مطالعه تغییرات فعالیت‌های پاراکسونازی و آریل‌استرازی آنزیم پاراکسوناز به‌دنبال تجویز عصاره آبی سیر در موش صحرائی

دکتر نادره رشتچی‌زاده[*1]، دکتر امیر قربانی حق‌جو[2]، دکتر محمدحسین میرمومنی[3]، مرتضی قاری قرآن[4]، جابر هاشم‌زاده[5]

تاریخ دریافت ۸۹/۱/۱۲، تاریخ پذیرش ۸۹/۳/۱

چکیده

پیش زمینه و هدف: آنزیم پاراکسوناز (PON 1) یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های حذف کننده رادیکال‌های آزاد و از محافظ‌های اصلی لیپوپروتئین‌ها در برابر ترکیبات اکسیدکننده می‌باشد. مطالعه حاضر بررسی اثر تجویز عصاره آبی سیر را بر فعالیت این آنزیم مورد توجه قرار می‌دهد.

مواد و روش کار: ۲۰ راس موش صحرایی نر به‌روش غیرانتخابی به ۲ گروه مساوی تقسیم شدند. در گروه ۱ هر موش به میزان ۳ میلی‌لیتر عصاره آبی سیر به‌صورت داخل پریتونئال و گروه ۲ (کنترل) در حجم مساوی سالین نرمال در شرایط یکسان دریافت نمودند. پس از مدت ۷ روز خون گیری از موش‌های هر دو گروه و انجام آزمایشات مربوطه، فعالیت آنزیم‌های پاراکسوناز - آریل استراز، آنتی اکسیدانت تام، سطح مالون دی آلدهید سرمی و همچنین سطح پروفیل لیپیدی شامل کلسترول، تری گلیسیرید،HDL-C و LDL-C مورد سنجش قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیمی پاراکسونازی و آریل‌استرازی، آنتی اکسیدانت تام سرمی و کاهش معنی‌داری در مقدار سرمی مالون دی آلدهید گروه مورد نسبت به گروه شاهد ($P < ۰/۰۵$ در تمامی موارد) می‌باشد. همچنین همبستگی مثبت و معنی‌داری بین فعالیت آنزیم PON با فعالیت ARYL ($p=۰/۰۲۵$ و$r=۰/۶۹۷$) و نیز سطح سرمی HDL-C ($p= ۰/۰۰۶$ و$r=۰/۷۹۴$) مشاهده گردید.

بحث و نتیجه‌گیری: عصاره آبی سیر به دلیل توانایی افزایش فعالیت آنزیم PON، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش قدرت آنتی اکسیدانتی می‌تواند به‌عنوان یک ماده غذایی کاهش دهنده محصولات تنش اکسیداتو مورد توجه قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: عصاره‌آبی سیر ، مالون دی آلدهید، پاراکسوناز، آریل استراز

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و یکم، شماره دوم، ص ۲۶۶-۲۶۰، تابستان ۱۳۸۹

آدرس مکاتبه: تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات کاربردی داروئی تلفن: ۰۹۱۴۱۱۴۵۴۹۳

Email: rashtchizadeh@yahoo.com

مقدمه

پاراکسوناز ۱ (PON 1) سرمی انسان (Hu PON1; EC 3.1.8.1) پروتئین گلیکولیزه شده‌ای است که دارای وزن ملکولی ۴۵-۴۳ KDa و حاوی ۳۴۵ اسید آمینه می‌باشد (۱). ساختار سه بعدی PON1 دارای یک جایگاه فعال و ۶ پره بتا (β-propeller) بوده و وابسته به Ca^{2+} است و با جذب آن ساختار و عملکرد کاتالیتیکی آنزیم به هم می‌ریزد (۴-۲). این آنزیم متصل به لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) است که با زنجیرهای غیراشباع فسفولیپیدی آن در ارتباط تنگاتنگ است (۵)؛ در کبد ساخته می‌شود و در خون به HDL متصل می‌شود (active site). این آنزیم دارای چندین عمل کاتالیتیکی متفاوت است: پاراکسونازی، آریل استرازی (ARYL)، دیازوکسونازی و لاکتونازی (۸-۶). در ابتدا محققان تصور می‌کردند که آنزیم PON1 فقط ترکیبات فسفات آلی (Ops) مثل پاراکسون را سم زدایی می‌کند و نام آن را طبق سوبسترای آن

