View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۲، شماره ۲/ تابستان ۱۳۸۹/ ۴۳-۳۵

بررسی تاثیر پلی مورفیسم 629C/A- ژن پروتئین انتقال دهندUUه کلسترول استر در ارتباط با اثر استاتین ها بر سطح لیپوپروتئین با دانسیته بالا (HDL)

عفت فرخی*، دکتر کیهان قطره سامانی**[1]، دکتر سید اسداله امینی***، دکتر مرتضی هاشم زاده چالشتری†، محمد تقی مرادی††، حسین امینی نجف آبادی†††

*کارشناس ارشد بیوشیمی-مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، **دکتری بیوشیمی – مرکز تحقیقات گیاهان دارویی-دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ***استادیار گروه بیوشیمی – دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، †استاد ژنتیک انسانی- مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ††کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ††† مربی گروه بیوشیمی-دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد.

تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۳۰ تاریخ تایید: ۸۹/۳/۲۹

چکیده:

زمینه و هدف: **کلسترید استر ترانسفر پروتئین (CETP) نقش اساسی در متابولیسم لیپوپروتئین با دانسیته بالا (HDL) و مسیر انتقال معکوس کلسترول دارد. واریانت های ژن CETP مانند 629C>A- که مستقیماً بر HDL کلسترول تاثیر می گذارد نسخه برداری از این ژن را تحت تاثیر قرار می دهد. این مطالعه با هدف تعیین تاثیر پلی مورفیسم 629C>A- در پروموتر ژن CETP بر سطح کلسترول HDL در پاسخ به درمان با استاتین ها انجام شد.**

روش بررسی: **در این مطالعه توصیفی - تحلیلی از بین بیمارانی که سطح لیپوپروتئین با دانسیته پایین (LDL-C) بالاتر از ۱۲۰ mg/dl داشتند و نیاز به درمان داشتند، ۱۹۶ بیمار دریافت کنندگان لواستاتین یا آتورواستاتین انتخاب شدند. در همه بیماران قبل و بعد از درمان پروفایل لیپیدی اندازه گیری شد پلی مورفیسم 629C>A در پروموتر ژن توسط تکنیک چند شکلی طول قطعه محدود (PCR- RFLP) تعیین گردید. نتایج آزمایشات بیوشیمیایی قبل و بعد از درمان در پلی مورفیسم های مختلف با استفاده از آزمون های t زوجی، ANOVA و Tukey تجزیه و تحلیل گردید.**

یافته ها: **پس از درمان با لواستاتین در ژنوتیپ AA سطح کلسترول کاهش بیشتر و سطح HDL افزایش بیشتری نسبت به دو ژنوتیپ دیگر نشان داد در حالی که غلظت آپولیپوپروتئین A1 (ApoA1) در ژنوتیپ CC نسبت به ژنوتیپ AA و AC افزایش بیشتری نشان داد (P<۰/۰۵). همچنین آتورواستاتین میزان ApoA1 را در ژنوتیپ CC بیشتر از دو ژنوتیپ AA و AC افزایش داد (P<۰/۰۱).**

نتیجه گیری: **لواستاتین و آتورواستاتین در ژنوتیپ CC، پروتئین ApoA1 را در ذرات HDL بیش از دو ژنوتیپ دیگرافزایش داده بنابراین بنظر می رسد درمان با این دو دارو در بیماران با ژنوتیپ CC موثرتر باشد.**

واژه های کلیدی: آتورواستاتین، پلی مورفیسم 629C>A-، کلسترید استر ترانسفر پروتئین، لیپوپروتئین با دانسیته بالا، لواستاتین.

مقدمه:

لیپوپروتئین های با دانسیته بالا (HDL) بواسطه مسیر انتقال معکوس کلسترول (RCT) در پیشگیری از بیماری قلبی عروقی نقش شناخته شده ای دارند (۲،۱). در مسیر انتقال معکوس کلسترول، کلسترول اضافی بافت ها به کبد منتقل گردیده و توسط صفرا دفع می گردد.

در متابولیسم HDL در مسیر انتقال معکوس کلسترول، کلسترید استر ترانسفر پروتئین (Cholesterol Ester Transfer Protein=CETP) نقش اساسی دارد (۴،۳). این پروتئین باعث انتقال استرهای کلسترول از ذرات HDL به لیپوپروتئین های با دانسیته

[1]نویسنده مسئول: شهرکرد-رحمتیه-دانشکده پزشکی-مرکز تحقیقات گیاهان دارویی-تلفن: ۳۳۴۶۶۹۲-۰۳۸۱، E-mail:kgsamani@yahoo.com

کم (LDL) و بسیار کم (VLDL) می شود و شانس برگشت کلسترول از طریق LDL به سلول های محیطی را بیشتر می کند. از طرفی این پروتئین با افزایش LDL باعث می شود بخشی از کلسترول که توسط گیرنده LDL سلول های کبدی برداشته می شود بیشتر شود. پس CETP می تواند نقش آتروژنیک یا آنتی آتروژنیک داشته باشد(۶،۵).

