تأثیر مهارکننده های HMG - CoA ردوکتاز و ACAT بر ترشح محتوای پروتئینی و فسفولیپیدی VLDL1 و VLDL2 درمدل خوکچهٔ هندی

دکتر فرزاد اسدی[۴] دکتر محمود دوستی[۱*] دکتر مهین زهرائی[۱] دکتر محمود قاضی[۲] دکتر شهین احمدیان[۳] صدیقه سلیمانی[۱]

دریافت مقاله :۲۴ شهریور ماه ۱۳۸۲
پذیرش نهایی :۳ آذر ماه ۱۳۸۲

هدف: مقایسه مهار دونوع آنزیم HMG-CoA ردوکتاز و ACAT بر محتوای پروتئینی و فسفولیپیدی VLDL1 و VLDL2 مترشحه از کبد.

طرح: مطالعه تجربی.

حیوانات: خوکچه هندی.

روش: کبد خوکچه های هندی پس از بیهوشی و جراحی محوطه بطنی در سیستم پرفیوژن مدار بسته با بافر کربس- هنسلیت (Krebs-Henslite) پرفیوژن گردید. در این حالت تأثیر داروهای لواستاتین(Lovastatin)، پروژسترون (Progesterone)و پروژسترون+ لواستاتین بر محتوای پروتئینی و فسفولیپیدی فراکسیون های VLDL1 و VLDL2 مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور فراکسیون های VLDL با روش اولتراسانتریفوژ تجمعی-شناوری جدا شدند و با میکروسکوپ الکترونی تایید گردیدند. پس از آزادسازی محتوای این فراکسیون ها میزان لیپید تام، پروتئین تام و فسفولیپید آنها اندازه گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری: میانگین تغییر درصد ترشح دقیقه ۹۰ در بین گروههای مختلف با روش ANOVA مورد مطالعه قرار گرفت. از سوی دیگر اختلاف شیب رگرسیون خطی گروههای درمانی و کنترل با آزمون t-student مطالعه شد.

نتایج: در حالیکه پروژسترون فاقد تأثیر معنی دار بر ترشح لیپید تام، فسفولیپید و پروتئین تام VLDL1 می باشد، تغییر درصد شیب رگرسیون خطی برای VLDL2 در مقابل لواستاتین معنی دار است($P<0/05$). در این راستا لواستاتین به ترتیب موجب کاهش ۲۰ و۴۱ درصد در لیپید تام VLDL 1 و VLDL2 می شود. میزان کاهش فسفولیپید به ترتیب ۲۰ و ۳۹ درصد است. از سوی دیگر در گروه درمانی پروژسترون+ لواستاتین میزان این تغییرات برای لیپید تام به ترتیب ۲۰ و ۴۵ درصد و برای فسفولیپید ۲۱ و ۴۴ درصد است.

نتیجه گیری: کلسترول استریفیه نقش مهمی در فرآیند لیپید دار شدن و ترشح فراکسیون های VLDL1 و VLDL2 در مدل پرفیوژن کبد خوکچه هندی دارد؛ به نحوی که تأثیر مهارکننده های HMG-CoA ردوکتاز بر VLDL های با اندازه کوچکتر بیشتراز تأثیر آن بر VLDL های با اندازه بزرگتراست. این یافته ها برای مطالعه اختلالات لیپوپروتئین ها با استفاده از حیوانات مدل LDL حائز اهمیت زیادی است. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۳)، دوره ۵۹، شماره ۴، ۳۶۴-۳۵۷.

واژه های کلیدی: پرفیوژن، کبد، تری گلیسرید، کلسترول استریفیه.

۱) گروه آموزشی علوم پایه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران - ایران .
۲) گروه آموزشی فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران -ایران .
۳) مؤسسه بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران، تهران- ایران .
۴) گروه آموزشی علوم پایه دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه تهران ، تهران - ایران .
*) نویسنده مسؤول doostimd@tums.ac.ir

Effect of HMG-CoA reductase and ACAT inhibition on protein and phospholipid contents of VLDL1 and VLDL2 in guinea pig model

Asadi F.,[1] Doosti M.,[1] Zahraei M.,[1] Ghazi M.,[2] Ahmadian S.,[3] Solaimani S.[1]

[1]Department of Medical Biochemistry, Tehran University of Medical Sciences ,Tehran -Iran . [2]Department of medical pharmacology Tehran University of Medical Sciences, Tehran-Iran.[3] Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran-Iran.

Objective: To compare the effect of HMG-CoA reductase and ACAT inhibition on the protein and phospholipid contents of perfusate VLDL1 and VLDL2.

Design: Experimental study.

Animal: Guina pig.

Procedure: After anesthesia and abdominal surgery, guinea pig liver was perfused by Krebs-Henslite buffer through completely closed perfusion system.In continue the effect of progesterone, lovastatin and progesterone plus lovastatin on the perfusate VLDL1 and VLDL2 contents was studied.For this reason, VLDL fractions were separarted by cumulative flotation ultracentrifugation ,confirmed by electrone microscopy and in each pool total protein(TOP), total lipid and phospholipid (PL) were measured.

Statistical analysis: Percent of 90 minute point mean secretion were compared among different treatment groups by ANOVA.Moreover, slope linear regression between each of treatment group and control was analyzed by t-student test.

Results: Progesterone has no significant effect on total lipid,TOP and PL contents of VLDL1 while percent slope changes of linear regression for VLDL2 contents show a significant decrease in lovastatin treatment group ($P<0.05$). Lovastatin lowers total lipid (by 20%) in VLDL1 and (by 41%) in VLDL2.PL decrease is 20% in VLDL1 and 39% VLDL2.These changes in Progesterone plus lovastatin treatment group are 20% and 40% for total lipid and 21% and 44% for phospholipid.

Clinical implications: The effect of HMG-CoA reductase inhibitors on smaller VLDL2 is more than larger VLDL1.These findings are important for using of LDL animal as a model for studying of lipoprotein disorders.

J.Fac.Vet.Med.Univ.Tehran.59,4:357-364,2004.

Key words: Perfusion,Liver,Triglyceride , Esterified , Cholesterol.

Corresponding author's email:doostimd@tums.ac.ir

لیپوپروتئین های با دانسیته بسیار کم یا (Low Density Lipoprotein (Very VLDL) در کبد سنتز شده و به داخل پلاسما ترشح می شوند(۲۴). در پلاسما VLDL طی فرآیند لیپولیز به وسیله آنزیم لیپوپروتئین لیپاز (LPL) مقدار قابل توجهی از تری گلیسریدهای (TG) خود را از دست داده و در نهایت به لیپوپروتئین های با دانسیته کم یا LDL(Lipoprotein Low Density) تبدیل می شود. لیپوپروتئین اخیر به عنوان فاکتور خطر بیماریهای قلبی – عروقی تلقی میگردد(۳۳، ۳۱، ۳). به علاوه محققین معتقدند خود VLDL اکسیدشده نیز در شکل گیری بیماریهای قلبی – عروقی دخالت دارد (۲۶).

