

Lovastatin Enhances Paraoxonase Enzyme Activity and Quells low-density Lipoprotein Susceptibility to Oxidation in Type 2 Diabetic Nephropathy

Mohammad Naghavi Behzad¹, Nariman Nezami², Reza Piri¹, Javid Safa², Behzad Salari², Nadereh Rashtchi Zadeh³, Amir Ghorbanihaghjo²

¹Research Center for Philosophy and History of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

²Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 9 Sep, 2012 Accepted: 18 Dec, 2012

Abstract

Background & Objectives: This study was done to investigate the effect of lovastatin therapy on paraoxonase 1 (PON1) and arylesterase (ARE) activities, and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) susceptibility to oxidation in people with type 2 diabetic nephropathy (T2DN).

& Methods: Lovastatin (20 mg/day) was administered to 30 people with T2DN for 90 days and then withdrawn for 30 days. PON1 and ARE activities were measured by the spectrophotometric method. Susceptibility of LDL-C to oxidation was determined as the production of conjugated dienes.

Results: After 90 days of lovastatin intervention, PON1 and ARE activities and LDL-C lag phase were significantly increased ($p=0.004$, 0.002 , and $b0.001$). After 30 days of lovastatin withdrawal, PON1 and ARE activities and LDL-C lag phase had not changed significantly.

Conclusion: Lovastatin therapy improves PON1 and ARE activities, and LDL-C susceptibility to oxidation. Despite withdrawal of lovastatin, PON1 and ARE activities, and LDL-C susceptibility to oxidation remain unchanged for a long period of time in people with T2DN.

Key Words: Diabetes, Nephropathy, Lipid peroxidation, Arylesterase, Lovastatin

*Corresponding author:

E-mail: ghorbaniamir@hotmail.com

مقاله پژوهشی

اثر افزایشی لووستاتین بر فعالیت آنزیم پاروکسوناز و اثر فرو نشانی آن بر حساسیت لیپوپروتئین کم چگالی به اکسیداسیون در نفروپاتی دیابتیک نوع ۲

محمد نقوی بهزاد: مرکز تحقیقات فلسفه و تاریخ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
نریمان نظامی: مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
رضا پیری: مرکز تحقیقات فلسفه و تاریخ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
جاوید صفا: مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
هزاد سالاری: مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
نادره رشتچی زاده: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
امیر قربانی حق جو: مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، نویسنده رابط:

Email: ghorbaniamir@hotmail.com

دریافت: ۹۱/۶/۱۹ پذیرش: ۹۱/۹/۲۸

چکیده:

زمینه و اهداف: بیماری دیابت ملیتوس احتمال ابتلا به بیماریهای قلبی کرونری را ۲ تا ۳ برابر افزایش می دهد. هدف از این مطالعه بررسی اثر درمان لووستاتین و پرهیز از آن بر سطوح فعالیت آنزیم پاروکسوناز ۱ (PON1) و آنزیم آریل استراز (ARE) و حساسیت به اکسیداسیون لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL) در مبتلایان به نفروپاتی دیابتی نوع ۲ (T2DN) بود.

مواد و روش ها: لووستاتین (۲۰ میلی گرم/روز) به مدت ۹۰ روز به ۳۰ نفر مبتلا به T2DN تجویز و سپس به مدت ۳۰ روز پس از دریافت دارو قطع گردید. فعالیت آنزیمهای PON1 و ARE به روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. حساسیت به اکسیداسیون LDL با ارزیابی فاز تاخیری بواسطه اندازه گیری تولید دیونهای کونژوگه تعیین شد.

یافته ها: پس از ۹۰ روز تجویز لووستاتین، فعالیت آنزیمهای PON1 و ARE و فاز تاخیری LDL به طور معنی داری افزایش یافته بودند ($P = 0.004$ ، $P = 0.002$ ، $P < 0.001$)، در حالی که پس از ۳۰ روز از قطع دارو، فعالیت هر دو آنزیم PON1 و ARE و فاز تاخیری LDL تغییر قابل توجهی نکرده بود.

نتیجه گیری: درمان با لووستاتین فعالیت آنزیمهای PON1 و ARE و حساسیت به اکسیداسیون LDL را بهبود می بخشد. با این وجود، علیرغم قطع لووستاتین به مدت ۳۰ روز، فعالیت PON1 و ARE و حساسیت به اکسیداسیون LDL در مبتلایان به T2DN بدون تغییر باقی ماند.

کلید واژه ها: دیابت، نفروپاتی، پراکسیداسیون لیپیدی، لووستاتین، پاروکسوناز، آریل استراز.

