

مطالعه تغییرات فعالیت‌های پاراکسونازی و آریل استرازای آنزیم پاراکسوناز به دنبال تجویز عصاره آبی سیر در موش صحرائی

دکتر نادره رشتچی‌زاده^{۱*}، دکتر امیر قربانی حق‌جو^۲، دکتر محمدحسین میرمومنی^۳، مرتضی قاری قرآن^۴، جابر هاشم‌زاده^۵

تاریخ دریافت ۸۹/۱/۱۲، تاریخ پذیرش ۸۹/۳/۱

چکیده

پیش زمینه و هدف: آنزیم پاراکسوناز (PON 1) یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های حذف‌کننده رادیکال‌های آزاد و از محافظ‌های اصلی لیپوپروتئین‌ها در برابر ترکیبات اکسیدکننده می‌باشد. مطالعه حاضر بررسی اثر تجویز عصاره آبی سیر را بر فعالیت این آنزیم مورد توجه قرار می‌دهد.

مواد و روش کار: ۲۰ راس موش صحرایی نر به روش غیرانتخابی به ۲ گروه مساوی تقسیم شدند. در گروه ۱ هر موش به میزان ۳ میلی‌لیتر عصاره آبی سیر به صورت داخل پریونئال و گروه ۲ (کنترل) در حجم مساوی سالین نرمال در شرایط یکسان دریافت نمودند. پس از مدت ۷ روز خون‌گیری از موش‌های هر دو گروه و انجام آزمایشات مربوطه، فعالیت آنزیم‌های پاراکسوناز - آریل استراز، آنتی‌اکسیدانت تام، سطح مالون دی‌آلدهید سرمی و همچنین سطح پروفیل لیپیدی شامل کلسترول، تری‌گلیسیرید، HDL-C و LDL-C مورد سنجش قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیمی پاراکسونازی و آریل استراز، آنتی‌اکسیدانت تام سرمی و کاهش معنی‌داری در مقدار سرمی مالون دی‌آلدهید گروه مورد نسبت به گروه شاهد ($P < 0.05$ در تمامی موارد) می‌باشد. همچنین همبستگی مثبت و معنی‌داری بین فعالیت آنزیم PON با فعالیت ARYL ($p = 0.025$ و $r = 0.697$) و نیز سطح سرمی HDL-C ($p = 0.006$ و $r = 0.794$) مشاهده گردید.

بحث و نتیجه‌گیری: عصاره آبی سیر به دلیل توانایی افزایش فعالیت آنزیم PON، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانتی می‌تواند به عنوان یک ماده غذایی کاهش‌دهنده محصولات تنش‌آکسیدانتی مورد توجه قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: عصاره آبی سیر، مالون دی‌آلدهید، پاراکسوناز، آریل استراز

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و یکم، شماره دوم، ص ۲۶۶-۲۶۰، تابستان ۱۳۸۹

آدرس مکاتبه: تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی تلفن: ۰۹۱۴۱۱۴۵۴۹۳

Email: rashchizadeh@yahoo.com

مقدمه

است که با زنجیرهای غیراشباع فسفولیپیدی آن در ارتباط تنگاتنگ است (۵)؛ در کبد ساخته می‌شود و در خون به HDL متصل می‌شود (active site). این آنزیم دارای چندین عمل کاتالیتیکی متفاوت است: پاراکسونازی، آریل استراز (ARYL)، دیازوکسونازی و لاکتونازی (۸-۶). در ابتدا محققان تصور می‌کردند که آنزیم PON1 فقط ترکیبات فسفات آلی (Ops) مثل پاراکسون را سم زدایی می‌کند و نام آن را طبق سوبسترای آن