جهش های نادری که در ژن CETP ایجاد می گردند باعث افزایش غلظت HDL می گردد (۶). اما از طرفی مطالعات نشان داده علیرغم افزایش غلظت HDL بدنبال کاهش CETP، شانس ابتلا به بیماری قلبی عروقی افزایش می یابد (۶). به نظر می رسد ذرات HDL که در کمبود CETP تشکیل می شود خواص کامل آنتی آتروژنیک ندارند (۷) و ذرات LDL تشکیل شده به دنبال کاهش CETP تمایل کمتری به گیرنده های خود نشان می دهند (۸).

پلی مورفیسم های متعددی در ناحیه پروموتر ژن CETP مشخص شده که مهم ترین آنها 629C/A-، 971G/A- و 2708G/A- بوده و این پلی مورفیسم ها با تغییر غلظت CETP همراه می باشند (۱۰،۹). 629C/A- یک پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی است که در ۶۲۹ باز قبل از شروع نسخه برداری در پروموتر ژن CETP ایجاد می شود که فعالیت نسخه برداری این ژن را تعدیل می نماید و در تنظیم سطح پلاسمایی CETP نقش دارد (۱۱).

وجود آلل A در ۶۲۹- با کاهش پنجاه درصدی پروتئین CETP و افزایش HDL-C سرم همراه است (۱۲). مصرف استاتین ها (Statins) با مهار فعالیت CETP همراه بوده و منجر به افزایش ۱۵-۵ درصد در سطح HDL-C می گردد (۱۳). همچنین مطالعات نشان داده آتورواستاتین (Atorvastatin) باعث کاهش کلسترول تام – تری گلیسرید-لیپوپروتئین با دانسیته پایین (LDL-C) وآپولیپوپروتئین B (ApoB) پلاسما می گردد در حالی که تاثیر قابل توجهی بر روی سطح HDL-C پلاسما و سطح آپولیپوپروتئین A1 (ApoA1) نداشته است ولی باعث مهار فعالیت CETP شده است. (۱۴).

تداخل درمان با استاتین منجر به این نتیجه شد که نتایج درمان با استاتین می تواند تحت تاثیر پلی مورفیسم های CETP و غلظت این پروتئین قرار گیرد (۱۶،۱۵) و به نظر می رسد تعیین نقش پلی مورفیسم های CETP در پیش بینی حساسیت به بیماری و پاسخ های دارویی حایز اهمیت باشد.

هدف از این مطالعه بررسی اثر پلی مورفیسم 629C/A- ژن CETP در پاسخ درمانی به استاتین ها می باشد. مشخص شدن این مطلب که وجود کدام پلی مورفیسم باعث افزایش بیشتر HDL-C در دوزهای متفاوت استاتین می شود، می تواند در هدایت بیماران و استعدادیابی بیماری های قلبی عروقی موثر باشد.

روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی– تحلیلی در سال ۱۳۸۸ از بین بیماران مراجعه کننده به متخصص قلب و عروق یا متخصص داخلی کلینیک شماره ۲ شهرکرد، که به تشخیص پزشک معالج نیاز به درمان هایپر کلسترولمی داشته و سطح LDL-C بالاتر از ۱۲۰ میلی گرم در دسی لیتر داشتند ۱۹۶ بیمار انتخاب شدند. (۱۰۶ نفره شامل دریافت کنندگان لواستاتین و ۹۰ نفره شامل دریافت کنندگان آتورواستاتین بودند).

افراد با بیماری های دیابت کنترل نشده، بیماری های کبدی، کلیوی، هیپوتیروئیدیسم و افرادی که به عللی دارو مصرف می کنند، از مطالعه خارج گردیدند.

اطلاعات لازم در مورد تحقیق به کلیه افراد داوطلب داده شد و رضایت نامه کتبی به همراه پرسشنامه در هنگام نمونه گیری از بیماران دریافت گردید. این مطالعه پس از تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام گردید.

نمونه گیری و آزمایشات بیوشیمیایی:

پس از کسب رضایت نامه و تکمیل پرسشنامه در شروع مطالعه از همه بیماران بصورت ناشتا ۴ میلی لیتر خون بدون ماده ضد انعقاد جهت انجام آزمایشات بیوشیمیایی، همچنین ۲ میلی لیتر خون با EDTA ۰/۵ مولار جهت انجام آزمایشات مولکولی گرفته شد. پس از پایان دوره درمان که ۴۵ روز بود مجدداً از کلیه بیماران ۴ میلی لیتر خون جهت انجام آزمایشات بیوشیمیایی اخذ شد. سرم نمونه های خون پس از مدت زمان لازم جدا شد و همراه با نمونه های خون مربوط به آزمایشات مولکولی در فریزر ۲۰- تا انجام آزمایشات نگهداری گردید. کلیه آزمایشات بیوشیمیایی شامل گلوکز، تری گلیسرید و کلسترول تام به روش آنزیمی، HDL-C و LDL-C به روش مستقیم ایمنوبیوشیمی و ApoA1 و ApoB به روش ایمونوتوربیدومتریک تعیین مقدار گردید. همچنین میزان کراتینین خون افراد به روش ژافه انجام شد تا بیماران کلیوی شناسایی و از مطالعه خارج گردند. آزمایشات فوق با استفاده از کیت های شرکت پارس آزمون و استفاده از دستگاه اتوآنالیز BT3000 (فرانسه) انجام شد. بر روی نمونه های خون مربوط به آزمایشات مولکولی ابتدا استخراج DNA و سپس تعیین پلی مورفیسم مذکور توسط تکنیک PCR- RFLP انجام گردید. در این روش ژن مورد نظر با تکنیک PCR تکثیر شده سپس با استفاده از آنزیم های محدودگر برش داده شد و محصولات پس از هضم آنزیمی، الکتروفورز شده و نتایج بررسی گردید. وجود جابجایی نوکلئونید منجر به ایجاد یا حذف محل برش آنزیم می گردد. کلیه آزمایشات در مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام شد.