VLDL شامل مجموعه ای از ذرات است که از نظر دانسیته شناوری یا sf (Svedberg flotation rate) ، نحوه سنتز، ساختمان و واکنش با گیرنده (Receptor) با یکدیگر اختلاف دارند . به دلیل وجود چنین اختلافاتی زیرخانواده های این مجموعه از نظر متابولیسم، واکنش ایمنی، پاسخ به داروهای کاهنده لیپید و نقش در ایجاد بیماریهای قلبی – عروقی متفاوت از یکدیگرند(۳۶)؛ به نحوی که می توان گفت سرنوشت متابولیکی زیرخانواده ها از روی محتوای آنها تعیین می شود(۱۳).

از نظر اهمیت بالینی در بروز بیماریهای قلبی – عروقی می توان VLDLهای مترشحه از کبد را به دو زیرخانواده تقسیم کرد(۲۳):

۱) VLDL1 که غنی از TG بوده و از قطری بین A^{o} ۹۰۰ - ۴۵۰ و ضریب شناوری sf ۴۰۰ - ۶۰ برخوردار است و۲) VLDL2 که غنی از کلسترول استریفیه (CE) بوده و از قطری بین A^{o} ۴۵۰ - ۳۰۰ و ضریب شناوری sf ۶۰ - ۲۰ برخوردار است. در این رابطه Demant و Packard در سال ۱۹۹۸ نشان داده اند که VLDL1 پیش ساز نوعی LDL است که به کندی کاتابولیزه و بیشتر در جریان خون باقی می ماند و در نتیجه موجب بروز بیماریهای قلبی – عروقی می شود(۱۰).

شواهد *invivo* و *invitro* حکایت از آن دارند که میزان دسترسی به کلسترول آزاد (FC) و CE می تواند ترشح زیرخانواده های VLDL را تنظیم کند (۶). مکانیسم دقیقی که کبد به وسیله آن قادر به تنظیم مقادیر ترشح VLDL1 و VLDL2 می باشد تاکنون ناشناخته است . برخی از محققین معتقدند غلظت داخل سلولی لیپیدهای مختلف (FC, CE, TG, PL) ممکن است نقش مهمی در سنتز و ترشح VLDL1 و VLDL2 داشته باشند. در این رابطه Ginsberg و همکاران در سال ۱۹۹۳ معتقدند افزایش داخل سلولی CE موجب افزایش ترشح ApoB100 می شود، در حالی که Avramoglu و همکاران (۳) در سال ۱۹۸۷ معتقدند مهار تولید CE باعث افزایش ترشح ApoB100 می شود ضمن اینکه Sniderman و همکاران کاهش ترشح ApoB100 را نیز در این شرایط گزارش کرده اند(۳۱). تاکنون جهت مهار تولید CE از مهارکننده های مختلف آنزیمی استفاده شده است.

آنزیم آسیل کوآنزیم A - کلسترول آسیل ترانسفراز یا ACBT (EC 2. 3. 1. 26 Acyl coenzyme A: cholesterol acyl transferase) آنزیمی کلیدی است که در سنتز داخل سلولی CE دخالت داشته و شکل ذخیره ای CE داخل سلولی را تولید می کند. از آنجایی که CE نقش به سزایی در تبدیل مونوسیت ها به ماکروفاژهای کف آلود و پیدایش بیماری قلبی - عروقی دارد (۳۵، ۱۷) دستیابی به مهارکننده ای جهت این آنزیم از اهمیت به سزایی برخوردار است . در این رابطه مشخص شده که پروژسترون (هورمون استروئیدی زنانه) در برخی از رده های سلولی باعث مهار آنزیم ACAT می شود(۵). البته در این رابطه نظرات متناقضی گزارش شده است به گونه ای که برخی از محققین کاهش ترشح ApoB و برخی دیگر افزایش ترشح آن را در نتیجه تأثیر این هورمون بر روی کبد گزارش کرده اند(۱۶).

از طرف دیگر HMG-CoA ردوکتاز که آنزیم ناظم بیوسنتز FC است سو بسترای مورد نیاز آنزیم ACAT را تأمین می کند. تاکنون مطالعات زیادی برای مهار آنزیم HMG-CoA ردوکتاز به عمل آمده است. در این رابطه مطالعات بالینی حکایت از آن دارند که داروهای استاتین از کارایی بالایی جهت کاستن از کلسترول پلاسمایی در داخل سلول و در نهایت تقلیل خطر بیماریهای قلبی – عروقی برخوردارند(۸). البته نتایج متناقضی نیز در رابطه با تأثیر لواستاتین بر ترشح ApoB و کاهش تولید VLDL گزارش شده است (۳۵، ۱۷).

در طی فرآیند بیوسنتز و ترشح VLDL، ApoB100 به محض ترجمه با فسفولیپیدها (PL) ترکیب شده و در هنگام عبور از عرض شبکه آندوپلاسمی (ER) غنی از TG و CE می شود(۱۸). به نظر می رسد تأمین لیپیدها شاخص عمده ای برای سنتز ApoB100 و ترشح آن باشد. در این رابطه ممکن است FC یا EC نقش مهمی در تسریع سنتز ApoB100 و ترشح آن داشته باشند. در این رابطه Huff و همکاران نشان دادند در سال ۱۹۹۷ که مهار سنتز فسفولیپید موجب کاهش ترشح ApoB در کشت هپاتوسیته های موش صحرائی می شود (۱۸) ولی تاکنون تأثیر وضعیت CE سلولی بر ترشح میزان PL ها نشان داده نشده است. جهت پی بردن به تأثیر مهارکننده های ACAT و HMG-CoA ردوکتاز بر ترشح ApoB و تأثیر آن بر الحاق فسفولیپید به ApoB، مطالعه حاضر بر روی سیستم پرفیوژن کبد خوکچه هندی صورت گرفته است.

مواد و روش کار

لواستاتین و پروژسترون توسط شرکتهای شیمیایی رازک و ایران هورمون (ایران - تهران) جهت این مطالعه اهدا شدند. سرم آلبومین گاوی (BSA)، پلی اتیلن گلایکول (PEG-300)، اتانول، هپارین و سایر مواد شیمیایی عمومی از شرکت مرک خریداری گردیدند.

حیوان : خوکچه های هندی نر نژاد سفید به ظاهر سالم به وزن ۴۰۰-۳۵۰ گرم از مؤسسه رازی (ایران - کرج) خریداری گردیدند . حیوانات به مدت ۱۲ ساعت پیش از آزمایش از غذا محروم شدند ولی آب در اختیار آنها قرار داده شد .

