



بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی انجیر بر فعالیت و بیان ژن آنزیم پاراکسوناز ۱ در مدل هایپر لیپید موش صحرایی به روش آزمایشگاهی و شبیه‌سازی شده

جواد صفاری چالستری^۱، کیهان قطره سامانی^۲، حجت‌الله روحی^۱، رضا احمدی^{۱*}

۱- مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شهرکرد، ایران.

۲- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۰۳، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۳

چکیده

مقدمه: آنزیم پاراکسوناز ۱، یک آنزیم کلیدی در برابر اکسیداسیون Low Density Lipoprotein (LDL) است. افزایش فعالیت این آنزیم می‌تواند تا حد بالایی از بروز آترواسکلروزیس و تصلب شرایین مخصوصاً در افراد هایپرلیپید جلوگیری کند. این مطالعه، تأثیر عصاره هیدروالکلی انجیر را بر فعالیت و میزان بیان ژن آنزیم پاراکسوناز ۱ بررسی نموده و با استفاده از مطالعات شبیه‌سازی شده تأثیر مهمترین ترکیبات مؤثره انجیر را بر عملکرد این آنزیم مورد بررسی قرار داده است.

مواد و روش‌ها: ۴ گروه ده‌تایی موش صحرایی نر شامل گروه شاهد و گروه‌های هیپرلیپید با غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی انجیر برای ۹۰ روز تیمار شدند. پروفایل لیپیدی سرم اندازه‌گیری و میزان بیان ژن آنزیم پاراکسوناز ۱ از بافت کبد و همچنین میزان فعالیت آریل استراز آنزیم پاراکسوناز ۱ در سرم حیوانات مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات شبیه‌سازی و دینامیک مولکولی مهمترین ترکیبات مؤثره انجیر شامل اسیدگالیک و روتین با استفاده از نرم‌افزارهای AutoDock v.4.2 و Gromacs 2018 انجام شد.

نتایج: عصاره هیدروالکلی انجیر، پروفایل لیپیدی رت‌های هایپرلیپید را کاهش ($P < 0/001$) و میزان بیان ژن و همچنین فعالیت آنزیم پاراکسوناز ۱ را افزایش داد. بر اساس نتایج مطالعات دینامیک مولکولی، دو ترکیب روتین و گالیک اسید با تمایل بالای اتصال به آنزیم پاراکسوناز ۱ باعث افزایش در شعاع چرخشی آنزیم شده و احتمال فعال شدن آنزیم را افزایش می‌دهند.

نتیجه‌گیری: عصاره هیدروالکلی انجیر نه تنها موجب کاهش پروفایل لیپیدی می‌شود بلکه با فعال کردن آنزیم پاراکسوناز ۱ می‌تواند از بروز آترواسکلروزیس و تصلب شرایین تا حد بالایی جلوگیری کند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم پاراکسوناز ۱، هیپرلیپید، داکینگ، دینامیک مولکولی.

*نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه علوم پزشکی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، تلفن: ۰۳۸۲۲۲۲۱۴۷۱، نمابر: ۰۳۸۲۳۳۳۰۷۰۹، Email: rezaahmadimd@gmail.com

ارجاع: صفاری چالستری جواد، قطره سامانی کیهان، روحی حجت‌الله، احمدی رضا. بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی انجیر بر فعالیت و بیان ژن آنزیم پاراکسوناز ۱ در مدل هایپرلیپید موش صحرایی به روش آزمایشگاهی و شبیه‌سازی شده. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۲؛ ۱۸(۲): ۶۸-۶۰.

مقدمه

بیماری‌های قلبی عروقی از جمله شایع‌ترین علل مرگ و میر در جهان می‌باشند که مهمترین ریسک فاکتور آن اختلالات هیپرکلسترولمیا بوده و ارتباط نزدیکی با بروز آترواسکلروزیس دارد (۱ و ۲). از جمله مهمترین علل بروز آترواسکلروزیس، اکسید شدن کلسترول در لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین (Low Density Lipoprotein (LDL)) است که به دنبال آن تصلب و گرفتگی عروق را به دنبال دارد (۳ و ۴). کم تحرکی و رژیم غذایی پرچرب، فشار خون بالا، افزایش سن، دیابت، و استعمال دخانیات از جمله مهمترین عواملی هستند که در فرآیند اکسیداسیون LDL و بروز آترواسکلروزیس مؤثرند (۵-۷).

در عین حال، برخی آنزیم‌ها و فاکتورهای بیولوژیک، با فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌توانند مانع از بروز اکسیداسیون LDL شوند. آنزیم پاراکسوناز ۱ با فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود از جمله فاکتورهای کلیدی در جلوگیری از بروز آترواسکلروزیس است (۸). این آنزیم در کبد ساخته می‌شود و برای انجام فعالیت‌های بیولوژیک به سرم خون منتقل می‌شود (۹). آنزیم پاراکسوناز ۱ یک آنزیم پایدار و فعال در سرم است که نقش محافظتی از اکسیده شدن LDL پلاسما را ایفا می‌کند. در واقع این آنزیم از آنزیم‌های اصلی لیپوپروتئین پرچگال (High Density Lipoprotein (HDL)) است که می‌تواند نقش مهمی در خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آتروژنیک این لیپوپروتئین ایفاء کند (۱۰-۱۲). غلظت سرمی HDL با ایجاد و توسعه آترواسکلروز ارتباط معکوس دارد (۱۳). نقص یا کاهش فعالیت آنزیم پاراکسوناز ۱ ارتباط مستقیمی با بروز آترواسکلروزیس دارد. اما حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌تواند به‌طور بالقوه‌ای فعالیت این آنزیم را افزایش دهد (۱۴).

بسیاری از گیاهان به‌عنوان مهمترین منبع آنتی‌اکسیدان‌ها، در کاهش میزان چربی خون و یا کاهش عوارض ناشی از آن بسیار مؤثر شناخته شده‌اند (۱۵). انجیر یکی از قدیمی‌ترین گیاهان مصرف شده توسط انسان است که استفاده از آن در طب سنتی بسیار سفارش شده است. مطالعات نشان داده است که انجیر با دارا بودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و انواع آنتوسیانین‌ها به‌طور بالقوه‌ای می‌تواند منجر به کاهش کلسترول شود (۱۶ و ۱۷). همچنین مطالعات تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی نشان داده است که روتین و اسیدگالیک دو ترکیب آنتی‌اکسیدانی مهم در ساختار انجیر هستند (۱۸). به‌نظر می‌رسد که روتین و اسیدگالیک بر اساس خواص آنتی‌اکسیدانی خود از طرفی مانع اکسیداسیون کلسترول شده و از طرف دیگر موجب کاهش میزان کلسترول گردد (۱۹ و ۲۰).

