

## بررسی ارتباط پلی مورفیسم Q192R ژن پاراکسوناز ۱ (PON1) با ترکیبات لیپوپروتئین با دانسیته بالا (HDL) در بیماران درمان شده با لواستاتین

دکتر کیهان قطره سامانی<sup>۱</sup>، عفت فرخی<sup>۲\*</sup>، دکتر مرتضی هاشم زاده چالستری<sup>۳</sup>، مسعود صادقی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ <sup>۲</sup> مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ <sup>۳</sup> مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران، گروه بافت شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۲۶ اصلاح نهایی: ۹۱/۴/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۲۲

### چکیده:

زمینه و هدف: وظیفه آنتی اکسیدانی HDL به عهده آنزیم پاراکسوناز ۱ (PON1) می باشد. استاتین ها بر غلظت و بیان ژن PON1 تأثیرگذار هستند. لذا اسیدهای چرب تشکیل دهنده فسفولیپیدها را در HDL دچار تغییر می کنند. این مطالعه با هدف، بررسی اثر لواستاتین بر فعالیت پاراکسوناز ۱ خون و تأثیر بر ترکیبات فسفولیپیدی HDL در ژنوتیپ های پلی مورفیسم Q192R انجام شده است.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی تحلیلی، ۱۳۱ نفر دارای LDL بالای ۱۳۰ mg/dl (گروه مورد) و ۱۳۴ نفر دارای LDL کمتر از ۱۳۰ mg/dl (گروه شاهد) از افراد مراجعه کننده به کلینیک داخلی بیمارستان آیت اله کاشانی شهرکرد به روش در دسترس انتخاب شدند. گروه مورد طبق نظر متخصص به دو گروه دریافت کننده لواستاتین (۷۶ نفر) و گروهی که هیچ دارویی دریافت نکردند (۵۵ نفر) تقسیم شدند. در مرحله اول از تمامی افراد ۷۶ ml خون ناشتا گرفته شد و سطح سرمی گلوکز، کلسترول توتال، تری گلیسرید، HDL-C، LDL-C، کراتینین، آپولیپروتئین A1، آپولیپروتئین B، LDL اکسید شده (OxLDL)، فعالیت پاراکسونازی و آرپل استرازی PON1 اندازه گیری شد. ژنوتیپ های پلی مورفیسم Q192R با استفاده از روش PCR-RFLP مشخص گردید. ۲ ماه پس از درمان در افراد دریافت کننده لواستاتین مجدداً پروفایل های لیپیدی و فعالیت آنزیم پاراکسوناز و ترکیب اسیدهای چرب اندازه گیری شد. نتایج حاصل با استفاده از آزمون های آماری در نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: به دنبال مصرف لواستاتین فعالیت پاراکسونازی PON1، درصد اسید استتاریک، اسید اولئیک، اسید لینولئیک و اسید ایکوزوپنتانویک نسبت به قبل از درمان افزایش نشان داد. فراوانی آلل Q در گروه شاهد ۰/۷۷ و در گروه مورد ۰/۷۰ بود (P=۰/۲۴) همچنین درصد اسید اولئیک، اسید لینولئیک، اسید ایکوزوپنتانویک و فعالیت پاراکسونازی بعد از درمان در ژنوتیپ QR/RR نسبت به QQ افزایش بیشتری نشان داد. نتیجه گیری: بر طبق یافته های این مطالعه درمان بیماران با استفاده از لواستاتین در افراد دارای آلل R (QR/RR) با افزایش فعالیت پاراکسونازی و تغییر اسیدهای چرب غیر اشباع در فسفولیپیدهای HDL باعث تغییر ماهیت این ذرات شده و ممکن است باعث افزایش نقش این ذرات در کاهش بیماری های قلبی و عروقی شود.

واژه های کلیدی: پاراکسوناز ۱، فسفولیپید، لیپوپروتئین با دانسیته بالا، لواستاتین.

### مقدمه:

(oxLDL) نقش اصلی در شروع و پیشرفت آترواسکلروز دارد. LDL با نفوذ به دیواره عروق تحت مسیر لیپوآکسیژناز و یا تحت تأثیر آنزیم میلوپراکسیداز، اکسیده می گردد. بویژه اکسیداسیون اسیدآرآشیدونیک باعث

آترواسکلروز بیماری عضلات صاف شریان ها است که در نتیجه رسوب لیپید و سایر ترکیبات خون در دیواره داخلی برخی شریان ها تشکیل می گردد (۱). ثابت شده که لیپوپروتئین با دانسیته پایین اکسید شده

\*نویسنده مسئول: شهرکرد -رحمتیه-دانشگاه علوم پزشکی- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی - تلفن: ۰۳۸۱-۳۳۴۶۶۹۲

E-mail: E\_farrokhi\_K@yahoo.com

می‌گذارد و مسئول ویژگی هیدرولیز آنزیم برای سوبسترا می‌باشد. ایزوفرم 192R با کارآیی بالا توانایی هیدرولیز پاراکسون را دارد در حالی که 192Q توانایی کمتر برای پاراکسون و قدرت بیشتر برای هیدرولیز سومان و سارین دارد (۲).