پاراکسوناز ۱ (PON 1) سرمی انسان (Hu PON1; EC 3.1.8.1) پروتئین گلیکولیزه شده‌ای است که دارای وزن ملکولی ۴۳-۴۵ KDa و حاوی ۳۴۵ اسید آمینه می‌باشد (۱). ساختار سه بعدی PON1 دارای یک جایگاه فعال و ۶ پره بتا (β -propeller) بوده و وابسته به Ca^{2+} است و با جذب آن ساختار و عملکرد کاتالیتیکی آنزیم به هم می‌ریزد (۴-۲). این آنزیم متصل به لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL)

^۱ دانشیار بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات کاربرد دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (نویسنده مسول)

^۲ استادیار بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات کاربرد دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

^۳ استادیار علوم سلولی، دانشگاه رازی کرمانشاه

^۴ کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه رازی کرمانشاه

^۵ کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

مطالعات مختلفی صورت گرفته است. اما یکی از اثرات مهم آنتی اکسیدانتی آن می‌تواند اثر آن بر روی فعالیت آنزیم پاراکسوناز باشد که تاکنون مطالعاتی روی آن صورت نگرفته است. نتایج مطالعه حاضر می‌تواند جنبه‌های دیگری از اهمیت سیر را به‌خصوص در مورد فعالیت آنتی اکسیدانتی آن آشکار سازد.

مواد و روش کار

در مطالعه حاضر که به روش مداخله‌ای تجربی از نوع مورد شاهد می‌باشد و در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تبریز انجام گرفته است، بیست راس موش صحرایی نر نژاد Wistar با محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم مورد آزمایش قرار گرفتند. تمامی حیوانات پس از یک هفته نگهداری در اتاق حیوانات و تطبیق با شرایط نوری به صورت ۱۲ ساعت روشنایی - ۱۲ ساعت تاریکی و استفاده از غذای استاندارد به‌صورت تصادفی به دو گروه ۱۰ تایی A و B تقسیم و در قفس‌های جداگانه قرار گرفتند.

جهت تهیه عصاره آبی سیر پس از جداسازی پوسته و برش دادن به ازای هر ۳۰ گرم سیر خالص که به هم‌زن‌ایزور ریخته می‌شد آنقدر آب استریل به آن اضافه می‌گردید تا بتوان پس از فشرده کردن آن و عبور دادن آن از صافی استریل بتوان ۶۰ میلی‌لیتر عصاره آبی سیر از آن استخراج نمود. گروه A عصاره آبی سیر برابر یک میلی‌لیتر (حدود ۲۰۰-۲۵۰ میکرولیتر) به ازای هر کیلوگرم به‌صورت داخل پریتونال از طریق سرنگ انسولین به مدت هفت روز دریافت کردند (۲۴،۲۳) گروه B نیز در حجم مساوی سالین نرمال استریل به‌صورت داخل پریتونال در همان مدت مشابه دریافت نمودند (۲۴) در پایان مداخله نمونه‌گیری از طریق سینوس چشم موش‌های مورد مطالعه انجام و سرم‌ها به روش سانتیفریژ در دور پایین (۳۵۰۰ دور در دقیقه) و به مدت ۱۰ دقیقه تهیه گردید. میزان کلسترول، تری‌گلیسیرید و HDL بر اساس متد بیوشیمیایی استاندارد و کیت‌های آزمایشگاهی مربوطه با دستگاه اتوانالیزور مورد سنجش و سطح LDL با فرمول فردوالد محاسبه گردید (۲۵). فعالیت آنزیم پاراکسوناز با استفاده از سوبسترای پاراکسون C10H14NO6P از طریق سرعت هیدرولیز پاراکسون که به عنوان سوبسترا با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۲ نانومتر با استفاده از کورنومتر در ثانیه‌های ۶۰ و ۱۲۰ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم آریل استراز از طریق سرعت هیدرولیز فنیل استات که به عنوان سوبسترا با UV-اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۷۰ نانومتر به‌روش استفاده از کورنومتر جهت ثبت تغییرات فعالیت در زمان‌های ۶۰ و ۱۲۰ ثانیه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد (۲۶،۲۷).