پرفیوژن : پرفیوژن کبد طبق روش Fitzharris انجام شد(۱۴). به طور خلاصه در این روش ابتدا حیوان به طریقه استنشایی و با ماسک آغشته به کلروفرم بیهوش گردید . در ادامه هپارین به میزان ۱۲۵۰ واحد بین المللی

به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن به طریقه داخل صفاقی جهت جلوگیری از لخته شدن خون تزریق گردید. پرفیوژن کبد در سیستم کاملاً بسته صورت گرفت به گونه‌ای که با یک کانولا مایع پرفیوژن توسط پمپ پریستالتیک (Middleton Minipuls 3 Peristaltic Pump; Gilson,) وارد ورید باب شده به میزان ۲/۵ ml/min/g liver به وسیله کانولای دیگر از ورید اجوف فوقانی خارج گردید و دوباره به مخزن اولیه پمپ گردید. پیش از انجام پرفیوژن مدار بسته، ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه پرفیوژن مدار باز جهت تخلیه باقیمانده لیپوپروتئین ها از کبد صورت گرفت و در ادامه طی ۹۰ دقیقه پرفیوژن بسته اجرا گردید. حجم مایع پرفیوژن در سیستم بسته ۱۰۰ میلی لیتر حفظ گردید و هر ۱۵ دقیقه ۱۰ میلی لیتر از آن جهت جداسازی VLDL1 و VLDL2 نمونه برداری گردید. طی پرفیوژن، کبد گرم و مرطوب نگه داشته شد و pH مایع پرفیوژن با تنظیم فشار گاز ($5O_2$ درصد و CO_2 ۹۵درصد) بین ۷/۴-۷/۳ تنظیم گردید و درجه حرارت آن روی ۴۰°C-۳۷ حفظ شد.

در طی پرفیوژن زنده بودن کبد با اندازه گیری مارکرهای AST و LDH ارزیابی گردید. بعد از پرفیوژن نمونه کبدی در فرمالین ۱۰درصد تثبیت گردید و پس از رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین با میکروسکوپ نوری یکپارچگی ساختمان کبد در مقایسه با کبد سالم مطالعه گردید.

گروههای مطالعاتی: دز لواستاتین و پروژسترون با استفاده از آزمایش دز - پاسخ (Dose-Response) به دست آمد. در این رابطه ارزیابی سمی بودن یا نبودن دز به کار رفته با استفاده از مارکرهای حیاتی کبد (LDH, AST) مشخص گردید. برای این منظور هر دزی از دارو روی ۴ خوکچه هندی آزمایش شد. هر دارو در مخلوطی از حامل (۵ : ۹۵) PEG 300 : Ethanol حل گشته و پس از کنژوگه گردیدن (۱۳) با آلبومین به بافر کربس- هنسلیت- بیکربنات حاوی ۱۱۸/۹ mM NaCl، ۴/۷۹ mM Kcl، ۱/۱۹ mM KH2Po4، ۲/۵۵ mM CaCl2، ۲۴/۸ mM NaHCo3 (هر یک به طور جداگانه تهیه و به مدت ۱ ساعت با گاز $95O_2$درصد و $5 Co_2$ درصد گازدهی گردیدند)، ۲/۵درصد گلوکز و ۳درصد BSA اضافه گردید. در تمامی آزمایشات غلظت حامل ۰/۰۲درصد تثبیت گردید. تجربیات بر روی ۳ گروه درمانی شامل لواستاتین، پروژسترون و لواستاتین + پروژسترون (هر گروه شامل ۴ رأس خوکچه) در مقابل گروه کنترل (شامل ۴ رأس خوکچه) انجام شد.

جداسازی VLDL1 و VLDL2 از مایع پرفیوژن: جداسازی با روش Cumulative flotation ultracentrifugenation انجام شد (۲۷). در این روش نمونه های جداشده با استفاده از سانتریفوژ (۸۳۱۵۰ g به مدت ۱۸ ساعت) در دانسیته ۱/۰۶۵ گرم در میلی لیتر تغلیظ شدند. در ادامه اولتراسانتریفوژ طی دو مرحله متوالی انجام شد، به گونه ای که در ابتدا VLDL1 (طی ۴h با ۳۷۸۰۰rpm) و در ادامه VLDL2 (طی ۱۵h با ۴۰/۰۰۰rpm) جدا گردیدند. در این رابطه بعد از اولتراسانتریفوژ مرحله اول ۰/۵ میلی لیتر از محلول قسمت فوقانی لوله که حاوی VLDL1 بود آسپیره گردید و به جای آن ۰/۵ میلی لیتر از دانسیته ۱/۰۰۶ گرم در میلی لیتر به آن اضافه گردید. pH تمام محلولهای نمکی روی ۷/۴ تنظیم گردید. دانسیته مایع پرفیوژن روی ۱/۱ گرم در میلی لیتر تنظیم و پس از ریختن ۴ میلی لیتر از آن در قسمت تحتانی لوله‌های ultraclear دانسیته‌های نمکی ۱/۰۶۵ گرم در میلی لیتر و ۱/۰۲ و ۱/۰۰۶ گرم در میلی لیتر به میزان ۳ میلی لیتر به صورت یک گرادیان پلکانی درآمدند. دانسیته های تهیه شده با دستگاه دانسیتومتر DMA. 58 AP PAAR ساخت کشور اتریش تا ۴ رقم اعشار تأیید شدند. اولتراسانتریفوژ با دستگاه اولتراسانتریفوژ Beckman x-100 و با روتور Swti 40.3 در درجه حرارت ۱۵ درجه سانتیگراد انجام گردید.

آنالیز میکروسکوپ الکترونی: جداسازی VLDL1 و VLDL2 با استفاده از میکروسکوپ الکترونی تأیید گردید. برای این منظور یک قطره (۲۰میکرو لیتر) از VLDL1 یا VLDL2 روی گرید (Gride) پوشیده از فور موار (Formvar) ریخته شد. پس از ۶۰ ثانیه زیادی مایع به وسیله کاغذ صافی برداشته شد و به دنبال آن یک قطره فسفوتنگستات پتاسیم ۲درصد (pH =۶/۳ - ۶/۴) به آن اضافه شد. پس از تبخیر گریدها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی Siemens (Siemens Corp,IseliusNJ) مورد مطالعه قرار گرفت.

اندازه گیری لیپیدها و پروتئین های VLDL1 و VLDL2: لیپیدهای VLDL1 و VLDL2 با استفاده از مخلوط اتر: اتانول (۱:۳ V/V) استخراج گردیدند. در ادامه TC به روش اسپکتروفتومتری (۱۶)، پروتئین به روش برادفورد (۵)، فسفولیپید و کلسترول به روش شیمیایی (۱۶) و لیپید تام به روش شیمیایی (۱۵) محاسبه گردیدند.

