تجاری لواستاتین ساخت شرکت پورسینا، ایران) به‌میزان ۲۰ میلی‌گرم در روز مجدداً از گروه B، ۵ml خون به‌صورت ناشتا گرفته شده و مجدداً پروفایل لیپیدی و فعالیت آنزیم پاراکسوناز و ترکیب اسیدهای چرب HDL اندازه‌گیری و تعیین مقدار گردید و نتایج حاصل با استفاده از Pair t-test با قبل از درمان مقایسه شد و تاثیر پلی‌مورفیسم L55M در پاسخ‌دهی به درمان توسط لوواستاتین مشخص گردید.

آزمایشات مولکولی: در این مطالعه برای استخراج DNA از روش فنل کلروفرم استفاده شد.[۱۵] اگزون ۳ از ژن پاراکسونازا۱ جهت بررسی پلی‌مورفیسم L55M با استفاده از پرایمرهای Primer F 5' CCTGCAATAATATGAAACAACCTG 3' و Primer R

www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 11:41 IRDT on Tuesday September 10th 2013

5' TGAAAGACTTAAACTGCCAGTC 3' شناسایی و قطعاتی به‌طول ۱۷۲ جفت باز تکثیر گردید.[۱۶] مواد و مقادیر مورد نیاز برای هر واکنش PCR (تهیه‌شده از شرکت سیناژن MgCl2 (۵۰mM): ۲µl، Buffer (۱۰X): ۲/۵µl، F Primer (۱۰pM): ۳µl، R Primer (۱۰pM): dNTP (۱۰mM)، ۰/۱µl: Taq DNA Polymerase (۵U/µl)، ۰/۳µl و DNA (حدود ۲۵ng) که با ddH2O به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. شرایط دمایی بهینه شامل ۳۵ سیکل مشتمل بر دمای واسرشت ۹۴ °C به‌مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۹ °C به‌مدت ۴۰ ثانیه و دمای ساخت ۷۲ °C به‌مدت ۴۰ ثانیه بود. محصول PCR بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۸٪ (۲۹:۱) با میلی‌آمپر ۴۰ به‌مدت ۱/۵ ساعت الکتروفورز گردید و پس از رنگ‌آمیزی با نیترات نقره مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام PCR-RFLP ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR تحت تاثیر پنج واحد آنزیم محدودکننده NlaIII (Fermentase, Canada) به‌مدت یک‌شب (Over night) در دمای ۳۷ °C قرار گرفت. پس از الکتروفورز وجود قطعات به‌اندازه‌های ۱۷۲، ۱۰۳ و ۶۹ جفت بازی بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۸٪ (۲۹:۱) بررسی گردید.

یافته‌ها

دو گروه مورد و شاهد به‌گونه‌ای انتخاب شدند که از نظر متغیرهای سن، جنس، فشارخون و نمای توده بدنی (BMI) همسان بودند. پس از انجام آزمایشات بیوشیمیایی نتایج نشان داد، سطح کلسترول، LDL و Apo B در گروه مورد بالاتر از شاهد بوده است. بعد از تقسیم‌بندی گروه مورد به دو گروه A و B و به‌دنبال آن تجویز لواستاتین به‌مدت دو ماه به افراد گروه B مشاهده گردید لواستاتین با مهار ردوکتاز باعث کاهش کلسترول تام، LDL-C، Apo B و oxLDL شده است و فعالیت پاراکسونازی PON1 نیز به‌دنبال لواستاتین افزایش یافته است (جدول ۱). تاثیر لواستاتین بر ترکیبات اسید چرب موجود در فسفولیپید HDL در جدول ۲ نشان داده شده است. درصد اسید استئاریک (۰: ۱۸)، اسید اولییک (۱۹: ۱۸)، اسید لینولییک (۹،۱۲ ۲ :۱۸) و اسید ایکوزوپنتانوییک (۵ :۲۰) نسبت به قبل از درمان افزایش نشان داده است. در بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم L55M با اثربخشی داروی لواستاتین، نتایج ما نشان داد فعالیت پاراکسونازی به‌دنبال درمان با لواستاتین در هموزیگوت LL نسبت به دو ژنوتیپ دیگر یعنی LM و MM افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است. هم‌چنین غلظت ApoA1 در ژنوتیپ LL بعد از درمان با لواستاتین افزایش داشته است (جدول ۳). تغییرات اسید چرب فسفولیپیدهای موجود در HDL بعد از درمان در ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم L55M در جدول ۴ نشان داده شده است. در این جدول مقایسه بین آلل حاوی M (MM/LM) در مقابل LL صورت گرفته است. درصد اسید اولییک و