پاراکسوناز نامیدند (۹) اما بعدها متوجه شدند که عمل عمدۀ این آنزیم مقابله با رادیکال‌های آزاد و مهار تنش‌های اکسیداتیو می‌باشد. این آنزیم به همراه سایر آنزیم‌ها و مواد آنتی اکسیدان در بدن یک سد دفاعی قوی در برابر مواد اکسید کننده تولید شده ایجاد می‌کنند. مواد اکسید کننده ممکن است در خود بدن در مسیرهای متابولیکی اکسایش - احیا تولید شود که مهم‌ترین آن پراکسید هیدروژن (H_2O_2) است و یا در اثر مصرف چربی‌های اکسید شده بوجود آید. جلوگیری از اکسیداسیون LDL دستاورد جدیدی است که دانشمندان برای PON1 متصوراند (۱۰). از آنجایی که لیوپروتنین با چگالی پایین (LDL) و گونه اکسید شده آن ارتباط مهمی با نارسایی بافت‌های مختلف مثل قلب، کبد، کلیه و مغز و سایر قسمت‌ها دارد لذا پژوهش‌های اخیر اغلب بر ویژگی آنتی اکسیدانتی PON1 متمرکز است (۱۱). تحقیقات نشان داده است که با کاهش میزان مواد آنتی اکسیدان بدن از فعالیت این آنزیم کم می‌شود و برعکس با مصرف مواد آنتی اکسیدان از جمله ویتامین‌ها، ترکیبات فلاونوئید و غیره بر فعالیت آن افزوده می‌شود. برخی از داروهای کاهنده چربی و کلسترول مثل استاتین‌ها نیز اثرات اخیر را دارند. خاصیت آنتی اکسیدانتی HDL مربوط به PON1 و مقداری به آنزیم لسیتین کلسترول اسیل ترانسفراز (LCAT) است که باعث کاهش اکسیداسیون LDL می‌شود. آپولیپوپروتئین A (Apo-A1) و J (Apo-J) با گرایش بالا به PON1 متصل شده و به‌طور انتخابی فعالیت لاکتونازی را تحریک می‌کند (۱۲،۱۳). PON1 عامل جریان سریع کلسترول به واسطه HDL است.

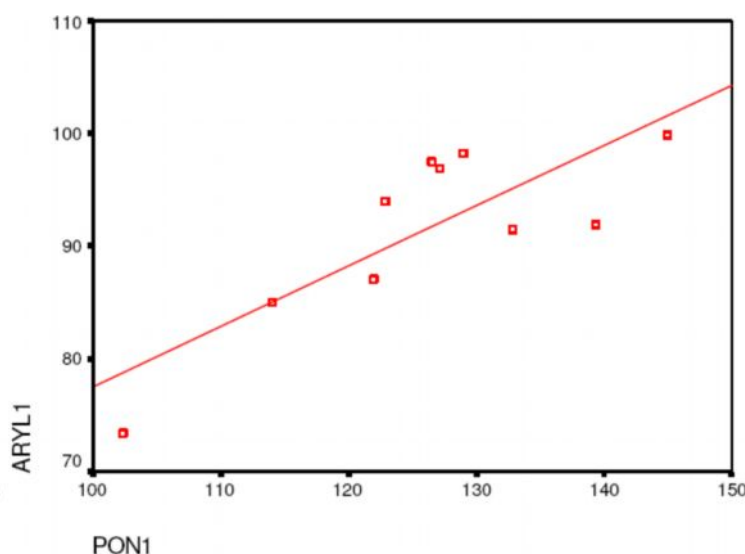
سیر از قرن‌ها قبل به‌عنوان یک داروی گیاهی مورد استفاده بوده (۱۴) و از آن در درمان آسبه‌ها، سرفه، مسمومیت‌ها، انگل‌ها، کرم‌ها، مشکلات گوارشی و گردش خون (۱۵)، هموروئید، درد شکم، کاهش اشتها و پنومونی استفاده می‌شده است (۱۶). همچنین گزارش شده که مصرف سیر فشار خون را کاهش می‌دهد (۱۷) در مردمان اروپای جنوبی که مقادیر زیادی سیر مصرف می‌نمایند، نیز میزان بروز بیماری‌های قلبی - عروقی به‌طور بارزی پایین است (۱۸). همچنین در سم‌زدایی از برخی از ترکیبات مثل سیکلوسپورین آ که یک داروی سرکوب‌کننده ایمنی است یا آرسنیت سدیم در آلودگی‌های آبی موثر است (۱۹،۲۰). گفته می‌شود که آلئیسین و برخی مواد سولفوردار دیگر مثل آلئیل سیستین و آلئیل دی‌سولفید که به فراوانی در سیر وجود دارد این اثرات را بروز می‌دهند (۲۱،۲۲). مطالعات مختلفی درخصوص اثرات بهبود دهندگی سیر بر سطح پروپیل لیپیدی شده است اما توجه به نقش آنتی اکسیدانتی آن اجتناب ناپذیر بوده و مطالعات گسترده‌ای درخصوص اثرات سم‌زدایی و آنتی اکسیدانتی سیر

