JAMS
Journal of Arak University of Medical Sciences
2019; 22(1)
Journal Homepage: http://jams.arakmu.ac.ir

ORIGINAL RESEARCH

Comparative Investigation of the Effect of Quercetin and Hydroalcoholic Extract of *Otostegia Persica* Boiss with Atorvastatin on ABC A1 Gene Expression in Hypercholesterolemic Male Wistar Rats

Ali Parvin[1], Parichehreh Yaghmaei[1], Mahdi Noureddini[2*], Sayyed Ali Haeri Roohani[1], Saeed Aminzadeh[3]

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Applied Cell Sciences, Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.
3. Department of Bioprocess Engineering Research, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history

Received: *11 June 2018*

Accepted: *17 September 2018*

Published online: *20 April 2019*

Keywords

ABC A1 gene
Atorvastatin
Hydroalcoholic extract
Hypercholesterolemia
Otostegia persica Boiss
Quercetin

**** Corresponding Author:***

Mahdi Noureddini; P.O. Box 88715973474, Department of Applied Cell Sciences, Physiology Research Center, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, 3 Km from Ravand Rd, Kashan, Iran.

Fax: *+98 31 5554 1112*

Email: *mnoureddini@yahoo.com*

ABSTRACT

Background and Aim: Hypercholesterolemia is an independent risk factor for atherosclerosis that the use of medicinal plants with minimal side effects is very important in the treatment of it. In this study, comparative evaluation of the effect of hydroalcoholic extract and quercetin of *Otostegia persica* Boiss with atorvastatin on ABC A1 gene expression in hypercholesterolemic male Wistar rats was carried out.

Materials and Methods: Forty male wistar rats with about 180gr weight randomly individed into five groups of eight: 3 experimental groups, 1 sham group and 1 control group. The experimental and sham groups received a high-fat diet with 2% cholesterol (through gavage) for 40 days. The experimental groups were treated (were fed) separately with 40 mg/kg/day atorvastatin, 25 mg/kg/day quercetin and 25 mg/kg/day hydroalcoholic extract of *Otostegia persica* Boiss for 28 days. Sham group received daily 1 mg/kg saline water during this period. In the end, the expression of ABC A1 gene was determined by Real-Time PCR in leukocytes and serum lipids were measured by photometric method.

Ethical Considerations: This study with research ethics code B/29/5/1/1799 has been approved by committee for ethics in biomedical research at Kashan university of medical sciensec on July 31, 2016.

Findings: The hydroalcoholic extract and quercetin of *Otostegia persica* Boiss and atorvastatin significantly increased ABC A1 gene expression in three experimental groups {(1.14 ± 0.09) ,(1.18 ± 0.03),(1.11 ± 0.03) respectively} realated to control group(1.00 ± 0.011) ($p<0.05$) and sham group(0.89 ± 0.03) ($p<0.05$). Quercetin also was more effective than atorvastatin in increasing of ABC A1 gene expression ($p<0.05$).

Conclusion: Quercetin and hydroalcoholic extract of *Otostegia persica* Boiss have increased effect on ABC A1 gene expression in hypercholesterolemic male Wistar rats.

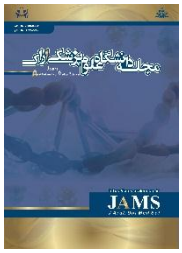
© Copyright (2019) Arak University of Medical Sciences

Use your device to scan and read this article online:

Parvin A., Yaghmaei P., Noureddini M, et al. Comparative Investigation of the Effect of Quercetin and Hydroalcoholic Extract of *Otostegia Persica* Boiss with Atorvastatin on ABC A1 Gene Expression in Hypercholesterolemic Male Wistar Rats. J Arak Uni Med Sci. 2019; 22(1): 27-38.

This open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).

JAMS
مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک
دوره بیست و دو، شماره یک، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۸
journal homepage: http://jams.arakmu.ac.ir



مقاله پژوهشی

بررسی مقایسه‌ای اثر عصاره هیدروالکلی و کوئرستین استخراجی از گیاه گلدر با داروی آتورواستاتین بر بیان ژن ABC A1 در رت‌های نر هیپرکلسترولمی نژاد ویستار

علی پروین[۱]، پریچهره یغمایی[۱]، مهدی نورالدینی[۲*]، سید علی حائری روحانی[۱]، سعید امین زاده[۳]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. گروه علوم سلولی کاربردی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.
۳. گروه تحقیقات مهندسی زیست پردازش، انستیتو ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی تهران، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۳/۲۱
تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۲۶
تاریخ انتشار: ۹۸/۰۱/۳۱

واژگان کلیدی

آتورواستاتین
ژنABC A1
عصاره هیدروالکلی
کوئرستین
گیاه گلدر
هیپرکلسترولمی

*نویسنده مسئول:
مهدی نورالدینی
آدرس پستی: ایران، کاشان، کیلومتر ۳ جاده راوند، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، گروه علوم سلولی کاربردی، کد پستی: ۸۸۷۱۵۹۷۳۴۷۴
نمابر: 1112 555 31 98+
E-mail:
mnoureddini@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از گیاهان دارویی در درمان هیپرکلسترولمی، فاکتور خطر موثر بر آترواسکلروز می‌باشد. در این مطالعه اثر مقایسه‌ای کوئرستین، عصاره هیدروالکلی استخراجی از گیاه گلدر و آتورواستاتین بر بیان ژن ABC A1 در رت‌های نر هیپرکلسترولمی نژاد ویستار بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی، ۴۰ سر رت نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۸۰ گرم، به‌صورت تصادفی به ۵ گروه ۸ تایی (کنترل، شم، تجربی ۱، ۲ و ۳) تقسیم شدند. تمام گروه‌ها (به جز کنترل) به مدت ۴۰ روز علاوه برگاواژ کلسترول ۲ درصد، غذای چرب (۱ درصد کلسترولی) دریافت کردند. گروه‌های تجربی طی ۲۸ روز، روزانه به ترتیب ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آتورواستاتین، ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی گیاه گلدر وگروه شم روزانه ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم محلول سالین دریافت کردند. در پایان، بیان ژن ABC A1 در لوکوسیت‌ها توسط Real-Time PCR و سطح لیپیدهای سرم به روش فتومتریک اندازه‌گیری گردید.

ملاحظات اخلاقی: مجوز تحقیق توسط کمیته اخلاق در پژوهش های زیست پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان به شماره ۱۷۹۹/ ۱/ ۵/ ۲۹ / ب مورخ ۱۰ / ۵/ ۹۵ صادر گردید.

