

## بررسی ارتباط فعالیت آنزیم پاراکساناز ۱ و چند شکلی های ناحیه پروموتری ژن آنزیم (۱۰۸-، ۱۲۶-) در دیابت نوع دو

آصفه سادات امامی<sup>۱</sup>، محمدحسن تاج الدینی<sup>۲</sup>، مجتبی بهشتی تبار<sup>۳</sup>، صدیقه عسگری<sup>۴\*</sup>

<sup>۱</sup>دانشجو، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران؛ <sup>۲</sup>مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ <sup>۳</sup>گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران؛ <sup>۴</sup>مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان، پژوهشکده قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱

### چکیده:

زمینه و هدف: پاراکساناز ۱ (PON<sub>1</sub>) گلیکوپروتئینی است که در کبد ساخته شده و به سیستم گردش خون وارد می شود. در میان افراد یک جمعیت فعالیت PON<sub>1</sub> به طور وسیعی متفاوت است. بیشتر این اختلافات، توسط پلی مورفیسم های ناحیه کدینگ (ناحیه کدکننده) Q192R و ناحیه تنظیمی (راه انداز) T-108C توجه می شود. Q192R به طور وسیعی مطالعه شده است. برخی مطالعات (نه همه) نشان داده اند که فعالیت PON<sub>1</sub> در دیابت نوع دو کاهش می یابد. ما در این مطالعه به بررسی فعالیت آنزیم PON<sub>1</sub> سرم و رابطه آن با پلی مورفیسم های پروموتری -108 C/T و -126 C/G در بیماران دیابتی و افراد غیر دیابتی پرداختیم.

روش بررسی: در مطالعه مقطعی حاضر، فعالیت آنزیم پاراکساناز ۱ به روش اسپکتروفتومتری و نوع و فراوانی پلی مورفیسم های ۱۲۶- و ۱۰۸- آنزیم، به روش HRM (High resolution melt)- Real time PCR در ۹۶ بیمار دیابت نوع دو و ۱۰۴ فرد غیردیابتی مورد بررسی قرار گرفته است.

یافته ها: فعالیت آنزیم PON<sub>1</sub> در دو گروه، از لحاظ آماری تفاوت مهمی نداشت (P=۰/۶۷۱)؛ همچنین اختلاف مهمی در نوع و فراوانی پلی مورفیسم ۱۰۸- در دو گروه یافت نشد (P=۰/۲۷۷). لیکن اختلاف مهمی در نوع و فراوانی پلی مورفیسم ۱۲۶- در بیماران دیابتی و افراد غیر دیابتی وجود داشت (P=۰/۰۰۰).

نتیجه گیری: نتایج نشان دادند که فعالیت PON<sub>1</sub> بین افراد دیابتی و غیردیابتی تفاوتی ندارد. از آنجا که توزیع پلی مورفیسم ۱۰۸- در دو گروه یکسان بود، شاید بتوان آن را، علت یکسان بودن فعالیت آنزیم در دو گروه دانست. لیکن علی رغم یکسان بودن فعالیت آنزیم، توزیع پلی مورفیسم ۱۲۶- بین افراد دیابتی و غیردیابتی به طور مهمی متفاوت بود، بنابراین شاید بتوان آن را به استعداد ژنتیکی دیابت نوع دو مربوط دانست.

واژه های کلیدی: دیابت نوع دو، فعالیت آنزیم پاراکساناز ۱، پلی مورفیسم ژن، PON<sub>1</sub>.

### مقدمه:

آنزیمی به نام آنزیم پاراکساناز ۱ کاهش می یابد (۴،۳). آنزیم پاراکساناز (PON<sub>1</sub>)، همراه با HDL در خون انتقال یافته و مانع تجمع پراکسیدهای لیپیدی در LDL می شود (۵-۸). در جمعیت های مختلف، مقادیر گوناگون از فعالیت PON<sub>1</sub>، در افراد مشاهده می شود. این اختلافات می تواند اثر پلی مورفیسم های ناحیه کدینگ (رمزگردان) و پروموترون PON<sub>1</sub> و نیز عوامل محیطی

دیابت ملیتوس نوع دو، توسط عواملی نظیر شیوه زندگی، عوامل محیطی و برگ خریدهای ژنتیکی به وجود می آید. تا به امروز مطالعات گوناگونی پیرامون مکانیسم بیماری زایی دیابت به وسیله آزمایش ها ژنتیکی انجام شده و صدها ژن گزارش شده است که مرتبط با دیابت ملیتوس بوده اند (۲،۱). برخی مطالعات (نه همه) نشان داده اند که در بیماران دیابتی نوع دو، فعالیت