[1] دانشیار بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات کاربرد داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (نویسنده مسول)

[2] استادیار بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات کاربرد داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

[3] استادیار علوم سلولی، دانشگاه رازی کرمانشاه

[4] کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه رازی کرمانشاه

[5] کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

پاراکسوناز نامیدند (۹) اما بعدها متوجه شدند که عمل عمده این آنزیم مقابله با رادیکال‌های آزاد و مهار تنش‌های اکسیداتیو می‌باشد. این آنزیم به همراه سایر آنزیم‌ها و مواد آنتی اکسیدان در بدن یک سد دفاعی قوی در برابر مواد اکسید کننده تولید شده ایجاد می‌کنند. مواد اکسید کننده ممکن است در خود بدن در مسیرهای متابولیکی اکسایش - احیا تولید شود که مهم‌ترین آن پراکسید هیدروژن (H_2O_2) است و یا در اثر مصرف چربی‌های اکسید شده بوجود آید. جلوگیری از اکسیداسیون LDL دستاورد جدیدی است که دانشمندان برای PON1 متصوراند (۱۰). از آنجایی که لیپوپروتئین با چگالی پایین (LDL) و گونه اکسید شده آن ارتباط مهمی با نارسایی بافت‌های مختلف مثل قلب، کبد، کلیه و مغز و سایر قسمت‌ها دارد لذا پژوهش‌های اخیر اغلب بر ویژگی آنتی اکسیدانی PON1 متمرکز است (۱۱). تحقیقات نشان داده است که با کاهش میزان مواد آنتی‌اکسیدان بدن از فعالیت این آنزیم کم می‌شود و برعکس با مصرف مواد آنتی‌اکسیدان از جمله ویتامین‌ها، ترکیبات فلاونوئید و غیره بر فعالیت آن افزوده می‌شود. برخی از داروهای کاهنده چربی و کلسترول مثل استاتین‌ها نیز اثرات اخیر را دارند. خاصیت آنتی اکسیدانی HDL مربوط به PON1 و مقداری به آنزیم لسیتین کلسترول اسیل ترانسفراز (LCAT) است که باعث کاهش اکسیداسیون LDL می‌شود. آپوولیپوپروتئین A(Apo-A1) و J (Apo-J) با گرایش بالا به PON1 متصل شده و به‌طور انتخابی فعالیت لاکتونازی را تحریک می‌کند (۱۳،۱۲). PON1 عامل جریان سریع کلسترول به واسطه HDL است.

سیر از قرن‌ها قبل به‌عنوان یک داروی گیاهی مورد استفاده بوده (۱۴) و از آن در درمان آبسه‌ها، سرفه، مسمومیت‌ها، انگل‌ها، کرم‌ها، مشکلات گوارشی و گردش خون (۱۵)، هموروئید، درد شکم، کاهش اشتها و پنومونی استفاده می‌شده است (۱۶). همچنین گزارش شده که مصرف سیر فشار خون را کاهش می‌دهد (۱۷) در مردمان اروپای جنوبی که مقادیر زیادی سیر مصرف می‌نمایند، نیز میزان بروز بیماری‌های قلبی - عروقی به‌طور بارزی پایین است (۱۸). همچنین در سم‌زدایی از برخی از ترکیبات مثل سیکلوسپورین آ که یک داروی سرکوب‌کننده ایمنی است یا آرسنیت سدیم در آلودگی‌های آبی موثر است (۲۰،۱۹). گفته می‌شود که آلیسین و برخی مواد سولفوردار دیگر مثل آلیل سیستئین و آلیل دی‌سولفید که به فراوانی در سیر وجود دارد این اثرات را بروز می‌دهند (۲۲،۲۱). مطالعات مختلفی درخصوص اثرات بهبود دهندگی سیر بر سطح پروفیل لیپیدی شده است اما توجه به نقش آنتی اکسیدانی آن اجتناب ناپذیر بوده و مطالعات گسترده‌ای درخصوص اثرات سم زدایی و آنتی اکسیدانی سیر مطالعات مختلفی صورت گرفته است. اما یکی از اثرات مهم آنتی اکسیدانتی آن می‌تواند اثر آن بر روی فعالیت آنزیم پاراکسوناز باشد که تاکنون مطالعه‌ای روی آن صورت نگرفته است. نتایج مطالعه حاضر می‌تواند جنبه‌های دیگری از اهمیت سیر را به‌خصوص در مورد فعالیت آنتی اکسیدانتی آن آشکار سازد.