نتایج آزمایشات بیوشیمیایی قبل و بعد از درمان در آلل های مختلف پلی مورفیسم با استفاده از آزمون t زوجی و در صورت نیاز به مقایسه در بین ژنوتیپ ها با آزمون آماری ANOVA و جهت مشخص شدن ژنوتیپی که با بقیه اختلاف دارد با آزمون Tukey مورد مطالعه قرار گرفت.

آزمایشات مولکولی:

DNA نمونه های خون با استفاده از روش فنل – کلروفرم استخراج گردید (۱۷) و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر (Unico 2100 USA) مقدار و کیفیت آن تخمین زده شد.

پلی مورفیسم 629C/A- ژن CETP با استفاده از روش PCR-RFLP با استفاده از دستگاه ترموسایکلر TECHNE (TC-512 - UK) به شرح زیر تعیین گردید:

در ناحیه پروموتر ژن CETP قطعه ۱۲۷بازی توسط پرایمرهای زیر تکثیر گردید (۱۸):

F:5'AGAATTGAAATGCCACAGACATTCC 3'
R:5'CCTTGATATGCATAAAATAACTCTCG 3'

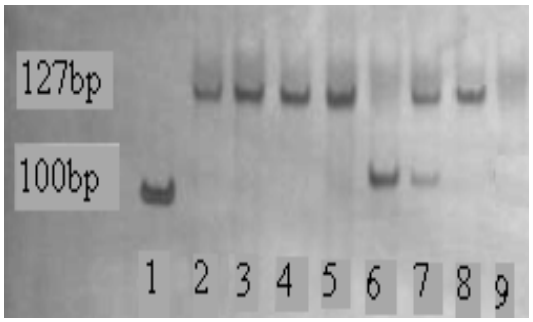
مواد مورد استفاده در هر واکنش PCR شامل: 0.5µl از هر دو پرایمر جلو برنده و معکوس(10PM)، 2.5µl MgCl2 (50mM)، 2.5µl از Taq DNA buffer(10X)، 0.5µl از Mix dNTP (10mM)، 0.1µl از Taq DNA Polymerase (5U/µl) و 1µl از DNA (حدود 100ng) بود که با آب مقطر دو بار تقطیر شده به حجم نهایی 25µl رسانده شد.

شرایط دمایی ترموسایکلر پس از بهینه سازی شامل این موارد بود: دمای واسرشته شدن اولیه ۹۶ درجه به مدت ۵ دقیقه سپس ۳۵ سیکل شامل ۹۶°c به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ °c به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°c به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت طویل سازی نهایی ۷۲ درجه به مدت ۶ دقیقه. محصول PCR بدست آمده توسط ۵ واحد آنزیم AvaI (Fermentase- Canada) به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه مورد هضم قرار گرفت. سپس محصول هضم شده بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد (۲۹:۱) جهت وجود قطعاتی به طول ۱۰۰ و ۲۷ جفت باز مورد بررسی قرار گرفت. الکتروفورز با ولتاژ ۲۰۰ ولت به مدت یک ساعت انجام گردید و ژل بدست آمده با نیترات نقره رنگ آمیزی شد. از هر پلی مورفیسم یک نمونه جهت تایید، تعیین توالی شدند.

یافته ها:

محصولات PCR پس از انجام RFLP بر روی

ژل پلی اکریل آمید بررسی گردیدند. وجود باند در ناحیه ۱۲۷ جفت بازی بیانگر ژنوتیپ AA، در ناحیه ۱۰۰ جفت بازی ژنوتیپ CC و در هر دو محل ۱۲۷ و ۱۰۰ جفت بازی ژنوتیپ CA می باشد (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: *محصولات PCR-RFLP پلی مورفیسم -629C/A بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪.*
شماره ۱ مارکر، شماره های ۲ تا ۵ ژنوتیپ AA، شماره ٦ ژنوتیپ CC، شماره ۷ ژنوتیپ CA، شماره ۸ کنترل بدون آنزیم (Uncut)، شماره ۹ کنترل منفی (بدون DNA).