با توجه به نقش آنزیم پاراکسوناز ۱ در حفظ هموستاز کلسترول و همین‌طور اهمیت انجیر در طب سنتی برای درمان بسیاری از

بیماری‌ها، این مطالعه تأثیر عصاره هیدروالکلی انجیر را بر میزان فعالیت مخصوص آنزیم پاراکسوناز ۱ با استفاده از خاصیت آریل استرازی آن بررسی نموده و میزان تأثیر این عصاره را بر بیان ژن آنزیم مذکور در بافت کبد تعیین نموده است. همچنین تأثیر مهمترین ترکیبات مؤثره انجیر شامل روتین و اسیدگالیک بر آنزیم پاراکسوناز ۱ با استفاده از محاسبات دینامیک مولکولی و مطالعات شبیه‌سازی شده مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی و شبیه‌سازی شده که در مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی پژوهشکده علوم پایه سلامت در دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام شد در ابتدا تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر با وزن تقریبی ۲۰۰ گرم در ۴ گروه ده‌تایی تقسیم شدند. پس از نگهداری حیوانات در شرایط ثابت دمایی ۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، تمامی گروه‌ها به شرح زیر مورد مطالعه قرار گرفتند:

تیمار حیوانات: گروه ۱ شامل ۱۰ سر موش صحرایی به‌عنوان گروه شاهد با رژیم غذایی معمولی به مدت ۹۰ روز. گروه ۲ شامل ۱۰ سر موش صحرایی به‌عنوان گروه کنترل منفی با رژیم غنی‌شده با چربی (۲۱) به مدت ۹۰ روز. گروه ۳ شامل ۱۰ سر رات همراه با رژیم غذایی غنی شده با چربی و عصاره هیدروالکلی انجیر با غلظت ۴۰۰ mg/kg به مدت ۹۰ روز گروه ۴ شامل ۱۰ سر رات همراه با رژیم غذایی غنی شده با چربی و عصاره هیدروالکلی انجیر با غلظت: ۸۰۰ mg/kg به مدت ۹۰ روز.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پاراکسوناز ۱: پس از کشتار حیوانات نمونه، سرم خون گروه‌های مختلف مورد مطالعه را جداسازی کرده و مقادیر فاکتورهای بیوشیمیایی مربوطه چربی و کلسترول خون با استفاده از کیت‌های پارس آزما و دستگاه BT-3000 اندازه‌گیری شدند. همچنین فعالیت مخصوص آنزیم پاراکسوناز ۱ بر اساس خاصیت آریل استرازی آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۷۰ nm اندازه‌گیری شد (۲۲).

اندازه‌گیری میزان بیان ژن آنزیم پاراکسوناز ۱: به‌منظور بررسی میزان بیان ژن آنزیم پاراکسوناز ۱، از نمونه‌های بافت کبد گروه‌های مورد مطالعه استفاده شد. استخراج RNA از بافت کبدی توسط کیت مربوطه استخراج RNA (RNAlplus) انجام شد. همچنین برای تبدیل RNA به cDNA از کیت سنتز cDNA (Takara Bio Inc., Japan) استفاده شد. انجام واکنش‌های Real time PCR با استفاده از سایبرگرین انجام شد و بیان ژن پاراکسوناز ۱ نسبت به ژن رفرنس بتا اکتین با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید (۲۳).

پرایمرهای مربوطه ژن پاراکسوناز ۱ با توالی

Forward: 5'- TTG AAT GAG AAG GAG CCA GC -3'

(Reverse: 5'- CAC GGT GGA CGA GGA GTC -3'

همچنین پرایمرهای مربوطه ژن بتا اکتین با توالی

تعداد پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوبی بین آنزیم پاراکسوناز ۱ و لیگاندهای مورد مطالعه بعد از داکینگ با نرم‌افزار Ligplot+ به دست آمدند. همچنین بعد از به دست آمدن نتایج داکینگ و شناسایی جایگاه اتصال لیگاندها به گیرنده، کمپلکس آنزیم-لیگاند طبق روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در حضور لیگاندهای مورد مطالعه شبیه‌سازی شدند.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی کمپلکس پروتئین-لیگاند در آب و نمک: در این مرحله، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی کمپلکس آنزیم پاراکسوناز ۱ با لیگاندهای مورد مطالعه در محیط آب و نمک مطابق روش بالا (شبیه‌سازی دینامیک مولکولی آنزیم پاراکسوناز ۱ در آب و نمک) انجام شد و همانند قبل مسیرهای ذخیره شده در شبیه‌سازی برای تجزیه و تحلیل شاخص‌های ساختاری کمپلکس مورد استفاده قرار گرفت. در پایان آخرین مرحله از محاسبات دینامیک مولکولی، مقادیر مربوطه میزان شعاع چرخشی (Radius of gyration (Rg)) و میانگین ریشه مربعات اسکلت پروتئین (Root Mean Square Deviation (RMSD)) مربوطه ساختارهای مورد مطالعه در مراحل مربوطه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی آنزیم پاراکسوناز ۱ در آب و نمک در مقایسه با شبیه‌سازی دینامیک مولکولی کمپلکس آنزیم-لیگاند در آب و نمک بر اساس دستورات موجود در نرم‌افزار گرومکس در محیط سیستم عامل لینوکس به دست آمد و نتایج حاصل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۲۴).

نتایج این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون اختصاصی آنالیز واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) با سطح معنی‌داری $P < 0.05$ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

نتایج

پروفایل لیپیدی شامل میزان تری‌گلیسرید (Triglycerides (TG))، کلسترول تام (Total Cholesterol (TC))، لیپوپروتئین با چگالی بالا (High Density Lipoproteins (HDL))، لیپو پروتئین با چگالی پایین (Low Density Lipoproteins (LDL)) و لیپو پروتئین با چگالی بسیار پایین (Very Low Density Lipoproteins (VLDL)) را در گروه‌های مورد مطالعه شامل گروه شاهد، گروه کنترل منفی (هایپر لیپید)، گروه تیمار شده با غلظت ۴۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی انجیر و گروه تیمار شده با غلظت ۸۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی انجیر در جدول ۱ نشان داده شده است.