یافته‌ها: عصاره هیدروالکلی، کوئرستین استخراجی از گلدر و آتورواستاتین موجب افزایش معنی‌دار در بیان ژن ABC A1 به ترتیب با بیان ۰/۰۹ ± ۱/۱۴، ۰/۰۳± ۱/۱۸ و ۰/۰۳± ۱/۱۱ نسبت به گروه کنترل با بیان ۰/۰۱۱ ± ۱ و نسبت به گروه شم با بیان ۰/۰۳± ۰/۰۸۹ شدند (p<۰/۰۵). کوئرستین در افزایش بیان ژن مذکور مؤثرتر از آتورواستاتین بود (p<۰/۰۵).

نتیجه گیری: عصاره هیدروالکلی و کوئرستین استخراجی از گیاه گلدر دارای اثر افزایشی بر بیان ژن ABC A1 در رت‌های نر هیپرکلسترولمی نژاد ویستار می‌باشد.

تمامی حقوق انتشار این اثر، متعلق به دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد.

۱. مقدمه

هیپرکلسترولمی فاکتور خطر مستقلی برای آترواسکلروز به عنوان یک بیماری التهابی مزمن سرخرگی است. آترواسکلروز با رسوب لیپید و کلسترول کم‌چگال بر روی دیواره سرخرگ‌ها مشخص می‌گردد که نتیجه آن تشکیل پلاک‌های فیبری-چربی (آتروما) بوده که به تدریج به پلاک‌های اصلی توسعه می‌یابد و موجب تنگی و سختی رگ می‌گردد (۱). هیپرکلسترولمی همراه با فعالیت سیتوکین‌های التهابی ناشی از لنفوسیت T، ماکروفاژها و ماست سل‌ها در محل ضایعه موجب فعال شدن موضعی سلول‌های اندوتلیوم در شریان می‌شود. احتباس و اکسیداسیون لیپوپروتئین‌ها به ویژه LDL (low density Lipoprotein) توسط ماکروفاژ، عامل اصلی در تشکیل آتروم می‌باشد.

ox-LDL (oxidized-low density Lipoprotein) خود محرک واکنش‌های التهابی بوده، موجب جذب مونوسیت‌های خون و ازدیاد و تکثیر ماکروفاژها می‌گردد. این واکنش‌های التهابی برای از بین بردن LDLهای اکسید شده پدید می‌آید. در این سیر، لیپیدهای اکسیده شده ماکروفاژها را بیشتر فعال کرده و اکسیداسیون خود را تشدید می‌کنند. در حضور هیپرکلسترولمی، پاسخ‌های التهابی که برای خنثی کردن اثر LDLهای اکسیده شده آغاز می‌شوند نمی‌توانند عملکرد خود را کامل کنند و در عوض سبب اکسید شدن لیپوپروتئین‌ها و بروز التهاب بیشتر می‌گردد (۲). اولین گام در بهبود یا جلوگیری از بروز آترواسکلروز مهار تجمع چربی، به‌ویژه کلسترول درون سلول‌ها و بافت پیوندی رگ است. در سلول‌ها هموستازی کلسترول داخل سلولی به بالانس بین سنتز، ورود، تخریب و انتقال کلسترول به غشاء پلاسمایی برای خروج وابسته می‌باشد (۳).

ژن‌های فوق خانواده ABC شامل هفت خانواده (ABC A to ABC G) می‌باشد. ژن‌های خانواده ABC A نیز شامل دوازده زیر خانواده (ABC A1- ABC A12) می‌باشد. پروتئین‌های ترانسپورتر ABC حاصل از بیان هرکدام از این ژن‌ها مولکول‌های مختلف را در عرض غشاهای سلولی حمل می‌کنند و در واقع پمپ‌های محافظ سلولی خارج‌کننده موادند (۴) که در فرآیندهای انتقال لیپید، دارو، اسید صفراوی و انتقال و هموستازی استرول و مکانیسم‌های ایمنی درگیر می‌باشند. بیان آن‌ها توسط لیپیدها کنترل می‌شود (۵). ترانسپورتر ABC A1 (ATP binding cassette transporter A1) که ژن کدگذاری‌کننده آن ABC A1 (ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1) می‌باشد، عضو خانواده ABC A است (۴).

این ترانسپورتر جزو پروتئین‌های غشایی چندکاره می‌باشد که یا اجازه جذب فعال سوبستراهای ویژه را می‌دهد یا آن‌ها را از عرض سیستم‌های متنوع غشایی بیولوژیکی به خارج انتقال می‌دهد و یا به عنوان مولکول‌های تنظیمی عمل می‌نماید (۵). ترانسپورتر مذکور به عنوان یک پمپ خارج کننده کلسترول در مسیر حذف لیپید سلولی عمل می‌کند تا مانع از رسوب کلسترول و تشکیل پلاک آترومی در دیواره اندوتلیالی رگ گردد و یکی از تنظیم‌کننده‌های اصلی کلسترول سلولی و هوموستازی فسفولیپید می‌باشد؛ درواقع، باعث انتقال کلسترول و فسفولیپید از غشاء پلاسمایی سلول‌ها به آپولیپوپروتئین فقیر از لیپید Apo A1 (Apolipoprotein A1)، یکی از اجزای تشکیل دهنده لیپوپروتئین با دانسیته بالا (HDL) می‌شود و به همین دلیل احتمالاً در پیشگیری از گسترش آترواسکلروز نقش دارد. مطالعات متعدد ارتباط معکوس بین سطوح HDL-C (High density lipoprotein- Cholesterol) و بیماری سرخرگ کرونر را نشان داده‌اند. HDL-C هم انتقال معکوس کلسترول را از طریق تسهیل انتقال آن از بافت‌های محیطی به کبد برای مصرف افزایش می‌دهد (۶). در انتقال معکوس کلسترول، کلسترول اضافی در بافت‌های محیطی طی سه مرحله به خارج از بدن ترشح می‌شود: ابتدا کلسترول از سلول‌های محیطی به HDL پمپ می‌شود، سپس از طریق HDL-C در خون به کبد منتقل می‌گردد. سرانجام مستقیم یا بعد از تبدیل به اسید صفراوی از کبد به صفرا ترشح می‌شود. ترانسپورتر ABC A1 نقش مهمی در این انتقال بازی می‌کند، چون برای تشکیل HDL ضروری است. mRNAی آن در تمام سلول‌ها و بافت‌ها یافت می‌گردد (۷). ژن ABC A1 ژنی حساس به استرول است

که از ژن‌های هدف رسپتورهای هسته ای (β و α) LXR می‌باشد. لیپیدها موثرترین مدولاتورهای ترانس کریپشنال این ژن‌اند و اثرات القایی آن‌ها عمدتاً توسط رسپتورهای مذکور تنظیم می‌شود (۸). هیپرکلسترولمی از عوامل خطر قابل تغییر برای آترواسکلروز است. روش‌های درمان شامل استفاده از طب سنتی و صنعتی است که در طب صنعتی از داروهای شیمیایی مانند استاتین‌ها استفاده می‌شود (۹). به دلیل عوارض داروهای شیمیایی، امروزه در طب سنتی از عصاره گیاهان به دلیل عوارض کمتر و داشتن ترکیبات آنتی اکسیدانی مثل فلاونوئیدها استفاده می‌شود (۱۰).