و زنان، باردار نبودند. میانگین سن افراد، در دو گروه، تفاوت معنی داری نداشت ( $P=0/421$ ). از افراد انتخاب شده، ۳ میلی لیتر خون گرفته شد. ۱ میلی لیتر آن، جهت تعیین پلی مورفیسیم در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - همراه EDTA، ذخیره و ۲ میلی لیتر آن، به منظور اندازه گیری فعالیت آنزیم، پس از استخراج سرم در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شد. اندازه گیری فعالیت آنزیم، با افزودن محلول Eserin ( $10^{-5}\text{M}$ ) به سرم و انکوباسیون، به مدت ۱۰ دقیقه، سپس افزودن محلول حاصل به محلول پاراکسان که شامل Tris/HCl، (۱۰۰ میلی مولار،  $\text{pH}=8$ ) (Sigma-Aldrich) و ۲ میلی مولار  $\text{CaCl}_2$  و پاراکسان ۲ میلی مولار بود و استفاده از متد اسپکتروفوتومتری، در طول موج ۴۰۵ نانومتر و خوانش ۵ دقیقه برای هر نمونه انجام شد (۱۴،۷). به منظور تعیین پلی مورفیسیم های ۱۰۸- و ۱۲۶- آنزیم پاراکساناز ۱، استخراج DNA به وسیله کیت Accue prep Genomic DNA Extraction kit (Bioneer inc, korea) صورت گرفته و پس از شناسایی SNPs از طریق NCBI data bank، پرایمرهای مورد نیاز به کمک: (PREMIER Biosoft international, USA) طراحی و سنتز شدند. (Bioneer, Korea) به منظور تکثیر نواحی مورد نظر PCR (و نیز تعیین ژنوتیپ ها توسط متد High Resolution Melt (HRM)، دستگاه Rotor-Gene 6000 (Corbett Life science Australia) مورد استفاده قرار گرفت. واکنش های PCR با استفاده از Type it HRM kit (Qiagen)، بافر HRM PCR، نوکلئوتیدها و رنگ Evagreen، همچنین از آنزیم HotStarTaq Plus DNA Polymerase و ۲۵ میکروگرم از DNA استخراج شده صورت گرفت. ابتدا مرحله فعال سازی آنزیم HotStarTaq Plus DNA Polymerase (موجود در Master Mix) در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. سپس واکنش PCR در ۵۰ سیکل ۳ مرحله ای دنبال شد. زمان مورد نیاز مرحله annealing که پرایمرها به DNA تک رشته ای متصل شدند ۳۰ ثانیه بوده و در دمای  $55^{\circ}\text{C}$  انجام شد. در

باشد که هم بر غلظت و هم بر فعالیت آنزیم تأثیرگذارند. مهم ترین فاکتورهای به وجود آورنده این اختلافات، پلی مورفیسیم های C-108T پروموتور و Q192R ناحیه کدینگ می باشند (۹-۱۰). سایت ۱۰۸- مهم ترین عامل برای تعیین میزان  $\text{PON}_1$  سرم است و اثر مهمی بر بیان  $\text{PON}_1$  سرم انسان دارد، از این رو موضوع بیشتر تحقیقات است (۱۱). به هر حال امکان بررسی همزمان همه عوامل، بر فعالیت آنزیم وجود ندارد. ویژگی های آنزیمی  $\text{PON}_1$ ، آن را به عنوان لاکتوزاز مطرح می کند.  $\text{PON}_1$  هیدرولیز لاکتون های N-آسیل هموسرین سیگنال های حسی باکتری های بیماری زا را، کاتالیز می کند. همچنین به علت فعالیت در هیدرولیز متابولیت های سمی حشره کش ها و ارگونوفسفروس ها مانند پاراتیون، سومان، سارین و ترکیبات جنگی عصبی، بسیار مورد توجه است (۱۲، ۱۳). با توجه به این که فراوانی پلی مورفیسیم های ژن پاراکساناز ۱، در جوامع مختلف متفاوت است بایستی فراوانی پلی مورفیسیم های ژن آنزیم و فعالیت آن در جوامع مختلف بررسی شود تا تأثیر این پلی مورفیسیم ها بر فعالیت آنزیم ایجاد بیماری کاملاً روشن شود. هدف از این مطالعه بررسی میزان فعالیت آنزیم در بیماران دیابتی نوع دو و مقایسه آن با افراد غیر دیابتی و رابطه فعالیت  $\text{PON}_1$  با پلی مورفیسیم های ناحیه پروموتوری آن (۱۰۸- و ۱۲۶-) در دو گروه مذکور می باشد.