دو گروه از نظر مشخصات دموگرافیک و بیوشیمیایی اختلاف آماری معنی داری نداشتند (جدول شماره ۱). مصرف لواستاتین باعث کاهش غلظت کلسترول، تری گلیسرید، LDL-C و ApoB در هر سه ژنوتیپ شده است. این در حالی است که کاهش موارد یاد شده در ژنوتیپ AA واضح تر بوده است. مصرف لواستاتین منجر به افزایش غلظت HDL-C در ژنوتیپ AA و ApoA1 در ژنوتیپ CC گردیده است (جدول شماره ۲). بواسطه ماهیت عملکردی دارو در تمام ژنوتیپ های پلی مورفیسم -629C/A ژن CETP کاهش غلظت در کلسترول تام، HDL-C و ApoB دیده شده است. میزان تری گلیسرید نیز کاهش نشان داده که این کاهش در ژنوتیپ AA واضح تر بوده است. به دنبال مصرف آتورواستاتین درکلیه ژنوتیپ ها، افزایش غلظت HDL-C در هر سه ژنوتیپ و افزایش ApoA1 بویژه در ژنوتیپ CC مشاهده گردید (جدول شماره ۲) .

جدول شماره ۱: ویژگی های دموگرافیک و بیوشیمیایی درکل افراد تحت مطالعه

ژنوتیپ / متغیر	پلی مورفیسم -629C/A		
	CC	AC	AA
سن (سال)	۵۱±۹/۲	۵۲±۱۲/۵	٥٤±۱۱/۳
تعداد	۲٦	۷۰	۱۰۰
مردان (٪)	۵۳	٤۷	٤۹
سیگاری (٪)	۲۲	۲۵	۲٦
نمایه توده بدنی	۲۸±۳/۱	۲۷±٤/۵	۲٦±٤/۱
قند ناشتا (mg/dl)	۱۰۲±۱٦/٦	۸۹±۳۱/٤	۹٦±۲۱/۲
کلسترول (mg/dl)	۲۲۳±۲٤/۲	۲۲۵±٤۳/۲	۲۲۸±۳٦/۲
تری گلیسرید(mg/dl)	۲۰۵±٤۱/٦	۱۹٤±٤۵/۷	۱۸۳±۸٤/٦
HDL-C (mg/dl)	۳۷±۱۳/۲	۳۸±۸/۹	٤۲±۱۲/۵
LDL-C (mg/dl)	۱٤۵±۲٤/۷	۱٤٤±۲۳/۹	۱٤٤±۲٤/۷
ApoA1 (mg/dl)	۱۳۸±۲۰/٤	۱۲٤±۱۸/۹	۱۲٦±۲۳/۷
ApoB (mg/dl)	۱۲٤±۲۷/۷	۱۲۳±٤۲/۲	۱۲٦±۲۷/۱

$P>0/05$ در تمامی متغیرها بین دو گروه. *HDL: لیپوپروتئین با دانسیته بالا، LDL: لیپوپروتئین با دانسیته پایین، ApoB: آپولیپوپروتئین B، ApoA1: آپولیپوپروتئین A1*

جدول شماره ۲: نتایج آزمایش پروفایل لیپیدی افراد تحت مطالعه بر حسب ژنوتیپ های پلی مورفیسم 629C/A- قبل و بعد از دریافت دارو