مقدمه

بیماری دیابت ملیتوس، حتی با در نظر گرفتن سایر عوامل زمینه ساز، احتمال ابتلا به بیماریهای قلبی کرونری را ۲ تا ۳ برابر افزایش می دهد (۱). از میان عوامل متعدد زمینه ساز آترواسکلروز در بیماری دیابت، نقش احتمالی تغییرات اکسیداتیو لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL)، طی دهه اخیر به شدت مورد توجه قرار گرفته است و این در حالی است که شواهد همراه حاکی از افزایش

استرس اکسیداتیو در بیماران دیابتی است. نتایج گزارش های متعدد نشان داده است که میزان LDL پلاسما در افراد مبتلا به دیابت به طور قابل توجهی بالا است (۳و۲). علاوه بر این، بررسی ها مشخص کرده اند که LDL استخراج شده از پلاسمای افراد مبتلا به دیابت کنترل نشده نسبت به اکسیداسیون مستعدتر است (۴). آنزیم پاراکسوناز سرمی (PON1) یک فسفو تری استراز متصل به

پائیتتر از $129/79 \text{ mmHg}$ حفظ شده بود. افراد تحت مطالعه تحت رژیم درمانی با پروتئین محدود و منظم، تجویز شده توسط مشاور تغذیه، بودند. هر تغییر عمده ای در فشار خون، میزان مصرف پروتئین و فعالیت بدنی در طول تحقیق جزء موارد خروج از مطالعه در نظر گرفته شده بود. سایر موارد خروج از تحقیق عبارت بودند از: استفاده از سایر استاتینها غیر از لووستاتین، فیبراتها، آسپرین β -blaker، آلوپورینول، ویتامینها، پنتوکسی فیلین، روغن ماهی، یا دیگر آنتی اکسیدانها، سیگاری های فعال، بروز التهاب فعال (دیابتی، هپاتیت، عفونتها و ...) بیماریهای قلبی-عروقی فعال (که با علائم بالینی و یافته های الکتروکاردیوگرام تشخیص داده می شود) و بیماری دیابت نوع ۲ کنترل نشده (Hb A1c بیشتر از 7.5%) در طول ۳ ماه. در نهایت اطلاعات ۳۰ بیمار که مبتلا به T2DN بودند وارد مطالعه و مورد آنالیز قرار گرفت (قدرت مطالعه 0.8 و معنی داری 0.5). در حالی که ۸ بیمار، ۲ نفر به دلایل عدم همکاری، ۱ نفر استفاده از ویتامین C در طول مطالعه، ۱ نفر تغییر شیوهی زندگی در طول مطالعه، ۱ نفر سیگار کشیدن در طول مطالعه، ۱ نفر سفر کردن در طول مطالعه، ۱ نفر تغییر مصرف لووستاتین به آتورواستاتین توسط متخصص غدد و ۱ نفر به علت پیشرفت بیماری به مرحلهی نهایی نارسایی کلیوی از مطالعه حذف شدند. بر اساس پروتکل های مطالعه، بیماران تحت یک دوره لووستاتین درمانی به میزان روزانه 20 mg و بمدت ۹۰ روز قرار گرفتند. بعد از گذشت ۳ ماه لووستاتین درمانی، از بیماران خواسته شد که از روز ۹۱ ام تا روز ۱۲۰ ام مصرف لووستاتین را متوقف کنند. برای بررسی میزان فعالیت آنزیمهای PON1 و ARE و حساسیت به اکسیداسیون LDL-C از بیماران در ۴ نوبت با برنامهی مذکور نمونه خون گرفته شد. قبل از لووستاتین درمانی (پایه)، ۴۵ روز بعد از شروع لووستاتین درمانی، ۹۰ روز بعد از شروع لووستاتین درمانی و ۳۰ روز بعد از توقف لووستاتین درمانی. نمونه های خون بعد از ناشتایی شبانه (۱۲ ساعت) در لوله های خالی و استیل گرفته شده و سپس بلافاصله در یخ و در دمای 4°C نگه داری شدند نمونه های سرم از سلولهای خونی به وسیله سانتریفوژ 3000 rpm برای ۱۰ دقیقه جدا شد. سپس سرم به دو قسمت تقسیم شد، یک قسمت به حالت سرم و قسمت دیگر در میکروتوب های محتوی EDTA در دمای -70°C تا زمان آنالیز نهایی نگه داری شدند. تست های بیوشیمیایی برای اندازه گیری میزان FBG، کلسترول (Chol)، HDL و تری گلیسرید (TG) با استفاده از کیت های تجاری و دستگاه اتوماتیک آنالیزور شیمیایی (Abbott analyzer محصول شرکت Abbott، آمریکا) انجام گرفته شد. میزان LDL با استفاده از معادله Friedwald محاسبه شد (۱۳). میزان فعالیت آنزیم PON1 در حضور NaCl (فعالیت تحریک شده با نمک) و در غیاب NaCl (فعالیت پایه) اندازه گیری شد. به طور خلاصه، میزان هیدرولیز پاراکسون (signal) با افزایش جذب در 412 nm و دمای 25°C اندازه گیری شد. میزان P-nitrophenol ساخته شده با ضریب جذب مولی در $\text{PH}=8$ محاسبه شد که مقدار آن $17,100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ به دست آمد. میزان فعالیت PON به صورت V/L سری بیان شد. فنیل استات به عنوان یک مادهی اولیه برای