جدول-۱: تاثیر لواستاتین بر متغیرها در گروه B از گروه مورد (۷۶ نفر)

متغیر	قبل از لواستاتین	بعد از لواستاتین	P
کلسترول تام (mg/dl)	۲۳۶±۳۹/۴	۱۹۱±۳۱/۵	۰/۰۱
تری گلیسرید (mg/dl)	۲۱۲±۱۲۱/۷	۱۹۸±۱۱۳/۶	۰/۴۵
HDL-C (mg/dl)	۴۶±۱۱/۱	۴۸±۹/۵	۰/۳۹
LDL-C (mg/dl)	۱۶۴±۲۸/۹	۹۹±۳۱/۸	۰/۰۰۶
ApoA1 (mg/dl)	۱۲۹±۱۵/۵	۱۳۵±۲۹/۴	۰/۵۶
ApoB (mg/dl)	۱۲۱±۱۷/۹	۹۸±۲۵/۴	۰/۰۰۴
LDL اکسید شده (u/L)	۸۶±۱۴/۴	۷۳±۱۵/۳	۰/۰۰۷
فعالیت آنزیم آریل‌استراز (u/mL)	۱۰۶±۲۵/۶	۱۰۸±۳۲/۱	۰/۰۹
فعالیت آنزیم پاراکسوناز (u/mL)	۲۰۵±۱۱۷	۲۶۱±۱۱۴	۰/۰۴

نتایج به‌صورت Mean± SD می‌باشد. P<۰/۰۵ با آزمون آماری تی‌زوجی معنی‌دار می‌باشد.

جدول-۲: اسیدهای چرب فسفولیپیدهای HDL در گروه B از گروه مورد

متغیر (درصد از کل)	قبل از لواستاتین	بعد از لواستاتین	P
اسید پالمتیک (۰: ۱۶)	۳۲±۳/۴	۳۱±۳/۵	۰/۴۱
اسید پالمیتولییک (۱: ۱۶)	۱/۱±۰/۶	۱/۱±۰/۷	۰/۲۵
اسید استئاریک (۰: ۱۸)	۱۶±۱/۴	۱۸±۱/۵	*۰/۰۳۹
اسید اولییک (۹: ۱۸)	۷/۸±۱/۹	۹/۸±۱/۸	*۰/۰۲۶
اسید لینولییک (۹،۱۲ ۲: ۱۸)	۱۸/۲±۲/۵	۲۱/۱±۲/۴	*۰/۰۱۹
اسید آراشیدونیک (۴: ۲۰)	۷/۵±۱/۹	۸/۲±۲/۴	۰/۰۷۲
اسید ایکوزوپنتانوییک (۵: ۲۰)	۱/۱±۰/۴	۱/۲±۰/۷	*۰/۰۰۷
اسید دوکوزوهگزانوییک (۶: ۲۲)	۰/۹۵±۰/۶	۰/۹۹±۰/۶	۰/۰۹

نتایج به‌صورت Mean± SD می‌باشد. * P<۰/۰۵ با آزمون آماری تی‌زوجی معنی‌دار می‌باشد.