متغیر	گروه / ژنوتیپ	دریافت کنندگان لواستاتین (n=۱۰۶)			دریافت کنندگان آتورواستاتین (n=۹۰)		
		CC(13)	AC(37)	AA(56)	CC(12)	AC(32)	AA(46)
کلسترول	قبل	۲۲۱±۲۹/٤	۲۲٦±۲۸/۳	۲۳۸±۳۰/۹	۲۲۸±۳۰/٦	۲۳۲±۲۹/٦	۲٤۱±۲۹/۹
	بعد	۱۸٤±۳۰/٥	۱۸۹±۲۸/۹	۱۸۱±۲۹/۸	۱۸٤±۳۳/٤	۱۸۹±۲۸/٦	۱۸٦±۲۷/۷
	درصد تغییر	-۱٦/۷	- ۱٦/٤	-۲۳/۷*	- ۱۹/۲	- ۱۸/٥	- ۲۲/۸
تری گلیسرید	قبل	۲۰٦±٤۸/٥	۱۹۸±٤٤/٥	۱۷٥±٦٤/۹	۲۰۱±٤٤/٥	۱۹٦±٤۱/٥	۱٦۹±٦٦/۱
	بعد	۱۸٤±٤۷/٥	۱۸۲±٤۹/٤	۱٤۲±۷۳/۸	۱۸۳ ±٥۱/٥	۱۸۷±٤٥/۲	۱٤۳±٦۹/۸
	درصد تغییر	- ۱۰/٦	-۸/۱	-۱۸/۸*	-۸/٤	- ٤/٦	- ۱٥/۳*
HDL-C	قبل	۳۷±۹/٦	٤۱±۱۱/٦	٤٤±۱٤/۷	۳۹±۹/۹	٤۰±۱۰/۹	٤۱±۱۲/۷
	بعد	٤۱±۹/۸	٤٦±۱۰/۸	٥۳±۱۳/٥	٤٤±۱۰/۲	٤٥±۱۱/۸	٤۷±۱۳/٥
	درصد تغییر	+ ۱۰/۸	+ ۱۲/۱	+ ۲۰/٤*	+ ۱۲/۸	+ ۱۲/٥	+ ۱٤/٦
LDL-C	قبل	۱٤۹±۲۸/٦	۱٤۲±۳۰/۹	۱۳۸±۲۹/۹	۱٥٤±۲۹/۹	۱٤۸±۲٥/٤	۱۳۹±۲۸/۹
	بعد	۹٥±۲۷/٦	۹۲±۲۹/۷	۹۸±۲۹/۸	۹۰±۳۰/۸	۸۷±۲۷/۷	۹۹±۲٥/۸
	درصد تغییر	-۳٦/۲	-۳٥/۲	-۳۰/٤	-٤۱/٥	-٤۱/۲	-۲۹/٤
ApoA1	قبل	۱۲۱±۲۲/۹	۱۲۳±۱۸/۹	۱۲۲±۲٤/٦	۱۲٦±۱۹/۹	۱۲۰±۲۱/۹	۱۲۰±۲٤/۹
	بعد	۱٤۷±۲٦/۸	۱۲٦±۲۱/۹	۱۲٦±۲۳/٥	۱٥٥±۲۸/۷	۱۲۹±۳۰/۹	۱۳۰±۲۲/٤
	درصد تغییر	+ ۱۳/۲*	+ ۲/۱	+ ۲/۱	+ ۲۳/۱ **	+ ۷/٥	+ ۸/۳
ApoB	قبل	۱۲٥±۲۸/٦	۱۲٤±۳٥/۹	۱۲۳±۲۹/۷	۱۳۱±۲٥/٦	۱۲۹±۳۰/۷	۱۲٥±۳۰/۹
	بعد	۹۱±۲٥/٥	۸۱±۳۳/٦	۸۸±۲٦/۸	۹۸±۲۷/٤	۸۸±۳۱/۱	۸٥±۲٤/۸
	درصد تغییر	- ۲۷/۲	- ۳٤/٦	- ۲۸/٤	-۲٥/۲	-۳۱/۹	-۳۲/۱

*$P<۰/۰٥$ *در آزمون* Tukey *در بین سه ژنوتیپ.* **$P<۰/۰۱$ *در آزمون* Tukey *در سه ژنوتیپ*

HDL: *لیپوپروتئین با دانسیته بالا،* LDL: *لیپوپروتئین با دانسیته پایین،* ApoB: *آپولیپوپروتئین* B، *ApoA1 آپولیپوپروتئین* A1

غلظت ها بر اساس mg/dl *می باشد.*

بحث:

به نظر می رسد تعیین نقش پلی مورفیسم های CETP در پیش بینی حساسیت به بیماری و پاسخ های دارویی حایز اهمیت باشد.

در مطالعه حاضر غلظت پروفایل لیپیدی قبل و همچنین بعد از دریافت لواستاتین یا آتورواستاتین در بین ژنوتیپ های مختلف بررسی گردید. در کلیه افراد مورد مطالعه در تمام ژنوتیپ ها کاهش کلسترول تام دیده شد که ناشی از ماهیت عملکردی داروها یعنی

مهار آنزیم کنترل کننده مسیر تولید کلسترول داخلی (HMG CoA Reductase) توسط این داروها است. اما به دنبال مصرف لواستاتین در ژنوتیپ AA از پلی مورفیسم 629C/A- کاهش بیشتری در کلسترول تام دیده شد و به نظر می رسد در ژنوتیپ هایی از CETP که فعالیت CETP به دلیل آلل موجود کاهش یافته (آلل A) پاسخ بهتری در مورد کاهش کلسترول به درمان با لواستاتین نشان داده شده است.

یک احتمال برای کاهش بیشتر کلسترول در این ژنوتیپ می تواند این مسئله باشد که کلسترول بیشتر در این ژنوتیپ در HDL-C باقی مانده (به دلیل کم بودن فعالیت CETP) و این HDL-C های غنی از کلسترول از مسیر SR-B1 در کبد از پلاسما حذف شده اند. مسیر SR-B1 جزء گیرنده های مربوط به HDL-C است که در انتقال معکوس کلسترول باعث حذف ذرات HDL-C می گردد (۲۰،۱۹).