یافته‌ها

در تمام رت‌های گروه A که عصاره آبی سیر را دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه کنترل (B) افزایش معنی‌داری در سطح آنتی‌اکسیدانت تام مشاهده شد ($p < 0/011$). همچنین سطح پراکسیداسیون لیپیدی و شاخص مهم آن مالون دی‌آلدهید (MDA) نیز در قیاس با گروه کنترل به صورت معنی‌داری کاهش را نشان داد ($p < 0/035$). سطح فعالیت پاراکسوناز ($p < 0/003$) و آریل استراز ($p < 0/004$) و نیز غلظت HDL-کلسترول ($p < 0/003$) گروه مورد نسبت به گروه کنترل افزایش نشان می‌دهد. به تبع افزایش HDL-C غلظت LDL ($p < 0/001$) و کلسترول ($p < 0/005$) کاهش می‌یابد (شکل ۱). همچنین بین فعالیت‌های پاراکسونازی و آریل‌استرازی در گروه A همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده گردید ($r = 0/697$ و $p = 0/025$). همبستگی بین فعالیت پاراکسونازی و غلظت HDL-کلسترول (HDL-C) نیز در گروه A مثبت ارزیابی شد ($r = 0/794$ و $p = 0/006$) (شکل ۲).

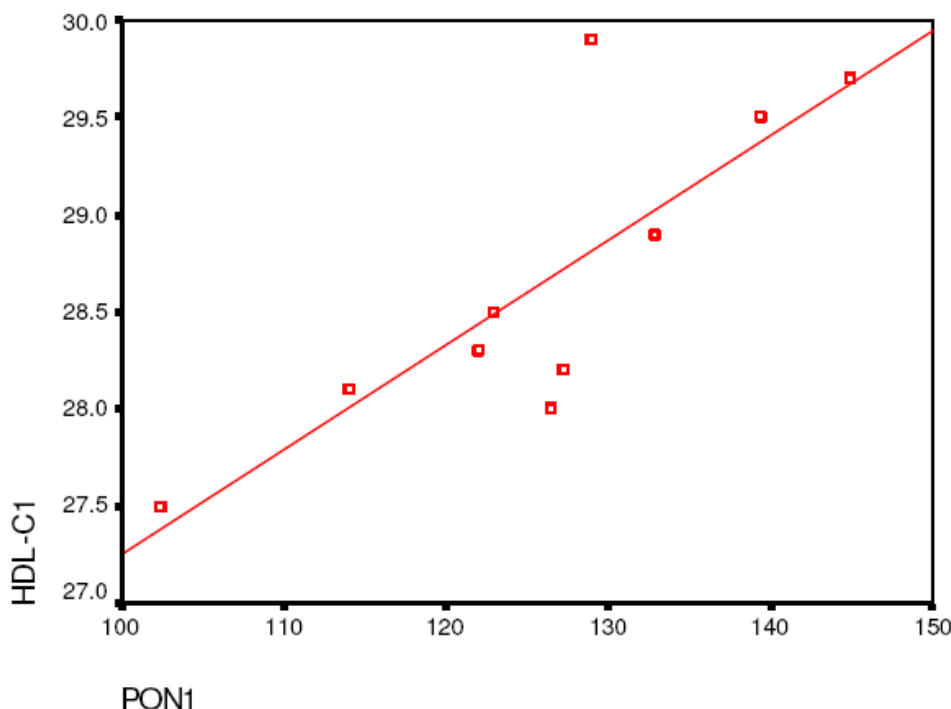
جدول شماره (۱): مقایسه فعالیت آنزیم‌های پاراکسوناز، آریل استراز، توتال آنتی‌اکسیدانت، پراکسیداسیون لیپیدی و سطح پروفیل لیپیدی در دو گروه مورد مطالعه