مواد و روش کار

در مطالعه حاضر که به روش مداخله‌ای تجربی از نوع مورد شاهد می‌باشد و در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تبریز انجام گرفته است، بیست راس موش صحرایی نر نژاد Wistar با محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰گرم مورد آزمایش قرار گرفتند. تمامی حیوان‌ها پس از یک هفته نگهداری در اتاق حیوانات و تطبیق با شرایط نوری به صورت ۱۲ ساعت روشنایی- ۱۲ ساعت تاریکی و استفاده ا ز غذای استاندارد به‌صورت تصادفی به دو گروه ۱۰ تاییA وB تفسیم ودر قفس‌های جداگانه قرارگرفتند.

جهت تهیه عصاره آبی سیر پس از جداسازی پوسته و برش دادن به ازای هر ۳۰ گرم سیر خالص که به هموژنایزور ریخته می‌شد آنقدر آب استریل به آن اضافه می‌گردید تا بتوان پس از فشرده کردن آن و عبور دادن آن از صافی استریل بتوان ۶۰ میلی‌لیتر عطاره آبی سیر از آن استخراج نمود. گروه A عصاره آبی سیر برابر یک میلی‌لیتر (حدود ۲۰۰-۲۵۰ میکرولیتر)به ازای هر کیلوگرم به‌صورت داخل پریتونئال از طریق سرنگ انسولین به مدت هفت روز دریافت کردند (۲۴،۲۳) گروه B نیز در حجم مساوی سالین نرمال استریل به‌صورت داخل پریتونئال در همان مدت مشابه دریافت نمودند (۲۴) در پایان مداخله نمونه گیری از طریق سینوس چشم موش‌های مورد مطالعه انجام و سرم‌ها به روش سانتریفوژ در دور پایین (۳۵۰۰ دور در دقیقه)و به مدت ۱۰ دقیقه تهیه گردید. میزان کلسترول، تری گلیسیری و HDL بر اساس متد بیوشیمیایی استاندارد و کیت‌های آزمایشگاهی مربوطه با دستگاه اتوانالیزور مورد سنجش و سطح LDL با فرمول فردوالد محاسبه گردید (۲۵). فعالیت آنزیم پاراکسوناز با استفاده از سوبسترای پاراکسون C10H14NO6P از طریق سرعت هیدرولیز پاراکسون که به عنوان سوبسترا با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۲ نانومتر با استفاده از کورنومتر در ثانیه‌های ۶۰ و ۱۲۰ در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم آریل استراز از طریق سرعت هیدرولیز فنیل استات که به عنوان سوبسترا با UV–اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۷۰ نانومتر به‌روش استفاده از کورنومتر جهت ثبت تغییرات فعالیت در زمان‌های ۶۰ و ۱۲۰ ثانیه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراداندازه گیری شد (۲۶،۲۷). ظرفیت آنتی‌اکسیدانت تام سرم بروش اسپکتروفتومتری

