تاثیر پلی مورفیسم‌های ترکیبی Q/R192 پاراکسوناز ۱ و 5A/6A متالوپروتییناز ماتریکس ۳ بر روی بیماری عروق کرونری

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۰۵/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۰۹/۱۱

سودابه فلاح
اصغر قاسمی *
مرتضی سیفی
محسن فیروزرای

گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

زمینه و هدف: پلی مورفیسم‌های Q/R192 آنزیم پاراکسوناز ۱ (PON1) و 5A/6A آنزیم متالوپروتییناز ماتریکس ۳ (MMP3) ممکن است با استعدادپذیری با بیماری عروق کرونری (CAD) مرتبط باشند؛ جهت بررسی اهمیت این پلی‌مورفیسم‌ها در پاتوژنز بیماری عروق کرونری ما به مطالعه ارتباطی این پلی‌مورفیسم‌ها با CAD و تعداد رگ‌های بیمار در بیماران مبتلا به CAD پرداختیم. ***روش بررسی:*** پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های PON1 و MMP3 را با روش PCR و Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) در مبتلایان به CAD مطالعه کردیم. این پلی‌مورفیسم‌ها در ۱۲۹ بیمار مبتلا به CAD و ۱۱۵ نفر کنترل که تحت آنژیوگرافی عروق کرونری قرار گرفتند تعیین گردیدند. CAD به‌صورت وجود گرفتگی ۵۰٪ < در حداقل یکی از عروق کرونری اصلی مشخص گردید و افراد با گرفتگی بیش از ۱۰ درصد به‌عنوان کنترل عمل نمودند. ***یافته‌ها:*** فراوانی ژنوتیپ‌های PON1 192RR و MMP3 6A/6A در گروه بیماران مبتلا به CAD در مقایسه با افراد کنترل بیشتر بود (به‌ترتیب $p<0/05$ و $p<0/001$) و ژنوتیپ ترکیبی RR/6A6A در افراد مبتلا به CAD از فراوانی بالایی در مقایسه با افرادی که نه ژنوتیپ MMP3 6A/6A و نه ژنوتیپ PON1 RR را داشتند برخوردار بود ($p<0/001$) و در نهایت در مطالعه ارتباط ژنوتیپ‌ها با شدت بیماری، توزیع ژنوتیپ‌های PON1 192 و MMP3 5A/6A با تعداد رگ‌های بیمار مرتبط نشد ($p>0/05$). ***نتیجه‌گیری:*** پلی‌مورفیسم‌های ترکیبی PON1 192 و MMP3 5A/6A با بیماری CAD مرتبط می‌باشند اما تاثیری بر روی تعداد رگ‌های بیمار ندارند.

کلمات کلیدی: بیماری عروق کرونر، متالوپروتییناز، پلی‌مورفیسم.

* نویسنده مسئول: گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، کد پستی: ۱۴۴۹۶۱۴۵۲۵
تلفن: ۰۹۱۴-۴۰۸۱۰۹۴
email: aghasemi2009@yahoo.com

مقدمه

آنزیم‌های پاراکسوناز ۱ (PON1) و متالوپروتییناز‌های ماتریکس (MMPs) در استرس اکسیداتیو دخیل گزارش گردیده‌اند.[۱و۲] PON1 یک استراز وابسته به کلسیم است که پس از ساخت در کبد، در پلاسما به High Density Lipoprotein (HDL) متصل می‌شود.[۳] مشخص شده که این آنزیم از طریق هیدرولیز پراکسیدهای لیپیدی که مانع از تغییرات اکسیداتیو Low Density Lipoprotein (LDL) می‌شود به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند[۴] و با توجه به این‌که پراکسیداسیون LDL و پاسخ‌های التهابی ثانویه مراحل کلیدی در شروع آتروژنزیس می‌باشند بنابراین به‌نظر می‌رسد که PON1 مسئول حداقل بخشی از ویژگی‌های محافظتی HDL در بیماری‌های عروق کرونری مثل آتروسکلروزیس باشد.[۵] دو پلی‌مورفیسم شایع در منطقه کدکننده ژن PON1 که منجر به جایگزینی آرژینین (R) به جای گلوتامین (Q) در موقعیت ۱۹۲ (Gln/Arg192 یا Q/R192) و جایگزینی متیونین (M) به‌جای لوسین (L) در موقعیت ۵۵ (Leu/Met 55 یا L/M 55) می‌شود به‌طور مستقل بر روی فعالیت آنزیمی اثرگذار بوده به‌عنوان بخشی از اساس ملکولی تفاوت فعالیت آنزیم در افراد مختلف شناخته شده است.[۶و۷] مشخص شده است که آلوزیم PON1R به‌علت توانایی پایین خود در هیدرولیز پراکسیدهای لیپیدی کارایی کمتری در محافظت از اکسیداسیون LDL دارد.[۸و۹] بنابراین پیشنهاد شده است که آلل R می‌تواند یک فاکتور خطرزای ژنتیکی برای توسعه این بیماری‌ها باشد. MMP و افزایش استرس اکسیداتیو به‌عنوان عوامل مهمی در بروز آتروسکلروزیس مطرح گردیده‌اند.[۱۰] متالو پروتییناز‌های ماتریکس خانواده‌ای از بیش از ۲۰ آندوپپتیداز هستند که جهت تجزیه اجزای ماتریکس خارج سلولی (ECM) مثل کلاژن و الاستین و همچنین بسیاری از پروتیین‌های دخیل در