	Control	Garlic	p*
PON activity (U/ml)	106.01±9.86	126.11±12.11	0.003
ARYL activity (U/l)	76.63±9.73	91.51±7.99	0.004
HDL (mg/dl)	26.70±1.11	28.66±0.80	0.003
LDL-C (mg/dl)	51.60±4.75	43.38±2.50	0.001
TAS	1.73±0.15	1.90±0.08	0.011
TG (mg/dl)	51±4.03	44.3±3.16	0.004
Cholesterol (mg/dl)	88.50±5.39	80.90±2.23	0.005
MDA (μmol/l)	1.75±0.15	1.58±0.18	0.035



شکل شماره (۱): همبستگی بین فعالیت‌های پاراکسونازی و آریل استرازی در موش‌های تحت تجویز عصاره سیر

($r = 0/697$ و $p = 0/025$)



شکل شماره (۲): همبستگی بین فعالیت پاراکسونازی و غلظت HDL-C1 در موش‌های تحت تجویز عصاره سیر
($r=0.794$ و $P=0.006$)

غلظت آنتی‌اکسیدان تام (TAS) در اثر تجویز عصاره سیر افزایش داد که با مطالعات انجام شده مبنی بر کاهش پراکسیداسیون آنتی‌اکسیدان‌های سلولی نظیر گلوتاتیون (GSH) و سوپراکسید دیس‌موتاز (SOD) ناشی از اثر سیر هم‌خوانی دارد (۳۳-۳۵). نتایج همچنین بیان‌گر کاهش غلظت MDA در اثر تجویز عصاره سیر در موش‌های مورد مطالعه بود که این یافته‌ها نیز با مطالعات انجام گرفته در مورد عصاره سیر هماهنگی داشته و می‌تواند بیان‌گر اثر احتمالی عصاره سیر در کاهش و یا حذف رادیکال‌های فعال پراکسی و هیدروکسی باشد (۳۶). یافته‌ها نشان داده‌اند که دی‌آلیل‌پلی‌سولفات‌ها که در عصاره سیر به فراوانی یافت می‌شوند در ممانعت از تشکیل تیوباربتوریک اسید موثراند که این خود موید نتیجه فوق است (۳۷). مطالعات انجام شده در مورد نقش پروفیل لیپیدی و لیپوپروتئین‌ها، و ریسک ابتلا به بیمارهای عروقی نشان دهنده اثرات قابل توجه این ترکیبات در ایجاد و تشدید آترواسکلروز و بیماری‌های قلبی - عروقی است. در این مطالعه غلظت HDL موش‌های دریافت کننده عصاره سیر نسبت به گروه شاهد افزایش و غلظت کلسترول و به تبع آن LDL کاهش پیدا کرده بود؛ که با توجه به نقش HDL به عنوان عامل اصلی برگشت دهنده کلسترول، منطقی به نظر می‌رسد و با پژوهش‌های قبلی مطابقت دارد (۳۸). از آنجایی که آنزیم پاراکسوناز عمدتاً بر روی آپوپروتئین a1 (apoa1) در داخل HDL-C متمرکز است می‌توان نتیجه گرفت که افزایش میزان HDL-C به همراه همبستگی مثبت