## روش بررسی:

مطالعه حاضر یک مطالعه مقطعی است. انتخاب جامعه مورد مطالعه (۹۴ بیمار دیابتی و ۱۰۶ فرد غیر دیابتی) از مراجعین بیمارستان صدیقه طاهره (س) اصفهان، صورت گرفت. افراد دیابتی بر اساس معیارهای FBS بالای ۱۲۵ میلی گرم بر دسی لیتر یا  $\text{HbA}_{1c}$  بالای ۶/۵٪ انتخاب شدند. افراد غیر دیابتی پدر، مادر، خواهر یا برادر مبتلا به دیابت نداشتند. در دو گروه، تعداد مردان و زنان، تقریباً برابر انتخاب شده

## یافته‌ها:

جمعیت مورد مطالعه، ۹۴ بیمار دیابتی، مرد و زن با میانگین سنی (۵۸/۱۳±۱۲/۸۷) و ۱۰۶ فرد غیر دیابتی مرد و زن با میانگین سنی (۵۹/۷۵±۱۲/۲۹) بودند. سن و جنس افراد در دو گروه تفاوت معنی‌داری نداشت (به ترتیب  $P=0/۴۲۱$  و  $P=0/۷۵۱$ ). میانگین فعالیت آنزیم پاراکساناز ۱ در افراد دیابتی  $۱۲۲/۷±۶۶/۴۴$  و میانگین فعالیت آنزیم در افراد غیر دیابتی  $۱۲۶/۹۲±۷۶/۱۸$  تعیین شد. با وجود اختلاف میانگین‌ها، فعالیت آنزیم پاراکساناز ۱ بین دو گروه دیابتی و غیر دیابتی تفاوت معنی‌داری نداشت ( $P=0/۶۷۱$ ). در مرحله بعد استخراج DNA و سپس تکثیر ژن مورد نظر به وسیله Real time PCR انجام شد. سپس از تکنیک HRM استفاده نموده و منحنی‌های دقیق در ناحیه melt توسط نرم‌افزار دستگاه رسم شد.

در منحنی ذوب با داده‌های نرمالیزه، ناحیه Pre-melt و Post-melt حذف شده و تنها ناحیه Melt نمایش داده شده است. دو منحنی هموزیگوت و یک منحنی هتروزیگوت، کاملاً مشخص می‌باشند؛ ولی هنوز تشخیص فرم‌های هموزیگوت مشکل است. نمودار شماره ۱ منحنی اختلاف (Difference graph) مربوط به پلی مورفیسم ۱۰۸- می‌باشد. در این نمودار اختلاف سه منحنی واضح‌تر نشان داده می‌شود و تفکیک منحنی‌ها کامل‌تر صورت می‌گیرد. نرم‌افزار در این مرحله تغییرات فلورسانس دو منحنی را، نسبت به منحنی دیگر در برابر دما رسم می‌کند. به عنوان مثال ژنوتیپ هموزیگوت را به عنوان اساس در نظر گرفته و دو ژنوتیپ دیگر را نسبت به آن رسم می‌کند. برای هر موتاسیون یک منحنی نرمالیزه و برای هر منحنی نرمالیزه سه منحنی خواهیم داشت که در هر کدام یک ژنوتیپ به عنوان اساس در نظر گرفته شده و ژنوتیپ‌های دیگر نسبت به آن سنجیده و رسم می‌شوند. (یک منحنی نشان داده شده است). پس از انجام HRM Real Time PCR منحنی هر نمونه تعیین شده نمونه‌ها در سه گروه قرار شدند (دو گروه

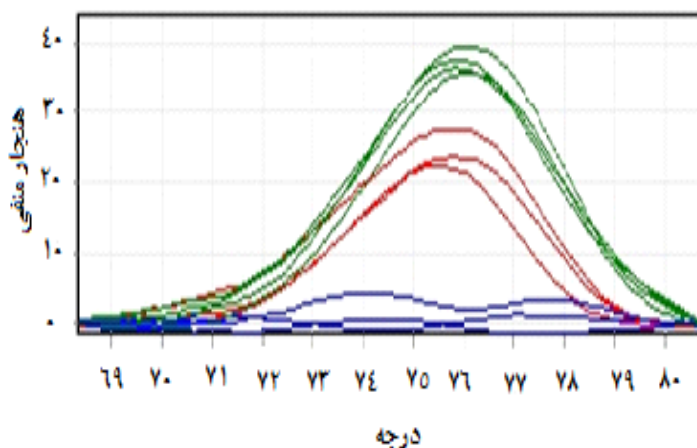
مرحله‌ی Extentional در مدت ۱۰ ثانیه در دمای  $۷۲^{\circ}\text{C}$  رشته‌ی DNA مکمل رشته‌ی الگو در ناحیه‌ی اتصال پرایمرها ساخته شد.