آنالیز آماری: تغییر درصد تجمع اجزاء لیپوپروتئین در بین جفت گروههای درمانی و کنترل صورت گرفت. به علاوه مقایسه رگرسیون خطی (slope linear regression) با استفاده از نرم افزار آماری sigma stat و با آزمون unpaird t -student مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج

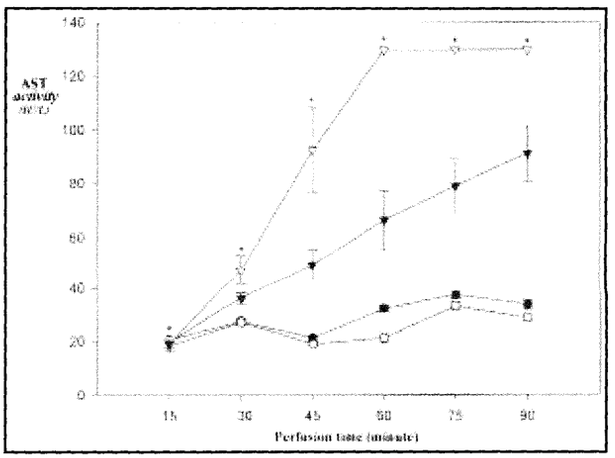
با استفاده از آزمایشات دز - پاسخ و مارکرهای سیتوتوکسیسیتی (LDH و AST) غلظتهای ۱/۵ و ۲۵ میلی مول به ترتیب برای لواستاتین (تصاویر ۱ و ۲) و پروژسترون (تصاویر ۳ و ۴) به عنوان دزهای مناسب انتخاب شدند. از طرف دیگر یکپارچگی سلولهای کبدی پس از پرفیوژن با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت.

تصاویر ۵ و ۶ مقاطع کبدی را نشان می دهند. همانطور که در تصویر مشهود است ۱۲۰ دقیقه پرفیوژن کبد فاقد بروز تغییرات مورفولوژیک (تصویر ۶) در مقایسه با کبد سالم و دست نخورده خوکچه هندی (تصویر ۵) است.

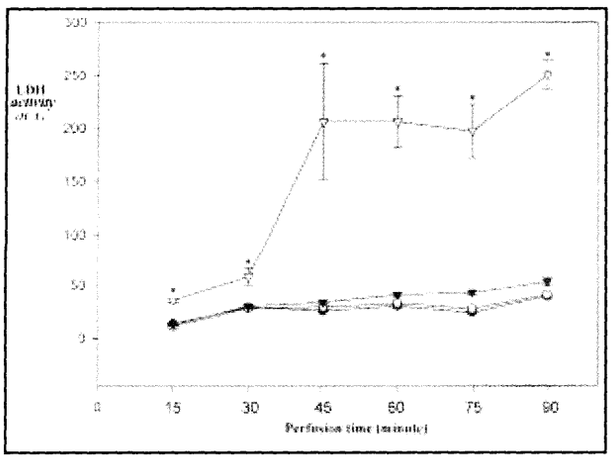
جداسازی VLDL1 و VLDL2 با شمارش ۶۰ ذره از هریک از این لیپوپروتئین ها در هر میکروگراف میکروسکوپ الکترونی تأیید گردید و اندازه لیپوپروتئین ها به صورت Mean±SEM بیان گردید. در این رابطه اندازه VLDL1 و VLDL2 به ترتیب ۰/۵± ۸۳۹ و ۰/۳۶± ۴۰۹/۷ انگستروم به دست آمد (تصاویر ۷ و ۸).

جدول۱ - تجمع لیپید تام در VLDL1 و VLDL2 در گروه های کنترل (C)، Lovastatin (L)، Progesterone(p) و Progesterone + Lovastatin (L+P) در طی ۹۰ دقیقه. در هر نمونه متوسط تجمع گروه های مختلف آزمون بصورت Mean ± SEM نشان داده شده است.

زمان پرفیوژن (دقیقه)	تجمع لیپید درفراکسیون VLDL1 (mg/dl)				تجمع لیپید درفراکسیون VLDL2 (mg/dl)			
	C	P	L	P+L	C	P	L	P+L
۱۵	۰/۶۱ ±۰/۱۲	۰/۵۷ ±۰/۰۳	۰/۴۶ ±۰/۰۸	۰/۴۷ ±۰/۰۲	۰/۲۳ ±۰/۰۹	۰/۲۴ ±۰/۴۶	۰/۱۴ ±۰/۰۴	۰/۱۳ ±۰/۰۵
۳۰	۱/۱۴ ±۰/۲۹	۱/۱۹ ±۰/۰۵	۰/۸۶ ±۰/۳۲	۰/۸۵ ±۰/۰۷	۰/۹۸ ±۰/۱۹	۱/۰۱ ±۰/۴	۰/۶۷ ±۰/۰۹	۰/۶۱ ±۰/۱۱
۴۵	۱/۸۲±۰/۳۳	۱/۸۷±۰/۰۷	۱/۴۸±۰/۳۳	۱/۳۴±۰/۱	۱/۷۵±۰/۲۹	۱/۸±۰/۵۳	۱/۱۳±۰/۱۴	۱/۰۷±۰/۱۲
۶۰	۲/۵۹±۰/۴۹	۲/۶۸±۰/۱۲	۲/۲±۰/۴۵	۲/۱۳±۰/۰۸	۲/۴۲±۰/۳۹	۲/۴۵±۰/۳۴	۱/۵۶±۰/۱۹	۱/۴۸±۰/۱۷
۷۵	۳/۱۷±۰/۶	۳/۲۸±۰/۱۳	۲/۵۹±۰/۵۱	۲/۴۸±۰/۱۴	۳/۰۱±۰/۴۶	۳/۰۸±۰/۴۲	۱/۹±۰/۲۳	۱/۸۴±۰/۱۸
۹۰	۳/۸۳±۰/۶۴	۳/۹۸±۰/۱۶	۳/۰۵±۰/۶۱	۳±۰/۱۲	۳/۵۹±۰/۵۷	۳/۶۶±۰/۳	۲/۳۱±۰/۲۷	۲/۱۷±۰/۲۴

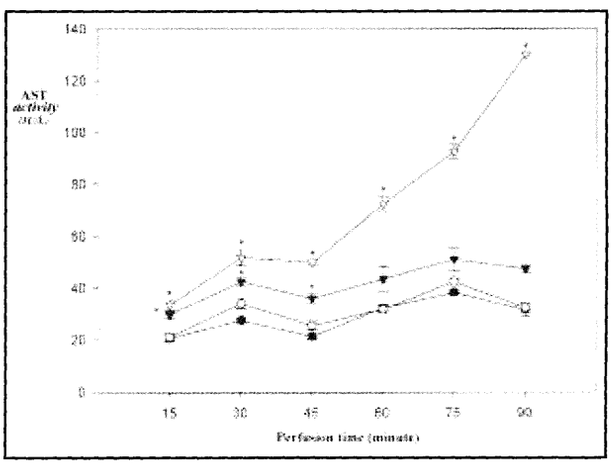


تصویر۱

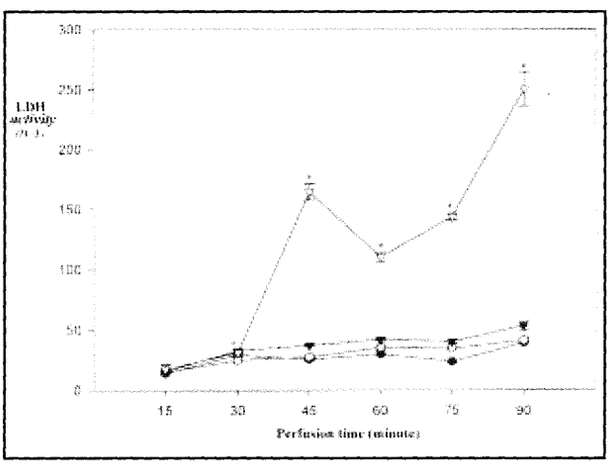


تصویر۲

تصاویر ۱و۲- آزمایشات دز ـ پاسخ برای لواستاتین در غلظت های مختلف (●) ۱μM، (▼) ۱/۵μM و (▽) ۲μM در مقایسه با گروه کنترل (○). (*) نشان دهنده تغییر معنی دار است. سیتوتوکسیسیتی با استفاده از شاخص های توکسیسیتی شامل AST (تصویر۱) و LDH (تصویر۲) در مایع پرفیوژن طی ۹۰ دقیقه پرفیوژن مدار بسته تعیین شده است.