بحث

تنش‌های اکسیداتیو به‌طور کلی باعث آسیب به غشاهای بیولوژیکی، ارگانل‌های درون سلولی و ماکرو مولکول‌ها از جمله پروتئین‌ها و DNA می‌شوند. اکسیداسیون لیپیدها توسط رادیکال‌های آزاد حاصل از این تنش‌ها یکی از آسیب‌های اصلی محسوب می‌شود و منجر به تولید ترکیبات فعال مثل آلدئیدها، کتون‌ها و اسیدهای هیدروکسیل می‌شود. این رادیکال‌ها ممکن است از واکنش‌های اکسیداسیون - احیا در بدن تولید شوند یا منشاء خارجی داشته باشند. عدم توازن تشکیل و حذف این رادیکال‌های آزاد از جمله ترکیبات فعال اکسیژنی (ROS) نشان داده شده است که باعث آسیب ژنتیکی، تداخل در سیگنال‌های سلولی، بیماری‌های تخریب نورونی متاستاز، پیری می‌شود. یکی از اثرات پاتولوژیکی آن‌ها در دراز مدت بروز بیماری‌های قلبی - عروقی از جمله آترواسکلروزیس و بیماری عروق کرونر است (۲۹). در موش‌های تیمار شده با عصاره آبی سیر آسیب‌های اکسیداتیو روی کلیه‌ها که معمولاً در اثر درمان با سیکلوسپورین A ایجاد می‌شود کاهش فزاینده‌ای نشان داده است (۳۰). آلین و پودر سیر مستقیماً باعث محو رادیکال‌های OH^* می‌شوند (۳۱) که این مورد اثر مستقیم سیر است. همچنین این عصاره از سلول‌های اندوتلیال عروق در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو القا شده توسط هیدروژن پراکسید جلوگیری می‌کند (۳۲). در مطالعه حاضر

اکسیداسیون لیپیدها و افزایش شاخص پراکسیداسیون لیپیدی MDA همراه است، مورد بررسی قرار گرفت. چرا که این اثرات مخرب در طیف وسیعی از بیماران شامل بیماران کلیوی، دیابتی، سرطانی، قلبی - عروقی و هیپرلیپیدمی بسیار مشکل ساز است. مطالعه حاضر با دوز و غلظت واحدی از سیر انجام شده است که می‌تواند از محدودیت‌های مطالعه حاضر در نتیجه گیری نهایی باشد. بررسی غلظت‌های گوناگون و زمان‌های تجویز متفاوت به همراه بررسی هر یک از مواد اصلی تشکیل دهنده سیر جهت بدست آوردن نتایج قابل اعتمادتر در مطالعات تکمیلی آینده می‌تواند نتایج بهتر و کامل‌تری را در بر داشته باشد. همچنین سنجش apoA1 به همراه آزمایشات میکروسکوپی و مطالعه ترکیبات موثر عصاره و بررسی خاصیت انفرادی و تجمعی هر کدام در مطالعات آینده با طراحی‌های جدیدتر می‌تواند مکانیسم‌های دقیق این پدیده را هر چه بیشتر آشکار نماید.