توانایی سرم برای هیدرولیز پاراکسون معمولاً شاخص اندازه‌گیری فعالیت پاراکسوناز خون است. غلظت پروتئین PON1 را می‌توان به روش الیزا اندازه‌گیری نمود که نسبتاً پرهزینه می‌باشد ولی بدلیل اینکه PON1 فعالیت استرازی نیز دارد و تحت تاثیر پلی مورفیسیم‌های مختلف قرار نمی‌گیرد غلظت PON1 را می‌توان از روی فعالیت آریل استرازی (مثلاً تاثیر بر فنیل استات) تخمین زد (۲). پس با اندازه‌گیری اثر آنزیم بر روی پاراکسون، فعالیت آنزیم و با اثر آن بر روی فنیل استات غلظت آنزیم قابل ارزیابی خواهد بود.

مطالعات در باره تاثیر فعالیت PON1 بر اجزا تشکیل دهنده لیپوپروتئین‌های پلاسما کمتر بررسی گردیده است. بنظر می‌رسد پلی مورفیسیم‌های مذکور علاوه بر تغییر غلظت خود لیپوپروتئین‌ها، اجزا تشکیل دهنده آنها بویژه اسیدهای چرب تشکیل دهنده فسفولیپیدها را دچار تغییر می‌کند و از این طریق بر فعالیت HDL تاثیرگذار خواهند بود.

هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر لوواستاتین بر فعالیت پاراکسوناز خون و تاثیر بر ترکیبات فسفولیپیدی HDL در ژنوتیپ‌های پلی مورفیسیم Q192R می‌باشد تا بتوان از این دسته داروها جهت افزایش فعالیت پاراکسوناز خون و در نتیجه کنترل بهتر لیپیدهای خون و کاهش موارد بیماری قلبی عروقی و افزایش سطح سلامت جامعه استفاده بهتری نمود.

### روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی تحلیلی پس از موافقت کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ۲۶۵ نفر از افراد در دسترس، مراجعه کننده به کلینیک داخلی بیمارستان آیت اله کاشانی شهرکرد توسط متخصص

تولید یک ترکیب پیش التهابی گردیده و باعث تحریک سیستم ایمنی می‌گردد. با تجمع ماکروفاژها و بلعیده شدن ذرات LDL اکسید شده، تولید سلول Foam می‌گردد که توده اولیه آتروم است (۲). از طرفی لیپوپروتئین با دانسیته بالا (HDL-C) علاوه بر نقش اصلی خود که انتقال کلسترول اضافی از بافت‌ها به کبد جهت دفع از مسیر صفرا می‌باشد و انتقال معکوس کلسترول (RCT) نامیده می‌شود (۳)، در مهار اکسیداسیون ذرات LDL نیز نقش دارد (۲).

قسمت عمده وظیفه آنتی اکسیدانی HDL به عهده آنزیم پاراکسوناز ۱ (PON1) می‌باشد که به همراه HDL در خون گردش می‌کند. نقش اصلی در انسان به عهده PON1 بوده که منحصراً در بافت کبدی بیان می‌شود (۴).

PON1 یک آنزیم استراز وابسته به کلسیم است که برای فعالیت آن وجود دو یون کلسیم ضروری است، PON1 اکسیداسیون LDL را کاهش می‌دهد. بر اساس مطالعات In vitro ثابت شده که PON1 از تجمع لیپیدهای پراکسید جلوگیری نموده و تبدیل LDL به ox LDL را کاهش می‌دهد (۵). PON1 حتی خود ذرات HDL را از اکسید شدن محافظت می‌نماید و باعث افزایش غلظت HDL سرم نیز می‌گردد (۶).

داروهای پایین آورنده LDL که مهارکننده هیدروکسی متیل گلوکوتاریل کوآنزیم A (HMG-CoA) ردوکتاز هستند بر فعالیت، غلظت و بیان ژن PON1 تاثیرگذار هستند. بنابراین PON1 نقش اصلاحی (Modifier) در موفقیت درمان با استاتین‌ها دارد (۷، ۸). فعالیت PON1 در بیماران قلبی عروقی کاهش داشته و با ضخامت حاصل از آتروم در عروق قلبی نسبت عکس دارد (۹) هم‌چنین در دیابت ملیتوس فعالیت PON1 بسیار پایین تر از گروه کنترل است (۱۰). پلی مورفیسیم‌های مختلف PON1 مسئول تغییر فعالیت و غلظت این آنزیم و همچنین مسئول تغییرات پلاسمایی HDL در جمعیت‌های مختلف می‌باشد (۱۱، ۱۲، ۱۳).

پلی مورفیسیم Q192R بر فعالیت آنزیم تاثیر

با استفاده از پلیت های ژل 60G و بافر (هگزان : اتیل اتر: استیک اسید) به نسبت (۸۰ : ۲۰ : ۱) جدا گردید (۱۵).

اسیدهای چرب موجود در فسفولیپید تحت ترکیب با عوامل متیل دار مانند متیل استر با استفاده از کاتالیز کلرید استیل در متانول به اسیدهای چرب متیله تبدیل شد (۱۶). مشتقات اسیدهای چرب متیله تولید شده از فسفولیپیدهای استخراج شده توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی (SRI, Torance, CI) با ستون ۶۰ × ۰/۲۵ نفیکک گردید.

نتایج حاصل از این مرحله با استفاده از آزمون آماری t-test برای پارامترهای کمی و آزمون آماری کای دو برای بررسی شیوع پلی مورفیسم تجزیه و تحلیل شد. افراد مورد، که در گروه اول قرار گرفتند مجدداً در دو گروه A و B تقسیم شدند. گروه A افرادی که طبق صلاحدید پزشک متخصص داخلی علیرغم داشتن LDL ۱۳۰ میلی گرم هیچ دارویی دریافت نکردند و گروه B تحت درمان با لواستاتین قرار گرفتند.