مطالعات قبلی حاکی از آن است که عصاره گیاهان از جمله عصاره استانداردشده دانه‌های گیاه *Silybum marianum* که Silymarin نامیده می‌شود دارای اثر تنظیمی مثبت بر بیان تراسپورهای ABC از جمله ABC A1 در سطح mRNA بوده و از این طریق اثرات هیپولیپیدمیک خود را در رت‌های تغذیه‌شده با رژیم پر کلسترول القاء می‌نماید (۱۱). هم‌چنین عصاره میوه زیتون چینی (*Canarium album* L.) سبب افزایش بیان پروتئین‌های ABC A1 و رسپتور LDL (که به ترتیب مسئول خروج و جذب کلسترول سلولی‌اند) در رت‌های تحت تغذیه پرچرب دیابتی شده و باعث کاهش توتال کلسترول و تری گلیسرید سرم وکبدی در آن‌ها گردیده است (۱۲). نتایج جذاب تحقیقاتی از این سنخ، ما را به پژوهش در این راستا ترغیب نمود.

گلدر (*Otostegia persica* Boiss)، گیاهی است علفی و چندساله که به خانواده Lamiaceae تعلق دارد. این گیاه حاوی ترکیبات فیتوشیمیایی متعددی از جمله فلاونوئیدها (ترکیبات فنلی)، استروئیدها، تاننها و تری ترپنوئیدهاست. از جمله ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره الکلی این گیاه کوئرستین(Quercetin)، مورین (Morin)، کاامپفرول(kaempferol)، ایزوویتکسین(Isovitexin)، ترانس- سینامیک اسید (Trans-Cinnamic acid)، کافئیک اسید (Caffeic acid)، ρ – هیدرواکسی بنزوئیک اسید (ρ-hydroxy benzoic acid)، بتاسیتواسترول (β-sitosterol) و بتا سیتواستریل استات (β-sitosteryl acetate) می‌باشد. کوئرستین (۳،۳'،۴،۵،۷- پنتا هیدروکسیل- فلاون) با فرمول ساختمانی (C15H10O7)، یک فلاونول است که به کلاسی از متابولیت‌های ثانویه شناخته‌شده گیاهی تحت عنوان فلاونوئیدها تعلق دارد. این ماده در اندام‌های هوایی گیاه گلدر شناسایی شده و دارای اثرات وازودیلاتوری، کاهش چربی خون و آنتی اکسیدانی است (۱۳).

هدف از مطالعه حاضر، بررسی مقایسه‌ای اثر عصاره هیدروالکلی و کوئرستین استخراجی از گیاه گلدر با داروی آتورواستاتین بر بیان ژن ABC A1 در رت‌های نر هیپر کلسترولمی نژاد ویستار (در سطح mRNA) می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

در این تحقیق تجربی، تعداد ۴۰ سر رت نر نژاد ویستار به وزن تقریبی ۱۸۰ گرم به صورت تصادفی در ۵ گروه هشت تایی تقسیم‌بندی شدند. شرایط استاندارد نور، دما (۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد)، تاریکی و روشنایی (۱۲:۱۲ ساعت) بر طبق دستورالعمل و ضوابط اخلاقی وزارت بهداشت در گروه‌های مورد مطالعه رعایت شد. گروه‌ها عبارت بودند از: گروه کنترل که در شرایط استاندارد آزمایشگاهی نگهداری شده و روزانه با ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم (یک میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) محلول سالین گاواژ شدند. گروه شم که طی ۴۰ روز مصرف غذای پرچرب و دریافت کلسترول ۲ درصد به صورت گاواژ، به مدت ۲۸ روز، روزانه ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم محلول سالین دریافت می‌کردند. گروه‌های تجربی ۱، ۲ و ۳ که پس از ۴۰ روز مصرف غذای پرچرب و دریافت کلسترول ۲ درصد به صورت گاواژ، روزانه و به مدت ۲۸ روز به ترتیب با ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) داروی آتورواستاتین، ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) فرآورده کوئرستین و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی گیاه گلدر از طریق گاواژ تیمار شدند.

روش هیپر کلسترولمی کردن حیوانات

برای هیپر کلسترولمی کردن از گاواژ کلسترول ۲ درصد (کلسترول مرک آلمان) به مدت ۴۰ روز استفاده شد. هم‌چنین غذای حیوانات طی این ۴۰ روز شامل کلسترول ۲ درصد، ۴۰ درصد کربوهیدرات، ۱۵ درصد چربی، ۴۰ درصد پروتئین و ۳ تا ۴ درصد فیبر بود (۱۴).

استخراج عصاره هیدروالکلی و کوئرستین از گیاه گلدر

گیاه گلدر (*Otostegia persica* Boiss) با کد هرباریوم IAUH- 000014912 در بهار ۱۳۹۵ (اردیبهشت ماه) مرکز تحقیقات ابن سینای دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران به ثبت رسید و مورد تأیید قرارگرفت. سپس مقادیر مورد نیاز از آن در جیرفت استان کرمان جمع‌آوری و خشک گردید. ۴۰ گرم برگ گیاه گلدر به صورت پودر درآمده و در دستگاه سوکسیله حاوی متانول ۴۰ درصد قرار داده شد. به مدت ۱۸ ساعت چرخش متانول و آب بر روی پودر برگ گیاه (که در قسمت ستونی سوکسیله قرار داشت) انجام گرفت و عصاره هیدروالکلی استخراج و به کمک دستگاه روتاری خشک گردید (۱۵). سپس ۱/۵ گرم استات سرب به ۵۰۰ میلی‌لیتر از محلول عصاره هیدورالکلی حاصله از دستگاه سوکسیله جهت جداسازی ترپن وتانن اضافه شد و پس از ۵ دقیقه به کمک کاغذ صافی عصاره هیدروالکلی فاقد ترپن و تانن حاصله با ۴۰۰ میلی‌لیتر اتانول و ۱۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم دکانته گردید. کوئرستین به کمک دکانتور جداسازی و جهت خشک کردن به دستگاه روتاری منتقل شد (۱۶).