References:

1. Graner M, James RW, Kahri J, Nieminen MS, Syvanne M, Taskinen MR. Association of paraoxonase-1 activity and concentration with angiographic severity and extent of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47(12):2429-35.
2. Kuo CL, La Du BN. Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonase structural stability and enzymatic activity. *Drug Metab Dispos* 1998; 26: 653-60.
3. Sorenson RC, Priom-Parmo SL, Kuo CL, Adkins S, Lockridge O, La Du BN. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7187-91.
4. Jakubowski H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylayion. *J Biol Chem* 2000; 275: 3957-62.
5. Oda MN, Bielichi JK, Berger T, Forte TM. Cysteine substitutions in apolipoprotein A-I

آن با افزایش فعالیت آنزیم پاراکسوناز می‌تواند دلیلی بر نقش سیر در افزایش فعالیت آنزیم پاراکسوناز با مکانیسم افزایش HDL-C را علاوه بر نقش القایی مثبت عصاره سیر بر فعالیت آنزیم داشته باشد که مطالعات بیشتر به همراه سنجش apoA1 موید این فرضیه خواهد بود. همبستگی مثبت و مستقیم فعالیت آنزیم پاراکسوناز و آریل‌استراز به دنبال تجویز عصاره سیر در مطالعه حاضر نیز با مطالعات انجام شده نظیر کاهش هر فعالیت آنزیمی پاراکسونازی و آریل‌استرازی در بیماری قلبی - عروقی (۳۹) و افزایش فعالیت آنزیمی پاراکسونازی و آریل‌استرازی به دنبال تجویز دهانی ایزوفلاون‌های سبوس در مدل‌های استانوهپاتیت نیز (۴۰) هماهنگی نشان می‌دهد.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر اثر عصاره آبی سیر به جهت خاصیت آنتی اکسیدانت آن به‌ویژه با افزایش فعالیت آنزیم پاراکسوناز در جلوگیری از اثرات مخرب تنش اکسیداتیو که عموماً "با

primary structure modulate paraoxonase activity.

Biochemistry 2001; 40: 1710-1718.

6. Furlong CE, Li WF, Brophy VH, Jarvik GP, Richter RJ, Shih DM, et al. The PON 1 gene and detoxication. *Neurotoxicology* 2000; 21: 581-87.
7. Ferre N, Tous M, Paul A, Zamora A, Vendrell JJ, Bardaji A, et al. Paraoxonase Gln-Arg(192) and Leu-Met (55) gene polymorphisms and enzyme activity in a population with a low rate of coronary heart disease. *Clin Biochem* 2002;35(3):197-203.
8. Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C, et al. Human serum paraoxonase (PON 1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Dispos* 2000; 28: 1335-42.
9. Van Himbege TM, van Tits LJ, Roest M, Stalenhoef AF. The story of PON 1: how an organophosphate-hydrolyzing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. *Neth J Med* 2006; 64: 34-8.
10. Shih DM, Gu L, Xia YR. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998; 394: 284-7.