نتایج مربوطه میزان بیان ژن آنزیم پاراکسوناز ۱ در نمودار ۱ نشان داده شده است. در موش‌های هاپرلیپید میزان بیان ژن آنزیم تغییر چندانی ندارد اما در گروه تیمار شده با غلظت ۴۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی انجیر و گروه تیمار شده با غلظت ۸۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی

Forward: 5'- CTT CTA CAA TGA GCT GCG TGT GGC C-3'

(Reverse: 5'- GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC ATG G-3'

از سایت NCBI تهیه شدند. واکنش‌های Real-time PCR شامل یک سیکل سه دقیقه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و پس از آن ۴۰ سیکل سه مرحله‌ای شامل ۱۰ ثانیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه ۶۲ درجه سانتی‌گراد و ۲۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. در پایان واکنش‌های Real-time PCR در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه خاتمه یافتند.

تهیه فایل‌های PDB: به منظور بررسی میزان تأثیرگذاری ترکیبات مؤثره انجیر بر آنزیم پاراکسوناز ۱ و انجام مطالعات مربوطه شبیه‌سازی و داکینگ مولکولی، ابتدا ساختار ماکرومولکولی و فایل PDB پروتئین پاراکسوناز ۱ از سایت PDB (Protein Data Bank) دریافت شد. همچنین ساختار مهمترین ترکیبات انجیر شامل روتین و گالیک اسید از سایت Pubchem دریافت و توسط نرم‌افزار Avogadro به فایل PDB تبدیل شدند.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی آنزیم پاراکسوناز ۱ در آب و نمک: مطالعات مربوطه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ساختار پروتئینی آنزیم پاراکسوناز ۱ با استفاده از نرم‌افزار Gromacs 2021 ابتدا در محیط آب نمک انجام شد تا ساختار مربوطه تحت شرایط تغییرات دما، فشار در غلظت ۱۴۰ میلی‌مولار قرار بگیرد و به حالت تعادل برسد. در این مطالعه از میدان نیروی G43A1 و مدل SPC216 استفاده شد (۲۴). بر اساس استانداردهای موجود غلظت املاح سیستم با افزودن مقادیر موردنیاز یون Na و Cl به غلظت ۱۴۰ میلی‌مولار رسانده شد و تعداد یون مذکور با حلال آب جایگزین شدند. مسیرهای ذخیره شده در شبیه‌سازی به عنوان کنترل برای تجزیه و تحلیل شاخص‌های ساختاری پروتئین پاراکسوناز ۱ در حضور لیگاندهای مورد استفاده قرار گرفتند. در ادامه بر روی فایل PDB خروجی از ساختار شبیه‌سازی شده در آب، مطابق روش زیر داکینگ مولکولی انجام شد.

داکینگ مولکولی: برای انجام داکینگ مولکولی نرم‌افزار Autodock 4.1 مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از این برنامه می‌توان پیش‌بینی کرد که یک سوسترا یا دارو چگونه در گیرنده قرار می‌گیرد و ساختار سه بعدی آن نیز نشان داده می‌شود. با استفاده از این برنامه روتین و گالیک اسید به عنوان لیگاند و آنزیم پاراکسوناز ۱ به عنوان گیرنده تعریف شدند. لیگاندهای مورد مطالعه به صورت جداگانه در کنار آنزیم پاراکسوناز ۱ در ۲۰۰ مرحله مستقل جایگیری شده و مورد بررسی قرار گرفتند. برای انجام داکینگ از الگوریتم ژنتیک استفاده شد. در این روش با جابجا کردن لیگاند و چرخاندن آن اطراف پروتئین صورت‌بندی‌های جدید لیگاند در کنار پروتئین شناسایی شدند. پایین‌ترین سطح انرژی اتصال از برهمکنش بین لیگاند و آنزیم به عنوان مناسب‌ترین جایگاه اتصال در انجام داکینگ محسوب شدند.

جایگاه اتصال با این لیگاندها برهمکنش‌های هیدروژنی و هیدروفوب تشکیل داده‌اند نشان داده شده است. روتین با ۵ پیوند هیدروژنی و ۸ پیوند هیدروفوب با اسیدآمین‌های جایگاه اتصال پیوند برقرار کرده است. در حالی که اسیدگالیک با ۳ پیوند هیدروژنی و ۱۱ پیوند هیدروفوب با اسیدآمین‌های جایگاه اتصال پیوند برقرار کرده است.

مقادیر مربوطه میزان RMSD در مدت زمان ۱۰ نانوثانیه از فرآیند شبیه‌سازی دینامیک مولکولی قبل از داکینگ و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بعد از داکینگ، در نمودار ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که سیستم شبیه‌سازی بعد از گذشت ۴ نانوثانیه از زمان شبیه‌سازی به پایداری می‌رسد.

همچنین مقادیر مربوطه شعاع چرخشی (Rg) آنزیم پاراکسوناز ۱ قبل از داکینگ مولکولی و بعد از داکینگ مولکولی ترکیبات مؤثره اسید گالیک و روتین در نمودار ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که با اتصال اسید گالیک و روتین به جایگاه اتصال آنزیم پاراکسوناز ۱ میانگین شعاع چرخشی آنزیم افزایش می‌یابد. میزان افزایش شعاع چرخشی آنزیم پاراکسوناز ۱ در اتصال با روتین، بسیار بیشتر از میزان افزایش شعاع چرخشی آنزیم پاراکسوناز ۱ در اتصال با اسیدگالیک است.

انجیر بیان ژن به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. همچنین نتایج آزمایشات مربوطه فعالیت آریل استرازای آنزیم PON1 در تصویر ۱ نشان داده شده است. در موش‌های هاپرلیپید میزان فعالیت آنزیم به شدت کاهش می‌یابد اما در گروه تیمار شده با غلظت ۴۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی انجیر و گروه تیمار شده با غلظت ۸۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی انجیر این کاهش فعالیت به‌طور معنی‌داری افزایش نشان می‌دهد. افزایش فعالیت آنزیم در گروه‌هایی که با غلظت ۸۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی انجیر تیمار شده‌اند رشد بیشتری داشته است.