سنجش میزان بیان ژنABC A1 به روش Real-Time PCR

از قلب هر سر رت ۵ میلی‌لیتر خون‌گیری به عمل آمد و در لوله آزمایش حاوی (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) EDTA سرد ریخته شد. سرم خون به‌وسیله‌ی دستگاه سانتریفیوژ (با دور ۱۴۰۰g طی ۸ دقیقه) جداسازی و جهت سنجش پارامترهای بیوشیمیایی (TC، LDL و HDL) استفاده شد. برای خالص سازی لوکوسیت‌ها از بخش سلولی باقیمانده، طی دو مرحله، لایزیز بافر (Lysis buffer) شامل ۸/۰۲ گرم NH4CL و ۰/۸۴ گرم NAHCO3 و ۰/۳۷ گرم EDTA و ۱۰۰۰ سی سی H2O) به آن اضافه گردید و در هر مرحله ۵ دقیقه در دستگاه Shaker (لرزاننده) گذاشته شد و بعد از هر مرحله لرزش از دستگاه سانتریفیوژ با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (به ترتیب با دور ۱۸۰۰ گرم و ۲۴۰۰ گرم) به مدت ۵ دقیقه استفاده گردید. سپس، رسوب لوکوسیت‌ها در ته لوله آزمایش با کمی لایزیز بافر شستشو داده و به میکروتیوب منتقل شد. جهت ته نشینی لوکوسیت‌ها از دور ۷۰۰۰ سانتریفیوژ به مدت ۱ دقیقه استفاده شد و در انتها لایزیز بافر از میکروتیوب‌ها تخلیه گردید (۱۷) سپس RNA طبق پروتکل کیت RNx plus (شرکت سینا ژن، ساخت ایران)، از لوکوسیت‌ها استخراج و غلظت آن به‌وسیله اسپکتروفوتومتر nanodrop اندازه‌گیری گردید (۱۸) پس از تعیین میزان RNA از کیت سنتز cDNA (شرکت پارس توس- ساخت ایران) شامل: ۱ میکرولیتر (dt) Oligo و DEPC-treated water و ۱۰ میکرولیتر RT premix به همراه ۱میکروگرم Template RNA برای سنتز cDNA طبق پروتکل کیت استفاده شد. برای افزایش سنتز cDNA پلیت‌های چاهک دار حاوی ژن به دستگاه PCR وارد شده و در طول دوره‌های مختلف cDNA سنتز شد و سپس باند بیان ژن نمونه‌ها بر روی ژل الکتروفورز مشاهده گردید. جهت سنجش میزان بیان ژن ABC A1 به کمک دستگاه Real-Time PCR (Bio-Rad) از ۲۰ میکرولیتر محلول شامل ۱۰ میکرولیتر Master mix 2x، ۰/۴ میکرولیتر ROX dye 50x، ۱ میلی‌لیتر پرایمر پیشرو و ۱ میلی‌لیتر پرایمر پسرو، Template DNA و Sterilized D.W به روش Real-SYBR Green Time PCR استفاده گردید. کیفیت مراحل آزمون در دمای ۶۲/۵ درجه سلسیوس در زمان دو ساعت و پنج دقیقه (۲:۰۵´) شامل سه فاز خطی، نمایی و کفه (The liner phase, exponential phase and plateau phase) در ۴۵ سیکل ثبت گردید. از ژن GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphatdehydrogenase) برای house keeping استفاده شد (۱۸) (جدول ۱). آنالیز داده‌های

حاصله به‌صورت ΔΔCT است. پرایمرهای پیشرو و پسرو به صورت زیر طراحی شدند (۱۹) (جدول ۱).

جدول۱. مشخصات پرایمرهای پیشرو و پسرو مربوط به ژن ABC A1 وGAPDH

پرایمر	توالی (3→5)	طول	در صد CG	دمای ذوب
پرایمر پیشروABC A1	ACTTCCTCCGAGCCAAGAAG	۲۰	۵۵	۹۵°C
پرایمر پسرو ABC A1	GCCAGCCCTTGTTATTGAAC	۲۰	۵۰	
پیشروGAPDH	GCAAGAGCACAAGAGGAAGA	۲۰	۵۰	۹۵°C
پسروGAPDH	ACTGTGAGGAGGGGAGATTC	۲۰	۵۵	

سنجش پارامترهای بیو شیمیایی (لیپیدهای) خون به روش فتومتریک

پارامترهای بیوشیمیایی (TC، LDL و HDL) با استفاده از کیت‌های تشخیص کمی (شرکت پارس آزمون-ساخت ایران) به روش فتومتریک به کمک دستگاه اتوآنالایزر آلفا اندازه‌گیری شد. جهت سنجش لیپیدی، مخلوط ۱۰ میکرولیتر استاندارد، ۱۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰۰۰ میکرولیتر معرف بلانک به همراه ۱۰۰۰ میکرولیتر نمونه را در دمای ۲۵ درجه به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه نموده و سپس سنجش در طول موج ۵۴۶ نانومتر انجام گرفت. فتومتر با بلانک روی صفر تنظیم شده بود. برای تجزیه و تحلیل اطلاعات از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه با تست تعقیبی توکی استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ در سطح خطای ۵ درصد تحلیل شدند.

۳. ملاحظات اخلاقی

موافقت با این تحقیق در بند ۱۶ مصوبه یکصد و شصت و دومین جلسه کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان مورخه ۹۵/۴/۲۰ اعلام و مجوز آن به شماره ۲۹/۵/۱/۱۷۹۹/ب مورخه ۱۳۹۵/۵/۱۰ صادر گردید.

۴. یافته‌ها

در یک مطالعه مقایسه‌ای در زمینه اثر کوئرستین و عصاره هیدروالکلی استخراجی از گیاه گلدر با داروی آتورواستاتین برروی بیان ژن ABC A1 در مدل رت نر هیپرکلسترولمی نژاد ویستار، تفاوت معناداری در بیان ژن ABC A1 (در سطح mRNA) در گروه‌های تجربی، شم و کنترل مشاهده شد، به‌طوری‌که بیان ژن ABC A1 در گروه‌های تجربی (مصرف‌کننده آتورواستاتین، کوئرستین و عصاره هیدروالکلی) به طور معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد (p<۰/۰۵). بیان این ژن در گروه شم نسبت به گروه کنترل کاهش داشت (p<۰/۰۵). افزایش بیان ژن مذکور در گروه‌های مصرف کننده‌ی عصاره و آتورواستاتین (p<۰/۰۵) و در گروه مصرف کننده کوئرستین (p<۰/۰۱) نسبت به گروه شم مشهود بود. این یافته‌ها نشان داد که کوئرستین موجب افزایش معنی‌داری در بیان ژن ABC A1 در مقایسه با آتورواستاتین گردید (p<۰/۰۵)، اما افزایش بیان ناشی از مصرف عصاره هیدروالکلی در مقایسه با آتورواستاتین معنی‌دار نبود (جدول۲ و نمودار ۱). تجزیه و تحلیل منحنی ذوب نشان داد که کیفیت مراحل آزمون در دمای ۶۲/۵ درجه سلسیوس در زمان دو ساعت و پنج دقیقه (´۲:۰۵) با سه فاز خطی، نمایی و کفه (The (liner phase, exponential phase and plateau phase در ۴۵ سیکل ثبت گردید.