پس از دو ماه از دریافت دارو مجدداً از گروه B، ۵ میلی لیتر خون بصورت ناشتا گرفته شده و مجدداً پروفایل لیپیدی و فعالیت آنزیم پاراکسوناز و ترکیب اسیدهای چرب HDL اندازه گیری و تعیین مقدار گردید و نتایج حاصل با استفاده از آزمون t زوجی با قبل از درمان مقایسه شد و تاثیر پلی مورفیسم Q192R در پاسخ دهی به درمان توسط لوواستاتین مشخص گردید. آزمایشات مولکولی:

در این تحقیق برای استخراج DNA از روش فنل کلروفرم استفاده شد (۱۷). توالی پرایمرهای Forward و Reverse مورد نیاز جهت تکثیر آگزون ۶ ژن پاراکسوناز جهت بررسی پلی مورفیسم Q192R بصورت زیر می باشد:

Q192RF 5'TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G 3'  
Q192RR 5'CCT GAGAAT CTGAGT AAA TCCACT 3'

این پرایمرها قطعاتی به طول ۲۳۸ جفت باز (238bp) را تکثیر می نمایند (۱۸).

مواد و مقادیر مورد نیاز برای هر واکنش PCR (تهیه شده از شرکت سیناژن) شامل: 2.5µl : Buffer (10X) ، 2µl (50mM) MgCl2

بیماری های داخلی انتخاب شدند. افراد مورد مطالعه در دو گروه شامل افرادی که دارای LDL بالای ۱۳۰ میلی گرم در دسی لیتر به عنوان گروه مورد (۱۳۱ نفر) و افراد دارای LDL کمتر از ۱۳۰ میلی گرم در دسی لیتر به عنوان گروه شاهد (۱۳۴ نفر) قرار گرفتند. بدیهی است افرادی که دارای بیماری های متابولیک نظیر دیابت و بیماری های کبدی و کلیوی و .... بودند از مطالعه حذف گردیدند.

اطلاعات افراد تحت مطالعه از طریق پرسشنامه جمع آوری شد و در مرحله اول از تمام افراد مورد مطالعه ۷ میلی لیتر خون ناشتا گرفته شد. ۲ میلی لیتر از خون جهت آزمایشات مولکولی به لوله مخصوص، حاوی EDTA (با غلظت ۰/۵ مولار) و ۵ میلی لیتر خون جهت آزمایشات بیوشیمیایی به لوله شیشه ای منتقل شد. در کمتر از نیم ساعت سرم نمونه ها با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه از قسمت لخته جدا گردید و در دمای ۲۰- درجه تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شدند و سطح سرمی گلوکز، کلسترول توتال، تری گلیسرید، HDL-C، LDL-C، کراتینین، آپولیپوپروتئین A1 (Apo A1) و آپولیپوپروتئین B (Apo B) در تمامی نمونه ها با استفاده از کیت های تجاری ساخت شرکت پارس آزمون توسط دستگاه اتوآنالیز BT3000 (ایتالیا) در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد اندازه گیری گردید. اندازه گیری oxLDL در سرم با استفاده از کیت های ایزا خریداری شده از شرکت Mercodia سوئد برطبق دستورالعمل کیت انجام شد. سپس فعالیت پاراکسونازی (EC 3181) و آریل استرازی (EC3112) PON1 با استفاده از روش های دستی استاندارد اندازه گیری گردید.

پس از رسوب ذرات لیپوپروتئینی حاوی ApoB، لیپیدهای موجود در لایه رویی (لیپیدهای موجود در HDL) توسط روش Folch استخراج گردید (۱۴).

کلیه فسفولیپیدهای موجود در HDL به روش کروماتوگرافی لایه نازک (Thin Layer Chromatography)

### یافته ها:

در این مطالعه ۲۶۵ نفر در دو گروه شاهد و مورد با هم مقایسه شده است متغیرهای تاثیرگذار مانند سن، جنس، فشارخون و نمایه توده بدنی (BMI) اختلاف معنی داری در دو گروه نداشته اند. در بررسی متغیرهای بیوشیمیایی در دو گروه مورد و شاهد سطح کلسترول، LDL و Apo B در گروه مورد بالاتر از شاهد بود ( $P < 0.001$ ) (جدول شماره ۱). بر اساس نتایج لواستاتین با مهار ردوکتاز باعث کاهش کلسترول تام، Apo B، LDL-C و LDL ox شده است. فعالیت پاراکسونازی PON1 نیز به دنبال لواستاتین افزایش یافته است (جدول شماره ۲). تاثیر لواستاتین بر ترکیبات اسید چرب موجود در فسفولیپید HDL نشان داد درصد اسید استتاریک، اسید اولئیک، اسید لینولئیک و اسید ایکوزوپنتانوئیک نسبت به قبل از درمان افزایش نشان داده است (جدول شماره ۳).

0.3µl:R Primer (10pM)، 0.3µl:F Primer (10pM)، dNTP (10mM)، 0.1µl:Taq DNA Polymerase (5U/µl) و 0.5µl DNA (حدود 25ng) که با ddH2O به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. شرایط دمایی بهینه شامل ۳۵ سیکل مشتمل بر دمای واسرشت  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال  $61^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۰ ثانیه و دمای ساخت  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۰ ثانیه بود. محصول PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد با میلی آمپر ۴۰ به مدت ۱/۵ ساعت الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی نیترات نقره مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام PCR-RFLP، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR تحت تاثیر ۴ واحد آنزیم محدود کننده BspPI (Fermentase-Canada) به مدت یک شب (Over night) در دمای  $55^{\circ}\text{C}$  قرار گرفت. پس از آن وجود قطعات به اندازه های ۲۳۸، ۱۷۵ و ۶۳ جفت بازی بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد با میلی آمپر ۴۰ به مدت ۱/۵ ساعت بررسی گردیدند.