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-05]

آنژیوزنز، مهاجرت سلولی، رشد و مرگ سلولی ضروری هستند.[۱۲و۱۱] پنج کلاس از این آنزیم‌ها وجود دارد: کلاژنازها، ژلاتینازها، استرومولیزین‌ها، MMPهای تیپ غشایی (membrane type MMP) و چند MMP اخیراً شناخته شده دیگر.[۱۴و۱۳] استرومولیزین-۱ (MMP3) خانواده کلیدی MMPها است که باعث تجزیه ژلاتین، فیبرونکتین، لامینین وکلاژن تیپ IV می‌شود.[۱۶و۱۵] پلی‌مورفیسم شایع 5A/6A -1612 در منطقه پروموتر ژن MMP3 به‌ویژه در بیماری آتروسکلروزیس مطرح شده است.[۱۷] از آنجا که فاکتورهای ژنتیکی مختلفی در استعدادپذیری به CAD مرتبط گزارش گردیده‌اند بنابراین جهت پیشگویی دقیق‌تر ارتباط فاکتورهای خطرزای ژنتیکی با CAD، مطالعه همزمان پلی مورفیسم‌های متعدد دخیل در بروز این بیماری‌ها به‌جای مطالعه تغییرات ژنتیکی واحد ضروری به‌نظر می‌رسد و جهت نیل به این هدف ما تاثیر همزمان پلی مورفیسم‌های ترکیبی Q/R192 آنزیم پاراکسوناز ۱ (PON1) و 5A/6A متالوپروتیینازماتریس-۳ (MMP3) را بر روی بیماری عروق کرونری مورد مطالعه قرار دادیم.

روش بررسی

در این مطالعه که به‌روش مورد- شاهدی (case-control) بین سال‌های ۸۸-۱۳۸۶ در بخش بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام گرفت ۲۴۴ نفر افراد ایرانی مراجعه کننده به بیمارستان شهید رجایی تهران بررسی و رضایت‌نامه کتبی مبنی بر نمونه‌گیری اخذ گردید. افراد مورد مطالعه شامل دو گروه کنترل و بیمار بودند. گروه کنترل ۱۱۵ نفری (۶۲ نفر مرد و ۵۳ نفر زن؛ متوسط سن: ۹/۶۴±۵۳/۴۵) بخشی از جامعه مورد پژوهش را تشکیل دادند که عدم گرفتگی عروق کرونری آنها توسط پزشک متخصص قلب تایید شد. افراد مبتلا به بیماری‌های دیابت، کبد، کلیه، افراد الکلی و بیماران با سابقه چربی و فشار خون بالا و همچنین افرادی که با حشره‌کش‌ها کار می‌کردند از این گروه حذف شدند. گروه بیمار ۱۲۹ نفری (۸۹ نفر مرد و ۴۰ نفر زن؛ متوسط سن: ۹/۳۵±۵۸/۶۱) بخشی دیگر از جامعه مورد پژوهش بودند که گرفتگی عروق کرونری آنها توسط متخصص قلب تایید شده بود (تنگی بیش از ۵۰٪). این افراد به سه گروه تقسیم شدند بیماران با گرفتگی یکی از رگ‌های عروق کرونری (SVD)، بیماران با گرفتگی دو تا از رگ‌های عروق کرونری (2VD) و بیماران با گرفتگی سه تا از رگ‌های عروق کرونری (3VD). از این گروه آنهایی که تحت درمان نبوده و فشار خون بالایی داشتند حذف گردیدند. DNA ژنومیک از لکوسیت‌های خون محیطی به روش salting out استخراج گردید.[۱۸] در مورد ژن PON1 قطعه هدف ۹۹ جفت بازی (99bp) با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز Polymerase Chain Reaction (PCR) و با به‌کارگیری پرایمرهای forward5'-TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G-3' و revers 5'-CAC GCT AAACCC AAA TAC ATC TC 3'[۱۹](شرکت زیست فناوری کوثر، تهران) تکثیر یافت. محصولات PCR با ۸U از آنزیم محدودگر A1w1 (New England Biolabs) به‌صورت شبانه (۱۶ ساعت) هضم شده از طریق الکتروفورز آگاروز ۳٪ و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید (شرکت ندای فن، تهران) محصولات هضم شده جدا شدند. قطعه ۹۹ جفت بازی (99bp) مربوط به آلل Q192 به‌صورت هموزیگوت، قطعات ۳۵ و ۶۴ جفت بازی (35bp, 64bp) مربوط به آلل R192 به‌صورت هموزیگوت و قطعات ۹۹، ۳۵، ۶۴ جفت بازی (99bp, 35bp, 64bp) مربوط به آلل R و Q192 به‌صورت هتروزیگوت بودند. قطعه هدف ۱۲۰ جفت بازی (120bp) ژن MMP3 با استفاده از پرایمرهای forward 5'-GAT TAC AGA CAT GGG TCA CA-3' و revers 5'-TTT CAA TCA GGA CAA GAC GAA GTT T-3'[۲۰] (شرکت زیست فناوری کوثر، تهران) تکثیر شد. محصولات PCR پس از هضم با آنزیم محدودگر Xmn۱ (New England Biolabs) از طریق الکتروفورز آگاروز ۳٪ و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید جدا شدند. آلل 5A توسط آنزیم به دو قطعه ۹۷ و ۲۳ جفت بازی (23bp, 97bp) تجزیه می‌شد در حالی‌که آلل 6A به‌صورت قطعه ۱۲۰ جفت بازی (120bp) دست نخورده باقی می‌ماند. در مقایسه سن، BMI و پروفایل لیپیدی در دو گروه بیمار و کنترل از Student's t- test استفاده شد. فراوانی‌های ژنوتیپی در دو گروه از طریق آزمون χ^2 با هم مقایسه گردید. برای تعیین تعادل هاردی- وینبرگ و ارتباط نسبی ژنوتیپ-های PON1 و MMP3 با شدت گرفتگی عروق کرونری از آزمون χ^2 استفاده شد. مقدار $p<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. اطلاعات کمّی به‌صورت میانگین± انحراف معیار بیان گردید و تحلیل‌های آماری با نرم‌افزار SPPS ویراست ۱۴ انجام گرفتند.