LDL-C در بین ژنوتیپ ها چه قبل از دریافت لواستاتین و آتورواستاتین و چه بعد از دریافت آنها، اختلافی را نشان نداده است. نبودن اختلاف در ژنوتیپ ها بدنبال درمان در مورد LDL-C ناشی از همان ماهیت مهاری بر آنزیم تولید کلسترول است که مستقل از CETP می باشد و در واقع کاهش در تمام ژنوتیپ ها در میزان LDL-C تقریباً به یک میزان صورت گرفته است و این نشان می دهد که تاثیر دارو در مهار تولید کلسترول مستقل از CETP عمل می نماید. تغییرات ApoB هم به تبعیت از کاهش LDL-C در هر سه ژنوتیپ به یک نسبت بوده است و تحت تاثیر تغییر فعالیت CETP در اثر تغییر ژنوتیپ ها قرار نگرفته است. کاهش ذرات حاوی تری گلیسرید از جمله LDL-C توسط آتورواستاتین و یا لواستاتین منجر به کاهش میزان تری گلیسرید در افراد مورد مطالعه گردیده است. در ژنوتیپ AA از پلی مورفیسم - 629C/A کاهش واضح تری نسبت به بقیه ژنوتیپ ها دیده می شود. به نظر می رسد در افراد دارای این ژنوتیپ بدلیل فعالیت پایین تر CETP و کاهش انتقال تری گلیسرید از ذرات حاوی تری گلیسرید به HDL-C ذرات درشت حاوی تری گلیسرید تولید می گردد که بیشتر تحت تاثیر هپاتیک لیپاز قرار می گیرند (۲۱) و بنابراین سریع تر از خون حذف می شوند.

HDL-C درژ نوتیپ های مختلف از ۸/۳ درصد تا ۲۰/۴ درصد در مصرف لواستاتین و از ۸/۱ درصد تا ۱۴/۶ درصد در مورد آتورواستاتین افزایش داشته است که بیشترین درصد افزایش در مورد هر دو دارو مربوط به ژنوتیپ AA می باشد که بیشتر تحت تاثیر استاتین قرار گرفته است. به نظر می رسد پایین تر بودن ذاتی CETP ناشی از پلی مورفیسم هایی که باعث کاهش غلظت یا فعالیت CETP می شوند (وجود آلل A در ۶۲۹-) باعث حساسیت بیشتر در فرد به استاتین می گردد و لذا افزایش HDL-C ناشی از مهار بیشتر CETP در این ژنوتیپ ها واضح تر بوده است.

در یک مطالعه وجود ژنوتیپ خاصی از پلی مورفیسم Taq1B2 با سطح بالاتر CETP در خون همراه بوده است که منجر به کاهش HDL-C در پلاسما شده است (۲۲). این ارتباط تحت تاثیر درمان با پاراواستاتین قرار گرفته است. به نظر می رسد پاراواستاتین در ژنوتیپ های B1B1 نسبت به B2B2 تاثیر کمتری داشته است (۲۲) که نتایج ما با نتایج این مطالعه تا حدی همسو می باشد.

همینطور در مطالعات دیگر وجود ژنوتیپ B1B1 در CETP با غلظت کمتر HDL-C و ریسک بالاتر بیماری های قلبی عروقی و پاسخ بیشتر تری گلیسرید به کاهش در مقابل داروی ژمفیبروزیل (Gemfibrozil) بوده است (۲۳) که این نتایج نیز تایید کننده نتایج مطالعات ما می باشد.

مکانیسم حفاظتی HDL-C در برابر بیماری قلبی عروقی هنوز بطور کامل شناخته نشده است اما نقش HDL-C در انتقال معکوس کلسترول (RCT) از اهمیت ویژه ای برخوردار است. بنابراین ارتباط ژنوتیپ های CETP با ریسک بیماری قلبی عروقی ناشی از تاثیرات CETP بر روی HDL-C می تواند ناشی از کاهش

RCT باشد. یک دلیل واضح افزایش HDL-C ناشی از استاتین ها که در مطالعه ما و مطالعات مشابه دیده شده، کاهش انتقال کلسترول استر از ذرات HDL-C به ذرات حاوی ApoB100 نظیر LDL-C به دلیل کاهش تولید این ذرات در اثر مهار HMG CoA Reductase بواسطه دارو است. یعنی علاوه بر تحت تاثیر قرار گرفتن غلظت و فعالیت CETP ناشی از مصرف استاتین ها دلیل دیگر افزایش HDL-C، کاهش سوبستـرای گیرنده کلسترول استر جهت انتقال معکوس کلسترول است.

در حضور لیپوپروتئین های غنی از تری گلیسرید، CETP، کلسترول استر موجود در ذرات HDL-C را حذف نموده و به جای آن تری گلیسرید قرار می دهد. همراه با عملکرد هپاتیک لیپاز تاثیر CETP بر HDL-C منجر به تولید HDL-C با اندازه های کوچکتر می گردد که با حذف سریع آنها از پلاسما توام است. بنابراین افزایش سطح CETP در خون با پایین بودن سطح HDL-C همراه می گردد.

در این مطالعه غلظت ApoA1 تحت تاثیر هر دو دارو افزایش یافته است بطوری که در گروه لواستاتین تا ۱۲ درصد و در گروه آتورواستاتین تا ۲۶ درصد افزایش غلظت در ApoA1 دیده شد.