جدول شماره ۱. مقایسه ویژگی های بیوشیمیایی دو گروه تحت مطالعه مرحله اول

Pvalue	گروه مورد (۱۳۱ نفر)	گروه شاهد (۱۳۴ نفر)	گروه متغیر
۰/۰۰۱	۲۴۰±۴۰/۱	۱۸۵±۲۹/۳	کلسترول (mg/dl)
۰/۰۲۳	۲۲۴±۱۳۱/۱	۱۷۲±۱۰۵/۸	تری گلیسرید (mg/dl)
۰/۶۲۵	۴۶±۱۰/۱	۴۷±۱۱/۶	لیپوپروتئین با دانسیته بالا HDL-C (mg/dl)
۰/۰۰۱	۱۶۱±۲۹/۳	۹۲±۲۸/۲	لیپوپروتئین با دانسیته پایین LDL-C (mg/dl)
۰/۷۱۱	۱۳۵±۱۶/۶	۱۳۷±۲۴/۹	آپولیپوپروتئین A ApoA1 (mg/dl)
۰/۰۰۱	۱۲۴±۱۸/۶	۱۰۰±۱۴/۵	آپولیپوپروتئین B ApoB (mg/dl)
۰/۰۵۹	۸۸±۵۹/۶	۹۸±۶۵/۶	آنزیم آریل استراز PON1 (U/ml)
۰/۲۴	۱۷۸±۱۲۴	۱۹۴±۱۳۲	آنزیم پاراکسوناز PON1 (U/ml)

نتایج بصورت "میانگین ± انحراف معیار" می باشند، گروه شاهد: افراد دارای LDL کمتر از ۱۳۰ mg/dl، گروه مورد: افراد دارای LDL بیشتر از ۱۳۰ mg/dl، واحد متغیرهای مورد بررسی mg/dl می باشد، PON1 آنزیم پاراکسوناز ۱.

## جدول شماره ۲: تاثیر لواستاتین بر متغیرهای مورد مطالعه دریافت کننده لواستاتین

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

نتایج بصورت "میانگین±انحراف معیار" می باشد.  $n=۷۶$

نشان داده درصد اسید اولئیک و اسید لینولئیک و اسیدایکوزو پنتانویک بعد از درمان در ژنوتیپ QR/RR نسبت به قبل از درمان افزایش یافته است ( $P<۰/۰۵$ ) (جدول شماره ۵).

تاثیر پلی مورفیسم مطالعه شده بر برخی متغیرها در جدول شماره ۴ ارائه شده است. به دلیل کم بودن تعداد نمونه های هموزیگوت در پلی مورفیسم Q192R، مقایسه بین (QR/RR) در مقابل QQ صورت گرفته است. تغییرات اسید چرب در فسفولیپیدهای موجود در HDL بعد از درمان در ژنوتیپ های هر سه پلی مورفیسم

## جدول شماره ۳: اسیدهای چرب موجود در فسفولیپیدهای بیماران دریافت کننده لواستاتین

P value	بعد لواستاتین	قبل لواستاتین	متغیر
۰/۴۱	۳۱ ± ۳/۵	۳۲ ± ۳/۴	اسید پالمیتیک
۰/۲۵	۱/۱ ± ۰/۷	۱/۱ ± ۰/۶	اسید پالمیتولئیک
۰/۰۳۹	۱۸ ± ۱/۵	۱۶ ± ۱/۴	اسید استئاریک
۰/۰۲۶	۹/۸ ± ۱/۸	۷/۸ ± ۱/۹	اسید اولئیک
۰/۰۱۹	۲۱/۱ ± ۲/۴	۱۸/۲ ± ۲/۵	اسید لینو لئیک
۰/۰۷۲	۸/۲ ± ۲/۴	۷/۵ ± ۱/۹	اسید آراشیدونیک
۰/۰۰۷	۱/۲ ± ۰/۷	۱/۱ ± ۰/۴	اسید ایکوزو پنتانویک
۰/۰۹	۰/۹۹ ± ۰/۶	۰/۹۵ ± ۰/۶	اسید دو کوزو هگزانویک

نتایج بصورت "میانگین±انحراف معیار" می باشد.  $n=۷۶$

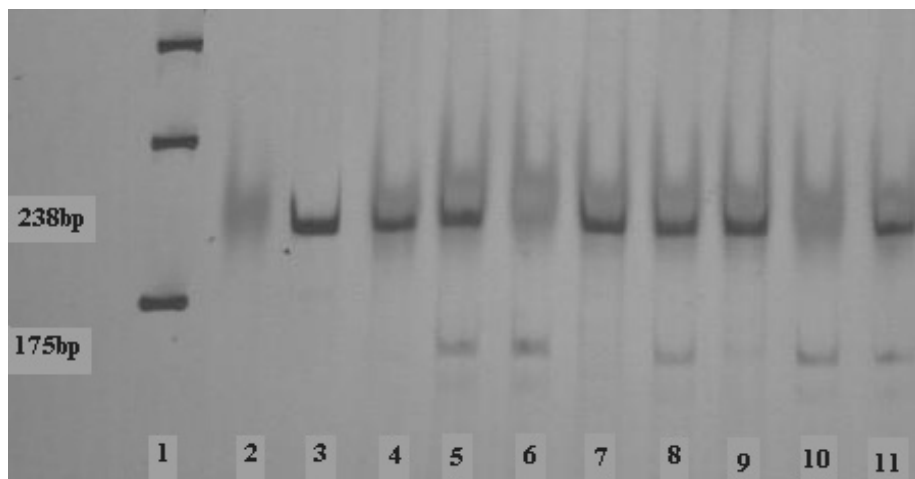
**جدول شماره ۴:** مقایسه ویژگی های یوشیمیایی بر اساس پلی مورفیسم های بررسی شده در بیماران دریافت کننده لواستاتین