یافته‌ها

در مورد پارامترهای سن‌و جنس و سطح LDL-C اختلاف معنی‌داری

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-05]

جدول-۱: ویژگی‌های جمعیتی مورد مطالعه

ویژگی	گروه کنترل	گروه بیمار	p*
سن (سال)	۵۳/۴۵±۹/۶۴	۵۸/۶۱±۹/۳۵	۰/۰۰۱
جنس (مرد/ زن)	(۵۳/۶۲)	(۴۰/۸۹)	۰/۰۱۸
BMI (kg/m)	۲۷/۸۸±۴/۰۹	۲۶/۱۱±۴/۳۶	۰/۱۸۶
SBP (mm hg)	۱۲/۳۳±۱/۴۳	۱۲/۳۲±۱/۳۷	۰/۹۸۳
DBP (mm hg)	۷/۸۶±۰/۹۹	۷/۸۳±۰/۴۴	۰/۸۸۴
کلسترول (mg/dl)	۱۷۹/۲۷±۳۹/۷۱	۱۷۱/۱۲±۳۵/۸۸	۰/۱۷۳
تری گلسیرید (mg/dl)	۱۵۷/۷۴±۶۷/۴۷	۱۴۶/۴۱±۶۳/۸۸	۰/۲۷۷
HDL (mg/dl)	۳۸/۲۵±۸/۸۳	۳۹/۵۴±۹/۰۹	۰/۳۷۰
LDL-C (mg/dl)	۱۰۰/۷۳±۲۵/۵۷	۹۳/۱۰±۲۲/۷۳	۰/۰۴۷
VLDL-C (mg/dl)	۴۴/۰۰±۲۳/۶۷	۳۹/۲۹±۲۰/۳۰	۰/۱۷۴

تمام اطلاعات به‌صورت میانگین± انحراف معیار بیان شده‌اند. * مقایسه متغیرهای کمی بین دو گروه از طریق آزمون χ^2 ارزیابی و p<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار محسوب گردید.

BMI: Body Mass Index, SBP: Systole Blood Pressure, DBP: Diastole Blood Pressure, HDL-C: High Density Lipoprotein-Cholesterol, VLDL-C: Very Low Density Lipoprotein-Cholesterol, LDL-C: low density lipoprotein- cholesterol

جدول-۲: توزیع ژنوتیپی PON1 192 و MMP3 در دو گروه بیمار و کنترل

ژنوتیپ‌ها	بیمار (n%)	کنترل (n%)	p*
QQ	۳۷(٪۲۸/۷)	۵۳(٪۴۶/۱)	<۰/۰۵
QR	۶۵(٪۵۰/۴)	۴۹(٪۴۲/۶)	
RR	۲۷(٪۲۰/۹)	۱۳(٪۱۱/۳)	
6A/6A	۹۸(٪۷۶)	۷۷(٪۶۶/۹)	<۰/۰۰۱
6A/5A	۲۶(٪۲۰/۱)	۲۷(٪۲۳/۴)	
5A/5A	۵(٪۳/۹)	۱۱(٪۹/۶)	

RR, QR, QQ ژنوتیپ‌های مربوط به PON1 و 5A/5A, 6A/6A, 6A/6A ژنوتیپ‌های مربوط به MMP3 هستند.* فراوانی ژنوتیپ‌ها بین دو گروه بیمار و کنترل با آزمون χ^2 ارزیابی شد و p<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار محسوب گردید.