HDL است که به طور عمده توسط کبد تولید می شود (۵). مطالعات اخیر آشکار کرده اند (۶) که آنزیم PON1 در ارتباط با لیپوپروتئین های غنی از تری گلیسرید (VLDL و chylomicrons) فعالیت دارد، نه LDL-C آنزیم PON1 یک استراز وابسته به کلسیم است که توانایی هیدرولیز طیف وسیعی از مواد شامل ارگانوفسفاتها، آریل استرها و لاکونها را دارا می باشد (۷،۵). مطالعات اخیر کاهش میزان و فعالیت آنزیم PON1 را در بیماران مبتلا به دیابت بویژه بیماران دچار نوروپاتی دیابتی گزارش کرده اند (۸ و ۹). در بین داروهای مختلف کاهنده میزان لیپید، استاتین ها (statins) داروهای ضد هایپرلیپیدمی هستند که به علت عوارض کم و تاثیر قوی در کاهش میزان LDL-C به طور جهانی مورد استفاده قرار می گیرند. از آنجایی که استاتینها به خوبی توسط بیمار تحمل می شوند و تاثیر منفی بر کنترل قند خون ندارند، در بیماران مبتلا به دیابت، استاتین ها داروی انتخابی برای کاهش میزان LDL-C (برخی استاتین ها میزان تری گلیسرید را هم می کاهند) هستند (۱۰). داده های به دست آمده از آنالیزهای زیر گروهی میزان کلسترول در کارآزماییهای بالینی استاتینها نشان می دهند که فواید درمان با استاتینها در مبتلایان به دیابت به همان میزان فواید آن در گروه افراد غیر دیابتی قابل توجه است. با توجه به اثرات کاهنده این داروها بر میزان پروفایل لیپیدی، متابولیت های استاتین ها به احتمال زیاد قابلیت آنتی اکسیدانی داشته باشند (۱۱). بررسیهای متعدد بالینی اثرات مفید استاتین ها بر میزان فعالیت آنزیم PON1 متصل به HDL-C را در بیماران مبتلا به هایپرلیپیدمی اثبات کرده اند، هر چند نتایج این بررسی ها هنوز مورد بحث هستند (۱۲). هدف از مطالعهی پیش رو، بررسی اثرات تجویز و قطع داروی لووستاتین بر میزان فعالیت آنزیمهای PON1 و آریل استراز و حساسیت به اکسیداسیون LDL-C در مبتلایان به نوروپاتی دیابتیک نوع ۲ به همراه تاثیر این دارو بر روی پروفایل لیپیدی است.

مواد و روش ها

مطالعهی کارآزمایی بالینی شاهد دار تصادفی کنونی از تاریخ فروردین ماه ۱۳۸۸ لغایت شهریور ۱۳۹۰ در کلینیک فوق تخصصی شیخ الرئیس دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام گرفت. بعد از ارزیابی های بالینی و آزمایش های اولیه، ۳۸ مرد که مبتلا به نوروپاتی دیابتی نوع ۲ (T2DN) بودند مورد مطالعه قرار گرفتند. برای حذف عوامل اختلال گر در مطالعه، افرادی که دیابت نوع ۲ و پروتینوری کمتر از حد نفروتیک (مثلاً 3 g/dg) و کلیرانس کلیوی تخمینی بیشتر از 30 mg/min (محاسبه شده با فرمول Cockcroft-Gault) داشتند مورد مطالعه قرار گرفتند. تمامی شرکت کنندگان رضایت نامه کتبی پر کرده بودند و پروتکول تحقیق که منطبق بر توافقنامه Helsinki بود، به تأیید کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز رسیده بود. سطح گلوکز پلاسما ناشتای شرکت کنندگان با تزریق انسولین یا تجویز سولفونیل اورهی خوراکی مورد کنترل قرار گرفته بود. فشار خون به وسیلهی مهار کننده های آنزیم مبدل آنژیوتاسین و یا مسدود کننده های گیرنده آنژیوتاسین به همراه آلفا بلوکرها و داروهای مدر (به مقدار لازم)

اندازه‌گیری فعالیت ARE استفاده شد. با اضافه کردن سرم واکنش شروع شده و افزایش جذب در ۲۷۰nm خوانده شد. نمونه‌های کنترل هم برای اندازه‌گیری هیدرولیز خود به خودی فنیل استات اضافه شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از ضرب جذب مولی فنل تولید شده محاسبه شد که برابر با $1 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ بود. یک واحد فعالیتی ARE به صورت $1 \mu\text{mol}$ فنول تولید شده در شرایط فوق بر دقیقه تعریف شده و به صورت KV/L در نظر گرفته شد (۱۴). حساسیت به اکسیداسیون LDL قسمت LDL با استفاده از اولتراسانتیفریوژ تحت شرایط 100000 دور در دقیقه برای ۴ ساعت و دمای ۱۵ درجه سانتی گراد از پلاسما جدا شد. اکسیداسیون LDL (μg) با تولید داینهای کونژوگه تحت تاثیر حضور یون مس (μM) هر ۵ دقیقه در طیف نوری ۲۳۴ نانومتر در یک میلی لیتر محلول بافری فسفات در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد زیر اشعه UV (m) اندازه‌گیری شد و نتایج به عنوان فاز تاخیری اکسیداسیون LDL در نظر گرفته شد (۱۴). آنالیزهای آماری داده‌های مطالعه با استفاده از بسته نرم افزاری SPSS نسخه-۱۳.۰ برای ویندوز انجام شد. نتایج بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شدند. برای مقایسه تغییرات طی تجویز و قطع از آزمونهای model repeated measures analysis, General linear and Wilcoxon signed rank, Bonferroni tests, paired t-tests tests استفاده شد. ارتباط بین متغیرها نیز با استفاده از آزمون ارتباط Pearson بررسی شد. در صورتی که نتایج میزان p کمتر از ۰/۰۵ می شد، تفاوت و ارتباط معنی دار در نظر گرفته می شد.