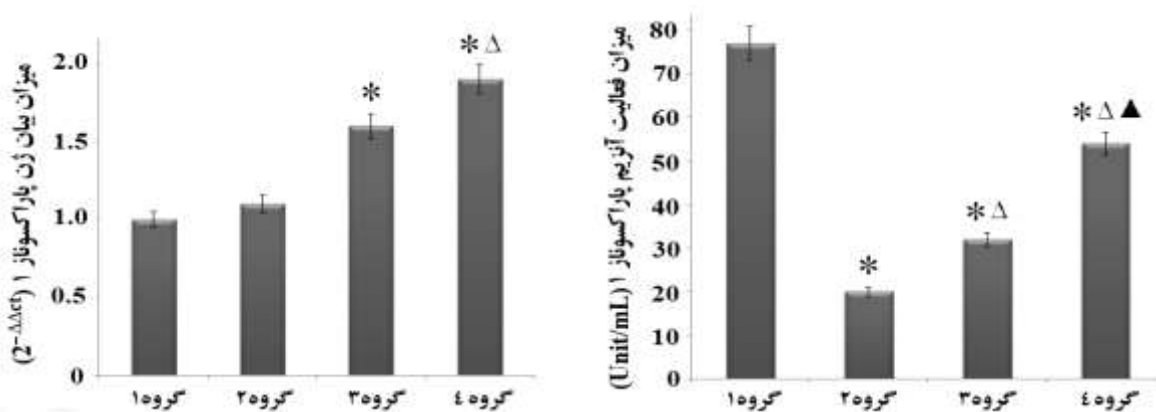
نتایج مربوطه مطالعات داکینگ مولکولی و میزان انرژی اتصال (Binding Energy) هنگام اتصال لیگاندهای روتین و گالیک اسید به جایگاه اتصال آنزیم پاراکسوناز ۱ همچنین تعداد اسیدآمین‌های موجود در جایگاه اتصال برای هرکدام از لیگاندها و نوع پیوند هیدروژنی یا پیوند هیدروفوب در جدول ۲ نشان داده شده است. تمایل اتصال روتین به جایگاه اتصال آنزیم پاراکسوناز ۱ با آزاد کردن ۸/۱۰ KJ/mol انرژی بسیار بیشتر از تمایل اتصال اسید گالیک به جایگاه اتصال آنزیم پاراکسوناز ۱ با آزاد کردن ۵/۶۷ KJ/mol انرژی است.

شکل ۱ جایگاه اتصال مهمترین ترکیبات مؤثره انجیر شامل روتین و اسید گالیک را نشان می‌دهد. همچنین اسیدهای آمینه‌ای که در

جدول ۱- پروفایل لیپیدی گروه‌های مورد مطالعه

گروه ۱ (کنترل منفی)	گروه ۲ (شاهد)	گروه ۳ (۴۰۰ mg/kg)	گروه ۴ (۸۰۰ mg/kg)
۴۲/۶۲±۹/۳۰	۹۷/۵۰±۱۶/۸۱*	۷۷/۸۸±۱۲/۷۷* Δ	۷۴/۶۲±۱۰/۸۶* Δ
۴۷/۱۲±۹/۰۹	۱۰۵/۸۸±۱۰/۱۵*	۸۷/۱۲±۱۵/۰۵* Δ	۸۹/۶۲±۷/۶۹* Δ
۹/۷۷±۴/۰۵	۲۴/۷۹±۵/۳۰*	۱۸/۵۳±۳/۳۱* Δ	۱۴/۵۹±۴/۴۸* Δ
۹/۲۸±۲/۰۱	۲۱/۱۸±۲/۰۳*	۱۷/۳۸±۳/۰۰*	۱۷/۵۰±۲/۴۶*
۳۲/۶۱±۵/۰۴	۲۸/۶۰±۴/۳۲	۳۵/۶۸±۷/۳۲ Δ	۳۶/۵۵±۴/۹۶ Δ

گروه ۱: به‌عنوان گروه کنترل منفی با رژیم غذایی معمولی. گروه ۲: به‌عنوان گروه شاهد با رژیم غنی شده چربی با سرم اینترالیپید. گروه ۳: رژیم غذایی غنی شده چربی با سرم اینترالیپید و عصاره هیدروالکلی انجیر با غلظت ۴۰۰ mg/kg. گروه ۴: رژیم غذایی غنی شده چربی با سرم اینترالیپید و عصاره هیدروالکلی انجیر با غلظت ۸۰۰ mg/kg به مدت ۹۰ روز. نتایج به‌صورت (SD ± میانگین) نشان داده شده‌اند. * نشانه سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه ۱. Δ نشانه سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه ۲. ▲ نشانه سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه ۳.