بین دو گروه بیمار و کنترل وجود داشت (جدول ۱). فراوانی ژنوتیپ‌های هم PON1 و هم MMP3 در دو گروه بیمار و کنترل از نظر آماری متفاوت بودند (جدول ۲). در حالی‌که ژنوتیپ‌های QQ (p<۰/۰۵) و 5A5A (p<۰/۰۰۱) در گروه کنترل فراوانی بالایی داشتند در گروه بیمار ژنوتیپ‌های RR و 6A6A از فراوانی بالایی برخوردار بودند. تعادل‌های هاردی واینبرگ (Hadry-weinberg) در توزیع ژنوتیپی برقرار بود (p=۰/۹۸ و χ^2=۰/۰۲). همان‌طور که در جدول ۳ ملاحظه می‌گردد اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های Q/R192 و 5A6A و شدت گرفتگی عروق کرونری مشاهده نگردید (p>۰/۰۵). وقتی ژنوتیپ‌های ترکیبی بین دو گروه بیمار و کنترل مقایسه گردید تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشاهده گردید که به‌ویژه در این میان می‌توان به فراوانی بالای ژنوتیپ RR/6A6A (p<۰/۰۰۱) در گروه بیمار و فراوانی بالای ژنوتیپ QQ/5A5A (p<۰/۰۰۱) در گروه کنترل اشاره

جدول-۳: ارتباط ژنوتیپ‌های Q/R192 و 5A6A با شدت گرفتگی عروق کرونری

ژنوتیپ	SVD (n%)	2VD (n%)	3VD (n%)
QQ	۱۷(٪۳۴)	۷(٪۲۳/۳)	۱۴(٪۲۸/۶)
QR	۲۲(٪۴۴)	۲۰(٪۶۶/۷)	۲۲(٪۴۴/۹)
RR	۱۱(٪۲۲)	۳(٪۱۰)	۱۳(٪۲۶/۵)
6A/6A	۲۵(٪۶۹/۵)	۲۵(٪۷۱/۵)	۴۷(٪۸۱)
5A/6A	۸ (٪۲۲/۲)	۸(٪۲۲/۸)	۹(٪۱۵/۵)
5A/5A	۳(٪۸/۳)	۲(٪۵/۷)	۲(٪۳/۵)

3VD: Triple Vessel Disease ،2VD: Double Vessel Disease ،SVD: Single Vessel Disease

جدول-۴: فراوانی ژنوتیپ‌های ترکیبی PON1 192/MMP3 در گروه بیمار و کنترل

ژنوتیپ‌ها	کنترل (n%)	بیمار (n%)	p*
QQ/5A5A	٪۸۱	٪۱۹	<۰/۰۰۱
QR/5A5A	٪۷۰	٪۳۰	<۰/۰۵
QR/5A6A	٪۵۸	٪۴۲	<۰/۰۵
QR/6A6A	٪۳۲	٪۶۸	<۰/۰۵
RR/6A6A	٪۲۱	٪۷۹	<۰/۰۰۱

* ژنوتیپ‌های ترکیبی بین دو گروه بیمار و کنترل با آزمون χ^2 از نظر آماری معنی‌دار بودند. ژنوتیپ‌های ترکیبی RR/6A6A در گروه بیماران (p<۰/۰۰۱) و QQ/5A5A در گروه کنترل (p<۰/۰۰۱) به‌طور قابل ملاحظه‌ای فراوانی بالایی داشتند.

کرد (جدول ۴). ارتباط نسبی ژنوتیپ‌های PON1 و MMP3 با شدت گرفتگی عروق کرونری از طریق آزمون χ^2 تعیین و p<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

بحث

در مطالعه حاضر ژنوتیپ‌های PON1 RR و MMP3 6A6A به‌طور مستقل و ترکیبی RR/6A6A در گروه بیماران و ژنوتیپ‌های PON1 QQ و MMP3 5A5A به‌طور مستقل و ترکیبی QQ/5A5A در گروه کنترل از فراوانی بالایی برخوردار بودند و ژنوتیپ‌های RR آنزیم PON1 و 6A/6A آنزیم MMP3 هم به‌صورت مستقل و هم به‌صورت ترکیبی RR/6A6A به‌عنوان فاکتورهای خطرزای ژنتیکی برای گرفتگی عروق کرونری مطرح گردیدند. فعالیت PON1 بین افراد مختلف به‌میزان ۴۰-۱۰ مرتبه متغیر است و جایگزینی Gln (Q) با Arg (R) در موقعیت ۱۹۲ این آنزیم که به‌طور مستقل بر روی فعالیت آنزیم تاثیر می‌گذارد به‌عنوان بخشی از اساس مولکولی تغییر فعالیت این آنزیم شناخته شده است. قبلاً مشخص گردیده بود که آلوآنزیم R در ممانعت از اکسیداسیون LDL نسبت به آلوآنزیم Q کارایی کمتری دارد[۸،۹] و همین یافته می‌تواند دلیل احتمالی فراوانی بالای ژنوتیپ RR در گروه

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-05]