تصویر۳

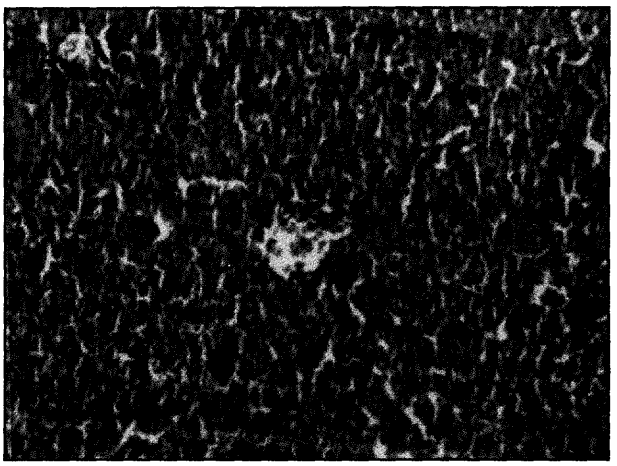


تصویر۴

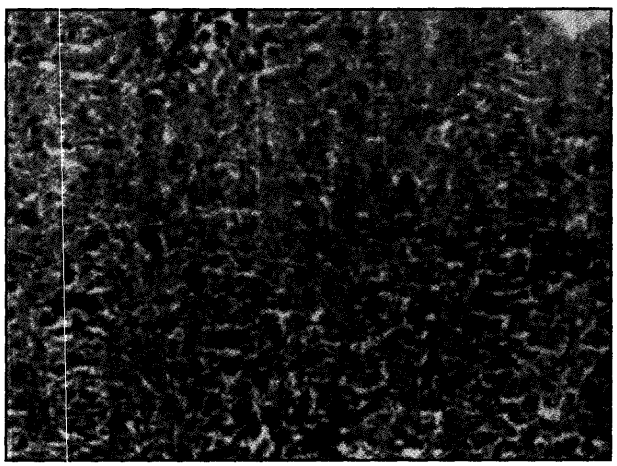
تصاویر ۳و۴- آزمایشات دز ـ پاسخ برای پروژسترون در غلظت های مختلف (●) ۲۰μM، (▼) ۲۵μM و (▽) ۳۰μM در مقایسه با گروه کنترل (○). (*) نشان دهنده تغییر معنی دار است. سیتوتوکسیستی با استفاده از شاخص های توکسیسیتی شامل AST (تصویر۳) و LDH (تصویر۴) در مایع پرفیوژن طی ۹۰ دقیقه پرفیوژن مدار بسته تعیین شده است.

طبق تقسیم بندی VLDL به دو خانواده VLDL1 و VLDL2 جدول ۱ نشان می دهد که تجمع لیپید تام در بخشهای VLDL1 و VLDL2 تحت تأثیر پروژسترون اختلاف معنی داری را با گروه کنترل نشان نمی دهد.

از طرف دیگر تغییر ترشح لیپید تام بر مبنای درصد تغییرات دقیقه ۹۰ نشان می دهد که پروژسترون فاقد تأثیر معنی دار بر ترشح VLDL1 و VLDL2 است، در حالی که لواستاتین موجب ۲۰ درصد کاهش در لیپید تام VLDL1 و

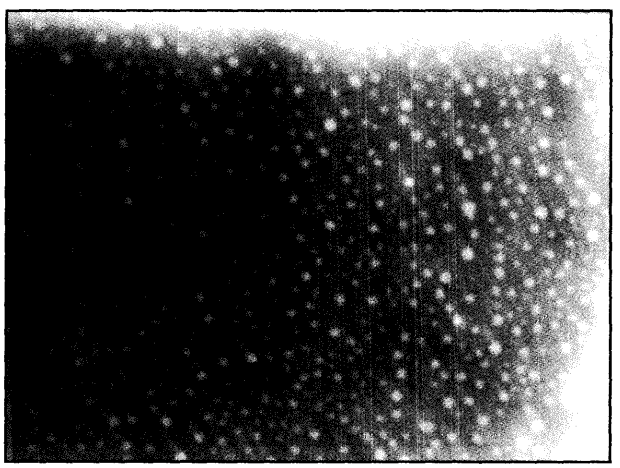


تصویر ۵

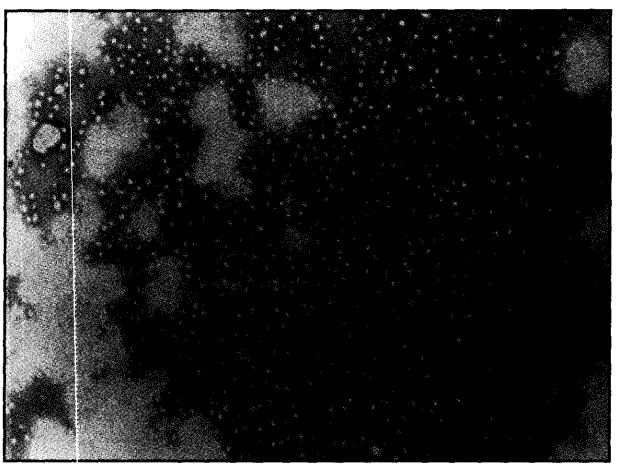


تصویر ۶

تصاویر ۵و۶-تظاهر میکروسکوپیک کبد خوکچه هندی در رنگ آمیزی با هماتوکسیلین وائوزی. تصویر ۵ ،کبد سالم یک خوکچه هندی (با بزرگنمایی۲۲۵x) و تصویر ۶ کبد را بعد از ۹۰ دقیقه پرفیوژن در مدار بسته نشان می دهد.



تصویر ۷



تصویر ۸

تصاویر ۷و۸- تصاویر VLDL1 (تصویر ۷) و VLDL2 (تصویر ۸) با بزرگنمایی ۵۰/۰۰۰: تصاویر پس از آماده سازی با میکروسکوپ الکترونی گرفته شدند. اندازه هر فراکسیون VLDL با شمارش ۶۰ ذره بصورت Mean ± SEM بیان گردید.