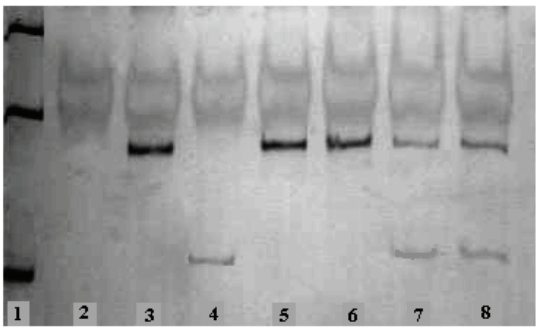
www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 11:41 IRDT on Tuesday September 10th 2013

جدول-۳: ویژگی بیوشیمیایی براساس ژنوتیپ پلی‌مورفیسم L55M (گروه B)

متغیر	پلی‌مورفیسم L55M		
	MM	LM	LL
HDL-C قبل (mg/dl)	۳۸±۹/۹	۴۳±۹/۸	۴۲±۸/۶
HDL-C بعد (mg/dl)	۴۱±۱۰/۱	۴۲±۸/۷	۴۲±۱۰/۹
ApoA1 قبل (mg/dl)	۱۲۵±۱۹/۵	۱۲۰±۱۷/۹	۱۲۸±۱۹/۹
ApoA1 بعد (mg/dl)	۱۲۸±۲۰/۲	۱۲۲±۲۲/۸	۱۴۱±۲۴/۶*
آریل استرازی (u/mL) **قبل**	۵۶±۳۰/۵	۶۷±۲۶/۸	۸۱±۲۹/۹
آریل استرازی (u/mL) **بعد**	۵۴±۲۹/۶	۸۶±۳۳/۶	۹۹±۲۸/۵
پاراکسونازی (u/mL) **قبل**	۸۶±۹۳	۱۲۰±۱۲۹	۲۹۸±۱۳۸*
پاراکسونازی (u/mL) **بعد**	۹۹±۱۱۴	۲۱۵±۱۴۴	۳۴۴±۲۱۱

نتایج به‌صورت Mean± SD می‌باشد. * P<۰/۰۵ با آزمون آماری ANOVA معنی‌دار می‌باشد.



شکل-۱: ژل پلی‌اکریل آمید PCR-RFLP مربوط به پلی‌مورفیسم L55M. شماره ۱ مارکر، ۲ کنترل منفی (بدون DNA)، ۳ کنترل Uncut (بدون آنزیم)، ۳ و ۵ و ۶ ژنوتیپ LL، ۷ و ۸ ژنوتیپ LM، ۴ ژنوتیپ MM

جدول-۴: اسیدهای چرب موجود در فسفولیپیدهای HDL در گروه B

متغیر	پلی‌مورفیسم L55M		متغیر	پلی‌مورفیسم L55M	
	LM/ MM	LL		LM/ MM	LL
اسید پالمتیک (۰ : ۱۶)			اسید لینولییک (۲ [۹،۱۲] : ۱۸)		
قبل از دارو	۳۱±۳/۵	۳۳±۲/۷	قبل از دارو	۱۸/۵±۳/۱	۱۸/۱±۲/۸
بعد از دارو	۳۰±۲/۹	۳۲±۳/۲	بعد از دارو	۱۹/۱±۳/۸	۲۲/۳±۳/۴*
اسید پالمیتولییک (۱ : ۱۶)			اسید آراشیدونیک (۴ : ۲۰)		
قبل از دارو	۱±۰/۶	۱/۲±۰/۵	قبل از دارو	۷/۲±۲/۱	۷/۴±۲/۸
بعد از دارو	۱/۱±۰/۵	۱/۱±۰/۷	بعد از دارو	۸/۱±۲/۵	۸/۲±۲/۵
اسید استاریک (۰ : ۱۸)			اسید ایکوزوپنتانوییک (۵ : ۲۰)		
قبل از دارو	۱۶±۲/۵	۱۷±۲/۴	قبل از دارو	۱/۲±۰/۵	۱±۰/۴
بعد از دارو	۱۷±۲/۸	۱۸±½	بعد از دارو	۱/۲±۰/۴	۱/۳±۰/۹*
اسید اولییک (۱۹ : ۱۸)			اسید دوکوزوهگزانوییک (۶ : ۲۲)		
قبل از دارو	۸±۲/۱	۸/۱±۲/۴	قبل از دارو	۰/۹±۰/۶	۱±۰/۶
بعد از دارو	۸/۸±۲/۵	۱۰/۵±۳/۵*	بعد از دارو	۰/۹±۰/۸	۰/۹±۰/۷

نتایج به‌صورت Mean± SD می‌باشد. * P<۰/۰۵ با آزمون آماری تی‌زوجی معنی‌دار می‌باشد.

