

بررسی پلی مورفیسم L55M ژن پاراکسوناز ۱ با ترکیب اسیدهای چرب فسفولیپیدهای موجود در لیپوپروتئین های با دانسیته بالا

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

چکیده

کیهان قطره سامانی^۱

عفت فرخی^{*۲}

مرتضی هاشم‌زاده چالستری^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: ۰۳۸۱-۳۳۴۶۶۲
E-mail: e_farrokhki_k@yahoo.com

زمینه و هدف: آنزیم پاراکسوناز ۱ به همراه لیپو پروتئین های با دانسیته بالا (HDL) در خون گردش می کند و مانع از اکسید شدن لیپو پروتئین های با دانسیته پایین (LDL) می گردد. هدف از این مطالعه تعیین اثر پلی مورفیسم L55M ژن آنزیم پاراکسوناز ۱ بر ترکیبات HDL خون و پاسخ دهی به درمان با لواستاتین در افراد با کلسترول خون بالا می باشد. **روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی تحلیلی ۱۳۴ نفر با LDL کم تر از ۱۳۰ mg/dl (گروه شاهد) و ۱۳۱ نفر با LDL بالای ۱۳۰ mg/dl (گروه مورد) انتخاب شدند. اسیدهای چرب موجود در فسفولیپید HDL به روش گاز کروماتوگرافی اندازه گیری گردید. پروفایل لیپیدی، آپولیپوپروتئین A1 و B با استفاده از کیت های تجاری و هم چنین LDL اکسید شده به روش الیزا و فعالیت پاراکسوناز با استفاده از روش های استاندارد تعیین شد. هم چنین پلی مورفیسم L55M ژن پاراکسوناز ۱ با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز- پلی مورفیسم طولی قطعات محدود تعیین شد. **یافته ها:** فراوانی آلل L در پلی مورفیسم 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 به دنبال درمان با لواستاتین در ژنوتیپ LL افزایش قابل توجه تری داشت. هم چنین درصد اسید اولئیک و اسید لینولئیک و اسید ایکوزاپنتانویک بعد از درمان در ژنوتیپ های LL نسبت به قبل از درمان افزایش نشان داد. **نتیجه گیری:** آلل L از پلی مورفیسم L55M در افراد با LDL بالای ۱۳۰ mg/dl فراوانی بیش تری دارد و ژنوتیپ های پاراکسوناز ۱ نقش تعدیل کننده در تاثیر لواستاتین بر فعالیت پاراکسونازی در این مطالعه داشتند.

کلمات کلیدی: پاراکسوناز ۱، پلی مورفیسم L55M، اسید چرب، HDL.

مقدمه

اصلی را دارد^۳ و HDL با خاصیت آنتی اکسیدانی خود از چند مسیر مانع از اکسیداسیون LDL می گردد. بیش تر وظیفه آنتی اکسیدانی HDL بر عهده آنزیم پاراکسوناز ۱ (PON1) می باشد که به همراه HDL در خون گردش می کند. مطالعات In vitro نشان داده که PON1 از تجمع لیپیدهای پراکسید جلوگیری نموده و تبدیل LDL به ox LDL را کاهش می دهد.^۴ PON1 حتی خود ذرات HDL را از اکسید شدن محافظت می نماید و باعث افزایش غلظت HDL سرم نیز می گردد.^۵ داروهای پایین آورنده 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

آترواسکلروز (Atherosclerosis) علت بسیاری از مرگ و میرها در جهان است و پایین بودن سطح لیپوپروتئین با دانسیته بالا (HDL) یکی از قوی ترین ریسک فاکتورها در این رابطه است.^۱ عمل اصلی ذرات HDL انتقال کلسترول اضافی از بافت ها به کبد جهت دفع از مسیر صفر می باشد که انتقال معکوس کلسترول Reverse Cholesterol Transfer (RCT) نامیده می شود.^۲ نقش دیگر HDL مهار اکسیداسیون ذرات لیپوپروتئین با دانسیته پایین (LDL) می باشد. ثابت شده که برای شروع و پیشرفت آترواسکلروز، LDL اکسید شده (oxLDL) نقش

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 به مدت ۱۰ دقیقه از قسمت لخته جدا گردید و در دمای °C ۲۰- 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، تری-گلیسرید، HDL-C، LDL-C، کراتینین، آپولیپوپروتئین A1 (Apo A1) و آپولیپوپروتئین 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 الیزا (Mercodia Co., Sweden) و فعالیت پاراکسونازی (EC 3181) و آریل استراز (EC3112) PON1 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, Torrance, CI) با ستون ۶۰×۰/۲۵ تفکیک گردید. نتایج حاصل از این مرحله با استفاده از آزمون آماری Student's t-test برای پارامترهای کمی 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) به میزان 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 لواستاتین مشخص گردید.