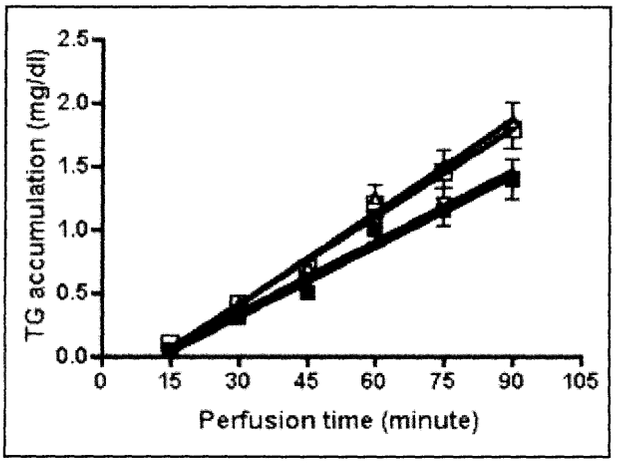
۴۱درصد کاهش در VLDL2 می شود . به علاوه تحت تأثیر مخلوط توأم پروژسترون و لواستاتین میزان لیپید تام VLDL1 و VLDL2 به ترتیب ۲۱درصد و ۴۱درصد کاهش را نشان می دهد .

تصاویر ۹ و ۱۰ تغییرات فسفولیپیدها را به ترتیب در VLDL1 و VLDL2 طی درمان با داروهای مختلف در مقابل گروه کنترل نشان می دهند . ترشح دقیقه ۹۰ فسفولیپیدها با پروژسترون افزایش ۹ و ۶ درصد را به ترتیب برای VLDL1 و VLDL2 نشان می دهد . ازسوی دیگر ترشح PL با لواستاتین کاهش ۲۰ و ۳۹ درصد و با لوآستاتین + پروژسترون کاهش ۲۰ و ۴۵ درصد نشان می دهند. با وجود تغییر ترشح فسفولیپید در VLDL1 این تغییر با آزمون t-student معنی دار نیست در حالیکه این تغییرات در VLDL2 معنی دار است (P<۰/۰۵).

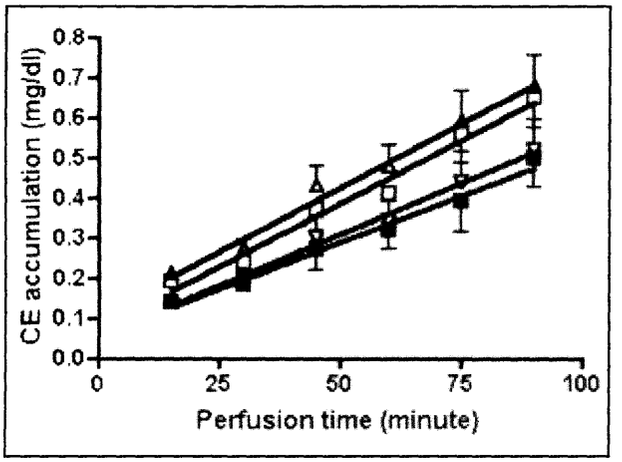
از سوی دیگر تغییرات پروتئین تام VLDL1 و VLDL2 تحت تأثیر لواستاتین و پروژسترون به ترتیب در اشکال ۱۱ و ۱۲ نمایش داده شده است . همان طور که در اشکال مشخص است پروتئین تام تحت تأثیر پروژسترون تغییر معنی داری را در آنالیز رگرسیون خطی با آزمون t-student نشان نمی دهد؛ درحالیکه تغییر معنی داری با لواستاتین و همچنین مخلوط لوآستاتین و پروژسترون مشهود است (P<۰/۰۵). با وجود کاهش ۷درصد پروتئین در VLDL1 با لواستاتین این کاهش در مقابل مخلوط پروژسترون و لوآستاتین نیز ۷درصد مشاهده گردید، درحالی که تغییرات درصد ترشح دقیقه ۹۰ در مقابل پروژسترون برای VLDL2 فاقد تأثیر و برای VLDL1، ۲درصد به دست آمد . تغییر درصد ترشح پروتئین در VLDL2 برای لوآستاتین ۳۱درصد کاهش و برای مخلوط پروژسترون و لوآستاتین ۲۹درصد کاهش را نشان می دهد .

بحث

نتایج این مطالعه همسو با یافته های Burnett و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان می دهد که دسترسی به CE می تواند ترشح VLDL را از کبد تنظیم کند. همانطور که در جدول ۱ ملاحظه می شود ترشح لیپید تام به ترتیب کاهش ۲۰ و ۳۷ درصد را در مقابل لواستاتین و کاهش ۲۱ و ۴۴ درصد را در مقابل پروژسترون + لواستاتین نشان می دهند. ازسوی دیگر همانطورکه در تصاویر

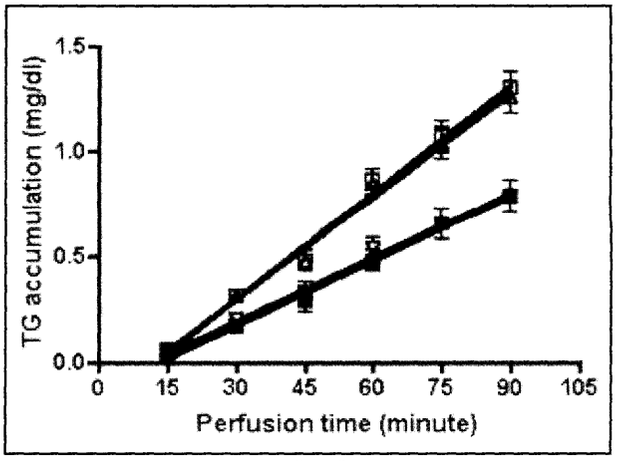


تصویر۹

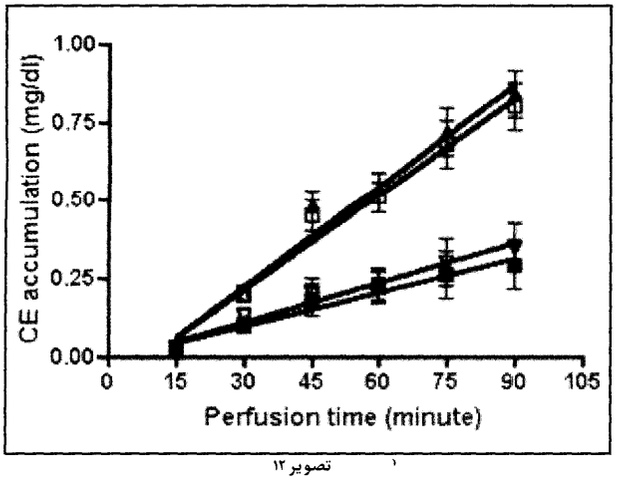


تصویر ۱۰

تصاویر ۹ و ۱۰- مقادیر VLDL1- PL (تصویر ۹) و VLDL2- PL (تصویر ۱۰) حاصل از مایع پرفیوژن در گروههای درمانی پروژسترون (▲)، لوآستاتین (○) و پروژسترون + لوآستاتین (■) در مقایسه با گروه کنترل (□). شیب رگرسیون خطی هریک از گروههای درمانی در مقابل گروه کنترل با آزمون t-student مقایسه گردید.