Archive of SID

اسید لینولییک و اسید ایکوزوپنتانوییک بعد از درمان در ژنوتیپ‌های LL نسبت به قبل از درمان افزایش نشان داده است.

نتایج آزمایشات مولکولی: پس از انجام RFLP برروی محصولات PCR با استفاده از آنزیم NlaIII، و بررسی قطعات حاصل از برش آنزیمی بر روی ژل پلی‌اکریل آمید، وجود قطعاتی با اندازه‌های ۱۷۲، ۱۰۳ و ۶۹ جفت بازی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). فراوانی ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم L55M (شاهد ۱۳۴ نفر به مورد ۱۳۱ نفر) به‌ترتیب (۳۱/۴ به ۴۴/۸) LL، (۴۳/۱ به ۳۹/۷) LM و (۲۵/۵ به ۱۵/۵) MM بودند که فراوانی آلل L پس از محاسبه در پلی‌مورفیسم L55M در گروه شاهد ۰/۵۳ می‌باشد که وقتی با میانگین فراوانی گروه مورد (۰/۶۴۶) مقایسه شود اختلاف در فراوانی آلل L با استفاده از تست آماری χ^2 در بین دو گروه دیده می‌شود (P=۰/۰۴). به‌عبارت دیگر در

www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 11:41 IRDT on Tuesday September 10th 2013

پلی‌مورفیسم L55M تفاوت معنی‌داری در فراوانی آلل‌ها در افراد با LDL بالاتر از ۱۳۰ و افراد با LDL کم‌تر از ۱۳۰ دیده می‌شود.

بحث

اکسیداسیون LDL نقش اساسی در روند آتروژنز دارد و پاراکسوناز۱ متصل به HDL خط اولیه دفاع در برابر این اکسیداسیون می‌باشد.[۱۷] پاراکسوناز۱ بر روی لیپیدهای اکسید شده تاثیرگذار است و از طرفی ممکن است اسیدهای چرب اکسید شده به HDL انتقال یافته سپس تحت تاثیر PON1 قرار بگیرند.[۱۸] واضح است که درمان‌های دارویی و عوامل ژنتیکی می‌توانند بر فعالیت PON1 یا غلظت PON1 تاثیرگذار باشند.