بیماران مطالعه حاضر باشد. این یافته با برخی از مطالعات که بر روی جمعیت‌ها و بیماری‌های مختلف قلبی–عروقی انجام گرفتند همخوانی دارد؛ به‌طوری که از مقایسه ۸۱ بیمار دچار سکته قلبی با ۲۵۵۳ کنترل مشخص شد که PON1R یک فاکتور مستقل برای سکته قلبی است.[۲۱] به‌طور مشابه از مقایسه ۱۳۹ بیمار مبتلا به CAD با ۱۱۹ کنترل، ژنوتیپ RR نه تنها به‌عنوان یک فاکتور خطرزا برای CAD معرفی گردید بلکه با شدت گرفتگی عروق کرونری هم مرتبط دانسته شد.[۲۲] در این دو مطالعه همانند مطالعه حاضر بالاترین درصد فراوانی ژنوتیپ‌های PON1 در گروه کنترل و بیماران به‌ترتیب Q/Q و Q/R بود. به هر حال در مطالعه Pasdar که در آن ۳۹۷ بیمار دچار سکته قلبی با ۴۰۰ نفر کنترل مقایسه گردید تفاوت معنی‌داری در ژنوتیپ‌های PON1 مشاهده نشده و پلی‌مورفیسم Q/R192 به‌عنوان یک فاکتور خطرزا برای CAD رد گردید[۲۳] و در نهایت در مطالعه‌ای که اخیراً توسط Flekac به‌منظور بررسی مقایسه‌ای فراوانی پلی مورفیسم Q/R192 در دو گروه بیماران مبتلا به دیابت (تعدادی از آن‌ها دچار عوارض عروقی بوده‌اند) و کنترل انجام گرفته است تفاوت معنی‌داری در فراوانی پلی مورفیسم مربوطه مشاهده گردیده است[۲۴] اما برخلاف مطالعه حاضر که ژنوتیپ RR فراوانی بالایی در گروه بیماران داشت در این مطالعه فراوانی بالای ژنوتیپ RR در گروه کنترل گزارش گردیده است. در بحث نتایج ضد و نقیض در بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های PON1 با بیماری CAD اولین نکته‌ای که به‌نظر می‌رسد تفاوت در شرایط انتخاب جمعیت‌های مورد مطالعه و طراحی مطالعات مورد– شاهد است، هرچند که تفاوت‌های نژادی را هم در توزیع ژنوتیپ‌های PON1 نباید نادیده گرفت.[۲۵] در حالت کلی ژنوتیپ R/R نسبت به ژنوتیپ Q/Q فعالیت پاراکسونازی بیشتری دارد[۲۶] اما در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی همیشه همسان با فعالیت آنزیمی و ژنوتیپ‌های مختلف این آنزیم نیست. با این‌که قبلاً مشخص شده بود که ژنوتیپ R/R توانایی کمتری در هیدرولیز پراکسیدهای لیپیدی LDL دارد[۸و۹] و در مطالعه حاضر و برخی دیگر از مطالعات دلیل فراوانی بالای ژنوتیپ R/R در گروه بیماران همین مسئله عنوان می‌شود[۲۲و۲۷] ولی اخیراً در یکی از مطالعات مشخص شده است که چون آنزیم PON1 Q192 نسبت به آلو آنزیم R به‌میزان سه برابر تمایل کمتری در اتصال به HDL دارد در نتیجه از پایداری و فعالیت لاکتونازی کمتری برخوردار است[۲۸] و با توجه به این‌که قبلا در یکی از مطالعات آزمایشگاهی مشخص شده بود که نقص فعالیت لاکتونازی PON1 توانایی این آنزیم را در محافظت از اکسیداسیون LDL کاهش می‌دهد[۲۹] یکی از مطالعات اخیر یافته خود را که در آن ژنوتیپ R/R فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی داشت تکمیل‌کننده این مطالعات معرفی می‌کند.[۳۰] مرور این مطالعات یک نکته اساسی را مطرح می‌کند و آن این‌که برخلاف مطالعات نسبتا گسترده، مکانیسم فعالیت آنتی‌اکسیدانی و به‌ویژه این‌که کدام‌یک از ژنوتیپ‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد هنوز کاملاً مشخص نشده است و همین مسئله می‌تواند یکی دیگر از دلایل وجود فراوانی‌های مختلف ژنوتیپ‌های PON1 در مطالعات مختلف باشد. Beyzad در مطالعه‌ای بیان کرد که ژنوتیپ 6A6A به‌طور قابل ملاحظه‌ای با گرفتگی عروق کرونری مرتبط می‌باشد.[۳۱] این یافته مطابق با مطالعه ما و چند مطالعه پیشین است که نشان دادند ژنوتیپ 6A/6A در مقایسه با ژنوتیپ‌های 5A5A و 5A6A خطر ابتلا به گرفتگی عروق کرونری را افزایش می‌دهد.[۳۲و۳۳] با این حال در مطالعه مورد– شاهدی که بر روی ۲۰۴ نفر مبتلا به CAD و ۲۶۷ نفر کنترل سالم صورت گرفت ارتباطی بین ژنوتیپ 5A6A و گرفتگی عروق کرونری مشاهده نشد[۳۴] و در تنها مطالعه‌ای که به‌منظور بررسی پلی مورفیسم ترکیبی PON1 192 و 5A6A MMP3 انجام گرفت این پلی مورفیسم‌ها به‌عنوان فاکتور خطرزا برای CAD معرفی گردیدند اما برخلاف مطالعه حاضر که در آن فراوانی ژنوتیپ 6A6A در گروه بیماران مبتلا به گرفتگی عروق کرونری بالا بود در این مطالعه فراوانی ژنوتیپ 5A5A آن‌هم در گروه بیماران مبتلا به انفارکتوس میوکارد گزارش گردید.[۲۲] در تفسیر این یافته‌ها و دلیل وجود تشابهات و تفاوت‌ها باید به مکانیسم تشکیل زخم‌های آتروسکلروتیک اشاره کرد. اجزای اصلی تشکیل‌دهنده زخم‌های آتروسکلروتیک پروتیین‌های ماتریکس (کلاژن‌ها، الاستین، پروتئوگلیکان‌ها و غیره)، سلول‌های عضلانی صاف، ماکروفاژها و لیپیدها می‌باشند.[۳۵] سهم نسبی این اجزا در تشکیل پلاک‌های مختلف متفاوت می‌باشد. پلاک‌هایی که سرشار از لیپید وماکروفاژ هستند پلاک‌های غنی از لیپید (lipid rich plaques) و پلاک‌هایی که سرشار از پروتیین‌های ماتریکس و سلول‌های عضلانی صاف می‌باشند پلاک‌های فیبروتیک (fibrotic plaques) نامیده می‌شوند. پلاک‌های غنی از لیپید که کوچک‌تر بوده و مستعد پارگی هستند در انفارکتوس میوکارد دخیل دانسته شده‌اند، در حالی‌که