تصویر۱۱



تصویر ۱۲

تصاویر ۱۱ و ۱۲- مقادیر VLDL1-TOP (تصویر ۱۱) و VLDL2-TOP (تصویر ۱۲) حاصل از مایع پرفیوژن در گروههای درمانی پروژسترون (▲)، لوآستاتین (○) و پروژسترون + لوآستاتین (■) در مقایسه با گروه کنترل (□). شیب رگرسیون خطی هریک از گروههای درمانی در مقابل گروه کنترل با آزمون t-student مقایسه گردید.

۹ و ۱۰ ملاحظه می‌شود بخشی از این کاهش ناشی از تقلیل میزان PL است. اگرچه آنالیز رگرسیون خطی با آزمون t-student حکایت از عدم تغییر معنی دار ترشح PL دارد ولی از آنجایی که کاهش در این فراکسیون به صورت پیوسته دنبال می‌شود این فرضیه را تقویت می‌کند که لواستاتین در هر دو فراکسیون اثر کاهنده دارد. علت عدم معنی دار بودن این کاهش ممکن است اثر کوتاه مدت (۹۰ دقیقه) لواستاتین باشد به گونه ای که Isusi و همکاران در سال ۲۰۰۰ معتقدند اثر کوتاه مدت لواستاتین بر سنتز و ترشح TG و CE متفاوت از اثر طولانی مدت آن است. ضمن اینکه میزان بیشتر CE در نسبت نیز می تواند از دیگر دلایل آن می تواند باشد (۴،۱۸).

تغییر درصد ترشح پروتئین در فراکسیون معنی دار نمی باشد در حالی که این تغییر معنی دار است. در این رابطه همانطور که Wilcox و همکاران در سال ۱۹۹۹ معتقدند کاهش CE باعث افزایش تجزیه داخل سلولی ApoB می‌شود که در فراکسیون مشهود است (۳۴، ۲۱، ۴). Huff و همکاران در سال ۱۹۹۷ بیان داشته اند کاهش سنتز CE یا FC ممکن است موجب اختلال در روند تا خوردگی ApoB شده و یا لیپیداسیون کامل ApoB را کاهش داده و در نتیجه موجب کاهش ترشح آن شود. همچنین ممکن است سرعت تجزیه ApoB و یا جابجائی آن از عرض شبکه آندو پلاسمی تحت تأثیر استاتین ها قرار گیرد (۲). به علاوه Huff و همکاران در سال ۱۹۹۷ مهارکننده های HMG-CoA ردوکتاز کاهش معنی داری را در ترشح فسفولیپیدهای VLDL ایجاد می‌کنند. به نظر می رسد به علت غلظت بیشتر CE در زیرخانواده VLDL2 تأثیر لواستاتین بر این زیرخانواده بیشتر از زیرخانواده VLDL1 است. از آنجائیکه سرعت ترشح ApoB ارتباط مستقیمی با غلظت CE سلولی دارد و از طرف دیگر اضافه شدن PL به ApoB سنتز شده پیش شرط برای ترشح VLDL در مسیر ترشحی کبدی است (۲۷، ۲۳) کاهش ترشح در هر دو فراکسیون و کاهش بیشتر و معنی دار آن در زیرخانواده قابل توجیه است.

محققین معتقدند که دو آنزیم ACAT (ACAT1,ACAT2) در استریفیکاسیون FC سلولی و تبدیل آن به CE شرکت دارند. در این رابطه ACAT2 مسؤول تولید CE مورد نیاز جهت سنتز VLDL می باشد در حالی

که ACAT1 موجب بیوسنتز شکل ذخیره ای CE در سلول می شود. از آنجایی که در این مطالعه پروژسترون نتوانسته موجب مهار ترشح VLDL از کبد شود به نظر می رسد پروژسترون مهارکننده مناسبی برای ACAT2 نمی باشد(۲۸، ۱۸).

به طور کلی به نظر می رسد مهار کوتاه مدت آنزیم HMG-CoA ردوکتاز با مهارکننده های استاتینی از یک سو با کاهش FC و از طرف دیگر با کاستن از فعالیت آنزیم ACAT موجب کاهش CE سلولی می شود. در نتیجه چنین کاهشی در میزان CE سلولی، ترشح فراکسیون VLDL2 که غنی از CE می باشد نیز کاهش معنی داری می یابد. با توجه به اینکه ترشح ApoB تابع الحاق CE به آن است (۲۲، ۴) در این شرایط ترشح ApoB نیز کاهش می یابد. از طرف دیگر ApoB در مسیر ترشحی خود نیاز به الحاق PL به خود داشته که با توجه به کاهش ترشح ApoB میزان PL نیز کاهش می یابد. به علاوه، تحقیق فعلی حاکی از عدم تأثیر پروژسترون به عنوان یک مهارکننده مناسب جهت ترشح VLDL1 و VLDL2 از سلولهای کبد خوکچه هندی است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان از زحمات آقای دکتر سید حسین مرجانمهر جهت کمک بیدریغ در مطالعه میکروسکوپیک بافت کبد تشکر و قدردانی می نمایند. در ضمن از آقای هاشمی جهت کمک در تهیه میکروگراف های میکروسکوپ الکترونی تشکر می نمایند. در ضمن از مدیریت محترم قطب علوم تشریحی دامپزشکی ، جناب آقای دکتر بیژن رادمهر به جهت کمک در انجام طرح صمیمانه تشکر و قدردانی می نماید.