آزمایشات مولکولی: در این مطالعه برای استخراج DNA از روش فنل کلروفرم استفاده شد.^{۱۵} آگزون ۳ از ژن پاراکسوناز جهت بررسی پلی‌مورفیسم L55M با استفاده از پرایمرهای Primer R و Primer F 5' CCTGCAATAATATGAAACAACCTG 3'

استاتین‌ها دارد.^{۶،۷} 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.^{۱۱،۱۲} 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 لیپوپروتئین‌های پلازما مطالعه‌ای صورت نگرفته، و ترکیبات HDL بر فعالیت آن تاثیرگذار است این مطالعه با هدف تعیین اثر پلی‌مورفیسم L55M ژن آنزیم پاراکسوناز 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

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 به دنبال آن تجویز لواستاتین به مدت دو ماه به افراد گروه B مشاهده گردید لواستاتین با مهار ردوتناز باعث کاهش کلسترول تام، LDL-C، Apo B و oxLDL شده است و فعالیت پاراکسونازی PON1 نیز به دنبال 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 استتاریک (۰:۱۸)، اسید اولئیک (۱۹:۱۸)، اسید لینولیک (۱۲، ۹، ۲: ۱۸) و اسید ایکوزوپنتانویک (۵: ۲۰) نسبت به قبل از درمان افزایش نشان داده است. در بررسی ارتباط پلی مورفیسیم L55M با اثربخشی داروی لواستاتین، نتایج ما نشان داد فعالیت پاراکسونازی به دنبال 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 پلی مورفیسیم 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 اولئیک و

3' TGAAAGACTTAAACTGCCAGTC 5' شناسایی و قطعاتی به طول ۱۷۲ جفت باز تکثیر گردید.^{۱۶} مواد و مقادیر مورد نیاز برای هر واکنش PCR (تهیه شده از شرکت سینژن MgCl₂ (۵۰mM): ۲μl، Buffer (۱۰X): ۲/۵μl، F Primer (۱۰pM): ۳μl، R Primer (۱۰pM): ۳μl، Taq DNA Polymerase (۵U/μl): ۰/۱μl، dNTP (۱۰mM): 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 به مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۹ °C به مدت ۴۰ ثانیه و دمای ساخت ۷۲ °C به مدت ۴۰ ثانیه بود. محصول PCR بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۸٪ (۲۹:۱) با میلی‌آمپر ۴۰ به مدت 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 پنچ واحد آنزیم محدودکننده (Fermentase, NlaIII (Canada) به مدت یک‌شب (Over night) در دمای ۳۷ °C قرار گرفت. پس از الکتروفورز وجود قطعات به اندازه‌های 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

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

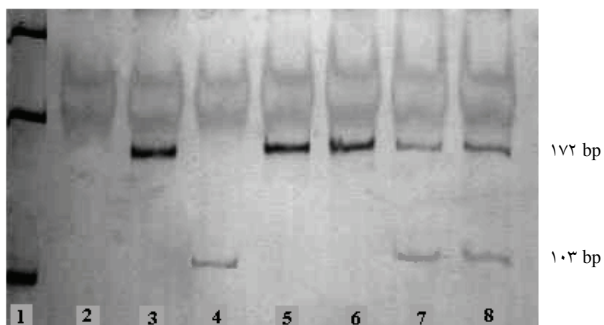
| متغیر | قبل از لواستاتین | بعد از لواستاتین | P |
|---------------------------------|------------------|------------------|-------|
| کلسترول تام (mg/dl) | ۲۳۶±۳۹/۴ | ۱۹۱±۳۱/۵ | ۰/۰۱ |
| تری گلیسرید (mg/dl) | ۲۱۲±۱۲۱/۷ | ۱۹۸±۱۱۳/۶ | ۰/۴۵ |
| HDL-C (mg/dl) | ۴۶±۱۱/۱ | ۴۸±۹/۵ | ۰/۳۹ |
| LDL-C (mg/dl) | 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 آریل استراز (u/mL) | ۱۰۶±۲۵/۶ | ۱۰۸±۳۲/۱ | ۰/۰۰۹ |
| فعالیت آنزیم پاراکسوناز (u/mL) | ۲۰۵±۱۱۷ | ۲۶۱±۱۱۴ | ۰/۰۰۴ |