پس از انجام واکنش‌های PCR، تکنیک HRM به کمک کیت HRM انجام شد. کیت HRM شامل ترکیبات Taq پلیمرز،  $10\text{ X}$ ، dNTP، B. sh arpener، Dye. Eva green،  $\text{H}_2\text{O}$  است که برای هر نمونه مقدار لازم در کیت آورده شده است (هر بار ۷۰ نمونه در دستگاه قرار می‌دهیم). ابتدا در یک میکروتیوب، از محلول فوق را ریخته و داخل ورتکس مخلوط نموده و سپس در هر لوله reaction مربوط به دستگاه HRM، ۱۳ میکرولیتر ریخته و به آن ۲ میکرولیتر از نمونه DNA مورد نظر به عنوان الگو (Template) اضافه کردیم. سپس، دما به  $۶۵^{\circ}\text{C}$  کاهش یافته و هر ۲ ثانیه  $0/۱^{\circ}\text{C}$  افزایش یافت. با افزایش دما دو رشته‌ی DNA های ساخته شده در مراحل PCR از هم جدا شده و رنگ متصل شونده به DNA دو رشته‌ای آزاد شد و در نتیجه مقدار فلورسانس ثبت شده توسط دستگاه به تدریج کاهش یافت. این روند تا رسیدن به دمای  $۹۵^{\circ}\text{C}$  ادامه یافته و منحنی ذوب با استفاده از تغییرات فلورسانس ثبت شده در این بازه‌ی دمایی توسط نرم‌افزار مربوطه رسم گردید. پس منحنی ذوب مربوط به هر نمونه رسم گردید. در پایان از هر سه نوع منحنی ذوب به دست آمده که دو منحنی مربوط به آلل‌های هموزیگوت و یک منحنی مربوط به آلل‌های هتروزیگوت است (هر نمونه یک منحنی دارد)، تعدادی نمونه انتخاب و تمامی نمونه‌ها تعیین توالی شدند.

نتایج به دست آمده برای فعالیت آنزیم به صورت میانگین و انحراف معیار و با سطح اطمینان ۹۵٪ با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری t-test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. سطح معنی‌داری نیز ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. نتایج به دست عمده برای توزیع پلی مورفیسم‌ها به وسیله آزمون  $\chi^2$  مورد بررسی آماری قرار گرفت.

تهران با دستگاه: Applied biosystems مدل دستگاه:  
x13730/3730 توالی های ذکر شده در تمامی نمونه ها  
تعیین شد و مورد بررسی آنالیز آماری قرار گرفت.

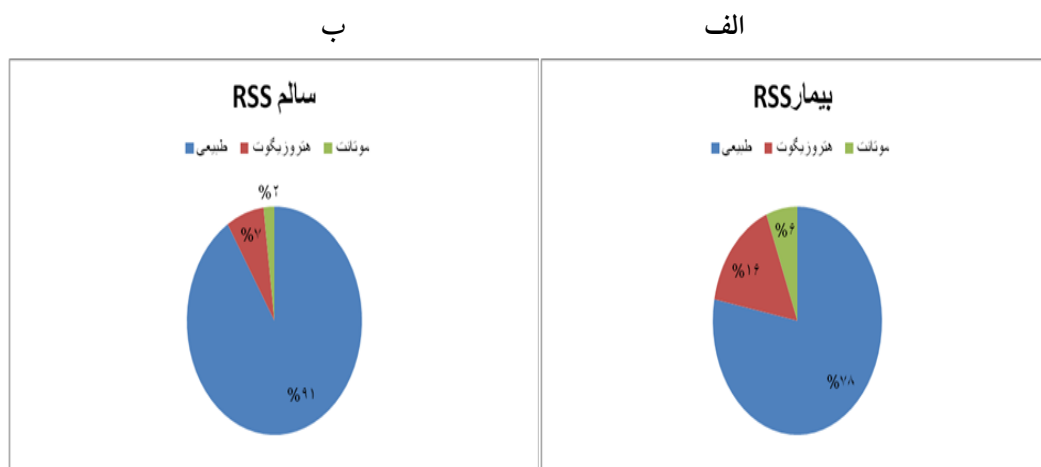
هموزیگوت و یک گروه هتروزیگوت). از هر گروه  
تعدادی نمونه های حاوی DNA تکثیر شده، جهت تعیین  
توالی و Sequencing از طریق شرکت تکاپو زیست



نمودار شماره ۱: منحنی اختلاف پلی مورفیسم ۱۰۸- ژن پاراکساناز ۱

آماري نشان داد که تفاوت معنی داری در نوع و فراوانی پلی مورفیسم ۱۰۸- بین دو گروه وجود ندارد ( $P=0/277$ ). در پلی مورفیسم ۱۲۶- در افراد غیر دیابتی ۹۱٪ دارای آلل طبیعی C/C بودند؛ در حالی که در بیماران دیابتی ۷۸٪ دارای آلل طبیعی بودند. آنالیز آماری تفاوت مهمی در نوع و فراوانی پلی مورفیسم ۱۲۶- بین دو گروه نشان داد ( $P=0/000$ ).