با توجه به جدول ۱ تحت تاثیر درمان با لواستاتین تنها در صورتی‌که سوبسترا خود پاراکسون باشد، درمان باعث افزایش فعالیت PON1 می‌شود (P=۰/۰۴). این درحالی است که اگر فنیل‌استات به‌عنوان سوبسترا مورد استفاده قرار گیرد تغییر در فعالیت به‌دنبال درمان در فعالیت آریل استرازی دیده نمی‌شود (P=۰/۰۹). با توجه به این‌که فعالیت پاراکسونازی با فعالیت آنزیم متناسب است و فعالیت آریل استرازی تقریباً غلظت پروتیین PON1 را نشان می‌دهد[۱۹] می‌توان نتیجه‌گیری نمود که لواستاتین باعث افزایش فعالیت PON1 شده و این درحالی است که بر غلظت این پروتیین تاثیر کم‌تری داشته است. البته باید در نظر داشت که افزایش غلظت جزیی که در ApoA1 به‌دنبال درمان صورت گرفته است امکان دارد باعث تولید بیش‌تر پروتیین PON1 به‌دنبال درمان شده باشد. اما انتظار این بود که اگر مقدار پروتیین بالا می‌رفت در فعالیت آریل استرازی PON1 نیز افزایش دیده می‌شد. بررسی ژنوتیپ‌ها در L55M نشان داده که وجود لوسین در موقعیت ۵۵ (ژنوتیپ‌های LL) باعث گردیده آنزیم به‌نحوی تغییر نماید که ویژگی برای هیدرولیز پاراکسون در آنزیم بیش‌تر شود و تغییری که در ساختمان PON1 صورت گرفته منجر به این مسئله گردید که آنزیم موجود در پلاسمای افراد حامل این ژنوتیپ‌ها تماس بیش‌تری برای هیدرولیز پاراکسون داشته باشد. البته باید در نظر داشت که ApoA1 در مطالعه حاضر در افراد با ژنوتیپ LL نسبت به قبل از درمان با استاتین افزایش داشته است (P<۰/۰۵) و افزایش ApoA1 علاوه بر افزایش فعالیت باعث نگه‌داری بیش‌تر پروتیین پاراکسوناز۱ با ذرات HDL می‌گردد. بنابراین افزایش فعالیت در ژنوتیپ LL نسبت به MM شاید ناشی از این مطلب باشد. در مطالعه‌ای که بر روی ژمفیبروزیل صورت گرفته تاثیر قابل‌توجهی در فعالیت PON1 دیده نشده است.[۲۰] در مطالعات قبلی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سرم افراد که تحت درمان با استاتین‌ها قرار گرفته‌اند افزایش نشان داده است.[۲۱] این افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گزارش شده در اثر مصرف استاتین‌ها ممکن است به‌دلیل افزایش فعالیت PON1 بوده باشد که در مطالعه حاضر دیده شده است. استاتین‌ها ممکن است اثرات فیزیولوژیک پیچیده‌تری داشته باشند که احتمالاً یکی از این عملکردها افزایش فعالیت آنزیم‌های خاص در پلاسما است. البته ارتباط فعالیت پاراکسوناز با ترکیبات لیپیدی یا پروتیینی HDL قبلاً گزارش شده است.[۲۲]

در مطالعه حاضر ارتباط بین افزایش غلظت ApoA1 و فعالیت پاراکسوناز۱ در ژنوتیپ LL از پلی‌مورفیسم L55M دیده شده است. LDL اکسید شده باعث غیرفعال شدن PON1 می‌گردد.[۲۳] پاسخ کلی افزایش فعالیت در اثر درمان با استاتین که در مطالعه حاضر دیده می‌شود احتمالاً به‌دلیل کاهش این LDLهای اکسید شده به‌دنبال کاهش کلسترول تام و LDL بعد از مصرف لواستاتین می‌تواند باشد. مطالعات نشان داده الگوی خاص مصرف مواد غذایی که در اسکیموها وجود دارد باعث کاهش بیماری‌های قلبی عروقی در این افراد می‌شود که این مسئله به‌دلیل تغییر اسیدهای چرب موجود در فسفولیپید این افراد به‌دلیل رژیم غذایی خاصی که مصرف می‌کنند می‌باشد.[۲۴] مصرف ویتامین‌های آنتی‌اکسیدان مانند C و E باعث افزایش فعالیت PON1 می‌گردند. هم‌چنین مصرف الکل باعث افزایش فعالیت PON1 می‌گردد.[۲۵] اما مقدار PON1 در بیماران کبدی ناشی از الکلیسم کاهش دارد. پس با توجه به مطالب فوق فعالیت PON1 تحت تاثیر رژیم غذایی و دارویی می‌تواند دستخوش تغییر گردد. ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های پروتیین انتقال‌دهنده کلسترل‌استر (CETP) و ترکیبات HDL نشان داده شده است و 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.[۲۶] پس دور از انتظار نیست که افراد با ژنوتیپ‌های متفاوت پاراکسوناز۱ پاسخ متفاوتی به درمان با لواستاتین از خود نشان دهند که این پاسخ متفاوت با تغییر

www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 11:41 IRDT on Tuesday September 10th 2013

در اسیدهای چرب در ساختمان HDL می‌تواند همراه باشد که در مطالعه ما نشان داده شده است.