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-05]

پلاک‌های فیبروتیک بسیار پایدار و حجیم می‌باشند.[۳۶و۳۷] از آنجایی‌که MMP3 نقش مهمی در تجزیه پروتیین‌های ماتریکس در زخم‌های آتروسکلروتیک دارد و با توجه به این‌که بروز ژن MMP در بافت‌های عروقی حاملین ژنوتیپ 5A5A در مقایسه با حاملین ژنوتیپ 6A6A بیشتر است[۳۸] بنابراین دلیل احتمالی این یافته که چرا ژنوتیپ 6A6A با افزایش خطر گرفتگی عروق کرونری و ژنوتیپ 5A5A با ابتلا به انفارکتوس میوکارد همراه هستند این است که حاملین ژنوتیپ‌های 6A6A به‌دلیل بروز پایین ژن MMP3 تمایل به گسترش پلاک‌های آتروسکلروتیک را دارند که غنی از پروتیین‌های ماتریکس بوده نسبتاً بزرگ و پایدار می‌باشند (پلاک‌های فیبروتیک) در حالی‌که حاملین ژنوتیپ‌های 5A5A به‌دلیل بروز بالای ژن MMP3 تمایل به گسترش پلاک‌های غنی از لیپید و ماکروفاژها را دارند که کوچک‌تر بوده و تمایل به پارگی دارند. این فرضیه با مطالعه‌ای که بر روی موش‌های فاقد ژن MMP3 انجام گرفت همخوانی دارد.[۳۹] در این مطالعه مشخص گردید که غیر فعال شدن ژن MMP3 در موش‌های فاقد آپوپروتیین E (Apo E) منجر به افزایش اندازه پلاک‌های آتروسکلرو-تیک و همچنین میزان پروتیین ماتریکس موجود در زخم می‌شود. در این مطالعه همچنین مشخص شد که پلی‌مورفیسم Q/R192 و MMP3 5A6A بدون در نظر گرفتن سایر فاکتورهای خطرزا با شدت گرفتگی عروق کرونری مرتبط نیست. در تفسیر این یافته این نکته باید مد نظر قرار گیرد که پلی‌مورفیسم‌ها تنها بخشی از تغییر فعالیت آنزیم PON1 و MMP3 را تشکیل می‌دهند و فعالیت این آنزیم‌ها علاوه بر فاکتورهای ژنتیکی تحت تاثیر فاکتورهای اکتسابی و محیطی مثل تغذیه، سبک زندگی (مصرف سیگار و الکل و غیره)، مواد شیمیایی محیطی، سن و جنس و فاکتورهای متعدد دیگر قرار می‌گیرد[۴۰و۴۱] و علاوه براین آتروسکلروزیس یک بیماری با علل و عوامل مختلف ژنتیکی و اکتسابی است که به‌صورت بسیار پیچیده تحت تاثیر این عوامل بروز می‌نماید.[۴۲] در این بررسی یک عامل به‌صورت دو مورد از پلی‌مورفیسم‌های ژن دخیل در بروز این بیماری مورد مطالعه قرار گرفت که فقط یک فاکتور از بین ده‌ها فاکتور دخیل در این بیماری می‌باشد، بنابراین با توجه به این‌که علل و عوامل مختلفی در بروز و شدت این بیماری وجود دارد احتمال می‌رود که علی‌رغم این‌که ژنوتیپ‌های PON1RR و MMP3 5A6A در مطالعه ما به‌عنوان یک فاکتور خطرزا برای بروز بیماری گرفتگی عروق کرونری می‌باشند اما در شدت بیماری احتمالاً علل و عواملی مهم‌تر از این پلی‌مورفیسم‌ها دخالت دارند. در مطالعه حاضر همان‌طور که در مبحث نتایج نشان داده شد در دو گروه مورد مطالعه فقط سن و جنس و سطح LDL-C با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند. با بررسی پرونده بیماران مشخص شد که این افراد از داروهای کاهنده لیپید و فشار خون استفاده می‌کردند و به‌نظر می‌رسد که علت کاهش سطح LDL-C و سایر فاکتورهای مرتبط با پروفایل لیپیدی در این گروه مصرف چنین داروهایی باشد. در مجموع در این مطالعه مشخص گردید که با این‌که یک اختلاف معنی‌دار بین فراوانی پلی‌مورفیسم‌های PON1 Q/R192 و MMP3 5A6A بین دو گروه بیماران مبتلا به گرفتگی عروق کرونری و افراد کنترل وجود دارد و فراوانی ژنوتیپ RR و 6A6A هم به‌صورت مستقل و هم به‌صورت ترکیبی RR/6A6A در گروه بیماران بیشتر می‌باشد اما این ژنوتیپ‌ها با شدت بیماری مرتبط نمی‌باشند. بنابراین اگرچه می‌توانیم پلی‌مورفیسم‌های PON1 Q/R192 و MMP3 5A6A را به‌عنوان فاکتورهای خطرزای ژنتیکی برای بیماری گرفتگی عروق کرونری مطرح کنیم اما در شدت بیماری احتمالاً عوامل مهمتری از این پلی‌مورفیسم‌ها دخالت دارند. از محدودیت‌های این پژوهش می‌توان به تعداد نمونه‌های نسبتاً کم جهت حصول نتایج قطعی‌تر و فقدان فعالیت آنزیمی به‌ویژه در پیشگویی ارتباط این پلی‌مورفیسم‌ها با شدت گرفتگی عروق کرونری اشاره کرد. *سپاسگزاری:* این طرح با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شده و نویسندگان تشکر خود را نسبت به آن معاونت اعلام می‌دارند.