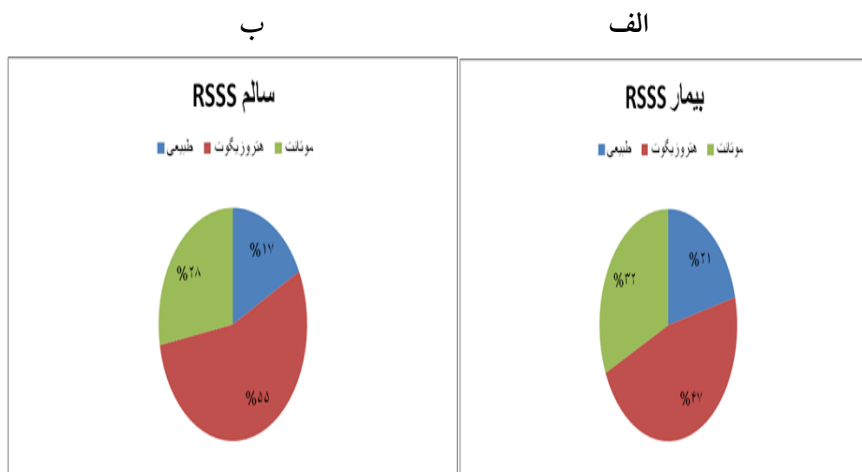
نمودارهای ۲ و ۳ توزیع آلل های هموزیگوت طبیعی، هتروزیگوت و آلل های موتانت پلی مورفیسم های ۱۲۶- و ۱۰۸- را در بیماران دیابتی و گروه کنترل مقایسه می کند. در پلی مورفیسم ۱۰۸- در دو گروه، بیشتر افراد دارای آلل های هتروزیگوت C/T (۴۷٪ از بیماران دیابتی و ۵۵٪ از افراد غیر دیابتی) نسبت به آلل های هموزیگوت C/C و T/T بودند. آنالیز



نمودار شماره ۲: نمودار دایره ای، فراوانی آلل های طبیعی (C/C)، هتروزیگوت (C/G) و موتانت (G/G)

پلی مورفیسم ۱۲۶- ژن پاراکساناز

الف) افراد دیابت؛ ب) گروه کنترل.



نمودار شماره ۳: نمودار دایره‌ای، فراوانی آل‌های طبیعی (C/C) و هتروزیگوت (C/T) و موتانت (T/T) پلی

مورفیسیم ۱۰۸-

الف) گروه کنترل؛ ب) افراد دیابت.

## بحث:

فعالیت آنزیم  $PON_1$  را در دیابت ملیتوس نوع دو، حتی در بیماران دیابتی تحت درمان گزارش نموده‌اند (۱۹). همچنین Poh و Muniandy نشان دادند که (حذف کلمه به طور کلی) فعالیت  $PON_1$  در بیماران دیابتی نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابد (حذف یک جمله). Poh و Muniandy گزارش دادند که فعالیت  $PON_1$  در افراد سالم و دیابتی‌های بدون عوارض دیابت، مشابه است و (حذف کلمه تنها) در بیماران دیابتی مبتلا به عوارض دیابت به میزان قابل توجهی کاهش یافته است (۲۰).

از سوی دیگر در برخی بررسی‌ها، کاهش چشمگیری در فعالیت  $PON_1$ ، در بیماران دیابتی مبتلا به پیامدهای قلبی-عروقی و نوروپاتی مشاهده نشده است (۲۱، ۲۲). Rahmani و همکاران گزارش داد که اختلاف معنی‌داری در فعالیت  $PON_1$  در بیماران CAD مبتلا به دیابت و افراد سالم وجود ندارد (۲۱). Hofer و همکاران نشان داد که فعالیت  $PON_1$  در افراد سالم و بیماران دیابتی مبتلا به عوارض دیابت یکسان است (۲۲). در مطالعه حاضر فعالیت  $PON_1$  در بیماران دیابتی و افراد غیر دیابتی، تعیین شده اثر پلی مورفیسیم‌های پروموتور بر فعالیت آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. در