نتایج به صورت 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 پالمیتیک (۰:۱۶) | ۳۲±۳/۴ | ۳۱±۳/۵ | ۰/۴۱ |
| اسید پالمیتولیک (۱:۱۶) | ۱/۱±۰/۶ | ۱/۱±۰/۷ | ۰/۲۵ |
| اسید استتاریک (۰:۱۸) | ۱۶±۱/۴ | ۱۸±۱/۵ | *۰/۰۳۹ |
| اسید اولئیک (۱ ^۹ :۱۸) | ۷/۸±۱/۹ | ۹/۸±۱/۸ | *۰/۰۲۶ |
| اسید لینولیک (۱۲:۲:۹:۱۸) | ۱۸±۲/۵ | ۲۱/۱±۲/۴ | *۰/۰۱۹ |
| اسید آراشیدونیک (۴:۲۰) | ۷/۵±۱/۹ | ۸/۲±۲/۴ | ۰/۰۷۲ |
| اسید ایکوزوپنتانویک (۵:۲۰) | ۱/۱±۰/۴ | ۱/۲±۰/۷ | *۰/۰۰۷ |
| اسید دوکوزوهگزانویک (۶:۲۲) | ۰/۹۵±۰/۶ | ۰/۹۹±۰/۶ | ۰/۰۰۹ |

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



شکل ۱- ژل پلی اکریل آمید PCR-RFLP مربوط به پلی مورفیسم 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 ۳- ویژگی بیوشیمیایی براساس ژنوتیپ پلی مورفیسم L55M (گروه B)

| متغیر | پلی مورفیسم L55M | | |
|-------------------------|------------------|----------|----------|
| | LL | LM | MM |
| HDL-C قبل (mg/dl) | 42±8/6 | 43±9/8 | 38±9/9 |
| HDL-C بعد (mg/dl) | 42±10/9 | 42±8/7 | 41±10/1 |
| ApoA1 قبل (mg/dl) | 128±19/9 | 120±17/9 | 125±19/5 |
| ApoA1 بعد (mg/dl) | 141±24/6* | 122±22/8 | 128±20/2 |
| آریل استرازی (u/mL) قبل | 81±29/9 | 67±26/8 | 56±30/5 |
| آریل استرازی (u/mL) بعد | 99±28/5 | 86±33/6 | 54±29/6 |
| پاراکسونازی (u/mL) قبل | 298±138* | 120±129 | 86±93 |
| پاراکسونازی (u/mL) بعد | 344±211 | 215±144 | 99±114 |

نتایج به صورت Mean±SD می باشد. * P<0/05 با آزمون آماری ANOVA معنی دار می باشد.

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

| متغیر | پلی مورفیسم L55M | | متغیر | پلی مورفیسم L55M | |
|--------------------------|------------------|----------|------------------------------|------------------|---------|
| | LL | LM/ MM | | LL | LM/ MM |
| اسید پالمیتیک (۰ : ۱۶) | | | اسید لینولیک (۰ : ۱۸) | | |
| قبل از دارو | 18/1±2/8 | 18/5±3/1 | قبل از دارو | 33±2/7 | 31±3/5 |
| بعد از دارو | 22/3±3/4* | 19/1±3/8 | بعد از دارو | 32±3/2 | 30±2/9 |
| اسید پالمیتولیک (۱ : ۱۶) | | | اسید آراشیدونیک (۴ : ۲۰) | | |
| قبل از دارو | 7/4±2/8 | 7/2±2/1 | قبل از دارو | 1/2±0/5 | 1±0/6 |
| بعد از دارو | 8/2±2/5 | 8/1±2/5 | بعد از دارو | 1/1±0/7 | 1/1±0/5 |
| اسید استئاریک (۰ : ۱۸) | | | اسید ایکوزوپنتانویک (۵ : ۲۰) | | |
| قبل از دارو | 1±0/4 | 1/2±0/5 | قبل از دارو | 17±2/4 | 16±2/5 |
| بعد از دارو | 1/3±0/9* | 1/2±0/4 | بعد از دارو | 18±1/2 | 17±2/8 |
| اسید اولئیک (۱۹ : ۱۸) | | | اسید دوکوزوهگزانویک (۶ : ۲۲) | | |
| قبل از دارو | 1±0/6 | 0/9±0/6 | قبل از دارو | 8/1±2/4 | 8±2/1 |
| بعد از دارو | 0/9±0/7 | 0/9±0/8 | بعد از دارو | 10/5±3/5* | 8/8±2/5 |