یافته ها

میانگین سنی شرکت کنندگان $54/54 \pm 4/14$ سال، با میانگین شاخص توده بدنی $26/83 \pm 3/11 \text{ kg/m}^2$ و میانگین طول مدت ابتلا به دیابت $9/76 \pm 3/11$ سال بود. ۱۳ شرکت کننده (۳۳/۳۴ درصد) دارای فشار خون خفیف تا متوسط به مدت $3/98 \pm 3/10$ سال بودند. میانگین فشار خون سیستول و دیاستول در ابتدای مطالعه به ترتیب $124/72 \pm 11/45 \text{ mmHg}$ و $72/90 \pm 5/18 \text{ mmHg}$ بود. میانگین کراتینین و اوره سرم و حجم، پروتئین، کراتینین و نسبت پروتئین به کراتینین ادرار ۲۴ ساعته $93/21 \pm 9/21 \text{ mL/day}$ ، $54/23 \pm 32/05 \text{ mg/DL}$ ، 165 ± 0.91 ، $2116/67 \pm 706/83 \text{ mg/day}$ ، $1210.36 \pm 309.16 \text{ mg/day}$ ، $974/73$ و $0/81 \pm 0/48$ بود. میانگین و انحراف معیار FPG، Chol، HDL، TG و LDL در جدول ۱ نشان داده شده است. این نتایج

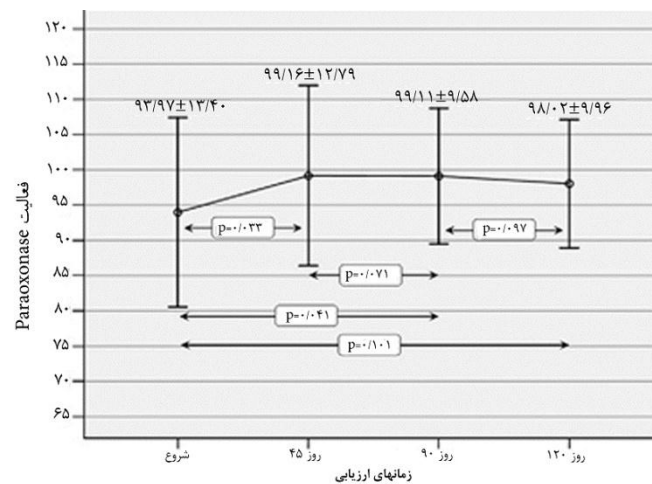
نشان می‌دهند که میزان LDL و Chol بعد از ۴۵ روز درمان با لووستاتین به طور معنی داری، بدون تغییر قابل ملاحظه‌ای در میزان TG کاهش یافته است. بعلاوه، در پایان ۴۵ روز از درمان با لووستاتین، میزان HDL، TG، Chol و C- در پایان روز ۹۰ درمان با لووستاتین، تفاوت قابل ملاحظه‌ای با روز ۴۵ ام درمان نداشت. سی روز بعد از اتمام تجویز لووستاتین میانگین میزان LDL و TG و HDL به طور چشمگیری در مقایسه با میزان اندازه‌گیری شده در روز ۹۰ درمان با لووستاتین افزایش یافته بود.

میانگین و انحراف معیار میزان فعالیت (PON 1) در شکل ۱ نمایش داده شده است. درمان با لووستاتین به طور معنی داری میزان فعالیت این آنزیم را افزایش و قطع دارو آن را کاهش داده است $Wilks' \lambda = 0/840$ ، $f(3,27) = 7/715$ ، $p = 0/032$ ، $\text{multivariate partial eta squared}$ ، در طول درمان ۴۵ روزه اول لووستاتین، میزان فعالیت PON1 به طور قابل توجهی افزایش یافت، در حالی که ۴۵ روز پس از آن لووستاتین درمانی تغییری در فعالیت PON1 ایجاد نکرد. فعالیت PON1 بعد از عدم دریافت لووستاتین کاهش یافت، با این حال این تغییر از لحاظ آماری در مقایسه با اندازه‌گیری میزان ۹۰ روزه قابل ملاحظه نیست. میانگین و انحراف معیار فعالیت ARE در شکل ۲ نشان داده شده است. اثر قابل توجهی ناشی از درمان با لووستاتین و قطع آن وجود داشت $Wilks' \lambda = 0/663$ ، $f(3,27) = 4/570$ ، $p = 0/010$ ، $\text{multivariate partial eta squared}$ و $0/337$ ، نظیر PON1، فعالیت ARE به دنبال ۴۵ روز اول درمان با لووستاتین افزایش یافته بود و سپس در ۴۵ روز بعدی در میزانی ثابت و بالاتر از میزان قبل از دریافت دارو قرار گرفت. همچنین قطع لووستاتین تغییری در سطح ARE ایجاد نکرد. فاز تاخیری اکسیداسیون LDL در شکل ۳ نشان داده شده است $Wilks' \lambda = 0/429$ ، $f(3,27) = 11/486$ ، $p = 0/001$ ، $\text{Multivariate partial eta squared}$ و $0/561$ ، فاز تاخیری اکسیداسیون LDL از آغاز درمان لووستاتین تا روز ۹۰ مداخله طولانی شد، ولی بعد از ۳۰ روز پس از قطع لووستاتین تغییری نکرد. اگرچه تغییرات فعالیت آنزیمهای PON1 و ARE ارتباطی با تغییرات میزان HDL در طول مدت زمان مداخله نداشت $p = 0/236$ و $p = 0/185$ ، ولی تغییرات فعالیت آنزیمهای PON1 و ARE بعد از قطع درمان رابطه‌ی خطی مستقیمی با تغییرات میزان HDL داشت $r = 0/454$ ، $p = 0/012$ ؛ $r = 0/709$ ، $p < 0/001$