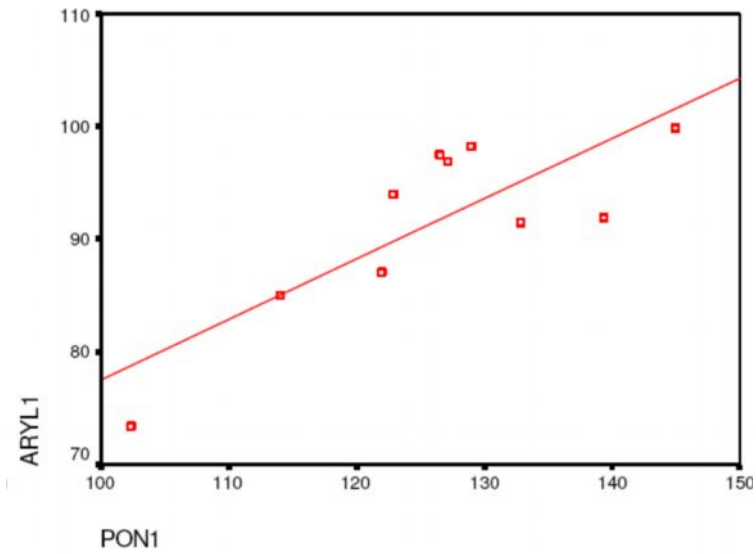
براساس واکنش بین یک ترکیب تولید کننده رادیکال آزاد با ترکیبات آنتی‌اکسیدانت موجود در سرم تعیین شد. ظرفیت آنتی اکسیدانی تام با اندازه‌گیری شدت تغییر رنگ معرف در طول موج تحریک ۴۸۰ نانومتر با استفاده از کیت‌های شرکت راندوکس مورد سنجش قرار گرفت. سطح MDA سرم به روش واکنش با تیوباربیتوریک اسید و اندازه‌گیری جذب محلول استخراج شده و مخلوط آن با بوتانل طبیعی اندازه‌گیری شد (۲۸). نتایج حاصله با نرم افزار SPSS16 مورد تحلیل آماری قرار گرفت و مقدار p کم‌تر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. در بررسی تغییرات از آزمون تی زوج و در مقایسه گروه‌ها از آزمون‌های Independent sample t-test، Mann-Whitney-U، Kruskal-Wallis بهره گرفته شد.

یافته‌ها

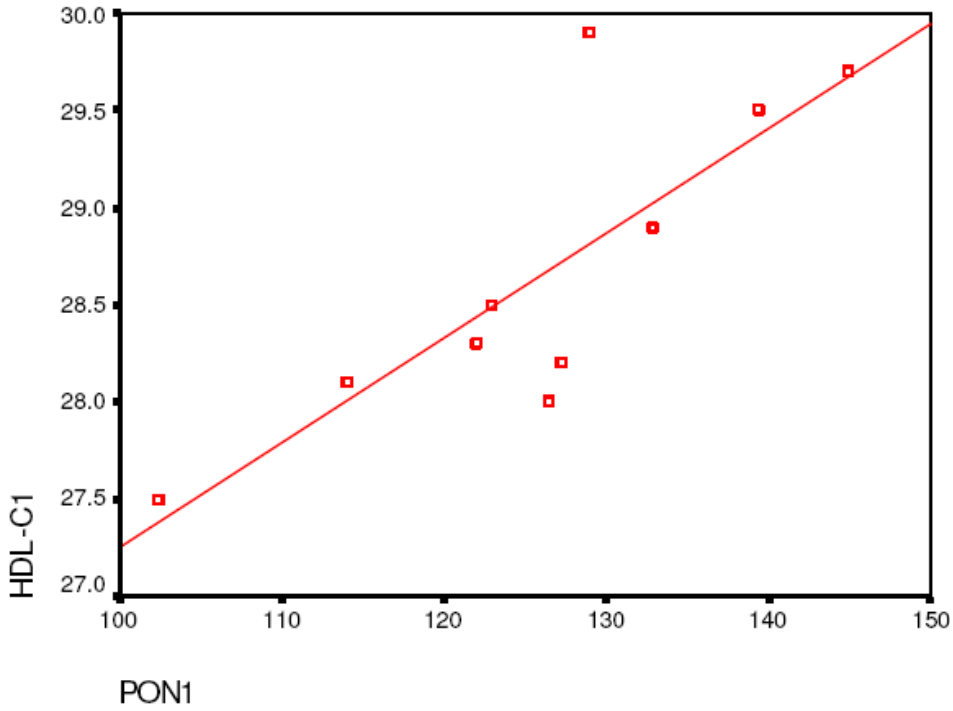
در تمام رت‌های گروه A که عصاره آبی سیر را دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه کنترل (B) افزایش معنی‌داری در سطح آنتی اکسیدانت تام مشاهده شد (p<۰/۰۱۱). همچنین سطح پراکسیداسیون لیپیدی و شاخص مهم آن مالون دی آلدهید (MDA) نیز در قیاس با گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری کاهش را نشان داد (p<۰/۰۳۵). سطح فعالیت پاراکسوناز (p<۰/۰۰۳) و آریل استراز(p<۰/۰۰۴) و نیز غلظت HDL- کلسترول (p<۰/۰۰۳) گروه مورد نسبت به گروه کنترل افزایش نشان می‌دهد. به تبع افزایش HDL-C غلظت LDL (p<۰/۰۰۱) و کلسترول (p<۰/۰۰۵) کاهش می‌یابد (شکل ۱). همچنین بین فعالیت‌های پاراکسونازی و آریل‌استرازی در گروه A همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده گردید (p=۰/۰۲۵ و r=۰/۶۹۷). همبستگی بین فعالیت پاراکسونازی و غلظت HDL-کلسترول (HDL-C) نیز در گروه A مثبت ارزیابی شد (p= ۰/۰۰۶ و r=۰/۷۹۴) (شکل ۲).