نتایج به صورت Mean±SD می باشد. * P<0/05 با آزمون آماری تی زوجی معنی دار می باشد.

ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم L55M (شاهد ۱۳۴ نفر به مورد ۱۳۱ نفر) به ترتیب LL (۳۱/۴ به ۴۴/۸)، LM (۳۹/۷ به ۴۳/۱) و (۱۵/۵ به ۲۵/۵) بودند که فراوانی آلل L پس از محاسبه در پلی مورفیسم L55M در گروه شاهد ۰/۵۳ می باشد 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 می شود (P=0/04). به عبارت دیگر در

اسید لینولیک و اسید ایکوزوپنتانویک بعد از درمان در ژنوتیپ‌های LL نسبت به قبل از درمان افزایش نشان داده است. نتایج آزمایشات مولکولی: پس از انجام RFLP بررسی محصولات PCR با استفاده از آنزیم NlaIII، و بررسی قطعات حاصل از برش آنزیمی بر روی ژل پلی اکریل آمید، وجود قطعاتی با اندازه‌های ۱۷۲، ۱۰۳ و ۶۹ جفت بازی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). فراوانی

بحث

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

اکسیداسیون LDL نقش اساسی در روند آتروژنز دارد و پاراکسوناز ۱ متصل به HDL خط اولیه دفاع در برابر این اکسیداسیون می‌باشد.^{۱۷} پاراکسوناز ۱ بر روی لیپیدهای اکسید شده تأثیرگذار است و از طرفی ممکن است اسیدهای چرب اکسید شده به HDL انتقال یافته سپس تحت تأثیر PON1 قرار بگیرند.^{۱۸} واضح است که درمان‌های دارویی و عوامل ژنتیکی می‌توانند بر فعالیت PON1 یا غلظت PON1 تأثیرگذار باشند.

با توجه به جدول ۱ تحت تأثیر درمان با لواستاتین تنها در صورتی که سوبسترا خود پاراکسون باشد، درمان باعث افزایش فعالیت PON1 می‌شود ($P=0/04$). این درحالی است که اگر فیل‌استات به‌عنوان سوبسترا مورد استفاده قرار گیرد تغییر در فعالیت به‌دنبال درمان در فعالیت آریل استرازی دیده نمی‌شود ($P=0/09$). با توجه به این‌که فعالیت پاراکسونازی با فعالیت آنزیم متناسب است و فعالیت آریل استرازی تقریباً غلظت پروتئین PON1 را نشان می‌دهد^{۱۹} می‌توان نتیجه‌گیری نمود که لواستاتین باعث افزایش فعالیت PON1 شده و این درحالی است که بر غلظت این پروتئین تأثیر کم‌تری داشته است. البته باید در نظر داشت که افزایش غلظت جزئی که در ApoA1 به‌دنبال درمان صورت گرفته است امکان دارد باعث تولید بیش‌تر پروتئین PON1 به‌دنبال درمان شده باشد. اما انتظار این بود که اگر مقدار پروتئین 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 پلاسماهای 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 ($P<0/05$) و افزایش ApoA1 علاوه بر افزایش فعالیت باعث نگره‌داری بیش‌تر پروتئین

پاراکسوناز ۱ با ذرات HDL می‌گردد. بنابراین افزایش فعالیت در ژنوتیپ LL نسبت به MM شاید ناشی از این مطلب باشد. در مطالعه‌ای که بر روی ژمفیروزیل صورت گرفته تأثیر 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 به دلیل 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 پروتئینی HDL قبلاً گزارش شده است.^{۲۲}