بیشترین تغییر در اثر دارو در ژنوتیپ CC از پلی مورفیسم 629C/A- بوده است. این بدین معنی است که در ژنوتیپ هایی که غلظت HDL-C کمتر تحت تاثیر دارو قرار گرفته غلظت ApoA1 بیشتر افزایش یافته که حاکی از تولید ذرات HDL-C با پروتئین بیشتر بوده است و باید توجه نمود که عملکرد اصلی ذرات HDL-C بیشتر به واسطه بخش پروتئینی این ذرات است. آتورواستاتین به دلیل افزایش موثرتر در غلظت ApoA1 نسبت به لواستاتین، باعث تولید ذرات HDL با درصد پروتئین بیشتر می گردد و احتمالاً نقش موثرتری در عملکرد HDL در بیماری های قلبی عروقی خواهد داشت.

نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان می دهد تغییرات در ژنوتیپ های مختلف از پلی مورفیسم های بررسی شده یکسان نبوده و در ژنوتیپ هایی که غلظت CETP یا فعالیت آن کمتر بوده افزایش HDL-C به دنبال مصرف دارو واضح تر بوده است ولی علیرغم این افزایش بدلیل اینکه در ژنوتیپ های مذکور ApoA1 به نسبت کمتر افزایش یافته منجر به تولید ذرات HDL با نسبت لیپید به پروتئین بیشتر، در این ژنوتیپ شده است که این مسئله در نهایت در ژنوتیپ هایی که افزایش بیشتر بوده انتقال معکوس کلسترول کارآیی کمتری خواهد داشت. پس به نظر می رسد در افراد با ژنوتیپ CC از پلی مورفیسم -629C/A، ذرات HDL تولید شده به دلیل بالاتر بودن ApoA1 کارآیی بیشتری در انتقال معکوس کلسترول خواهند داشت در نتیجه مصرف استاتین ها با هدف افزایش HDL در این ژنوتیپ ها احتمالاً نتایج سودمندتری به دنبال خواهد داشت.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از کلیه کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی شهرکرد و همچنین پرسنل محترم معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد کمال تشکر و قدردانی را داریم .هزینه این طرح توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد با شماره گرانت ۵۱۱ تامین گردیده است.

منابع:

1. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. J Lipid Res. 1995 Feb; 36(2): 211-28.

2. Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. J Lipid Res. 1999 May; 40(5): 781-96.

3. Barter PJ, Rye KA. Cholesteryl ester transfer protein, high density lipoprotein and arterial disease. Curr Opin Lipidol. 2001 Aug; 12(4): 377-82.

4. Borggreve SE, De Vries R, Dullaart RP. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. Eur J Clin Invest. 2003 Dec; 33(12): 1051-69.

5. Stein O, Stein Y. Lipid transfer proteins (LTP) and atherosclerosis. Atherosclerosis. 2005 Feb; 178(2): 217-30.

6. Hirano K, Yamashita S, Nakajima N, Arai T, Maruyama T, Yoshida Y, et al. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency is extremely frequent in the Omagari area of Japan. Marked hyperalphalipoproteinemia caused by CETP gene mutation is not associated with longevity. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997 Jun; 17(6): 1053-9.

7. Yamashita S, Maruyama T, Hirano K, Sakai N, Nakajima N, Matsuzawa Y. Molecular mechanisms, lipoprotein abnormalities and atherogenicity of hyperalphalipoproteinemia. Atherosclerosis. 2000 Oct; 152(2): 271-85.

8. Sakai N, Yamashita S, Hirano K, Ishigami M, Arai T, Kobayashi K, et al. Decreased affinity of low density lipoprotein (LDL) particles for LDL receptors in patients with cholesteryl ester transfer protein deficiency. Eur J Clin Invest. 1995 May; 25(5): 332-9.

9. Boekholdt SM, Kuivenhoven JA, Hovingh GK, Jukema JW, Kastelein JJ, Van Tol A. Curr Opin Lipidol. CETP gene variation: relation to lipid parameters and cardiovascular risk.2004 Aug; 15(4): 393-8.

10. Klerkx AHEM, Tanck MWT, Kastelein JJP, Molhuizen HOF, Jukema JW, Zwinderman AH, et al. Haplotype analysis of the CETP gene: not TaqIB, but the closely linked -629C-A polymorphism and a novel promoter variant are independently associated with CETP concentration. Hum Mol Genet. 2003 Jan; 12(2): 111-23.

11. Dachet C, Poirier O, Cambien F, Chapman MJ, Rouis M. New functional promoter polymorphism, CETP/-629, in cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene related to CETP mass and high density lipoprotein cholesterol levels: role of Sp1/Sp3 in transcriptional regulation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 Feb; 20(2): 507-15.

12. Kakko S, Tamminen M, Paivansalo M, Kauma H, Rantala AO, Lilja , et al. Variation at the cholesteryl ester transfer protein gene in relation to plasma high density lipoproteins cholesterol concentrations and carotid intima media thickness. Eur J Clin Invest, 2001; 31: 593-602.

13. Tavintharan S, Lim SC, Sum CF. Patients with low levels of high-density lipoprotein cholesterol: to treat or not to treat? Singapore Med J. 2005 Oct; 46(10): 519-28.