جدول شماره (۱): مقایسه فعالیت آنزیم‌های پاراکسوناز، اریل استراز، توتال آنتی اکسیدانت، پر اکسیداسیون لیپیدی و سطح پروفیل لیپیدی در دو گروه مورد مطالعه

	Control	Garlic	P*
PON activity (U/ml)	106.01±9.86	126.11±12.11	0.003
ARYL activity (U/l)	76.63±9.73	91.51±7.99	0.004
HDL (mg/dl)	26.70±1.11	28.66±0.80	0.003
LDL-C (mg/dl)	51.60±4.75	43.38±2.50	0.001
TAS	1.73±0.15	1.90±0.08	0.011
TG (mg/dl)	51±4.03	44.3±3.16	0.004
Cholesterol (mg/dl)	88.50±5.39	80.90±2.23	0.005
MDA (µmol/l)	1.75±0.15	1.58±0.18	0.035



شکل شماره (۱): همبستگی بین فعالیت‌های پاراکسونازی و آریل استرازی در موش‌های تحت تجویز عصاره سیر (r= ۰/۶۹۷و p=۰/۰۲۵)



شکل شماره (۲): همبستگی بین فعالیت پاراکسونازی و غلظت HDL-C1 در موش‌های تحت تجویز عصاره سیر (r= ۰/۷۹۴ و P= ۰/۰۰۶)