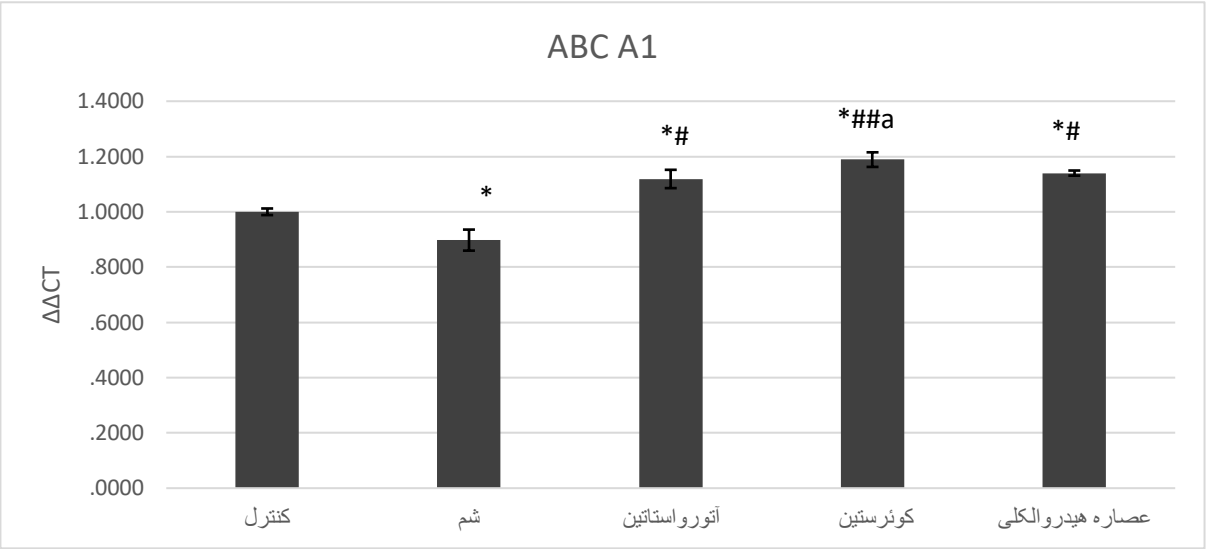
جدول۲. تغییرات بیان ژن ABC A1 پس از ۲۸ روز تیمار درگروه‌های مورد مطالعه (میانگین ± انحراف معیار)

گروه‌ها / پارامتر	کنترل	شم	آتورواستاتین (تجربی ۱)	کوئرستین (تجربی ۲)	عصاره هیدروالکلی (تجربی۳)
تغییرات بیان ژن ABC A1 براساس ΔΔCT	۰،۰۱۱ ± ۱،۰۰	*۰،۰۳ ±۰،۸۹	*#۰،۰۳ ±۱،۱۱	*##a۰،۰۳±۱،۱۸	*#۰،۰۹±۱،۱۴

* اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل (p<۰/۰۵)، # اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه شم (p<۰/۰۵)

اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه شم (p<۰/۰۱)، a اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه آتورواستاتین (p<۰/۰۵).

نمودار ۱. نمودار تغییرات بیان ژن ABC A1 بعد از ۲۸ روز تیمار در گروه‌های مورد مطالعه.



* اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل ($p < ۰/۰۵$)، # اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه شم($p < ۰/۰۵$).
اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه شم ($p < ۰/۰۱$)، a اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه آتورواستاتین($p < ۰/۰۵$).

گروه شم افزایش معنی‌داری در سطح توتال کلسترول (TC) و لیپو پروتئین کم دانسیته (LDL) سرم ($p<۰/۰۱$) و کاهش معنی‌داری در میزان HDL ($p<۰/۰۵$) نسبت به گروه کنترل نشان داد. آتورواستاتین و کوئرستین ($p<۰/۰۱$) و عصاره هیدروالکلی ($p<۰/۰۵$) باعث کاهش سطح توتال کلسترول (TC) و لیپو پروتئین کم دانسیته (LDL) سرم نسبت به گروه شم شدند. تأثیر آتورواستاتین بر کاهش LDL سرم نسبت به کوئرستین و عصاره هیدروالکلی بیشتر بود ($p<۰/۰۵$). کوئرستین و عصاره هیدروالکلی موجب افزایش سطح HDL سرم نسبت به گروه‌های شم وکنترل شدند ($p<۰/۰۵$). افزایش سطح HDL در گروه مصرف‌کننده آتورواستاتین معنی‌دار نبود (جدول ۳).

جدول ۳. تغییرات لیپیدهای سرم پس از ۲۸ روز تیمار در گروه‌های مورد مطالعه (میانگین ± انحراف معیار)

گروه‌ها / پارامترها	کنترل	شم	آتورواستاتین (تجربی۱)	کوئرستین (تجربی۲)	عصاره هیدروالکلی (تجربی۳)
TC (میلی گرم/دسی لیتر)	۲,۵۵±۸۵,۴۳	**۱۳,۱۰±۱۴۱,۵	*##۳,۹۰±۹۴,۱۸	##۲,۱۵±۸۹,۶۴	*#۲,۹۱±۱۰۱,۵
LDL (میلی گرم/دسی لیتر)	۲,۸۷±۷۴,۵۲	**۱۲,۴۹±۱۲۵,۵۱	##۲,۰۵±۷۸,۵۳	*##a۳,۸۴±۸۴,۰۷	*#a۶,۱۴±۸۷,۰۲
HDL (میلی گرم/دسی لیتر)	۲,۷۰±۶۷,۳۵	*۲,۵۳±۶۱,۳۰	۷,۵۴±۷۰,۳۵	*#۶,۶۹±۸۱,۱۰	*#۵,۲۲±۷۸,۰۰

* اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل($p<۰/۰۵$)، **اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل($p<۰/۰۱$).
# اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه شم($p<۰/۰۵$)، ## اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه شم ($p<۰/۰۱$).
a اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه آتورواستاتین($p<۰/۰۵$).