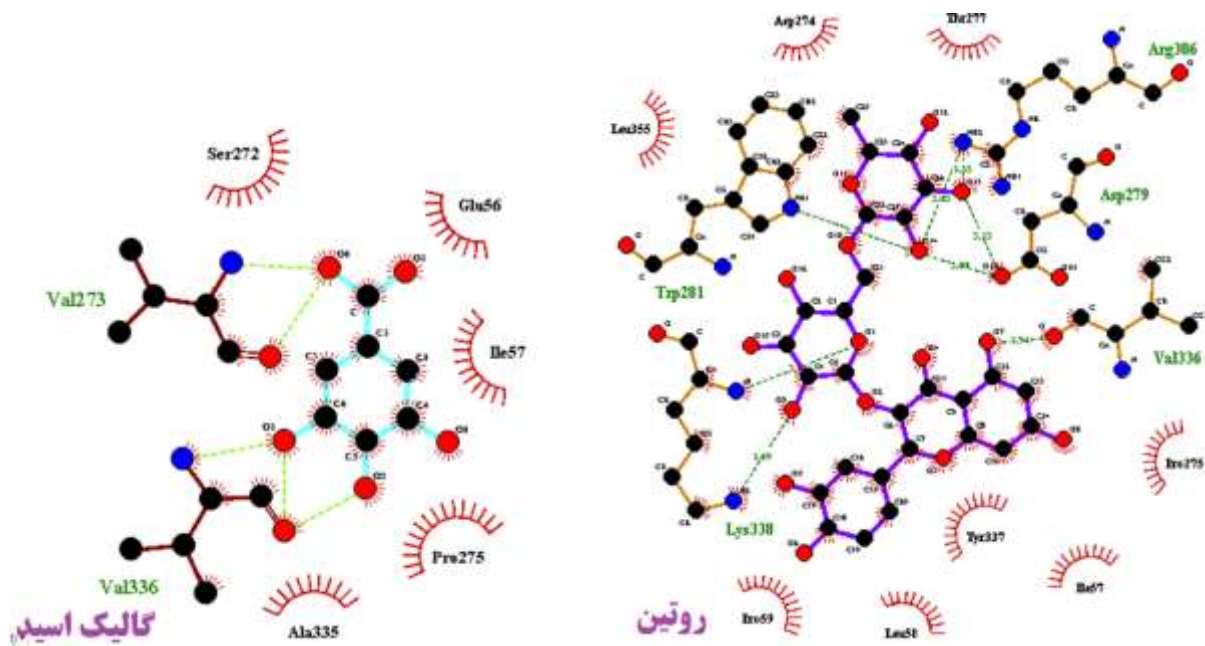


نمودار ۱- میزان فعالیت (Unit/mL) و بیان ژن (2-ΔΔct) آنزیم پاراکسوناز ۱

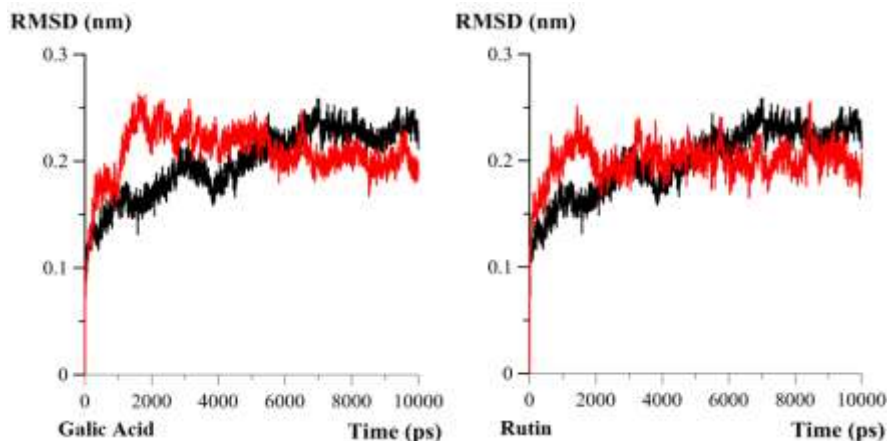
گروه ۱: به عنوان گروه کنترل منفی با رژیم غذایی معمولی. گروه ۲: به عنوان گروه شاهد با رژیم غنی شده چربی با سرم اینترالیپید. گروه ۳: رژیم غذایی غنی شده چربی با سرم اینترالیپید و عصاره هیدروالکلی انجیر با غلظت ۴۰۰ mg/kg. گروه ۴: رژیم غذایی غنی شده چربی با سرم اینترالیپید و عصاره هیدروالکلی انجیر با غلظت ۸۰۰ mg/kg به مدت ۹۰ روز. نتایج به صورت (SD ± میانگین) نشان داده شده‌اند. * نشانه معنی داری ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه ۱. Δ نشانه سطح معنی داری ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه ۲. \blacktriangle نشانه سطح معنی داری ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه ۳.

جدول ۲- انرژی اتصال و آمینواسیدهای موجود در جایگاه اتصال روتین و گالیک اسید به آنزیم

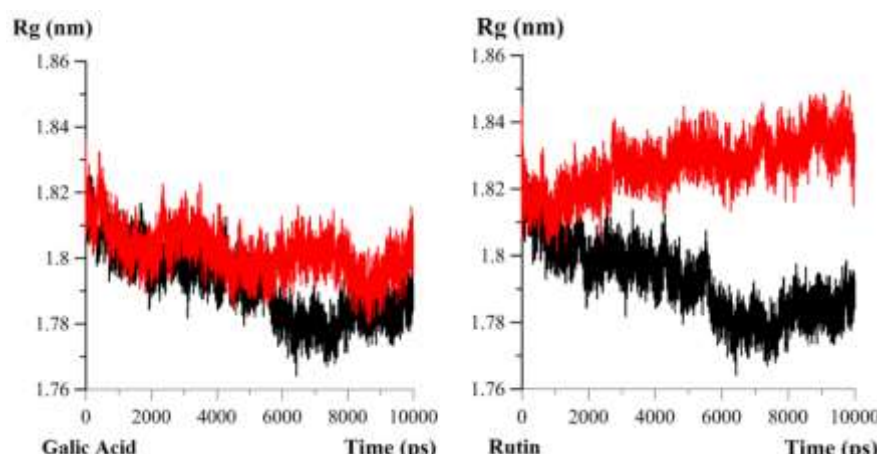
لیگاند-گیرنده	انرژی اتصال KJ/mol	پیوندهای بین لیگاند-گیرنده	پیوند هیدروفوب
گالیک اسید-پاراکسوناز	-۵/۶۷	Asn227, Val273, Val336	Leu55, Ser272, Glu56, Asp274, Val336, Tyr337, Pro59, Leu58, Ala335, Ile54, Pro275
روتین-پاراکسوناز	-۸/۱۰	Trp281, Asp279, Arg306, Asp279, Val336	Leu335, Asp274, Thr177, Pro275, Tyr337, Ile57, Leu58, Pro59



شکل ۱- جایگاه اتصال روتین و اسید گالیک با آنزیم پاراکسوناز ۱. پیوند هیدروژنی و پیوند هیدروفوب



نمودار ۲- مقادیر مربوطه میزان root-mean-square deviation (RMSD). خطوط سیاه مربوطه شبیه سازی آنزیم پاراکسوناز ۱ قبل از داکینگ مولکولی و خطوط قرمز مربوطه شبیه سازی آنزیم پاراکسوناز ۱ بعد از داکینگ مولکولی است.



نمودار ۳- مقادیر مربوط به میزان شعاع چرخشی (Radius of gyration (Rg). خطوط سیاه مربوط به شبیه سازی آنزیم پاراکسوناز ۱ قبل از داکینگ مولکولی و خطوط قرمز مربوط به شبیه سازی آنزیم پاراکسوناز ۱ بعد از داکینگ مولکولی است.