در مطالعه حاضر دیده شده که افزایش اسیدهای چرب اشباع‌نشده در ساختمان HDL در ژنوتیپ‌های خاصی بوده است و در این ژنوتیپ با تغییر مشاهده شده فعالیت پاراکسونازی PON1 افزایش یافته است. دلیل این امر می‌تواند به مسایل متعددی مربوط باشد از جمله این‌که افزایش اسیدهای چرب غیر اشباع در ساختمان HDL با کاهش دانسیته HDL و تغییر زیرواحدهای HDL به‌سمت زیر واحدهای فعال‌تر همراه گردیده است[۲۷و۲۸] و از این طریق فعالیت پاراکسونازی را افزایش داده است. آلل L از پلی‌مورفیسم L55M در افراد با LDL بالای ۱۳۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر فراوانی بیش‌تری دارد.

هم‌چنین لواستاتین بر فعالیت PON1 تاثیرگذار است و پلی‌مورفیسم L55M مربوط به PON1 نقش تعدیل‌کننده در تاثیر لواستاتین بر فعالیت پاراکسونازی در این مطالعه داشته‌اند. در ژنوتیپ‌هایی از پلی‌مورفیسم بررسی‌شده PON1 که نسبت اسید چرب غیر اشباع در ساختمان HDL بیش‌تر شده فعالیت پاراکسونازی PON1 نیز افزایش بیش‌تری نشان داده است.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی پلی‌مورفیسم‌های ژن پاراکسونا‌ز۱ با ترکیبات HDL در افراد با کلسترول بالا" مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد در سال ۱۳۸۸ به کد ۷۰۹ می‌باشد که با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد اجرا شده است.

References

1. Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation* 2006;113(21):2548-55.
2. Joy T, Hegele RA. Is raising HDL a futile strategy for atheroprotection? *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(2):143-55.
3. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991;286(1-2):152-4.
4. Khersonsky O, Tawfik DS. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry* 2005;44(16):6371-82.
5. Oda MN, Bielicki JK, Ho TT, Berger T, Rubin EM, Forte TM. Paraoxonase 1 overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290(3):921-7.
6. 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(11):2083-9.
7. Gouédard C, Koum-Besson N, Barouki R, Morel Y. Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol* 2003;63(4):945-56.
8. Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. The role of paraoxonase 1 activity in cardiovascular disease: potential for therapeutic intervention. *Am J Cardiovasc Drugs* 2004;4(4):211-7.
9. Karabina SA, Lehner AN, Frank E, Parthasarathy S, Santanam N. Oxidative inactivation of paraoxonase: implications in diabetes mellitus and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2005;1725(2):213-21.
10. 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. *J Lipid Res* 2005;46(3):445-51.
11. 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. *J Lipid Res* 2005;46(9):1888-95.
12. van Himbergen TM, van Tits LJ, Roest M, Stalenhoef AF. The story of PON1: how an organophosphate-hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. *Neth J Med* 2006;64(2):34-8.
13. Brekke OL, 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.
14. Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 1986;27(1):114-20.
15. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1982. p. 76-85.
16. Gradic M, Barisic K, Rumora L, Salamunic I, Tadijanovic M, Grubisic TZ, et al. Genetic frequencies of paraoxonase 1 gene polymorphisms in Croatian population. *Croat Chem Acta* 2008;81(1):105-111.
17. Gao X, Jayaraman S, Gursky O. Mild oxidation promotes and advanced oxidation impairs remodeling of human high-density lipoprotein in vitro. *J Mol Biol* 2008;376(4):997-1007.
18. Moren X, Deakin S, Liu ML, Taskinen MR, James RW. HDL subfraction distribution of paraoxonase-1 and its relevance to enzyme activity and resistance to oxidative stress. *J Lipid Res* 2008;49(6):1246-53.
19. van Himbergen TM, van Tits LJ, Roest M, Stalenhoef AF. The story of PON1: how an organophosphate-hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. *Neth J Med* 2006;64(2):34-8.
20. Durrington PN, Mackness MI, 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.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 11:41 IRDT on Tuesday September 10th 2013