در مطالعه حاضر ارتباط بین افزایش غلظت ApoA1 و فعالیت پاراکسوناز ۱ 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 به دلیل 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 به دلیل تغییر اسیدهای چرب موجود در فسفولیپید این افراد به دلیل 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 تأثیر رژیم غذایی و دارویی می‌تواند دستخوش تغییر گردد. ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های پروتئین انتقال‌دهنده کلستریل‌استر (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 پاراکسوناز ۱ پاسخ متفاوتی به درمان با لواستاتین از خود نشان دهند که این پاسخ متفاوت با تغییر

همچنین لواستاتین بر فعالیت PON1 تاثیرگذار است و پلی مورفیسم L55M مربوط به PON1 نقش تعدیل کننده در تاثیر لواستاتین بر فعالیت پاراکسونازی در این مطالعه داشته اند. در ژنوتیپ هایی از پلی مورفیسم بررسی شده PON1 که نسبت اسید چرب غیر اشباع در ساختمان HDL بیش تر شده فعالیت پاراکسونازی PON1 نیز افزایش بیش تری نشان داده است.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی پلی مورفیسم های ژن پاراکسوناز ۱ با ترکیبات HDL در افراد با کلسترول بالا" مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد در سال ۱۳۸۸ به کد ۷۰۹ می باشد که با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد اجرا شده است.

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

در مطالعه حاضر دیده شده که افزایش اسیدهای چرب اشباع نشده در ساختمان HDL در ژنوتیپ های خاصی بوده است و در این ژنوتیپ با تغییر مشاهده شده فعالیت پاراکسونازی PON1 افزایش یافته است. دلیل این امر می تواند به مسایل متعددی مربوط باشد از جمله این که 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،۲۸} و از این طریق فعالیت پاراکسونازی را افزایش داده است. آل L از پلی مورفیسم L55M در افراد با LDL بالای ۱۳۰ میلی گرم در دسی لیتر فراوانی بیش تری دارد.

References

- Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation* 2006;113(21):2548-55.
- Joy T, Hegele RA. Is raising HDL a futile strategy for atheroprotection? *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(2):143-55.
- Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991;286(1-2):152-4.
- Khersonsky O, Tawfik DS. Structure-reactivity studies of serum paraonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry* 2005;44(16):6371-82.
- Oda MN, Bielicki JK, Ho TT, Berger T, Rubin EM, Forte TM. Paraonase 1 overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290(3):921-7.
- Deakin S, Leviev I, Guernier S, James RW. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(11):2083-9.
- Gouédard C, Koum-Besson N, Barouki R, Morel Y. Opposite regulation of the human paraonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol* 2003;63(4):945-56.
- Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. The role of paraonase 1 activity in cardiovascular disease: potential for therapeutic intervention. *Am J Cardiovasc Drugs* 2004;4(4):211-7.
- Karabina SA, Lehner AN, Frank E, Parthasarathy S, Santanam N. Oxidative inactivation of paraonase: implications in diabetes mellitus and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2005;1725(2):213-21.
- van Himbergen TM, Roest M, de Graaf J, Jansen EH, Hattori H, Kastelein JJ, et al. Indications that paraonase-1 contributes to plasma high density lipoprotein levels in familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 2005;46(3):445-51.
- 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;46(9):1888-95.
- 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.
- 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.
- Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 1986;27(1):114-20.
- Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1982. p. 76-85.
- Gradic M, Barisic K, Rumora L, Salamunic I, Tadijanovic M, Grubisic TZ, et al. Genetic frequencies of paraonase 1 gene polymorphisms in Croatian population. *Croat Chem Acta* 2008;81(1):105-111.
- 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.
- Moren X, Deakin S, Liu ML, Taskinen MR, James RW. HDL subfraction distribution of paraonase-1 and its relevance to enzyme activity and resistance to oxidative stress. *J Lipid Res* 2008;49(6):1246-53.
- 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.
- 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 paraonase activity in type IIb hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis* 1998;138(1):217-25.

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, Rahimpour 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.

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

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

Abstract

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.

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.

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