11. Blatter MC, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. *Eur J Biochem* 1993; 211: 871-9.
12. James R, Deakin S. The importance of high-density lipoprotein for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1986-94.
13. Gaidukov L, Tawfik D. High affinity, stability, and lactonase activity of serum paraoxonase PON 1 anchored on HDL with apoA-1. 2005; 44: 11843-54.
14. Lash JP, Cardoso LR, Mesler PM, Walczak DA, Pollak R. The Effect of garlic on hypercholesterolemia in renal transplant patients. *Transp Proce* 1998; 30: 189-91.
15. Isaacsohn JL, Moser M, Stein EA, Dudley K, Davey JA, Liskov E, et al. Garlic powder and plasma lipids and lipoproteins. *Arch Intern Med* 1998; 158: 1189-94.
16. Aouadi R, Aouidet A, Elkadhi A, Ben Rayana C, Jaafoura H, Tritar B, et al. Effect of fresh garlic (*Allium Sativum*) on lipid metabolism in male rats. *Nutr Res* 2000; 20: 273-80.
17. Silagy CA, Neil HAW. A meta-analysis of the effect of garlic on blood pressure. *J Hypertens* 1991 12: 463-68.
18. Keyes Wine A. Garlic and CHD in seven countries. *Lancet* 1980; 1: 145-6.
19. Wongmekiat O, Thamprasert K. Investigating the protecting effect of aged garlic extract on cyclosporin-induced nephrotoxicity in rats. *Fund Clin Pharmacol* 2005; 19: 555-62.
20. Chowdhury R, Dutta A, Chaudhuri SR, Sharma N, Giri AK, Chaudhuri K. In vitro and in vivo reduction of sodium arsenite induced toxicity by aqueous garlic extract. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 740-51.
21. Lawson LD, Gardner CD. Composition, stability, and bioavailability of garlic products used in clinical trial. *J Agric Food Chem* 2005; 53:6254-61.
22. Chung LY. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. *J Med Food* 2006; 9: 205-13.
23. Batirel HF, Aktan S, Aykut C, Yeğen BC, Coşkun T. The effect of aqueous garlic extract on the levels of arachidonic acid metabolites (leukotriene C4 and prostaglandin E2) in rat forebrain after ischemia-reperfusion injury. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*.1996; 54: 289-92.
24. Javadzadeh A, Ghorbanihaghjo A, Arami S, Rashtchizadeh N, Mesgari M, Rafeey M, Omid YI. Prevention of selenite-induced cataractogenesis in Wistar albino rats by aqueous extract of garlic. *J Ocul Pharmacol Ther* 2009; 25(5):395-400.
25. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18 (6): 499-502.
26. Ruiz J, Blanche H, James RW, Garin MC, Vaisse C, Charpentier G, et al. Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995; 346:869-72.
27. Mackness B, Durrington P, McElduff P, John Y, Naheed A, Michael W, et al. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly prospective study. *Circulation* 2003; 107(22):2775-9.
28. Yagi K. Assay for blood plasma and serum. *Methods Enzymol* 2001;105:328-31.
29. Allen RG. Oxidative stress and superoxide dismutase in development, aging and gene regulation. *Age* 1998; 21: 47-76

30. Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pendraza-Chaverri J. Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats. *Life Sci* 2003; 73: 2543-56.
31. Kourounakis PN, Pekka EA. Effect on active oxygen species of alliin and allium sativum (garlic) powder. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1991; 74: 249-52.
32. Yamasaki T, Li I, Lau BH. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury. *Phytother Res* 1994; 8: 408-12.
33. Borek C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr* 2001; 131: 1010-15.
34. Ide N, Matsuura H, Itakura Y. Scavenging effect of aged garlic extract and its constituent on active oxygen species. *Phytother Res* 1996; 10: 340-1.
35. Ide N, Lau BH. Age garlic extract attenuates intracellular oxidative stress. *Phytomedicine* 1999; 6: 125-31.
36. El Shenawy NS, Soliman MF, Reyad SI. The effect of antioxidant properties of aqueous garlic extract and *Nigella sativa* as anti-schistosomiasis agent in mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2008; 1 : 50-9.
37. Horie T, Awazu SYI, Fuwa T. Identified diallyl polysulfides from an aged garlic extract which protects the membrane from lipid peroxidation. *Planta Med* 1992; 58: 468-9.
38. Durak I, Kavutcu M, Aytac B, Avci A, Devrim E, Ozbek H, et al. Effect of garlic extract consumption on blood lipid and oxidant/antioxidant parameters in human with high blood cholesterol. *J Nutr Biochem* 2004; 15: 373-77
39. Gur M, Aslan M, Yildiz A, Demirbag R, Yilmaz R, Selek S, et al. Paraoxonase and arylesterase activities in coronary artery disease. *Euro Clin Invest* 2006; 36: 779-87
40. Ustundag B, Bahcecioglu IH, Sahin K, Duzgun S, Koca S, Gulcu F, et al. Protective Effect of soy isoflavones and activity levels of plasma paraoxonase and arylesterase in the experimental Nonalcoholic steatohepatitis model. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 2006-14.