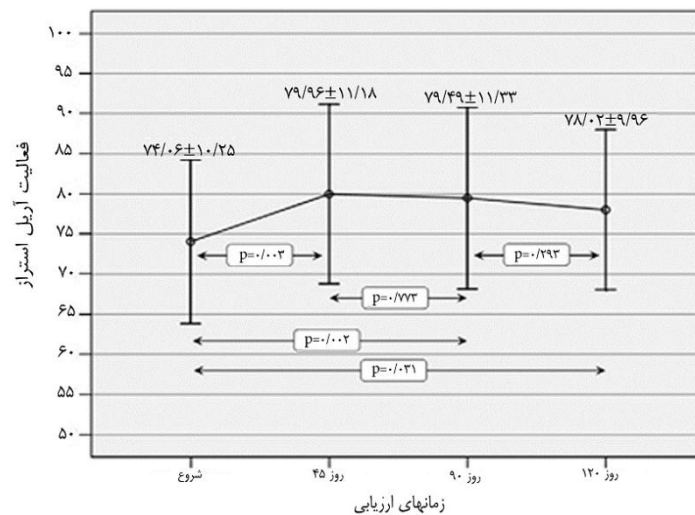
جدول ۱: تغییرات گلوکز و لیپید پلاسما در افراد مبتلا به نوروپاتی دیابتیک ۲ بعد از ۳ ماه مصرف لووستاتین و یک ماه پرهیز بعد از آن.

زمان های ارزیابی	شروع درمان	۴۵ روز بعد از شروع درمان	۹۰ روز بعد از شروع درمان	۳۰ روز بعد از قطع درمان	p values	P ^a	p ^b	p ^c	p ^d	p ^e
FBG (mg/dL)	۱۵۹/۱۷±۶۷/۵۳	۱۵۴/۴۵±۵۸/۴۰	۱۵۶/۵۸±۵۷/۶۵	۱۵۶/۶۰±۵۷/۷۷	۰/۰۵۰	۰/۴۸۸	۰/۴۹۱	۰/۴۹۳	۰/۴۹۳	۰/۴۹۳
Chol (mg/dL)	۱۹۹/۰۰±۳۳/۳۳	۱۶۴/۶۶±۳۵/۱۹	۱۶۵/۴۳±۴۰/۴۱	۱۹۸/۴۰±۴۸/۱۸	۰/۰۷۳	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
TG (mg/dL)	۱۷۵/۳۷±۹۴/۹۷	۱۷۲/۰۶±۹۴/۷۲	۱۷۰/۹۰±۹۵/۲۴	۲۰۶/۵۰±۱۲۲/۰۲	۰/۰۰۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
HDL-C (mg/dL)	۴۰/۰۰±۵/۳۰	۴۲/۸۰±۵/۱۴	۴۲/۴۷±۴/۳۸	۴۰/۶۰±۴/۴۹	۰/۰۰۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
LDL-C (mg/dL)	۱۱۵/۸۶±۴۷/۳۳	۸۴/۴۷±۲۹/۲۲	۸۲/۲۲±۳۶/۶۸	۱۰۶/۹۸±۳۸/۴۷	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

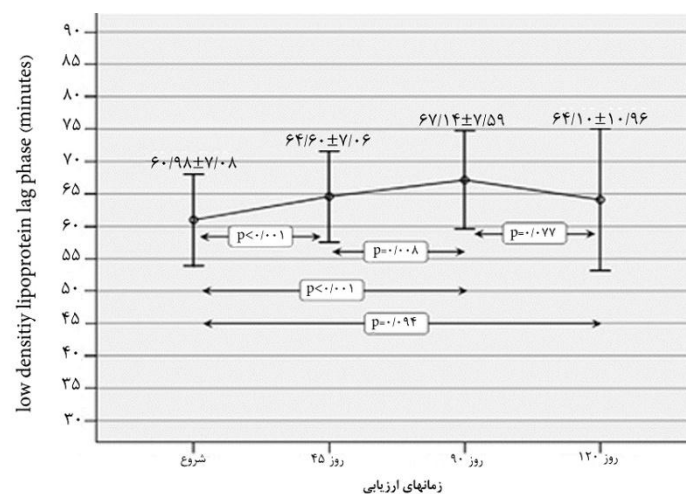
FBG: گلوکز خون در حالت ناشتا، LDL-C: لیپوپروتئین با چگالی کم، HDL-C: لیپوپروتئین با چگالی زیاد، Chol: کلسترول کل.
^a مقایسه بین میزان اولیه و پنجمین روز بعد از درمان.
^b مقایسه بین میزان نودمین و چهل و پنجمین روز بعد از درمان.
^c مقایسه بین میزان اولیه و سی و دومین روز بعد از پرهیز.
^d مقایسه بین میزان اولیه و نودمین روز بعد از درمان.
^e مقایسه بین میزان اولیه و سی و دومین روز بعد از پرهیز.