شکل ۲ نشان می‌دهد که ترکیبات مؤثره موجود در عصاره هیدروالکلی انجیر علاوه بر افزایش میزان بیان ژن آنزیم پاراکسوناز ۱ می‌توانند مستقیماً بر روی آنزیم اثر گذاشته و میزان فعالیت آن را افزایش می‌دهد. در مطالعه حاضر میزان فعالیت آریل استرازای آنزیم پاراکسوناز ۱ در رت‌های هاپرلیپید به‌طور معنی‌دار کاهش یافته و این در حالی است که مصرف دوزهای ۴۰۰ و ۸۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی گیاه انجیر در رت‌های هاپرلیپید منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آریل استرازای آنزیم پاراکسوناز ۱ می‌شود (نمودار ۱). مطالعات پیشین نشان داده است که بسیاری از ترکیبات آنتوسیانین و متابولیت‌های میکروبی می‌توانند علاوه بر افزایش میزان بیان ژن آنزیم پاراکسوناز ۱ میزان فعالیت آنزیمی را هم افزایش دهند (۲۹). پارسایان و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که عصاره میوه انار می‌تواند منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم پاراکسوناز ۱ در بیماران دیابتی شود (۳۰).

نتایج دینامیک مولکولی و محاسبات شبیه‌سازی شده حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که روتین و اسیدگالیک به‌عنوان مهمترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فلاونوئیدی عصاره هیدروالکلی انجیر با تمایل بسیار بالا برای اتصال به آنزیم پاراکسوناز ۱ می‌توانند تأثیرگذاری بالقوه‌ای را بر ساختار آنزیم القاء کنند. نتایج حاصل از داکینگ مولکولی نشان داد که روتین با آزاد کردن انرژی اتصال حدود ۸۱۰ kJ/mol تمایل بالاتری برای اتصال با جایگاه فعال آنزیم پاراکسوناز ۱ دارد (جدول ۲). همچنین اتصال روتین در جایگاه اتصال از طریق ۵ پیوند هیدروژنی و ۸ پیوند هیدروفوب برقرار شده است که نشان دهنده تمایل بسیار بالا برای اتصال روتین به آنزیم پاراکسوناز ۱ است (جدول ۲ و شکل ۱). دمیر و همکاران در سال ۲۰۲۰ اثرات مهار

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی گیاه انجیر می‌تواند تأثیر معنی‌داری بر کاهش میزان پروفایل لیپیدی سرم رت‌های هاپرلیپید داشته باشد. میزان کلسترول تام، تری‌گلیسرید و LDL پس از مصرف دوزهای ۴۰۰ و ۸۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی گیاه انجیر در موش‌های صحرایی هاپرلیپید به طرز معنی‌داری کاهش یافته و همچنین میزان HDL افزایش معنی‌دار داشته است (جدول ۱). مطالعات پیشین نیز نشان داده است که انجیر به‌واسطه دارا بودن میزان قابل توجهی از پتاسیم و چربی‌های غیر اشباع امگا۳ و امگا۶ منجر به کاهش فشار خون و کاهش میزان کلسترول خون می‌شود (۲۵). آنزیم پاراکسوناز ۱ به‌عنوان یک آنزیم کلیدی در محافظت از اکسیداسیون LDL نقش مهمی را در هموستاز کلسترول ایفا می‌کند (۲۶).

به‌نظر می‌رسد که ترکیبات فلاونوئیدی و آنتوسیانین‌های موجود در انجیر نقش به‌سزایی در افزایش میزان بیان ژن آنزیم پاراکسوناز ۱ داشته باشند. به‌طوری که نتایج این مطالعه نشان می‌دهد میزان بیان ژن آنزیم پاراکسوناز ۱ در رت‌های هاپرلیپید که دوزهای ۴۰۰ و ۸۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی گیاه انجیر را مصرف کرده‌اند به طرز معنی‌داری افزایش یافته است (نمودار ۱). در مطالعه خسروی و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان داده شد که ماده مؤثره سیترال موجود در گیاه علف لیمو میزان بیان ژن آنزیم پاراکسوناز ۱ را رت‌های دیابتی افزایش می‌دهد (۲۷). همچنین فتح‌الهی و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که کورکومین موجود در زردچوبه می‌تواند میزان بیان ژن آنزیم پاراکسوناز ۱ را در رت‌هایی که با مصرف اتانول دچار آسیب کبدی شده‌اند افزایش دهد (۲۸).

- and meta-analysis of cohort studies. *Scientific Reports* 2021;14:1-28. doi: 10.1038/s41598-020-79708-x
- Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, et al. Heart disease and stroke statistics-2021 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2021;143:254-743. doi: 10.1161/CIR.0000000000000950
 - Ahmad F, Mitchell RD, Houben T, Palo A, Yadati T, Parnell AJ, et al. Cysteamine Decreases Low-Density Lipoprotein Oxidation, Causes Regression of Atherosclerosis, and Improves Liver and Muscle Function in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Journal of the American Heart Association* 2021;10:e017524. doi: 10.1161/JAHA.120.017524
 - Zhang S, Li L, Chen W, Xu S, Feng X, Zhang L. Natural products: The role and mechanism in low-density lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Phytotherapy Research* 2021;35:2945-67. doi: 10.1002/ptr.7002
 - Waqar AB, Koike T, Yu Y, Inoue T, Aoki T, Liu E, et al. High-fat diet without excess calories induces metabolic disorders and enhances atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 2010;213:148-55. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.07.051
 - Yuan T, Yang T, Chen H, Fu D, Hu Y, Wang J, et al. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Redox Biology* 2019;20:247-60. doi: 10.1016/j.redox.2018.09.025
 - Kiriyama H, Kaneko H, Itoh H, Yoshida Y, Nakanishi K, Mizuno Y, et al. Effect of cigarette smoking on carotid artery atherosclerosis: a community-based cohort study. *Heart and Vessels* 2020;35:22-9. doi: 10.1007/s00380-019-01455-5
 - Litvinov D, Mahini H, Garelnabi M. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases. *North American Journal of Medical Sciences* 2021;4:523-11. doi: 10.4103/1947-2714.103310
 - Gong M, Garige M, Varatharajulu R, Marmillot P, Gottipatti C, Leckey LC, et al. Quercetin up-regulates paraoxonase 1 gene expression with concomitant protection against LDL oxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010;59:1372-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.01.015
 - Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Fogelman AM, Berliner J, Lusis AJ, et al. Paraonase and coronary heart disease. *Current Opinion in Lipidology* 1998;9:319-24. doi: 10.1097/00041433-199808000-00006
 - Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PN. Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1999;19:330-5. doi: 10.1161/01.ATV.19.2.330
 - Mackness MI, Mackness B, Durrington PN. Paraonase and coronary heart disease. *Atherosclerosis Supplements* 2002;3:49-55. doi: 10.1016/S1567-5688(02)00046-6
 - Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, et al. Paraonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2001;21:1451-7. doi: 10.1161/hq0901.094247
 - Ghaffari T, Nouri M, Irannejad E, Rashidi M-R. Effect of vitamin E and selenium supplement on paraonase-1 activity, oxidized low density lipoprotein and antioxidant defense in diabetic rats. *BioImpacts BI* 2011;1:121.
 - Geng X, Liu H, Yuwen Q, Wang J, Zhang S, Zhang X, et al. Protective effects of zingerone on high cholesterol diet-induced atherosclerosis through lipid regulatory signaling pathway. *Human & Experimental Toxicology* 2021;40:1732-45. doi: 10.1177/09603271211006170
 - Fatemi A, Rasouli A, Asadi F. Effect of fig (*Ficus carica*) leaf extract on the secretion and content of cholesterol in Hepg2 cell. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences* 2007;2:104-7. doi: 10.3844/ajavsp.2007.104.107