بحث

تنش‌های اکسیداتیو به‌طور کلی باعث آسیب به غشاهای بیولوژیکی، ارگانل‌های درون سلولی و ماکرو مولکول‌ها از جمله پروتئین‌ها و DNA می‌شوند. اکسیداسیون لیپیدها توسط رادیکال‌های آزاد حاصل از این تنش‌ها یکی از آسیب‌های اصلی محسوب می‌شود و منجر به تولید ترکیبات فعال مثل آلدهیدها، کتون‌ها و اسیدهای هیدروکسیل می‌شود. این رادیکال‌ها ممکن است از واکنش‌های اکسیداسیون- احیا در بدن تولید شوند یا منشاء خارجی داشته باشند. عدم توازن تشکیل و حذف این رادیکال‌های آزاد از جمله ترکیبات فعال اکسیژنی (ROS) نشان داده شده است که باعث آسیب ژنتیکی، تداخل در سیگنال‌های سلولی، بیماری‌های تخریب نورونی متاستاز، پیری می‌شود. یکی از اثرات پاتولوژیکی آن‌ها در دراز مدت بروز بیماری‌های قلبی - عروقی از جمله آترواسکلروزیس و بیماری عروق کرونر است (۲۹). در موش‌های تیمار شده با عصاره آبی سیر آسیب‌های اکسیداتیو روی کلیه‌ها که معمولاً در اثر درمان با سیکلوسپورین A ایجاد می‌شود کاهش فزاینده‌ای نشان داده است (۳۰). آلیین و پودر سیر مستقیماً باعث محو رادیکال‌های $OH^{\bullet}$ می‌شوند (۳۱) که این مورد اثر مستقیم سیر است. همچنین این عصاره از سلول‌های اندوتلیال عروق در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو القا شده توسط هیدروژن پراکسید جلوگیری می‌کند (۳۲). در مطالعه حاضر غلظت آنتی‌اکسیدان تام (TAS) در اثر تجویز عصاره سیر افزایش داد که با مطالعات انجام شده مبنی بر کاهش پراکسیداسیون آنتی‌اکسیدانت‌های سلولی نظیر گلوتاتیون (GSH) و سوپراکسید دیس‌موتاز (SOD) ناشی از اثر سیر هم‌خوانی دارد (۳۵-۳۳). نتایج همچنین بیان‌گر کاهش غلظت MDA در اثر تجویز عصاره سیر در موش‌های مورد مطالعه بود که این یافته‌ها نیز با مطالعات انجام گرفته در مورد عصاره سیر هماهنگی داشته و می‌تواند بیان‌گر اثر احتمالی عصاره سیر در کاهش و یا حذف رادیکال‌های فعال پراکسی و هیدروکسی باشد (۳۶). یافته‌ها نشان داده اند که دی‌آلیل‌پلی‌سولفات‌ها که در عصاره سیر به فراوانی یافت می‌شوند در ممانعت از تشکیل تیوباربیتوریک اسید موثرند که این خود موید نتیجه فوق است (۳۷). مطالعات انجام شده در مورد نقش پروفیل لیپیدی و لیپوپروتئین‌ها، و ریسک ابتلا به بیمارهای عروقی نشان دهنده اثرات قابل توجه این ترکیبات در ایجاد و تشدید آترواسکلروز و بیماری‌های قلبی - عروقی است. در این مطالعه غلظت HDL موش‌های دریافت کننده عصاره سیر نسبت به گروه شاهد افزایش و غلظت کلسترول و به تبع آن LDL کاهش پیدا کرده بود؛ که با توجه به نقش HDL به عنوان عامل اصلی برگشت دهنده کلسترول، منطقی به نظر می‌رسد و با پژوهش‌های قبلی مطابقت دارد (۳۸). از آنجایی که آنزیم پاراکسوناز عمدتاً بر روی آپوپروتئین a1 (apoa1) در داخل HDL-C متمرکز است می‌توان نتیجه گرفت که افزایش میزان HDL-C به همراه همبستگی مثبت

آن با افزایش فعالیت آنزیم پاراکسوناز می‌تواند دلیلی بر نقش سیر در افزایش فعالیت آنزیم پاراکسوناز با مکانیسم افزایش HDL-C را علاوه بر نقش القایی مثبت عصاره سیر بر فعالیت آنزیم داشته باشد که مطالعات بیشتر به همراه سنجش apoA1 موید این فرضیه خواهد بود. همبستگی مثبت و مستقیم فعالیت آنزیم پاراکسوناز و آریل استراز به‌دنبال تجویز عصاره سیر در مطالعه حاضر نیز با مطالعات انجام شده نظیر کاهش هر فعالیت آنزیمی پاراکسونازی و آریل‌استرازی در بیماری قلبی - عروقی (۳۹) و افزایش فعالیت آنزیمی پاراکسونازی و آریل‌استرازی به دنبال تجویز دهانی ایزوفلاون‌های سبوس در مدل‌های استانوهپاتیت نیز (۴۰) هماهنگی نشان می‌دهد.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر اثر عصاره آبی سیر به جهت خاصیت آنتی اکسیدانت آن به‌ویژه با افزایش فعالیت آنزیم پاراکسونااز در جلوگیری از اثرات مخرب تنش اکسیداتیو که عموما" با اکسیداسیون لیپیدها و افزایش شاخص پراکسیداسیون لیپیدی MDA همراه است، مورد بررسی قرار گرفت. چرا که این اثرات مخرب در طیف وسیعی از بیماران شامل بیماران کلیوی، دیابتی، سرطانی، قلبی - عروقی و هیپرلیپیدمی بسیار مشکل ساز است. مطالعه حاضر با دوز و غلظت واحدی از سیر انجام شده است که می‌تواند از محدودیت‌های مطالعه حاضر در نتیجه گیری نهایی باشد. بررسی غلظت‌های گوناگون و زمان‌های تجویز متفاوت به همراه بررسی هر یک از مواد اصلی تشکیل دهنده سیر جهت بدست آوردن نتایج قابل اعتمادتر در مطالعات تکمیلی آینده می‌تواند نتایج بهتر و کامل‌تری را در بر داشته باشد. همچنین سنجش apoA1 به همراه آزمایشات میکروسکپی و مطالعه ترکیبات موثر عصاره و بررسی خاصیت انفرادی و تجمعی هر کدام در مطالعات آینده با طراحی‌های جدیدتر می‌تواند مکانیسم‌های دقیق این پدیده را هر چه بیشتر آشکار نماید.