References

1. Arad Y., Ramakrishnan R., Ginsberg H.N.(1992): Effect of lovastatin therapy on very low density lipoprotein triglyceride metabolism in subjects with combined hyperlipidemia evidence for reduced assembly and secretion of triglyceride rich lipoproteins. *Metabolism. 41,487-93.*
2. Arbogast B.W., Dreher N.J.(1987) Coronary disease prediction using a new atherogenic index. *Atherosclerosis .66,1-2:55-62.*
3. Avramoglu R.K., Cianflone K.,Sniderman A.D.(1995): Role of the neutral lipid accessible pool in the regulation of secretion of apoB100 lipoprotein particles by Hep G2 cells. *J. Lipid Res.36:2513-2528.*
4. Berglund L., Sharkey M.F., Elam R.L., *witztum JL.*(1989): Effects of lovastatin therapy on guinea pig low density lipoprotein composition and metabolism. *J. Lipid Res.30:1591-1600.*
5. Bradford M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. Anal. *Biochem. 72: 248-254.*
6. Burnett J.R., Wilcox L.J., Huff M.W. (1999): Acyl coenzyme A:Cholesterol acyl transferase inhibition and hepatic apolipoprotein B secretion.*Clinica Chimica Acta 286,231-42.*
7. Carr T.P., Parks J.S. and Rudel L.L.(1992): Hepatic ACAT activity in African green monkeys is highly correlated to plasma LDL cholesterol ester enrichment and coronary artery atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. 12:1274-1283.*
8. Cuchel M., Schaefer E.J., Millar J.S.,Jones PJ.,Dolnikowski GG.,Vergani C.,Lichtenstein AH.(1997): Lovastatin decrease de novo cholesterol synthesis and LDL apoB100 production rates in combined-hyperlipidemicmales. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17:1910-1917.*
9. Dashti N.(1992): The effect of low density lipoproteins, cholesterol and 25-hydroxy cholesterol on apolipoprotein B gene expression in Hep G2 cells. *J. Biol.Chem.267:7160-7169.*
10. Demant T., Packard C.J.(1998): In vivo studies of VLDL metabolism and LDL heterogeneity.*Eur. Heart J.19,suppl H. H7-10.*
11. Dixon J.L., Ginsberg H.N.(1993): Regulation of hepatic secretion of apolipoprotein B containing lipoproteins: Information obtained from cultured liver cells. *J. Lipid. Res.34:167-179.*
12. Field F.J. and Mathur S.N.(1987) Regulation of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase by 25- hydroxy cholesterol in rabbit intestinal microsomes and absorptive cells. *J. Lipid Res.24,1049-1059.*
13. Fisher R.M., Coppack S.W., Gibbons G.F.,Frayn KN.,.(1993) Post-prandial VLDL subfraction metabolism in normal and obese subjects. Int.*J.Obes.17:263-259.*
14. Fitzharris T.J., Quinn D.M., Goh E.H., *et al.*(1981): Hydrolysis of guinea pig nascent very low density lipoproteins catalyzed by lipoprotein lipase: activation by human apolipoprotein CII. *J. Lipid Res. 22,921-933.*
15. Frings C.S., Fendley T.W., Dunn R.T.,Queen CA. (1972): Improved determination of total serum lipids by the

sulfo-phospho-vanillin reaction. *Clin. Chem. 18: 673-676.*

16. Gottfried S.P., Rosenberg B.(1973) Improved manual spectrophotometric procedure for serum triglycerides. *Clin.Chem. 19(9):1077-1078.*

17. Graham A., Wood J.L., Russell L.J.(1996): Cholesterol esterification is not essential for secretion of lipoprotein components by Hep G2 cells. Biochim. *Biophys. Acta,1302:46-54.*

18. Huff M.W., Burnett J.R.(1997):3-Hydroxy- 3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and hepatic apolipoprotein B secretion.*Curr. Opin. Lipidol. 8(3):138-145.*

19. Isusi E., Aspichueta P., Liza M.,Hernadex ML.,Diaz C., Hernandez G., Martinez MJ,ocha B. (2000): Short- and long-term effects of atorvastatin, lovastatin and simvastatin on the cellular metabolism of cholesteryl esters and VLDL secretion in rat hepatocytes. *Atherosclerosis. 153(2):283-294.*

20. Krause B.R., Newton R.S.(1995) Lipid-lowering activity of atorvastatin and lovastatin in rodent species: triglyceride-lowering in rats correlates with efficacy in LDL. *Animal models.117(2):237-44* .

21. Kushwaha R.S., Foster D.M., Barrett P.H.R. *Carey KD..*(1990) Effect of estrogen and progesterone on metabolism of apolipoprotein B in babons. *Am.J.Physiol.258:E172-183.*

22. Lin MCM., Gordon D., Wetterau J.R.(1995): Microsomal triglyceride transfer protein regulation in Hep G2 cells. Insulin negatively regulates MTP gene expression. *J.Lipid Res. 36:1073-1081.*

23. Malmstrom R., Packard C.J, Caslake M.,Bedford D., Stewart P., Shepherd J., *Taskinen MR.* (1999): Effect of heparin-stimulated plasma lipolytic activity on VLDL Apo B subclass metabolism in normal subjects. *Atherosclerosis. 146:381-390.*

24. Marinetti G.V.(1990) :Disorders of lipid metabolism, New York Ny,Plenum,PP:75-119.

25. Markwell M.A.K., Haas S.M., Bieber L.L.Tolbert NE. (1978): A modification of the lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples.*Anal.biochem.87:206-210.*

26. McEney J., Trimble E.R., Young I.S.(1998): A simple method for assessing copper-mediated oxidation of very-low-density lipoprotein isolated by rapid ultracentrifugation. 35:504-514.

27. Packard C.J., Shepherd J.(1997): Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein b metabolism. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 17(12):3542-3556.*

28. Pease R.J., Leiper J.M.(1996): Regulation of hepatic apolipoprotein B-containing lipoprotein secretion. *Curr. Opin. Lipidol. 7:132-138.*

29. Redgrave T.G. and Carlson L.A.(1979): Changes in plasma very low density lipoprotein and low density lipoprotein content, composition and size after a fatty meal in normo and hypertriglyceridemic man.*J. Lipid. Res.20:217-230.*

30. Rodriguez J.L., Ghiselli G.C., Torreggiani D., Sirtori C.R.(1976) :Very low density lipoproteins in normal and cholesterol-fed rabbits: lipid and protein composition and metabolism. Part1. Chemical composition of very low density lipoproteins in rabbits. *Atherosclerosis. 23(1):73-83.*

31. Sniderman A.D., Cianflone K.(1993): Substrate delivery as a determination of hepatic apo B secretion. *Arterioscler. Thromb.13(5):629-636.*

32. Tanaka M., Jingami H., Otani H., Cho M., *Ueda Y., Arati H., Nagano Y., Doi T., Yokode M., Kita T.*(1993) Regulation of apolipoprotein B production and secretion in response to the change of intracellular cholesteryl ester contents in rabbit hepatocytes . *J.Biol.Chem.268: 12713 - 12718.*

33. Vyden J.K., Thorner J., Nagasawa K., *Takano T., Grose th, Dittrich MF, Perlow R., Swan HJ.*(1975):Metabolic and cardiovascular abnormalities in patients with peripheral arterial disease. *Am. Heart J. 90(6):703-708.*

34. Wilcox L.J., Burnett PHR., and Huff M.W. (1999): Differential regulation of apolipoprotein B secretion from HepG2 cells by two HMG-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin. *J. Lipid Res. 40:1078-10 89* .

35. Wu X., Sakata N., Lui E., Ginsberg H.N.(1994): Evidence for a lack of regulation of the assembly and secretion of apolipoprotein B containing lipoprotein from Hep G2 cells by cholesteryl ester. *J. Biol. Chem. 269: 12375-12382* .

36. Zhao S.P., Bastiaanse E.M.L., Hau M.F., *Smelt AH., Gevers Leuven JA., Van der Learse A., Van't Hoof FM.* (1995): Separation of VLDL subfraction by density gradient ultrcentrifugation.*J. Lab. Clin . Med .125 (5): 641-649.*