نمودار ۱. میزان های فعالیت paraoxonase سرمی در افراد مبتلا به نوروپاتی دیابتیک نوع ۲ قبل (اولیه) و چهل و پنجمین و نودمین روز بعد از درمان. میزان فعالیت سرمی paraoxonase به طور قابل توجهی افزایش یافت و همان طور در طول درمان باقی ماند. (مراحل با paired t-test مقایسه شده اند)



نمودار ۲. میزان های فعالیت arylesterase سرمی در افراد مبتلا به نوروپاتی دیابتیک نوع ۲ قبل (اولیه) و چهل و پنجمین و نودمین روز بعد از درمان. میزان فعالیت سرمی arylesterase به طور قابل توجهی افزایش یافت و همان طور در طول درمان باقی ماند. (مراحل با paired t-test مقایسه شده اند).



نمودار ۳. میزان فاز تأخیری اکسیداسیون LDL در افراد مبتلا به نوروپاتی دیابتیک نوع ۲ قبل (اولیه) و چهل و پنجمین و نودمین روز بعد از درمان. فاز LDL-C lag به طور قابل توجهی طولانی تر شد. (مراحل با paired t-test مقایسه شده اند)

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که لووستاتین میزان LDL و HDL را کاهش داده و سطح HDL را افزایش می‌دهد، بدون اینکه تأثیری در میزان TG داشته باشد. این موضوع می‌تواند حاکی از بهبود قابل توجه الگوی آترواسکلروز زای پروفایل لیپید در مبتلایان به T2DN باشد. قطع لووستاتین این اثر اصلاح بخش بر الگوی لیپیدی را باز می‌گرداند. همان طور که از اندازه‌گیری‌های پایه‌ای مطالعه حاضر مشهود است افراد مبتلا به T2DM و به ویژه T2DN اغلب مبتلا به اختلالات لیپیدی و لیپوپروتئینی متعددی هستند (۱۵). پروفایل لیپیدی بیماران مبتلا به T2DM به طور عمده با افزایش میزان LDL و TG و کاهش سطح HDL در پلاسما مشخص می‌شود (۱۶). این اختلالات به عنوان عوامل خطر عمده در بروز بیماری‌های عروق کرونری شناخته می‌شوند و میزان شیوع درگیری عروق کرونری در بیماران مبتلا به دیابت ۲ تا ۴ برابر بیماری‌های عروق مغزی و عروق محیطی است (۱۷). استاتینها داروهای مقرون به صرفه و ارزشمندی در کنترل اختلالات پروفایل لیپیدی به شمار می‌روند و به عنوان خط اول درمان در کنترل پروفایل لیپیدی بیماران مطرح هستند (۱۸).

علاوه بر این، نتایج حاصل تحقیق حاضر نشان داد که لووستاتین فعالیت آنزیم PON1 را بعد از ۴۵ روز درمان افزایش داده که این میزان فعالیت همچنان تا نودمین روز درمان و حتی ۳۰ روز بعد از قطع دارو افزایش یافته باقی ماند (شکل ۱). الگوی مشابه نیز برای فعالیت آنزیم ARE نشان داده شد (شکل ۲).

فعالیت PON1 در افراد دیابتی کاهش یافته و این کاهش در بیماران مبتلا به عوارض عروقی DM از جمله مبتلایان به DN به میزان بیشتری بارز است. در چنین شرایطی، استرس اکسیداتیو نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند و هم چنین به عنوان یک عامل بیماری‌زا برای راجع در DM و عوارض ناشی آن از جمله نفروپاتی در نظر گرفته می‌شود (۱۹،۲۸).

مسیرهای بیوشیمیایی متعددی ممکن است در حالت هایپرگلیسمی ناشی از DN تشدید شده و تولید رادیکالهای آزاد را افزایش دهند برای مثال گلوکز اتوکسیداز، مسیر Polyol، سنتز پروستانوئید و گلیکاسیون پروتئینها. این رادیکالهای آزاد موجب پراکسیداسیون لیپیدی به ویژه اکسیداسیون لیپیدهای حاوی اسید چرب غیر اشباع می‌شوند. محصول واکنش بین آنیون سوپراکسید و نیتریک اسید پراکسی نترات نامیده می‌شود که در واقع یک اکسیدان قوی LDL-C محسوب می‌شود (۳).

غیرفعال شدن PON1 در نتیجه واکنش متقابل فسفولیپیدهای اکسید شده موجود در اکسید LDL، اکسید استرهای کلسترول یا لیزوفساتیدیل کولین با گروه سولفیدریل آزاد در PON1 cys284 است (۲۰). بنابراین اگر LDL و بعد از آن اکسید LDL کاهش یابد، فعالیت آنزیم PON1 افزایش می‌یابد. تعداد زیادی از مطالعات انجام شده بر روی تأثیر انواع مختلف استاتین با بررسی فعالیت آنزیم PON1 نسبت به فنیل استات و پاراکسون در بیماران مبتلا به اختلالات لیپیدی نشان داده اند که این داروها فعالیت سرمی آنزیم PON1 را افزایش می‌دهند (۲۱). در حقیقت استاتینها با کاهش

LDL سرمی اثر مفیدی بر فعالیت PON1 دارند چرا که تعداد LDL اکسیده که باید توسط PON1 تخریب شوند کاهش یافته است (۲۲ و ۱۱).