۵. بحث

هیپرکلسترولمی از عوامل خطر بروز آترواسکلروز است که یک بیماری التهابی با نقص در متابولیسم لیپیدی بوده و در آن سخت شدن دیواره و تنگی مجرای شریان‌ها با رسوب لیپید و کلسترول کم‌چگال بر روی لایه اینتیما-مدیای آن‌ها مشهود است (۱). هیپرکلسترولمی، سلول‌های اندوتلیال را در شریان فعال می‌کند که سبب به دام انداختن لیپوپروتئین‌ها به خصوص لیپوپروتئین‌های کم چگال به عنوان عامل اصلی در فرآیند تشکیل پلاک می‌گردد، هم‌چنین باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو می‌شود و علاوه بر این، مسئول افزایش فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو است که نهایتاً سبب آسیب سلولی می‌شود (۲). ترانس پورتر ABC A1 که از

بیان ژن ABC A1 حاصل می‌شود، یکی از میانجی‌گرهای کلیدی خروج کلسترول از سلول‌ها و انتقال معکوس آن به کبد است که به عنوان تسهیل‌کننده خروج کلسترول سلولی به Apo A1 که بخشی از HDL است، عمل می‌نماید. این ترانسپورتر عملکرد ضدآتروژنیک دارد و در پیشگیری از بروز آترواسکلروز مؤثر است (۲۰).

در مطالعه ما که اثر عصاره هیدروالکلی و کوئرستین استخراجی از گیاه گلدر در مقایسه با داروی آتورواستاتین بر بیان ژن ABC A1 در رت‌های نر نژاد ویستار هیپرکلسترولمی مورد بررسی قرارگرفت، معلوم شد که هر سه ماده بیان این ژن را در سطح mRNA افزایش داده و کوئرستین مؤثرتر از آتورواستاتین عمل می‌نماید.

نتایج گروه دوم (گروه شم) در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که بیان ژن ABC A1 و سطح HDL سرم کاهش و سطوح TC و LDL افزایش پیدا کرد.

کاهش بیان ژن ABC A1 منجر به کاهش سطح ترانسپورتر ABC A1 می‌شود و این موضوع یک عامل اساسی در تداوم هیپرکلسترولمی و بروز ضایعات آترواسکلروزی است. اگر بیان ژن ABC A1 در ماکروفاژها غیر فعال شود، انتقال معکوس کلسترول از ماکروفاژ به کبد و خروج آن از طریق صفرا تا مقدار ۵۰ درصد تنزل می‌یابد که نتیجه آن هیپرکلسترولمی و شروع روند آترواسکلروز است. بین کاهش خروج کلسترول سلولی ناشی از نقص عملکرد ترانسپورتر ABC A1 و افزایش ضخامت دیواره سرخرگ‌ها ارتباط مستقیم وجود دارد (۲۱). کاهش در بیان ترانسپورتر ABC A1 معمولاً منجر به کاهش خروج کلسترول از بافت‌های محیطی شده و آن هم به نوبه خود باعث کاهش تشکیل HDL کلسترول پلاسمایی (HDL-C) و در نتیجه بروز آترواسکلروز می‌گردد. سطوح پایین HDL-C و سطوح بالای LDL-C فاکتورهای خطر مهمی برای بیماری قلبی عروقی آترواسکلروتیک می‌باشند (۲۲).

لیو و دیگران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴ گزارش نمودند که ox-LDL مس‌دار شده (oxLDL= oxidized low-density Lipoprotein) در ماکروفاژهای THP-1 سبب سرکوب و مهار بیان ژن ABC A و کاهش خروج کلسترول از آن‌ها می‌شود (۲۰). ژیانگ- مینگ سو و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که غلظت‌های بالای ox-LDL موجب کاهش بیان mRNA ی ABC A1 در مونوسیت‌ها شده و محتوی کلسترول و لیپید سلولی افزایش می‌یابد (۲۳). ترانسفکشن (Transfection)، ژن ABC A1 در سلول‌های اندوتلیال محتوی کلسترول سلولی را کاهش و خروج کلسترول میانجی شده با Apo A1 را افزایش می‌دهد. بیش‌بیانی ABC A1 در این سلول‌ها از طریق پمپ کلسترول به خارج مانع از تجمع کلسترول اضافی در آن‌ها می‌شود. بنابراین ABC A1 نقش مهمی در هموستازی کلسترول در اندوتلیال رگی بازی می‌کند (۲۲). در مطالعه ما هم مصرف کلسترول ۲ درصد و غذای پرچرب موجب افزایش غلظت لیپیدهای پلاسمایی از جمله کلسترول، LDL و کاهش HDL در گروه شم شد که به نظر می‌رسد به تبع آن میزان ox-LDL هم افزایش یافته و احتمالاً این موضوع باعث کاهش بیان ژن ABC A1 در این گروه و در نتیجه تداوم هیپرکلسترولمی باشد.

نتایج گروه سوم (تجربی۱) در مقایسه با گروه شم و کنترل نشان داد که آتورواستاتین، موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن ABC A1 شده و کاهش معنی‌دار در سطوح TC و LDL سرم را سبب گردید. توتال کلسترول و LDL فاکتورهای خطر در بروز بیماری ایسکمی قلبی (IHD) بوده و سطوح آن‌ها از طریق دارودرمانی با استاتین‌ها کاهش می‌یابد. استاتین‌ها سبب کاهش LDL و جلوگیری از بروز ترومبوز، ایسکمی و توسعه آترواسکلروز می‌شوند. این داروها بیان ترانسپورترهای کلسترول از جمله ABC A1، ABC G1 در کبد، روده، بافت چربی و پوست را افزایش می‌دهند. هم چنین موجب افزایش بیان Apo A1در هپاتوسیت‌ها می‌شوند. افزایش بیان ABC A1 و ABC G1 منجر به انتقال بیشتر کلسترول به Apo A1 می‌شود که آن هم به نوبه خود موجب تشکیل بیشتر ذرات HDL شده و بدین ترتیب انتقال معکوس کلسترول از طریق HDL به کبد افزایش می‌یابد و کلسترول لازم برای سنتز اسیدهای صفراوی

در کبد فراهم می‌گردد (۲۴). آتورواستاتین از طریق کاهش سطح کلسترول و مالونیل دی آلدئید (MDA) دارای اثرات محافظت‌کنندگی از رگ‌ها در رت‌ها می‌باشد (۲۵).

احمدی و همکاران در سال ۲۰۱۷ بیان کردند آتوراستاتین موجب القای افزایش بیان اجزای دخیل در فرآیند انتقال معکوس کلسترول از جمله ABC A1, Apo A1 و ABC G1 می‌شود. هم‌چنین موجب افزایش بیان رسپتور LDL در هپاتوسیت‌ها شده و بنابراین مقدار LDL-C را در گردش خون می‌کاهد. علاوه‌براین، آنزیم اصلی مسیر بیوسنتز کلسترول یعنی هیدروکسیل متیل گلوتاریل کوآنزیم A رودوکتاز (HMG CR) را در هپاتوسیت‌ها مهار می‌نماید (۲۴). اثرات آتورواستاتین روی بیان ABC A1 وابسته به میزان کلسترول موجود در ماکروفاژ است. به‌طوری‌که در ماکروفاژهای سرشار از لیپید موجب تنظیم افزایشی بیان آن می‌گردد. آتورواستاتین با افزایش بیان ژن ABC A1و افزایش انتقال کلسترول به Apo A1 و تشکیل HDL_3 سبب کاهش کلسترول سلولی و در نتیجه کاهش LDL-C می‌شود (۲۶). یافته‌های ما هم حاکی از اثر افزایشی آتورواستاتین بر بیان ژن ABC A1 به عنوان ژن پیشگیری‌کننده از هیپرکلسترولمی بود.