References

1. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991;286(1-2):152-4.
2. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280(1):C53-60.
3. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1996;7(2):69-76.
4. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 1993;104(1-2):129-35.
5. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998;101(8):1581-90.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-05]

6. Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 1993;52(3):598-608.
7. Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanché H, Passa P, Froguel P, et al. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest* 1997;99(1):62-6.
8. Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Durrington PN. Alloenzymes of paraoxonase and effectiveness of high-density lipoproteins in protecting low-density lipoprotein against lipid peroxidation. *Lancet* 1997;349(9055):851-2.
9. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, et al. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation* 2000;101(21):2510-7.
10. Kameda K, Matsunaga T, Abe N, Hanada H, Ishizaka H, Ono H, et al. Correlation of oxidative stress with activity of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease. Possible role for left ventricular remodelling. *Eur Heart J* 2003;24(24):2180-5.
11. Zucker S, Hymowitz M, Conner C, Zarrabi HM, Hurewitz AN, Matrisian L, et al. Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:212-27.
12. Gottschall PE, Deb S. Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons. *Neuroimmunomodulation* 1996;3(2-3):69-75.
13. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274(31):21491-4.
14. Verstappen J, Von den Hoff JW. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res* 2006;85(12):1074-84.
15. Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, Foster K, Hembry R, Murphy G, et al. Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(18):8154-8.
16. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;5(8):2145-54.
17. Newby AC, Johnson JL. Genetic strategies to elucidate the roles of matrix metalloproteinases in atherosclerotic plaque growth and stability. *Circ Res* 2005;97(10):958-60.
18. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215.
19. Aynacioglu AS, Kepekci Y. The human paraoxonase Gln-Argl92 (Q/R) polymorphism in turkish patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2000;74(1):33-7.
20. Oceandy D, Yusoff R, Baudoin FM, Neyses L, Ray SG. Promoter polymorphism of the matrix metalloproteinase 3 gene is associated with regurgitation and left ventricular remodelling in mitral valve prolapse patients. *Eur J Heart Fail* 2007;9(10):1010-7.
21. Ranade K, Kirchgessner TG, Iakoubova OA, Devlin JJ, DelMonte T, Vishnupad P, et al. Evaluation of the paraoxonases as candidate genes for stroke: Gln192Arg polymorphism in the paraoxonase 1 gene is associated with increased risk of stroke. *Stroke* 2005;36(11):2346-50.
22. Ozkök E, Aydin M, Babalik E, Ozbek Z, Ince N, Kara I. Combined impact of matrix metalloproteinase-3 and paraoxonase 1 55/192 gene variants on coronary artery disease in Turkish patients. *Med Sci Monit* 2008;14(10):CR536-42.
23. Pasdar A, Ross-Adams H, Cumming A, Cheung J, Whalley L, St Clair D, et al. Paraoxonase gene polymorphisms and haplotype analysis in a stroke population. *BMC Med Genet* 2006;7:28.
24. Flekac M, Skrha J, Zídková K, Lacinová Z, Hilgertová J. Paraoxonase 1 gene polymorphisms and enzyme activities in diabetes mellitus. *Physiol Res* 2008;57(5):717-26.
25. Koda Y, Tachida H, Soejima M, Takenaka O, Kimura H. Population differences in DNA sequence variation and linkage disequilibrium at the PON1 gene. *Ann Hum Genet* 2004;68(Pt 2):110-9.
26. Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet* 1996;14(3):334-6.
27. Irace C, Cortese C, Fiaschi E, Scavelli F, Liberatoscioli L, Federici G, et al. The influence of PON1 192 polymorphism on endothelial function in diabetic subjects with or without hypertension. *Hypertens Res* 2008;31(3):507-13.
28. Gaidukov L, Rosenblat M, Aviram M, Tawfik DS. The 192R/Q polymorphs of serum paraoxonase PON1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux. *J Lipid Res* 2006;47(11):2492-502.
29. Khersonsky O, Tawfik DS. The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases. *J Biol Chem* 2006;281(11):7649-56.