اغلب مطالعات انجام گرفته (۲۳،۲۱،۲۴) رابطه معنی‌داری بین فعالیت سرمی آنزیم PON1 و سطح HDL نشان نمی‌دهند و تنها افزایش آماری قابل توجه فعالیت سرمی PON1 مشاهده شده است. با توجه به اینکه PON1 به طور کامل با HDL در سرم مرتبط است، انتظار می‌رود که فاکتورهای موثر بر سطح HDL در غلظت و فعالیت PON1 تغییراتی ایجاد می‌کنند (۲۲). در مطالعه حاضر اگرچه مداخله‌ی لووستاتین غلظت HDL را افزایش می‌دهد، ارتباطی بین سطح HDL و فعالیت PON1 یافته نشد. به نظر می‌رسد افزایش فعالیت PON1 تحت تأثیر درمان با لووستاتین مستقل از سطح HDL متأثر از خواص آنتی اکسیدانی استاتین است. در مطالعه حاضر حساسیت به اکسیداسیون LDL اندازه‌گیری شده با معیار تولید دیونهای کونژوگه با استفاده از یون مس، نتایج به عنوان فاز تاخیری ارائه شده‌اند درمان با لووستاتین فاز تاخیری LDL را طولانی می‌کند که بدین فعالیت لووستاتین حساسیت و گرایش LDL نسبت به اکسیداسیون را کاهش می‌دهد. فعالیت PON1 ارتباط معکوس با غلظت پراکسید لیپید بعد از درمان با لووستاتین دارد. اخیراً مطالعاتی که از انواع مختلفی از استاتینها (از جمله سیمواستاتین) استفاده کردند نشان داد که حساسیت به اکسیداسیون LDL بعد از دریافت این داروها کاهش یافته است (۲۳).

تمام کلاسهای لیپوپروتئینهای سرم انسانی مستعد تغییرات اکسیداتیو هستند که از اثرات طولانی بیولوژیکی بهره می‌برند (۲۵). نتیجه‌ی بسیار مهم، احتمالاً برداشت (جذب) کنترل نشده‌ی LDL اکسیده با گیرنده‌های فاگوسیتوزی ماکروفاژها در فضای زیراندوتلیال شریانی است که در نهایت منجر به تشکیل سلول کف آلود و آتروسکلروز می‌شود. افزایش اکسیداسیون لیپوپروتئین در دیابتی‌ها بواسطه چندین مطالعه ثابت شده است که نمونه آنها کاهش مقاومت در برابر عوامل محرک اکسیداسیون در شرایط آزمایشگاهی افزایش تیر آتوانتی‌بادی‌ها بر ضد LDL اکسیده در سرم بیماران دیابتی است. علاوه بر این، غلظت‌های کم ویتامین-های آنتی اکسیدانی (به ویژه α -توکوفرال) و افزایش غلظت محصولات پراکسیداسیون لیپید در پلاسما به ویژه لیپید پراکسیداز و F2 ایزوپروکسان در بیماران دیابتی شرح داده شده است. با توجه به این، PON1 ممکن است یک مانع دفاعی عمده در برابر ایجاد پراکسیدهای لیپیدی با منشا LDL اکسید شده باشد. بنابراین افزایش HDL و افزایش فعالیت PON1 در درمان با لووستاتین می‌تواند نقش اساسی در کاهش حساسیت LDL به اکسیداسیون در مطالعه‌ی حاضر داشته باشد. علاوه بر این درمان با لووستاتین منجر به کاهش سطح محصولات LDL و متعاقب آن کاهش تعداد ذرات LDL مستعد به اکسیداسیون می‌شود. همچنین اثر مهارتی لووستاتین بر اکسیداسیون LDL ممکن است به دلیل افزایش

مطالعه‌ای است که تلاش می‌کند اثرات لووستاتین بر فعالیت آنزیمهای PON1 و ARE، و حساسیت به اکسیداسیون LDL را در افراد مبتلا به T2DN نشان دهد.

نتیجه گیری

در مجموع، لووستاتین موجب بهبود پروفایل لیپیدی و فعالیت آنزیم PON1 شده و حساسیت به اکسیداسیون LDL را در مبتلایان به T2DN کاهش می‌دهد که این تغییرات تاثیر قابل توجه و سودمندی در پیشگیری و پیشرفت CAD دارد. علاوه بر آن، به نظر می‌رسد که لووستاتین با بهبود اختلالات لیپیدی در بیماران دیابتی نقش موثری را در کنترل عامل خطری مهم در پیشرفت DN ایفا می‌کند.

تقدیر و تشکر

این مقاله با حمایت مالی مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (تبریز- ایران) انجام گرفته است.

حذف LDL های قدیمی باشد که نسبت به LDL های تازه ستنز نشده بیشتر مستعد اکسیداسیون هستند (۲۶). کاهش بیان و فعالیت گلوکاتین پراکسیداز، سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز در موش ها باعث افزایش اکسیداسیون LDL در آنها می شود (۲۷). برخلاف این پدیده، مطالعات نشان داده اند که استاتین ها تولید رادیکالهای آزاد را کاهش و فعالین سوپراکسیداز دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتین پراکسیداز را افزایش می‌دهد (۲۸-۲۶). افزون بر این یافته ها اخیراً پیشنهاد شده است که استاتین ها در ذرات لیوپروتئینی به عنوان آنتی اکسیدان عمل می‌کنند و LDL مقاوم به اکسیداسیون ایجاد می‌کنند (۳۰ و ۲۹). به این ترتیب از طریق اصلاح تعادل بین استرس اکسیداتیو و آنتی اکسیدان کاهش اکسیداسیون LDL و کاهش حساسیت آن نسبت به اکسیداسیون می‌شود. محدودیتهای عمده ی مطالعه عبارتند از: حجم پائین جامعه آماری مطالعه، دوز پایین لووستاتین، جامعه مورد مطالعه افراد مذکر، کوتاه بودن زمان مطالعه و فقدان اندازه گیری فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتین پراکسیداز و اندازه‌ی ظرفیت آنتی اکسیدان. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، این اولین