QQ		QR / RR		پلی مورفیسم Q192R	متغیر
بعد	قبل	بعد	قبل		
۴۴±۸/۹	۳۹ ± ۸/۸	۴۶±۸/۹	۴۴ ± ۱۰/۸	(mg/dl) HDL-C	لیپوپروتئین با دانسیته بالا
۱۱۹±۲۱/۵	۱۱۶ ± ۲۰/۲	۱۳۸±۱۹/۷	۱۳۰ ± ۲۱/۲	(mg/dl) ApoA1	آپولیپوپروتئین
۷۹±۲۷/۱	۷۴±۳۱/۲	۸۵±۲۶/۴	۷۵ ± ۲۴/۷	(u/mL)	آنزیم آریل استرازی
۱۱۹±۸۴	۱۰۹±۷۳	۵۹۵±۲۱۹	۵۱۴ ± ۲۰۱	(u/mL)	آنزیم پاراکسونازی

نتایج بصورت " میانگین ± انحراف معیار " می باشند. \*  $P < 0.05$  سطح معنی داری قبل و بعد از بررسی می باشد.

است. نمونه هایی که ژنوتیپ QQ دارند بدون تغییر باقی مانده و در محل ۲۳۸ باند دارند و نمونه هایی که ژنوتیپ QR دارند هم در محل ۱۷۵ و هم در محل ۲۳۸ دارای باند الکتروفوزی می باشند (باندهای ۶۳ از ژل خارج گردیده و دیده نمی شود) (تصویر شماره ۱).

پس از انجام RFLP بر روی محصولات PCR، آنزیم BspPI با ایجاد برش در محل 4 GGATC(N) در محصولات PCR، در نمونه هایی که آلل R دارند (ژنوتیپ RR و QR) دارند برش ایجاد نموده و دو محصول با اندازه های ۱۷۵ و ۶۳ جفت بازی ایجاد نموده



**تصویر شماره ۱:** ژل پلی اکریل آمید PCR-RFLP مربوط به پلی مورفیسم Q192R.

شماره ۱ مارکر، ۲ کنترل منفی (بدون DNA)، ۳ کنترل Uncut (بدون آنزیم)، ۴، ۷ و ۹ ژنوتیپ QQ، ۵، ۸ و ۱۱ ژنوتیپ QR، ۶، ۱۰ ژنوتیپ RR

و افراد با LDL کمتر از ۱۳۰ در پلی مورفیسم Q192R دیده نمی شود.

فراوانی آلل Q در گروه شاهد ۰/۷۷۴ و در گروه مورد ۰/۷۰ بود ( $P=0.24$ ). به عبارت دیگر تفاوت معنی دار در فراوانی آلل ها در افراد با LDL بالاتر از ۱۳۰

جدول شماره ۵: اسیدهای چرب موجود در فسفو لیپدهای HDL در بیماران دریافت کننده لوآستاتین بر اساس دسته بندی پلی مورفیسم

متغیر	Q192R پلی مورفیسم		QR/ RR		QQ	
	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد
اسید پالمیتیک	۳۰±۴/۸	۳۰±۴/۱	۳۲±۲/۸	۳۲±۲/۹	۳۲±۲/۹	۳۲±۲/۹
اسید پالمیتولنیک	۱/۱±۰/۷	۱/۱±۰/۶	۱/۲±۰/۶	۱/۲±۰/۹	۱/۲±۰/۹	۱/۲±۰/۹
اسید استئاریک	۱۶±۳/۱	۱۸±۲/۴	۱۶±۲/۹	۱۷±۲/۴	۱۷±۲/۴	۱۷±۲/۴
اسید اولئیک	۷/۹±۲/۷	۹/۲±۲/۴	۷/۸±۲/۱	۹/۹±۳/۸*	۷/۸±۲/۱	۹/۹±۳/۸*
اسید لینولنیک	۱۸±۳/۵	۲۳±۴/۱*	۱۸/۱±۲/۴	۱۹/۹±۳/۱	۱۸/۱±۲/۴	۱۹/۹±۳/۱
اسید آراشیدونیک	۷/۷±۳/۱	۸/۴±۲/۹	۷/۴±۱/۱	۷/۹±۳/۱	۷/۴±۱/۱	۷/۹±۳/۱
اسید ایکوزو پنتانویک	۱±۰/۵	۱/۳±۰/۸*	۱/۱±۰/۳	۱/۱±۰/۴	۱/۱±۰/۳	۱/۱±۰/۴
اسید دوکوزو هگزانویک	۰/۹±۰/۵	۱±۰/۷	۰/۹±۰/۶	۰/۹±۰/۷	۰/۹±۰/۶	۰/۹±۰/۷

نتایج بصورت "میانگین± انحراف معیار" می باشد.  $P < 0.05^*$

## بحث

سوبسترای PON1 (نظیر کاهش LDL اکسید) یا افزایش فعالیت PON1 و نه افزایش غلظت پروتئین آن باعث افزایش فعالیت پاراکسونازی گردیده است. البته باید در نظر داشت که افزایش غلظت جزئی که در ApoA1 به دنبال درمان صورت گرفته است امکان دارد باعث تولید بیشتر پروتئین PON1 به دنبال درمان شده باشد. اما انتظار این بود که اگر مقدار پروتئین بالا می رفت در فعالیت آریل استرازی PON1 نیز افزایش دیده می شد.