References:

1. Graner M, James RW, Kahri J, Nieminen MS, Syvanne M, Taskinen MR. Association of paraoxonase-1 activity and concentration with angiographic severity and extent of coronary artery disease. J Am Coll Cardiol 2006; 47(12):2429–35.
2. Kuo CL, La Du BN. Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonase structural stability and enzymatic activity. Drug Metab Dispos 1998; 26: 653-60.
3. Sorenson RC, Priom-Parmo SL, Kuo CL, Adkins S, Lockridge O, La Du BN. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 7187-91.
4. Jakubowski H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylayion. J Biol Chem 2000; 275: 3957-62.
5. Oda MN, Bielichi JK, Berger T, Forte TM. Cysteine substitutions in apolipoprotein A-I primary structure modulate paraoxonase activity. Biochemistry 2001; 40: 1710-1718.
6. Furlong CE, Li WF, Brophy VH, Jarvik GP, Richter RJ, Shih DM, et al. The PON 1 gene and detoxication. Neurotoxicology 2000; 21: 581-87.
7. Ferre N, Tous M, Paul A, Zamora A, Vendrell JJ, Bardaji A, et al. Paraoxonase Gln–Arg(192) and Leu–Met (55) gene polymorphisms and enzyme activity in a population with a low rate of coronary heart disease. Clin Biochem 2002;35(3):197–203.
8. Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C, et al. Human serum paraoxonase (PON 1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. Drug Metab Dispos 2000; 28: 1335-42.
9. Van Himbegen TM, van Tits LJ, Roest M, Stalenhoef AF. The story of PON 1: how an organophosphate-hydrolyzing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. Neth J Med 2006; 64: 34-8.
10. Shih DM, Gu L, Xia YR. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. Nature 1998; 394: 284-7.