کنندگی برخی ترکیبات ضدسرطان بر روی آنزیم پاراکسوناز را با استفاده از مطالعات شبیه‌سازی و داکینگ مولکولی نشان دادند (۳۱). همچنین علیم و همکاران نیز در سال ۲۰۱۹ با استفاده از مطالعات داکینگ مولکولی نشان دادند که ترکیبات ایندازول می‌توانند با تمایل بسیار بالایی به جایگاه اتصال آنزیم پاراکسوناز متصل شوند. هرچند که نتایج مطالعه آنان نشان داد که احتمالاً اتصال ترکیبات ایندازول منجر به مهار فعالیت آنزیمی پاراکسوناز می‌شود (۳۲). اما نتایج حاصل از محاسبات دینامیک مولکولی شبیه‌سازی شده در مطالعه حاضر نشان می‌دهد که اسیدگالیک و روتین می‌توانند با اتصال به آنزیم پاراکسوناز موجب فعال شدن این آنزیم شوند. عدم نوسان در نمودارهای مربوط به RMSD در نمودار ۲ نشان می‌دهد که فرآیند و سیستم‌های شبیه‌سازی در مراحل پایانی ۱۰ نانوثانیه به پایداری کامل رسیده است (نمودار ۲). همچنین اتصال روتین و اسید گالیک به آنزیم پاراکسوناز موجب افزایش در میزان شعاع چرخشی آنزیم پاراکسوناز شده است. نمودار ۳ نشان می‌دهد که افزایش شعاع چرخشی آنزیم پاراکسوناز بعد از اتصال با روتین، بسیار بیشتر از افزایش شعاع چرخشی کمپلکس آنزیم با اسیدگالیک است. از آنجا که افزایش شعاع چرخشی پروتئین احتمال در دسترس قرار دادن جایگاه فعال آنزیم را برای انجام واکنش‌های کاتالیتیک افزایش می‌دهد به نظر می‌رسد که اتصال روتین و اسیدگالیک به آنزیم پاراکسوناز منجر به فعال شدن این آنزیم می‌شود که با نتایج آزمایشگاهی مطابقت دارد.

این مطالعه نشان می‌دهد که انجیر نه تنها تأثیر به‌سزایی در کاهش پروفایل لیپیدی دارد بلکه ترکیبات موثره موجود در آن به‌واسطه فعال کردن آنزیم پاراکسوناز می‌توانند نقش حفاظتی در برابر اکسید شدن LDL ایفا کنند و این امر از رسوب کلسترول در عروق و بروز آترواسکلروزیس جلوگیری می‌کند. مهمترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی انجیر شامل روتین و اسیدگالیک می‌باشند که با تمایل بالا برای اتصال به آنزیم پاراکسوناز نقش مهمی را در فعال کردن آنزیم ایفا می‌کنند. نتایج این مطالعه به خوبی نشان می‌دهد که مصرف انجیر نه تنها می‌تواند موجب کاهش پروفایل لیپیدی شود بلکه از بروز آترواسکلروزیس و تصلب شرایین تا حد بالایی جلوگیری کند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از حمایت‌های معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد بابت تأمین هزینه‌های مالی انجام این طرح (کد: ۶۷۱) و کد اخلاق (IR.SKUMS.REC.1397.125) نهایت قدردانی به‌عمل می‌آید.

References

- Jakobsen MU, Trolle E, Outzen M, Mejbom H, Grønberg MG, Lyndgaard CB, et al. Intake of dairy products and associations with major atherosclerotic cardiovascular diseases: a systematic review