مقادیر گوناگون فعالیت آنزیم  $PON_1$ ، در جمعیت‌های مختلف گزارش شده است. این تفاوت‌ها، تأثیر پلی مورفیسیم‌های ناحیه کدینگ و پروموتور ژن  $PON_1$  و نیز عوامل محیطی می‌باشند که هم بر غلظت و هم بر فعالیت آنزیم تأثیر گذارند (۹-۱۱). در یک جمعیت فعالیت  $PON_1$  تا ۴۰ برابر می‌تواند متغیر باشد. مهم‌ترین فاکتورهای به وجود آورنده این اختلافات، پلی مورفیسیم‌های C-108T پروموتور و Q192R ناحیه کدینگ می‌باشند (۱۰). سایت ۱۰۸- مهم‌ترین عامل برای تعیین میزان  $PON_1$  سرم است و اثر مهمی بر بیان  $PON_1$  سرم انسان دارد، از این رو موضوع بیشتر تحقیقات است (۱۱، ۱۵). ناحیه ۲۰۰bp که پلی مورفیسیم‌های ۱۶۲- و ۱۰۸- را در بر می‌گیرد، در رونویسی از ژن  $PON_1$  نقش اصلی را دارد (۱۱، ۱۵). پلی مورفیسیم‌های  $PON_1$  با برخی بیماری‌ها در ارتباط اند. پلی مورفیسیم Q192R ناحیه کدینگ به طور وسیعی مطالعه شده است (۱۱). برخی مطالعات گزارش داده‌اند که پلی مورفیسیم‌های ناحیه کدینگ  $PON_1$  با بیماری‌های قلبی-عروقی، رتیئوپاتی و نوروپاتی در بیماران دیابتی مرتبط می‌باشند (۱۱، ۱۶-۱۸). لیکن نقش پروموتور با بیماری هنوز روشن نیست (۱۱). Oner و همکاران، کاهش در

## نتیجه گیری:

به نظر می‌رسد که به علت یکسان بودن پلی مورفیسیم C/T ۱۰۸- ناحیه پروموتری پاراکساناز ۱ در بیماران دیابتی و افراد غیر دیابتی جمعیت مورد مطالعه ما، میزان فعالیت آنزیم در دو گروه یکسان بوده است. ما تأثیر مهم این پلی مورفیسیم را بر فعالیت آنزیم که در مطالعات گذشته ذکر شده است، در مقایسه بین افراد دیابتی و غیر دیابتی تأیید می‌کنیم. از آنجا که با وجود یکسان بودن فعالیت آنزیم، توزیع پلی مورفیسیم ۱۲۶- در بیماران دیابتی و افراد غیر دیابتی تفاوت مهمی داشت، به نظر می‌رسد پلی مورفیسیم ذکر شده در فعالیت آنزیم در افراد دیابتی تأثیر مهمی نداشته باشد، لیکن ممکن است از عوامل افزایش دهنده ریسک ابتلا به دیابت یا استعداد ژنتیکی دیابت باشد. از آنجا که در میان عوامل موثر بر فعالیت  $PON_1$ ، پلی مورفیسیم ۱۰۸- عامل تعیین کننده مهم به نظر می‌رسد، بررسی مکانیسم مولکولی تنظیم  $PON_1$  در پلی مورفیسیم ۱۰۸- و احتمالاً به کمک مهندسی ژنتیک، می‌تواند ما را برای افزایش بیان و فعالیت این آنزیم یاری نماید. همچنین مطالعات مولکولی زیادی لازم است تا چگونگی تأثیر احتمالی پلی مورفیسیم ۱۲۶- و تنظیم کننده‌های آن، بر ایجاد بیماری دیابت روشن شود. ممکن است با شناسایی مکانیسم تنظیم این پلی مورفیسیم، راهکارهایی جهت کنترل دیابت حاصل شود.

## تشکر و قدردانی:

این پایان نامه پاییز ۹۳ در دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد و مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان با کد ۹۴۱۱۲ به تصویب رسید. نویسندگان این مقاله از کلیه پرسنل آزمایشگاه تشخیص طبی بیمارستان صدیقه طاهره (س) اصفهان و مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و نیز کلیه بیمارانی که در اجرای این تحقیق با ما همکاری نمودند، قدردانی و تشکر می‌نمایند.

نتیجه این مطالعه، همانند نتایج مطالعات Rahmani همکاران و Hofer و همکاران، کاهشی در فعالیت  $PON_1$  در بیماران دیابتی نوع دو نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد ( $P=0/671$ ) (۲۲،۲۱).