14. Kassai A, Illyes L, Mirdamadi HZ, Seres I, Kalmar T, Audikovszky M, Paragh G. The effect of atorvastatin therapy on lecithin: cholesterol acyltransferase, cholesteryl ester transfer protein and the antioxidant paraoxonase. Clin Biochem. 2007 Jan; 40(1-2): 1-5.

15. Kuivenhoven JA, Jukema JW, Zwinderman AH, de Knijff P, McPherson R, Bruschke AV, et al. The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group. N Engl J Med. 1998 Jan; 338(2): 6-93.

16. van Venrooij FV, Stolk RP, Banga JD, Sijmonsma TP, van Tol A, Erkelens DW, et al. DALI Study Group. Common cholesteryl ester transfer protein gene polymorphisms and the effect of atorvastatin therapy in type 2 diabetes. Diabetes Care. 2003 Apr; 26(4): 1216-23.

17. Dale JW, Schantz MV. Purification and separation of nucleic acid. In: from genes to genomes. University of Surrey. UK: John Wiley; 2002. p: 31-3.

18. Padmaja N, Ravindra Kumar M, Soya SS, Adithan C. Common variants of Cholesteryl ester transfer protein gene and their association with lipid parameters in healthy volunteers of Tamilian population. Clin Chim Acta. 2007 Jan; 375(1-2): 140-6.

19. Brewer HB Jr, Remaley AT, Neufeld EB, Basso F, Joyce C. Regulation of plasma high-density lipoprotein levels by the ABCA1 transporter and the emerging role of high-density lipoprotein in the treatment of cardiovascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Oct; 24(10): 1755-60.

20. Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. Proc Natl Acad Sci USA. 2004 Jun; 101(26): 9774-9.

21. Borggreve SE, Hillege HL, Wolffenbuttel BH, de Jong PE, Bakker SJ, van der Steege G, et al. The effect of cholesteryl ester transfer protein -629C->A promoter polymorphism on high-density lipoprotein cholesterol is dependent on serum triglycerides. J Clin Endocrinol Metab. 2005 Jul; 90(7): 4198-204.

22. Regieli JJ, Jukema JW, Grobbee DE, Kastelein JJ, Kuivenhoven JA, Zwinderman AH, et al. CETP genotype predicts increased mortality in statin-treated men with proven cardiovascular disease: an adverse pharmacogenetic interaction. Eur Heart J. 2008 Nov; 29(22): 2792-9.

23. Okamoto H, Yonemori F, Wakitani K, Minowa T, Maeda K, Shinkai H. A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosis in rabbits. Nature. 2000 Jul; 406(6792): 203-7.

Journal of Shahrekord University
Of
Medical Sciences

19/Jan/2010 Accepted: *Received: 19/Apr/2010*

Study of -629C/A polymorphism of cholesteryl ester transfer protein gene in statin effects on plasma high density lipoprotein cholesterol level.

, Amini SA **, Gatreh Samani K (PhD)[1]*Farrokhi E (MSc) (PhD)***, Hashemzadeh Chaleshtori M (PhD)†, Moradi MT (MSc)†††, Amini Najafabadi H (MSc)††

**Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran, **Biochemist, Medical Plants Research Center, Shahrekord Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran, ***Assistant professore, Biochemistry Dept., Shahrekord Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran, †Professor of Human Genetics, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran, ††Medical Plants Research Center, Shahrekord Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran, †††Lecturer, Biochemistry Dept., Shahrekord Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran*

Background and aim: Cholesteryl ester transfer protein (CETP) plays in HDL metabolism and in reverse cholesterol transport (RCT) pivotal role pathway. CETP gene variants such as -629C/A that affect HDL cholesterol directly, modulates CETP gene transcriptional activity. This study was aimed to determine influence of -629C/A polymorphism of CETP in statin effects with regard to plasma HDL cholesterol levels.

Methods: In this descriptive-analytical study, 196 adult patients with LDL-C more than 120mg/dL were divided into two groups base on lovastatin and atorvastatin using. Lipid profile was measured in all subjects before and after treatment and -629C/A polymorphism of CETP promoter was studied using polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism method. Data were compared with paired t-test and ANOVA in SPSS software.

Results: Cholesterol was decreased and HDL was increased in AA genotype more than other genotypes by lovastatin, but ApoA1 was increased in CC genotype. ApoA1 also was increased in CC genotype more than AA or AC genotypes by atorvastatin.

Conclusion: In CC genotype, lovastatin and specially atorvastatin increased ApoA1 in HDL particles more than other genotypes. Therefore, treatment with lovastatin and atorvastatin is more effective in patients with CC genotype for raising HDL particles activity.

Keywords: **Atorvastatin**, **Cholesteryl ester transfer protein (CETP), -629C/A, Polymorphism, Lovastatin, HDL-C.**

[1]***Corresponding author****:*
Medical Plants Research Center, Rahmatieh, Shahrekord Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran.
Tel:
0381-3346692
E-mail:
kgsamani@yahoo.com