17. Solomon A, Golubowicz S, Yablowicz Z, Grossman S, Bergman M, Gottlieb HE, et al. Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006;54:7717-23. doi: [10.1021/jf060497h](https://doi.org/10.1021/jf060497h)
18. Veberic R, Colaric M, Stampar F. Phenolic acids and flavonoids of fig fruit (*Ficus carica* L.) in the northern Mediterranean region. *Food Chemistry* 2008;106:153-7. doi: [10.1016/j.foodchem.2007.05.061](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.061)
19. Shaik AH, Shaik SR, Daddam JR, Ali D, Manoharadas S, Arafah MW, et al. Maslinic acid and gallic acid protective efficacy on lipids, lipoproteins and lipid metabolizing enzymes against isoproterenol administered cardiotoxicity: an in vivo and in silico molecular docking evidences. *Journal of King Saud University-Science* 2021;33:101230. doi: [10.1016/j.jksus.2020.101230](https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.101230)
20. de Oliveira DA, Diniz SN, Pereira RM, Gonçalves ID, Rennó AL, Gorjão R, Vieira EG, da C. Ferreira AM, Okuyama CE. Effectiveness of a new rutin Cu (II) complex in the prevention of lipid peroxidation and hepatotoxicity in hypercholesterolemic rats. *Journal of Food Biochemistry* 2021;7:13999. doi: [10.1111/jfbc.13999](https://doi.org/10.1111/jfbc.13999)
21. Rouhi-Broujeni H, Heidarian E, Darvishzadeh-Borojeni P, Rafieian-Kopaei M, Gharipour M. Lipid lowering activity of *Moringa pergerina* seeds in rat: a comparison between the extract and atorvastatin. *Research Journal of Biological Sciences* 2013;8:150-4.
22. Zargari F, Tabaghchi Saeedy H. Effects of Vitamin C on Paraoxonase1 Arylesterase Activity in Rats Exposed to Arsenic. *Iranian Journal of Toxicology*. 2017;11:47-50. doi: [10.29252/arakmu.11.3.47](https://doi.org/10.29252/arakmu.11.3.47)
23. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*. 2008;3:1101-8. doi: [10.1038/nprot.2008.7](https://doi.org/10.1038/nprot.2008.7)
24. Project E, Nachliel E, Gutman M. Force field-dependant structural divergence revealed during long time simulations of Calbindin d9k. *Journal of computational chemistry*. 2010;31:1864-72. doi: [10.1002/jcc.21473](https://doi.org/10.1002/jcc.21473)
25. Hussain SZ, Naseer B, Qadri T, Fatima T, Bhat TA. Fig (*Ficus Carica*)-Morphology, Taxonomy, Composition and Health Benefits. *Fruits Grown in Highland Regions of the Himalayas*: Springer; 2021;16:77-90. doi: [10.1007/978-3-030-75502-7_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-75502-7_6)
26. Ali RJ, Baban RS, Ali SH. Evaluation of Lipid metabolizing enzymes: ParaxonaseI (PON1) and Lecithin Cholesterol acyltransferase (LCAT) activities in children with nephrotic syndrome. *Baghdad Journal of Biochemistry and Applied Biological Sciences*. 2021;2:47-58. doi: [10.47419/bjbabs.v2i01.38](https://doi.org/10.47419/bjbabs.v2i01.38)
27. Bakhtiari MK, Sharifiyazdi H, Nazifi S, Ghaemi M, Zarandi MH. Effects of citral on serum antioxidant status and liver genes expressions of paraoxonase 1 and nitric oxide synthase in a rat model of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2021;22:195.
28. Fatolahi H, Azarbayjani MA, Peeri M, Matinhomaei H. The effect of curcumin and exercise rehabilitation on liver paraoxonase-1 and NF-κβ gene expression in the rat induced by forced drinking of ethanol. *Clinical and experimental hepatology*. 2020;6:49. doi: [10.5114/ceh.2020.93057](https://doi.org/10.5114/ceh.2020.93057)
29. Aboufarrag HT, Needs PW, Rimbach G, Kroon PA. The effects of anthocyanins and their microbial metabolites on the expression and enzyme activities of paraoxonase 1, an important marker of HDL function. *Nutrients* 2019;27:2887. doi: [10.3390/nu11122872](https://doi.org/10.3390/nu11122872)
30. Parsaeyan N, Mozaffari-Khosravi H, Mozayan MR. Effect of pomegranate juice on paraoxonase enzyme activity in patients with type 2 diabetes. *Journal of diabetes & metabolic disorders*. 2012;11:1-4. doi: [10.1186/2251-6581-11-11](https://doi.org/10.1186/2251-6581-11-11)
31. Demir Y, Türkeş C, Beydemir Ş. Molecular docking studies and inhibition properties of some antineoplastic agents against paraoxonase-I. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 2020;20:887-96. doi: [10.2174/1871520620666200218110645](https://doi.org/10.2174/1871520620666200218110645)
32. Alım Z, Kılıç D, Demir Y. Some indazoles reduced the activity of human serum paraoxonase 1, an antioxidant enzyme: in vitro inhibition and molecular modeling studies. *Archives of physiology and biochemistry*. 2019;125:387-95. doi: [10.1080/13813455.2018.1470646](https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1470646)



The Effect of Hydro-Alcoholic Extract of Fig on Paraoxonase1 Enzyme in a Rat Hyperlipidemia Model. An In-Silico and In-Vitro Study

Javad Saffari-Chaleshtori (Ph.D.)¹, Keyhan Ghatre-Samani (Ph.D.)², Hojatollah Rohi-Brojeni (Ph.D.)¹, Reza Ahmadi (Ph.D.)^{1*}

1- Clinical Biochemistry Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

2- Medical Plant Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

Received: 23 January 2022, Accepted: 12 February 2023

Abstract:

Introduction: Paraoxonase 1 is a key enzyme against Low Density Lipoprotein (LDL) oxidation. Increased activity of this enzyme can lead to the prevention of atherosclerosis. This study investigated the effect of hydro-alcoholic extract of fig on the activity and gene expression of paraoxonase 1. Also, the effect of the most important effective compounds of fig on the function of this enzyme was investigated by simulation studies.

Methods: Four groups of ten male rats including control group and hyperlipidemia groups were treated with concentrations of 400 and 800 mg / kg of hydro-alcoholic extract of fig for 90 days. Serum lipid profile was measured, and paraoxonase 1 gene expression was detected in liver tissues, as well as paraoxonase 1 aryl esterase activity in animal serum. Simulation and molecular dynamics studies of the most important effective compounds of fig including gallic acid and rutin were performed using AutoDock v.4.2 and Gromacs 2018 software.

Results: The hydro-alcoholic extract of fig decreased the lipid profile of hyperlipidemia rats ($P < 0.001$), increased gene expression as well as paraoxonase 1 activity ($P < 0.05$). According to the results of molecular dynamics studies, two compounds of rutin and gallic acid with a high tendency to bind to the enzyme paraoxonase 1 increase the rotational radius of the enzyme and also increase the activated probability of the enzyme.

Conclusion: The hydro-alcoholic extract of fig not only reduces the lipid profile but also by activating the enzyme paraoxonase 1 can greatly prevent atherosclerosis and atherosclerosis.

Keywords: Paraoxonase1, Hyperlipidemia, Docking, Molecular Dynamic.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: R. Ahmadi, Email: rezaahmadimd@gmail.com

Citation: Saffari-Chaleshtori J, Ghatre-Samani K, Rohi-Brojeni H, Ahmadi R. The effect of hydro-alcoholic extract of fig on paraoxonase1 enzyme in a rat hyperlipidemia model. An in-silico and in-vitro study. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2023;18(2):60-68.