گروه چهارم (تجربی۲) که فرآورده کوئرستین دریافت کردند، افزایش معنی‌داری در بیان ژن ABC A1 و سطح HDL و کاهش معنی‌داری در سطوح TC وLDL سرم نشان دادند.

لاخانپال و همکاران در سال ۲۰۰۸ بیان نمودند که کوئرستین یک ماده غذایی آنتی اکسیدانت است که طیف وسیعی از اثرات بیولوژیکی و فارماکولوژیکی (از جمله اثرات وازودیلاتوری، آنتی ترومبوتیک، آنتی ایسکمیک، آنتی ریتمیک، آنتی اکسیداتیو و عمدتاً آنتی‌هایپرتنسیو) را در حیوانات و انسان علاوه بر اعمال آنتی اکسیداتیو و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد به نمایش می‌گذارد و افزایش مصرف آن با کاهش خطر بیماری‌های قلبی عروقی همراه می‌باشد (۲۷). آرینا و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش نمودند که کوئرستین دارای اثرات آنژیوژنز، ضد التهابی و مهارکننده‌ی رادیکال‌های آزاد می‌باشد. مصرف آن عوارض رگی و بافتی القا شده توسط دیابت را در آئورت سینه‌ای رت‌ها می‌کاهد (۲۸). احتمالاً اثرات آنتی هیپرتانسیو، آنتی ایسکمی و ضد التهابی کوئرستین ناشی از اثر مثبت آن بر بیان ژن ABC A1 است.

در گروه پنجم تحقیق ما (تجربی۳)که عصاره هیدروالکلی گیاه گلدر را دریافت کردند، افزایش معنی‌داری در بیان ژن ABC A1 مشاهده گردید که با افزایش معنی دار سطح HDL و کاهش معنی دار سطح TC و LDL سرم در این گروه همراه بود. دوراندیشان و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش کردند که عصاره آبی گلدر موجب کاهش مؤثر در سطوح LDL و توتال کلسترول خون در رت‌های نر دیابتی نژاد ویستار می‌شود (۲۹). هم‌چنین باقرزاده و همکاران در تحقیقی بیان کردند که عصاره آبی ریشه گلدر موجب کاهش معنی‌دار در توتال کلسترول، تری گلیسرید، لیپو پروتئین کم دانسیته و گلوکز در رت‌های آلبینوی هیپرلیپیدمیک دیابتی می‌شود (۳۰). احتمالاً اثرات فوق‌الذکر عصاره گلدر خصوصاً کاهش کلسترول و LDL خون ناشی از تأثیر مثبت عصاره این گیاه بر بیان ژن ABC A1 باشد.

در مطالعه ما هم کوئرستین و عصاره هیدروالکلی گیاه گلدر موجب افزایش معنی دار سطح HDL وکاهش معنی‌دار توتال کلسترول و LDL سرم خون در رت‌های نر هیپرکلسترولمی نژاد ویستار شد که به نظر می‌رسد نتیجه افزایش معنی‌دار در بیان ژن ABC A1 باشد.

موش‌هایی که ژن ABC A1 آن‌ها ناک اوت شده (مثل بیماران Tangier که این ژن درآن‌ها جهش یافته است) دارای سطوح HDL پایین و افزایش تجمع کلسترول در بافت‌ها می‌باشند. اما موش‌های تراژنی که ژن ABC A1 را دریافت کرده‌اند، خروج کلسترول از ماکروفاژهای آن‌ها افزایش یافته و تشکیل آسیب‌های آترواسکلروتیک کاهش می‌یابد (۳).

با توجه به مطالعات مذکور چنین برمی‌آید که افزایش بیان ژن ABC A1 منجر به افزایش تولید ترانسپورتر ABC A1 شده و این ترانسپورتر هم از طریق پمپ نمودن کلسترول سلولی به Apo A1 منجر به افزایشHDL پلاسمایی (به عنوان فاکتور آنتی آتروژنیک) می‌گردد و بدین ترتیب در انتقال معکوس کلسترول و جلوگیری از هیپرکلسترولمی و آترواسکلروز ایفای

نقش می‌نماید. چنین استنباط می‌گردد که عصاره هیدروالکلی گیاه گلدر و کوئرستین استخراجی از آن از طریق افزایش بیان ژن ABC A1 موجب کاهش کلسترول و دیگر لیپیدهای خون شده و دارای خاصیت آنتی آترواسکلرتیک است، پس لازم است در مطالعات دیگر مکانیسم مولکولی آن مورد بررسی قرار گیرد. در مطالعه ما نشان داده شد که کوئرستین استخراجی و عصاره هیدرالکلی گیاه گلدر بیان mRNAی مربوط به ژن ABC A1 را افزایش داده که احتمالاً به تبع آن بیان ترانسپورتر ABC A1 هم برای انتقال معکوس کلسترول افزایش یافته است. از محدودیت‌های این مطالعه گران‌قیمت بودن مواد، لوازم و تجهیزات موردنیاز بود.

۶. نتیجه‌گیری

آتورواستاتین، عصاره هیدروالکلی گیاه گلدر و کوئرستین استخراجی از آن دارای اثرات افزایشی معنی‌دار بر بیان ژن ABC A1 در لوکوسیت‌ها هستند که در این میان تأثیر کوئرستین بر بیان ژن مذکور به طور معنی‌داری از آتورواستاتین هم بیشتر است. پروتئین حاصل از بیان mRNA این ژن احتمالاً با افزایش انتقال معکوس کلسترول از سلول‌ها به کبد و دفع آن از طریق صفرا از ایجاد هیپرکلسترولمی و عوارض آن جلوگیری می‌نماید.

پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی، مکانیسم مولکولی اثر افزایشی عصاره هیدروالکلی گلدر و کوئرستین استخراجی از آن بر بیان ژن ABC A1 بررسی گردد.