21. Nagila A, Permpongpaiboon T, Tantrarongroj S, Porapakkham P, Chinwattana K, Deakin S, et al. Effect of atorvastatin on paraoxonase1 (PON1) and oxidative status. *Pharmacol Rep* 2009;61(5):892-8.
22. Getz GS, Reardon CA. Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. *Curr Opin Lipidol* 2004;15(3):261-7.
23. 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 Radic Biol Med* 1999;26(7-8):892-904.
24. Nagakawa Y, Orimo H, Harasawa M, Morita I, Yashiro K, Murota S. Effect of eicosapentaenoic acid on the platelet aggregation and composition of fatty acid in man. A double blind study. *Atherosclerosis* 1983;47(1):71-5.
25. 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, randomised intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis* 1999;147(2):405-10.
26. Marsillach J, Ferré N, Vila MC, Lligoña A, Mackness B, Mackness M, et al. Serum paraoxonase-1 in chronic alcoholics: relationship with liver disease. *Clin Biochem* 2007;40(9-10):645-50.
27. Noori M, Darabi M, Rahimipour A, Rahbani M, Abadi NA, Darabi M, et al. Fatty acid composition of HDL phospholipids and coronary artery disease. *J Clin Lipidol* 2009;3(1):39-44.
28. Singh IM, Shishehbor MH, Ansell BJ. High-density lipoprotein as a therapeutic target: a systematic review. *JAMA* 2007;298(7):786-98.

Archive of SID

www.SID.ir

Tehran University Medical Journal; Vol. 70, No. 1, April 2012: 7-14

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 11:41 IRDT on Tuesday September 10th 2013

Paraoxonase-1 L55M polymorphism with fatty acid composition of phospholipids in high-density lipoproteins

Keihan Ghatreh Samani Ph.D.[1]
Effat Farrokhi Ph.D.[2*]
Morteza Hashemzadeh Chaleshtory Ph.D.[3]
Fatemeh Azadegan M.Sc.[3]

1- Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.
2- Molecular Science, Ph.D. Student, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.
3- Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

[*] Corresponding author: Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Rahmatieh, Shahrekord, Iran.
Tel: +98-381-3346692
E-mail: e_farrokhi_k@yahoo.com

Received: September 27, 2011 Accepted: January 11, 2012

Abstract

Background: Paraoxonase-1 (PON1) moves with high-density lipoprotein (HDL) particles in blood and prevents low-density lipoprotein (LDL) particles from oxidation. The aims of this study were to investigate the correlation between fatty acid composition of HDL phospholipids with pon-1 polymorphisms and response to lovastatin treatment in people with high blood cholesterol.

Methods: In this descriptive study, 265 patients were selected and divided into two groups based on LDL-C concentrations; 131 patients with LDL-C greater than 130 mg/dl (cases) and 134 patients with LDL-C lower than 130 mg/dl (controls). Fatty acids of HDL phospholipids were measured with gas chromatography and lipid profile (cholesterol, triglyceride, LDL-C, HDL-C), apolipoprotein A1 and apolipoprotein B were measured by relevant commercial kits. Oxidized LDL was measured by ELISA method and activity of paraoxonase was determined by a relevant standard manual method. Genotypes of L55M polymorphism were determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism procedure.

Results: Prevalence of L allele from L55M polymorphism was 0.65 and 0.53 in the case and control groups, respectively (P=0.04). PON1 paraoxonase activity in LL homozygote genotype was higher than other genotypes upon treatment with lovastatin. Concentrations of oleic, linoleic and eicosapentaenoic acids in LL genotype were increased by lovastatin administration.

Conclusion: Allele (L) from L55M polymorphism had a higher frequency in patients with higher LDL-C concentrations. PON1 genotypes seemed to have a modifying role on paraoxonase-1 activity after lovastatin therapy.

Keywords: Fatty acids, HDL, L55M, paraoxanase-1, polymorphism.

Archive of SID

www.SID.ir