30. Bhattacharyya T, Nicholls SJ, Topol EJ, Zhang R, Yang X, Schmitt D, et al. Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. *JAMA* 2008;299(11):1265-76.
31. Beyzade S, Zhang S, Wong YK, Day IN, Eriksson P, Ye S. Influences of matrix metalloproteinase-3 gene variation on extent of coronary atherosclerosis and risk of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(12):2130-7.
32. Schwarz A, Haberbosch W, Tillmanns H, Gardemann A. The stromelysin-1 5A/6A promoter polymorphism is a disease marker for the extent of coronary heart disease. *Dis Markers* 2002;18(3):121-8.
33. Hirashiki A, Yamada Y, Murase Y, Suzuki Y, Kataoka H, Morimoto Y, et al. Association of gene polymorphisms with coronary artery disease in low- or high-risk subjects defined by conventional risk factors. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:1429-37.
34. Hoppmann P, Koch W, Schömig A, Kastrati A. The 5A/6A polymorphism of the stromelysin-1 gene and restenosis after percutaneous coronary interventions. *Eur Heart J* 2004;25(4):335-41.
35. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362(6423):801-9.
36. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995;91(11):2844-50.
37. Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation* 1996;94(8):2013-20.
38. Ye S, Eriksson P, Hamsten A. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem* 1996; 271:13055–60.
39. Silence J, Lupu F, Collen D, Lijnen HR. Persistence of atherosclerotic plaque but reduced aneurysm formation in mice with stromelysin-1 (MMP-3) gene inactivation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(9):1440-5.
40. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol* 2005;69(4):541-50.
41. Ichihara S, Noda A, Nagata K, Obata K, Xu J, Ichihara G, et al. Pravastatin increases survival and suppresses an increase in myocardial matrix metalloproteinase activity in a rat model of heart failure. *Cardiovasc Res* 2006;69(3):726-35.
42. Lusis AJ, Mar R, Pajukanta P. Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004;5:189-218.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-05]

Tehran University Medical Journal; Vol. 67, No. 11, Feb 2010: 759-765

The impact of combined paraoxonase1 Q/R 192 and 5A6A matrix metalloproteinase-3 polymorphisms on coronary artery disease

Fallah S.
Ghasemi A.*
Seifi M.
Firoozrai M.

Department of Biochemistry, School of Medicine

Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: August 22, 2009 Accepted: December 02, 2009

Abstract

Background: It has been suggested that Q/R 192 polymorphism of paraoxonase1 (PON1) and 5A/6A polymorphism of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) might be associated with the predisposition to coronary artery disease (CAD). Therefore to investigate the significance of these polymorphisms in the pathogenesis of CAD we performed an association study of the polymorphisms with CAD and the number of diseased vessels in patients with CAD.

Methods: We studied the human PON1 and MMP3 gene polymorphisms in patients with CAD by polymerase chain reaction/ restriction fragment length polymorphism (PCR/RFLP). These polymorphisms were determined in 129 CAD patients and 115 control subjects who underwent coronary angiography. CAD was defined as the presence of one or more stenoses>50% in at least one major coronary artery and subjects with <10% stenosis served as controls.

Results: The frequencies of the PON1 192 RR genotype and MMP-3 6A6A genotype were increased among CAD patients compared with controls ($p<0.05$ and $p<0.001$ respectively). The combined genotypes of RR/6A6A had significantly higher frequency in the CAD patients compared with subjects who possess neither the MMP-3 6A6A nor the PON1 RR genotype ($p<0.001$) and finally in the study of relationship between genotypes and severity of disease, distribution of PON1 192 and MMP-3 5A6A genotypes were not associated with the number of diseased vessels ($p>0.05$).

Conclusion: The combined PON1 192 and MMP-3 5A6A polymorphisms are associated with CAD but don't have any effect on the number of diseased vessels.

Keywords: Coronary artery disease, metalloproteinase, polymorphism.

* Corresponding author: Dept. of Biochemistry, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel: +98-914-4081094
email: aghasemi2009@yahoo.com

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-05]