۷. تقدیر و تشکر

این مقاله منتج از پایان نامه دانشجویی مقطع دکترا است و هیچ‌گونه حامی مالی نداشته است. بدین‌وسیله از کلیه کسانی که در انجام این پژوهش با ما همکاری نمودند کمال امتنان را داریم.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease. Circulation research. 2016; 118(4):535-46.
2. Shanmugam N, Roman-Rego A, Ong P, Kaski JC. Atherosclerotic plaque regression: fact or fiction? Cardiovascular drugs and therapy. 2010; 24(4):311-7.
3. Hayden MR, Clee SM, Brooks-Wilson A, Genest Jr J, Attie A, Kastelein JJ. Cholesterol efflux regulatory protein, Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. Current opinion in lipidology. 2000; 11(2):117-22.
4. Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. Human genomics. 2009; 3(3):281-90.
5. Langmann T, Mauerer R, Zahn A, Moehle C, Probst M, Stremmel W, et al. Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. Clinical chemistry. 2003; 49(2):230-8.
6. Song G, Liu J, Zhao Z, Yu Y, Tian H, Yao S, et al. Simvastatin reduces atherogenesis and promotes the expression of hepatic genes associated with reverse cholesterol transport in apoE-knockout mice fed high-fat diet. Lipids in health and disease. 2011; 10(1):8-14.
7. Shimizu T, Miura S-i, Tanigawa H, Kuwano T, Zhang B, Uehara Y, et al. Rosuvastatin Activates ATP-Binding Cassette Transporter A1–Dependent Efflux Ex Vivo and Promotes Reverse Cholesterol Transport in Macrophage Cells in Mice Fed a High-Fat DietSignificance. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2014; 34(10):2246-53.
8. Genvigir FDV, Rodrigues AC, Cerda A, Arazi SS, Willrich MAV, Oliveira R, et al. Effects of lipid-lowering drugs on reverse cholesterol transport gene expressions in peripheral blood mononuclear and HepG2 cells. Pharmacogenomics. 2010; 11(9):1235-46.
9. Taylor F, Ward K, Moore T, Burke M, Davey Smith G, Casas JP, et al. Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. Cochrane database syst rev. 2011; 1(1):1-72.
10. Shrififar F, Yassa F, Shafiee A. Antioxidant activity of Otostegia persica (Labiatae) and its constituents. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2010; 2(4):235-9.
11. Vecera R, Zacharova A, Orolin J, Skottova N, Anzenbacher P. The effect of silymarin on expression of selected ABC transporters in the rat. Veterinarni Medicina 2011; 56 (2): 59–62.
12. Yeh YT, Chiang AN, Hsieh SC. Chinese Olive (Canarium album L.) Fruit Extract Attenuates Metabolic Dysfunction in Diabetic Rats. Nutrients 2017, 9, 1123; doi:10.3390/nu9101123.pages:1-18.
13. Sadeghi Z, Akaberi M, Valizadeh J. Otostegia persica (Lamiaceae): A review on its ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology. Avicenna journal of phytomedicine. 2014; 4(2):79-88.
14. Amna B, Uzma S, Umme HH, Farha A, Ambreen MU. Hyperlipidemia and hypertension; cardiovascular risk factors, various induction methods and their management by ethnomedicines. International Research Journal of Pharmacy. 2016; 7(11):1-9.
15. Sharifi N, Mahernia S, Amanlou M. Comparison of Different Methods in Quercetin Extraction from Leaves of Raphanus sativus L. Pharmaceutical Sciences. 2017; 23(1):59-65.
16. Lekar A, Borisenko S, Vetrova E, Sushkova S, Borisenko N. Extraction of quercetin from Polygonum hydropiper L. by subcritical water. American Journal of Agricultural and Biological Sciences. 2014; 9(1):1-5.
17. Boyd M, Tennant S, Melendez J, Toema D, Galen J, Geddes C, et al. Adaptation of red blood cell lysis represents a fundamental breakthrough that improves the sensitivity of Salmonella detection in blood. Journal of applied microbiology. 2015; 118(5):1199-209.
18. Hamidinia M, Boroujerdnia MG, Talaiezadeh A, Solgi G, Roshani R, Iranprast S, et al. Increased P-35, EBI3 transcripts and other treg markers in peripheral blood mononuclear cells of breast cancer patients with different clinical Stages. Advanced pharmaceutical bulletin. 2015; 5(2):261-7.
19. Chen Z, Lei Y-L, Wang W-P, Lei Y-Y, Liu Y-H, Hei J, et al. Effects of Saponin from Trigonella Foenum-Graecum Seeds on Dyslipidemia. Iranian journal of medical sciences. 2017; 42(6):577-85.
20. Liu H-Y, Cui H-B, Chen X-M, Chen X-Y, Wang S-H, Du W-P, et al. Imbalanced response of ATP-binding cassette transporter A1 and CD36 expression to increased oxidized low-density lipoprotein loading contributes to

the development of THP-1 derived foam cells. The Journal of Biochemistry. 2014; 155(1):35-42.
21. Wang M-D, Franklin V, Marcel YL. In vivo reverse cholesterol transport from macrophages lacking ABCA1 expression is impaired. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2007; 27(8):1837-42.
22. Liao H, Langmann T, Schmitz G, Zhu Y. Native LDL upregulation of ATP-binding cassette transporter-1 in human vascular endothelial cells. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2002; 22(1):127-32.
23. Su X-M, Wei Y, Wang Y, Zhang W. ABCA1 mRNA expression and cholesterol outflow in U937 cells. International journal of clinical and experimental pathology. 2015; 8(3):3116-21.
24. Ahmadi Y, Ghorbanihaghjo A, Argani H. The effect of statins on the organs: similar or contradictory? Journal of cardiovascular and thoracic research. 2017; 9(2):64-70.
25. Srinivas M, Annapurna A, Reddy YN. Anti-atherosclerotic effect of atorvastatin and clopidogrel alone and in combination in rats. Indian J Exp Biol. 2008; 46(10):698-703.
26. Argmann CA, Edwards JY, Sawyez CG, O'Neil CH, Hegele RA, Pickering JG, et al. Regulation of macrophage cholesterol efflux through hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibition a role for RhoA in ABCA1-mediated Cholesterol efflux. Journal of Biological Chemistry. 2005; 280(23):22212-21.
27. Lakhanpal P, Rai DK. Role of quercetin in cardiovascular diseases. Internet Journal of Medical Update. 2008; 3(1):31-49.
28. Chis IC, Coseriu A, Simedrea R, Oros A, Nagy AL, Clichici S. In Vivo Effects of Quercetin in Association with Moderate Exercise Training in Improving Streptozotocin-Induced Aortic Tissue Injuries. Molecules. 2015; 20(12):21770-86.
29. Dourandishan M, Hossieni M, Malekaneh M, Bagherzade G. Effect of Otostegia persica's root extract on the blood biochemical factors in diabetic hyperlipidemic rats. The Horizon of Medical Sciences. 2014; 20(1):17-21.
30. Bagherzade G, Dourandishana M, Malekanehb M. Antidiabetic effects of Otostegia persica root in alloxan-induced diabetic rats. Pure Appl Chem Sci. 2014; 2:1-9.