بنابراین افزایش در فعالیت PON1 در موردی که سوبسترای پاراکسون مصرف شده است به دلیل تغییراتی بغیر از افزایش توده پروتئین بوده که به احتمال قوی همانطور که ذکر شد تغییرات غلظتی سوبستراهای اصلی موجود در بدن بوده که منجر به افزایش فعالیت PON1 در In Vitro شده است. بررسی ژنوتیپ ها در Q192R نشان داده که در ژنوتیپ های QR/RR از این پلی مورفیسم تغییر در فعالیت پاراکسوناز دیده شده است. به نظر می رسد افرادی که دارای ژنوتیپ های QR یا RR می باشند به دلیل ساختار خاص آنزیم که ناشی از تغییر ساختمان سوم به دلیل وجود اسید آمینه گلوتامات است. با کاهش LDL پلاسما یا ApoB ناشی از تاثیر دارو، فعالیت آنزیم بیشتر افزایش یافته است.

اکسیداسیون LDL نقش اساسی در روند آتروژنز دارد و پاراکسوناز ۱ متصل به HDL خط اولیه دفاع در برابر این اکسیداسیون می باشد (۴). پاراکسوناز ۱ بر روی لیپدهای اکسید شده تاثیر گذار است و از طرفی ممکن است اسیدهای چرب اکسید شده به HDL انتقال یافته سپس تحت تاثیر PON1 قرار بگیرند (۵). واضح است که درمان های دارویی و عوامل ژنتیکی می توانند بر فعالیت PON1 یا غلظت PON1 تاثیر گذار باشند.

با توجه به نتایج تحت تاثیر درمان با لوآستاتین تنها در صورتی که سوبسترا خود پاراکسون باشد، درمان باعث افزایش فعالیت PON1 می شود. این درحالی است که فنیل استات به عنوان سوبسترا قرار گیرد تغییر در فعالیت به دنبال درمان در فعالیت آریل استرازی دیده نمی شود. با توجه به اینکه فعالیت آریل استرازی تقریباً غلظت پروتئین PON1 را نشان می دهد (۲) پس می توان نتیجه گیری نمود که لوآستاتین باعث افزایش فعالیت PON1 شده و این درحالی است که بر غلظت این پروتئین تاثیر کمتری داشته است. غلظت HDL و ApoA1 تحت درمان با لوآستاتین افزایش جزئی داشته که از نظر آماری معنی دار نبود. لذا با توجه به افزایش فعالیت پاراکسونازی PON1 احتمالاً لوآستاتین با تغییر در غلظت

بیماری های قلبی عروقی در این افراد می شود که این مسئله بدلیل تغییر اسیدهای چرب موجود در فسفولیپید این افراد به دلیل رژیم غذایی خاص که مصرف می کنند می باشد (۲۳).

رژیم غذایی Pro Atherogenic باعث کاهش معنی دار در فعالیت PON1 می گردد که ناشی از کاهش HDL پلاسما است. در عوض مصرف اسیداولئیک موجود در روغن زیتون با افزایش فعالیت PON1 همراه است. همچنین غذاهایی که با سطح بالای لیپیدهای اکسید همراه است (مانند غذاهای سرخ شده) باعث افت فعالیت PON1 می گردند (۱۱) که این یافته در آزمایشگاه با LDL اکسید و لیپید اکسید شده نیز نشان داده شده است (۲۴).

مصرف ویتامین های آنتی اکسیدان مانند C و E باعث افزایش فعالیت PON1 می گردند. همچنین مصرف الکل باعث افزایش فعالیت PON1 می گردد (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 می تواند دستخوش تغییر گردد.

ارتباط بین پلی مورفیسیم های پروتئین انتقال دهنده کلستریل استر (CETP) و ترکیبات HDL نشان داده شده است و ثابت شده که ترکیبات موجود در HDL در افراد مختلف با ژنوتیپ های متفاوت به ترکیبات رژیم غذایی غنی از اسید چرب غیر اشباع پاسخ متفاوتی می دهند و باعث کاهش متفاوت در کلسترول پلاسما می شود (۱۶). پس دور از انتظار نیست که افراد با ژنوتیپ های متفاوت پاراکسوناز ۱ پاسخ متفاوتی به درمان با لواستاتین از خود نشان دهند که این پاسخ متفاوت با تغییر در اسیدهای چرب در ساختمان HDL می تواند همراه باشد که در مطالعه ما نیز نشان داده شده است.

تغییر در اسیدهای چرب فسفولیپیدی در ژنوتیپ هایی که فعالیت پاراکسونازی افزایش داشته بیشتر با افزایش اسیدهای چرب غیر اشباع نسبت به اشباع همراه بوده است.