از طرف دیگر، پس از بررسی پلی مورفیسیم های پروموتر، فراوانی پلی مورفیسیم C/T ۱۰۸- در دو گروه، از لحاظ آماری یکسان بود ( $P=0/277$ ). شاید به علت فراوانی یکسان پلی مورفیسیم ذکر شده در دو گروه مورد مطالعه ما، فعالیت آنزیم در افراد دیابتی و غیر دیابتی یکسان بوده است. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که پلی مورفیسیم C/T ۱۰۸- در فعالیت آنزیم  $PON_1$ ، بیش از سایر پلی مورفیسیم ها تأثیر داشته است (۱۵،۱۱). ما تأثیر مهم این پلی مورفیسیم را بر فعالیت  $PON_1$  و در مقایسه بیماران دیابتی و افراد غیر دیابتی تأیید می‌کنیم. در مطالعات گذشته پلی مورفیسیم A/G ۱۲۶- به عنوان یکی از پلی مورفیسیم های موثر بر بیان ژن  $PON_1$  گزارش شده است (۱۵،۱۱). ما پس از بررسی این پلی مورفیسیم، تفاوت مهمی، در فراوانی آن در دو گروه مورد مطالعه یافتیم ( $P=0/000$ ). علیرغم آن که فعالیت آنزیم در دو گروه تفاوت قابل ملاحظه‌ای نداشت. در نتیجه این مطالعه به نظر می‌رسد که پلی مورفیسیم ذکر شده تأثیر چشمگیری بر فعالیت آنزیم در دیابت ملیتوس نوع دو نداشته باشد. از سوی دیگر، از آنجا که فراوانی پلی مورفیسیم C/G ۱۲۶- در گروه دیابتی و افراد غیر دیابتی در جمعیت مورد مطالعه ما، از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری داشت، بنابراین شاید بتوان این پلی مورفیسیم را از عوامل افزایش دهنده ریسک ابتلا به دیابت نوع دو و یا استعداد ژنتیکی دیابت دانست. از آنجا که در جمعیت‌های مختلف ممکن است، پلی مورفیسیم های  $PON_1$  توزیع متفاوتی داشته باشند (۱۵)، باید مطالعات بیشتری در جمعیت‌های دیگر صورت بگیرد تا فراوانی پلی مورفیسیم های ذکر شده و تأثیر آن‌ها بر "فعالیت آنزیم و ریسک ابتلا به دیابت" کاملاً روشن شود.

## منابع:

1. Kim YJ, Lee SY, Park Y-K, Kim J. DMBase: An integrated genetic information resource for diabetes mellitus. *Interdisciplinary Bio Central*. 2011; 3(1): 6.
2. Rathmann W, Giani G. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care*. 2004; 27(10): 2568-9.
3. Gupta N, Binukumar B, Singh S, Sunkaria A, Kandimalla R, Bhansali A, et al. Serum paraoxonase-1 (PON<sub>1</sub>) activities (PONase/AREase) and polymorphisms in patients with type 2 diabetes mellitus in a North-West Indian population. *Gene*. 2011; 487(1): 88-95.
4. Ikeda Y, Suehiro T, Inoue M, Nakauchi Y, Morita T, Arii K, et al. Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. 1998; 47(5): 598-602.
5. Litvinov D, Mahini H, Garelnabi M. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases. *North Am J Med Sci*. 2012; 4(11): 523.
6. Ceron JJ, Tecles F, Tvarijonaviciute A. Serum paraoxonase 1 (PON<sub>1</sub>) measurement: An update. *BMC Vet Res*. 2014; 10(1): 74.
7. Kim DS, Burt AA, Ranchalis JE, Richter RJ, Marshall JK, Nakayama KS, et al. Dietary cholesterol increases paraoxonase 1 enzyme activity. *J Lipid Res*. 2012; 53(11): 2450-8.
8. Ferretti G, Bacchetti T, Busni D, Rabini R, Curatola G. Protective effect of paraoxonase activity in high-density lipoproteins against erythrocyte membranes peroxidation: A comparison between healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(6): 2957-62.
9. Flekac M, Skrha J, Zidkova K, Lacinova Z, Hilgertova J. Paraoxonase 1 gene polymorphisms and enzyme activities in diabetes mellitus. *Pharm Res*. 2008; 57(5): 717.
10. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON<sub>1</sub>) activity. *Biochem Pharmacol*. 2005; 69(4): 541-50.
11. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci*. 2004; 107(5): 435-47.
12. Rainwater DL, Rutherford S, Dyer TD, Rainwater ED, Cole SA, VandeBerg JL, et al. Determinants of variation in human serum paraoxonase activity. *Heredity*. 2009; 102(2): 147.
13. Harel M, Brumshtein B, Meged R, Dvir H, Ravelli R, McCarthy A, et al. 3-D structure of serum paraoxonase 1 sheds light on its activity, stability, solubility and crystallizability. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2007; 58(3): 347-53.
14. Quemeneur T, Martin-Nizard F, Kandoussi A, Kyndt X, Vanhille P, Hachulla E, et al., editors. PON<sub>1</sub>, a new biomarker of cardiovascular disease, is low in patients with systemic vasculitis. *Semin Arthritis Rheum*. 2007; 37(3): 149-55.
15. Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON<sub>1</sub>) expression. *Am J Hum Genet*. 2001; 68(6): 1428-36.
16. Elnoamany MF, Dawood AA, Azmy RM, Elnajjar MM. Paraoxonase 1 gene (Gln 192-Arg) polymorphism and the risk of coronary artery disease in type 2 diabetes mellitus. *Egypt Heart J*. 2012; 64(2): 55-62.
17. El-Lebedy D, Kafoury M, Abd-El Haleem D, Ibrahim A, Awadallah E, Ashmawy I. Paraoxonase-1 gene Q192R and L55M polymorphisms and risk of cardiovascular disease in Egyptian patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Metab Disord*. 2014; 13(1): 124.
18. MH Hampe. Paraoxonase1 activity, its Q192R polymorphism and diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus. *Clin Sci*. 2014; 98(3): 355-63.