References

- Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannel WB. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study. *Diabetes* 1974; **23**(2): 105-111.
- Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; **48**(1): 1-9.
- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; **19**(3): 257-267.
- Tsai EC, Hirsch IB, Brunzell JD, Chait A. Reduced plasma peroxyl radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes* 1994; **43**(8): 1010-1014.
- Shamir R, Hartman C, Karry R, Pavlotzky E, Eliakim R, Lachter J, et al. Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radical Biology & Medicine* 2005; **39**(3): 336-344.
- Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) is present in postprandial chylomicrons. *Atherosclerosis* 2005; **180**(1): 55-61.
- Rosenblat M, Karry R, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) is a more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux, when present in HDL than in lipoprotein-deficient serum: relevance to diabetes. *Atherosclerosis* 2006; **187**(1): 74-81.
- Lehmann R, Schleicher ED. Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 2000; **297**(1-2): 135-144.
- Aguilar-Salinas CA, Gomez-Perez FJ, Posadas-Romero C, Vazquez-Chavez C, Meaney E, Gullas-Herrero A, et al. Efficacy and safety of atorvastatin in hyperlipidemic, type 2 diabetic patients. A 34-week, multicenter, open-label study. *Atherosclerosis* 2000; **152**(2): 489-496.
- Pyorala K, Pedersen TR, Kjekshus J, Faergeman O, Olsson AG, Thorgeirsson G. Cholesterol lowering with simvastatin improves prognosis of diabetic patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Diabetes Care* 1997; **20**(4): 614-620.
- Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. *Current Opinion in Lipidology* 2005; **16**(4): 393-399.
- Mackness M, Mackness B. Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important? *Free Radical Biology & Medicine* 2004; **37**(9): 1317-1323.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 1972; **18**(6): 499-502.
- Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 2001; **306**(1-2): 1-17.
- Shoji T, Emoto M, Kawagishi T, Kimoto E, Yamada A, Tabata T, et al. Atherogenic lipoprotein changes in diabetic nephropathy. *Atherosclerosis* 2001; **156**(2): 425-433.
- Vinik AI, Colwell JA. Effects of gemfibrozil on triglyceride levels in patients with NIDDM.

- Hyperlipidemia in Diabetes Investigators. *Diabetes Care* 1993; **16**(1): 37-44.
17. Harris SB, Macaulay AC. Diabetes management: new evidence-based recommendations. Highlights of the 1998 Canadian clinical practice guidelines. Canadian Diabetes Association. *Canadian Family Physician Medecin De Famille Canadien* 1998; **44**: 2465-2466, 2469-2479.
18. Martikainen JA, Soini E, Paulsson T. Cost-effectiveness of single agent, uptitration and switching statin treatment strategies for lipid lowering in Sweden. *Current Medical Research and Opinion* 2010; **26**(2): 389-396.
19. Ha H, Kim KH. Role of oxidative stress in the development of diabetic nephropathy. *Kidney International. Supplement* 1995; **51**: 18-21.
20. Aviram M. Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? *Molecular Medicine Today* 1999; **5**(9): 381-386.
21. Van Himbergen TM, Vvan Tits LJ, Ter Avest E, Roest M, Voorbij HA, de Graaf J, et al. Paraoxonase (PON1) is associated with familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2008; **199**(1): 87-94.
22. Deakin S, Leviev I, Guernier S, James RW. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2003; **23**(11): 2083-2089.
23. Tomas M, Senti M, Garcia-Faria F, Vila J, Torrents A, Covas M, et al. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2000; **20**(9): 2113-2119.
24. Harangi M, Seres I, Varga Z, Emri G, Szilvassy Z, Paragh G, et al. Atorvastatin effect on high-density lipoprotein-associated paraoxonase activity and oxidative DNA damage. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2004; **60**(10): 685-691.
25. Chisolm GM, Hazen SL, Fox PL, Cathcart MK. The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Biochemical and biological mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; **274**(37): 25959-25962.
26. Aviram M. Interaction of oxidized low density lipoprotein with macrophages in atherosclerosis, and the antiatherogenicity of antioxidants. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry: Journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies* 1996; **34**(8): 599-608.
27. Guo Z, Van Remmen H, Yang H, Chen X, Mele J, Vijg J, et al. Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2001; **21**(7): 1131-1138.
28. Endres M, Laufs U. Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke; A Journal of Cerebral Circulation* 2004; **35**: 2708-2711.
29. Girona J, La Ville AE, Sola R, Plana N, Masana L. Simvastatin decreases aldehyde production derived from lipoprotein oxidation. *The American Journal of Cardiology* 1999; **83**(6): 846-851.
30. Rosario RF, Prabhakar S. Lipids and diabetic nephropathy. *Current Diabetes Reports* 2006; **6**(6): 455-462.