در واقع وجود گلوتامین در موقعیت ۱۹۲ باعث گردیده آنزیم به نحوی 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 پلاسما افراد حامل این ژنوتیپ ها تماس بیشتری برای هیدرولیز پاراکسون داشته باشد.

در مطالعات قبلی فعالیت آنتی اکسیدانی در سرم افراد که تحت درمان با استاتین ها قرار گرفته اند افزایش نشان داده است (۱۹). این افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی گزارش شده در اثر مصرف استاتین ها ممکن است به دلیل افزایش فعالیت PON1 بوده، که در مطالعه حاضر دیده شده است.

مکانیسم اثر استاتین ها مهار آنزیم ردوکتاز و کاهش تولید کلسترول داخل سلولی است و از این طریق بر غلظت LDL، HDL و PON1 تاثیر گذار خواهد بود ولی باید در نظر داشت که استاتین ها ممکن است اثرات فیزیولوژیک پیچیده تری داشته باشند که احتمالاً یکی از این عملکردها افزایش فعالیت آنزیم های خاص در پلاسما است. البته ارتباط فعالیت پاراکسوناز با ترکیبات لیپیدی یا پروتئینی HDL قبلاً گزارش شد (۱۹، ۲۰).

در مطالعه ای گزارش شده که تفاوت در فعالیت PON1 با وجود زیر واحدهای خاص HDL در پلاسما همراه است (۲۱). علاوه بر این گزارش شده که HDL های حاوی ApoJ به طور فیزیکی قدرت اتصال به PON1 را دارند (۲۲). شاید مصرف استاتین ها مانند لواستاتین باعث اتصال بیشتر HDL های حاوی ApoJ به آنزیم PON1 در بعضی ژنوتیپ ها شده لذا با افزایش غلظت آنزیم فعالیت این آنزیم در پلاسما در این ژنوتیپ ها افزایش یافته که در مطالعه حاضر مشهود است. پس در واقع می توان بدین گونه عنوان نمود که تغییرات ساختمانی خاصی که ناشی از پلی مورفیسیم های ویژه در ساختمان PON1 ایجاد می گردد، تمایل این آنزیم را در اتصال به ApoJ در پاسخ به استاتین افزایش می دهد.

مطالعات نشان داده الگوی خاص مصرف مواد غذایی که در اسکیموها وجود دارد باعث کاهش



بالای ۱۳۰ میلی گرم در دسی لیتر در مقایسه با افراد با LDL-C کمتر از ۱۳۰ فراوانی مشابهی دارد. لواستاتین بر فعالیت PON1 تاثیرگذار است و ژنوتیپ های PON1 نقش تعدیل کننده در تاثیر لواستاتین بر فعالیت پاراکسونازی در این مطالعه داشته اند. در ژنوتیپ هایی از پلی مورفیسم های بررسی شده PON1 که نسبت اسید چرب غیراشباع بیشتر شده فعالیت پاراکسونازی PON1 نیز افزایش بیشتری نشان داده است.

### تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از مساعدت های معاونت محترم پژوهشی به خاطر تامین هزینه های مربوطه و همچنین از پرسنل محترم مرکز حقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تشکر و قدردانی می گردد.

تاثیر افزایش پروتئین ApoA1 بر افزایش فعالیت PON1 قبلاً نشان داده شده است (۲۶). در مطالعه حاضر دیده شده که افزایش اسیدهای چرب اشباع نشده در ساختمان HDL با ژنوتیپ های خاصی همراه بوده است و در این ژنوتیپ با تغییر مشاهده شده فعالیت پاراکسونازی PON1 افزایش یافته است. دلیل این امر می تواند به مسائل متعددی مربوط باشد از جمله اینکه افزایش اسیدهای چرب غیر اشباع در ساختمان HDL با کاهش دانسیته HDL و تغییر زیر واحدهای HDL به سمت زیر واحدهای فعال تر همراه گردیده است (۲۷) و از این طریق فعالیت پاراکسونازی را افزایش داده است.

### نتیجه گیری:

آل Q از پلی مورفیسم Q192R در افراد با LDL

### منابع:

1. Wilkinson IB, McEniery CM, Cockcroft JR. Arteriosclerosis and atherosclerosis: guilty by association. *Hypertension*. 2009; 54(6): 1213-15.
2. 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 Feb; 64(2): 34-8.
3. Asztalos BF, Roheim PS, Milani RL, Lefevre M, Mc Namara JR, Horvath KV, et al. Distribution of ApoA-I containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Dec; 20(12): 2670-6.
4. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab MF, Fogelman AM, et al. Paraonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Biol Chem*. 2001 Nov; 276(48): 444-9.
5. Rozek LS, Hatsukami TS, Richter RJ, Ranchalis J, Nakayama K, McKinstry LA, et al. The correlation of paraonase (PON1) activity with lipid and lipoprotein levels differs with vascular disease status. *J Lipid Res*. 2005 Sep; 46(9): 1888-95.
6. Carey JNg, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2005 Jan; 38(2): 153-63.
7. Deakin S, Leviev I, Guernier S, James RW. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraonase: a role for sterol regulator y element-binding protein-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Nov; 23(11): 2083-9.
8. Gouedard C, Koum-Besson N, Barouki R, Morel Y. Opposite regulation of the human paraonase-gene PON-by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol*. 2003 Apr; 63(4): 945-56.