19. Oner A, Baskol G, Karakucuk S, Baskol M, Gumus K, Arda H, et al. The evaluation of serum paraoxanase activity and malondialdehyde levels in type 2 diabetic patients with retinopathy. *Erciyes Med J*. 2010; 32(4): 235-40.
20. Poh R, Muniandy S. Paraoxanase 1 activity as a predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2010; 41(5): 1231-46.
21. Rahmani M, Raiszadeh F, Allahverdian S, Kiaii S, Navab M, Azizi F. Coronary artery disease is associated with the ratio of apolipoprotein A-I/B and serum concentration of apolipoprotein B, but not with paraoxanase enzyme activity in Iranian subjects. *Atherosclerosis* 2002; 162: 381-9.
22. Hofer SE, Bennetts B, Chan AK, et al. Association between PON<sub>1</sub> polymorphisms, PON activity and diabetes complications. *J Diabet Complic* 2006; 20: 322-8.



## The evaluation of accusation paraoxonase1 enzyme activity and its (-108, -126) polymorphisms in diabetic patients

Emami AS<sup>1</sup>, Tajadini MH<sup>2</sup>, Beheshtitabar M<sup>3</sup>, Asgary S<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Student, Clinical Biochemistry Dept., Shahid Sadoughy University of Medical Sciences, Yazd, I.R. Iran; <sup>2</sup>Physiology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran; <sup>3</sup>Clinical Biochemistry Dept., Shahid Sadoughy University of Medical Sciences, Yazd, I.R. Iran; <sup>4</sup>Isfahan Cardiovascular Reseach Center, Cardiovascular Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran.

Received: 23/Jun/2016 Accepted: 20/Jan/2017

**Background and aims:** Paraoxonase1 (PON<sub>1</sub>) is a liver-derived glycoprotein that is secreted into circulation. Among individuals in a population, PON<sub>1</sub> activity varies widely. Most of this variation can be explained by polymorphisms in the coding region (Q192R) and the regulatory region (T-108C). Q192R has been more widely studied. Many studies (but not all) indicated that PON<sub>1</sub> activity decreased in diabetes. In this study, it was investigated serum PON<sub>1</sub> activity and its association with promoter -108 C/T and -126C/G polymorphisms in diabetic patients and non-diabetic subjects.

**Methods:** In this cross sectional study, spectrophotometry technique was used to define PON<sub>1</sub> activity and HRM(High resolution melt)- Real time PCR technique was used to define -108 and -126 polymorphisms distribution in 96 diabetic patients and 104 non diabetic subjects.

**Results:** Paraoxonase1 activity in both two groups was not different (P=0.67). Also, significant difference was not found in type and abundance of -108 polymorphism in groups (P=0.277). It was found significant difference in type and abundance of -126 polymorphism distribution in diabetic and non-diabetic patients (P=0.000).

**Conclusion:** The results showed that PON<sub>1</sub> activity is not different between people with type 2 diabetes and non-diabetic subjects. -108 polymorphism distributions were the same in groups. Therefore, it can be considered a reason for similar enzyme activity. In spite of similar enzyme activity, significant difference was found between groups in -126 polymorphism. Therefore, it may be related to genetic susceptibility to type 2 diabetes.

**Key words:** Type 2 diabetes, Paraoxonase1 enzyme activity, PON<sub>1</sub> gene polymorphism.

**Cite this article as:** Emami AS, Tajadini MH, Beheshtitabar M, Asgary S. The evaluation of accosiation Paraoxonase1 enzyme activity and its (-108, -126) polymorphisms in diabetic patients. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017; 19(3): 92-100.

**\*Corresponding author:**

Isfahan Cardiovascular Reseach Center, Cardiovascular Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran. Tel: 00989133094145, E-mail: sasgary@yahoo.com