11. Blatter MC, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. Eur J Biochem 1993; 211: 871-9.
12. James R, Deakin S. The importance of high-density liopprotein for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. Free Radic Biol Med 2004; 37: 1986-94.
13. Gaidukov L, Tawfik D. High affinity, stability, and lactonase activity of serum paraoxonase PON 1 anchored on HDL with apoA-1. 2005; 44: 11843-54.
14. Lash JP, Cardoso LR, Mesler PM, Walczak DA, Pollak R. The Effect of garlic on hypecholesterolemia in renal transplant patients. Transp Proce 1998; 30: 189-91.
15. Isaacsohn JL, Moser M, Stein EA, Dudley K, Davey JA, Liskov E, et al. Garlic powder and plasma lipids and lipoproteins. Arch Intern Med 1998; 158: 1189-94.
16. Aouadi R, Aouidet A, Elkadhi A, Ben Rayana C, Jaafoura H, Tritar B, et al. Effect of fresh garlic (Allium Sativum) on lipid metabolism in male rates. Nutr Res 2000; 20: 273-80.
17. Silagy CA, Neil HAW. A meta-analysis of the effect of garlic on blood pressure. J Hypertens 1991 12: 463-68.
18. Keyes Wine A. Garlic and CHD in seven countries. Lancet 1980; 1: 145-6.
19. Wongmekiat O, Thamprasert K. Investigating the protecting effect of aged garlic extract on cyclosporin-induced nephrotoxicity in rats. Fund Clin Pharmacol 2005; 19: 555-62.
20. Chowdhury R, Dutta A, Chaudhuri SR, Sharma N, Giri AK, Chaudhuri K. In vitro and in vivo reduction of sodium arsenite induced toxicity by aqueous garlic extract. Food Chem Toxicol 2008; 46: 740–51.
21. Lawson LD, Gardner CD. Composition, stability, and bioavailability of garlic products used in clinical trial. J Agric Food Chem 2005; 53:6254-61.
22. Chung LY. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. J Med Food 2006; 9: 205-13.
23. Batirel HF, Aktan S, Aykut C, Yeğen BC, Coşkun T. The effect of aqueous garlic extract on the levels of arachidonic acid metabolites (leukotriene C4 and prostaglandin E2) in rat forebrain after ischemia-reperfusion injury. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.1996; 54: 289-92.
24. Javadzadeh A, Ghorbanihaghjo A, Arami S, Rashtchizadeh N, Mesgari M, Rafeey M, Omidi Yl. Prevention of selenite-induced cataractogenesis in Wistar albino rats by aqueous extract of garlic. J Ocul Pharmacol Ther 2009; 25(5):395-400.
25. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 1972; 18 (6): 499–502.
26. Ruiz J, Blanche H, James RW, Garin MC, Vaisse C, Charpentier G, et al. Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in ytype 2 diabetes. Lancet 1995; 346:869–72.
27. Mackness B, Durrington P, McElduff P, John Y, Naheed A, Michael W, et al. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly prospective study. Circulation 2003; 107(22):2775-9.
28. Yagi K. Assay for blood plasma and serum. Methods Enzmol 2001;105:328-31.
29. Allen RG. Oxidative stress and superoxide dismutase in development, aging and gene regulation. Age 1998; 21: 47-76

30. Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pendraza-Chaverri J. Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats. Life Sci 2003; 73: 2543-56.
31. Kourounakis PN, Pekka EA. Effect on active oxygen species of alliin and allium sativum (garlic) powder. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1991; 74: 249-52.
32. Yamasaki T, Li I, Lau BH. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury. Phytother Res 1994; 8: 408-12.
33. Borek C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. J Nutr 2001; 131: 1010-15.
34. Ide N, Matsuura H, Itakura Y. Scavenging effect of aged garlic extract and its constituent on active oxygen species. Phytother Res 1996; 10: 340-1.
35. Ide N, Lau BH. Age garlicextract attenuates intracellular oxidative stress. Phytomedicine 1999; 6: 125-31.
36. El Shenawy NS, Soliman MF, Reyad SI. The effect of antioxidant properties of aqueous garlic extract and Nigella sativa as anti-schistosomiasis agent in mice. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2008; 1 : 50-9.
37. Horie T, Awazu SYI, Fuwa T. Identified diallyl polysufides from an aged garlic extract which protects the membrane from lipid peroxidation. Planta Med 1992; 58: 468-9.
38. Durak I, Kavutcu M, Aytac B, Avci A, Devrim E, Ozbek H, et al. Effect of garlic extract consumption on blood lipid and oxidant/antioxidant parameters in human with high blood cholesterol. J Nutr Biochem 2004; 15: 373-77
39. Gur M, Aslan M, Yildiz A, Demirbag R, Yilmaz R, Selek S, et al. Paraoxonase and arylesterase activities in coronary artery disease. Euro Clin Invest 2006; 36: 779–87
40. Ustundag B, Bahcecioglu IH, Sahin K, Duzgun S, Koca S, Gulcu F, et al. Protective Effect of soy isoflavones and activity levels of plasma paraoxonase and arylesterase in the experimental Nonalcoholic steatohepatitis model. Dig Dis Sci 2007; 52: 2006–14.