9. 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.
10. Karabina SA, Lehner AN, Frank E, Parthasarathy Y, Santanam N. Oxidative inactivation of paraoxonase--implications in diabetes mellitus and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Sep; 1725(2): 213-21.
11. Van Himbergen TM, Roest M, de Graaf J. Indications that paraoxonase-1 contributes to plasma high density lipoprotein levels in familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res*. 2005 Mar; 46(3): 445-51.
12. Srinivasan SR, Li S, Chen W, Tang R, Bond MG, Boerwinkle E, et al. Q192R polymorphism of the paraoxonase 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 Nov; 177(1): 167-74.
13. 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*. 2013; 46: 1885-96.
14. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957 May; 226(1): 497-509.
15. 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 Mar; 27(3): 161-8.
16. Noori M, Darabi M, Rahimpour A, Mohammad Rahbani M, Aslan Abadi N, Maryam Darabi M, Ghatrehsamani K. Fatty acid composition of HDL phospholipids and coronary artery disease. *J Clin Lipidol*. 2009 Feb; 3(1): 39-44.
17. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Press; 1982.
18. Uyar OA, Kara M, Erol D, Ardicoglu A, Yuce H. Investigating paraoxonase-1 gene Q192R and L55M polymorphism in patients with renal cell cancer. *Genet Mol Res*. 2011 Feb; 10(1): 133-9.
19. Girona J, La Ville AE, Sola R, Plana N, Masana L. Simvastatin decreases aldehyde production derived from lipoprotein oxidation. *Am J Cardiol*. 1999 Mar; 83(6): 846-51.
20. Blatter-Garin M-C, Abbott C, Messmer S, Mackness M, Durrington P, Pometta D, et al. Quantification of human serum paraoxonase by enzyme-linked immunoassay: population differences in protein concentrations. *Biochem J*. 1994 Dec; 304 (Pt 2): 549-54.
21. 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 Mar; 7: 48.
22. Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Starck TC, Harmony JAK. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry*. 1994 Jan; 33(3): 832-9.
23. 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. *Atherosclerosis*. 1983 Apr; 47(1): 71-5.
24. Jarvik GP, Tsai NT, McKinstry LA, Wani R, Brophy VH, Richter RJ, et al. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Aug; 22(8): 1329-33.

25. Veiga L, Silva-Nunes J, Melao A, Oliveira A, Duarte L, Brito M. Q192R polymorphism of the paraoxonase-1 gene as a risk factor for obesity in Portuguese women. *Eur J Endocrinol*. 2011 Feb; 164(2): 213-8.
26. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory Properties of HDL. *Circ Res*. 2004 Oct; 95(8): 764-72.
27. Singh IM, Shishehbor MH, Ansell BJ. High-Density Lipoprotein as a Therapeutic Target. *JAMA*. 2007 Aug; 298(7): 786-98.

## Study the relationship between Q192R paraoxonase gene polymorphism and high density lipoprotein composition after Lovastatin Trapy

Ghatreh-Samani K (PhD)<sup>1</sup>, Farrokhi E (PhD student)\*<sup>2</sup>, Hashemzadeh-Chaleshtori M (PhD)<sup>3</sup>, Sadeghi M (MSc)<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; <sup>2</sup>Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; <sup>3</sup>Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; <sup>4</sup>Histology Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 14/Feb/2012      Revised: 12/Jul/2012      Accepted: 121/Nov/2012

**Background and aims:** Enzyme paraoxonase 1 (PON1) has the main antioxidant function of HDL. Statins affect PON1 concentration and expression, therefore the fatty acid composition of phospholipids in HDL is changed by statins. The aim of this study is to investigate the effect of Lovastatin on paraoxonase activity and HDL phospholipids composition in genotypes of Q192R polymorphism.

**Methods:** In this descriptive analytical study, 265 participants from Kashani hospital were randomly divided into two groups. One hundred and thirty participants with LDL higher than 130mg/dl were chosen for case and 134 participants with LDL lower than 130mg/dl were chosen for control group. Considering the expert's idea, the control group was divided into two groups. Group receiving Lovastatin (n=76) and another group receiving no treatment (n=55). From all participants the blood sample and glucose level, total cholesterol, triglycerid, HDL, LDL, creatinine, apolipoprotein A1, apolipoprotein B, OxLDL, PON1 arylesterase and paraoxonase activity were measured. Q192R polymorphism genotypes were determined using PCR-RFLP method. 2 months after Lovastatin treatment lipid profiles and paraoxonase activities and fatty acid components were measured. Data were analyzed using SPSS software.

**Results:** After using Lovastatin; paraoxonase activity, percentage of stearic acid, oleic acid, Linoleic acid and Eicosapentaenoic acid were increased before the treatment. The Q allele showed the same frequency in the control and case groups (0.77 and 0.70 respectively p=0.24) Percentage of oleic, linoleic, Eicosapentaenoic acid and paraoxonase activity in QR / RR were higher than QQ genotype after the treatment.

**Conclusion:** Based on the findings of this study in individuals with alleles R (QR/RR) increasing paraoxonase activity and changing unsaturated fatty acids of phospholipids HDL particles, results in changes the nature of these particles and may decrease cardio vascular disease.

**Keywords:** HDL particles, Lovastatin, Paraoxonase 1, Phospholipid.

Cite this article as: Ghatreh-Samani K, Farrokhi E, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Sadeghi M. Study the relationship between Q192R paraoxonase gene polymorphism and high density lipoprotein composition after lovastatin Trapy. J Shahrekord Univ Med Sci. 2012 Dec, Jan; 14(5): 1-12

**\*Corresponding author:**

Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Rahmatieh, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 00983813346692, E-mail E\_farrokhi\_K@yahoo.com